

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA



ESTUDO QUÍMICO DE ESPONJAS DE ÁGUA-DOCE DOS GÊNEROS
DRULIA, METANIA E SPONGILLA.

UFAM

Vanessa Reis Campos
Bolsista CNPq

MANAUS
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA



RELATÓRIO FINAL

PIB-E-/0021/2008

ESTUDO QUÍMICO DE ESPONJAS DE ÁGUA-DOCE DOS GÊNEROS
DRULIA, METANIA E SPONGILLA.

Vanessa Reis Campos
Bolsista CNPq

Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior
Orientador

Manaus - 2009

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Departamento de Apoio à Pesquisa e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Grupo de Pesquisas em Química de Biomoléculas da Amazônia (Q-BiomA) na Universidade Federal do Amazonas – UFAM

LISTA DE ABREVIATURAS

T2A15- *Drulia cristata*. Segunda coleta realizada no Tapajós, local 1, Igarapé do Encanto Aramanaí, Santarém-PA. Especime 15. Data de coleta: 17/09/2007.

T2A16- *Metania fittkaui*. Segunda coleta realizada no Tapajós, local 1, Igarapé do Encanto Aramanaí, Santarém-PA. Especime 16. Data de coleta: 17/09/2007.

T2B18- *Drulia uruguayensis*. Segunda coleta realizada no Tapajós, local 2, Região dos Barrancos, Santarém- Pará. Especime 18. Data de coleta: 17/09/2007.

J1A- *Drulia browni*. Primeira coleta realizada no Lago do Januári, local 1, Manaus-AM. Data de coleta: 05/09/2007.

PL1A- *Drulia browni*. Primeira coleta realizada acima da Praia da lua, local 1, Manaus-AM. Data de coleta: 05/12/2007.

Tu1A- *Metania reticulata*. Primeira coleta realizada no Lago do Tupé, local 1, Ponta da Pedra, Manaus – AM. Data de coleta: 22/09/2007.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3 MÉTODOS UTILIZADOS	12
3.1 Análises Espectométricas.....	12
3.1.1 Fluorescência de raios-x.....	12
3.1.2 Espectometria de Massas.....	12
3.2 Determinação de Fenóis Totais	12
3.3 Toxicidade frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i>.....	12
3.4 Atividade inibitória a enzima acetilcolinesterase.....	12
3.5 Atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH.....	12
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	13
4.1 Fluorescência de raios-x	13
4.2 Espectometria de massas	14
4.3 Determinação de Fenóis Totais	14
4.4 Toxicidade frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i>.....	15
4.5 Atividade inibitória a enzima acetilcolinesterase.....	16
4.6 Atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH.....	17
5 CONCLUSÃO.....	18
6 REFERÊNCIAS	19
7 CRONOGRAMA EXECUTADO.....	21

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Ilustração 01-** Gráfico do Espectro de Fluorescência de Raios-X das amostras de *Drulia cristata* e *Drulia uruguayensis* sobrepostas.....13
- Ilustração 02-** Gráfico da comparação dos elementos químicos presente nas amostras de *Drulia cristata* e *Drulia uruguayensis*.....14
- Ilustração 03-** Placa de acetilcolineasterase em acetato, (1) *Drulia browni*; (2) *Drulia cristata*; (3) *Drulia uruguayensis*; (4) *Metania reticulata*; (5) *Metania fitthai* e (6) Solvente.....16
- Ilustração 04-** Placa de acetilcolineasterase em metanol, (1) *Drulia browni*; (2) *Drulia cristata*; (3) *Drulia uruguayensis*; (4) *Metania reticulata*; (5) *Metania fitthai* e (6) Solvente.....16
- Ilustração 05-** Placa para DPPH em hexano. (1) *Drulia browni*; (2) *Drulia cristata*; (3) *Drulia uruguayensis*; (4) *Metania reticulata*; (5) *Metania fittkai*; (6) Quercetina (Padrão).....17

LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Resultados referentes ao Ensaio de Fenóis Totais.....	15
Tabela 02- Resultados obtidos no Ensaio Citotóxico frente ao microcrustáceo <i>Artemia Salina</i>	16
Tabela 03- Resultado qualitativo para o Ensaio de inibição a enzima de Acetilcolineasterase.....	17

RESUMO

As esponjas são organismos comumente encontrados no meio marinho. Apresentam várias e destacadas funções dentre elas: aplicações no mercado de óleo essenciais, shampoos, fármacos, e como indicadores ambiental. Conhecidas por serem ricas em metabólitos secundários, fontes potenciais de alguns metabólitos únicos, o que inclui substâncias citotóxicas e com atividade anticancerígena, as esponjas têm sido extensamente estudadas em todo o mundo.

Cerca de 5000 espécies de esponjas conhecidas pertencem ao ambiente marinho mas apenas 150 espécies são encontradas unicamente em água-doce. No Brasil, os estudos com esponjas de água-doce são mínimos perto da grande quantidade de espécies existentes. Quimicamente, nada foi feito. Na Amazônia, várias esponjas são causadoras de casos de dermatite de contato em ribeirinhos, o mecanismo de ocorrência ainda é desconhecido e podem vir a ser atribuídos à sua composição micromolecular.

Diante destas informações, é observada a deficiência de um estudo preciso das esponjas de água-doce. Este projeto é voltado para a realização de estudos químicos com estes animais, colocando em pauta esponjas dos gêneros: *Drulia*, *Metania* e *Spogilla*.

Os resultados obtidos neste projeto são exclusivos e preliminares para uma nova fase de estudos com focos mais amadurecidos voltados para esponjas de água-doce da Amazônia.

Inibição de colinesterases, avaliações químicas preliminares, atividade antioxidante e análises inorgânicas foram realizadas, mostrando que o potencial de estudo é ainda maior que o imaginado anteriormente e a continuidade do trabalho promete resultados muito interessantes.

ABSTRACT

Sponges are organisms currently observed at marine environment. They have several functions to human beings, including: market applications of essential oils, shampoos, drugs, and as an environmental indicator. Known to be rich in secondary metabolites, potential sources of unique metabolites, which include substances with cytotoxic and anticancer activity, sponges have been extensively studied all over the world.

About 5000 known species of sponges belonging to the marine environment but only 150 species are found only in fresh-water. In Brazil, studies with fresh-water sponges are minimal near the large amount of existing species. Chemically, nothing was done. Sponges in the Amazon are responsible for several cases of contact dermatitis bordering on the mechanism of occurrence is still unknown and could be attributed to their micromolecular composition.

Considering this information, is observed the deficiency of a specific study of fresh-water sponges. This project is aimed for studies chemicals with these animals, specially sponges of *Drulia*, *Metania* and *Spogilla* genus.

The results of this project are unique and preliminary to a new phase of studies to focus more mature towards fresh-water sponges of the Amazon.

Cholinesterasis inhibition, preliminary chemical evaluation, anti-oxidant activity and inorganic analysis were performed, showing that the potential of this study is even bigger than the initially imagine and the continuing of this study promise very interesting results.

1. INTRODUÇÃO

As esponjas são consideradas o grupo de animais Metazoários mais simples pela sua estrutura e a pequena interdependência entre as suas células, ficando um nível um pouco acima dos protozoários que formam colônias. Esponjas de água doce representam apenas 1% do total de esponjas existentes no mundo.

As esponjas podem filtrar a cada hora um volume de água correspondente a dez vezes seu próprio tamanho. Além do grande volume filtrado, já foi demonstrado sua capacidade de retirar até 100% das bactérias presentes na água, o que representa um possível papel na manutenção da qualidade da água, especialmente onde as esponjas são muito abundantes. Elas são ricas em metabólitos secundários, que podem vir a serem utilizados pelas indústrias química e farmacêutica.

Se por um lado estas esponjas podem possuir substâncias bioativas para o tratamento e cura de diversas doenças, por outro lado os episódios de contato com sua estrutura silicosa geram dermatites graves, em especial para as espécies amazônicas, provocando grande número de ocorrências em hospitais da região.

Recurso da biodiversidade ainda inexplorado, o estudo químico desses animais é de extrema importância, uma vez que impactos ambientais podem levar à sua extinção. Visando descrever a composição de esponjas-de-água-doce amazônicas dos gêneros *Drulia*, *Metania* e *Spongilla*, diversos espécimes foram analisados por técnicas cromatográficas e em ensaios biológicos em modelos de *Artemia salina*, Antioxidante frente ao radical livre DPPH, anticolineasterase e anticâncer, além de ensaios iniciais de prospecção fitoquímica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente projeto ilustra um dos muitos nichos de estudo ainda completamente desconhecido do homem: a constituição química das esponjas da Amazônia.

Esponjas são os animais pluricelulares mais antigos que existem, fato atestado tanto pelos estudos filogenéticos quanto pela presença de fósseis datados do período Pré-Cambriano. Consistem de populações de células embebidas em uma matriz gelatinosa sustentada por estruturas calcáreas ou silicosas, geralmente com formas aciculares, chamadas de espículas. Existem mais de 5000 espécies de esponjas classificadas no filo Porífera, que é composto por três grupos distintos: Hexactinellida, Demospongiae e Calcarea¹.

A característica primitiva das esponjas faz com que apresentem biomembranas únicas. Estas membranas possuem uma alta proporção de ácidos graxos pouco comuns². Desde a década de 1950, mais de 5500 metabólitos produzidos por esponjas foram relatados em mais de 3000 artigos científicos³. Diversas substâncias obtidas de esponjas apresentam estruturas marcadamente diferentes daquelas produzidas por outros seres e, muitas vezes, com ações farmacológicas únicas.

Apesar de mais de 5000 das espécies de esponjas conhecidas pertencerem ao ambiente marinho, cerca de 150 espécies são encontradas unicamente em água-doce. As esponjas de água-doce, como todas as esponjas marinhas, contêm poros, através dos quais filtram grandes quantidades de água, capturando pequenas partículas e principalmente bactérias para sua alimentação¹.

No Brasil, os primeiros registros de esponjas de água doce foram feitos a partir da segunda metade do século XIX, sobre espécimes coletados na Amazônia por naturalistas e viajantes europeus, totalizando 17 espécies, das quais 13 ainda constituem espécies válidas. Estudos abrangentes sobre a taxonomia de esponjas de água doce Brasileiras foram realizados por Volkmer-Ribeiro e colaboradores^{6,7,8}, com destaque para as da Região Amazônica, sendo atualmente descritas 44 espécies de esponjas de água doce no Brasil, distribuídas em 20 gêneros⁹.

Além de serem conhecidas por serem ricas em metabólitos secundários, fontes potenciais de metabólitos únicos, incluindo substâncias citotóxicas e com atividade anticancerígena, as esponjas são consideradas excelentes indicadores ambientais devido ao modo de alimentação por filtração, que expõe estes organismos a quaisquer compostos presentes na água^{13,14,15,16}, o que motiva estudos de composição química orgânica e inorgânica.

O estudo de esponjas de água doce na Amazônia apresenta diversos pontos de interesse, sejam eles ecológicos, como indicadores de elementos ambientais, uma vez que são filtradoras da água em que vivem; econômicos, para a produção de cerâmicas nobres, como chips de computador^{6,10}; entre vários outros, que incluem o conhecimento para a preservação da espécie.

Algumas destas esponjas provocam grande número de ocorrências em hospitais da região Amazônica por episódios de contato que geram dermatites graves. O mecanismo de ocorrência dos danos ainda não está completamente elucidado e deve ser mais bem estudado, podendo ser atribuído à composição micromolecular das esponjas. Há, ainda, questões comerciais ligadas à questão ecológica. Vários peixes dos lagos Amazônicos se alimentam destas esponjas, tendo sido encontradas espículas em seus aparelhos digestivos.

Os estudos químicos envolvendo esponjas de água-doce são raros, não sendo facilmente encontrados na literatura. Um artigo recente apresenta uma revisão das cerca de 100 substâncias, entre esteróis, ácidos graxos e lipídios novos, raros ou pouco usuais, identificadas em extratos apolares de esponjas de água-doce¹.

No Brasil, os estudos com esponjas ainda são mínimos frente à quantidade de espécies existentes¹¹. Com relação às esponjas de água doce, não há nenhum estudo químico relatando a composição destes animais, o que constitui um imenso e verdadeiro hiato no conhecimento da biodiversidade Amazônica.

Uma vez que uma única substância que apresente um esqueleto inédito pode levar à constituição de uma nova classe de *“lead compounds”*, uma molécula base para a produção de fármacos que se tornem alternativas ao tratamento de diversas doenças no futuro, como para a tuberculose, o câncer, a AIDS, o Mal de Parkinson ou de Alzheimer, o conhecimento da química de metabólitos secundários destes animais irá contribuir de uma forma inigualável para a evolução da química de metabólitos secundários e, talvez, de novos fármacos.

3 MÉTODOS UTILIZADOS

As esponjas foram coletadas em lagos Amazônicos por zoólogos experientes na área, foram imediatamente congeladas e transportadas para laboratório. A identificação foi feita pela Dra. Cecília Volkmer Ribeiro do Instituto de Zoobotânica do Rio Grande do Sul.

3.1 Análises espectrométricas

3.1.1 Fluorescência de raios-x

Foi utilizado o método de fluorescência de raios-x por dispersão de energia (EDX) em estado sólido, sendo analisados os elementos compreendidos entre o sódio e o urânio.

3.1.2 Espectrometria de Massas

As análises por espectrometria de massas foram realizadas através do acoplamento ao cromatógrafo em fase gasosa. Os extratos obtidos em hexano foram submetidos à análise por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) e por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrômetro de massas (CG-EM).

3.2 Determinação de Compostos Fenólicos Totais

Foi adicionado 1,5mL da solução do reagente de Folin Ciocateu a 0,2mL de solução de cada amostra (extrato e padrão). Após 5 minutos foi adicionado 1,5mL da Solução Tampão de bicarbonato de sódio. A leitura foi feita a 725nm após 90 minutos.

3.3 Toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

Foram realizados ensaios frente ao microcrustáceo *Artemia salina* visando avaliar o potencial tóxico para os extratos em hexano, acetato e metanol das espécies. Os ensaios foram realizados segundo o método desenvolvido por Meyer *et al* (1982). Como controle foi utilizado Lapachol® e os dados foram tratados no software estatístico Probitos.

3.4 Atividade inibitória a enzima acetilcolinesterase

A avaliação qualitativa da atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase foi efetuada de acordo com o ensaio enzimático descrito por Ellman *et al.* (1961) e modificado por Rhee *et al.* (2001). Eserine é utilizado como padrão neste ensaio. A inibição da atividade enzimática é sugerida pelo surgimento de manchas esbranquiçadas sob um fundo amarelo.

3.5 Atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH

Foi realizado o ensaio qualitativo frente ao radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) visando avaliar o potencial redutor das amostras. Quercertina foi utilizada como padrão. O potencial antioxidante frente ao DPPH é sugerida pelo surgimento de manchas amarelas sob um fundo lilás. O ensaio foi realizado em duplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fluorescência de raios-x

Foram analisadas três amostras provenientes de duas espécies do gênero *Drulia*, coletadas em uma mesma região: *Drulia uruguayensis* e *Drulia cristata*. Na região de coleta no rio Tapajós não foi observada qualquer presença humana (choupanas, casas, vilas, etc) a dois quilômetros à montante do ponto de coleta e somente um quilômetro à jusante (Vila de Aramaná). Sendo assim, quaisquer que fossem as características da água do rio Tapajós no período em que estiveram expostas, os espécimes estiveram expostos às mesmas condições.

Nas duas espécies foi observada a presença, já esperada, de silício em grande quantidade, proveniente das espículas que formam o esqueleto deste tipo de esponja.

Em *Drulia uruguayensis* foram detectadas a presença de fósforo, enxofre, cloro, vanádio, zircônio, ferro e cobre .

Em *Drulia cristata*, a análise confirmou a presença de fósforo, cloro, vanádio, ferro e cobre. Além disso, em *Drulia cristata* foram detectados alumínio e manganês .

A sobreposição dos gráficos (Ilustração 01) permite a comparação dos espectros das amostras das duas espécies e a observação da presença de zircônio e de manganês em cada uma delas.

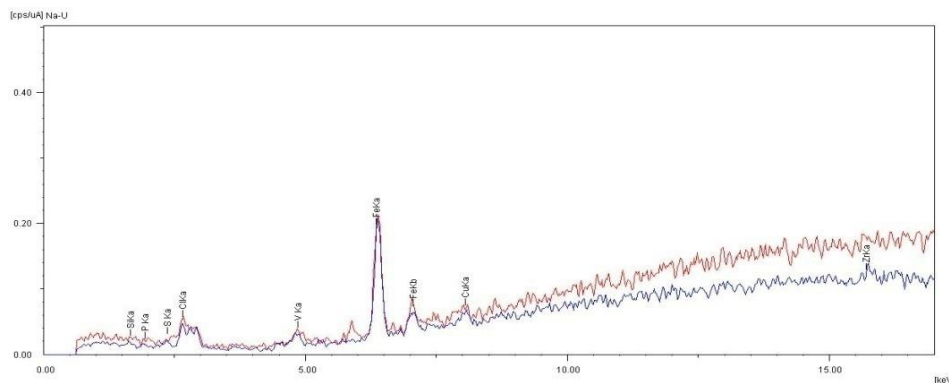


Ilustração 01- Gráfico do Espectro de Fluorescência de Raios-X das amostras de *Drulia cristata* e *Drulia uruguayensis* sobrepostas.

Através dos padrões externos utilizados para a quantificação dos principais elementos detectados foram observadas variações nas três amostras analisadas de cada espécie.

Entre os elementos encontrados em *Drulia uruguayensis*, magnésio foi o que mais variou entre as três amostras da espécie.

Isso também acontece nas amostras de *Drulia cristata*, onde o alumínio é o elemento que apresenta maior variação entre as amostras e o ferro, vanádio e cobre apresentam maior semelhança.

Ao comparar os elementos presentes nas espécies também foi possível observar variações (Ilustração 02). Em *Drulia uruguayensis* foi analisada a grande presença de magnésio diferente da *Drulia cristata* que possui uma grande quantidade de sódio.

O Ferro, o Cobre e o Vanádio estão presentes nos dois gêneros em concentrações parecidas.

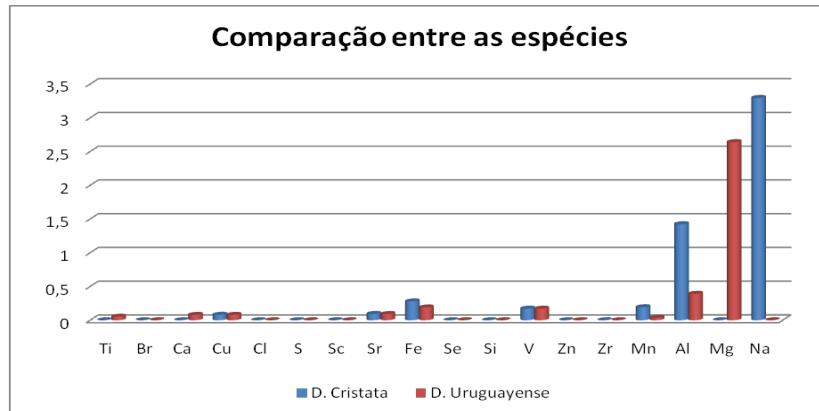


Ilustração 02- Gráfico da comparação dos elementos químicos presente nas amostras de *Drulia cristata* e *Drulia uruguayensis*.

Não se pode afirmar em nenhum dos casos que os elementos aqui encontrados sejam constituintes das espécies estudadas. Uma vez que as esponjas são animais filtradores, estes podem estar concentrando seletivamente os metais observados e este fato é de grande interesse.

4.2 Espectrometria de massas

As análises por espectrometria de massas foram realizadas com os extratos apolares feitos em hexano de três espécies de esponjas, a *Drulia Browni*, a *Metania reticulata* e a *Drulia cristata*, coletadas no lago acima da Praia da Lua, na Praia do Tupé e no rio Tapájos, respectivamente.

Em todas as espécies os resultados evidenciaram a presença de ácidos graxos, hidrocarbonetos, esteróis e outros.

Em *Drulia cristata* cerca de 67,13% da composição são esteróis; 17,48% são ácidos graxos; 9,65% são hidrocarbonetos e 7,11% são outros compostos. Para *Drulia browni* verificou-se que cerca de 82,55% são esteróis; 10,65% são ácidos graxos; 4,41% são hidrocarbonetos e 2,58% são outros. Na *Metania reticulata* cerca de 77,94% são esteróis; 18,05% são ácidos graxos; 0,51% são hidrocarbonetos e 4,48% são outros compostos.

Alguns resultados estão de acordo com a literatura, comprovando a presença de esteróis e ácidos graxos em esponjas de água-doce.

4.3 Determinação de Compostos Fenólicos Totais

Esta análise foi realizada com extratos polares feitos em metanol de três espécies de esponjas, a *Drulia browni* (2), *Drulia cristata* e a *Metania reticulata*, coletadas no Lago do Januari e acima da Praia da Lua, no lago de Aramanaí e no lago do Tupé, respectivamente.

A curva de calibração do ácido gálico, usado como padrão foi satisfatória tendo um coeficiente de correlação de 0,9998.

Os resultados obtidos (Tabela 01) são bem relevantes ao levar em consideração que as esponjas são seres vivos e não plantas, fazendo com que a *Metania reticulata* seja a que apresente a melhor média de fenóis com 7,16mg EAG/g do extrato.

Tabela 01 – Resultados referentes ao Ensaio de Fenóis Totais

Extrato (mg/mL)	AMOSTRA						MÉDIA	Desvio Padrão
	Absorvância			Concentração (mg EAG/g do extrato)				
	1	2	3	1	2	3		
<i>D browni</i> – Januari	0,031	0,049	0,032	1,761161749	4,541943	1,915649622	2,739585	1,562798384
<i>D.browni</i> - Praia da Lua	0,035	0,025	0,023	2,37911324	0,834235	0,525258767	1,246202	0,993218061
<i>D.cristata</i> – Aramanaí	0,103	0,065	0,060	12,88428858	7,013749	6,241310057	8,713116	3,632929404
<i>M.reticulata</i> – Tupé	0,065	0,061	0,072	7,013749421	6,395798	8,09516453	7,168237	0,860152072

Estes resultados foram obtidos de extratos de solvente polar, o que pode vir a comprovar a presença de fenóis derivados de ácido benzóico ou de esteróis, identificados nos espectros de massas dos extratos obtidos de solvente apolar.

4.3 Toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

Esta análise foi realizada com o extrato bruto das espécies *Drulia bronni*, *Drulia cristata*, *Drulia uruguayensis*, *Metania fittkai* e *Metania reticulata*, coletadas no Lago do Januari, acima do rio Tapajos (2), na Comunidade de Bom Jesus e no Lago do Tupé, respectivamente. Os extratos foram extraídos em hexano, acetato de etila e metanol.

O padrão apresentou um comportamento adequado para dose letal 50%, tornando o ensaio preciso.

Os resultados obtidos no programa estatístico para todos os solventes usados nas seis espécies de esponjas estão muito acima da curva alcançada com o Lapachol, o que indica que para todos os extratos utilizados neste ensaio o resultado é negativo (Tabela 02).

Nenhuma das espécies estudadas no presente projeto apresenta toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia Salina*.

Tabela 02 – Resultados obtidos no Ensaio Citotóxico frente ao microcrustáceo *Artemia Salina*.

ESPÉCIES	DOSE LETAL (50%) µg/mL		
	HEXANO	ACETATO	METANOL
Lapachol (Padrão)	23,7961	23,7961	23,7961
<i>Drulia browni</i>	282,9351	282,9351	282,9351
<i>Drulia cristata</i>	92,36211	230,2570	230,2255
<i>Drulia uruguayensis</i>	102,6366	1649,497	71,46429
<i>Metania fittkai</i>	149,7048	230,2570	139,4833
<i>Metania reticulata</i>	149,7084	230,2570	230,2570

4.5 Atividade inibitória a enzima acetilcolinesterase

Esta análise foi realizada com o extrato bruto de cinco espécies de esponjas *Drulia browni*, *Drulia cristata*, *Drulia uruguayensis*, *Metania reticulata* e *Metania fittkai*, coletadas no Lago do Januari, acima do rio Tapajos (2), no Lago do Tupé e na Comunidade de Bom Jesus, respectivamente. Os extratos foram obtidos através de acetato de etila e metanol. O resultado do padrão utilizado foi satisfatório, confirmando assim o sucesso do ensaio.

No extrato obtido em acetato de etila, as cinco espécies apresentaram atividade inibitória (Ilustração 03).

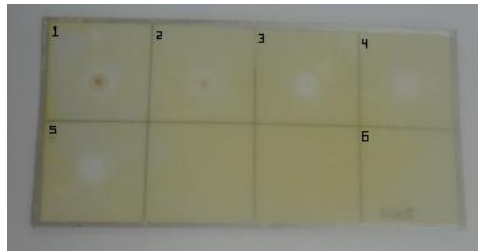


Ilustração 03 - Placa de acetilcolinesterase em acetato, (1) *Drulia browni*; (2) *Drulia cristata*; (3) *Drulia uruguayensis*; (4) *Metania reticulata*; (5) *Metania fittkai* e (6) Solvente.

Já no extrato obtido em metanol, as cinco espécies apresentaram atividade inibitória a enzima (Ilustração 04).

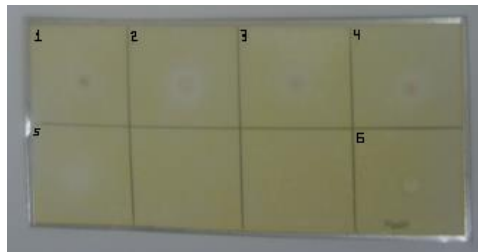


Ilustração 04 - Placa de acetilcolinesterase em metanol, (1) *Drulia browni*; (2) *Drulia cristata*; (3) *Drulia uruguayensis*; (4) *Metania reticulata*; (5) *Metania fittkai* e (6) Solvente.

O grau de inibição comparativo para todas as espécies nos dois solventes pode ser observado na Tabela 03, onde a *Metania reticulata* e a *Metania fittkai* apresentaram maior atividade inibitória nos dois solventes utilizados neste ensaio.

Tabela 03- Resultado qualitativo para o Ensaio de inibição a enzima de Acetilcolineesterase.

Espécie	Acetato			Metanol		
Eserine (padrão)	+	+	+	+	+	+
<i>Drulia browni</i>	+	+		+		
<i>Drulia cristata</i>	+	+		+	+	+
<i>Drulia uruguayensis</i>	+	+	+	+	+	
<i>Metania reticulata</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Metania fittkai</i>	+	+	+	+	+	+

Os resultados obtidos aqui são resultados qualitativos quanto a inibição da enzima, serão realizados ensaios quantitativos onde será possível analisar e comparar de uma forma mais exata a atividade de cada espécie.

4.6 Atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH

Esta análise foi realizada com as cinco espécies de esponjas: *Drulia browni*, *Drulia cristata*, *Drulia uruguayensis*, *Metania reticulata* e *Metania fittkai*, coletadas no Lago do Januari, acima do rio Tapajos (2), no Lago do Tupé e na Comunidade de Bom Jesus, respectivamente. O ensaio foi realizado com os extratos brutos das espécies nos três solventes hexano, acetato e metanol.

O resultado alcançado com o a Quercetina (padrão) foi considerado satisfatório, o que confirma a eficácia do ensaio.

Em hexano, acetato e metanol os resultados obtidos foram negativos (Ilustração 05), o que descarta a atividade antioxidante nos extratos das cinco espécies de esponjas de água-doce estudadas neste projeto.

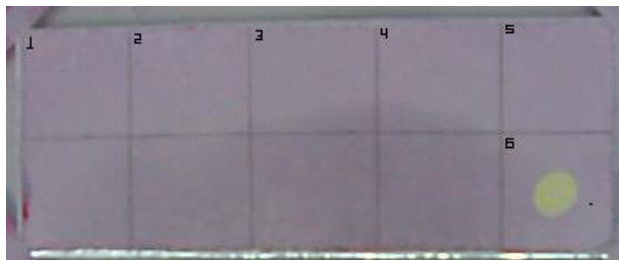


Ilustração 05 - Placa para DPPH em hexano. (1) *Drulia browni*; (2) *Drulia cristata*; (3) *Drulia uruguayensis*; (4) *Metania reticulata*; (5) *Metania fittkai*; (6) Quercetina (Padrão).

5 CONCLUSÃO

Todos os resultados obtidos neste projeto são de suma importância para a ciência já que trata-se do estudo químico inédito e exclusivo de esponjas de água-doce da Amazônia.

Os resultados obtidos em fluorescência de raios-x mostram o comportamento das duas espécies quanto a filtração da água com seletividade de metais, o que com estudos mais profundos podem vir a ser um modo de caracterizar cada espécie e a sugerir novos sistemas de concentração e monitoramento destes metais.

A presença de esteróis e ácidos graxos em esponjas de água doce citada em um dos únicos artigos encontrados sobre essas esponjas na literatura pode ser confirmada com os resultados observados em espectros de massas com extratos apolares e com o ensaio para Determinação de Compostos Fenólicos Totais, feito com extrato bruto polar de algumas espécies de esponjas. O isolamento e identificação de cada um deles em etapas posteriores irá gerar importantes comunicações científicas sobre a sua composição.

Os resultados encontrados para toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e para antioxidante frente ao radical livre DPPH mesmo que negativos são interessantes, pois a partir destes ensaios preliminares outros ensaios com relação à atividade antioxidante e a toxicidade não serão necessários.

Os ensaios (qualitativos) de atividade inibitório de acetilcolinesterase mostraram a excelente ação dos extratos. Ensaio quantitativo para a inibição desta enzima serão realizados a fim de confirmar com exatidão os resultados obtidos no ensaio qualitativo.

Os ensaios realizados aqui mostraram um pouco do comportamento e da composição de algumas espécies de esponjas em análises preliminares. Todas as informações coletadas neste projeto servirão de base para estudos mais avançados e com um foco mais direcionado nesta área de pesquisa para esponjas de água-doce da Amazônia.

6 REFERÊNCIAS

1. Bembitsky, V. M.; Rezanka, T.; Srebnik, M. 2003. Lipid compounds of freshwater sponges: family Spongillidae, class Demospongiae. *Chemistry and Physics of Lipids* 123, 117-155.
2. Litchfield, C.; Morales, R.W. 1976. Are Demospongiae membranes unique among living organisms? Harrison, F.W.; Cowden, R.K. (Eds.), *Aspects of Sponge Biology*. Academic Press 183-200.
3. Urban, S.; Hickford, S. J. H.; Blunt, J. W.; Munro, M. H. G. 2000. Bioactive marine alkaloids. *Current Organic Chemistry* 4, 765-807.
4. Donia, M.; Hamann, M. T. 2003. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infectious Diseases* 3, 338-348.
5. Racek, A. A. 1969. The freshwater sponges of Australia (Porifera: Spongillidae). *Australian Journal of Marine Freshwater Research* 20, 267-310.
6. Volkmer-Ribeiro, C. n. Porifera. Em: Hurlbert, Aquatic biota of tropical South America. *San Diego State University* 86-95.
7. Volkmer-Ribeiro, C. 1985. Esponjas de água doce. In: Sociedade Brasileira de Zoologia, *Manual de técnicas para Prepará-las de Coleções zoológicas* 3, 1-6.
8. Volkmer-Ribeiro, C. 1992. The freshwater sponges in some Peat-bog ponds in Brazil. *Amazoniana* 12, 317-335.
9. Volkmer-Ribeiro, C.; Pauls, S. M. 2000. Esponjas de agua dulce (Porifera, Demospongiae) de Venezuela. *Biologica Venezuelica* 20 (1):1-28.
10. Volkmer-Ribeiro, C. Esponjas. In: Joly, C. A.; Bicudo, C. E. M. 1999. Biodiversidade do Estado de São Paulo; síntese do conhecimento ao final do século XX. *Invertebrados de Água Doce*.
11. Berlink, R. G. S.; Hajdu, E.; Rocha, R. M.; Oliveira, J. H. H. L.; Hernandez, I. L. C.; Selegim, M. H. R.; Granato, A. C.; Almeida, E. V. R.; Nunez, C. V.; Muricy, G.; Peixinho, S.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Cavalcanti, B. C.; Nascimento, G. G. F.; Thiemann, O.; Silva, M.; Souza, A. O.

Silva, C. L.; Minarini, P. R. R. 2004. Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil. *Journal of Natural Products* 67, 510-522.

12. Volkmer-Ribeiro, C., Almeida, F. B. 2005. As esponjas do Lago Tupé. em: Santos-Silva, E.; Aprile, F. M.; Scudeller, V. V.; Melo, S. eds. BioTupé: meio físico, diversidade biológica e sociocultural do Baixo Rio Negro. *Amazônia Central* 123-134.

13. Hansen, I. V., Weeks, J. M., Depledge, M. H. 1995. Accumulation of copper, zinc, cadmium and chromium by the marine sponge *Halichondria panicea* Pallas and implications for biomonitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 133–138.

14. Hill, M. S.; Hill, A. L. 2002. Freshwater sponges as indicators of water pollution: an investigative undergraduate lab. Pages 385-389, in Tested studies for laboratory teaching, Volume 23 (M. A. O'Donnell, Editor). *Proceedings of the 23rd Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE)* 392.

15. Cebrian, E., Marti, R., Uriz, M.J., Turon, X., 2003. Sublethal effects of contamination on the Mediterranean sponge *Crambe crambe*: metal accumulation and biological responses. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 1273–1284.

16. Pérez, T., Wafo, E., Fourt, M., Vacelet, J., 2003. Marine sponges as biomonitor of polychlorobiphenyls contamination: concentration and fate of 24 congeners. *Sci. Technol* 37, 2152– 2158

