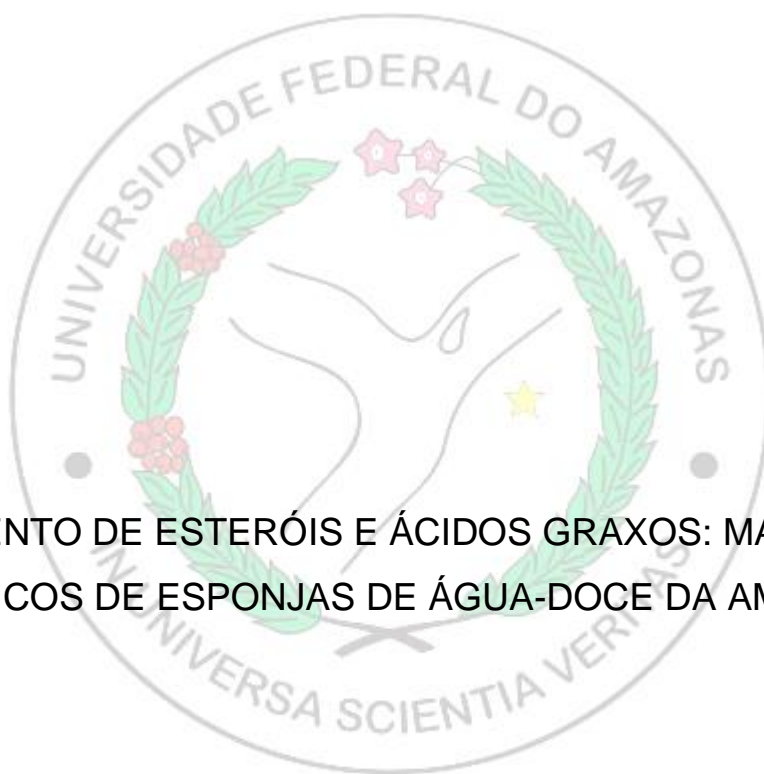


UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA



ISOLAMENTO DE ESTERÓIS E ÁCIDOS GRAXOS: MARCADORES  
QUÍMICOS DE ESPONJAS DE ÁGUA-DOCE DA AMAZÔNIA.

UFAM

Vanessa Reis Campos

Bolsista CNPq

MANAUS

2010

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

RELATÓRIO FINAL  
PIB-E/0019/2009  
ISOLAMENTO DE ESTERÓIS E ÁCIDOS GRAXOS: MARCADORES  
QUÍMICOS DE ESPONJAS DE ÁGUA-DOCE DA AMAZÔNIA.

Bolsista: Vanessa Reis Campos, CNPq  
Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Valdir Florêncio da Veiga Júnior

MANAUS  
2010

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

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>07</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>08</b>
<b>3 MÉTODOS UTILIZADOS .....</b>	<b>09</b>
3.1 Análises Espectométricas .....	09
3.1.1 Cromatografia em camada delgada .....	09
3.1.2 Análise por Infravermelho .....	09
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>10</b>
4.1 Análise por Infravermelho .....	10
4.2 Extrato bruto em Hexano .....	11
4.1.2 Coluna ácida .....	11
4.1.2 Cromatografia em coluna aberta .....	12
4.2 Extrato bruto em acetato de etila .....	12
4.2.1 Cromatografia em coluna aberta .....	12
4.2.2 Cromatografia em Camada Delgada preparativa .....	13
4.3 Extrato bruto em metanol .....	14
4.3.1 Cromatografia em coluna aberta .....	14
4.3.1 Cromatografia em coluna aberta – flash .....	14
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>16</b>
<b>7 CRONOGRAMA EXECUTADO .....</b>	<b>18</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Ilustração 01** - Estrutura química de ácido graxo observado em esponjas de água-doce.

**Ilustração 02** - Análise por Infravermelho do extrato bruto em hexano da esponja *Drulia browni*.

**Ilustração 03** - Análise por Infravermelho do extrato bruto em acetato de etila da esponja *Drulia browni*.

**Ilustração 04** - Análise por Infravermelho do extrato bruto em metanol da esponja *Drulia browni*.

**Ilustração 05** - Placa cromatográfica da coluna ácida de extrato hexânico, (1) Extrato bruto, (2) Fração neutra, (3) Fração ácida pH8, (4) Fração ácida pH5, (5) Fração ácida PH3.

**Ilustração 06** - Placa da cromatografia em coluna aberta realizada com a junção ácida obtida a partir da cromatografia de troca iônica com sílica impregnada com KOH, Subfrações 01, 02, 03 e 04.

**Ilustração 07** - Placa da cromatografia em coluna aberta realizada com o extrato bruto da esponja *Drulia browni* em acetato de etila.

**Ilustração 08** - Placa da cromatografia em camada delgada preparativa em UV-356nm.

**Ilustração 09** - Placa da cromatografia em coluna aberta realizada com o extrato bruto em metanol da esponja *Drulia browni*.

## RESUMO

As esponjas são conhecidas por serem excelentes indicadoras ambientais, mas destacam-se por conterem metabólitos secundários únicos, incluindo substâncias citotóxicas e com atividade anticancerígena. Cerca de 15000 espécies de esponjas conhecidas pertencem ao ambiente marinho e aproximadamente 200 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. Na Amazônia várias esponjas são causadoras de casos de dermatite de contato em ribeirinhos, o mecanismo de ocorrência ainda é desconhecido e pode vir a ser atribuída a sua composição micromolecular. Diante destas informações é observada a deficiência de estudos precisos das esponjas de água-doce. Este projeto é continuação de um anterior onde foram realizados estudos químicos e ensaios preliminares com o intuito de conhecer a composição de esponjas de água-doce da Amazônia e é voltado para a realização do isolamento de ácidos graxos e esteróis, presentes majoritariamente na esponja de água-doce da espécie *Drulia browni*. Das coletas das esponjas desta espécie realizadas em outubro de 2008, na praia-da-lua, em Manaus, foram obtidos extratos em hexano, acetato de etila e metanol. Com os extratos obtidos em hexano foram realizados fracionamentos com cromatografia de troca-iônica e em coluna aberta de sílica. Já com os extratos de média polaridade, obtidos em acetato de etila, foram realizados fracionamentos utilizando cromatografia em coluna aberta e cromatografia em camada delgada preparativa. Frações já purificadas foram encaminhadas à análise por espectrometria de massas e estão em fase de estudo dos espectros obtidos. Os extratos de alta polaridade foram fracionados em cromatografia em coluna aberta de sílica em fase normal comum e flash, tendo sido isoladas duas substâncias que estão em fase de identificação. Os resultados deste projeto são exclusivos e preliminares para uma nova fase de estudos com focos mais amadurecidos voltados para esponjas de água-doce da Amazônia.

## 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 reter grande quantidade das bactérias presentes na água chegando até 100% em alguns casos, o que demonstra 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 ser 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.

No presente estudo foram realizadas análises como cromatografia em Coluna de troca iônica, Cromatografia em camada delgada, Cromatografia em camada delgada preparativa, Espectrometria de massas e Análise por Infravermelho com os extratos obtidos da esponja *Drulia browni* visando um esclarecimento maior sobre a composição química de esponjas de água-doce.

## 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 calcárias ou silicosas, geralmente com formas aciculares, chamadas de espículas. Existem mais de 15000 espécies de esponjas classificadas no filo Porífera, que é composto por três grupos distintos: Hexactinellida, Demospongiae e Calcarea<sup>1</sup>.

A característica primitiva das esponjas faz com que apresentem biomembranas únicas. Estas membranas possuem uma alta proporção de ácidos graxos pouco comuns<sup>2</sup>. Desde a década de 1950, mais de 5500 metabólitos produzidos por esponjas foram relatados em mais de 3000 artigos científicos. Diversas substâncias obtidas de esponjas apresentam estruturas marcadamente diferentes daquelas produzidas por outros seres e, muitas vezes, com ações farmacológicas únicas<sup>3</sup>.

Apesar de mais de 5000 das espécies de esponjas conhecidas pertencerem ao ambiente marinho, cerca de 150 espécies são encontradas unicamente em água-doce<sup>1</sup>.

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<sup>6,7,8</sup>, com destaque para as da Região Amazônica, sendo atualmente descritas 44 espécies de esponjas de água doce no Brasil, distribuídas em 20 gêneros<sup>9</sup>.

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 sua alimentação por filtração e o fato de serem sésseis, que expõe estes organismos a quaisquer compostos presentes na água<sup>13,14,15, 16</sup>, o que motiva estudos de composição química orgânica e inorgânica.

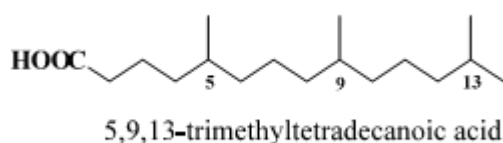
O estudo de esponjas de água doce na Amazônia apresenta diversos pontos de interesse, sejam eles ecológicos, como indicadores ambientais, uma vez que são filtradoras da água em que vivem; econômicos, para a produção de cerâmicas nobres, como chips de computador<sup>6,10</sup>; entre vários outros, que 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-doce<sup>1</sup>.

A primeira análise detalhada de uma espécie de água-doce, *Spongilla wagneri*, foi relatada por Laseter e Poirrier em 1970.<sup>9</sup> Os autores identificaram a presença de ácidos graxos C24:0(5,7%) e C24:1(3,2%) no exterior da gêmula. A presença de ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA) (C24/C28) em esponjas de água doce foi relatada pela primeira vez em 1981 por Bembitsky.<sup>2</sup> Estes ácidos foram isolados de esponjas pertencentes ao lago Baikal, na Rússia, para os gêneros *Lubomirskia* e *Baicalospongia*. Os estudos realizados mostraram que as esponjas do Lago Baikal possuem um número incomum e raro de ácidos graxos. Diversos destes ácidos possuem padrão variado de ramificações, como o ácido trimetiltetradecanoico (Figura 1).



**Ilustração 01.** Estrutura química de ácido graxo observado em esponjas de água-doce

Ácidos graxos poliinsaturados têm sido apontados atualmente como uma das principais fontes de substâncias protetoras de artérias, além de serem indicados na terapêutica de diversos males, de inflamações à proteção do sistema nervoso e imune.

Em conjunto com os ácidos graxos, esteróis de estrutura pouco comum em animais também são observados em esponjas de água-doce. Estas substâncias foram raramente descritas e nunca estudadas na Amazônia.

### 3 MÉTODOS UTILIZADOS

A esponja *Drulia browni* foi coletada a montante da praia da lua no município de Manaus e transportada para laboratório. A identificação foi feita pela Dra. Cecília Volkmer Ribeiro do Instituto de Zoobotânica do Rio Grande do Sul.

A partir do extrato bruto seco em hexano da esponja *Drulia browni* foi realizado o fracionamento utilizando cromatografia de troca iônica com sílica empregnada com KOH com o principal objetivo em separar a fração ácida da fração neutra do extrato. Após realização do fracionamento foi feita a comparação de frações obtidas a partir de Cromatografia em camada delgada empregando reveladores universais.

Os extratos brutos em acetato de etila e metanol da esponja *Drulia browni* foram submetidos a fracionamento por cromatografia em coluna aberta e posteriormente a isolamento empregando cromatografia em camada delgada preparativa e identificação através de espectrometria de massas.

#### 3.1 Análises espectrométricas

##### 3.1.1 Infravermelho (IV)

Os extratos brutos em solventes hexano, acetato e metanol da esponja *Drulia browni* foram submetidos a análises em espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier. Para as análises será utilizado o equipamento IV-TF modelo SPECTRUM 2000 da Perkin Elmer®, sendo o software utilizado, Spectrum v. 2.00®, localizado na Central Analítica – UFAM. As pastilhas das amostras serão preparadas com Brometo de Potássio P.A.

##### 3.1.2 Espectrometria de Massas

As análises por espectrometria de massas foram realizadas através do acoplamento ao cromatógrafo em fase gasosa. As frações obtidas por isolamento foram submetidas à análise por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) para a análise quantitativa e por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrômetro de massas (CG-EM), para a obtenção dos espectros de massas

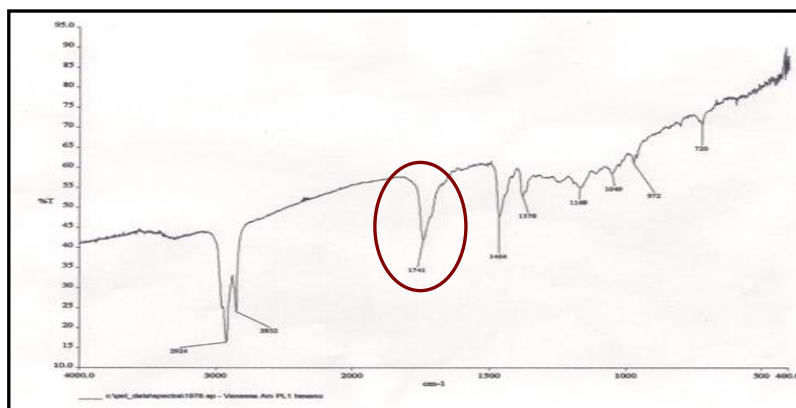
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Analise por Infravermelho

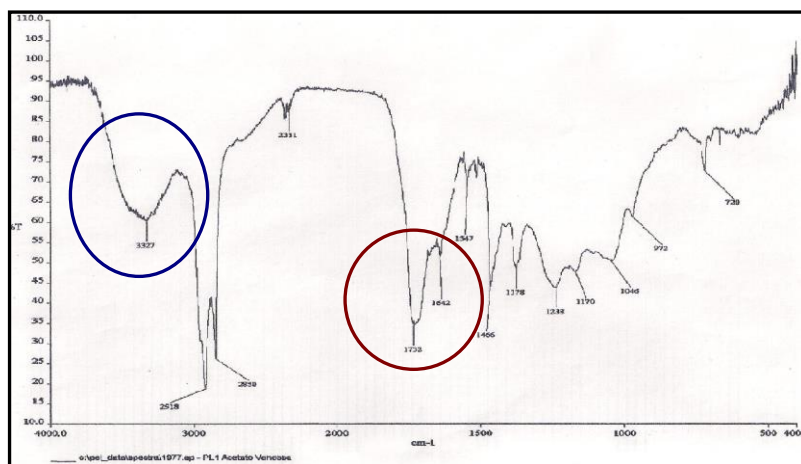
A partir da análise por espectrometria na região do infravermelho realizada com os extratos brutos em hexano, acetato de etila e metanol da espécie *Drulia browni*. A partir dos dados obtidos nesta análise foi possível identificar algumas bandas nas regiões correspondentes aos referentes grupos funcionais:

Carbonila (C=O) – v,F 1820-1630  $\text{cm}^{-1}$

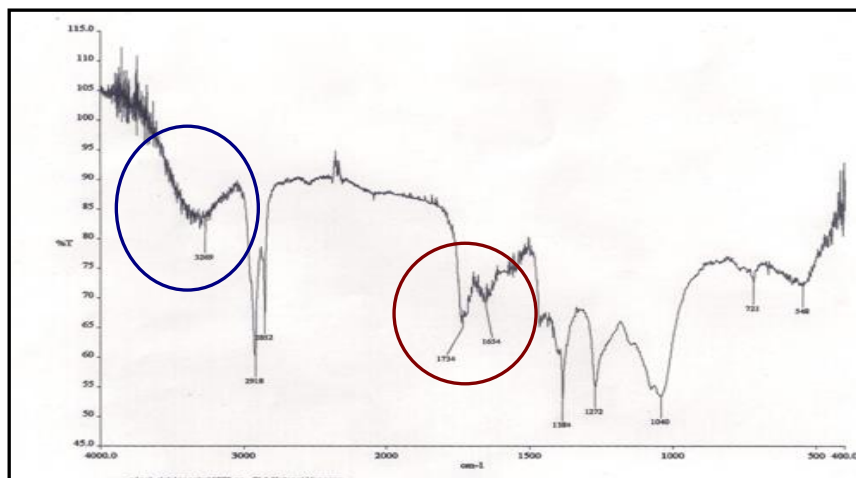
Hidroxila (OH) – v,F 3200- 2500  $\text{cm}^{-1}$



**Ilustração 02.** Analise por Infravermelho do extrato bruto em hexano da esponja *Drulia browni*.



**Ilustração 03.** Analise por Infravermelho do extrato bruto em acetato de etila da esponja *Drulia browni*.



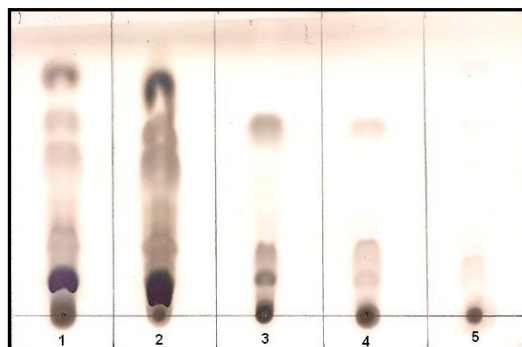
**Ilustração 04.** Análise por Infravermelho do extrato bruto em metanol da esponja *Drulia browni*.

A partir dos dados obtidos é possível perceber no extrato bruto em hexano a presença de uma banda referente ao grupo carbonila ( $\sim 1741\text{ cm}^{-1}$ ), nos extratos em acetato de etila tem-se bandas correspondentes aos grupos hidroxila ( $\sim 3327\text{ cm}^{-1}$ ) e carbonila ( $\sim 1732\text{ cm}^{-1}$ ) e em extratos em metanol notou-se a presença do grupo hidroxila ( $\sim 3269\text{ cm}^{-1}$ ) e carbonila ( $\sim 1734\text{-}1654\text{ cm}^{-1}$ ), o que pode vir a confirmar a presença de ácidos graxos e esteróis majoritariamente.

## 4.2 Extrato bruto em Hexano

### 4.1.2 Cromatografia de Troca-Iônica

A cromatografia de troca iônica utilizando sílica impregnada com KOH foi realizada com objetivo de separar ácidos graxos e principalmente esteróides do extrato bruto. Este fracionamento foi realizado como etapa prévia para obter substâncias isoladas.

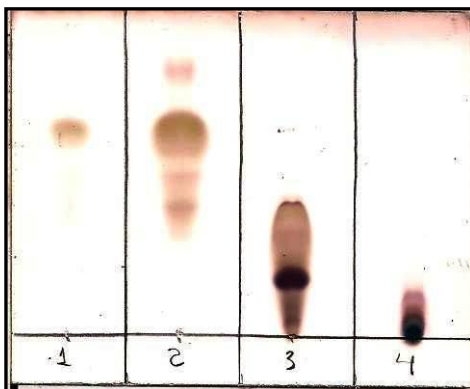


**Ilustração 05.** Placa cromatográfica da coluna ácida de extrato hexânico, (1) Extrato bruto, (2) Fração neutra, (3) Fração ácida pH8, (4) Fração ácida pH5, (5) Fração ácida pH3.

A observação da ilustração 05 permite visualizar a presença de substâncias no extrato bruto (1) que se encontram presentes na fração neutra (2) e não aparecem em nenhuma das frações ácidas (3,4,5), o que significa que foi obtida a separação parcial. Ao analisar a quantidade obtida nas frações em pH8, pH5 e pH3, assim como a sua composição, evidenciada por cromatografia em camada delgada, foi feita a união das três frações obtidas em valores de pH diferentes. A partir desta nova fração reunida, um novo fracionamento foi realizado para o isolamento e purificação dos constituintes de interesse.

#### 4.1.2 Cromatografia em coluna aberta

A fração de ácidos obtida por cromatografia de troca iônica (reunida anteriormente) foi fracionada por cromatografia em coluna aberta para separação das devidas substâncias. A coluna foi eluída realizada utilizando gradiente crescente de polaridade na mistura hexano/acetato de etila de acordo com o gradiente de polaridade e foram obtidas sete subfrações.



**Ilustração 06.** Placa da cromatografia em coluna aberta realizada com a junção ácida obtida a partir da cromatografia de troca iônica com sílica empregada com KOH, Subfrações 01,02,03 e 04.

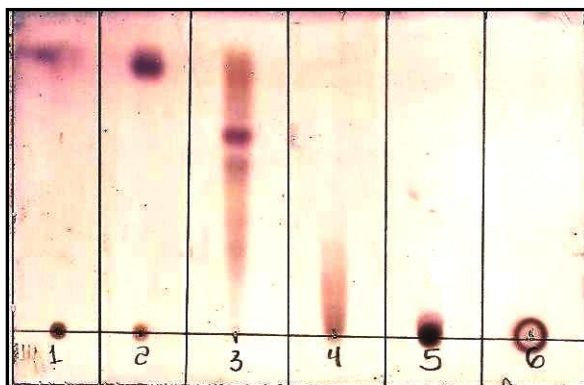
Para a identificação dos constituintes presentes, foi realizada a análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização de chama e de espectrometria de massas do extrato bruto obtido em hexano, da fração neutra da cromatografia de troca iônica e da subfração ácida 02 obtida da cromatografia em coluna aberta.

#### 4.2 Extrato bruto em acetato de etila

##### 4.2.1 Cromatografia em coluna aberta

O extrato bruto obtido em acetato de etila foi submetido a fracionamento utilizando a cromatografia em coluna aberta de sílica normal (70-230 msh) para separação de substâncias. A

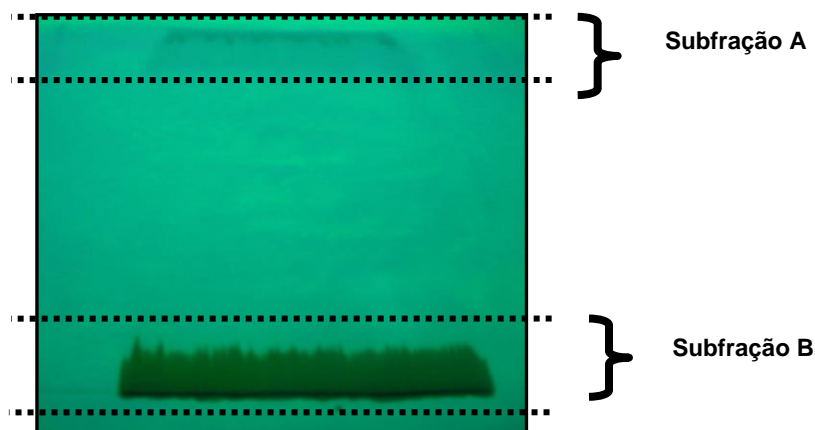
coluna foi realizada utilizando gradiente crescente de polaridade dos eluentes clorofórmio/acetato de etila , obtendo-se seis frações, conforme a ilustração 7, abaixo, da cromatografia em camada fina.



**Ilustração 07.** Placa da cromatografia em coluna aberta realizada com o extrato bruto da esponja *Drulia browni* em acetato de etila.

#### 4.2.2 Cromatografia em Camada Delgada preparativa

Ao analisar a placa cromatográfica da coluna aberta de sílica do extrato obtido em acetato de etila foi feita a junção das frações 01 e 02 e realizado o fracionamento por cromatografia em camada delgada preparativa com o intuito de obter substâncias isoladas. O fracionamento foi realizado utilizando como eluente cloroformio com 30% de acetona. Ao analisar a placa preparativa utilizando como detector a luz ultravioleta no comprimento de 365 nm foram observadas duas substâncias, que foram separadas e nomeadas de acordo com a ilustração 8, abaixo.



**Ilustração 08.** Placa da cromatografia em camada delgada preparativa em UV-365nm.

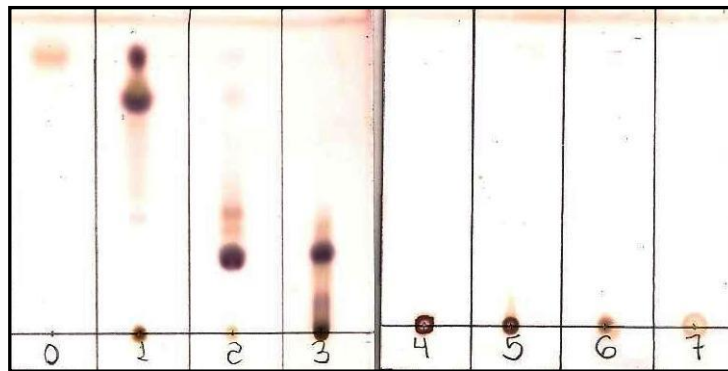
A subfração A foi resubmetida a fracionamento por cromatografia em camada delgada preparativa utilizando como eluente mistura de 5% de hexano em acetato de etila e eluída três vezes. Nesta nova separação foram observadas três manchas, que foram raspadas, extraídas com

acetato de etila, nominadas subfração A1; subfração A2 ; subfração A3; e enviadas para análise por Espectometria de Massas através do acoplamento ao comatográfico em fase gasosa.

### 4.3 Extrato bruto em metanol

#### 4.3.1 Cromatografia em coluna aberta

O extrato bruto em metanol foi submetido a fracionamento utilizando a cromatografia em coluna aberta para separação de substâncias. A coluna foi realizada utilizando como eluente mistura de diclorometano e metanol, de acordo com o gradiente de polaridade, sendo coletadas oito frações. A fração de número zero foi coletada logo após o empacotamento e posteriormente reunida à fração 1.



*Ilustração 09. Placa de cromatografia em coluna aberta realizada com o extrato bruto em metanol da esponja *Druvia browni*.*

#### 4.3.1 Cromatografia em coluna de sílica Flash

A fração 1 foi submetida a cromatografia em coluna flash utilizando como eluente mistura de hexano/clorofórmio/acetona (9:10:1). A partir do fracionamento obteve-se 20 subfrações em pequenas quantidades. A subfração 01 foi submetida a análise em Espectometria de Massas através do acoplamento ao comatográfico em fase gasosa.

## 5 CONCLUSÃO

As técnicas empregadas neste projeto apresentaram elevada relevância quanto ao aprendizado das diferentes técnicas de fracionamento, purificação e separação de substâncias empregadas na química de produtos naturais. Os resultados das análises em andamento trarão como consequência o relato de substâncias nunca antes descritas na biodiversidade Amazônica. A finalização do projeto trará ainda como aprendizado a análise dos espectros de massas para as substâncias já isoladas.



## 6 REFERÊNCIAS

1. Manconi, R.; Pronzato, R. 2008. Global diversity of sponges (Porifera: Spongillina) in freshwater. Freshwater animal diversity assessment. *Hydrobiologia*, 595,27–33.
2. 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.
3. 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.
4. Urban, S.; Hickford, S. J. H.; Blunt, J. W.; Munro, M. H. G. 2000. Bioactive marine alkaloids. *Current Organic Chemistry* 4, 765-807.
5. Donia, M.; Hamann, M. T. 2003. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infectious Diseases* 3, 338-348.
6. Racek, A. A. 1969. The freshwater sponges of Australia (Porifera: Spongillidae). *Australian Journal of Marine Freshwater Research* 20, 267-310.
7. Volkmer-Ribeiro, C. n. Porifera. Em: Hurlbert, Aquatic biota of tropical South America. *San Diego State University* 86-95.
8. 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.
9. Volkmer-Ribeiro, C. 1992. The freshwater sponges in some Peat-bog ponds in Brazil. *Amazoniana* 12, 317-335.
10. Volkmer-Ribeiro, C.; Pauls, S. M. 2000. Esponjas de agua dulce (Porifera, Demospongiae) de Venezuela. *Biologica Venezuelica* 20 (1):1-28.
11. 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*.
12. 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.

13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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. Bull. Bull.* 46, 1273–1284.
17. 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

