

Biocromos (pigmentos) de invertebrados marinhos

I — Briozoarios

por

Gilberto G. Villela

(Com 6 figuras intercaladas no texto)

INTRODUÇÃO

Os invertebrados marinhos apresentam em geral colorações vivas que tem chamado a atenção de todos aqueles que se dedicam à biologia do mar. Entretanto, o aspecto bioquímico dos pigmentos desses animais ainda tem sido relativamente pouco estudado. Foram Kruckenbergl e também MacMunn e Moseley que no século passado procuraram descrever e identificar os diversos pigmentos encontrados na fauna marinha, mas nessa época a química desses grupos não estava ainda suficientemente desenvolvida para permitir uma análise mais profunda das substâncias isoladas. Com a introdução de técnicas modernas de análise e o conhecimento avançado da química dos carotenoides tem sido possível separar e ordenar os diversos tipos de pigmentos animais. Assim, já se vão tornando numerosos os trabalhos de especialistas que com técnicas apuradas vem abordando esse assunto (10), (3), (9), (8).

Os zoólogos, mais afeitos em geral ao estudo morfológico, descuidaram-se do aspecto biológico dos diversos grupos animais. Actualmente, entretanto, já os biólogos tem voltado a atenção para o lado bioquímico dos fenómenos observados e já se fala mesmo em bioquímica comparada como uma disciplina autónoma (1), (2).

Com o evoluir das técnicas, cada vez mais se procura relacionar a forma exterior com a composição química do meio e as suas profundas influências morfogenéticas. No que respeita os pigmentos, estes tem sido somente referidos pelos zoólogos quando a sua distribuição topográfica nos animais pode servir como carácter diferencial. As variações dentro da mesma espécie relacionadas com o género de alimentação, com as vias de excreção e com o metabolismo em geral, tem sido raramente estudadas. Sabemos hoje que os vários factores externos (alimentação, oxigenação) ou internos (hormónios),

tem decidida influencia sôbre a coloração dos animais. Infelizmente, a experimentação em invertebrados marinhos é ainda escassa, a determinação zoológica é muitas vezes imprecisa e a manutenção nos aquários difícil e trabalhosa. Para um estudo bioquímico completo torna-se necessário que a biologia do animal seja em parte conhecida, o que nem sempre é possível.

BIOCROMOS

A cor de um composto depende da absorção seletiva da luz de um comprimento de onda definido; a parte não absorvida sendo refletida ou transmitida ao nosso olho. Esta capacidade de absorver a luz visível depende de variados graus de insaturação das valências não satisfeitas localizadas nos denominados grupos cromóforos da molécula.

Os compostos químicos possuindo um grupo cromóforo e que existem espalhados nos tecidos animais receberam recentemente a denominação de biocromos (Fox) (4). *Os biocromos referem-se portanto a todos os pigmentos dos vegetaes e animais diferenciando-se dos corantes químicos formados por saes inorganicos e compostos organicos de síntese também muitas vezes denominados de pigmentos.*

As cores animais podem igualmente ser devidas à fenomenos de reflexão da luz sobre estruturas cutaneas especiais formadas por camadas lamelares muito delgadas. Nestes casos a parte do espectro de maior comprimento de onda (do amarelo ao violeta) é absorvida pela camada inferior que contem melanina.

A difração e a interferencia da luz, ocasionam vivas colorações azues e tonalidades variadas. Esses tipos de colorações não são devidos aos biocromos, mas às estruturas do tegumento e são chamadas de cores estruturais ou schemocromos. Os biocromos animais pertencem a diversos grupos químicos tais como :

- 1 — carotenoides
- 2 — derivados pirrolicos
- 3 — quinonas
- 4 — flavinas
- 5 — pterinas
- 6 — derivados indolicos — melaninas.
- 7 — biocromos não identificados.

Os carotenoides tem sido os mais estudados de todos os biocromos e talvez sejam os mais espalhados na fauna marinha. Encontram-se dissolvidos nos lipideos onde apresentam as cores amarela, alranjada e vermelha. Quando

conjugados com protídeos, as mais diversas tonalidades do azul, violeta, roseo, castanho, etc., podem ser observadas. Foram descritos numerosos carotenoides presente nos seguintes invertebrados: protozoários (euglena); espongiários (*Axinella*, *Suberitas*, *Ficulina*); celenterados (actínias, madreporas, etc.); Vermes, Equinodermes (asterídeos, enchinídeos, ofiurídeos, etc.); moluscos (cefalópodos, gasterópodos, etc.); artropodos (crustáceos, insetos, etc.) (10), (3), (11), (12).

As quinonas são representadas sobretudo pelo grupo das naftoquinonas (equinocromo, espinocromo dos equinodermes) e da antraquinona (ácido carminico e quermesico dos insetos).

No grupo dos pigmentos pirrólicos, figuram principalmente os derivados das porfirinas e dos pigmentos biliares. Neste grupo também são incluídos os produtos da degradação da clorofila.

As flavinas são também bastante difundidas, entre os invertebrados. Até agora tem sido mais estudada a riboflavina (vitamina B₂). Outros pigmentos com propriedade fluorescentes e cor amarela foram assinalados, mas pouco se sabe da composição química dos mesmos. As pterinas, também fluorescentes, foram referidas e estudadas detalhadamente nos insetos. Pouco se sabe da sua distribuição nos demais invertebrados.

As melaninas constituem um grupo muito difundido e fornecem derivados de cores diversas, mas cuja química é ainda pouco conhecida. A melanogênese foi explicada por Raper como um produto final da oxidação e ciclização da tirosina. Em geral as melaninas apresentam-se com várias tonalidades do preto ao castanho, sendo que os compostos intermediários são vermelhos ou amarelos. As uranidinas de cores vivas encontradas nas esponjas, medusas, holotúrias e anelídeos, parecem ser quimicamente relacionadas às melaninas (Fox & Summer). Numerosos outros biocromos aguardam ainda um estudo detalhado. Neles figuram pigmentos hidrossolúveis, verdes, azues, e vermelhos, sensíveis aos ácidos e às bases (indicadores de pH).

MÉTODOS DE ANÁLISE DOS BIOCROMOS

Os biocromos encontram-se nos invertebrados em estado livre ou formando complexos diversos. Os primeiros podem ser separados quer por simples extração aquosa (liocromos), quer por meio de solventes orgânicos (lipocromos). Os lipocromos acham-se frequentemente ligados a um suporte proteico necessitando portanto serem libertados pelo calor ou por outros pre-

cipitantes das proteínas. A acetona pura ou contendo etanol, constitue um dos melhores meios para a separação dos biocromos. Os liocromos podem ser extraídos pela água ou pela mistura hidro-alcoolica a 50 °|°. Em certos casos os liocromos também se encontram ligados às proteínas (flavinas), sendo então a precipitação das proteínas indispensavel para a retirada de todo o pigmento. Certos liocromos livres são extraídos quantitativamente por um solvente polar, a quente, e em pH determinado. No caso dos lipocromos, o esquema seguido, baseia-se nas propriedades de solubilidade e de adsorção e no espectro de absorção.

1 — Separação por meio solventes. O extrato é adicionado de líquidos não misciveis, como o eter de petroleo e o metanol. A mistura é agitada e a repartição do pigmento nas duas fases liquidas permite uma primeira identificação. Os carotenoides (caroteno, esterés de xantofila e algumas mono hidroxantofilas), passam para a fase superior (*epifase*), e as xantofilas para a fase inferior (*hipofase*).

2 — O tratamento das duas fases liquidas pela potassa alcoolica (saponificação) e posterior extração com o metanol, não altera os carotenos que se mantem na epifase. Depois da hidrolise, os esterés de xantofila de epifasicos passam para hipofasicos.

3 — A passagem dos pigmentos dissolvidos em cada uma das fases na coluna de adsorventes, determina a separação do caroteno e das xantofilas. Quando em solução no benzeno a percolação através uma coluna de carbonato de calcio deixa passar o caroteno e retém a xantofila e seus esterés. Os carotenos por sua vez são adsorvidos em coluna de hidroxido de calcio ou de aluminio. O aspecto das zonas coradas na coluna (cromatograma) favorece a identificação e purificação dos biocromos.

4 — Os pigmentos depois de purificados pela técnica dos líquidos não misciveis e da cromatografia, mostram espectros de absorção característicos que permitem a sua identificação.

5 — A purificação em muitos casos pode ser ultimada pela obtenção do pigmento em estado cristalino, sendo então determinado o seu ponto de fusão.

MATERIAL DE ESTUDO

O material que nos serviu para o estudo dos biocromos animais, é proveniente da Baía de Guanabara e das regiões da costa atlantica do Rio de Janeiro até Vitória, Espirito Santo. As especies da baía nos foram fornecidas

pelo Dr. Lejeune de Oliveira, (da Estação Hidrobiologica do Instituto Oswaldo Cruz, na ilha dos Pinheiros), a quem deixamos consignados os nossos agradecimentos. Outra parte do material foi obtido em dragagens e colheitas nas zonas beira-mar, principalmente durante uma excursão realizada no navio da marinha de guerra "Rio Branco" em Abril de 1948.

Foram estudados exemplares dos seguintes "phyla": Porifera (esponjas), Coelenterata (Actinias), Echinodermata (ouriços, estrelas, crinoides e holoturias) e Briozoarias.

Os pigmentos dos Briozoarios não foram até agora objeto de estudo bioquímico, fato porque achamos de maior interesse referir as verificações que fizemos nas especies obtidas. No presente trabalho só serão portanto tratados os biocromos dos briozoarios, seguindo-se em posteriores publicações o estudo dos pigmentos de outros grupos zoologicos.

As espécies que tivemos o ensejo de examinar foram as seguintes: "Bugula neritina", "Schizoporella unicornis", "Steganoporella magnilabris", "Bugula flabellata" e "Trigonospora sp".

A "Bugula neritina" L. pertence à ordem dos Cheilostomata e organiza-se em colonias, vivendo em geral em aguas pouco profundas (Fig. 1). A coloração das colonias varia do castanho ao roxo escuro. Morfologicamente o pigmento acha-se confinado às granulações existentes nos "zooecios", em volta do chamado "corpo castanho". Pela extração com agua distilada, obtém-se um líquido de cor vinhosa apresentando o efeito de Tyndall. Verificamos que a cor varia com o pH da solução, na sequencia abaixo indicada:

pH	coloração
2.4	azul-purpura
3.0	purpura
5.0	vermelho-vinho
6.8	vermelho-vinho
8.0	vermelho
9.5	purpura
11.0	azul-purpura

A estabilidade do pigmento depende também do pH. No pH. 11.1, todo o pigmento precipita o que permite isola-lo e purifica-lo, no pH de 9.2 o precipitado se redissolve voltando a precipitar em meio acido (pH 2.0).

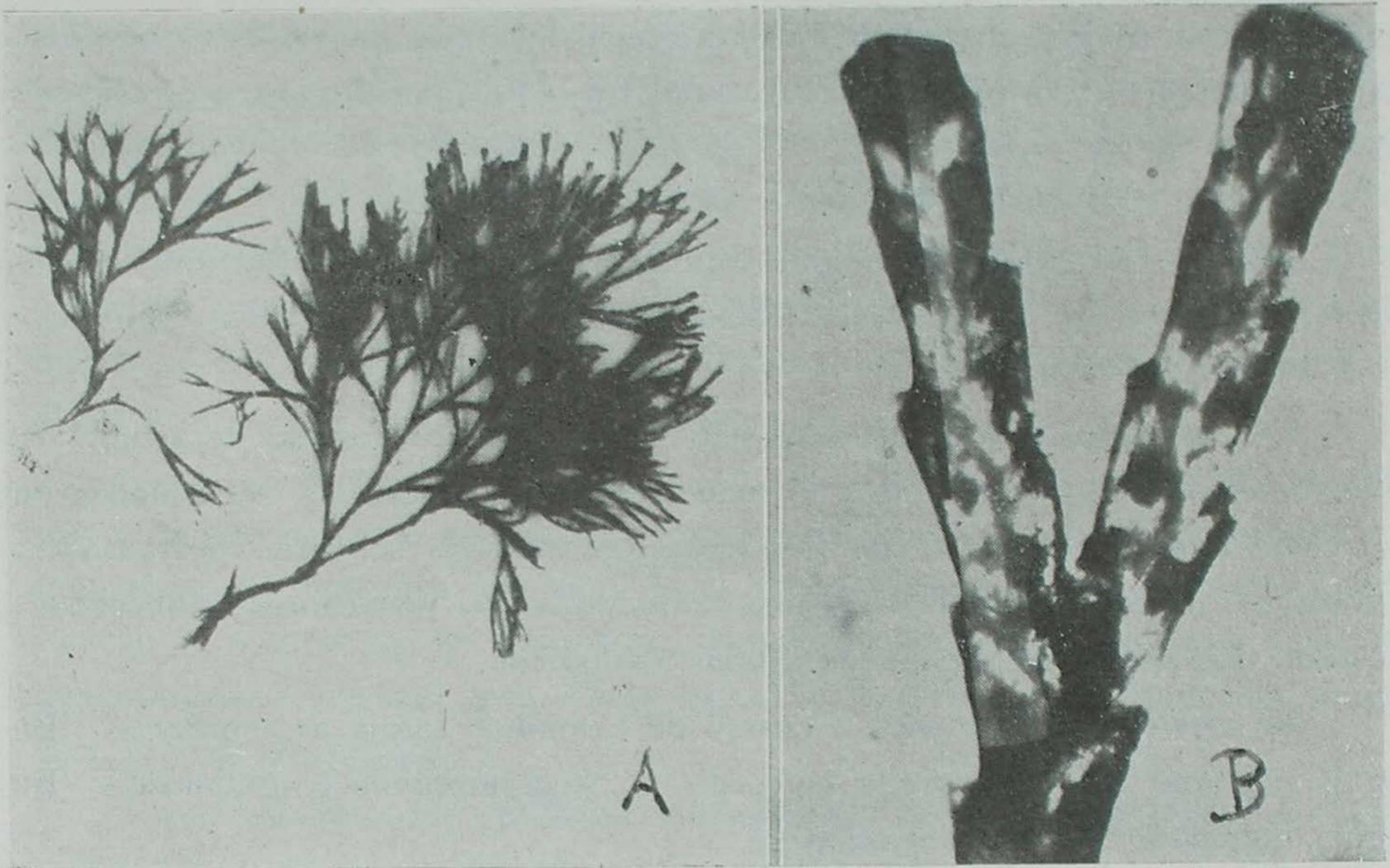


Fig. 1

A extração do pigmento foi feita pela técnica seguinte:

Os animais de uma ou mais colônias, depois de lavados em água do mar para a retirada dos organismos a eles frequentemente associados, foram pesados e extraídos com água destilada fervendo, durante 15 minutos. Procedeu-se à nova extração até que o líquido não continha mais o pigmento vermelho-arroxeadado. O extrato foi agitado com éter de petróleo que praticamente não retirou nenhum pigmento (ausência de caroteno). O líquido aquoso foi tornado alcalino (pH 11.0) pela adição de soda ou potassa, que precipitou o pigmento sob a forma de flocos de cor vermelho-arroxeadado. O precipitado foi separado por centrifugação, dissolvido pela adição de ácido acético a 10% e novamente precipitado pela soda 4N. O precipitado foi então lavado sucessivamente com álcool 80%, absoluto e éter e seco a 37°C. O pó finalmente obtido é azul escuro e facilmente solúvel em alcali ou ácido. A quantidade de biocromo varia de colônia para colônia. As colônias escuras foram as que deram maior quantidade de pigmento. O estudo do espectro de absorção foi feito primeiro com o fotômetro de Pulfrich e por fim com o espectrofotômetro de Beckman. O máximo encontrado é muito nitido e está si-

tuado em 545 $m\mu$, com a solução contendo 0,6g em 100ml e no pH 6,8. A fig. 2 mostra uma curva típica obtida no Beckman.

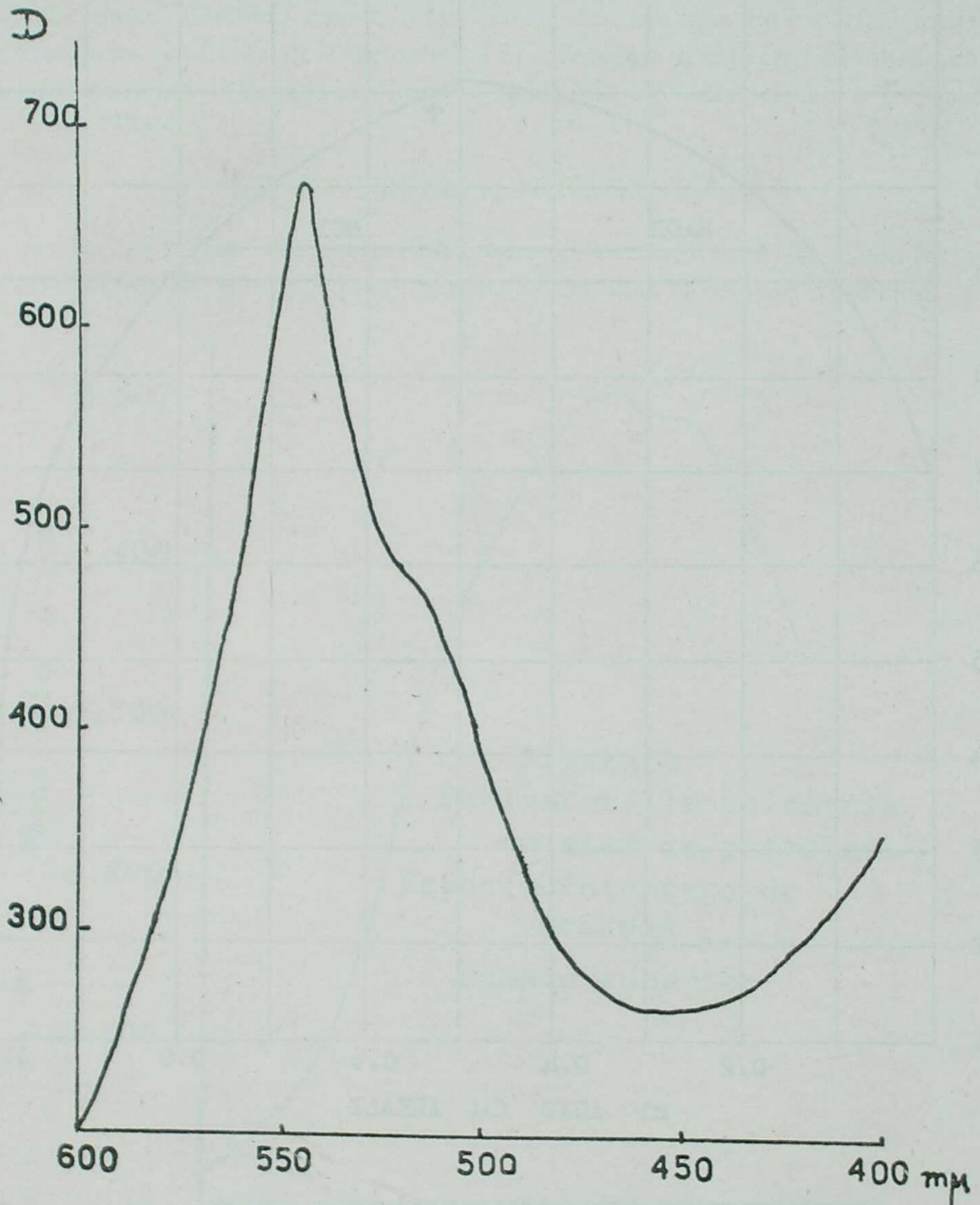
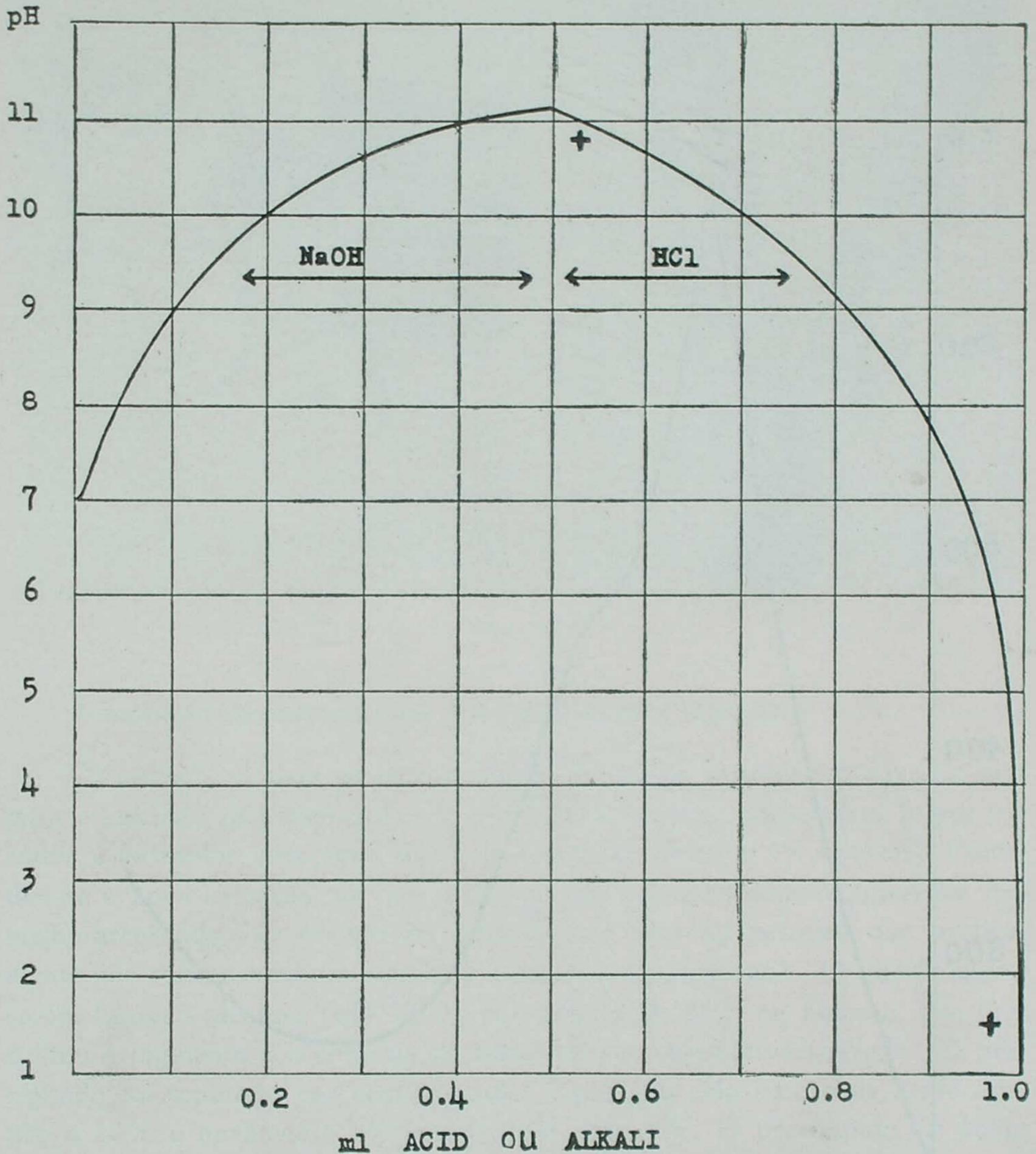


Fig. 2

A dupla titulação com soda e ácido clorídrico permitiu estudar o comportamento do pigmento em pH diferentes medidos electrometricamente com

o aparelho de Macbeth. Na Fig. 3, vê-se uma curva onde se acham indicados os pontos de precipitação.



O biocromo da «Bugula» é adsorvido pelo $\text{Ca}(\text{OH})_2$, MgO e Al_2O_3 . É insolúvel nos solventes orgânicos, descolorado pelo zinco em presença de KOH e pelo hidrosulfito de sódio. As reações do biureto e xantoproteica foram negativas. A água a 100°C não precipita o pigmento, mesmo depois de

acidificado. Ausencia de enxofre reduzido, e reação de Liebermann para o fenol também negativa. Para maiores detalhes veja-se o nosso trabalho (13).

As propriedades físico químicas acima mencionadas sugeriram-nos a semelhança deste biocromo com o adenocromo descrito por Fox e Updegraff nas branquias cardíacas do "Octopus" (7). Sómente o espectro de absorção deu uma pequena diferença no máximo (505 para o adenocromo e 545 m μ para o da "Bugula").

SCHIZOPORELLA UNICORNIS

As espécies deste briozoário foram provenientes da baía da Guanabara nas imediações da ilha d'Água. Apresentavam uma coloração vermelha de

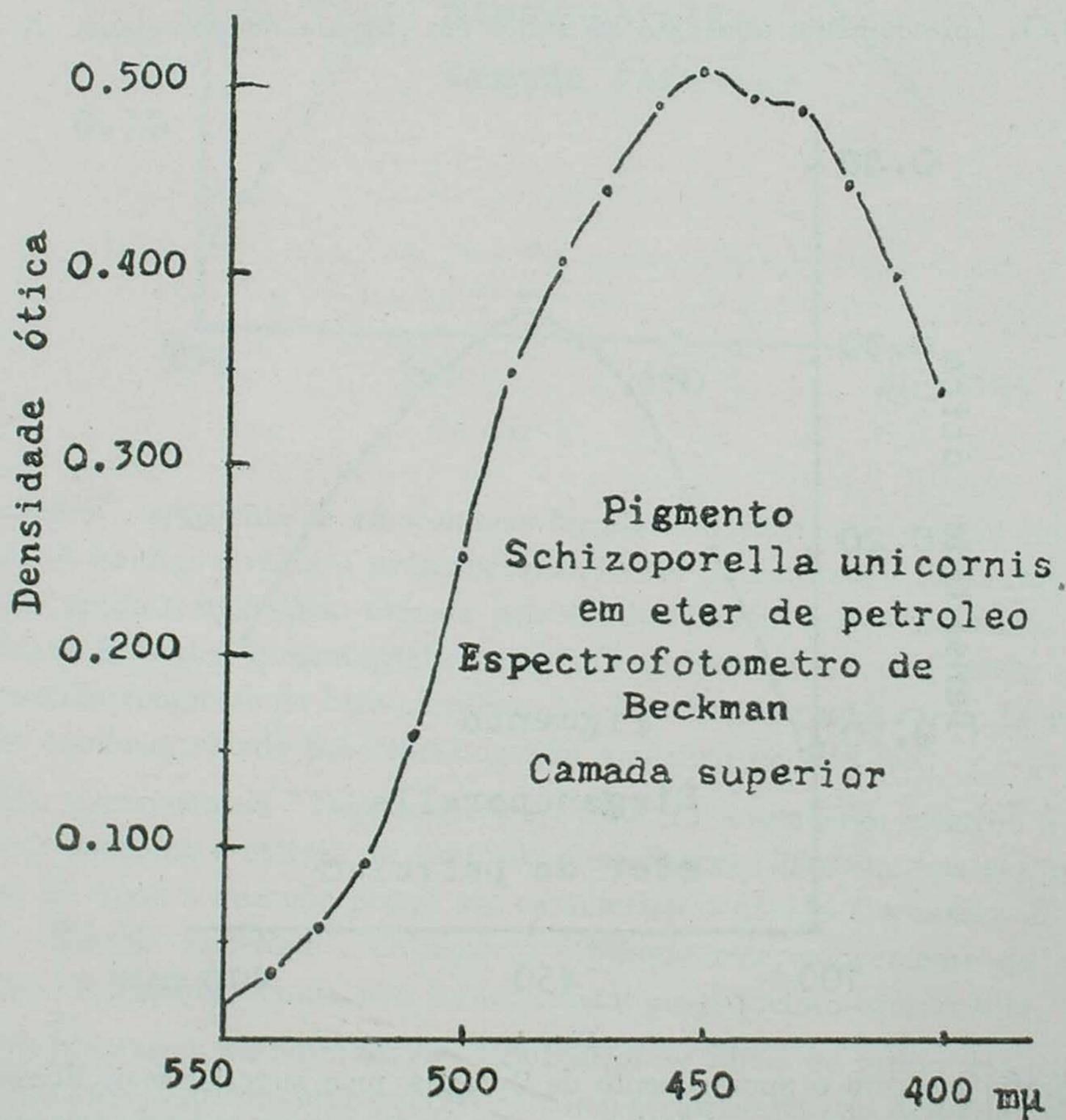


Fig. 3

várias tonalidades. Depois de lavados na água do mar filtrada, foram triturados em gral com uma solução de álcool-éter 3:1. Os líquidos de extração apresentaram-se fortemente corados. Ao extrato assim obtido foi adicionado de volume igual de éter de petróleo (p.e = 40-50°) e agitado fortemente durante 5 minutos. A epifase retirou grande parte do pigmento. A hipofase alcoólica foi separada e saponificada com 2 ml de potassa alcoólica a 40% a frio durante 1 hora. O líquido foi então extraído com éter de petróleo que retirou a quase totalidade dos pigmentos. A epifase depois de saponificada não libertou nenhum pigmento para a fase alcoólica, denotando ausência de ésteres de xantofila. O espectro de absorção da hipofase depois de saponificação (xantofilas) indicou um máximo de 420 m μ . no álcool. (Fig. 3).

Os extratos epifásicos depois da saponificação foram passados em coluna de Al₂O₃ (previamente aquecido ao rubro em capsula de porcelana. A cro-

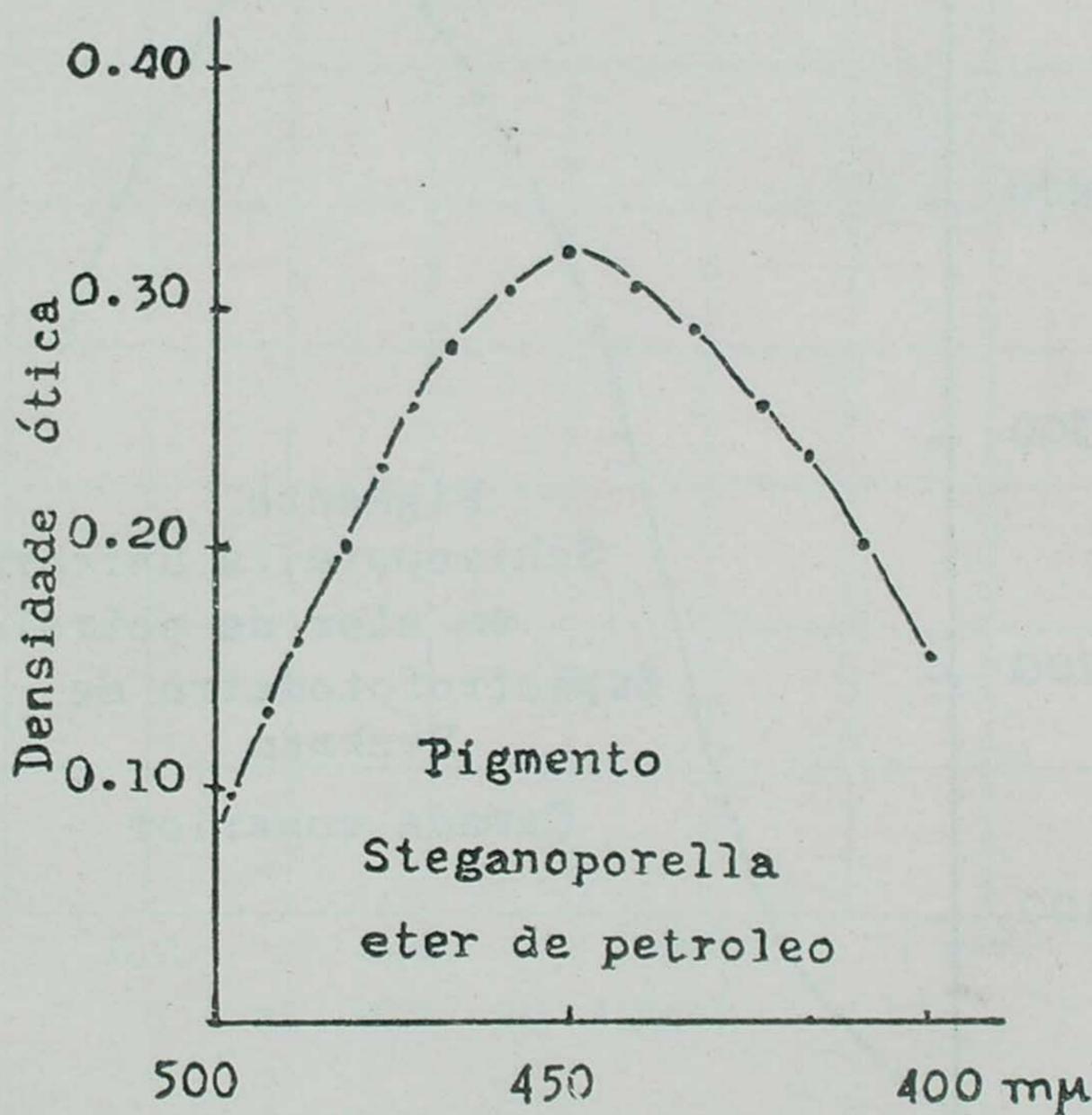


Fig. 4

matografia mostrou o aparecimento de 2 zonas, uma superior mais densa, de cor amarela escura e outra inferior amarelo clara, correspondendo respectivamente ao alfa e beta carotenos. Foi feito o espectro de absorção do eluato de ambas as zonas tendo-se obtido os máximos em 450 m μ para a zona su-

perior e 475 m μ para a inferior (Fig. 4). A "*Schizoporella unicornis*" não contém pigmentos hidrosolúveis como a "*Bugula*" "*neritina*" e a análise revelou que os únicos biocromos pertencem aos "carotenoides". A "*Stegnoporella*

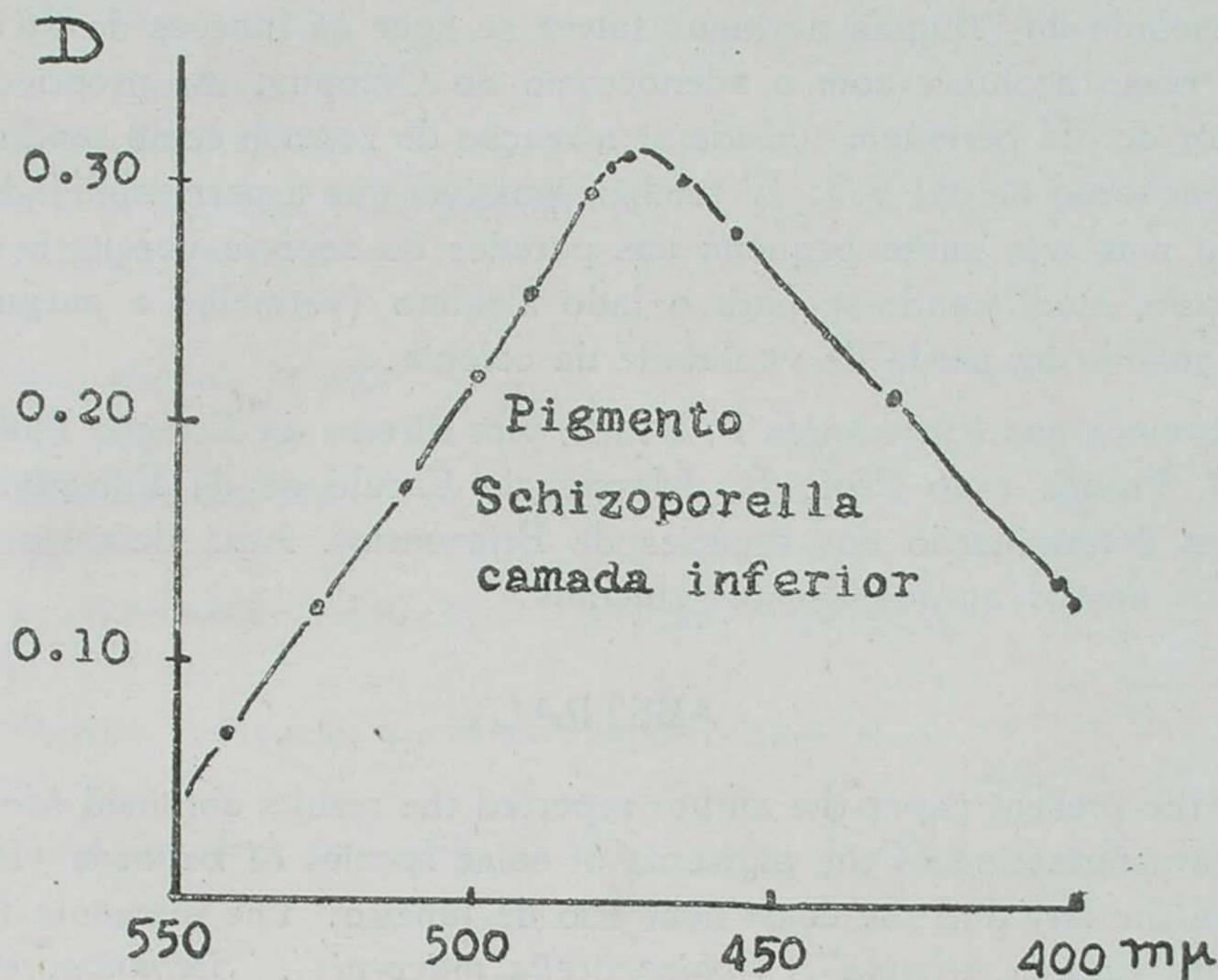


Fig. 5

magnilabris", apresenta-se em colônias lamelares fortemente coradas em vermelho. A análise revelou a presença unicamente de caroteno. O extrato metanólico sendo tratado pelo éter de petróleo fez passar todo o pigmento para a epifase. A análise cromatográfica em CaO apresentou 2 zonas, sendo que a mais corada compõe-se de beta-caroteno. Na Fig. 5, vê-se uma curva de absorção do caroteno isolado por cromatografia (máximo em 450 m μ).

Um espécimen de "*Trigonospora sp.*", que foi examinado mostrou a presença de caroteno e ésteres de xantofila além de um pigmento amarelo, que é solúvel na água e que não pode ser caracterizado devido à escassez do material. "*Bugula flabellata*", de aspecto esbranquiçado, proveniente da costa atlântica do Espírito Santo, não forneceu nenhum pigmento carotenóide.

Os biocromos encontrados nos briozoários se filiam ao grupo dos carotenoides e a um pigmento hidrosolúvel de composição ainda não definida. Esses biocromos devem ser provenientes da alimentação vegetal (algas) ou animal (crustáceos). Sabe-se que os animais predadores contém em geral mais caro-

teno que xantofila em seus tecidos, donde se supõe que "*Schizoporella*" e "*Steganoporella*" devem ter uma alimentação predominantemente animal, em virtude da maior proporção de caroteno encontrada em seus tecidos. O pigmento isolado da "*Bugula neritina*" talvez se ligue às funções de excreção da colonia como acontece com o adenocromo do Octopus. As propriedades de indicador de pH permitem considerar a reação do zooecio como sendo do lado acido, em torno de pH 5.5. E' também possível que a permeabilidade para a agua do mar seja muito pequena nas paredes do zooecio porque a côr é do lado acido, modificando-se para o lado alcalino (vermelho e purpura), sómente quando ha perda de vitalidade da colonia.

Devemos aos Professores P. Drach, vice-diretor da Estação Biologica de Roscoff, França e ao Prof. E. Marcus da Faculdade de Filosofia de São Paulo, a determinação das espécies de Briozoarios. Aqui deixamos consignados os nossos agradecimentos sinceros.

ABSTRACT

In the present paper the author reported the results obtained for the chemical characterization of the pigments of some species of Bryozoa (Polyzoa), living in the bay and the coast near Rio de Janeiro. The pigments (biochromes) of "*Bugula neritina*", "*Schizoporella unicornis*", "*Steganoporella magnilabris*", "*Bugula flabellata*" and "*Trigonospora sp*", were extracted and the results showed that carotene was found in all the species, except, "*Bugula neritina*" and "*Bugula flabellata*". A new water-soluble pigment was described for "*Bugula neritina*". Spectrophotometric curves obtained with the Beckman spectrophotometer are reported for the "*Bugula*" pigment and for the carotenoids. Chromatographic analysis and the treatment with immiscible solvents were performed for all the extracts of the animals considered. A study of the biochromes of other "*phyla*" will be published in a near future.

BIBLIOGRAFIA

1. BALDWIN, E.
1937. An Introduction to Comparative Biochemistry The Macmillan C^o., New York.
2. FLORKIN, M.
1944. L'Évolution Biochimique — Masson & Cie.
3. FOX, D. L.
1947. Ann. Rev. Bioch, 15, 443.
4. FOX, D. L.
1944. Science, 100, 470.

5. FOX, D. L. & SCHEER, B. T.
1941. *Biol. Bull.* 80, 441.
6. FOX, D. L. & PANTIN, C.F.A.
1944. *Biol. Rev.* 19, 121.
7. FOX, D. L. & UPDEGRAFF, D. M.
1943. *Arch. Bioch.* 1, 339.
8. HEILBRON, I. M., JACKSON, H. & JONES, R. N.
1935. *Bioch. J.* 29, 1384.
9. KARRER, P.
1932. *Erg. Physiol.* 34, 812.
10. LEDERER, E.
1940. *Biol. Rev.* 15, 273.
11. LEDERER, E.
1935. *Les Caroténoides des Animaux* — Hermann & Cie, Paris.
12. VERNE, J.
1930. *Couleurs et Pigments des Etres Vivants* — Doin, Paris.
13. VILLELA, G. G.
1948. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 68, 531.