

ESTERÓIS E CONSTITUINTES VOLÁTEIS DA ESPONJA DULCÍCOLA *Trochospongilla paulula* (BOWERBANK)**Iuri B. de Barros^{ab}, Cecília Volkmer Ribeiro^c e Valdir F. da Veiga Junior^{ab,*}**^aInstituto Politécnico do Rio de Janeiro, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, R. Bonfim, 25, 28625-570 Nova Friburgo – RJ, Brasil^bDepartamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Av. Rodrigo Octávio, 6200, 69077-000 Manaus – AM, Brasil^cMuseu de Ciências Naturais, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, CP 1188, 900001-970 Porto Alegre – RS, Brasil

Recebido em 25/06/2015; aceito em 03/07/2015; publicado na web em 12/08/2015

STEROLS AND VOLATILE COMPOUNDS OF THE FRESHWATER SPONGE *TROCHOSPONGILLA PAULULA* (BOWERBANK, 1863). The Neotropical region has the highest freshwater sponge diversity in the world, with the presence of species of the families Metaniidae, Potamolepidae, and Spongillidae. Due to the remarkable lipid diversity in these organisms, this study aimed to characterize the sterols and volatile compounds of the sponge *Trochospongilla paulula* collected in the Tapajós River. Seven volatile compounds were identified, with the long-chain alcohols tetradecanol, pentadecanol, and hexadecanol representing 51.65% of this fraction. Cholesterol is the major sterol species, as reported for other species of the family Spongillidae; however, *T. paulula* may be distinguished by a chromatographic profile of its sterols.

Keywords: porifera; Spongillidae; cholesterol; *Trochospongilla paulula*.**INTRODUÇÃO**

As esponjas de água doce são classificadas em mais de 200 espécies pertencentes a 45 gêneros, distribuídos em seis famílias. Uma sétima família é restrita apenas a registros fósseis. Na região Neotropical é 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.¹

A pesquisa com substâncias voláteis está centrada em plantas terrestres, nas quais estas substâncias podem exercer diversas funções, como atrativos e repelentes de insetos, alelopática, entre outras.² Assim como ocorre em terra, a comunicação entre organismos aquáticos pode ocorrer por meio de substâncias voláteis.³

A identificação de substâncias voláteis de plantas é tradicionalmente realizada empregando cromatografia em fase gasosa acoplada a detectores de espectrometria de massas e ionização de chama e utilizando padrões de hidrocarbonetos lineares para os cálculos de índices de retenção linear.⁴ Técnica semelhante é descrita no estudo de substâncias voláteis de esponjas marinhas.⁵⁻⁸

Esponjas adquirem seus esteróis de quatro diferentes formas: a partir da biossíntese direta; pela ingestão; pela modificação de esteróis ingeridos; ou pela biossíntese associada a algum organismo simbiótico.⁹ 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 esteroide que se apresenta como majoritário e os demais aparecem em quantidade traço.¹⁰

A cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas é também empregada na identificação de esteróis. Outros recursos empregados são o uso de padrões para o cálculo de tempos de retenção relativos, e reações de derivatização utilizadas para facilitar a visualização de picos diagnósticos no espectro de massas, além de obter um melhor comportamento cromatográfico.^{11,12}

Amostras pertencentes à espécie *Trochospongilla paulula* (Bowerbank, 1863) foram coletadas no rio Tapajós, permitindo a

descrição, pela primeira vez, da composição volátil de uma esponja dulcícola. Além disso, a análise de esteróis de uma espécie pertencente à família Spongillidae coletada na Amazônia permite a comparação com outras espécies da mesma família, provenientes de outros biomas.

PARTE EXPERIMENTAL**Material biológico**

Espécimes de *Trochospongilla paulula* (Bowerbank, 1863) foram coletados no município de Santarém, no distrito de Alter do Chão – PA (2° 30,215' S 54° 57,526' O) em 23 de outubro de 2011, com autorização do SISBIO número 30292-1. As espécies foram identificadas por técnicas de microscopia¹³ e amostras voucher foram depositadas na coleção de invertebrados do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia sob o número INPA 0078. Os espécimes foram coletados próximos à linha d'água, e mantidos congelados a -5 °C até o momento da extração, para análises de voláteis. Para as análises de esteróis foram coletados espécimes secos, na mesma região.

Obtenção das frações esteroidicas

Inicialmente, foram realizadas extrações por maceração a frio e em extrator tipo Soxhlet por 12 h, ambas com solvente hexano, com as esponjas secas (10,000 g), conforme coletadas na natureza. Não sendo observadas diferenças no perfil cromatográfico dos extratos obtidos, as extrações subsequentes foram realizadas em aparelho tipo Soxhlet. O extrato em hexano foi submetido à cromatografia com sílica impregnada com KOH com o intuito de se obter uma fração livre dos ácidos graxos presentes no extrato. A fração não ácida obtida foi então submetida à cromatografia de coluna aberta utilizando misturas de hexano e acetato de etila como eluentes, em gradiente crescente de polaridade. As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada, reunidas, e as que apresentavam fator de retenção similar ao do colesterol foram submetidas à cromatografia flash e as frações obtidas, ricas em esteróis, foram acetiladas e analisadas por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama

*e-mail: valdir.veiga@gmail.com

(CG-DIC) e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). As acetilações foram realizadas com anidrido acético, utilizando dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador. Tempos de retenção relativos ao colesterol (TRR) foram calculados para auxiliar na identificação dos esteróis, utilizando um padrão de colesterol.

Extração da fração volátil

A extração foi realizada por extração e destilação simultâneas (SDE) em aparelho Likens-Nickerson.¹⁴ A esponja congelada foi submetida por 3 horas à extração e destilação simultânea contínua e a fração volátil, obtida em clorofórmio, foi seca com Na₂SO₄ anidro e armazenada em freezer até a análise em CG-DIC e CG-EM.⁵

Análises por cromatografia em fase gasosa

As análises foram realizadas em cromatógrafo em fase gasosa da Shimadzu® modelo CG2010, equipado com detector de ionização por chama (CG-DIC) e coluna DB-5, com medidas de 15 m × 0,25 mm × 0,25 µm, sendo utilizado como gás de arraste hélio em fluxo de 1 mL min⁻¹, e cromatógrafo em fase gasosa da Shimadzu® modelo QP-2010, acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) com coluna similar, empregando a técnica de impacto eletrônico a 70 eV.

Para a identificação 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. A análise dos esteróis acetilados foi realizada empregando uma isoterma a 280 °C por 60 minutos e as injeções foram realizadas no modo *split* 1:20. Um padrão de colesterol acetilado foi utilizado para o cálculo do tempo de retenção relativo.

Para a fração volátil da esponja 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 linear. A identificação foi realizada pelo conjunto de espectros de massas, comparados com espectroscopias, tempos de retenção, índices de retenção e fragmentografia de massas, para identificação das séries homólogas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração por SDE

A comunicação entre organismos aquáticos por meio de compostos voláteis é documentada para diversos organismos.¹⁵ Para esponjas são propostos mecanismos de interação ecológica por meio de aleloquímicos exsudados.¹⁶ Até o presente momento, não há registros de estudos dos voláteis das esponjas dulcícolas.

O SDE é um método que proporciona alta recuperação para amplo conjunto de substâncias, em especial para óleos voláteis presentes em pequenas quantidades.¹⁷ 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.⁵ 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 de óleos voláteis também são relatados para algumas plantas como as partes aéreas de *Stachys recta* L. para as quais é relatado o rendimento de 0,014%.¹⁸

Foi possível identificar sete substâncias que representam 69,71% da fração volátil da esponja *T. paulula* (Tabela 1). 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.⁵ Já para espécie *Siphonodictyon coralliphagum* foram identificados 99,61% da composição de seus voláteis,⁷ enquanto que na espécie *Geodia cydonium* foram identificados 85,5%. Resultados anteriores com esponjas do gênero *Tedania* sp. foram identificados 39,8 a 71,4% dos compostos.⁶

Tabela 1. Composição da fração volátil de *Trochospongilla paulula*.

Substância	Índice de retenção		Percentual (%)
	experimental	literatura ⁷	
Tetradecanol	1675	1671	6,28
Pentadecanal	1712		1,30
Pentadecanol	1775		14,22
Hexadecanal	1813	1819	2,15
Ácido pentadecanóico	1865		5,02
Hexadecanol	1879	1874	31,15
Ácido hexadecanóico	1960	1959	9,30

* Nem todos os índices de retenção estão disponíveis na literatura pesquisada.

O composto majoritário encontrado no óleo volátil, o hexadecanol, identificado pelo conjunto de dados de índice de retenção, espectrometria de massas e fragmentografia, corresponde a 31,15% do óleo, 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 detectados álcoois.⁸ Outros estudos de compostos voláteis de esponjas marinhas relatam a presença de álcoois, muitas vezes aromáticos, como componentes minoritários.^{7,19}

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.^{7,8} 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.²⁰ A associação de esponjas com microrganismos é bastante documentada,²¹ inclusive em ambientes dulcícolas.²² Outra justificativa para a presença de metabólitos de bactérias nas esponjas é que, ao filtrar a água, esses microrganismos são absorvidos como alimento.²³

É interessante observar que o aroma percebido no óleo essencial é bastante semelhante àquele identificado por diversos participantes da pesquisa como o “cheiro do rio”, onde as esponjas foram coletadas.

Esteróis

Colesterol é o esteroide comumente encontrado como majoritário em membranas celulares do reino animal, principalmente em vertebrados, embora diversos invertebrados marinhos apresentem esteróis com esqueletos modificados ou com grupos alquila adicionais na cadeia lateral como majoritários. Nas esponjas dulcícolas das famílias Spongillidae e Lubormiiskidae, o colesterol é relatado como esteroide majoritário.^{11,24,25} Entretanto, para esponjas dulcícolas dos gêneros *Drulia* e *Metania* (Metaniidae) coletadas no rio Negro, o 24-etilcolesta-5,22-dieno-3β-ol é o esteroide majoritário.²⁶ Como esta foi a primeira pesquisa com esteróis de esponjas dulcícolas da Amazônia

e, também, a primeira vez em que esponjas da família Metaniidae foram estudadas, um novo estudo com esponjas da Amazônia e da família Spongillidae faz-se necessário para avaliar: 1. se a presença do colesterol como minoritário é uma característica das esponjas da Amazônia; 2. Se o 24-etil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol é um marcador de esponjas da região ou somente da família Metaniidae; e, 3. Se as esponjas da família Spongillidae amazônicas possuem composição semelhante à de outros locais. A confirmação para as três questões apareceu com a composição evidenciada no presente estudo, em que é observado que o colesterol representa 32,11% do extrato obtido em hexano para esponja *T. paulula* (Tabela 2, Figura 1). Este resultado corrobora não só as evidências de marcador quimiotaxonômico do colesterol para as esponjas da família Spongillidae em todo o mundo,^{24,25} como também evidencia e fortalece a teoria de que o 24-etil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol seja o marcador para a família Metaniidae.

Tabela 2. Esteróis identificados na esponja *Trochospongilla paulula*

Esterol	Fragmentos típicos	TRR ¹⁸⁻¹⁹	%*
Colesterol	368, 353, 260, 255, 247, 213	1,00	32,11
24-metil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol	380, 365, 282, 267, 255, 213	1,09	3,27
24-metil-colesta-5-eno-3 β -ol	382, 367, 261, 255, 213	1,24	10,53
24-etil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol	394, 282, 267, 255, 213, 69	1,31	20,32
24-etil-colesta-5-eno-3 β -ol	396, 381, 275, 255, 213	1,49	8,16

TRR – Tempo de retenção dos derivados acetilados relativo ao colesterol acetilado; * – Porcentagem em área.

Para a esponja *T. paulula*, o 24-etil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol aparece como segundo mais abundante esterol, representando 20,32% do extrato obtido em hexano (Figura 1).

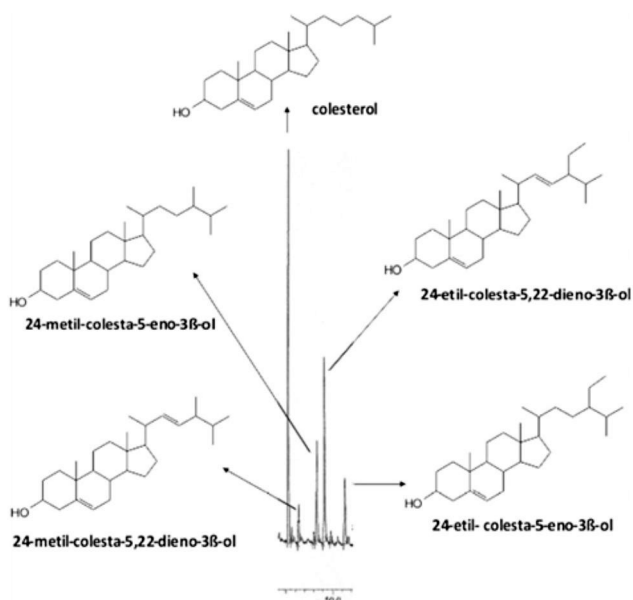


Figura 1. Perfil cromatográfico dos esteróis da esponja *Trochospongilla paulula*

Outros três esteróis encontrados aparecem em concentrações relativamente elevadas: 24-metil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol (3,27%),

24-metil-colesta-5-eno-3 β -ol (10,53%) e 24-etil-colesta-5-eno-3 β -ol (8,16%). Isso evidencia a diferença no perfil aqui observado para os esteróis de *T. paulula* do relatado para as espécies da família Spongillidae: *Ephydatia fluviatilis* e *Spongilla lacustres*. Nessas, foram identificados 12 e 10 esteróis, respectivamente. No entanto, o colesterol representou mais de 65% dos extratos esteroidais.²⁴ O perfil aqui relatado assemelha-se ao relatado para as espécies da família Metaniidae.²⁶ Os esteróis aqui descritos para *T. paulula* também são relatados como minoritários em espécies da família Lubormiiskidae que também apresentam o colesterol como majoritário.¹¹

CONCLUSÃO

Os perfis relatados neste trabalho para os compostos voláteis e esteróis da esponja *T. paulula* contribuem grandemente para a quimiotaxonomia das esponjas, que embora se encontre muito distante de substituir as técnicas clássicas de taxonomia e morfologia pode fornecer valiosas informações, inclusive já tendo sido usadas para sugerir revisões em algumas classificações.²⁷

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, à CAPES e à FAPEAM pelo apoio financeiro à execução deste projeto.

REFERÊNCIAS

- Manconi, R.; Pronzato, R.; *Hydrobiologia* **2008**, *595*, 27; van Soest, R. W. M.; Boury-Esnault, N.; Vacelet, J.; Dohrmann, M.; Erpenbeck, D.; de Voogd, N. J.; Santodomingo, N.; Vanhoorne, B.; Kelly, M.; Hooper, J. N. A.; *PLoS One* **2012**, *7*, e35105.
- Jiang, Y.; Ridsdill-Smith, T. J.; Ghisalberti, E. L.; *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23*, 163; Wang, S.; Ghisalberti, E. L.; Ridsdill-Smith, J.; *Phytochemistry* **1999**, *52*, 601; Maffei, M. E.; Gertsch, J.; Appendino, G.; *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1359.
- Whittaker, R. H.; Feeny, P. P.; *Science* **1971**, *171*, 757.
- Adams, R. P.; *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. 4th ed., Allured Business Media, Illinois: 2009; Alcântara, J. M.; Yamaguchi, K. K. L.; Silva, J. R. A.; Veiga Junior, V. F.; *Acta Amaz.* **2010**, *40*, 567; Ottobelli, I.; Facundo, V. A.; Zuliani, J.; Luz, C. C.; Brasil, H. O. B.; Militão, J. S. L. T.; Braz-Filho, R.; *Acta Amaz.* **2011**, *41*, 393.
- Roussis, V.; Mazomenos, E.; Vayas, K.; Harvala, C.; *J. Essent. Oil Res.* **1995**, *7*, 393.
- de Rosa, S.; Kamenarska, Z.; Seizova, K.; Iodice, C.; Petrova, A.; Nedelcheva, D.; Stefanov, K.; Popov, S.; *Bulg. Chem. Commun.* **2008**, *40*, 48.
- Mishra, P. M.; Sree, A.; *Asian J. Chem.* **2009**, *21*, 4429.
- Mishra, P. M.; Sree, A.; *J. Serbian Chem. Soc.* **2009**, *74*, 133.
- Goad, L. J.; *Mar. Chem.* **1983**, *12*, 225; Djerassi, C.; Silva, C. J.; *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 371.
- Bergquist, P. R.; Lavis, A.; Cambie, R. C.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1986**, *14*, 105.
- Kolesnikova, I. A.; Makarieva, T. N.; Stonik, V. A.; *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* **1992**, *103*, 501.
- Makarieva, T. N.; Bondarenko, I. A.; Dmitrenok, A. S.; Boguslavsky, V. M.; Stonik, V. A.; *J. Nat. Prod.* **1991**, *55*, 953; Santalova, E. A.; Makarieva, T. N.; Gorshkova, I. A.; Dmitrenok, A. S.; Krasokhin, V. B.; Stonik, V. A.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 153; Santalova, E. A.; Makarieva, T. N.; Ponomarenko, P.; Denisenko, V. A.; Krasokhin, V. B.; Mollo, E.; Cimino, G.; Stonik, V. A.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2007**, *35*, 439; Akinin, M.; Gros, E.; Vacelet, J.; Kashman, Y.; Gauvin-Bialecki, A.; *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2961.

13. Volkmer-Ribeiro, C.; Em *Manual de Técnicas para preparação de coleções zoológicas: Esponjas de água doce*; Malabarba, L. R.; Reis, R. E., eds.; Sociedade Brasileira de Zoologia, São Paulo, 1985, p. 1-6.
14. MacLeod, A. J.; Cave, S. J.; *J. Sci. Food Agric.* **1975**, *26*, 351.
15. Akakabe, Y.; Kajiwara, T.; *J. Appl. Phycol.* **2008**, *20*, 661; Jüttner, F.; Messina, P.; Patalano, C.; Zupo, V.; *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* **2010**, *400*, 63.
16. Jackson, J. B. C.; Buss, L.; *PNAS* **1975**, *72*, 5160; Sullivan, B.; Faulkner, D. J.; Webb, L.; *Science* **1983**, *221*, 1175.
17. Chaintreau, A.; *Flavour Fragrance J.* **2001**, *16*, 136.
18. Chalchat, J.-C.; Petrovic, S. D.; Maksimovic, Z. A.; Gorunovic, M. S.; *J. Essent. Oil Res.* **2000**, *12*, 455.
19. Nechev, J.; Christie, W. W.; Robaina, R.; Diego, F.; Popov, S.; Stefanov, K.; *Hydrobiologia* **2002**, *489*, 91; Nechev, J.; Christie, W. W.; Robaina, R.; Diego, F.; Popov, S.; Stefanov, K.; *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, *104*, 800; Nechev, J.; Christie, W. W.; Robaina, R.; Diego, F.; Popov, S.; Stefanov, K.; *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* **2004**, *137*, 365; de Rosa, S.; Iodice, C.; Nechev, J.; Stefanov, K.; Popov, S.; *J. Serbian Chem. Soc.* **2003**, *68*, 249.
20. Řezanka, T.; Sigler, K.; *Prog. Lipid Res.* **2009**, *48*, 206.
21. Taylor, M. W.; Hill, R. T.; Piel, J.; Thacker, R. W.; Hentschel, U.; *ISME J.* **2007**, *1*, 187; Pawlik, J.; McFall, G.; Zea, S.; *J. Chem. Ecol.* **2002**, *28*, 1103; Webster, N. S.; Taylor, M. W.; *Environ. Microbiol.* **2012**, *14*, 335.
22. Parfenova, V. V.; Terkina, I. A.; Kostornova, T. Ya.; Nikulina, I. G.; Chernykh, V. I.; Maksimova, E. A.; *Biol. Bull.* **2008**, *35*, 374; Costa, R.; Keller-Costa, T.; Gomes, N. C. M.; da Rocha, U. N.; van Overbeek, L.; van Elsas, J. D.; *Microb. Ecol.* **2013**, *65*, 232.
23. Wilkinson, C. R.; Garrone, R.; Vacelet, J.; *Proc. R. Soc. London, Ser. B* **1984**, *220*, 519; Leys, S. P.; Yahel, G.; Reidenbach, M. A.; Tunnicliffe, V.; Shavit, U.; Reswig, H. M.; *PLoS One* **2011**, *6*, e27787.
24. Manconi, R.; Piccialli, V.; Sica, D.; *Comp. Biochem. Physiol.* **1988**, *91B*, 237.
25. Hu, J. M.; Zhao, Y.-X.; Chen, J.-J.; Miao, Z.-H.; Zhou, J.; *B. Korean Chem. Soc.* **2009**, *30*, 1170.
26. de Barros, I. B.; Volkmer-Ribeiro, C.; Veiga Junior, V. F.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2013**, *49*, 167.
27. Bergquist, P. R.; *N. Z. J. Zool.* **1980**, *7*, 1; Bergquist, P. R.; Hofheinz, W.; Oesterhelt, G.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1980**, *8*, 423.