

Espongiários

Algumas Particularidades Biossintéticas*

M. FÁTIMA ARAÚJO¹, ALEXANDRA CRUZ², MADALENA HUMANES²,
MARIA TERESA LOPES², JOSÉ ARMANDO L. DA SILVA³, J.J.R. FRAÚSTO DA SILVA³

1. INTRODUÇÃO

As propriedades biológicas dos extractos de plantas e de animais são reconhecidas desde a Antiguidade, mas só no século passado surgiram os primeiros trabalhos de isolamento de compostos naturais activos como a morfina, o quinino e a nicotina, todos obtidos a partir de plantas terrestres.

Os metabolitos de origem marinha apresentam algumas características distintas dos de origem terrestre, o que justifica o desenvolvimento recente observado neste campo que,

entretanto, se transformou numa área de intensa investigação interdisciplinar. Os progressos verificados nesta área têm seguido diferentes vertentes ao longo do tempo. Na última década, cresceu o interesse por metabolitos com propriedades farmacêuticas e ecológicas de relevo; simultaneamente, foi dada uma maior atenção aos invertebrados marinhos como objecto de estudo em si mesmo, pelo facto de estes apresentarem numerosos metabolitos bioactivos. De todos os invertebrados marinhos, as esponjas têm sido os mais intensamente estudados sob o ponto de vista químico.

Datam do final do século passado as primeiras publicações relevantes sobre compostos derivados de Espongiários, nomeadamente sobre pigmentos. Posteriormente, Bergmann e colaboradores intensificaram os estudos sobre os metabolitos primários - ácidos nucleicos, aminoácidos, ácidos gordos, nucleósidos e, principalmente esteróis[1]. Nos anos quarenta e início dos anos cinquenta fizeram-se determinações dos teores em metais e halogéneos em esponjas, mas a aparentemente reduzida (ou não verificada) interrelação entre as vertentes orgânica e inorgânica não levou ao aprofundamento do problema[2]. Esta é, claramente, uma área que carece estudos mais pormenorizados.

Mais tarde, o interesse incidiu nos metabolitos secundários, na procura de estruturas químicas pouco usuais e na pesquisa da actividade biológica que muitos deles possuem. As substâncias bioactivas isoladas revelaram-se interessantes pelos seus efeitos terapêuticos (acções anti-inflamatória e anticancerígena, entre outras) e permitiram confirmar ou corrigir a classificação sistemática dos Espongiários (por exemplo, as esponjas da ordem Verongida são caracterizadas por sintetizarem derivados da bromotirosina[3]) já que a presença do mesmo tipo de metabolito e da mesma via de síntese pode confirmar classificações já realizadas ou provar a necessidade de proceder a ajustes taxonómicos. Estes metabo-

litos secundários são igualmente importantes pelo seu efeito tóxico ou antimicrobial, desempenhando um papel importante nas relações inter-específicas como mediadores de interacções ecológicas.

Neste, como noutros casos, os estudos biossintéticos de produtos naturais estiveram dependentes do desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas e da possibilidade de recurso a compostos com marcação isotópica. No caso das esponjas, o seu lento crescimento e a presença de microrganismos simbióticos tornam estes estudos complexos[3], dificultando o conhecimento das vias metabólicas e dos processos de interconversão dos produtos naturais. Assim, alguns metabolitos secundários que haviam sido isolados em esponjas foram igualmente obtidos do meio de cultura de bactérias isoladas de esponjas. Por outro lado, verificou-se a ocorrência de compostos estruturalmente semelhantes em extractos provenientes de espécies diferentes, enquanto que elementos da mesma espécie podem conter metabolitos distintos. Logo, torna-se provável que sejam microrganismos simbióticos os responsáveis pela biossíntese de alguns dos compostos bioactivos encontrados nas esponjas[4].

O ambiente marinho é considerado como a fonte mais abundante de metabolitos halogenados[5]; deste modo não é surpreendente a quantidade e diversidade de halometabolitos isolados de Espongiários[6] apesar de ser ainda muito limitado o conhecimento dos mecanismos de biohalogenação, assim como a função destes compostos no metabolismo das esponjas. Os processos envolvidos nestes fenómenos de biohalogenação são sobretudo de natureza enzimática. Os estudos dos metaloenzimas isolados de esponjas que se admitem estarem envolvidos nestes processos -haloperoxidasas- resumem-se a uma tentativa[7], cujos resultados foram inconclusivos, datada do final dos anos 70, anterior aos trabalhos efectuados neste campo com outros organismos marinhos, com especial realce para as Algas[5,8]. O

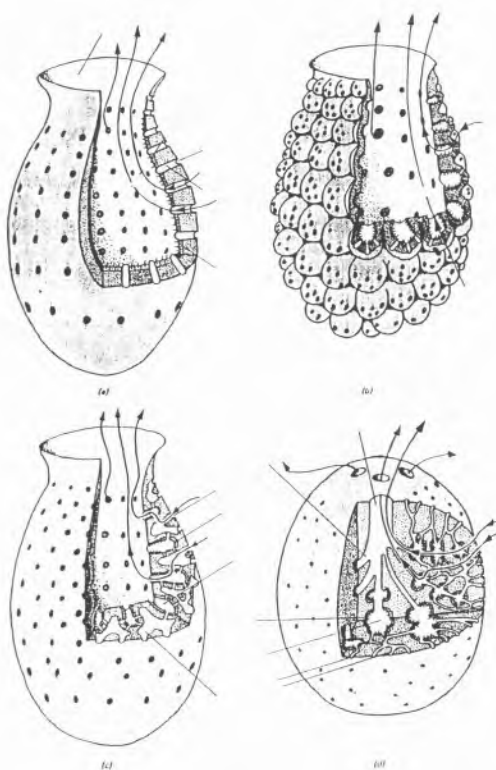


Figura 1. Esquema representativo dos diferentes tipos de organização das Esponjas. (a) Estrutura encontrada em dois géneros das Calcarea, constituída por uma unidade tubular simples cuja cavidade interna é limitada por uma camada coenocitária única. São visíveis o ósculo exalante e os ostíolos inalantes; (b) e (c) Nestas construções surge um sistema inalante formado por câmaras coenocitárias resultantes de um enrolamento progressivo da coenoderme e da pinacoderme. A pinacoderme apresenta-se projectada para o exterior em várias direcções; (d) Tipo de organização encontrada na maioria das Calcarea e restantes esponjas. Observa-se um maior volume e complexidade do mesohilo que acompanha o desenvolvimento do sistema aquífero.

estado incipiente do conhecimento sobre biohalogenação em Espongiários, aliado ao crescente número de halometabolitos isolados a partir destes animais, incentivou a realização de um estudo nesta área. No entanto, a compreensão do papel desempenhado pelos elementos metálicos neste sistema biológico particular exige um conhecimento mais aprofundado da biologia destes organismos, das famílias de compostos deles isolados e das respectivas vias biossintéticas.

2. ASPECTOS GERAIS DA BIOLOGIA DOS ESPONGIÁRIOS

As esponjas são Metazoários filtradores e sedentários remontando a sua origem ao período Pré-Câmbrico. Posteriormente ocorreram alterações metabólicas, fisiológicas e ecológicas dentro do grupo levando à diversidade química apresentada pelas cerca de 5000 espécies que actualmente constituem o filo [9].

Os Espongiários são igualmente designados por Porífera. Esta denominação do filo tem origem latina, resultando da aglutinação de *poru* (poro) e *ferre* (trazer). De facto, estes organismos estão organizados em torno de um complexo sistema de poros e canais por onde circula água nos tecidos. Dela extraem o alimento e o oxigénio necessário para a respiração e nela lançam os produtos de excreção e reprodução. A dieta destes animais é variada, podendo ingerir partículas de dimensões até cerca de 50 µm. As bactérias estão entre as fontes de nutrientes, assim como glícidos, aminoácidos e seus polímeros, que se encontram dissolvidos na água do mar [8], seu *habitat* preferencial.

São de há muito conhecidas associações entre esponjas e outros organismos; macrorganismos como crustáceos, poliquetas e moluscos são habitantes comuns dos Espongiários que se comportam como hospedeiros nestas relações onde predomina o comensalismo [10]. Crustáceos e poliquetas infiltram-se nos canais de esponjas como as Hexactinellida, Dict-

yoceratida ou Hadromerida [9] satisfazendo as suas necessidades nutricionais e respiratórias através da corrente de água que flui no sistema de canais destas esponjas. Noutro tipo de associação, crustáceos e bivalves utilizam as esponjas como camuflagem, protegendo-os de predadores.

A associação com microrganismos é, normalmente, de natureza simbiótica.

Os microrganismos são filtrados do meio aquoso com uma eficiência que varia com as diferentes espécies e que está relacionada com as características fisiológicas das células que delimitam os ostíolos¹, com o comprimento e complexidade do sistema aquífero e com as dimensões das câmaras coanocitárias² [11].

Na tabela 1 são especificados o tipo, a localização e a ocorrência dos simbiontes de Espongiários, bem como a coloração das espécies de esponjas que é atribuível à presença de tais simbiontes.

O corpo dos Espongiários é suportado por um esqueleto interno

composto por elementos que podem ser de natureza orgânica (colagénio) ou inorgânica (espículas).

O esqueleto espicular é uma estrutura de suporte importante, que pode ser complementada pela presença de fragmentos de rocha, areia ou por espículas de outra origem que a esponja tenha incorporado. É comum a sua associação com constituintes de natureza orgânica (colagénio), conferindo um certo grau de consistência à esponja. O aumento progressivo da quantidade de material espicular presente, em relação ao material orgânico, conduz a uma textura de solidez crescente, podendo mesmo ser a esponja idêntica a uma rocha - caso das ordens de Demospongiae, Choristida e Lithistida [9].

Apesar de conferir uma maior solidez às esponjas, o esqueleto mineral não contribui especialmente para o mecanismo de defesa contra predadores destes organismos, o qual tem sobretudo uma natureza bioquímica e não física [9,13]. O mecanismo de defesa é, naturalmente, im-

Tabela 1- Simbiontes de Espongiários [12]

Simbionte	Ocorrência (Ordem)
Cianobactérias <i>Aphanocapsa</i> (unicelular) localização: intra e extracelular <i>Phormidium</i> (pluricelular) localização: extracelular Origina coloração verde e do violeta ao castanho	Calcarea Clathrinida, Leucettida, Sycettida
Bactérias localização: intra e extracelular	Demospongiae Homosclerophorida, Astrophorida, Lithistida, Hadromerida, Halichondrida, Poecilosclerida, Haplosclerida, Petrosiida, Dictyoceratida, Dendroceratida, Verongida
Zooxanthellae localização: extracelular Origina coloração amarelo-esverdeado	Calcarea Clathrinida, Leucettida, Sycettida, Pharetronida, Sphinctozoida
Zoochlorellae localização: intracelular Origina coloração verde	Demospongiae Homosclerophorida, Astrophorida, Hadromerida, Poecilosclerida, Haplosclerida, Petrosiida, Dictyoceratida, Axinellida, Dendroceratida, Verongida
	Hadromerida (Cliona)
	Muitas espécies de água doce

portante para a sobrevivência dos Porifera, animais que colonizam todos os *habitats* aquáticos. Podem ser encontrados povoando águas salgadas, salobras e doces, a diferentes profundidades, em zonas de luminosidade diversa, e sobre substratos tão distintos quanto rocha, areia, lama, ou mesmo ocupando cavidades de formação de natureza calcária. De facto é notável a capacidade de perfuração que algumas esponjas apresentam, como sejam as chamadas esponjas perfurantes, normalmente da família Clionidae.

O mecanismo de penetração do substrato utilizado pelas Clionidae tem sido intensamente estudado[14,15] pela importância ecológica e geológica destas esponjas na bioerosão e também pela sua capacidade de destruir conchas de moluscos prejudicando a sua exploração comercial. A perfuração parece ocorrer pela libertação de anidrase carbónica que dissolve o substrato calcário ao longo da zona de contacto da concha com células especializadas da esponja.

A simplicidade destes organismos incentivou o estudo das suas interações celulares, sobretudo dos mecanismos de adesão e reconhecimento celular, sendo conhecida a capacidade das células das esponjas se agregarem após a sua dissociação mecânica[9].

A sistemática dos Espongiários baseia-se sobretudo em características do esqueleto, tais como a composição química e a morfologia das espículas ou outros elementos esqueléticos, e ainda no modo como estes elementos estão associados e se localizam na esponja. Além destas são utilizadas características reprodutivas, bioquímicas, histológicas e ecológicas. A morfologia externa e a cor são pouco importantes pois podem ser influenciadas por factores externos.

Consideram-se actualmente quatro classes no filo Porifera[9]:

- Hexactinellida;
- Calcarea;
- Sclerospongiae;
- Demospongiae.

As espécies pertencentes à classe Hexactinellida colonizam fundos ma-

rinhos de substrato móvel, sendo mais comuns em águas profundas. Apresentam esqueleto silicioso com 3 eixos principais e 6 pontas (estrutura hexactina). Não possuem pinacoderme³ superficial, nem matriz mesohílica⁴.

As Calcarea são esponjas exclusivamente marinhas que colonizam substratos firmes. O seu esqueleto é constituído por espículas discretas de carbonato de cálcio, apresentando uma estrutura cristalina do tipo calcite.

A classe Sclerospongiae integra esponjas que possuem espículas siliciosas e esqueleto orgânico de colagénio restritos a uma fina camada superficial viva suportada por um esqueleto calcário maciço, cuja estrutura cristalina pode ser do tipo calcite ou aragonite.

A maioria das espécies dos Porifera pertence a uma única classe, as Demospongiae. Representam 95% do filo, colonizam todo o tipo de substratos e possuem grande diversidade estrutural, fisiológica e reprodutora. O seu esqueleto mineral é constituído por espículas siliciosas, com um ou quatro eixos e conjuga-se com, ou é suplementado por um esqueleto orgânico de colagénio (disperso no mesohilo sob a forma de fibras ou filamentos de espongina⁵).

Na figura 2 apresentam-se alguns exemplares da costa de Portugal Continental.

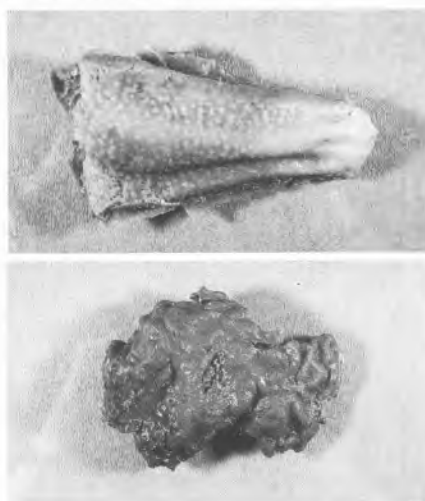


Figura 2. Esponjas da costa portuguesa;
(A) *Hymeniacidon sanguinea* (B) *Geodia cydonium*

3. COMPOSTOS QUÍMICOS ISOLADOS DE ESPONJAS

3.1. Introdução

Nos sistemas biológicos, os compostos químicos são sintetizados e degradados por várias reacções, mediadas normalmente por via enzimática; estes processos são denominados metabolismos. O envolvimento directo dos compostos químicos em processos metabólicos essenciais ou não, está na base da distinção entre metabolismo primário e metabolismo secundário.

Todos os organismos possuem vias metabólicas semelhantes, através das quais sintetizam e consomem espécies químicas essenciais, tais como glícidos, aminoácidos, nucleótidos e os polímeros deles derivados. Este é o chamado mecanismo primário e as espécies químicas consideradas são os denominados "metabolitos primários". Por outro lado, a maioria dos organismos sintetiza também compostos que não têm intervenção aparente nas vias metabólicas essenciais; estes compostos são os "metabolitos secundários", geralmente designados "produtos naturais". Este tipo de metabolismo é, tal como o primário determinado geneticamente. No entanto, a sua activação parece estar dependente das fases de crescimento e desenvolvimento dos organismos, assim como de períodos de *stress* causados, por exemplo, por limitação de nutrientes ou por ataque microbiano[16].

Os metabolitos secundários eram anteriormente considerados como produtos resultantes de processos de desintoxicação, dado que não era possível atribuir-lhe qualquer função importante em processos celulares básicos. Mais recentemente, a biossíntese de produtos naturais é considerada como representativa de um processo de evolução que conduz à produção de compostos tóxicos para outras espécies, com consequente acréscimo das hipóteses de sobrevivência das espécies produtoras e resistentes, mas as funções biológicas destes compostos na comunicação intra e interespecies são hoje

reconhecidas[17], confirmando a estrutura evolucionista: tóxico→desintoxicação → expulsão → sinalização de presença → mensageiro[18].

Note-se que, na verdade, existe uma estreita relação entre os dois tipos de metabolismo. O metabolismo primário fornece os precursores dos metabolitos secundários, sendo muitos destes precursores igualmente utilizados na biossíntese de algumas classes de metabolitos primários o que torna difícil, por vezes, estabelecer a fronteira entre os dois.

O ambiente marinho proporciona aos seres vivos condições de desenvolvimento diferentes das oferecidas pelos ambientes terrestres, o que se reflete nas diferenças marcantes existentes entre os metabolitos produzidos por organismos destes dois meios. Por exemplo, a presença de grupos halogenados (especialmente bromados) e isocianatos, que se encontram frequentemente em algas ou esponjas, contrasta com o facto de serem raros em metabolitos de origem terrestre.

Nas últimas duas décadas têm sido intensificados os estudos em torno dos produtos naturais de origem marinha. São inúmeros os novos compostos isolados[6], muitos deles apresentando estruturas peculiares e actividade biológica relevante. Estes dois factores estão na base do interesse demonstrado neste campo, em especial pela indústria farmacêutica.

Dada a complexidade dos produtos orgânicos sintetizados, frequentemente em quantidades vestigiais, bem como as alterações fundamentais das vias metabólicas que conduzem a estes compostos de estruturas invulgares, os estudos biossintéticos dos metabolismos secundários marinhos são bastante difíceis. Estas dificuldades são acrescidas no caso de organismos, como as esponjas, que apresentam vários microsimbiontes que podem estar na origem da síntese destes metabolitos.

3.2. Metabolitos Secundários

- Tipos de Compostos e sua Ordenação

A ordenação dos metabolitos secundários é normalmente efectuada tendo em conta os seus precursores[16]. Muitas das classes consideradas provêm da condensação de unidades acetato derivadas do acetil-coenzima-A (ver figura 3). Neste grupo incluem-se:

- ácidos gordos saturados, de fórmula geral $\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$;
- ácidos gordos insaturados os quais apresentam, em geral, cadeias hidrocarbonadas de C_{14} a C_{22} ;
- ácidos gordos que incluem na sua constituição grupos metílicos e anéis ciclopropílicos;
- prostaglandinas- grupo de ácidos gordos insaturados hidroxilados;
- poliacetilenos;
- polifenóis.

Também derivado da acetilcoenzima-A surge um segundo grupo de compostos: os isoprenóides ou terpenóides. Este grupo é o maior e estruturalmente mais diverso grupo de metabolitos secundários e deriva, como o anterior, do metabolismo do acetato.

Os terpenos resultam da condensação sucessiva de unidades de isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno) de uma forma "head to tail", produzindo polímeros que podem ser lineares ou cíclicos, de elevada reactividade, como por exemplo:

- monoterpenos ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}$);
- sesquiterpenos ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}$);
- diterpenos ($\text{C}_{20}\text{H}_{32}$);
- compostos que apresentam estruturas base características dos esteróides, mas que contêm um grupo -OH em C3, um grupo -CH₃ em C10 e C13 e uma cadeia alifática em C17.

Outro exemplo de polímeros superiores são os carotenóides que são geralmente metabolitos poliolefínicos C_{40} com muitos isómeros geométricos.

Um terceiro grupo deriva do ácido xiquímico (3,4,5-trihidroxiciclohexa-1-enecarboxílico) e a ele pertence um elevado número de compostos aromáticos relacionados com os aminoácidos aromáticos fenil-alanina e tirosina.

São ainda considerados mais dois grupos. O primeiro é constituído

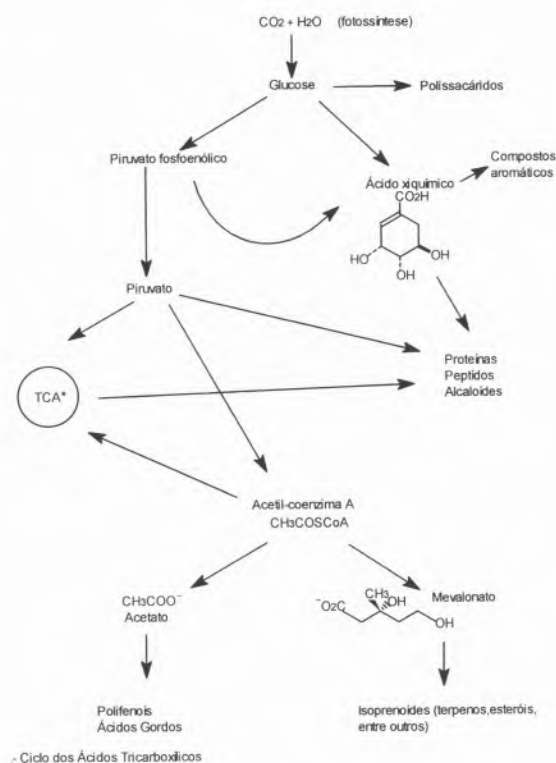


Figura 3. Principais vias de biossíntese

por alcalóides derivados do metabolismo de aminoácidos e o último é formado por metabolitos de origem biossintética mista. Nas secções seguintes estes metabolismos são descritos em maior pormenor.

3.3. Exemplos de Metabolitos Secundários Isolados de Esponjas

3.3.1 Ácidos gordos

As esponjas apresentam ácidos gordos pouco comuns, os quais têm na sua constituição cadeias hidrocarbonadas com um número de átomos de carbono superior ao máximo "normal" de 24, encontrado noutros organismos[8,19].

Foram isolados vários ácidos gordos com estas características da esponja *Microciona prolifera*, tendo como componentes predominantes os ácidos hexacosa-5,9-dienóico $\Delta^{5,9}\text{C}_{26:2}$ e hexacosa-5,9,19-trienóico $\Delta^{5,9,19}\text{C}_{26:3}$ [8], cuja estrutura é apresentada na figura 4.

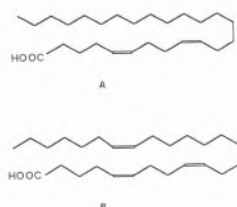


Figura 4. Estruturas dos ácidos hexacosano-5,9-dienoico (A) e hexacosano-5,9,19-trienoico (B).



Figura 5. Aplysterol (A) e 24,28-didehydroaplysterol (B)

O recurso à marcação isotópica com incorporação de acetato com ^{14}C permitiu estabelecer que estes ácidos gordos são formados por um mecanismo de alongamento da cadeia de precursores, como os ácidos C_{16} palmoleico (no caso do $\Delta^{5,9}\text{C}_{26:2}$) e palmítico (no caso do $\Delta^{5,9,19}\text{C}_{26:3}$). Esta é apenas uma proposta mecanística muito simplificada, dado o escasso conhecimento das vias biossintéticas nestes organismos.

Posteriormente, este estudo foi generalizado a vários géneros de cinco ordens de Demospongiae[19]. Estes resultados levaram à conclusão de que na classe Demospongiae é comum a existência de ácidos gordos com cadeias C_{24} a C_{30} , sendo também de realçar variações sazonais no teor dos ácidos gordos.

3.3.2 Esteróis

As esponjas são uma das fontes mais abundantes para o isolamento de esteróis. De facto, apresentam uma grande variedade deste tipo de compostos, cujos teores variam grandemente entre as diferentes espécies. Algumas esponjas contêm mais de 70 es-

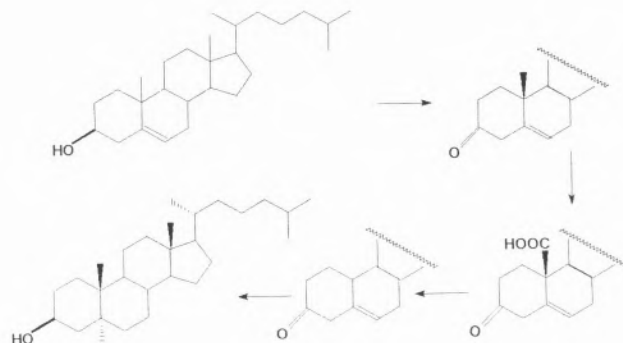


Figura 6. Proposta de um mecanismo de conversão do colesterol a 19-noresterol.

teróis diferentes, enquanto que outras são mais selectivas. Em trabalho recente[20], este tópico é explorado em pormenor, não só no que se refere ao isolamento, como também quanto às vias biossintéticas, sendo de destacar as características invulgares apresentadas por muitos daqueles compostos.

Assim, da esponja *Verongia aerophoba* foram obtidos o aplysterol e o 24,28-didehydroaplysterol, cuja estrutura se apresenta na figura 5.

Por outro lado, verificou-se que a esponja *Axinella polypoides* converte colesterol absorvido dos nutrientes

em 19-noresterol com um rendimento de 2%, resultado obtido com recurso à marcação isotópica com ^{14}C .

Por incorporação de precursores, com marcação isotópica com ^{14}C e ^3H foi possível estudar esta conversão em maior pormenor, que se representa em esquema na figura 6. O colesterol é convertido em Δ^4 -3-cetona por oxidação, ocorrendo então a oxidação e descarboxilação em C_{19} [21].

Os três esteróis acima apresentados, isolados de Demospongiae, provaram derivar da transformação do colesterol, tendo origem nos nutrientes e não sendo sintetizados pelo organismo. Estes resultados são concordantes com vários estudos de diversos autores[1] que testaram a capacidade das esponjas utilizarem acetato, mevalonato e colesterol na elaboração de algumas estruturas invulgares de esteróis. Estes trabalhos demonstraram que as Calcarea têm a capacidade de sintetizar esteróis a partir do acetato e do mevalonato, enquanto que as Demospongiae não o conseguem, tendo que recorrer ao colesterol proveniente da sua nutrição. Esta conclusão foi confirmada posteriormente [22,

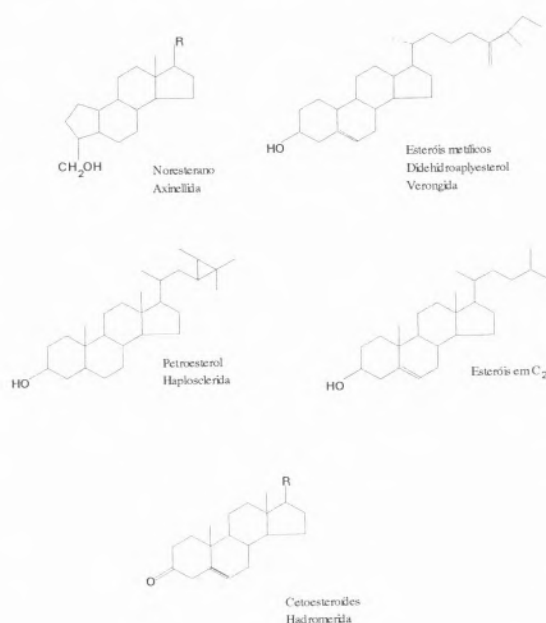


Figura 7. Estrutura e ocorrência de alguns esteróis em esponjas.

23], sendo assim propostas quatro vias para a biossíntese de esteróis em esponjas:

- (a) biossíntese a partir do acetato e mevalonato (como nas *Calcarea*);
- (b) captura do meio sem modificação química;
- (c) captura do meio com modificação química;
- (d) síntese por simbioses.

Na figura 7 são apresentados vários esteróis invulgares, obtidos de esponjas, de modo a exemplificar o tipo de estrutura e ocorrência verificadas[1].

3.3.3 Terpenos

Em geral, as esponjas apresentam teores de esteróis e terpenos numa proporção inversa[1]. Estes compostos utilizam os mesmos precursores (derivados da acetilcoenzima-A) que podem seguir vias meta-

bólicas alternativas.

Uma vasta gama de terpenos, de todas as categorias, ocorre em esponjas de variadas espécies[6]. Num trabalho publicado nos anos 70 foram isolados cerca de meia centena de sesquiterpenos diferentes a partir de apenas 11 espécies[1], o que só por si é representativo da abundância destes compostos nestas espécies. Na figura 8 são apresentados alguns exemplos de terpenos obtidos de esponjas da ordem Dictyoceratida.

A actividade biológica apresentada por alguns dos terpenos foi explorada num trabalho sobre a defesa química das esponjas perante alguns peixes predadores[13]. No conjunto de metabolitos isolados, destacam-se dois sesquiterpenos da esponja *Dysidea ambliia*, a pallelescina A e a furodysina, figura 9, que se mostraram

inibidores da acção predadora apesar de ocorrerem em baixas concentrações nos animais (0.4% e 0.0015%, em peso seco, respectivamente). Outros dois terpenóides da mesma esponja (ambliol A e ambliofurano) não mostraram esta acção inibidora, apesar ocorrerem em concentrações superiores, respectivamente de 1.1% e 0.6% do peso seco da esponja.



Figura 9. Estruturas da pallelescina A (A) e da furodysina (B).

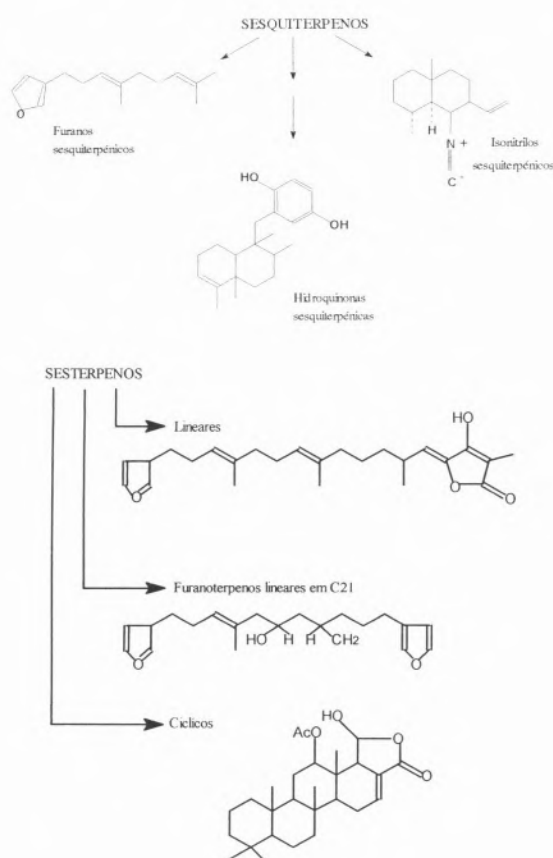


Figura 8. Exemplos de algumas categorias de terpenos obtidos.

3.4. Notas sobre Estudos Biossintéticos

Na realização de estudos biossintéticos em organismos marinhos há que referir vários aspectos que os dificultam, dos quais se podem destacar três mais fundamentais:

- os metabolitos puros são isolados em quantidades vestigiárias;
- a velocidade de síntese dos metabolitos é lenta, o que conduz à necessidade de estudos prolongados quando se recorre à incorporação de precursores marcados isotopicamente;
- a velocidade de conversão dos metabolitos pode ser lenta[24].

Estes três aspectos estão relacionados com o papel desempenhado pelo metabolito no organismo. A acumulação do metabolito pode, por exemplo, ocorrer apenas quando o organismo atinge determinada fase de desenvolvimento ou em resposta ao nível de nutrientes. Especificamente para as esponjas pode citar-se o caso da produção de esteróis (que têm um papel importante ao nível celular como intermediários metabólicos) a qual pode estar sujeita a inibição; assim há que ter em conta a possibilidade de variações na compo-

sição dos metabolitos dos espongiários como resposta a alterações ambientais. Desta forma, um estudo biossintético deve sempre admitir os efeitos de possíveis variações sazonais e ambientais[24].

Para além destes aspectos, é necessário considerar a questão da captura de precursores (relacionada com o teor de nutrientes do meio) e o seu transporte para os locais (células especializadas) de síntese dos metabolitos.

Em organismos marinhos, como as esponjas, coloca-se sempre a questão da importância das associações simbióticas nos processos de biossíntese. Como foi referido na secção 2, é comum a presença de microssimbiontes em esponjas, sendo a natureza destas associações variável de espécie para espécie. Esta questão será desenvolvida adiante com a apresentação de exemplos de metabolitos cuja origem parece ser devida aos microssimbiontes e não às esponjas a eles associadas.

Uma vez tomadas em consideração estas condicionantes, e realizada uma caracterização estrutural do metabolito em estudo, é possível propor a sua biogénese a partir de um dado precursor. Neste precursor é efectuada a incorporação de radioisótopos apropriados e o processo de biossíntese é acompanhado pelo isolamento do composto final e, se necessário, de compostos intermediários. Após a purificação e análise do conteúdo isotópico do metabolito é possível considerar a relação precursor/metabolito (nesta fase há que verificar se ocorreu incorporação de uma percentagem suficientemente elevada de precursor marcado que forneça resultados significativos. Só então é possível sugerir uma via biossintética do precursor do metabolito[16]).

Nos Espongiários, a diversidade estrutural exibida pelos seus metabolitos implica o envolvimento de trajectórias biossintéticas igualmente particulares. Para além disso, e como se disse, há que considerar a baixa velocidade metabólica destes animais e a presença de microrganismos simbióticos, daí que estes estudos sejam,

até ao momento limitados. No entanto, são várias as propostas biossintéticas de metabolitos derivados de esponjas[3,8,24,25] já apresentadas.

3.5. Metabolitos Secundários Sintetizados na Presença de Microrganismos Simbióticos

Na secção 2 foi realçado que a presença de microrganismos simbióticos é comum nos elementos do filo Porífera.

Esta presença está na origem de dúvidas colocadas relativamente à verdadeira origem de alguns dos metabolitos isolados em esponjas.

Recentemente, alguns dos metabolitos secundários que haviam sido isolados de extractos de esponjas foram igualmente obtidos a partir dos meios de cultura de bactérias marinhas isoladas de esponjas. Por exemplo o ácido okadaico (inibidor de fosfatases proteicas e agente anticancerígeno), figura 10, isolado inicialmente da esponja *Halichondria okadai*, é também produzido pelo dinoflagelado *Prorocentrum lima*[26].

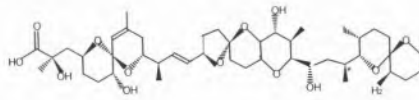


Figura 10. Ácido Okadaico.

Este ácido foi também isolado noutros dinoflagelados como o *Dinophysis fortii* e *Dinophysis acuminata*. A biossíntese do ácido okadaico a partir do *P. lima* foi estudada por utilização de radioisótopos, sendo os resultados ainda preliminares[3].

Uma bactéria, *Vibrio* sp., foi isolada de uma esponja do género *Dysidea*. Esta bactéria biossintetiza éteres difenólicos bromados. Por análise de GC-MS⁶ foi possível separar o composto 3,5-dibromo-2-(3',5'-dibromo-2'-metoxifenoxi)fenol, figura 11, o qual havia sido obtido anteriormente de extractos de *Dysidea* de que a bactéria foi isolada[27].

Também, algumas ceramidas de ácidos gordos hidroxilados, obtidas

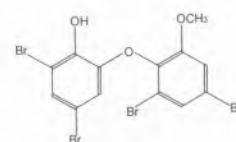


Figura 11.
3,5-dibromo-2-(3',5'-dibromo-2'-metoxifenoxi)fenol.

inicialmente da esponja *Dysidea etheria*, foram isoladas de um dinoflagelado simbiótico do género *Symbiodinium*[3].

Estes exemplos são extensíveis a outros metabolitos secundários, tais como alcalóides de esponjas dos géneros *Reniera* e *Xestospongia*, entre outros. Desta forma, para assegurar a origem dos compostos obtidos há que isolar, identificar e desenvolver os simbiotes num meio de cultura apropriado e proceder a tentativas de isolamento desses mesmos compostos, antes de se afirmar a proveniência do metabolito e fazer previsões biossintéticas.

É de realçar que estes microrganismos surgem como uma fonte promissora de substâncias bioactivas.

4. COMPOSTOS HALOGENADOS EM ESPONJAS

4.1. Introdução

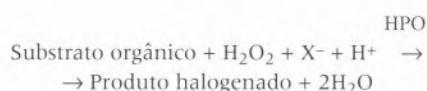
Como já foi referido, o ambiente marinho apresenta características químicas distintas das do ambiente terrestre que se reflectem na composição dos metabolitos obtidos de organismos oriundos destes meios. Os organismos marinhos são a fonte mais abundante de compostos halogenados[6].

Tem sido atribuída uma importância crescente aos compostos halogenados, reconhecida que foi a sua diversidade na natureza, em particular como produtos secundários do metabolismo de bactérias, fungos e organismos marinhos. Na realidade, verificou-se que as espécies capazes de produzir estes metabolitos são mais abundantes do que se esperava[28]. O estudo destes metabolitos e a procura de outros compostos são

incentivados pela actividade como agentes antibacterianos, anticancerígenos e antivirais, apresentada por muitos destes compostos[25].

As principais classes de produtos naturais marinhos contendo halogénios são os terpenos, os acetogénios, os compostos derivados da tirosina e os alcalóides. Nestes metabolitos o bromo é o halogénio mais frequente[24].

Apesar da enorme quantidade de halometabolitos até agora isolados e identificados, o conhecimento de enzimas passíveis de intervir no processo de biohalogenação destes compostos está, ainda, restrito às haloperoxidasas (HPO). Estes enzimas amplamente distribuídos na natureza, apresentam a capacidade de catalisar um elevado número de reacções, de acordo com a equação geral:



As haloperoxidasas estão divididas em três grupos distintos de acordo com a sua selectividade relativamente aos diferentes iões halogénio, ou seja:

- Cloroperoxidasas- oxidam Cl^- , Br^- , I^- ;
- Bromoperoxidasas- oxidam Br^- , I^- ;
- Iodoperoxidasas- oxidam apenas I^- .

Se para as Algas já foi observada actividade de haloperoxidasas em diversas zonas do planeta, inclusive na costa portuguesa[29, 30], no caso específico dos Espongiários, apenas um trabalho foi publicado[7] sobre haloperoxidasas, o qual se mostrou inconclusivo. Deste modo, encontra-se em aberto uma vasta área de estudo no campo dos metabolitos halogenados extraídos de esponjas.

4.2 Halometabolitos em Esponjas

Ao longo deste trabalho têm unicamente sido focados metabolitos secundários, no entanto, convém referir que os metabolitos primários obtidos de esponjas são, do mesmo

modo, extremamente numerosos e de características particulares. Por exemplo, entre 1985 e 1993 foi comunicado o isolamento de 50 péptidos de esponjas marinhas, alguns dos quais não só apresentavam actividade biológica interessante, como continham novos aminoácidos[31].

A jaspamida, figura 12, foi o primeiro péptido halogenado bioactivo a ser isolado da ordem Choristida, mais precisamente do género *Jaspis*[31]. Este metabolito apresenta actividade insecticida.

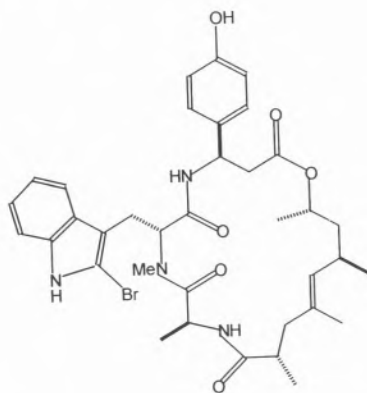


Figura 12. Jaspamida.

Da esponja *Geodia baretii* foi isolado o péptido bromado "barettin", figura 13, que apresenta resíduos de prolina e de 6-bromodihidrotriptofano na sua composição.

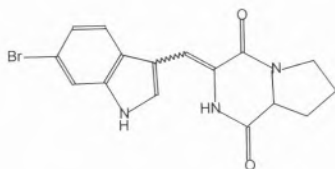


Figura 13. "Barettin".

O último exemplo seleccionado deste grupo é a orbiculamida A, figura 14, péptido cíclico, obtido da esponja *Theonella swinhoei*. Este agente citotóxico contém três aminoácidos invulgares sendo um deles halogenado, o 2-bromo-5-hidroxitriptofano.

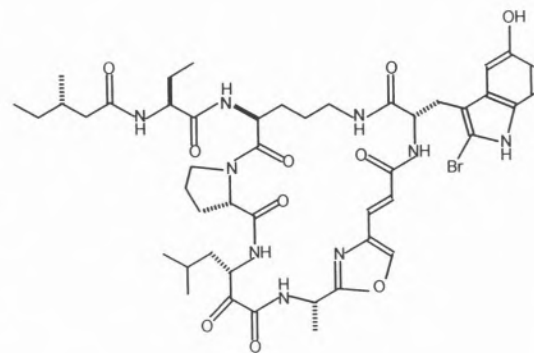


Figura 14. Orbiculamida A.

A esponja *Cliona celata* foi alvo de vários trabalhos ao longo de 2 anos[32-35]. Numa primeira fase foi isolado um derivado do 6-bromotriptofano, a tetracetil clionamida, que apresenta actividade antibiótica (ver figura 15).

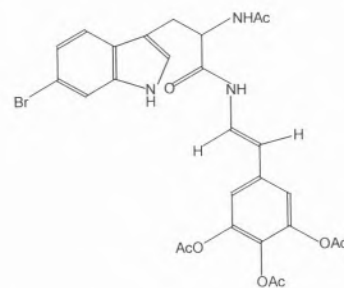


Figura 15. Tetracetil Clionamida.

No ano seguinte foi comunicado o isolamento da Clionamida, figura 16, um metabolito secundário de actividade antibiótica muito moderada. Os trabalhos seguintes registam a identificação de alcalóides peptídicos, denominados de celenamida A, B, C e D.

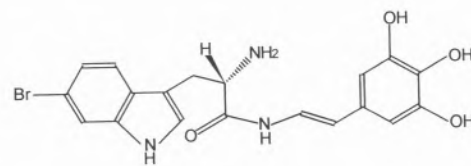


Figura 16. Clionamida.

Os halometabolitos podem ser utilizados (tal como acontece com outros metabolitos) como indicadores químicos taxonómicos; por exemplo os derivados do bromopirrol são característicos da ordem Axinellida, enquanto que as esponjas da ordem Verongida são caracterizadas pela sua capacidade de sintetisarem metabolitos derivados da bromotirosina[1,3]. Como exemplos de derivados da bromotirosina da ordem Verongida podem referir-se:

– a aerotionina, um metabolito obtido da esponja *Aplysina fistularis*, que é um derivado da dibromotirosina. Este metabolito representa 1% do peso seco da esponja e é um agente inibidor da predação[36].

– a 7-bromocavernicolonona, obtida da esponja *Aplysina cavernicola*, cujo precursor é a 3,5-dibromotirosina[37].

São considerados como prováveis precursores de muitos dos metabolitos isolados das Verongida a 3-cloro, 3-bromo, 3,5-dicloro e a 3-bromo-5-clorotirosina.

Apesar de até este ponto terem sido focados exclusivamente bromometabolitos, devem ser igualmente considerados os metabolitos clorados e iodados, assim como os compostos hetero-halogenados. Alguns exemplos destes compostos apresentam-se na figura 17; outros podem ser encontrados em várias das referências bibliográficas citadas neste trabalho [5,6,8,17,38].

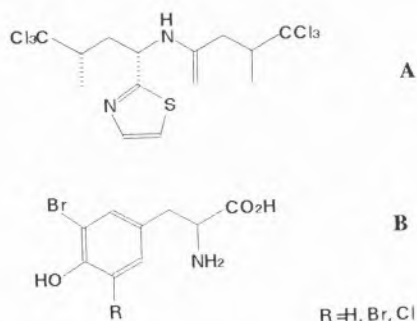


Figura 17.

(A) Dysideatiazol - Derivado aminoácido policlorado da esponja *Dysidea herbacea* (32).

(B) Composto hetero-halogenado da esponja *Despongia* sp. (5).

4.3. Estudos Biossintéticos

Os estudos biossintéticos em halometabolitos de organismos marinhos têm sido alvo de desenvolvimentos significativos.

A evolução observada neste domínio, permitiu o estabelecimento de vários percursos biossintéticos de forma bastante concreta; assim foram propostos vários esquemas representativos da biossíntese de acetogénicos, terpenos e metabolitos halogenados mistos, relativos a sistemas biológicos marinhos para os quais são conhecidos os tipos de mecanismos enzimáticos envolvidos nos vários passos do processo de síntese[24]. O facto dos metabolitos isolados das esponjas apresentarem características invulgares, associado à própria particularidade fisiológica destes organismos, inviabiliza o estabelecimento de paralelismos com quaisquer percursos biossintéticos de outros sistemas biológicos.

Em especial, nos Espongiários são totalmente desconhecidos quaisquer mecanismos enzimáticos intervenientes no processo de biohalogenação; logo, qualquer tentativa de comparação com os percursos apresentados para outros sistemas biológicos, designadamente para as algas, é injustificada.

Como foi focado, poucas propostas biossintéticas apresentadas para metabolitos derivados de espon-

jas, como as referidas em [3,24] por exemplo, são baseadas exclusivamente nos resultados das técnicas de incorporação de precursores marcados isotopicamente e no estabelecimento de analogias com outros sistemas. Este último aspecto não é viável pelos motivos acima descritos, enquanto que a marcação isotópica estabelece apenas uma relação precursor/metabolito e eventualmente indica a presença de determinado intermediário. Logo, estes dados não são suficientes para a consideração de vias biossintéticas em Espongiários, sendo esta uma área onde são esperados desenvolvimentos num futuro próximo.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

O processo de compreensão da química dos Espongiários deverá necessariamente abranger o esclarecimento das funções biológicas de alguns elementos químicos menos frequentes que neles ocorrem. Uma pesquisa bibliográfica exaustiva não revelou nenhum desenvolvimento significativo dos últimos resultados publicados ainda no início da década de 50[2]. Recentemente, dados obtidos por espectrometria de fluorescência de raios-X com esponjas provenientes da Madeira, Portugal Continental e Angola vieram, de facto, comprovar a existência de algumas particularidades que se encontram sumariadas na tabela 2[39].

Tabela 2 - Alguns dos componentes que permitem diferenciar entre espécies de esponjas liofilizadas provenientes das costas de Portugal Continental, Madeira e Angola, determinados por espectrometria de fluorescência de raios-X[39]

Elementos	<i>Hymeniacidon sanguinea</i> ¹	<i>Halichondria panicea</i> ²	<i>Halichondriidae</i> ³	<i>Suberitidae</i> ⁴	<i>Ircinia</i> sp. ⁵
Ti (ppm)	188-463	371-724	157-380	1300-2400	3200
Fe (%)	0,18-0,59	0,39-0,59	0,15-0,17	1,70-2,44	2,72
Ni (ppm)	9-14	8-10	7-8	2400-4100	100
Zn(ppm)	1100-2700	72-286	21-31	456-540	540
Br (ppm)	267-466	345-528	129-220	2300-2800	6600

¹ Intervalos de concentração obtidos para seis amostras recolhidas entre 1992 e 1994 na zona intertidal da costa portuguesa

² Espécie pertencente à mesma classe taxonómica que 1, sendo algumas das estações de colheita comuns entre as duas espécies

³ Amostras pertencentes à família Halichondriidae (a mesma da anterior), mas provenientes de Angola

^{4,5} Amostras provenientes da ilha da Madeira

Nestes resultados destaca-se a presença significativa de titânio, elemento a que ainda não foi atribuída qualquer função em sistemas biológicos, mas que permite diferenciar algumas das espécies consideradas no referido trabalho. Por outro lado, o ferro, o níquel e o zinco (elementos reconhecidamente essenciais) acumulam-se de forma diferenciada nas espécies estudadas. O bromo é ainda outro dos elementos a salientar. As variações interespecie verificadas poderão, eventualmente estar associadas a metabolitos bromados voláteis que se perdem na liofilização das amostras, ou corresponderão a diferentes funções deste elemento neste tipo de sistemas vivos.

Estes e outros resultados obtidos deverão ser relacionados com o equipamento enzimático e com os metabolitos das esponjas, mas é curioso notar que, numa pesquisa efectuada para os últimos doze anos, foram encontrados apenas 11 artigos referentes a enzimas isolados de esponjas e em nenhum caso referem a existência de centros activos com metais. Anteriormente a 1982, aparecem apenas referências isoladas sobre este assunto contudo ainda mais vagas. Como foi salientado ao longo do texto, existem muitos produtos isolados de esponjas com características peculiares, pelo que se torna importante tentar esclarecer as vias de formação dos metabolitos nestes animais que constituem um filo com características muito primitivas, inclusivamente do ponto de vista da evolução.

O aprofundamento destas questões permitirá também um melhor conhecimento da biologia das esponjas o que poderá ter implicações a nível da sistemática do filo. Por outro lado os metabolitos produzidos têm interesse tanto do ponto de vista de eventuais aplicações como de eventuais implicações no equilíbrio ambiental (caso dos compostos halogenados voláteis). Este será um trabalho para o futuro, com um carácter obrigatoriamente interdisciplinar, de biólogos, biofísicos, bioquímicos, químicos inorgânicos e analistas.

¹ Instituto Tecnológico e Nuclear - Departamento de Química

² Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

³ Centro de Química Estrutural - Instituto Superior Técnico

* Este trabalho corresponde a uma adaptação parcial dos Seminários I e II da licenciatura de Alexandra Cruz

Agradecimento

As investigações próprias referidas no presente artigo são suportadas pelo programa PRAXIS, contrato PRAXIS/2/2.1/QUI/14/94.

NOTAS

¹ Aberturas inalantes.

² Cavidades revestidas por células flageladas-coanócitos.

³ Camada uniestratificada de células delimitando a esponja do meio exterior.

⁴ Conjunto dos constituintes de uma esponja compreendidos entre a pinacoderme e a coanoderme.

⁵ Substância orgânica esquelética, constituída por colagénio.

⁶ Acrónimo inglês que significa cromatografia gasosa – espectrometria de massa.

BIBLIOGRAFIA

1. P. R. Bergquist, *Sponge Chemistry - A review in Biologie des spongiaires, Colloques Internationaux du CNRS, Paris, 1979.*
2. V. T. Bowen, D. Sutton, *J. Mar. Res.* **8** (1951) 153-167 e referências nele incluídas.
3. M. Garson, *Chemical Reviews* **93** (1993) 1699-1733.
4. J. Kobayashi, M. Ishibashi, *Chemical Reviews* **93** (1993) 1753-1769.
5. S. L. Neidleman, J. Geigert, *Biohalogenation: principles, basic roles and applications*, John Wiley & Sons, England, 1986.
6. D. J. Faulkner, *J. Nat. Prod.* **10** (1993) e suas publicações anteriores.
7. D.G. Baden, M.D. Corbett, *Comp. Biochem. Physiol. B* **64** (1979) 279-283.
8. K. D. Barrow, *Marine Natural products - Chemical and Biological Perspectives*, Academic Press, New York, 1983.
9. P. R. Bergquist, *Sponges*, Hutchinson, London, 1978.
10. A. Koukouras, E. Voultsiadou-Koukoura, H. Chintiroglou, C. Dounas, *Cahiers de Biologie Marine* **20**(3) (1985) 301-319.
11. C. R. Wilkinson, *Marine Biology* **49** (1978) 161-167.
12. T. L. Simpson, *The Cell Biology of Sponges*, Springer-Verlag, New York, 1984.
13. J. R. Pawlik, *Chemical Reviews* **93** (1993) 1911-1922.
14. B. W. Hoeksema, *Senckenbergiana Marit.* **15** (1983) 55-85.
15. W. Hatch, *Biol. Bull.* **159** (1980) 135-147.
16. J. Mann, *Secondary metabolism*, 2nd Ed., Oxford Science Publications, 1987.
17. W. Fenical, *Science* **215**(4535) (1982) 923-928.
18. R. J. P. Williams, J. J. R. Fraústo da Silva, *The Natural Selection of the Chemical Elements*, Oxford University Press, Oxford, 1995 (no prelo).
19. C. Litchfield, R. W. Morales, *Aspects of Sponge Biology*, (1976), 183-200.
20. J. L. Guiner, *Chemical Reviews* **93** (1993) 1735-1751.
21. M.H. Rabinowitz, C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.* **114** (1992) 304.
22. L.J. Goad, *Marine Natural Products*, (P.J. Scheuer Ed.), Academic Press, New York, 1978, vol.2, 76.
23. T. Itoh, D. Sica, C. Djerassi, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1983) 147.
24. M. J. Garson, *Nat. Prod. Report* **6**(2) (1989) 143-170.
25. K. L. Kirk, *Biochemistry of the Elemental Halogens and Inorganic Halides*, Plenum Press, New York, 1991.
26. Y. Murakami, Y. Oshima, T. Yasumoto, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **48** (1982) 69-72.
27. G.B. Elyakov, T. Kuznetsova, V.V. Mikhailov, I.I. Maltsev, V.G. Voinov, S.A. Fedoreyev, *Experientia* **47** (1991) 632-633.
28. G.W. Gribble, *J. Chem. Education* **71**(11) (1994) 907-911.
29. R. Wever, M. G. M. Tromp, J. W. P. M. van Schijndel, E. M. Vollenbroek, R. L. Olsen, E. Fogelqvist, *The biogeochemistry of global change: radiative trace gases* (Oremland Eds.), Chapman & Hall, Nova Iorque, s. d., 811-824.
30. J. J. R. Fraústo da Silva et al., em preparação.
31. N. Fusetani, S. Matsunaga, *Chemical Reviews* **93** (1993) 1793-1806.
32. R. J. Andersen, *Tetrahedron Letters* **29** (1978) 2541-2544.
33. R. J. Andersen, R.J. Stonard, *Can. J. Chem.* **57** (1979) 2325-2328.
34. R. J. Stonard, R. J. Andersen, *J. Org. Chem.* **45** (1980) 3687-3691.
35. R. J. Andersen, R.J. Stonard, *Can. J. Chem.* **58**(20) (1980) 2121-2126.
36. J.E. Thompson, R.P. Walker, D. Faulkner, *J. Mar. Biol.* **88** (1985) 11-21.
37. M. D'Ambrosio, C. Mealli, A. Guerriero, F. Pietra, *Helv. Chim. Acta.* **68** (1985) 1453-1460.
38. M. D. Unson, C. B. Rose, D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.* **58** (1993) 6336-6343.
39. J. J. R. Fraústo da Silva et al., em preparação.