



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Faculdade de Oceanografia

Humberto Freitas de Medeiros Fortunato

**A diversidade da Ordem Suberitida (Filo Porifera) sob a luz dos caracteres
morfológicos, assinaturas metabólicas e sistemática molecular**

Rio de Janeiro

2019

Humberto Freitas de Medeiros Fortunato

A diversidade da Ordem Suberitida (Filo Porifera) sob a luz dos caracteres morfológicos, assinaturas metabólicas e sistemática molecular

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Caracterização, Diagnóstico e Evolução de Ambientes Marinhos

Orientadora: Prof.^a Dra. Gisele Lôbo Hajdu

Coorientador: Prof. Dr. Thierry Pérez

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/C

F745d Fortunato, Humberto Freitas de Medeiros.

A diversidade da Ordem Suberitida (Filo Porifera) sob a luz dos caracteres morfológicos, assinaturas metabólicas e sistemática molecular / Humberto Freitas de Medeiros Fortunato. – 2019.

266 f. : il.

Orientador: Gisele Lôbo Hajdu.

Coorientador: Thierry Pérez.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Oceanografia.

1. Esponjas – Filogenia – Teses. 2. Biologia marinha – Teses. 3. Metabolômica – Teses. 4. Oceanografia – Taxonomia integrativa – Teses. 5. Atlântico, Oceano – Descoberta e explorações – Teses. I. Hajdu, Gisele Lôbo. II. Pérez, Thierry III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Oceanografia. IV. Título.

CDU 593.4

Bibliotecária responsável: Fernanda Lobo / CRB-7: 5265

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Humberto Freitas de Medeiros Fortunato

**A diversidade da Ordem Suberitida (Filo Porifera) sob a luz dos caracteres
morfológicos, assinaturas metabólicas e sistemática molecular**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-
Graduação em Oceanografia, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração:
Caracterização, Diagnóstico e Evolução de
Ambientes Marinhos

Aprovada em 8 de Agosto de 2019.

Orientadora: Prof.^a Dra. Gisele Lôbo Hajdu

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Thierry Pérez

Station Marine d'Endoume, Aix-Marseille Université - AMU

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Helena Passeri Lavrado
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Nicole Boury-Esnault
Aix-Marseille Université

Prof.^a Dra. Valéria Laneuville Teixeira
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Cristiano Valentim da Silva Lazoski
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Luís Felipe Skinner
Faculdade de Formação de Professores – UERJ

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às mulheres da minha família. Onde quer que estejam, olhem por mim. Vocês são exemplo de amor e dignidade: Vó Aglayr, mãe Maritza, irmãs Kharine, Vitória e Tamyris (*in memorian*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores Gisele e Thierry por terem se disponibilizado a embarcar nessa aventura ao meu lado. Gi, obrigado pela confiança, suporte intelectual, financeiro e amizade extrema. Thierry, merci d'avoir essayé de faire de Marseille ma maison. Merci pour les enseignements scientifiques, les menus varies et délicieux, le football et l'amitié.

Ao Thiago, um verdadeiro companheiro de trabalho, um gênio escondido sob sua timidez, um orientador sem igual! Sem você esse trabalho não teria sido possível. Obrigado pelas dicas, pelos puxões de orelha, pelos cafés e almoços. Obrigado por acreditar em mim e nesse projeto.

Au Stéphane, pour votre soutien dans Le développement de tous les travaux de métabolomique. Merci pour votre patience, pour Le temps investi en moi et pour être un compagnon quotidien dans un pays lointain.

À CAPES por ter concedido a minha bolsa de doutorado, a bolsa PDSE para a realização do doutorado sanduíche e por investir na ciência do país.

Ao professor Dr. Eduardo Hajdu por ter me incluído em diversas expedições no litoral nordestino, permitindo assim abranger e aumentar o número de espécimes coletados. Sem contar a oportunidade de admirar lugares paradisíacos tupiniquins.

Au professeur Jean Vacelet, Pope Sponge. Merci de m'avoir accueilli à Marseille, de votre attention lorsque vous m'avez appris à préparer des échantillons pour le microscope électronique, des explications sur la biologie des éponges, des histoires merveilleuses et pour votre grand copain du football.

A professora Nicole Boury-Esnault pelo carinho, ensinamentos e disponibilidade em atravessar o oceano para participar da minha banca de tese, atendendo ao meu pedido.

Au professeur Alexander Ereskovski pour m'aider à visualiser les larves et les embryons présents dans certains échantillons et de m'avoir brièvement parlé de La reproduction des éponges.

Às(aos) professora(e)s Helena Lavrado, Suzi Ribeiro, Valéria Laneuville Teixeira, Anderson Villas-Bôas e Luís Felipe Skinner pelas correções, direcionamento e incentivo no trabalho, durante os seminários internos.

Ao secretário do PPG-Ocn, André Felipe por toda presteza e camaradagem durante esses quatro anos de labuta. Obrigado por esclarecer todas as dúvidas e lembrar a todos os discentes dos nossos deveres nessa caminhada. Você é 10!

Aos doutores Eduardo Hajdu, Eduardo Esteves, Ulisses Pinheiro, Thierry Pérez, Joana Sandes e a mestre Diana Ugalde por terem concedido diversos espécimes comparativos, tanto das Américas quanto da França.

Ao Laboratório Central (LC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pela prestação de serviço de caráter multiusuário e interdisciplinar, no âmbito da Plataforma Tecnológica de Genômica e Expressão Gênica, o qual permitiu o sequenciamento das amostras de DNA.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Instituto de Química da UERJ pela disponibilidade nos serviços de microscopia de varredura eletrônica.

Ao Laboratório de Contracorrente do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais da UFRJ por disponibilizar o liofilizador para secar as amostras para a realização dos estudos de metabolômica. Levy, obrigado por fazer o meio de campo e pela camaradagem.

Ao técnico Eduardo do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ por ajudar na liofilização das amostras e pelos ensinamentos sobre as metodologias de preservação de amostras para trabalho de metabolômica.

Aos membros do Projeto Graef, Thiago Marques e Milton Araújo, que receberam a proposta de desenvolver uma atividade extensionista com tanto carinho. Yoyo, obrigado por dividir comigo essa ideia!

Aos amigos cientistas que ajudaram nos campos e no laboratório. Obrigado por fazer destes quatro anos de ralação, um tempo de divertimento, reflexão e muito aprendizado sobre esponjas e sobre amizade. Obrigado, Anaíra Lage, Ester Gomes, Marcinha Motta, Camille Leal, Luiz Duarte, Cristiana Castello-Branco, Joana Sandes, Dora Leite, Sula Salani, André Bispo, Júlio Fernandez, Merry Grenier, César Ruiz, Renan Frutuoso, Felipe Sciamarella, Val Aguiar, Maurício Fernandes, Levy Domingos.

Aos amigos da vida (de dentro e de fora da Universidade) que me mantêm firme e forte. Aqueles que fazem minha vida ganhar sentido, em tempos nefastos de sucateamento da educação brasileira. Por mais distante que estivéssemos meu coração e pensamento estão sempre com vocês. Sou grato pela amizade e cumplicidade de todos. Juliana Magalhães, Amanda Guilherme, Larissa Pires, Yollanda Vançato, Fernanda França. Aos amigos da minha vida toda Pablo, Sina, Fê, Muralha, Gustavo, Júnior, obrigado pelos finais de semana

descompromissados e leves. Nat, Liv e Rafa, o que a universidade nos deu, nada pode tirar. Amo todos vocês incondicionalmente!

A galera do Tigres FC por me acolher e proporcionar momentos únicos de alegria e solidariedade, sobretudo nos finais de semana.

À minha família, que sempre acreditou, torceu e apoiou minhas vontades. À minha mãe pela força, independente do momento, à minha vó pelo espírito de liberdade e conhecimento, à minha irmã pelo carinho. Amo vocês eternamente.

À Breylla, minha parceira de todo dia. Quem tem me aturado nos momentos mais tensos e proveitosos da vida, durante esses quatro anos. A pessoa que sempre me salva nas questões referentes à diagramação, formatação e produção de ilustrações, principalmente mapas. Obrigado por me escolher e me querer todo dia. Te amo!

O sonho da criação e a criação do sonho: a arte da ciência no tempo do impossível.

Jurandir, Wanderlei, Sereno e Enilson

G.R.E.S. Unidos da Tijuca, 2004 (Samba Enredo)

Beaucoup de gens attaquent la mer, je lui fais l'amour.

Jacques-Yves Cousteau

While I pass with my spongiological work the columns of Hercules, I am facing a task which, to its full extent, can only be performed with the strength of a hero.

O. E. Schmidt

RESUMO

FORTUNATO, Humberto Freitas de Medeiros. *A diversidade da Ordem Suberitida (Filo Porifera) sob a luz dos caracteres morfológicos, assinaturas metabólicas e sistemática molecular*. 2019. 266 f. Tese (Doutorado em Oceanografia) – Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

As esponjas representam o grupo mais basal do reino animal contendo morfologia simples e altamente plástica, dificultando a sua identificação. A estrutura esquelética e o conjunto espicular dos representantes da ordem Suberitida são variáveis desde o nível de ordem até o específico e grande parte da sua classificação se baseia na ausência de caracteres diagnósticos. O objetivo deste estudo foi identificar os representantes do grupo por meio de dados morfológicos, químicos e genéticos. Para isso, forma de crescimento, cor, habitat, tipo e tamanho de espículas e arquitetura esquelética foram analisados. Adicionalmente, a assinatura metabólica e o potencial citotóxico das espécies foram avaliados. Os dados morfológicos e químicos foram comparados às reconstruções filogenéticas obtidas por meio de quatro marcadores moleculares, dois nucleares (28S e ITS2) e dois mitocondriais (COX1 e 16S), em prol de um melhor entendimento sobre a sistemática do grupo. A estrutura secundária do gene ITS2 foi testada como um novo caráter fenotípico e obteve sucesso. Todas essas técnicas foram empregadas em espécimes coletados durante quatro anos de pesquisa no litoral do Brasil, Mar do Caribe, Golfo do México e Mônaco, além de diversos exemplares comparativos de Suberitida previamente depositados em coleções de Porifera. Um total de 174 indivíduos foram apresentados morfológicamente, 52 quimicamente e 459 comparados nas filogenias. Em Suberitida, 32 UTOs foram identificados em 11 gêneros. Três novos gêneros foram propostos (*Ditylos*, *Solistyla* e *Tenebria*) e um (*Rhaphidostyla*) foi ressuscitado, além de cinco espécies terem sido identificadas como novas: *Halichondria* sp. nov., *Hymeniacidon* sp. nov., *Rhaphidostyla* sp. nov., *Suberites* sp. nov. e *Topsentia* sp. nov. Características como a forma de crescimento, o tipo de superfície e a estrutura do esqueleto ectossomal e subectossomal foram diagnósticos para representantes de diversos gêneros. Assim, a ordem Suberitida não precisa mais ser classificada pela ausência de caracteres. As assinaturas metabólicas evidenciaram diferenças desde o nível de ordem até o nível específico, indicando alta utilidade para o suporte taxonômico, com ênfase nas fosfocolinas, glicolipídeos e esteróis aminosulfatados, e detectaram poluentes plásticos. As reconstruções filogenéticas com os quatro marcadores moleculares resgataram histórias semelhantes, com algumas especificidades referentes ao tipo de marcador e amostra inserida. Em todas as reconstruções filogenéticas, a espécie tipo do gênero *Terpios* agrupou na família Halichondriidae. Em geral, seis clados foram observados com alto suporte estatístico, sendo a família Halichondriidae aquela que ainda necessita de maior atenção. Alguns representantes dos gêneros *Axynissa* e *Topsentia* agruparam fora e pouco relacionados à ordem Suberitida, indicando a possível existência de uma ordem, aqui denominada “Topsentiida”. As características morfológicas e metabólicas se sobrepuseram e estiveram de acordo com as relações filogenéticas provando a eficiência das técnicas em prol da taxonomia integrativa. Diante dos resultados expostos, as três famílias da ordem Suberitida possuem 29 gêneros e 451 espécies, das quais apenas 52 (11,5%) estão distribuídas no Oceano Atlântico Tropical Ocidental.

Palavras-chave: Esponjas marinhas. Filogenia. Metabolômica. Novas espécies. Taxonomia integrativa.

ABSTRACT

FORTUNATO, Humberto Freitas de Medeiros. *Diversity of the Order Suberitida (Phylum Porifera) enlightened by morphological traits, metabolomic fingerprint and molecular systematics*. 2019. 266 f. Tese (Doutorado em Oceanografia) – Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Sponges represent the most basal group of the animal kingdom containing simple and high plastic morphology, turning their identification difficult. Skeletal structure and spicule set of representatives of the order Suberitida vary from order to species level, and much of their classification is based on the absence of diagnostic characters. The objective of this study was to identify group representatives through morphological, chemical and genetic data. For this, growth shape, color, habitat, type and size of spicules and skeletal architecture were analyzed. Additionally, the metabolic signature and cytotoxic potential of the species were evaluated. Morphological and chemical data were compared to phylogenetic reconstructions obtained by four molecular markers, two nuclear markers (28S and ITS2) and two mitochondrial markers (COX1 and 16S), in order to better understand the group systematics. The secondary structure of the ITS2 gene was tested with success as a new phenotypic character. All of these techniques were employed in specimens collected over four years of research in the Brazilian coast, the Caribbean Sea, the Gulf of Mexico, and Monaco, as well as several comparative Suberitida specimens previously deposited in Porifera collections. A total of 174 individuals were morphologically presented, 52 chemically and 459 compared in phylogenies. In Suberitida, 32 UTOs were identified in 11 genres. Three new genera were proposed (*Ditylos*, *Solistyla* and *Tenebria*) and one (*Rhaphidostyla*) was resurrected, and five species were identified as new: *Halichondria* sp. nov., *Hymeniacidon* sp. nov., *Rhaphidostyla* sp. nov., *Suberites* sp. nov. e *Topsentia* sp. nov. Characteristics such as growth shape, surface type and structure of the ectosomal and subectosomal skeleton were diagnostic for representatives of various genres. Thus, the Suberitida order no longer needs to be sorted by the absence of characters. The metabolic signatures showed differences from order to species level, indicating high utility for taxonomic support, with emphasis on phosphocholins, glycolipids and aminosulfated sterols, and detection of plastic pollutants. The phylogenetic reconstructions with the four molecular markers rescued similar histories, with some specificity regarding the marker type and inserted sample. In all phylogenetic reconstructions, the type species of the genus *Terpios* grouped in the family Halichondriidae. In general, six clades were observed with high statistical support, with the Halichondriidae family still needing the most attention. Some representatives of the genera *Axynissa* and *Topsentia* have grouped out and unrelated to the Suberitida order, indicating the possible existence of another order, here named “Topsentiida”. The morphological and metabolic characteristics overlapped and were in agreement with the phylogenetic relationships proving the efficiency of the techniques in favor of the integrative taxonomy. Given the results, the three families of the order Suberitida have 29 genera and 451 species, of which only 52 (11.5%) are distributed in the Western Tropical Atlantic Ocean.

Keywords: Marine sponges. Phylogeny. Metabolomics. New species. Integrative taxonomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	A representação da porção interna das esponjas com algumas de suas estruturas.....	24
Figura 2 –	Pequena representação da diversidade de espécies de esponjas marinhas do Oceano Atlântico Ocidental e Mar do Caribe.....	26
Figura 3 –	Esquema com algumas das áreas utilizadas nos estudos de taxonomia integrativa em esponjas marinhas.....	29
Figura 4 –	Alguns exemplos de substâncias químicas das classes dos esteróis e alcalóides já descritos em espécies da ordem Suberitida	30
Figura 5 –	Representação da área de estudo com os pontos de coleta em destaque.	33
Figura 6 –	Glossário dos tipos espiculares e principais arquiteturas esqueléticas observadas na Ordem Suberitida.....	40
Figura 7 –	Fotografias após a coleta de espécimes de <i>Aaptos</i> spp. na zona econômica exclusiva do Brasil.....	49
Figura 8 –	Retratação fotográfica dos conjuntos espiculares de <i>Aaptos</i> spp.....	50
Figura 9 –	Retratação fotográfica da arquitetura esquelética de <i>Aaptos</i> spp.....	52
Figura 10 –	Relação entre as médias do comprimento (μm) e da largura (μm) das estrongilóxeas observadas no gênero <i>Aaptos</i>	55
Figura 11 –	Anatomia externa de <i>Suberites</i> spp. registradas em poças de maré no Maranhão.....	56
Figura 12 –	Tilóstilos de <i>Suberites</i> spp. registradas em poças de maré no Maranhão. As imagens ilustram as variações nos tilos e tilóstilos para cada morfotipo.....	58
Figura 13 –	Relação entre as médias do comprimento (μm) e da largura (μm) dos tilóstilos observadas no gênero <i>Suberites</i>	60
Figura 14 –	Anatomia interna de <i>Suberites</i> spp. encontradas em poças de maré no Maranhão.....	62
Figura 15 –	Representação dos (sub)tilóstilos de <i>Suberites</i> sp. 2 e <i>Suberites</i> sp 3, em microscopia ótica.....	63
Figura 16 –	Representação fotográfica da anatomia externa de <i>Terpios</i> spp.....	64
Figura 17 –	Tilóstilos de <i>Terpios</i> spp. do Brasil e da Martinica, <i>Terpios</i>	

	<i>gelatinosus</i> e cf. <i>Terpios</i> (Mônaco), com detalhe para os tilos de cada indivíduo.....	65
Figura 18 –	Distribuição dos tilóstilos no esqueleto de <i>Terpios</i> spp.....	66
Figura 19 –	Relação entre as médias do comprimento (μm) e da largura (μm) dos tilóstilos observadas no gênero <i>Terpios</i>	67
Figura 20 –	Anatomia externa de <i>Amorphinopsis</i> spp. evidenciando a forma, cor e associação com epífitas.....	72
Figura 21 –	Anatomia interna de <i>Amorphinopsis</i> spp. evidenciando a estrutura esquelética desde a porção mais interna até a externa e as espículas em combinação no esqueleto.....	73
Figura 22 –	Relação entre as médias do comprimento (μm) e da largura (μm) das óxeas e dos estilos observados no gênero <i>Amorphinopsis</i>	75
Figura 23 –	Representação das variações na anatomia externa de <i>Halichondria</i> spp	76
Figura 24 –	Formas e tamanhos das óxeas fusiformes de <i>Halichondria</i> spp.....	77
Figura 25 –	Esqueleto interno de diferentes espécies de <i>Halichondria</i> (<i>Halichondria</i>).....	78
Figura 26 –	Relação entre as médias do comprimento (μm) e da largura (μm) das óxeas observados no gênero <i>Halichondria</i>	81
Figura 27 –	Anatomia externa, conjunto espicular (óxeas), organização esquelética e posicionamento e forma larval de exemplares do gênero <i>Halichondria</i>	83
Figura 28 –	Anatomia externa e interna de <i>Halichondria</i> sp. nov.....	85
Figura 29 –	Caracteres anatômicos externos e internos de <i>Hymeniacidon heliophila</i>	87
Figura 30 –	Relação entre as médias do comprimento (μm) e da largura (μm) dos estilos observados em alguns representantes do gênero <i>Hymeniacidon</i> distribuídos no Oceano Atlântico.....	88
Figura 31 –	Anatomia externa e interna de dois exemplares de <i>Hymeniacidon caerulea</i> do Caribe.....	90
Figura 32 –	Características anatômicas externas (A) e internas (B e C) de <i>Hymeniacidon</i> sp. nov.....	91
Figura 33 –	Prancha ilustrativa de exemplares de <i>Rhaphidostyla</i> sp. nov. encontrados na Baía de Ilha Grande (RJ).....	93

Figura 34 –	Exemplos da diversidade morfológica de <i>Topsentia</i> spp.....	95
Figura 35 –	Ilustração da arquitetura esquelética e da forma das espículas encontradas em <i>Topsentia</i> spp.....	97
Figura 36 –	Relação entre as médias do comprimento (μm) e da largura (μm) das óxeas observados no gênero <i>Topsentia</i>	100
Figura 37 –	Esquema da integração de ferramentas de estudo na era das ômicas.....	114
Figura 38 –	Fluxograma do processo de extração para as análises de metabolômica e bioatividade.....	119
Figura 39 –	Fluxograma das etapas de trabalho de metabolômica sem alvo.....	123
Figura 40 –	Comparação geral entre os perfis químicos.....	127
Figura 41 –	Comparação entre os perfis químicos de representantes de duas famílias da ordem Suberitida.....	128
Figura 42 –	Distribuição das espécies de Suberitida e dos grupos externos a partir da análise de PCA explicada pelos eixos 1 e 2 com o somatório >50 %	131
Figura 43 –	Agrupamento de espécies gerado com o coeficiente de Spearman e o método de ligação completa, a partir das assinaturas metabólicas.....	132
Figura 44 –	Mapa de calor indicando a ordenação das espécies frente a intensidade dos metabólitos VIP.....	141
Figura 45 –	Redes metabólicas com famílias de compostos específicas obtidas a partir de fragmentos de íons precursores em análise em tandem e suas prováveis fórmulas moleculares, à direita.....	142
Figura 46 –	Resposta ecotoxicológica das esponjas e dos graus de polaridade dos metabólitos frente à bactéria <i>Aliivibrio fischeri</i>	145
Figura 47 –	Topologia baiesiana da relação filogenética na subclasse Heteroscleromorpha Cárdenas, Pérez, Boury-Esnault, 2012.....	156
Figura 48 –	Fluxograma das etapas do estudo genético das esponjas marinhas, desde a extração de DNA até a edição das sequências.....	159
Figura 49 –	Representação gráfica do número de novas amostras sequenciadas com marcadores nucleares e mitocondriais por região geográfica.....	165
Figura 50 –	Relações filogenéticas recuperadas para as esponjas heteroscleromorfas utilizando o marcador 28S com o método de Verossimilhança Máxima.....	167
Figura 51 –	Relações filogenéticas recuperadas para os clados a e b referentes a	

Figura 50.....	168
Figura 52 – Relações filogenéticas recuperadas para o clado c referente à Figura 50.....	169
Figura 53 – Relações filogenéticas recuperadas para as esponjas suberitidas (d) utilizando o marcador 28S com o método de Verossimilhança Máxima.....	171
Figura 54 – Reconstrução filogenética da ordem Suberitida utilizando o marcador ITS2 pelo método de Máxima Verossimilhança.....	172
Figura 55 – Relação filogenética da subclasse Heteroscleromorpha Cárdenas, Pérez, Boury-Esnault, 2012 desde o nível de ordem até o nível específico, utilizando o marcador mitocondrial 16S por meio do método de Verossimilhança Máxima.....	173
Figura 56 – Relações filogenéticas recuperadas para as esponjas heteroscleromorfas utilizando o marcador COX1 com o método de Verossimilhança Máxima.....	174
Figura 57 – Detalhamento das relações filogenéticas recuperadas para o clado a, na Figura 56.....	175
Figura 58 – Detalhamento das relações filogenéticas recuperadas para o clado b, na Figura 56.....	176
Figura 59 – Detalhamento das relações filogenéticas recuperadas para o clado c (Ordem Suberitida), na Figura 56.....	177
Figura 60 – Comparação da estrutura secundária do gene ITS2 dentro da ordem Suberitida, reconstruída com o método de Máxima Verossimilhança para sequências geradas neste estudo e sequências já existentes.....	180
Figura 61 – Comparação entre as árvores moleculares geradas por análises de metabolômica (A) e filogenia com o marcador 28S (B) para amostras de Suberitida, Tetractinellida e “Topsentiida”, com maior detalhamento para a família Halichondriidae (C).....	192
Figura 62 – Novo posicionamento filogenético dos gêneros de Suberitida aqui trabalhados.....	200

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Espécies da ordem Suberitida compartilhadas entre o litoral Caribe e do Brasil.....	31
Tabela 2 –	Representação da ordem Suberitida em termos de classificação, apontando o número de espécies distribuídas na região Tropical Ocidental Atlântica (Golfo do México, Caribe e Brasil).....	41
Tabela 3 –	UTOs identificados através de caracteres morfológicos e as suas distribuições.....	48
Tabela 4 –	Comparação espicular entre diferentes espécies de <i>Aaptos</i> spp.....	54
Tabela 5 –	Tabela comparativa do tamanho e forma das espículas de diferentes espécies de <i>Suberites</i> spp.....	59
Tabela 6 –	Comparação do tamanho dos tilóstilos e cor de diferentes espécies do gênero <i>Terpios</i> encontradas no Oceano Atlântico, Mar do Caribe e Mar Mediterrâneo.....	69
Tabela 7 –	Comparação das características do tilo de diferentes espécies do gênero <i>Terpios</i> encontradas no Oceano Atlântico, Mar do Caribe e Mar Mediterrâneo.....	70
Tabela 8 –	Micrometria comparativa de diferentes espécies de <i>Amorphinopsis</i> e a variação nas medidas dentro de <i>A. atlantica</i>	74
Tabela 9 –	Comparação entre as espécies do gênero <i>Halichondria</i> distribuídas entre o Caribe e a América do Sul.....	79
Tabela 10 –	Comparação dos tipos e tamanhos das espículas e cores de <i>Hymeniacidon</i> spp. e <i>Rhaphidostyla</i> spp.....	89
Tabela 11 –	Comparação espicular de <i>Topsentia</i> spp. do Atlântico, Mar do Caribe, Golfo do México e o tipo do Mar Mediterrâneo.....	98
Tabela 12 –	Algumas substâncias químicas já isoladas de diferentes gêneros de Suberitida.....	112
Tabela 13 –	Informações gerais sobre a quantidade de material utilizado e extrato obtido.....	120
Tabela 14 –	Principais picos detectados nos perfis metabólicos das espécies de Suberitida.....	124

Tabela 15 –	VIPs identificados nos testes estatísticos aplicados pelo programa MetaboAnalyst 3.0.....	133
Tabela 16 –	<i>Primers</i> utilizados durante este trabalho para os diferentes marcadores moleculares.....	160
Tabela 17 –	Quantitativo de sequências comparativas incluídas nas análises filogenéticas de cada ordem de Heteroscleromorpha por marcador molecular.....	162
Tabela 18 –	Comparação entre a classificação antes e depois das propostas apresentadas no presente estudo e demonstradas na Figura 62.....	201

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔG	delta G
$^{\circ}C$	Graus Celcius
cm	Centímetro
h	Horas
km ²	Quilômetros quadrados
kV	Quilowatts
m	Metros
mA	Miliamperes
mg	Miligrama
mL	Mililitros
min	Minutos
mm	Milímetros
mM	Milimol
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
ppm	Partes por mil
s	Segundos
μm	Micrômetro
μg	Micrograma
μL	Microlitro
aff.	Afinidade
ANOVA	Análise de variância
ANTr	Atlântico Noroeste Tropical
APA	Área de Proteção Ambiental
APARC	Área de Proteção Ambiental dos Recifes de corais
Ara-A	Vidarabina
Ara-C	Citarabina
AS _{Te}	Atlântico Sudoeste Temperado
AS _{Te} Q	Atlântico Sudoeste Temperado Quente
AS _{Tr}	Atlântico Sudoeste Tropical
ATBC	Acetil tributil citrato (sigla em inglês)
BA	Bahia
BIG	Baía da Ilha Grande
BTS	Baía de Todos os Santos
CE	Ceará
cf.	Conferir

COX	Citocromo oxidase
CTAB	Brometo de Cetil-Trimetil Amônio
DCM	Diclorometano
DEHP	Di(2-etilhexil) ftalato (sigla em inglês)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC ₅₀	Efeito de concentração máximo para 50% da população
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESI	Ionização por spray elétrico (sigla em inglês)
FN	Arquipélago de Fernando de Noronha
GEBCO	The General Bathymetric Chart of the Oceans
GNPS	Global Natural Product Social
GSL	Glicosfingolipídeos
GTR	Tempo Geral Reversível (sigla em inglês)
GuHCl	Hidrocloreto de Guanidina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance (sigla em inglês)
HMM	Modelo escondido de Markov (sigla em inglês)
ITS	Espaçador interno transcrito (sigla em inglês)
LABMEV	Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura
L	Leste
LC	Laboratório Central
LGMar	Laboratório de Genética Marinha
MA	Maranhão
MAA	Milhões de anos atrás
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFE	Mínimo de energia livre (sigla em inglês)
ML	Máxima Verossimilhança
MNRJ	Museu Nacional, Rio de Janeiro
MS	Espectrometria de massa
MS/MS ou MS2	Espectrometria de massa em tandem
N	Norte
Nº inds.	Número de indivíduos
NE	Nordeste
NJ	Neighbor Joining
n.r.	Não registrado
pb	Pares de base
PCA	Análise de Componentes Principais (sigla em inglês)
PCB	Bifenilpoliclorado (sigla em inglês)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (sigla em inglês)

PEMPRM	Parque Estadual Marinho da Pedra da Risca do Meio
PAF	Fator de ativação de plaquetas
PARNAMAR	Parque Nacional Marinho
PNBr	Plataforma Norte do Brasil
PLSDA	Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (sigla em inglês)
PVC	Cloreto de polivinil (sigla em inglês)
RJ	Rio de Janeiro
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RN	Rio Grande do Norte
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribonuclease
rRNA	RNAríbssomal
S	Sul
SCUBA	Self Contained Underwater Breathing Apparatus
SE	Sudeste
SIRT	Sirtuína
sp.	Espécie
sp. nov.	Espécie nova
spp.	Espécies
TBC	Tributil citrato (sigla em inglês)
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UERJPOR	Coleção de Porifera da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFPEPOR	Coleção de Porifera da Universidade Federal de Pernambuco
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UTOs	Unidade Taxonômica Operacional
VIP	Importância Variável em Projeção (sigla em inglês)
vs.	Versus

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	22
1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO FILO PORIFERA GRANT, 1936.....	23
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.1	Área de Estudo.....	32
2.2	Coleta e preservação dos espécimes.....	36
3	A TAXONOMIA MORFOLÓGICA E AS SUAS LIMITAÇÕES NA ORDEM SUBERITIDA.....	38
3.1	Introdução.....	38
3.2	Objetivos.....	44
3.3	Material e Métodos.....	44
3.3.1	<u>Preparação morfológica.....</u>	44
3.3.1.1	Dissociação espicular.....	44
3.3.1.2	Protocolo de corte perpendicular e tangencial.....	45
3.3.1.3	Micrometria das espículas.....	46
3.3.1.4	Identificação das espécies.....	46
3.4	Resultados.....	47
3.5	Discussão.....	101
4	A UTILIZAÇÃO DA METABOLÔMICA EM PROL DE UMA TAXONOMIA INTEGRATIVA EM SUBERITIDA.....	110
4.1	Introdução.....	110
4.2	Objetivos.....	117
4.3	Material e Métodos.....	118
4.3.1	<u>Extração química.....</u>	118
4.3.2	<u>Análise metabólica por testes multivariados.....</u>	121
4.3.3	<u>Visualização e interpretação metabólica por redes moleculares.....</u>	122
4.3.4	<u>Teste de bioatividade Microtox®.....</u>	124
4.4	Resultados.....	125
4.4.1	<u>Perfis cromatográficos (assinaturas metabólicas).....</u>	125
4.4.2	<u>Análises multivariadas.....</u>	130
4.4.3	<u>Visualização e interpretação metabólica por redes moleculares.....</u>	140

4.4.4	<u>Toxicidade dos metabólitos pelo teste de Microtox®</u>	144
4.5	Discussão	145
5	FILOGENIA E SISTEMÁTICA MOLECULAR DA ORDEM SUBERITIDA	153
5.1	Introdução	153
5.2	Objetivos	157
5.3	Material e Métodos	157
5.3.1	<u>Extração e quantificação dos ácidos nucleicos</u>	157
5.3.2	<u>Marcadores moleculares e amplificação de DNA</u>	159
5.3.3	<u>Sequenciamento, edição e alinhamento múltiplo das sequências gênicas novas e comparativas</u>	161
5.3.4	<u>Anotação e estrutura secundária do ITS2</u>	163
5.3.5	<u>Reconstruções filogenéticas</u>	163
5.4	Resultados	164
5.4.1	<u>Interpretação das reconstruções filogenéticas</u>	165
5.4.2	<u>Interpretação da estrutura secundária do ITS2</u>	178
5.5	Discussão	183
6	DISCUSSÃO GERAL: A TAXONOMIA INTEGRATIVA EM PROL DE UMA NOVA PROPOSTA SISTEMÁTICA	189
6.1	Superando desafios	189
6.2	Convergência de relações a partir do uso de diferentes técnicas	190
6.3	Novas propostas de diagnose e classificação em Suberitida	199
	CONCLUSÕES	207
	REFERÊNCIAS	209
	APÊNDICE A – Lista dos 180 espécimes de Suberitida e grupos externos trabalhados com sucesso morfológico e molecular. Todos os espécimes tiveram a morfologia avaliada.....	242
	APÊNDICE B – Lista comparativa de amostras trabalhadas para a realização das reconstruções filogenéticas com os marcadores 28S, ITS2, COX1 e 16S.....	247
	APÊNDICE C – Sequência da estrutura secundária centróide dos espaçadores internos transcritos (ITS2) de Suberitida.....	257
	APÊNDICE D – Relação filogenética completa das suberitidas (A). Detalhamento dos complexos de espécies (B-F) referentes aos triângulos	

observados na porção mais distal dos ramos em (A).....	259
ANEXO A - Teste de bioatividade Microtox® com a bactéria <i>Aliivibrio fischeri</i> .	261
ANEXO B – Protocolo de extração de DNA com Hidroclorato de Guanidina (GuHCl) (Lôbo-Hajdu <i>et al.</i> , 1999) e Protocolo de extração de DNA com tampão de lise contendo Brometo de Cetil-Trimetil Amônio (CTAB) sensu de Paula (2016).....	262
ANEXO C – Preparação do gel de agarose com tampão de corrida Tris-acetato-EDTA (TAE) para visualização do DNA extraído e do produto de PCR.....	265

INTRODUÇÃO

O objetivo geral desta tese é integrar as ferramentas morfológicas, genéticas, químicas e geográficas para identificar espécies de esponjas marinhas da ordem Suberitida Chombard & Boury-Esnault, 1999 distribuídas majoritariamente em águas rasas (até 30 m), entre o litoral do Brasil e o do Caribe. No Oceano Atlântico Tropical Ocidental (OATO), diversas espécies de Porifera Grant, 1936 são amplamente distribuídas, mesmo este grupo sendo representado por espécies cujas larvas vivem poucos dias na coluna d'água (MALDONADO, 2006) e com a presença de rios com grandes volumes nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, os quais poderiam atuar como barreiras geográficas para espécies sésseis. Ademais, estudos filogenéticos vêm demonstrando a existência de polifilias em gêneros de Suberitida (MORROW *et al.*, 2012, 2013; REDMOND *et al.*, 2013; THACKER *et al.*, 2013). Assim sendo, a hipótese geral deste trabalho é a de que grande parte das espécies de Suberitida compartilhadas entre o Mar do Caribe e o litoral do Brasil não são da mesma espécie ou formam espécies crípticas tendendo à especiação.

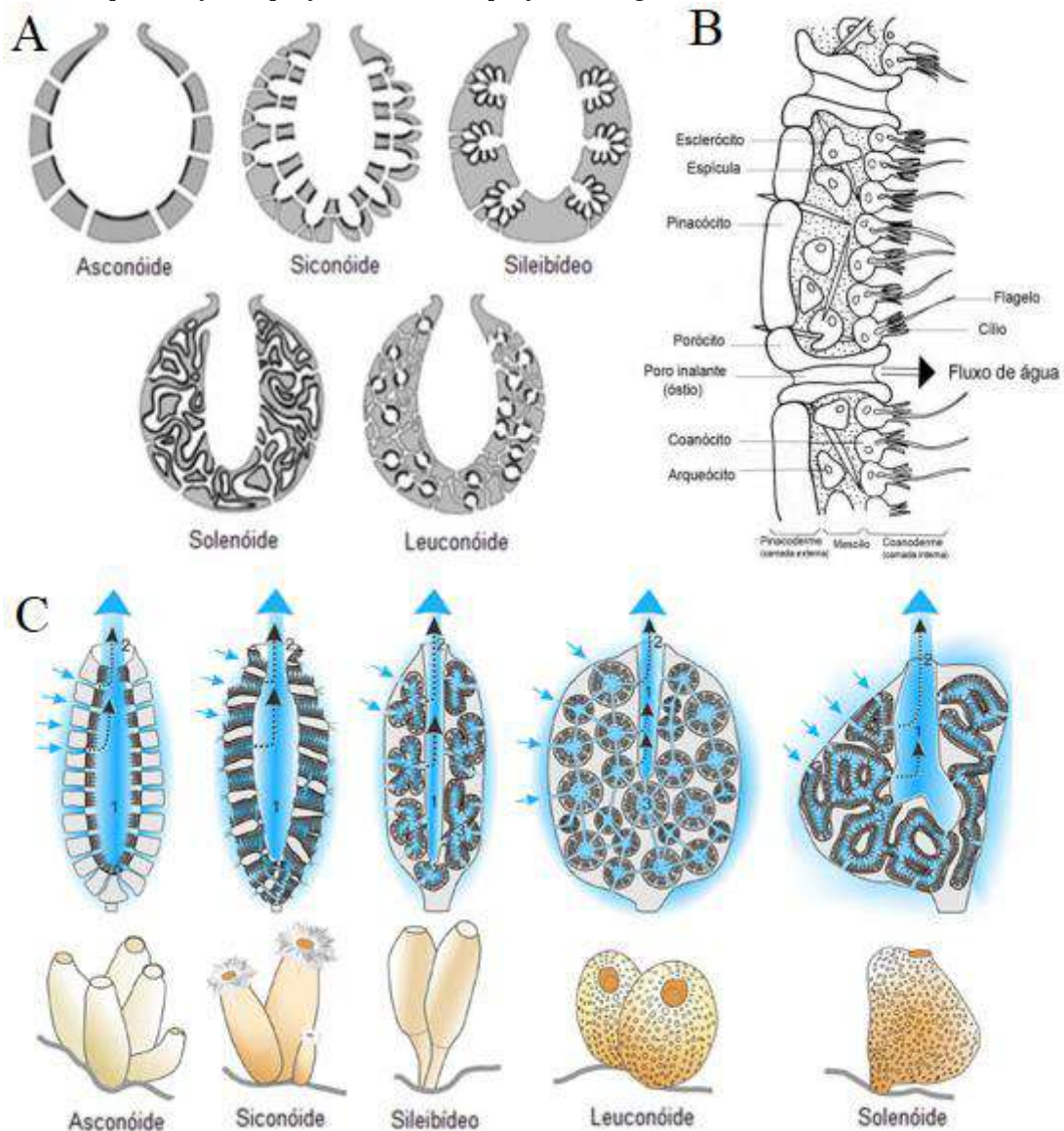
Para responder a hipótese proposta e expor os objetivos traçados, esta tese foi separada em três capítulos. O Capítulo 1 foi voltado para a delimitação de caracteres morfológicos como objetivo de descrever novas espécies e redescrever espécies já conhecidas da Ordem Suberitida, bem como adicionar novos caracteres diagnósticos às redescrições. O Capítulo 2 elucidou os prós e os contras da utilização da metabolômica na taxonomia integrativa, comparando os resultados químicos com os oriundos da taxonomia alfa. Grande parte das amostras deste capítulo são referentes a família Halichondriidae. O potencial de toxicidade dos metabólitos de Suberitida contra a bactéria *Aliivibrio fischeri* também foram medidos com objetivo de evidenciar o potencial citotóxico em esponjas suberitidas. O Capítulo 3 reconstruiu filogenias com marcadores moleculares nucleares e mitocondriais, bem como integrou os dados morfológicos, químicos e genéticos para o estudo da sistemática molecular Suberitida. Com base nas amostras do OATO e a partir da elucidação de novos caracteres diagnósticos, um novo paradigma sobre a definição, a filogenia e a diversidade de Suberitida foram discutidos e propostos ao final desta tese.

1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO FILO PORIFERA GRANT, 1936

As esponjas (Filo Porifera Grant, 1836) são animais exclusivamente aquáticos, bentônicos, sésseis ou sedentários com ampla distribuição (BERGQUIST, 1978). Elas estão localizadas na base da árvore evolutiva dos metazoários (FEUDA *et al.*, 2017; SIMION *et al.*, 2017; SOGABE *et al.*, 2019), tendo surgido há aproximadamente 550 milhões de anos atrás (MAA) (ANTCLIFF *et al.*, 2014; BOTTING e MUIR, 2018) e são consideradas como os animais mais antigos do mundo ainda existentes. A alimentação das esponjas é comumente realizada por filtração passiva de partículas microscópicas de nutrientes e matéria orgânica dissolvida (DE GOEIJ *et al.*, 2008, GODEFROY *et al.*, 2019), porém algumas espécies de ambientes profundos ou cavernas, com características particulares, predam pequenos invertebrados (VACELET e BOURY-ESNAULT, 1995, GODEFROY *et al.*, 2019). As esponjas se diferenciam dos demais metazoários pela presença exclusiva de câmaras coanocitárias, as quais ligam um sistema de poros inalantes e exalantes, formando o sistema aquífero (Figura 1) e devido à natureza totipotente de suas células.

Estes animais são multicelulares, com células com potencial totipotente (uma célula pode gerar outra com função diferente), porém sua anatomia celular é fundamentalmente diferente de outros animais (LEYS e HILL, 2012), e há ainda muitas perguntas não respondidas sobre a estrutura e homologia de seus tecidos em comparação com epitélios em outros animais, uma vez que não há formação de gástrula durante o desenvolvimento embrionário nas esponjas (ERESKOVSKY, 2010; LEYS e RIESGO, 2012). No geral, as esponjas são hermafroditas com a capacidade de realizar reprodução assexuada ou sexuada, podendo ser tanto vivíparas quanto ovíparas (BERGQUIST, 1978). As larvas são lecitotróficas, ciliadas e com pequeno tempo de vida planctônica (MALDONADO, 2006), de camada única e oca ou com camada dupla e sem cavidade (ERESKOVSKY, 2010).

Figura 1 – A representação da porção interna das esponjas com algumas de suas estruturas.



Legenda: A – sistemas aquíferos; B – tipos celulares e modo de filtração; C – direção e fluxo de água nos diferentes sistemas aquíferos.

Nota: A – Os cinco diferentes tipos de sistemas aquíferos encontrados em esponjas marinhas. O nível de organização segue do mais simples (asconóide) para o mais complexo (leuconóide) e B – O posicionamento de alguns dos tipos celulares das esponjas e C – direção do fluxo de água nas esponjas filtradoras.

Fonte: Cavalcanti e Klautau (2011), Goudie *et al.* (2013) e Godefroy *et al.* (2019). Modificada pelo autor, 2019.

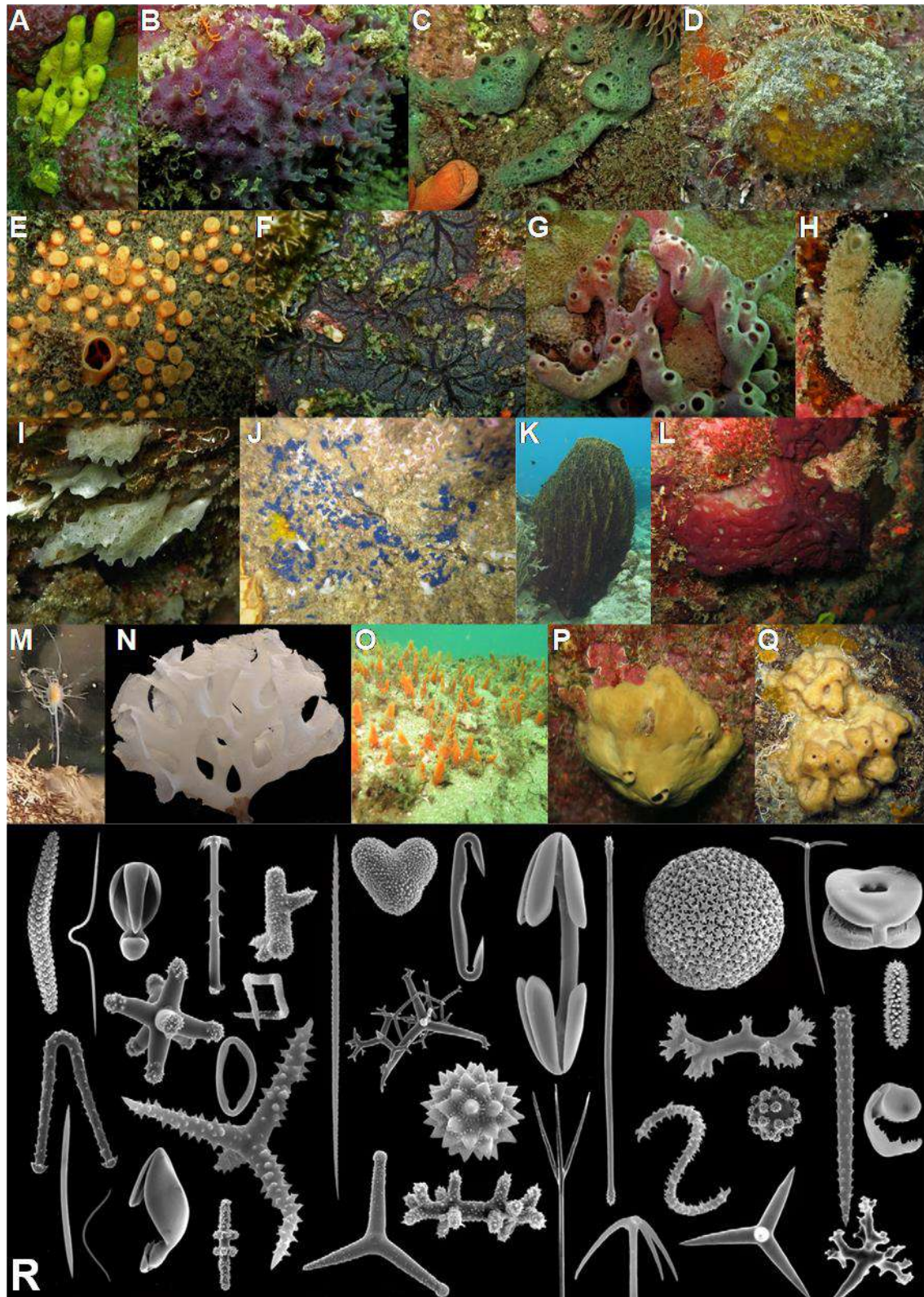
A identificação das esponjas é normalmente realizada através dos caracteres morfológicos, os quais apresentam uma diversidade extraordinária tanto interna quanto externamente (ver detalhes em BOURY-ESNAULT e RÜTZLER, 1997, Figura 2). As características do esqueleto das esponjas são os principais caracteres utilizados na taxonomia alfa. Quando presente, o esqueleto pode ser formado por espículas silicosas ou calcáreas e/ou fibras de espongina, cuja distribuição forma tipos diferentes de esqueleto, permitindo assim diferenciar os grandes grupos de poríferos (HOOPER e VAN SOEST, 2002a). Mesmo com

tantas possibilidades estruturais, há ainda esponjas que não apresentam determinados caracteres, sendo esta ausência um caráter taxonômico. Tal situação pode ser observada na descrição de *Suberitida*, por exemplo.

Atualmente, cerca de 9.100 espécies de esponjas são conhecidas no mundo, sendo a Classe *Demospongiae* a mais rica, com mais de 85% das espécies (VAN SOEST *et al.*, 2019). Segundo Appeltans e colaboradores (2012), ainda devem existir três vezes mais esponjas para serem descritas ao redor no globo. Os poríferos exercem funções essenciais no ambiente aquático participando ativamente dos ciclos biogeoquímicos do carbono (DE GOEIJ *et al.*, 2013; MCMURRAY *et al.*, 2018; HOER *et al.*, 2018), do nitrogênio (DE GOEIJ *et al.*, 2008; FIORE *et al.*, 2013; JIMÉNEZ e RIBES, 2007), da sílica (MALDONADO *et al.*, 1999; CHU *et al.*, 2011) e do fósforo (ZHANG *et al.*, 2015a), disponibilizando nutrientes em ambientes oligotróficos para a sobrevivência de comunidades de espécies em desertos marinhos. Em ambientes degradados ou que sofreram ações intempestivas da natureza, as esponjas funcionam como catalisadoras da regeneração da diversidade ecossistêmica (WULFF, 2006a, 2013) devido ao potencial totiponte de suas células, alta taxa de reprodução assexuada e intensa relação interespecífica. Os diferentes tipos de crescimento encontrados nos poríferos possibilitam que este grupo colonize os mais diversos ecossistemas aquáticos contribuindo para a formação de habitats tridimensionais complexos, representando uma biomassa, abundância e riqueza de espécies exuberantes (BARTHEL e GUTT, 1992; DÍAZ e RÜTZLER, 2001; MOURA *et al.*, 2016), aumentando assim a biodiversidade local (BEAZLEY *et al.*, 2013).

O filo *Porifera* também é importante para a economia de determinadas regiões. Esses animais são conhecidos e explorados pelo ser humano há séculos, com uma estimativa de início há 4-5 mil anos atrás, por pescadores, na Grécia e Tunísia (ver VOULTSIADOU *et al.*, 2011; FAO, 2017), sendo o mercado de produção e venda voltado para o uso doméstico, majoritariamente. Atualmente, os principais polos de aquicultura e comércio de esponjas são o Golfo do México e o Mediterrâneo (FAO, 2017), os quais podem utilizar diferentes formas de produção, a fim de agilizar o crescimento do produto (ver ÇELIK *et al.*, 2011).

Figura 2 - Pequena representação da diversidade de espécies de esponjas marinhas do Oceano Atlântico Ocidental e Mar do Caribe.



Legenda: A-Q) Exemplos de anatomia externa das quatro classes de Porifera e R) diversidade de espículas existentes nos poríferos.

Fonte: A-Q) Fotografias de Humberto Fortunato, Gisele Lôbo Hajdu e Jean Vacelet (N). R) Ilustração de van Soest *et al.* (2012). Modificada pelo autor, 2019.

A utilização de esponjas na produção de fármacos é outra vertente que vem crescendo exponencialmente nas últimas décadas. O filo Porifera produz uma grande diversidade de famílias de metabólitos (KORNPROBST, 2005), fazendo deste grupo de animais marinhos os principais na produção de compostos químicos bioativos (SIPKEMA *et al.*, 2005; POMPONI, 2006; MEHBUB *et al.*, 2014; ANJUM *et al.*, 2016). As atividades biológicas das substâncias químicas de esponjas marinhas são diversas, sendo alguns compostos já comercializados pela indústria farmacêutica, como o Ara-A e o Ara-C, provenientes de nucleosídeos isolados de *Tectitethya crypta* (de Laubenfels, 1949), os quais atuam como agentes antitumorais e antivirais (PROKSCH *et al.*, 2002). Grande parte desta diversidade está associada à comunidade holobionte que vive nas esponjas, sendo esta comunidade a responsável pela produção de uma grande variedade de substâncias químicas (PIEL, 2004), enquanto as esponjas produzem outros metabólitos (FLATT *et al.*, 2005; TERNON *et al.*, 2016).

As esponjas atuam em diversos tipos de interação ecológica (WULFF, 2006b, 2012). Em algumas associações interespecíficas, as esponjas podem ser beneficiadas (WILKINSON, 1978; SILVA *et al.*, 2017), prejudicadas (GUIDA, 1976; BO *et al.*, 2012; PAWLIK *et al.*, 2018) ou a interação pode não afetar os poríferos (CROCKER e REISWIG, 1981; MONTENEGRO-GONZÁLEZ e ACOSTA, 2010). A alta diversidade na produção de compostos químicos se reflete na grande capacidade competitiva, defensiva e evolutiva das esponjas nos ambientes bentônicos (PROKSCH, 1994; THACKER *et al.*, 1998; HILL *et al.*, 2005; PAWLIK, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2013).

Devido à simplicidade morfológica, grande capacidade adaptativa e representarem a base do reino Animalia, as esponjas formam um grupo essencial para a compreensão evolutiva dos caracteres nos animais. Neste sentido, diversos estudos já foram realizados com o objetivo de elucidar pontos fundamentais como: i) gênese das células e suas interações celulares (PANCER *et al.*, 1998; HASELEY *et al.*, 2001; DEGNAN *et al.*, 2005), ii) formação do sistema nervoso ou sensorial (LEYS e DEGNAN, 2001; LUDEMAN *et al.*, 2014; LEYS, 2015) e imunológico (HILDEMANN *et al.*, 1979; MÜLLER e MÜLLER, 2003), iii) produção de biominerais a partir da sílica (POLINI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013), iv) funcionamento das vias metabólicas (GENTA-JOUE e THOMAS, 2012), v) identificação e produção de substâncias químicas com funções medicinais (SIPKEMA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006; PERDICARIS *et al.*, 2013), entre outros.

Apesar de tantos estudos já terem sido realizados com esponjas marinhas, até hoje a classificação do grupo não é bem resolvida. Este problema se deve à combinação da

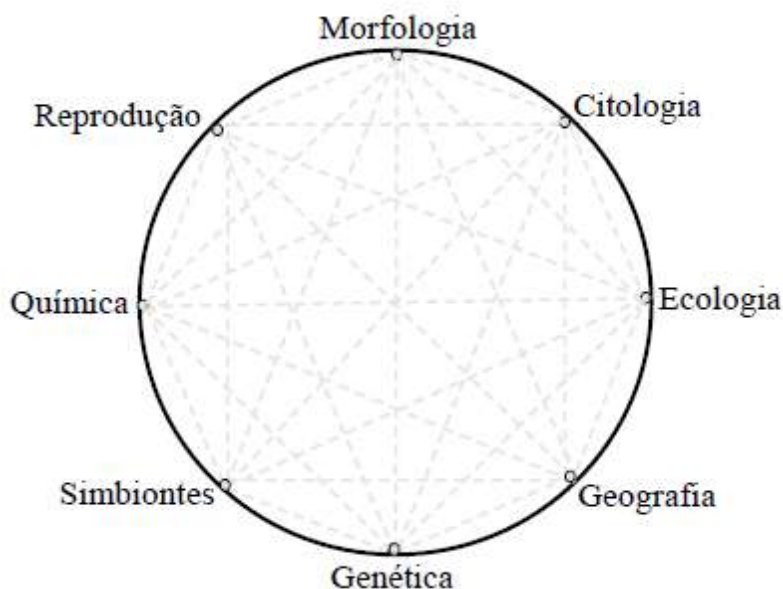
simplicidade morfológica das espécies aliada à alta plasticidade morfológica em resposta às variáveis ambientais. Para resolver tal problema, os especialistas têm utilizado diferentes ferramentas em conjunto para elucidar caracteres diagnósticos, e assim, identificar as espécies com maior robustez. Essa abordagem é chamada de taxonomia integrativa (DAYRAT, 2005; Figura 3). Os principais estudos de taxonomia integrativa utilizando esponjas são realizados por meio da sistemática molecular (genética), como por exemplo Gerasimova *et al.* (2008) e Melis *et al.* (2016). Estudos integrando ecologia (WULFF, 2006c), citologia (MURICY *et al.*, 1996; ERESKOVSKY *et al.*, 2014), reprodução (LÉVI, 1956; AYLING, 1980; ERESKOVSKY, 2004), geografia (HAJDU e DESQUEYROUX-FAÚNDEZ, 2008; AZEVEDO *et al.*, 2015), microrganismos (RÜTZLER e SMITH, 1993) e química (BERGQUIST e WELLS, 1983; IVANISEVIC *et al.*, 2011a,b) também já foram utilizados para realizar a redescritção ou identificação de novas espécies, assim como para elucidar relações filogenéticas através de ferramentas distintas (BOURY-ESNAULT *et al.*, 2013).

Em 2002, Hooper e van Soest organizaram, com o auxílio de aproximadamente 40 especialistas, a identificação das espécies baseada, quase que exclusivamente, em caracteres morfológicos no *Systema Porifera*. Entretanto, os autores elucidaram a necessidade de revisão de diversos grupos ali inseridos, uma vez que estes eram considerados para- ou polifiléticos. Sendo assim, nos últimos 15 anos, diversos estudos combinando principalmente dados morfológicos e genéticos foram desenvolvidos para redefinir a filogenia de grupos dentro do Filo Porifera (BORCHIELLINI *et al.*, 2004; NICHOLS, 2005; ERPENBECK e WÖRHEIDE, 2007; DOHRMANN *et al.*, 2008; LAVROV *et al.*, 2008; GAZAVE *et al.*, 2012; VOIGT *et al.*, 2012; MORROW *et al.*, 2013; REDMOND *et al.*, 2013; THACKER *et al.*, 2013; MORROW e CÁRDENAS, 2015).

Um dos grupos dentro de Porifera a ser testado quanto à robustez da taxonomia integrativa é a Ordem Suberitida Chombard & Boury-Esnault, 1999, porque este grupo contém gêneros que causam histórica confusão na sistemática das esponjas devido ao fato da definição do grupo ser realizada majoritariamente pela ausência de caracteres, o que é um grande problema na classificação, especialmente quanto à família Halichondriidae (ver detalhes em ERPENBECK *et al.*, 2006a, 2012). Além disso, a ordem foi criada com base na combinação de caracteres morfológicos e genéticos e, ainda assim, os seus grupos internos não são tidos como monofiléticos. A ramificação precoce do gênero *Homaxinella* em relação ao restante dos membros da ordem, o agrupamento do gênero *Terpios* (Família Suberitidae) com a família Halichondridae, a ausência de *Topsentia* dentro da família Halichondriidae e a

indefinição do posicionamento do gênero *Ulosa* (ver detalhes em MORROW *et al.*, 2012; REDMOND *et al.*, 2013; THACKER *et al.*, 2013), são exemplos da problemática filogenética no grupo.

Figura 3 – Esquema com algumas das áreas utilizadas nos estudos de taxonomia integrativa em esponjas marinhas.



Legenda: As linhas pontilhadas representam rotas de conexão entre as mais distintas áreas do conhecimento, todas elas tendo o mesmo peso para a taxonomia.

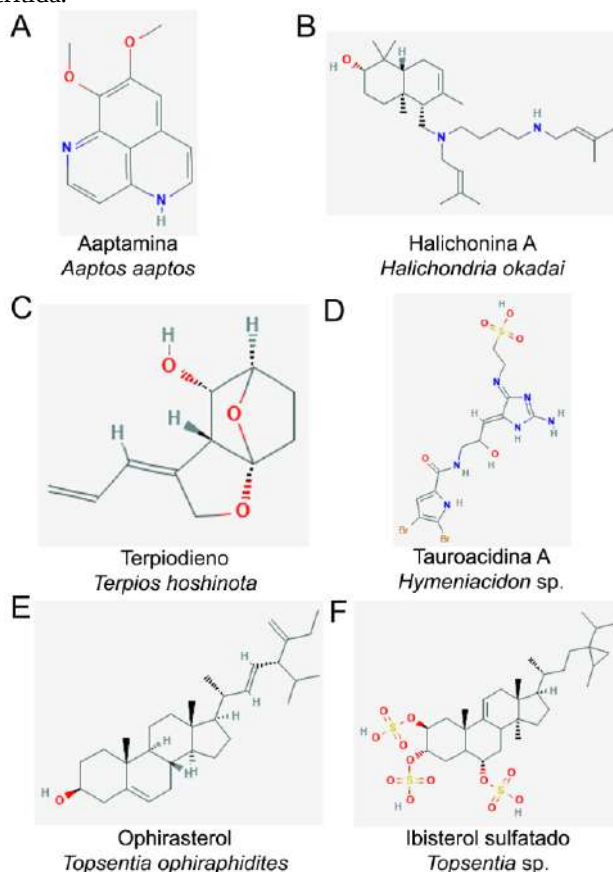
Fonte: Cárdenas *et al.* (2012). Adaptado pelo autor, 2019.

A ordem Suberitida também chama atenção dos spongólogos devido à capacidade de produzir diversos exemplos de esteróis e alcalóides, tais como aaptamina, taurocidina, halichonina, ofirasterol, ibisterol sulfatado, etc. (Figura 4), inclusive com atividade citotóxica, antiviral e antitumoral (HIRATA e UEMURA, 1986; FEDOREEV *et al.*, 1988). Atualmente, esta é a segunda ordem de esponjas estudadas na busca por novos compostos bioativos, somente atrás de Dictyoceratida (MEHBUB *et al.*, 2014).

A espongofauna caribenha é considerada como uma das mais bem conhecidas do mundo, sendo representada por cerca de 800 espécies, segundo comunicação pessoal com a pesquisadora Dra. Maria Cristina Díaz, em 2013. No Brasil, o número de esponjas está em torno de 600 espécies (MURICY, 2017). Estas regiões estão inseridas em dois reinos biogeográficos definidos por Spalding e colaboradores (2007), a partir de dados sobre as características climáticas, geológicas e oceanográficas em águas rasas, bem como o endemismo das espécies marinhas. O Caribe e as regiões Norte e Nordeste do Brasil estão alocadas no Reino Biogeográfico do Atlântico Tropical, enquanto as regiões Sudeste e Sul do Brasil integram o Reino Biogeográfico da América do Sul Temperada. O compartilhamento

das características abióticas também é observado no padrão de distribuição das espécies (MILOSLAVICH *et al.*, 2010, 2011), levando a uma similaridade faunística entre o Caribe e o Brasil.

Figura 4 – Alguns exemplos de substâncias químicas das classes dos esteróides e alcalóides já descritos em espécies da ordem Suberitida.



Fonte: PUBCHEM. Adaptada pelo autor, 2019.

Recentemente, van Soest (2017) evidenciou tal similaridade para a fauna de poríferos da Guiana Francesa, onde o autor identificou 39 espécies de esponjas compartilhadas entre o litoral do Brasil e o Mar do Caribe, 36 espécies são exclusivas do Caribe e 13 do Brasil, sugerindo que a região amazônica seja representada por uma fauna transitória, enquanto a espongoфаuna do Caribe pode ser considerada como uma fonte de biodiversidade. Especificamente para a ordem Suberitida, apenas nove espécies são compartilhadas entre o Caribe e o Brasil (ver Tabela 1).

Tabela 1 – Espécies da ordem Suberitida compartilhadas entre o litoral Caribe e do Brasil.

Família	Gênero	Espécie	ANTr	PNBr	ASTr	ASTeQ
Halichondriidae Gray, 1867	<i>Ciocalypa</i> Bowerbank, 1862	<i>alba</i> Carvalho, Carraro, Lerner & Hajdu, 2003		X		X
	<i>Halichondria</i> Fleming, 1828	<i>magniconulosa</i> Hechtel, 1965	X	X	X	X
	<i>Hymeniacidon</i> Bowerbank, 1858	<i>heliophila</i> (Wilson, 1911)	X	X	X	X
	<i>Topsentia</i> Berg, 1899	<i>ophiraphidites</i> (de Laubenfels, 1934)	X	X	X	X
	<i>Aptos</i> Schmidt, 1870	<i>bergmanni</i> de Laubenfels, 1950	X		X	
Suberitidae	<i>Suberites</i> Nardo, 1833	<i>aurantiacus</i> (Duchassaing & Michelotti, 1864)	X	X	X	X
	<i>Terpios</i> Duchassaing & Michelotti, 1864	<i>belindae</i> Rützler & Smith, 1993	X	X	X	
		<i>fugax</i> Duchassaing & Michelotti, 1864	X	X	X	X
		<i>manglaris</i> Rützler & Smith, 1993	X			X

Legenda: Atlântico Noroeste Tropical (ANTr), Plataforma Norte do Brasil (PNBr), Atlântico Sudoeste Tropical (ASTr) e Atlântico Sudoeste Temperado Quente (ASTeQ).

Fonte: O autor, 2019.

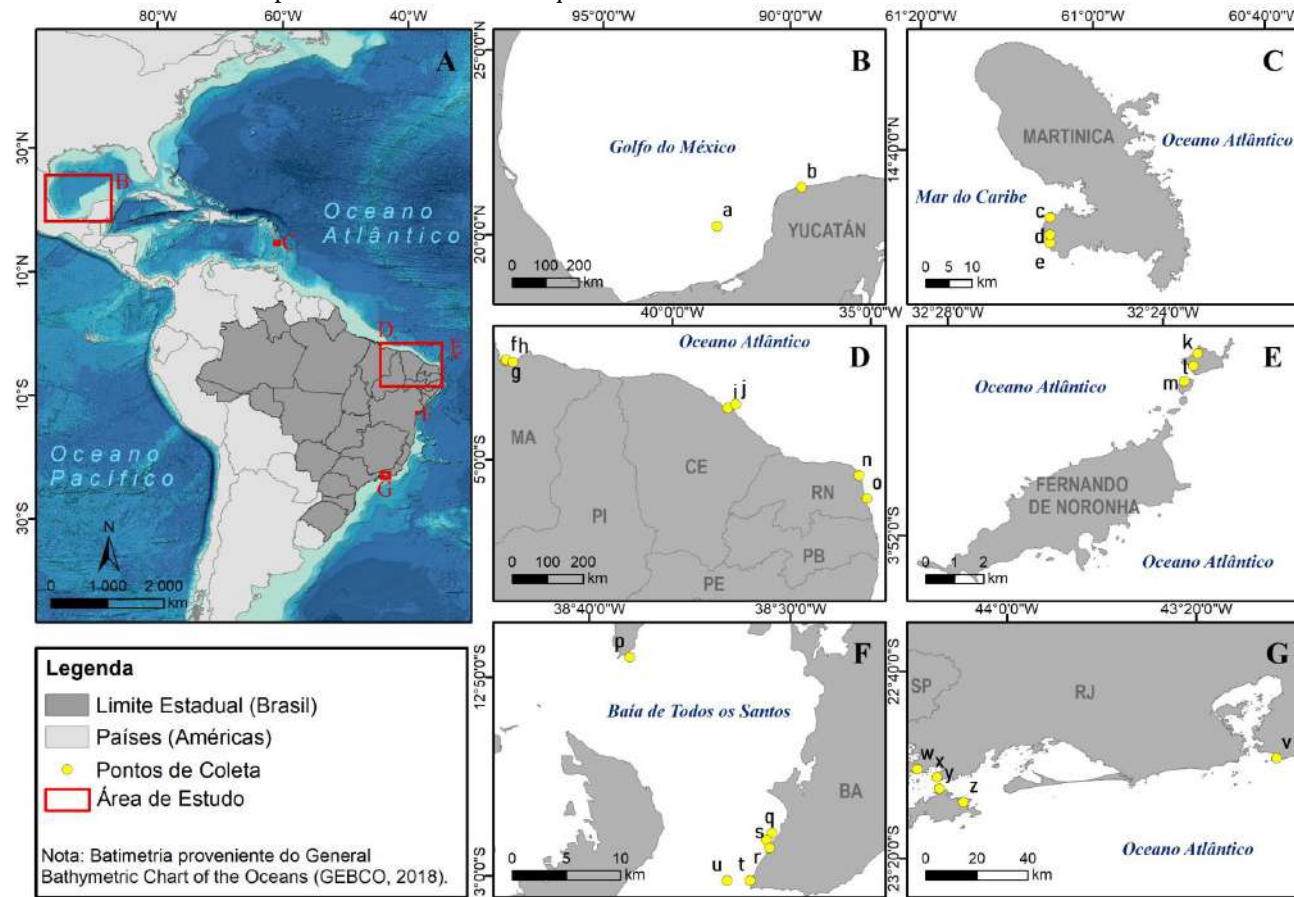
2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de Estudo

O estudo foi realizado em águas rasas (até 30 m) de diferentes regiões do Oceano Atlântico Ocidental, abarcando as províncias biogeográficas do Atlântico Noroeste Tropical (ANTr), Plataforma Norte do Brasil (PNBr), Atlântico Sudoeste Tropical (ASTr) e Atlântico Sudoeste Temperado Quente (ASTeQ), sendo estas baseadas no sistema biogeográfico marinho de áreas proposto por Spalding e colaboradores (2007) para regiões costeiras. Apesar de ter obtido material comparativo de diversos locais do mundo, incluindo amostras frescas de *Terpios gelatinosus* (Bowerbank, 1866) em Mônaco (França) para este trabalho, apenas a região citada acima é mostrada no mapa (Figura 5). A figura 5A aponta que o limite norte de coleta de espécimes foi o Golfo do México, enquanto outros espécimes foram obtidos nas Pequenas Antilhas, no Mar do Caribe, principalmente na ilha da Martinica. No Brasil, as coletas foram realizadas nas regiões Nordeste e Sudeste. O limite setentrional de coleta de espécimes foi na ilha de São Luís, no estado do Maranhão (MA), sendo também amostradas localidades dos estados do Ceará (CE), Rio Grande do Norte (RN), Pernambuco (Arquipélago de Fernando de Noronha, FN), Bahia (BA) e Rio de Janeiro (RJ), o limite austral.

O Golfo do México (Figura 5B) é o maior do mundo com 1,6 milhões de km², cercado pela América do Norte e Central, recebendo águas do mar do Caribe e com grande interesse para a indústria petrolífera. Os recifes de Cayo Arcas e a lagoa de Chelem estão localizados ao sul do golfo, próximos ao Banco de Campeche, localizado na Península de Yucatan. Esta parte do golfo difere das porções superiores devido às características oceanográficas, abarcando grande quantidade de espécies endêmicas (BELANGER *et al.*, 2012; ROBERTSON e CRAMER, 2014). Os recifes de Cayo Arcas podem se estender até a profundidade de 25 m, sendo abundante em organismos bentônicos e com mais de 160 espécies de peixes descritas (ver ROBERTSON *et al.*, 2016).

Figura 5 - Representação da área de estudo com os pontos de coleta em destaque.



Legenda: a) Arrecife de Cayo Arcas, b) Laguna de Chelem, c) Grotte Chauve-Souris, d) Plage Anse d'Arlet, e) Anse d'Arlet, f) Praia do Meio, g) Praia de Araçagi, h) Praia de Panaquatira, i) Dois Coqueiros, j) Pedra da Risca do Meio, k) Enseada das Cagarras, l) Ressureta, m) Ilha do Meio, n) Maracajaú, o) Pirangi do Sul, p) Ilha dos Frades, q) Quebramar norte, r) Quebramar leste, s) Deck, t) Praia da Barra, u) Boião, v) Itaipú, w) Pousada Jamanta, x) Ponta Leste, y) Lagoa Azul, z) Enseada do Abraão.

Fonte: Batimetria retirada de GEBCO, 2018.

A lagoa de Chelem, por sua vez, apresenta uma área aproximada de 15 km², tem uma forma alongada paralela a costa com conexão direta com o mar por meio de um canal artificial. A profundidade máxima na lagoa é de 1,5 m, com temperatura variando de 18 a 31°C e salinidade entre 34 e 38 ppm (VITE-GARCÍA *et al.*, 2014). Os impactos antrópicos na região têm aumentado nos últimos anos devido à presença de um porto e um forte aumento do turismo.

A ilha da Martinica (Figura 5C) é considerada um território da França, no Caribe, com aproximadamente 1100 km², cercada por águas claras e oligotróficas, com grande variedade de ecossistemas entre as profundidades de 0-50 m, totalizando uma superfície marinha de 452,22 km² (LEGRAND *et al.*, 2012; FAILLER *et al.*, 2015). As amostragens foram realizadas na região de Grande Anse, no sudoeste da ilha, onde o fundo marinho é composto por areia de granulometria fina a grossa e com a presença de matações (LEGRAND *et al.*, 2012) repletos de algas e fanerógamas marinhas (FAILLER *et al.*, 2015). Os costões rochosos da região são dominados por esponjas, tanto em diversidade quanto em biomassa e os corais, hermatípicos ou ahermatípicos, também estruturam a paisagem (PÉREZ *et al.*, 2017). Cavernas submarinas também são habitats comuns na região, criando um ambiente diverso e assim possibilitando a presença de espécies com estratégias de vida diferentes, tais como hidróides e esponjas hipercalcificadas, as quais assentam em pequenas rochas ou nas paredes verticais da caverna (PÉREZ *et al.*, 2017).

O litoral setentrional da região Nordeste (NE) do Brasil (Figura 5D) compreende os estados do Maranhão, Piauí, Ceará e parte do Rio Grande do Norte, sendo denominado como a Costa Semi-Árida do Brasil (DINIZ e OLIVEIRA, 2016). O litoral maranhense possui clima e condições oceanográficas transitórias, pois a parte ocidental se assemelha à região amazônica com grande aporte de sedimentos provenientes de rios e a formação de baías, enquanto a porção oriental possui praias arenosas extensas e um clima semi-árido, mais similar ao restante do litoral norte da região Nordeste (MUEHE, 1998). Neste estado, a variação de maré pode passar de 8 m, enquanto a temperatura da água tem média de 29 °C. No estado do Ceará, as poças de maré, na maré baixa, permitem a formação de ambientes repletos de afloramentos rochosos de origem quartzítica, facilmente quebráveis, enriquecidas com óxidos de ferro e estratificadas, porém com idade geológica desconhecida (FREITAS *et al.*, 2009). Nestes ambientes, as poças de maré podem chegar a mais de 1 m de profundidade, repletas de reentrâncias, onde uma grande diversidade de esponjas se fixa. Outro ambiente muito diverso no estado é o Parque Estadual Marinho da Pedra da Risca do Meio (PEMPRM), criado em 1997. Este compreende uma das poucas Unidades de Conservação Marinhas do Estado do

Ceará, com uma área de 33,20 km² distante aproximadamente 10 milhas náuticas de Fortaleza, na direção 60° NE (SOARES *et al.*, 2011). O PEMPRM é repleto de afloramentos rochosos de arenito "riscas" com 1 a 3 m de altura, porém pouco se sabe sobre suas características geológicas. Nesta região, a profundidade varia de 17 a 30 m, com temperatura média de 27°C e visibilidade de 30 m. Atualmente, cerca de 115 peixes recifais são encontrados na região, e apesar da quase inexistência de estudos relacionados à diversidade bentônica da região, SALANI *et al.* (2006) descreveram a esponja *Sigmaxinella cearense* Salani, Lotufo & Hajdu, 2006 para a PEMPRM.

O Arquipélago de Fernando de Noronha (FN) (Figura 5E) está a uma distância de 360 km da cidade de Natal (RN). Porém, FN pertence ao estado de Pernambuco. O arquipélago é datado com idades geológicas de 1,7 a 12 MAA devido a formação de montes submarinos originados por um *hot spot* vulcânico (CORDANI, 1970). Sua área emersa é de aproximadamente 18 km² e representa a parte não erodida de um edifício vulcânico cuja base encontra-se a 4000 m de profundidade (CORDANI, 1970). O arquipélago se estende desde a plataforma continental brasileira até o Oceano Atlântico, na direção oeste-leste. Atualmente, a área de FN divide-se em duas Unidades de Conservação: Área de Proteção Ambiental (APA), área relativa às atividades antrópicas, e Parque Nacional Marinho (PARNAMAR), todo o restante do arquipélago, restrita a visitação. A fauna de poríferos da região foi previamente estudada por Moraes (2011). A heterogeneidade de habitats marinhos, tais como poças de maré, grutas, cavernas profundas, matacões, paredes verticais e manguezais permitem a presença de diversas espécies de organismos bentônicos e pelágicos (MORAES, 2011).

No litoral leste da região Nordeste do Brasil, o estado do Rio Grande do Norte possui recifes de corais inseridos na Área de Proteção Ambiental dos Recifes de corais (APARC-RN), se estendendo desde a região de Maracajaú até Pirangi do sul. As praias da região geralmente são calmas, com a formação de piscinas naturais na maré baixa. Geralmente, o mês de abril é chuvoso, enquanto o restante do ano é ensolarado. Com relação à espongoфаuna do litoral potiguar, pouco se sabe, sendo o maior estudo na região realizado na região *offshore* (MURICY *et al.*, 2008).

No estado da Bahia, a Baía de Todos os Santos (BTS) é considerada a segunda maior baía do Brasil (Figura 5F), com área de 1223 km² e profundidade média de 9,8 m. A principal força física atuante sobre a circulação oceânica é a maré, a qual não apresenta grande variação. A temperatura dentro da baía é maior do que na entrada devido à influência de águas oceânicas (CIRANO e LESSA, 2007; HATJE e DE ANDRADE, 2009). A entrada da baía possui um fundo de sedimento marinho predominantemente silicoso, enquanto a porção

interna é caracterizada por areia transgressiva carbonática nos arredores da Ilha dos Frades e uma variação transgressiva à regressiva de fundos lamosos na saída dos rios (LESSA *et al.*, 2000). A BTS tem sido registrada como uma das regiões com maior diversidade de poríferos no Brasil, sendo a maior parte das espécies descritas para a praia da Barra, os Quebramares e a região de Madre de Deus (ver HAJDU *et al.*, 2011).

Na região Sudeste do Brasil, as esponjas do estado do Rio de Janeiro (Figura 5G) foram amostradas em duas áreas distintas: i) costão rochoso da praia de Itaipú, Niterói e ii) Baía da Ilha Grande (BIG). A praia de Itaipú é frequentemente utilizada por banhistas e pescadores, sendo caracterizada como calma e recebendo influência da baía de Guanabara. A variação de maré é pequena, cerca de 1,4 m, com correntes fracas de até 10 cm/s. O fundo marinho é composto por rocha pré-cambriana com a presença areia datada para o quaternário (detalhes em SALVADOR e SILVA, 2002). O fundo marinho da enseada de Itaipú é modelado de acordo com a entrada e saída de água da Lagoa de Itaipú e, sobretudo, pela ação dos ventos e ondas provenientes de frentes frias e tempestades (MUEHE e SUCHAROV, 1981). A enseada de Itaipú é dominada por areia fina, mas nas proximidades do costão rochoso e das ilhas do Pai, Mãe e Menina o domínio de sedimento médio com grânulos que podem variar de 8-50% da área é notório (SALVADOR e SILVA, 2002). O costão rochoso é dominado pelo mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), fonte de renda para pescadores, e pela esponja *Hymeniacidon heliophila* (Wilson, 1911) a qual já foi alvo de estudos de ecologia química (RIBEIRO *et al.*, 2010, 2012). Por sua vez, a Baía da Ilha Grande (BIG) é uma região com grande diversidade marinha, sendo a porção continental uma área de alta exploração portuária e turística. A região da BIG possui um relevo bastante recortado, formando diversas enseadas, pontas, lajes e ilhotas (CREED *et al.*, 2007). A temperatura na região varia de 20 a 30 °C e a salinidade média é de 35 ppm, com baixa circulação de correntes de fundo e com deposição de sedimento siltoso médio (ver detalhes em CREED *et al.*, 2007). A espongoфаuna da região tem sido registrada desde a expedição do CALYPSO para águas profundas (BOURY-ESNAULT, 1973) e mais recentemente para águas rasas (MURICY e HAJDU, 2006; FORTUNATO, 2015).

2.2 Coleta e preservação dos espécimes

Os espécimes de Suberitida analisados neste estudo estão listados no Apêndice A. Grande parte dos espécimes aqui trabalhados foi coletada especificamente para este projeto,

porém exemplares disponíveis na coleção de Porifera do Museu Nacional (MNRJ), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJPOR) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEPOR), da Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) e da Station Marine d'Endoume (Marselha) também foram utilizados como material comparativo. Alguns espécimes foram coletados por colaboradores nas Pequenas Antilhas, no âmbito do projeto PACOTILLES (2015) e na França (Mônaco). As coletas foram realizadas por mergulho de apnéia, SCUBA ou na região entre-marés entre o mês de abril de 2015 e dezembro de 2017. Todas as amostras que ainda não haviam sido tombadas foram registradas na coleção MNRJ.

Um pedaço de cada indivíduo coletado foi preservado separadamente em etanol 95% e RNAlater, para análises morfológicas e genéticas, respectivamente, enquanto o restante do material foi congelado para análises químicas. Todos os espécimes trabalhados foram triados e identificados, no mínimo, para estudos de taxonomia morfológica. Nos capítulos a seguir, a metodologia específica para cada tipo de análise estará detalhada.

Todos as coletas e transporte de material biológico foram autorizadas por órgãos fiscais responsáveis. Autorizações foram concedidas no âmbito dos Projetos MARRIO e PACOTILLES (internacionais) e também nas expedições TAXPO e TAXPOMOL (nacionais). As novas famílias, gêneros e espécies aqui descritas não seguem o Artigo 9º da Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica e, por isso, não tem efeito para princípios de prioridade e homonímia.

3 A TAXONOMIA MORFOLÓGICA E AS SUAS LIMITAÇÕES NA ORDEM SUBERITIDA¹

3.1 Introdução

Os atuais representantes da ordem Suberitida têm sido realocados em diferentes grupos de Porifera desde o século XIX (BOWERBANK, 1864, 1866, 1874; GRAY, 1872; SCHMIDT, 1866, 1870, 1880; SOLLAS, 1885; RIDLEY e DENDY, 1886; TOPSENT, 1892, 1900) devido à ausência de padrão e/ou sobreposição nas características morfológicas internas e uma alta variação dos caracteres externos. Essas primeiras avaliações foram baseadas exclusivamente pelos tipos de espículas e esqueletos, apesar da diagnose de Halichondriidae, Suberitidinae e Aciculida ter sido baseada na ausência de caracteres (SCHMIDT, 1862; 1870; TOPSENT, 1892). No século XX, os grupos que hoje representam Suberitida continuaram sendo alvo de um grande vai-e-vem classificatório, baseado em caracteres espiculares e esqueléticos (TOPSENT, 1928; DE LAUBENFELS, 1936; DÍAZ *et al.*, 1991, 1993; KELLY-BORGES e BERGQUIST, 1994). Adicionalmente, informações reprodutivas (LÉVI, 1951, 1953, 1973; WAPSTRA e VAN SOEST, 1987), bioquímicas e histológicas (BERGQUIST, 1978; BERGQUIST *et al.*, 1991a; HARTMAN, 1982; VAN SOEST e BRAEKMAN, 1999) e cladística (VAN SOEST *et al.*, 1990) já foram empregadas para compreender a organização filogenética das espécies da ordem. Portanto, a aplicação de uma taxonomia integrativa em Porifera não é uma novidade, mas sim uma necessidade.

No início do século XXI, HOOPER e VAN SOEST (2002a) organizaram as esponjas na obra *Systema Porifera*, onde diversos autores contribuíram com seus conhecimentos em prol de uma classificação robusta no filo. Estes especialistas se basearam tanto em caracteres morfológicos quanto biogeográficos e bioquímicos para definir a classificação de Porifera. Mesmo considerando este grande esforço colaborativo mundial para a definição classificatória de Porifera, os avanços nas técnicas moleculares têm evidenciado diferenças discrepantes quanto às relações filogenéticas previamente descritas (REISWIG, 2006; BORCHIellini *et al.*, 2004; ERPENBECK e WÖRHEIDE, 2007; GAZAVE *et al.*, 2012; WÖRHEIDE *et al.*,

¹ Parte deste capítulo será publicado na revista Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom sob autoria de Humberto F. M. Fortunato, Thierry Pérez e Gisele Lôbo Hajdu com o título “Morphological description of six species of Suberitida (Porifera: Demospongiae) from the unexplored north-eastern coast of Brazil, with emphasis on two new species” (in press).

2012; KLAUTAU *et al.*, 2013; HAJDU *et al.*, 2013; MORROW e CÁRDENAS, 2015). As ferramentas genéticas tem sido essenciais na identificação de um sem número de espécies crípticas, as quais são geralmente identificadas de forma errônea o que dificulta a real interpretação sistemática, subestima a diversidade local e impede a identificação de espécies exóticas (BLANQUER e URIZ, 2007; DE PAULA *et al.*, 2012; KNAPP *et al.*, 2015; SHAFFER *et al.*, 2019). A utilização da genética pode impedir problemas desde o nível de organismo até o nível ecossistêmico ao se tratar de preservação de espécies e conservação ambiental. Tais diferenças são observadas também dentro da ordem Suberitida, a qual ainda não pode ser considerada monofilética (CHOMBARD e BOURY-ESNAULT, 1999; ERPENBECK *et al.*, 2005, 2012; REDMOND *et al.*, 2013; THACKER *et al.*, 2013; MORROW e CÁRDENAS, 2015).

Mesmo com tantas modificações na classificação de Suberitida, esta ainda é basicamente diagnosticada por ausência de caracteres. Os representantes da ordem não possuem microscleras, exceto tricotragmas, enquanto as megascleras podem ser óxeas, óxeas centrotílo, estilos, estrogilóxeas e/ou tilóstilos, distribuídos de forma exclusiva ou em combinação no nível de gênero. O esqueleto ectossomal pode apresentar uma reticulação desenvolvida, mas geralmente não é especializado, enquanto que o esqueleto coanossomal é normalmente confuso, radial ou halichondróide (com a possível presença de tratos ascendentes) e com a formação de buquês próximos à superfície (Figura 6, MORROW e CÁRDENAS, 2015).

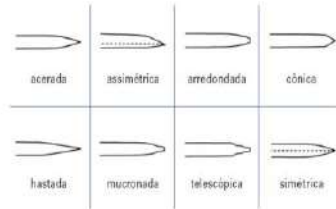
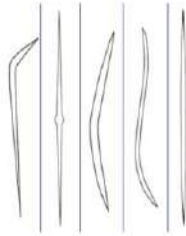
A ordem Suberitida é composta por três famílias: Stylocordylidae Topsent, 1892 com um gênero e oito espécies, Suberitidae Schmidt, 1870 com 10 gêneros e 194 espécies e Halichondriidae Gray, 1867 com 15 gêneros e 289 espécies (Tabela 2, VAN SOEST *et al.*, 2019). A maior parte das espécies da ordem é restrita aos mares temperados e alguns gêneros têm distribuição exclusiva em águas frias, sejam mares profundos ou regiões polares. Há ainda um grande número de espécies endêmicas da Oceania, enquanto que na região Tropical Ocidental Atlântica, apenas 10% das espécies de Suberitida são observadas. Apenas os gêneros analisados no presente estudo terão as suas definições informadas adiante.

Figura 6 - Glossário dos tipos espiculares e principais arquiteturas esqueléticas observadas na Ordem Suberitida.

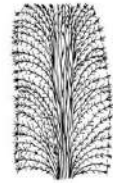
Estilo - Megasclera monoaxônica com uma extremidade pontiaguda e outra arredondada.



Óxea - Megasclera monoaxônica diactinal com as duas extremidades pontiagudas. O corpo e as extremidades das óxeas podem variar intra e/ou interespecificamente.



Axial - Organização do esqueleto em que alguns elementos estão condensados formando uma região central ou um eixo.



Radial - Organização do esqueleto em que os elementos estruturais divergem de uma região central em direção à superfície da esponja.



Confuso - Esqueleto sem organização, no qual as espículas se encontram dispersas e sem orientação.



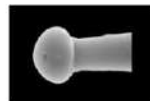
Estrongilóxea - Óxea fusiforme com uma extremidade pontiaguda e outra arredondada.



Tilóstilo - Megasclera monoactinal com um tilo basal na extremidade arredondada.



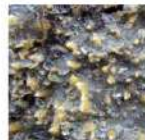
Tilo - Espessamento achatado ou semiesférico na base ou ao longo da espícula, uma ou mais vezes.



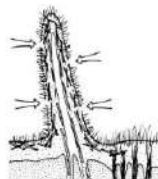
Tricodragma - Agrupamento de ráfides, microsclera muito finas, similares a um fio de cabelo.



Papilas - Estrutura com forma de mamilo que se projeta da base da esponja contendo ósculos, poros ou ambos.



Fistulas - Protuberância digitiforme delicada que se projeta da base da esponja.



Halichondróide - Esqueleto confuso, podendo apresentar tratos vagos. A região ectossomal geralmente é considerada especializada.



Buquê - Organização ectossomal em forma de escova, em que as espículas se encontram perpendiculares à superfície da esponja com as extremidades pontiagudas atravessando-a.



Paliçada - Espículas ectossomais em arranjo perpendicular atravessando a superfície da esponja.



Paratangencial - Esqueleto intermediário entre o tipo paliçada e tangencial.



Tangencial - Espículas ectossomais em arranjo paralelo a superfície da esponja.



Fonte: As ilustrações foram modificadas das publicações de Boury-Esnault e Rützler (1997), Díaz *et al.*, 1993 e Hajdu *et al.* (2011), e a foto da papila foi feita pelo autor, 2019.

Tabela 2 – Representação da ordem Suberitida em termos de classificação, apontando o número de espécies distribuídas na região Tropical Ocidental Atlântica (Golfo do México, Caribe e Brasil).

Família	Gênero	Espécies
Stylocordylidae Topsent, 1892	<i>Stylocordyla</i> Thomson, 1873*	2
Suberitidae Schmidt, 1870	Aaptos Gray, 1867*	7
	<i>Caulospongia</i> Kent, 1871*	
	<i>Homaxinella</i> Topsent, 1916*	
	<i>Plicatellopsis</i> Burton, 1932*	
	Protosuberites Swartschewsky, 1905*	1
	<i>Pseudospongosorites</i> McCormack & Kelly, 2002*	1
	<i>Pseudosuberites</i> Topsent, 1896*	
	<i>Rhizaxinella</i> Keller, 1880*	
	Suberites Nardo, 1833*	6
	Terpios Duchassaing & Michelotti, 1864*	3
Halichondriidae Gray, 1867	Amorphinopsis Carter, 1887*	1
	<i>Axinyssa</i> Lendenfeld, 1897*	2
	<i>Ciocalapata</i> de Laubenfels, 1936	1
	<i>Ciocalypta</i> Bowerbank, 1862*	1
	<i>Cryptax</i> de Laubenfels, 1954	
	<i>Epipolasis</i> de Laubenfels, 1936	2
	Halichondria Fleming, 1828*	13
	Hymeniacidon Bowerbank, 1858*	3
	<i>Johannesia</i> Gerasimova, Erpenbeck & Plotkin, 2008*	
	<i>Laminospongia</i> Pulitzer-Finali, 1983	
	<i>Sarcomella</i> Schmidt, 1868	
	<i>Spongosorites</i> Topsent, 1896*	3
	Topsentia Berg, 1899*	3
	<i>Uritaia</i> Burton, 1932	
	<i>Vosmaeria</i> Fristedt, 1885*	

Legenda: Negrito – gêneros com representantes avaliados morfológicamente neste estudo; * gêneros utilizados nas reconstruções filogenéticas.

Fonte: O autor, 2019.

Dentro do contexto exposto, a família Stylocordylidae é diagnosticada por van Soest (2002a), como esponjas com forma de crescimento em forma de haste globular ou oval e achatada no topo. O esqueleto é radial com arquitetura ectossomal tangencial e as espículas óxneas centrotílo, com estilos e estrôngilos modificados. A reprodução é vivípara sendo que as larvas são mantidas no corpo até se tornarem adultos jovens (BERGQUIST, 1972). A distribuição é cosmopolita, com predomínio de registros de águas frias (polares ou profundas) (VAN SOEST, 2002a). A família é representada exclusivamente pelo gênero *Stylocordyla* Thomson, 1873, sendo a espécie tipo *Stylocordyla borealis* (Lovén, 1868).

A diagnose da família Suberitidae é de esponjas com formas de crescimento variáveis, tais como globular, ramosa, hastada, maciça ou incrustante. O esqueleto pode ser estritamente radial, ter uma forte orientação axial ou ser confuso em espécies com crescimento maciço, enquanto não há um córtex reconhecível e o ectossoma geralmente é arranjado em buquês na superfície. Para espécies incrustantes, a orientação das espículas é paralela ou perpendicular

ao substrato. As espículas são tilóstilos com modificações nos tilos, em nível genérico ou específico, mas óxeas e ráfides em aglomerados (tricodragmas) também podem ser observadas na família (VAN SOEST, 2002b). As estratégias de reprodução assexuada, por meio de gêmulas, e sexuada com fertilização externa, estratégia ovípara (ERESKOVSKY, 2010). A distribuição é cosmopolita, com predomínio de registros de regiões temperadas (VAN SOEST, 2002b).

O gênero *Aaptos* é definido pela presença de esqueleto radial, formado por espículas do tipo estrôngilos em até três categorias, sendo a menor localizada na superfície da esponja em paliçada e ausência de microscleras (VAN SOEST, 2002b). A espécie tipo do gênero é *Aaptosa aptos* (Schmidt, 1864).

O gênero *Protosuberites* é diagnosticado por esponjas incrustantes com canais osculares visíveis, o esqueleto é formado por tilóstilos com o tilo voltado para a base e as pontas agudas para a superfície da esponja, sozinhos ou em grupos, geralmente paralelos e um esqueleto ectossomal consistindo de buquês de tilóstilos menores (VAN SOEST, 2002b). A espécie tipo do gênero é *Protosuberites prototipus* Swartchevsky, 1905.

O gênero *Suberites* é diagnosticado por esponjas maciças, compactas e com superfície aveludada. As espículas são do tipo tilóstilos em duas categorias de tamanho, sendo a maior delas distribuída de forma confusa no coanossoma e agrupado em direção à superfície de forma subradial, terminando em feixes plumosos (buquês) de tilóstilos de menor dimensão, no ectossoma. Microestrôngilos centrotílos espinados são raros, mas o único tipo de microsclera possível neste gênero (RÜTZLER e SMITH, 1993; VAN SOEST, 2002b). A espécie tipo do gênero é *Alcyonium domuncula* Olivi, 1792.

O gênero *Terpios* é definido por esponjas finamente incrustantes, com apenas uma categoria de tilóstilos, sendo o esqueleto representado por uma baixa densidade espicular e pouca especialização. A simbiose com cianobactérias é comum, gerando colorações brilhantes às espécies do gênero (RÜTZLER e SMITH, 1993; VAN SOEST, 2002b). A espécie tipo do gênero é *Terpios fugax* Duchassaing & Michelotti, 1864.

Por sua vez, os representantes da família Halichondriidae podem ter a forma de crescimento maciça, lobada, digitiforme, lobular, laminar ou incrustante, com a adição de papilas ou fístulas em alguns gêneros. O esqueleto ectossomal apresenta formação tangencial de espículas entrecruzadas, que é facilmente destacável devido a espaços subectossomais, ou um arranjo paratangencial ou em paliçada, quando o esqueleto ectossomal não é facilmente destacável. O esqueleto coanossomaltípico é o halichondróide, mas espículas soltas e aleatoriamente dispostas no corpo da esponja são muito comuns. Há pouca ou nenhuma

presença de espongina ligando os tratos espiculares. As espículas características da família são óxeas e estilos, mas subtilóstilos, estrongilóxeas, estrôngilos e tricodragmas podem ser observados, exclusivos ou em combinação (ERPENBECK e VAN SOEST, 2002). A família é representada por espécies com a estratégia ovípara e/ou vivípara (ERESKOVSKY, 2010). A distribuição é cosmopolita, com predomínio de espécies em ambientes costeiros das regiões temperada e tropical (ERPENBECK e VAN SOEST, 2002).

O gênero *Amorphinopsis* é definido por espécies com a forma de crescimento incrustante ou maciço com ramos irregulares saindo da base, uma combinação de estilos e óxeas como espículas, esqueleto ectossomal tangencial com espículas entrecruzadas em feixes e coanossoma confuso (ERPENBECK e VAN SOEST, 2002). A espécie tipo do gênero é *Amorphinopsis excavans* Carter, 1887. Com exceção de *Amorphinopsis atlantica* Carvalho, Hajdu, Mothes & van Soest, 2004 que é endêmica do litoral brasileiro, as outras 16 espécies são exclusivas do Oceano Índico.

O gênero *Halichondria* possui exclusivamente óxeas ou modificações (oxeotos e estilotos), em ampla variação de tamanho, esqueleto ectossomal tangencial, subectossoma com espaços, permitindo o fácil destaque do ectossoma e coanossoma do tipo halichondróide. Os ósculos estão frequentemente elevados em forma de cone (ERPENBECK e VAN SOEST, 2002). A espécie tipo do gênero é *Spongia panicea* Pallas, 1766.

O gênero *Hymeniacidon* é diagnosticado por esponjas com crescimento incrustante, maciço ou lobado com papilas irregulares e superfície rugosa. As espículas são exclusivamente estilos ou estilotos que não passam de 500 µm de comprimento. O ectossoma é geralmente paratangencial e não é facilmente destacável, enquanto o coanossoma varia de confuso a levemente plumoso (ERPENBECK e VAN SOEST, 2002). A espécie tipo do gênero é *Spongia perlevis* Montagu, 1818.

O gênero *Topsentia* é diagnosticado como Halichondriidaede com corpo maciço, compacto e pouca espongina, sem coloração vibrante. O esqueleto é confuso, sem grande especialização ectossomal e formado exclusivamente por óxeas de diferentes categorias de tamanho (ERPENBECK e VAN SOEST, 2002). A espécie tipo do gênero é *Anisoxya glabra* Topsent, 1898.

De acordo com as definições dos grupos acima mencionados é notória a sobreposição de caracteres nos gêneros e famílias. Além disso, poucas são as características diagnósticas que podem ser utilizadas em nível de gênero. Por estes motivos, a identificação de espécies da ordem Suberitida por meio de caracteres morfológicos ainda é complexa. Mesmo assim, um olhar mais detalhado quanto as terminações das espículas, a estrutura esquelética

subectossomale coanossomal e das características externas de cada gênero podem ser capazes de separar os grupos de Suberitida, uma vez que estes caracteres já foram informativos em outras ordens, como Poecilosclerida.

3.2 Objetivos

Objetivo geral:

- a) Identificar e descrever espécies de Suberitida a partir de caracteres morfológicos.

Objetivos específicos:

- a) Redescrever espécies de Suberitida já conhecidas para a região de estudo;
- b) Descrever novas espécies de Suberitida para o Atlântico Tropical Ocidental;
- c) Determinar caracteres diagnósticos para melhor delimitação de grupos de Suberitida, acima do nível de espécie.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Preparação morfológica

3.3.1.1 Dissociação espicular

A dissociação espicular foi realizada com adição de ácido nítrico e aquecimento para dissolver um pedaço de tecido de esponja com tamanho aproximado de um grão de arroz, seguindo a metodologia desenvolvida por Rützler (1978). Um pedaço da esponja foi triado para eliminação de epibiontes em lupa e acondicionado em uma lâmina. Algumas gotas de ácido nítrico (63%) foram pingadas sobre a amostra para digerir o tecido da esponja. Após a completa digestão do tecido, a lâmina foi lavada com água destilada para a limpeza da lâmina.

Por fim, algumas gotas de álcool foram pingadas sobre a lâmina, a qual foi colocada no fogo para combustão do álcool e obtenção exclusiva das espículas limpas. Nessa metodologia, as amostras foram dissolvidas pelo ácido e posteriormente duas lavagens com água destilada e álcool foram realizadas. Com este preparo, as lâminas ficaram significativamente mais limpas e puderam ser utilizadas também para estudos de microscopia eletrônica de varredura (MEV). O MEV utilizado para a visualização das espículas de forma detalhada está disponível no laboratório multidisciplinar - Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Instituto de Química (LABMEV) – da UERJ. O microscópio é do tipo USM – 6510 LV e a metalização foi realizada no equipamento DENTON VACUUM DESK V. A metalização foi realizada com carbono por 10 min e corrente de 15 mA, em alto vácuo. A aceleração de voltagem variou de 15-30 kV, a distância de trabalho foi feita em 17 mm e o diâmetro do feixe de elétron (em inglês, *spot size SS*) foi estabilizado em 20.

3.3.1.2 Protocolo de corte perpendicular e tangencial

Os cortes perpendiculares e tangenciais foram realizados para identificar o tipo de estrutura esquelética presente em cada animal. Duas metodologias foram realizadas para o corte perpendicular: I) a esponja ficou embebida por 30 min em Xilol para desidratar e depois foi armazenada em parafina. Após 24 h, cortes finos foram realizados, a fim de obter tanto o ectossoma quanto o coanossoma da esponja. Esses cortes foram embebidos novamente em Xilol para dissolver a parafina, por 12 h. Por fim, os cortes foram acondicionados em lâminas, as quais foram cobertas por Bálsamo do Canadá e lamínula para preservação Hajdu *et al.* (2011); II) em vez de utilizar parafina, os cortes das esponjas foram congelados por 48 h. Em seguida, cortes finos foram realizados no gelo e, conseqüentemente, na esponja para observação da arquitetura esquelética das esponjas. Estes cortes foram embebidos em Bálsamo do Canadá para preservação.

O corte tangencial, por sua vez, ilustra a organização espicular na parte mais externa do tecido da esponja e foi obtido com o destaque do ectossoma. Isto se faz observando a reticulaçoectossomal em lupa e com auxílio de uma lâmina e um bisturi. Para preservação das lâminas adicionou-se Bálsamo do Canadá e lamínula.

3.3.1.3 Micrometria das espículas

Em microscópio ótico, a forma, o tamanho e a organização das espículas no esqueleto foi observada e medida, utilizando o software ToupView. Sempre que possível, 100 espículas de cada tipo foram medidas para cada indivíduo apresentando o valor mínimo, média, desvio padrão e máximo, os quais serão evidenciados nas tabelas do Capítulo 1 na seguinte forma: (mínimo-média(desvio padrão)-máximo), primeiro para o comprimento das espículas e depois para a largura. Quando as 100 espículas não foram encontradas, ao menos 30 foram medidas, com exceção das espículas raras, as quais foram medidas todas as encontradas. Através de uma distribuição de frequência, por meio de histogramas, os dados foram agrupados em classes de ocorrência para definir o número de categorias de cada tipo de espícula. A regra de Sturges (dados paramétricos) e a densidade de Kernel (dados não-paramétricos) foram testadas e os números de classes obtidos por ambas foram similares, logo qualquer um dos testes pode ser aplicado para definir classes de tamanho espicular. Gráficos de dispersão comparando o comprimento e a largura das principais espículas das esponjas de cada gênero foram feitas para comparar as espécies, tanto as trabalhadas aqui quanto as espécies descritas pelo Atlântico não trabalhadas.

3.3.1.4 Identificação das espécies

Em primeiro lugar, a descrição morfológica externa das esponjas foi realizada, seguindo da descrição dos caracteres morfológicos observados por microscopia e, depois, a utilização de guias e chaves de identificação disponíveis na literatura (HOOPER e VAN SOEST, 2002a; MURICY *et al.*, 2008; HAJDU *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2011; ZEA *et al.*, 2014) e artigos de revisão de espécies para o OATO (DÍAZ *et al.*, 1991, 1993, RÜTZLER e SMITH, 1993, CARVALHO *et al.*, 2013).

3.4 Resultados

Um total de 174 indivíduos foi avaliado, os quais foram distribuídos em 32 UTOs (Unidade Taxonômica Operacional), sendo, pelo menos, cinco espécies tratadas como novas: *Halichondria* sp. nov., *Hymeniacidon* sp. nov., *Rhaphidostyla* sp. nov., *Suberites* sp. nov. e *Topsentia* sp. nov. (Tabela 3). O gênero *Rhaphidostyla* foi ressuscitado com a descrição desta nova espécie. Os gêneros mais representativos foram *Hymeniacidon* com 36 indivíduos e três UTOs e *Halichondria* com 34 indivíduos e oito UTOs.

As principais características das espécies são descritas e uma discussão é feita para cada uma delas. As espécies que não foram tratadas como espécies são tratadas como morfotipos, pois os caracteres diagnósticos para definí-las como espécie, utilizando exclusivamente a taxonomia alfa, não foram robustos.

Tabela 3 – UTOs identificados através de caracteres morfológicos e as suas distribuições.

UTOs	Nº inds	França Mediterrâneo	Golfo do México	Caribe Antilhas	Caribe Sul Continental	Brasil		
						N-NE	NE-L	SE-S
<i>Aaptos</i> sp. 1	5			X		X		
<i>Aaptos</i> sp. 2	4						X	
<i>Aaptos</i> sp. 3	1							X
<i>Amorphinopsis atlantica</i>	12				X		X	X
<i>Amorphinopsis</i> sp.	1				X			
<i>Halichondria cebimarensis</i>	1							X
<i>Halichondria marianae</i>	11				X	X	X	X
<i>Halichondria melanadocia</i>	9			X	X	X	X	
<i>Halichondria tenebrica</i>	1							X
<i>Halichondria</i> sp. nov.	1							X
<i>Halichondria</i> sp. 1	1				X			X
<i>Halichondria</i> sp. 2	5					X		
<i>Halichondria</i> sp. 3	3			X	X			X
<i>Halichondria</i> sp. 4	2							X
<i>Hymeniacidon caerulea</i>	11		X	X	X	X		
<i>Hymeniacidon heliophila</i>	22		X	X	X			X
<i>Hymeniacidon</i> sp. nov.	3					X		
<i>Rhaphidostyla</i> sp. nov.	6						X	X
<i>Suberites aurantiacus</i>	22		X	X	X	X	X	X
<i>Suberites</i> sp. nov.	1					X		
<i>Suberites</i> sp. 1	1					X		
<i>Suberites</i> sp. 2	1							X
<i>Suberites</i> sp. 3	1						X	
<i>Terpios belindae</i>	4				X	X	X	X
<i>Terpios fugax</i>	20		X	X	X	X	X	X
<i>Terpios gelatinosus</i>	2	X						
<i>Terpios manglaris</i>	2				X	X		X
<i>Topsentia</i> cf. <i>bahamensis</i>	4		X	X				
<i>Topsentia ophiraphidites</i>	4			X			X	
<i>Topsentia</i> sp. nov.	10					X	X	
cf. <i>Terpios</i>	1	X						
cf. <i>Topsentia</i>	1			X				

Legenda: N- Norte, NE- Nordeste, L- Leste, SE- Sudeste e S- Sul. Nº inds- número de indivíduos.
Fonte: O autor, 2019.

Reino Animalia Linnaeus, 1758

Filo Porifera Grant, 1836

Classe Demospongiae Sollas, 1885

Ordem Suberitida Chombard & Boury-Esnault, 1999

Família Suberitidae Schmidt, 1870

Gênero *Aptos* Gray, 1867

Espécie tipo. *Aptos aptos* (Schmidt, 1864) (tipo por designação original)

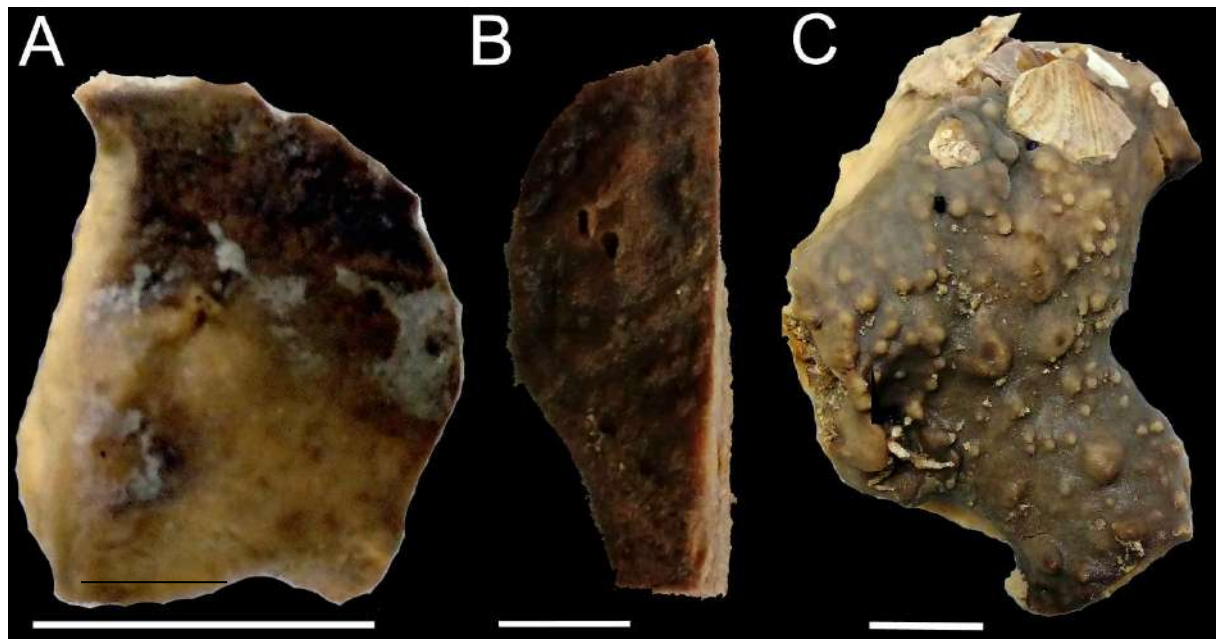
Aptos sp.1

(Figuras 7, 8, 9 e 10 e Tabela 4)

Material examinado. MNRJ: 7676, 7687, 7692a, 7692b e 21677.

Descrição. Os espécimes descritos se compunham de pequenos fragmentos. As esponjas apresentam forma irregular à maciça, superfície irregular variando de lisa a rugosa e consistência firme e pouco compressível. Os ósculos são arredondados com uma leve proeminência (1,5-2 mm). A cor varia de preta a marrom escuro ou cinza por fora e amarela clara a branca por dentro (Figura 7A).

Figura 7 - Fotografias após a coleta de espécimes de *Aptos* spp. na zona econômica exclusiva do Brasil.



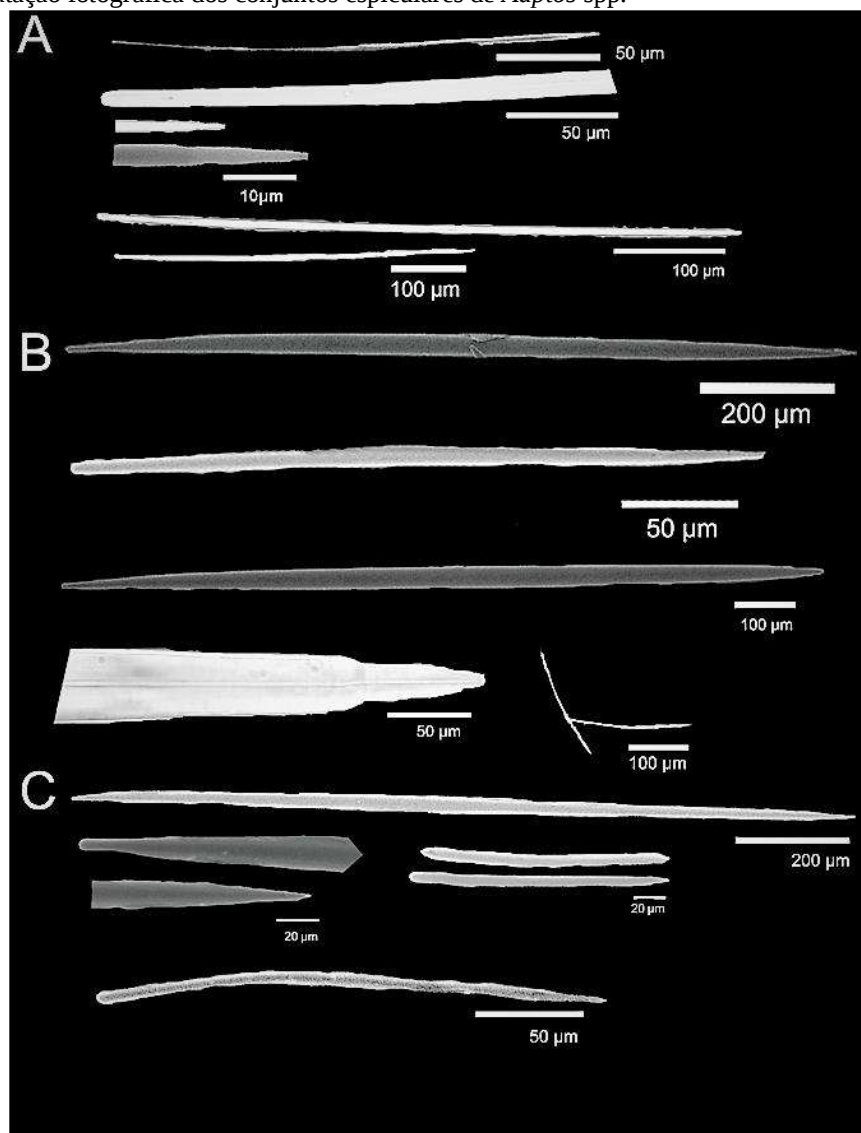
Legenda: A) *Aptos* sp.1 (MNRJ 7676) Atol das Rocas, B) *Aptos* sp. 2 (MNRJ 8343) Baía de Todos os Santos (Bahia) e C) *Aptos* sp. 3 (MNRJ 7500) Rio de Janeiro. As escalas representam 1 cm.

Fonte: O autor, 2019.

Espículas. As estrongilóxeas são encontradas em duas categorias de tamanho com as pontas telescópicas ou mucronadas e estilos em uma categoria com pontas aceradas (Figura 8A).

Esqueleto. O esqueleto é radial com feixes ascendentes compostos por estrongilóxeas de diferentes tamanhos, cujas terminações arredondadas estão presentes na região coanossomal e as terminações pontiagudas se encontram na ectossomal. Os feixes coanossomais terminam em buquês espessos. Espículas aleatoriamente distribuídas no coanossoma são comuns (Figura 9A).

Figura 8 - Retratação fotográfica dos conjuntos espiculares de *Aptos* spp.



Legenda: A) *Aptos* sp.1, B) *Aptos* sp. 2 e C) *Aptos* sp. 3.

Nota: As primeiras ilustrações se referem as espículas estrongilóxeas e posteriormente as suas terminações, geralmente telescópicas (A e B) ou agudas (C), em escala. As últimas espículas de cada morfotipos são os estilos (A e C) e óxeas (B e C), também em escala.

Fonte: O autor, 2019.

Ecologia. As esponjas são encontradas apenas em piscinas de maré.

Distribuição. Atlântico Tropical Ocidental – Caribe (Martinica) e Brasil (Atol das Rocas, Rio Grande do Norte).

Comentários. *Aaptos* sp. 1 possui semelhanças com duas espécies descritas para a Bacia Potiguar, Rio Grande do Norte: *Aaptos hajdui* Carvalho, Silva & Pinheiro, 2013 e *Aaptos potiguarensis* Carvalho, Silva & Pinheiro, 2013. Entretanto, *A. hajdui* tem forma de crescimento globular ou subesférica e cavidades na região ectossomal que não são observadas no morfotipo aqui presente, enquanto *A. potiguarensis* não possui estrongilóxeas com terminações telescópicas ou mucronadas como em *Aaptos* sp. 1. A presença de duas categorias de estrongilóxeas não foi evidenciada para estas espécies (CARVALHO *et al.*, 2013). *Aaptos* sp. 1 também se diferencia de todas as espécies registradas para o Caribe e o Golfo do México (ver abaixo Tabela 4) com base no tipo e tamanho das espículas. Até o momento, as únicas espécies descritas para o Atol das Rocas são *Aaptos glutinans* Moraes, 2011 e *Aaptos aaptos* (Schmidt, 1864), ambas por Moraes (2011). A primeira possui duas categorias de estilos e tem seu crescimento variando de incrustante a maciça se aglutinando em cascalho grosso, enquanto a segunda possui duas categorias de estrongilóxeas e duas de estilos. Porém, a descrição de *A. aaptos* por Moraes (2011) não evidencia as duas categorias de estilos, sugerindo que a espécie foi identificada de forma errada. Talvez, *Aaptos* sp. 1 e o espécime descrito por Moraes (2011) como *A. aaptos* sejam representantes da mesma espécie.

Aaptos sp. 2
(Figuras 7, 8, 9 e 10 e Tabela 4)

Material examinado. MNRJ: 8324, 8340, 8343 e 21663.

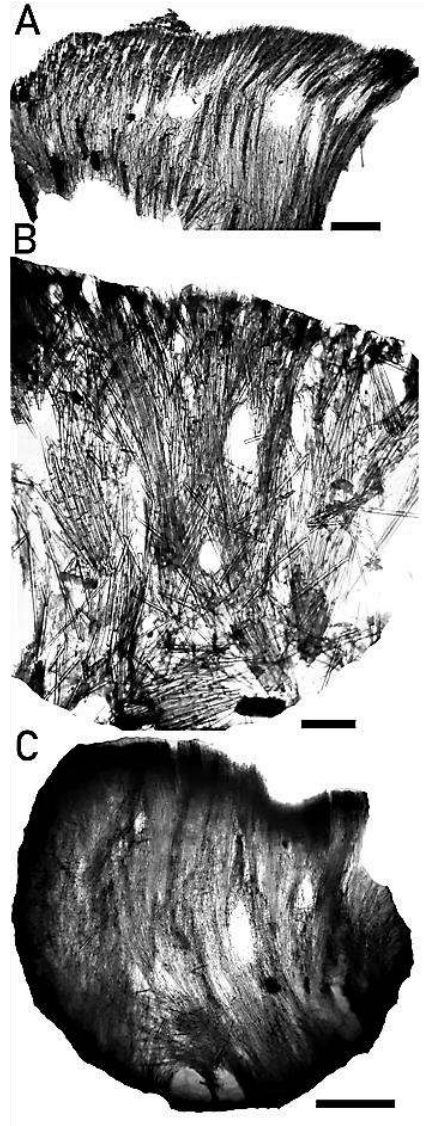
Descrição. As esponjas têm a forma variando de subesférica a maciça, com aproximadamente 15 cm de diâmetro. A consistência é firme e pouco compressível e a superfície é irregular e hispida. Os ósculos são visíveis, com média de 2 mm de diâmetro. A coloração externa varia de marrom a amarela, manchada, e creme por dentro. A esponja pode adquirir coloração marrom escuro após a fixação em etanol (Figura 7B).

Espículas. As estrongilóxeas podem ser encontradas em uma ou duas de tamanho e são as principais megascleras com uma ponta afunilada e outra variando de arredondada a aguda. Os estilos e óxeas (raras) complementam o esqueleto (Figura 8B).

Esqueleto. O esqueleto é radial com tratos ascendentes. O esqueleto coanossomal é denso e pode ser um pouco confuso. O arranjo ectossomal não é especializado e se confunde com as terminações dos densos feixes de megascleras coanossomais que alcançam a superfície em

forma de buquês. O esqueleto ectossomal é composto por estilos pequenos dispostos perpendicularmente à superfície, praticamente formando uma paliçada, enquanto que as óxeas podem estar tanto no ectossoma quanto no coanossoma (Figura 9B).

Figura 9 - Retratação fotográfica da arquitetura esquelética de *Aaptos* spp.



Legenda: A) *Aaptos* sp.1 (MNRJ 7687) Atol das Rocas, B) *Aaptos* sp. 2 (MNRJ 8343) Baía de Todos os Santos (Bahia) e C) *Aaptos* sp. 3 (MNRJ 7500) Rio de Janeiro. As escalas representam 200 μ m.

Fonte: O autor, 2019.

Ecologia. *Aaptos* sp. 2 são observadas no infralitoral consolidado da Baía de Todos os Santos e na porção oceânica, sobretudo em regiões de sedimento fino. Diferentes invertebrados bentônicos e algas são observadas sobre e dentro das esponjas.

Distribuição. Brasil (Bahia).

Comentários. Este morfotipo se diferencia das espécies já descritas e para *Aaptos* sp. 1 pela possível presença de óxea e uma terceira categoria de estrongilóxeas, ambas raras. Até o

momento *Aptos bergmanni* de Laubenfels, 1950 é a única espécie do gênero descrita para o litoral baiano (MENEGOLA e PEIXINHO, 2017). A descrição original de *A. bergmanni* aponta a presença exclusiva de estrongilóxeas maiores do que 950 µm, claramente diferenciando-a dos espécimes aqui analisados. Boury-Esnault (1973) descreveu *A. bergmanni* para o litoral de Pernambuco, a mais de 70 m de profundidade, exclusivamente com estilos fusiformes, com valores máximos de 760 µm. Por isso, a identificação desta espécie para o Brasil é confusa, provavelmente errônea e carece de revisão. Adicionalmente, é possível que o espécime descrito como *Aptos* sp. 2 corresponda a mesma espécie descrita por Hajdu *et al.* (2011) para a região da Baía de Todos os Santos como *Aptos* sp.

Aptos sp. 3

(Figuras 7, 8, 9 e 10 e Tabela 4)

Material examinado. MNRJ: 7500.

Descrição. A esponja possui forma maciça espessa, com aproximadamente 10 cm de diâmetro. A consistência é firme e pouco compressível e a superfície é lisa, mas com a presença de verrugas pequenas em toda a extensão apical da esponja. Os ósculos são visíveis, com cerca de 2 mm de diâmetro. O animal após a fixação apresenta coloração externa marrom na porção superior e amarela na base e creme no interior (Figura 7C).

Espículas. As estrongilóxeas estão divididas em duas categorias de tamanho e os estilos e as óxeas em uma categoria de pequena dimensão (Figura 8C). Na Figura 10, observa-se claramente que os tamanhos médios das estrongilóxeas deste espécime são muito superiores às categorias I e II dos demais.

Esqueleto. O esqueleto é radial com reticulação no coanossoma, apresentando tratos ascendentes. O arranjo ectossomal é formado por buquês estreitos e densos (Figura 9C).

Ecologia. Diversos organismos podem ser encontrados sobre a esponja, tais como moluscos e algas.

Distribuição. Brasil (Rio de Janeiro).

Comentários. Este morfotipo se diferencia dos demais aqui apresentados, pois as estrongilóxeas ultrapassam os 2000 µm com pontas agudas em vez de telescópicas e pela abundância de óxeas. Além disso, esta é o único morfotipo de *Aptos* encontrado abaixo do Nordeste do Brasil. Possivelmente, o espécime descrito como *Aptos* sp. 3 seja a mesma espécie descrita por *Aptos* sp. por Muricy e Hajdu (2006) para o Sudeste do Brasil.

Tabela 4 – Comparação espicular entre diferentes espécies de *Aaptos* spp.

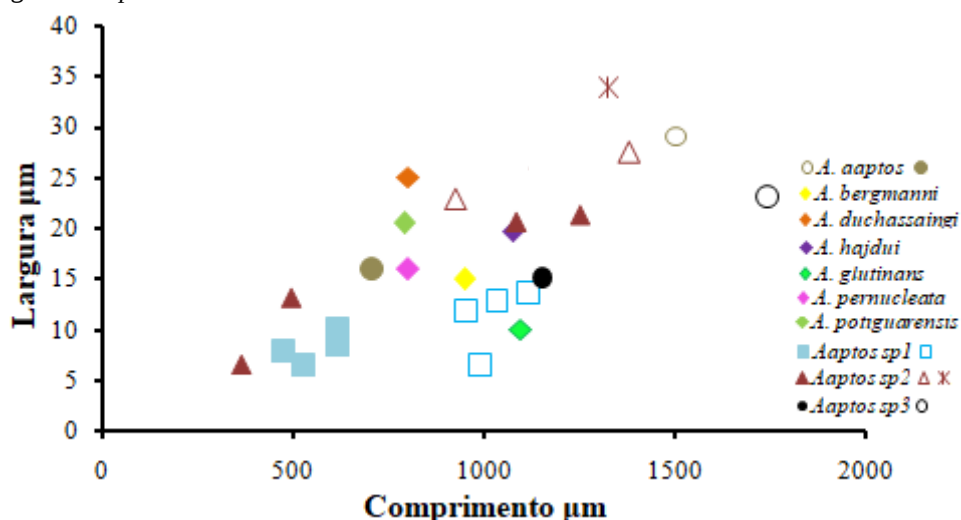
Voucher	Espécie	Localidade	Estrongilóxeas	Estilos e Óxeas (Ox)
	<i>A. aaptos</i>	Mar Mediterrâneo	I) 490–705–955 x 10–16–23 II) 1053– <u>1502</u> –1911 / 12– <u>29</u> –31	I) 270–318–354 x <1 II) 364– <u>388</u> –509 / 5– <u>7</u> –8
	<i>A. bergmanni</i>	Caribe e NE do Brasil	>950 / 15	150 / 2,5
	<i>A. duchassaingii</i>	Golfo do México, Caribe	>800 x 25	n.r.
	<i>A. pernucleata</i>	Golfo do México, Caribe	I) >800 II) 470–333–551 x 18–16–21	I) 187–231–270 x 2–8, 111 II) 312– <u>332</u> –416 x 13–16
MNRJ 7757	<i>A. glutinans</i>	Atol das Rocas, RN	925– <u>1096</u> –1375 / 7– <u>10</u> –14	I) 172– <u>238</u> –296 / 2– <u>4</u> –7 II) 240– <u>355</u> –570 / 3– <u>6</u> –12
UFPEPOR 62	<i>A. hajdui</i>	Bacia Potiguar, RN	649– <u>1076,7</u> –1475 / 10– <u>19,7</u> –30	252– <u>342,7</u> –524 / 2,4– <u>3,4</u> –7,2
UFPEPOR 45	<i>A. potiguarensis</i>	Bacia Potiguar, RN	301– <u>793,7</u> –1562 / 8– <u>20,6</u> –43	220– <u>350</u> –590 / 3,7– <u>7,4</u> –11
MNRJ 7676	<i>Aaptos</i> sp. 1	Atol das Rocas, RN	I) 263,5– <u>526,7</u> (24,5)–847,2 / 2,8– <u>6,5</u> (0,4)–12,7 II) 969,4– <u>988,6</u> (9,7)–1000,3 / 5,3– <u>6,6</u> (0,6)–7,3	104,9– <u>236,0</u> (64,9)–443,1 / 1,2– <u>3,1</u> (1,5)–8,5
MNRJ 7687	<i>Aaptos</i> sp. 1	Atol das Rocas, RN	I) 396,9– <u>619,0</u> (26,6)–820,2 / 3,6– <u>8,4</u> (0,6)–12,7 II) 843,3– <u>952,5</u> (14,5)–1120,5 / 7,5– <u>11,9</u> (0,5)–16,8	160,1– <u>236,8</u> (74,6)–457,9 / 1,4– <u>3,8</u> (2,0)–9,0
MNRJ 7692a	<i>Aaptos</i> sp. 1	Atol das Rocas, RN	I) 377,7– <u>616,9</u> (22,5)–789,0 / 4,8– <u>10,1</u> (0,6)–16,2 II) 802,8– <u>1116,9</u> (43,4)–1416,0 / 9,0– <u>13,6</u> (0,9)–24,7	187,8– <u>247,5</u> (49,3)–393,1 / 3,0– <u>4,5</u> (1,4)–9,6
MNRJ 7692b	<i>Aaptos</i> sp. 1	Atol das Rocas, RN	I) 295,7– <u>472,8</u> (19,9)–979,5 / 3,0– <u>7,9</u> (0,5)–15,0 II) 886,6– <u>1034,2</u> (31,6)–1168,4 / 8,5– <u>12,8</u> (1,8)–23,7	127,1– <u>232,6</u> (46,1)–349,7 / 1,2– <u>2,7</u> (1,6)–9,5
MNRJ 21677	<i>Aaptos</i> sp. 1	Martinica	I) 598,0– <u>664,8</u> (61,4)–772,9 / 8,1– <u>18,6</u> (4,8)–26,0 II) 985,8– <u>1190,5</u> (155,8)–1375,9 / 29,7– <u>34,0</u> (6,2)–47,7	91,0– <u>186,1</u> (61,1)–297,2 / 3,0– <u>7,1</u> (3,9)–15,1
MNRJ 8340	<i>Aaptos</i> sp. 2	BTS, BA	I) 229,4– <u>421,1</u> (287,8)–1162,4 / 4,0– <u>10,5</u> (10,3)–38,2 II) 1212,2– <u>1322,9</u> (92,8)–1526,7 / 18,9– <u>34,2</u> (7,4)–48,5	219,9– <u>311,6</u> (63,7)–538,9 / 3,4– <u>6,0</u> (1,2)–8,8
MNRJ 8343	<i>Aaptos</i> sp. 2	BTS, BA	I) 302,4– <u>495,9</u> (243,8)–1127,0 / 10,8– <u>13,2</u> (6,1)–22,0 II) 1149,8– <u>1382,7</u> (135,5)–1663,1 / 8,5– <u>27,6</u> (11,7)–48,1	172,6– <u>264,4</u> (62,1)–438,3 / 2,4– <u>4,8</u> (2,2)–11,6
MNRJ 21663	<i>Aaptos</i> sp. 2	BTS, BA	864,8– <u>1254,4</u> (276,3)–2195,0 / 9,0– <u>21,4</u> (8,5)–39,0	281,0– <u>555,8</u> (203,7)–856,4 / 6,0– <u>8,5</u> (2,9)–15
MNRJ 8324	<i>Aaptos</i> sp. 2	Ondina, BA	618,6– <u>1086,8</u> (246,1)–1579,8 / 7,5– <u>20,7</u> (8,6)–42,6	232,2– <u>286,0</u> (34,9)–297,8 / 6,0– <u>6,4</u> –(0,5)–7,0 Ox) 139,3– <u>171,6</u> (20,9)–178,7 / 3,6– <u>3,8</u> (0,3)–4,2
MNRJ 7500	<i>Aaptos</i> sp. 3	Ilhas Cagarras, RJ	I) 611,0– <u>1153,1</u> (201,0)–1557,2 / 7,6– <u>15,2</u> (3,8)–24,2 II) 1617,7– <u>1741,6</u> (197,2)–2192,7 / 18,1– <u>23,1</u> (6,0)–35,4	116,0– <u>209,4</u> (79,2)–452,3 / 2,0– <u>5,0</u> (2,4)–13,5 Ox) 140,0– <u>160,5</u> (35,0)–185,0 / 4,0– <u>6,0</u> (2,5)–10,0

Legenda: NE= Nordeste, RN= Rio Grande do Norte, BTS= Baía de Todos os Santos, BA= Bahia, RJ= Rio de Janeiro.

Nota: A micrometria é representada em mínimo–média(desvio padrão)–máximo (n= 50, exceto óxeas raras +/-10). As medidas são dadas em µm.

Fonte: O autor, 2019.

Figura 10 – Relação entre as médias do comprimento (μm) e da largura (μm) das estrongilóxeas observadas no gênero *Aptos*.



Legenda: Símbolo losango indica espécies com apenas uma categoria de estrongilóxeas. Espécies com duas ou três categorias de espículas são representadas por símbolos fechados (menor categoria) e abertos (maior categoria). No morfotipo *Aptos* sp. 2, a 3ª categoria de estrongilóxeas é identificada pelo *.

Fonte: O autor, 2019.

Gênero *Suberites* Nardo, 1833

Espécie tipo. *Suberites domuncula* (Olivi, 1792) (tipo por designação original)

Suberites aurantiacus (Duchassaing & Michelotti, 1864)

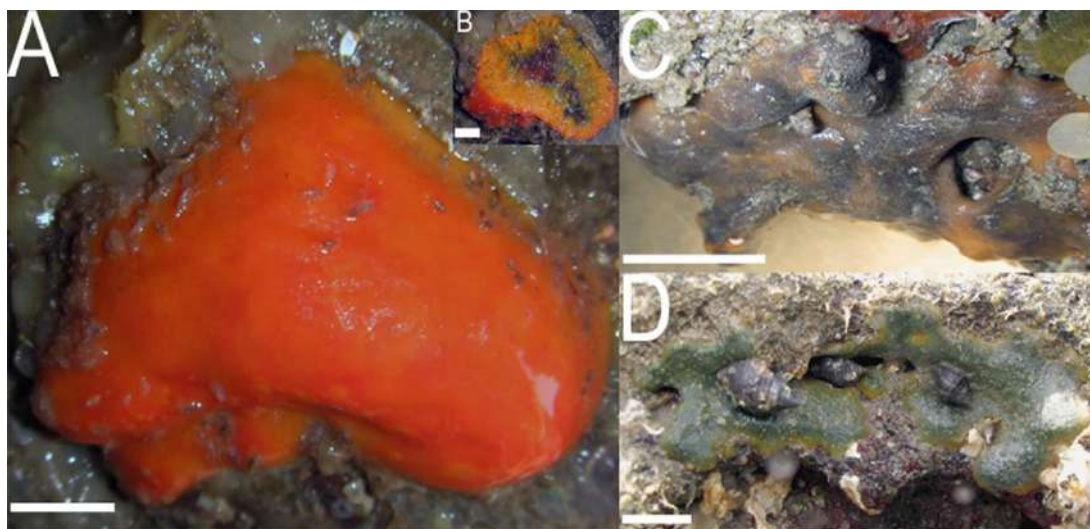
(Figuras 11, 12, 13 e 14 e Tabela 5)

Material examinado. MNRJ: 15061, 15701, 16247, 20788, 21340, 21397, 21402, 21405, 21430, 21584, 21585, 21601, 21665, 21668, 21758, 21808, 21818, 21819, 21820, 21821, 21822, 21917

Descrição. A esponja tem forma maciça com ramificações simples e cilíndricas que se unem na base formando lobos achatados. Os espécimes no Rio de Janeiro ultrapassavam 10 cm de comprimento, enquanto os do Nordeste não chegavam aos 10 cm. A consistência é firme, mas flexível, compressível. A superfície é irregular e levemente hispida, com ósculos dispersos e pequenos. A coloração externa é verde, mas espécimes alaranjados foram observados no Nordeste. Internamente a esponja é sempre amarela (Figura 11D).

Espículas. Os tilóstilos são encontrados em duas categorias (Figura 12C), possivelmente uma exclusiva do coanossoma e outra do ectossoma. O tilo é semiesférico e pode ter uma proeminência na porção superior e não é lobado. O corpo do tilóstilo é geralmente fino e reto (Figura 13; Tabela 5).

Figura 11 – Anatomia externa de *Suberites* spp. registradas em poças de maré no Maranhão.



Legenda: *Suberites* sp. 1 (A, B), *Suberites* sp. nov. (C) e *Suberites aurantiacus* (D). A escala é: 2 cm (A), 1 cm (B-D).

Fonte: O autor, 2019.

Esqueleto. O esqueleto ectossomal não possui especialização, exceto pela presença de buquês amplos. O esqueleto coanossomal possui feixes ascendentes que terminam em buquês de tilóstilos que atravessam a pinacoderme. Malhas grosseiras na porção basal do coanossoma podem ser visualizadas. De uma forma geral, o esqueleto coanossomal tende para confuso (Figura 14D).

Ecologia. Estas esponjas se estabelecem em substratos rochosos, pequenos fragmentos de rocha e conchas, e em manguezais na Baía de Todos os Santos e no Caribe (HAJDU *et al.*, 2011; PÉREZ *et al.*, 2017) e costões rasos no Sudeste e Sul do Brasil. A espécie costuma ser abundante na zona entremarés, sendo considerada bioindicadora de ambientes fortemente impactados por petróleo.

Distribuição. Atlântico Tropical e Subtropical Ocidental - Desde o Golfo do México até o estado de Santa Catarina, na região Sul do Brasil. A espécie também foi citada para o Pacífico Central (Havaí), onde é considerada uma espécie invasora, e Pacífico Tropical Oriental (Panamá).

Comentários. Apesar da variação na coloração externa da espécie ser descrita como comum, o padrão de cor verde externamente e amarelo na base foi encontrado desde o Golfo do México até o estado do Paraná, Brasil e apenas um indivíduo laranja foi observado no estado da Bahia. O padrão de ectossoma amplo também se manteve constante no gradiente latitudinal. A separação dos tilóstilos em duas categorias de tamanho, como sugerido por Rützler e Smith (1993), foi obtida visualmente e por análise da frequência das espículas. De uma forma geral, *S. aurantiacus* se assemelha ao tipo *S. domuncula*, quanto à presença de

tilóstilos em duas categorias de tamanho, um coanossoma ligeiramente confuso com tendência a radiação na porção periférica e finalizando em um ectossoma formando buquês. Por outro lado, as espécies se diferenciam muito quanto ao tamanho dos tilóstilos maiores e a forma das espículas, sempre curvas no tipo e retas na espécie *Tropical*. Reconstruções filogenéticas de *Suberitida*, frequentemente têm separado *Suberites domuncula* de *S. aurantiacus* (REDMOND *et al.*, 2013; THACKER *et al.*, 2013; IDAN *et al.*, 2018), sugerindo que a última faça parte de um gênero distinto.

Suberites sp. nov.

(Figuras 11, 12, 13 e 14 e Tabela 5)

Material examinado. MNRJ: 21343

Descrição. A esponja tem crescimento incrustante espesso, com a possível formação de lobos. A superfície é aveludada a levemente rugosa em algumas partes. A consistência é firme, cartilaginosa e pouco compressível. Externamente a cor é roxa na região apical e alaranjado na base e internamente amarela (Figura 11C).

Espículas. Os tilóstilos são divididos em duas categorias com a segunda ultrapassando os 1500 μm . O tilo é esférico e o corpo do tilóstilo pode ter um alargamento no meio (Figura 12B).

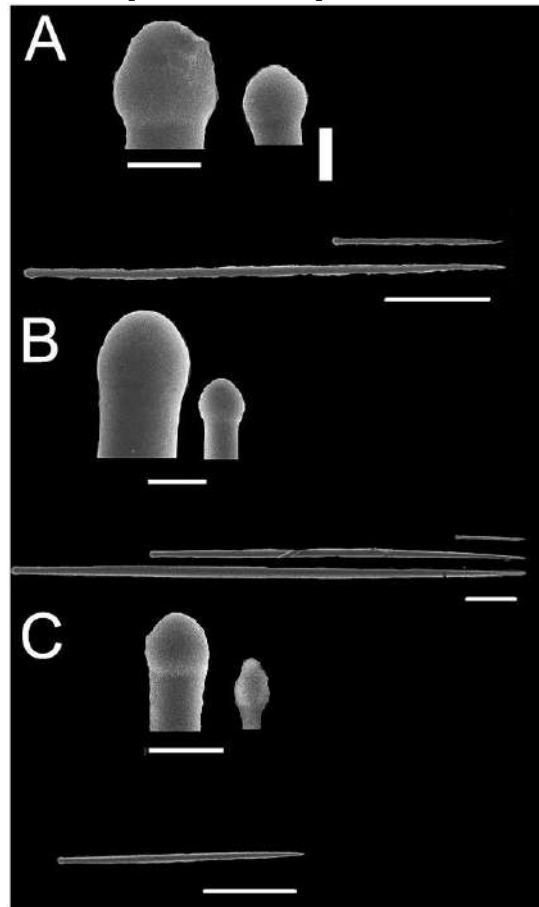
Esqueleto. O esqueleto coanossomal é um pouco confuso, com a presença de espículas agrupadas em feixes ou isoladas. Os feixes ectossomais terminam no ectossoma formando um buquê de espículas aberto e curto (Figura 14B e C).

Ecologia. O espécime foi encontrado na região intertidal, em uma poça de maré. O ambiente era semiescuro.

Distribuição. Brasil (Maranhão).

Comentários. Na poça de maré em que *Suberites* sp. nov. foi encontrada, também foram observados espécimes de *S. aurantiacus*, todos com a coloração verde. Apesar de já terem sido fotografados espécimes de *S. aurantiacus* roxos, principalmente em regiões de mangue, o tamanho das espículas de *Suberites* sp. nov. diferencia este morfotipo da espécie mencionada. Nenhuma outra espécie de *Suberites* do Atlântico ocidental e Caribe possuem espículas ultrapassando os 1500 μm . A combinação de espículas maiores do que 1500 μm , a cor roxa, os buquês curtos e abertos diferem este morfotipo de todos os seus congêneres.

Figura 12 – Tilóstilos de *Suberites* spp. registradas em poças de maré no Maranhão. As imagens ilustram as variações nos tilos e tilóstilos para cada morfotipo.



Legenda: *Suberites* sp. 1 (A), *Suberites* sp. nov. (B) e *Suberites aurantiacus* (C). A escala para os tilos é de 10 μm e para os tilóstilos 100 μm .

Fonte: O autor, 2019.

Suberites sp. 1

(Figuras 11, 12, 13 e 14 e Tabela 5)

Material examinado. MNRJ: 21500

Descrição. O espécime coletado possui forma maciça ovalada a subesférica. A superfície é lisa e pouco rugosa. A consistência é carnosa, pouco compressível. Externamente a cor é laranja brilhante e internamente amarela (Figura 11A e B).

Espículas. Os tilóstilos são encontrados em duas dimensões, sendo a segunda categoria menor do que 700 μm . O tilo é esférico e o corpo do tilóstilo pode ter um alargamento no meio (Figura 12A, 13, Tabela 5).

Tabela 5 – Tabela comparativa do tamanho e forma das espículas de diferentes espécies de *Suberites* spp.

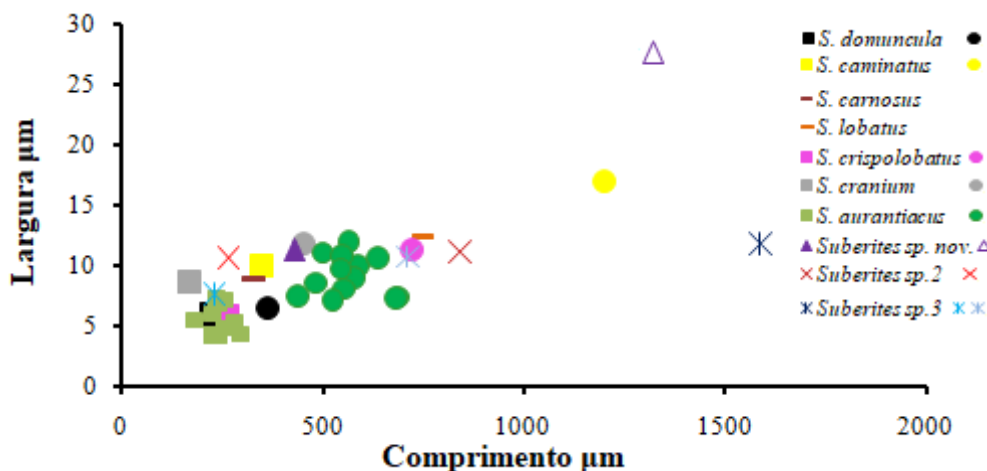
Espécies	Local	Tilóstilo I		Tilóstilo II		Tilo	
		Comprimento	Largura	Comprimento	Largura	Largura	Forma
<i>S. domuncula</i> ¹	Mediterrâneo e Atlântico	100-350	4-8	250-480	5-8	n.r.	Semiesférico
<i>Suberites</i> sp. nov. ²	Maranhão	208,5- <u>432,1</u> (149,9)-790,2	4,8- <u>11,4</u> (4,2)-21,6	860,7- <u>1322,3</u> (322,2)-1991,3	17,2- <u>27,7</u> (7,7)-45,8	5,3-33,9	Semiesférico
<i>S. aurantiacus</i> ²	Golfo do México	78,2- <u>225,3</u> (67,8)-377,9	1,2- <u>5,0</u> (1,5)-10,6	318,4- <u>455,6</u> (95,5)-730,7	3,7- <u>7,2</u> (2,2)-12,9	2,5-15,7	Semiesférico com proeminências lobulares
<i>S. aurantiacus</i> ²	Caribe	137,6- <u>261,4</u> (66,1)-387,4	2,4- <u>4,8</u> (1,7)-8,6	412,8- <u>548,2</u> (112,1)-824,0	6,0- <u>10,9</u> (3,3)-18,3	4,0-19,8	Semiesférico
<i>S. aurantiacus</i> ²	Maranhão	140,0- <u>210,5</u> (55,5)-386,5	2,4- <u>6,9</u> (1,7)-12,2	376,2- <u>551,1</u> (138,6)-830,9	4,9- <u>10,5</u> (3,5)-20,7	3,1-18,3	Semiesférico com proeminência no ápice
<i>S. aurantiacus</i> ²	Bahia	171- <u>283,1</u> -558	2- <u>4,2</u> -6	598- <u>842,2</u> -1278	6- <u>9,5</u> -12	3-14	Semiesférico com proeminência no ápice
<i>S. aurantiacus</i> ²	Rio de Janeiro	153- <u>355,82</u> -557	2- <u>5,1</u> -10	593- <u>658,5</u> -778	6- <u>9,9</u> -12	3-14	Semiesférico com proeminência no ápice
<i>S. aurantiacus</i> ³	Bahia	121-833	5-15	n.r.		5-15	Semiesférico com proeminência no ápice
<i>S. aurantiacus</i> ⁴	Rio de Janeiro	115-940	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	Semiesférico com proeminência no ápice
<i>S. aurantiacus</i> ⁵	Caribe	130-750	2-19	n.r.	n.r.	n.r.	Semiesférico com proeminência no ápice
<i>Suberites</i> sp.1 ²	Maranhão	151,9- <u>242,9</u> (66,0)-401,0	3,4- <u>6,9</u> (2,6)-13,8	437,2- <u>566,9</u> (76,4)-635,0	5,6- <u>12,1</u> (5,0)-20,7	3,0-11,8	Semiesférico ou com proeminência no ápice
<i>Suberites</i> sp.2 ²	Rio de Janeiro	222,0- <u>357,2</u> (121,5)-613,1	3,6- <u>7,1</u> (4,1)-16,7	911,6- <u>1013,4</u> (79,9)-1107,0	6,0- <u>10,4</u> (5,1)-18,0	5,4-10,8	Semiesférico
<i>Suberites</i> sp.3 ²	Abrolhos, Bahia	148,0- <u>265,0</u> (54,7)-356,9	4,3- <u>6,7</u> (1,5)-9,0	371,1- <u>418,2</u> (22,6)-452,7	4,6- <u>7,0</u> (1,3)-9,7	5,4-10,8	Cilíndrico, forma de cotonete /subtilóstilo
<i>S. carnosus</i> ⁶	Rio de Janeiro	230-430	6-12	n.r.	n.r.	n.r.	Cilíndrico, forma de cotonete
<i>S. caminatus</i> ⁶	Rio de Janeiro	240-600	3-12	n.r.	n.r.	n.r.	Semiesférico
<i>S. crispolobatus</i> ⁷	Guiana	186- <u>266</u> -396	3- <u>5,9</u> -10	456- <u>724</u> -858	9- <u>11,4</u> -14	n.r.	Semiesférico com proeminência
<i>S. distortus</i> ⁸	Caribe	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>S. heros</i> ⁸	Caribe	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>S. lobatus</i> ⁹	Caribe	200-300	3-4	650-850	10-15	n.r.	n.r.
<i>S. paradoxus</i> ¹⁰	EUA	220-300	7	280-350	8	n.r.	n.r.

Legenda: ¹van Soest, 2002b (holótipo); ²presente estudo; ³Hajdu *et al.*, 2011; ⁴Muricy e Hajdu, 2006; ⁵Pulitzer-Finali, 1981; ⁶Boury-Esnault, 1973; ⁷van Soest, 2017;

⁸Schmidt, 1870; ⁹Wilson, 1902; ¹⁰Wilson, 1931. N= 50; n.r.= não registrado.

Fonte: O autor, 2019

Figura 13 – Relação entre as médias do comprimento (μm) e da largura (μm) dos tilóstilos observadas no gênero *Suberites*.



Legenda: Símbolo quadrado indica tilóstilo menor e círculo tilóstilo maior para espécies com dois tamanhos de espículas. Os traços indicam espécies com apenas uma categoria de tilóstilos. X e * de diferentes cores são referentes às diferentes categorias de tamanho dos tilóstilos dos morfotipos do Chile ainda serem descritos. O triângulo se refere à *Suberites* sp. nov., aberto é a maior categoria e fechado a menor.

Fonte: O autor, 2019.

Esqueleto. O esqueleto ectossomal não tem especialização, exceto pela formação de plumas de tilóstilos longas e estreitas e quase sobrepostas. A porção mais basal do coanossoma tem uma leve reticulação que forma tratos ascendentes em direção ao ectossoma. Há uma clara diferenciação entre o coanossoma e o início da formação dos buquês ectossomais (Figura 14A).

Ecologia. A esponja foi encontrada no teto de uma rocha, voltada para o chão. Este ambiente é ligeiramente escuro e a esponja estava completamente fora d'água.

Distribuição. Brasil (Maranhão).

Comentários. *Suberites* sp. 1 se diferencia de todas as demais espécies de *Suberites* spp. do Atlântico ocidental no que se refere a combinação de características espiculares e anatomia externa, aproximando-se mais de *S. aurantiacus*. Por mais que haja uma grande variação de cores descrita para a segunda espécie, a coloração laranja brilhante não é observada em *S. aurantiacus* (ver MURICY e HAJDU, 2006). Além disso, *Suberites* sp. 1 possui um buquê longo e pequeno e espículas menores do que 700 μm , enquanto *S. aurantiacus* apresenta um buquê amplo e espículas ultrapassando os 800 μm . Em comparação com as outras espécies registradas para o Brasil, *Suberites* sp. 1 difere em diversas características tais como habitat, forma, e ausência de (sub)tilóstilos, como registrado em *S. carnosus* (BOURY-ESNAULT, 1973) e o tamanho das espículas em *S. caminatus* Ridley & Dendy, 1886. O morfotipo aqui descrito também se diferencia das espécies caribenhas, *Suberites lobatus* (Wilson, 1902), a qual tem crescimento incrustante, *S. crispolobatus* van Soest, 2017 que tem cor cinza

amarronzada, possui crescimento ramoso e vive em águas mesofóticas (50-85 m) e, por fim, *S. distortus* Schmidt, 1870 que tem uma forma arredondada. Infelizmente, a comparação com *Suberites heros* Schmidt, 1870 não é possível devido à falta de caracteres na descrição da espécie. *Suberites paradoxus* de Chesapeake Bay (EUA) difere do morfotipo descrito tanto na forma de crescimento laminar repleto de areia em seu interior quanto no tamanho das espículas, que só alcançam 350 µm. Com relação à espécie tipo *S. domuncula*, esta possui tilóstilos curvos com, no máximo, 500 µm (VAN SOEST, 2002b) muito diferentes dos apresentados pelas espécies de *Suberites* do Atlântico Sul. Diante das características mencionadas, este morfotipo pode se tratar de uma nova espécie, porém a similaridade com *S. aurantiacus* em diversas características impede a tomada de decisão utilizando exclusivamente dados morfológicos. A comparação destes resultados com os dados moleculares permitirá uma visão mais ampla sobre a variação desta espécie.

Suberites sp. 2

(Figura 15 e Tabela 5)

Material examinado. MNRJ: 3882

Descrição. Pequeno fragmento, apenas a dissociação foi realizada. O espécime parece ser maciço com a superfície microhispida e irregular. A consistência é pouco compressível. *In vivo*, laranja e fixado bege.

Espículas. Os tilóstilos são encontrados em duas categorias (Figura 15; Tabela 5), seguindo do tilo mais grosso para a ponta mais fina. O tilo é esférico, sem proeminências. Estas podem ser vistas apenas no pescoço do tilóstilo. As pontas podem ser aceradas ou não.

Esqueleto. O esqueleto ectossomalé formado por uma pluma de tilóstilos pequenos e o esqueleto coanossomal é confuso com tratos espiculares (quase radiais) em direção à pinacoderme.

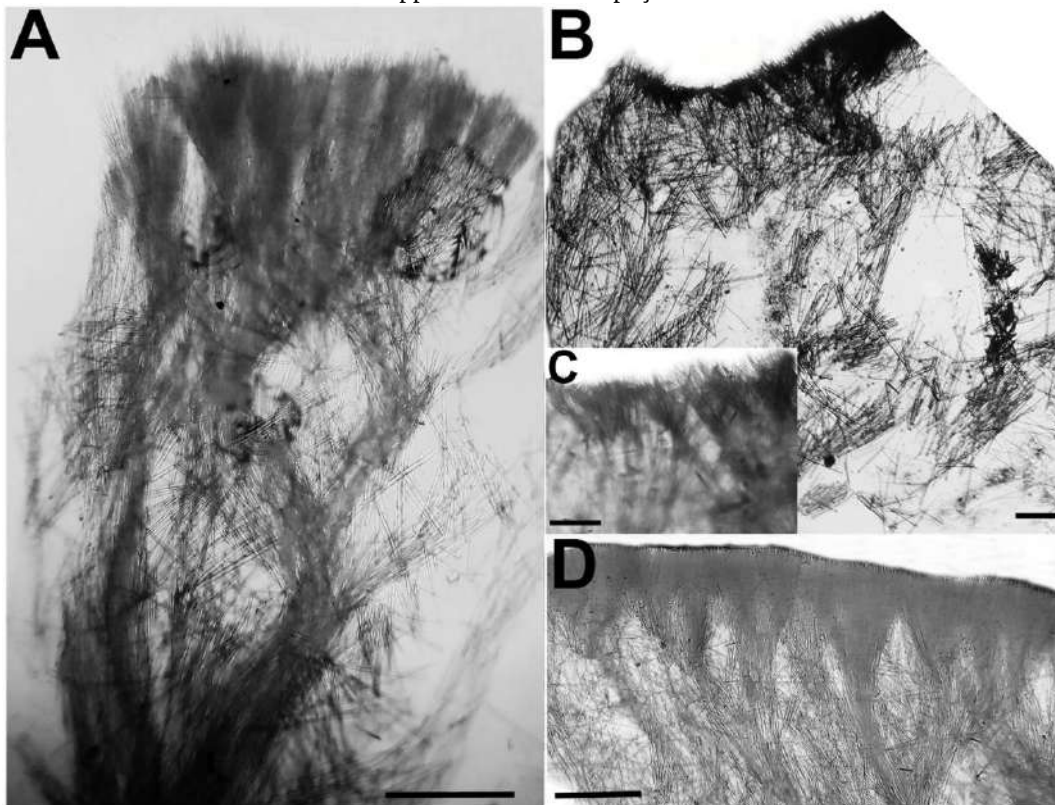
Ecologia. A esponja foi encontrada em costão rochoso, no infralitoral.

Distribuição. Brasil (Rio de Janeiro).

Comentários. *Suberites* sp. 2 se diferencia de todas as demais espécies de *Suberites* spp. do OATO quanto ao tamanho mínimo da menor da categoria de tilóstilos. Ao mesmo tempo, a cor *in vivo*, a distribuição, a forma e superfície e a forma e tamanho médio dos tilóstilos sugere que este espécime seja enquadrado como *Suberites aurantiacus*. A decisão de manter este espécime como um morfotipo é devido ao tamanho diminuto do fragmento, o qual não

permite aprofundar na diagnose do indivíduo. Caso haja sucesso nos estudos genéticos, a identificação do espécime poderá ser realizada por sistemática morfológica.

Figura 14 – Anatomia interna de *Suberites* spp. encontradas em poças de maré no Maranhão.



Legenda: As imagens ilustram as variações nos buquês e na forma do coanossoma de cada morfotipo. *Suberites* sp. 1 (A), *Suberites* sp. nov. (B-C) e *Suberites aurantiacus* (D). A escala é de 100 μm.

Fonte: O autor, 2019.

Suberites sp. 3

(Figura 15 eTabela 5)

Material examinado. MNRJ: 8641

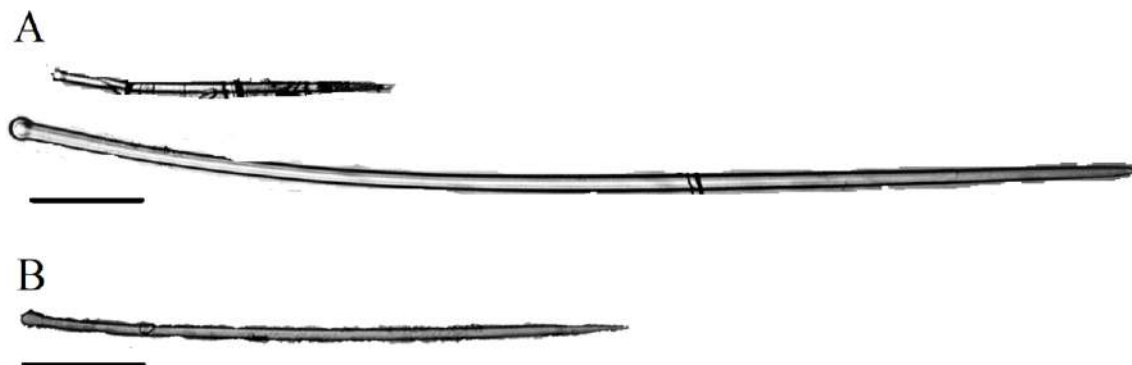
Descrição. Pequenos fragmentos quebradiços, apenas a dissociação foi realizada. O espécime coletado possui superfície ligeiramente irregular. Externamente a cor é laranja.

Espículas. Os tilóstilos são encontrados em duas dimensões, ligeiramente curvos, finos e com tendência a formar subtilóstilos. A ponta é acerada e o tilo é em forma de cotonete (Figura 15; Tabela 5). Uma micróxea foi observada na lâmina.

Esqueleto. Cortes anatômicos não foram possíveis de ser realizados devido ao tamanho diminuto dos fragmentos obtidos.

Ecologia. Os fragmentos de esponja estão diretamente fixados em pequenos fragmentos de rodolitos.

Figura 15 – Representação dos (sub)tilóstilos de *Suberites* sp. 2 e *Suberites* sp 3, em microscopia ótica.



Legenda: (A) *Suberites* sp. 2, (B) *Suberites* sp. 3. A escala é de 100 μ m.
Fonte: O autor, 2019.

Distribuição. Brasil (Abrolhos, Bahia).

Comentários. *Suberites* sp. 3 se diferencia de todas as demais espécies de *Suberites* spp. por manter a coloração amarelada após a fixação. A pequena variação de tamanho dos tilóstilos, espículas finas e o tilo cilíndrico em vez de esférico sugerem que este espécime seja mais próximo de *S. carnosus*. Contudo, *S. carnosus* descrita para o Brasil por Boury-Esnault (1973) é muito diferente do tipo da espécie, descrita para a Irlanda e apresentando uma forma de ameixa com ósculo central (JOHNSTON, 1842; ACKERS *et al.*, 1992). Sendo assim, *S. carnosus* do Brasil não deve ser tratada como é uma *Suberites*, assim como *Suberites* sp. 3. Estudos moleculares podem auxiliar na classificação deste morfotipo.

Gênero *Terpios* Duchassaing & Michelotti, 1864

Espécie tipo. *Terpios fugax* Duchassaing & Michelotti, 1864 (tipo por designação subsequente)

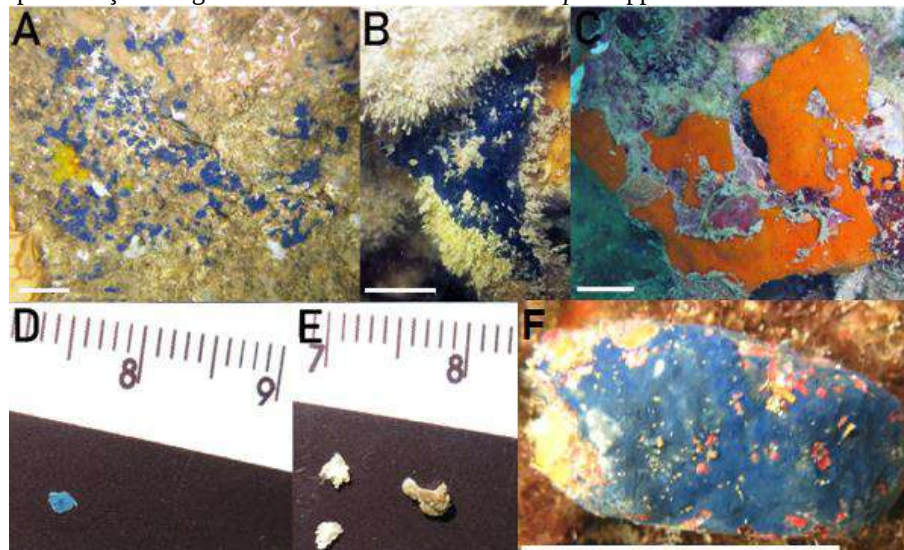
Terpios fugax Duchassaing & Michelotti, 1864
(Figuras 16, 17, 18 e 19 e Tabela 6 e 7)

Material examinado. MNRJ: 2536, 18940, 20065, 20078, 21630, 21631, 21632, 21633, 21638, 21639, 21679a, 21696, 21700, 21701, 21708, 21798, 21937, 21940, 21946, LGMAR 1469

Descrição. As esponjas são finamente incrustantes, com dimensões frequentemente inferiores a 25 cm², sem a presença de subcanais (Figura 16A, B e F). A superfície é microhispida, levemente áspera ao toque. A consistência é macia. Os ósculos são pequenos (< 1 mm), mas visíveis a olho nu. A cor em vida e após a fixação em etanol é azul-cobalto.

Espículas. Os tilóstilos são as únicas espículas encontradas. O tilo é arredondado e multilobado (Figura 17A; Tabela 6).

Figura 16 – Representação fotográfica da anatomia externa de *Terpios* spp.



Legenda: *Terpios fugax* (A, B e F), *Terpios belindae* (C), *Terpios gelatinosus* (D) e cf. *Terpios* (E). A escala é de 1 cm em cada imagem.

Fonte: O autor, 2019.

Esqueleto. O esqueleto tem baixa densidade espicular. O ectossoma não é especializado. O coanossoma possui vagos feixes espiculares, os quais protrudam a pinacoderme da esponja. A maior parte das megascleras se encontra dispersa no coanossoma (Figura 18A).

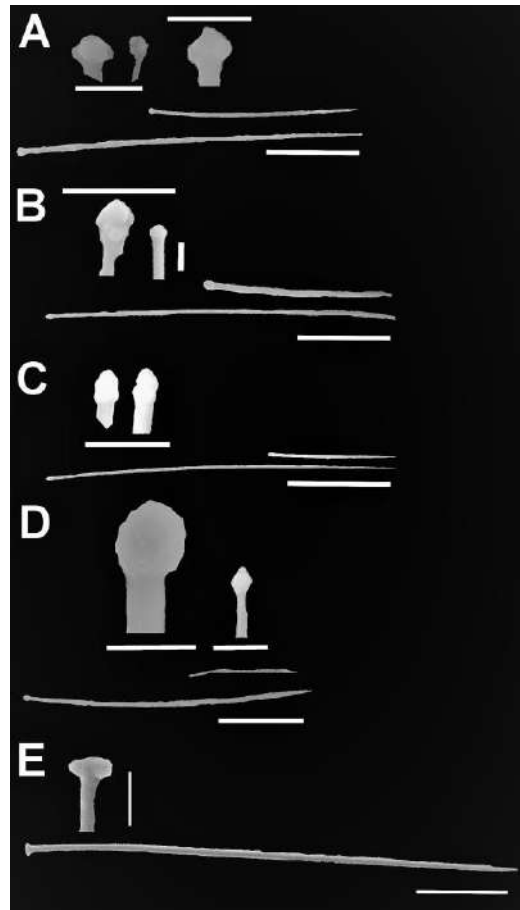
Ecologia. A espécie é relativamente comum no entremarés e infralitoral consolidado de toda a costa do Brasil com preferência por ambientes abrigados da iluminação intensa, mas facilmente encontrada em paredes verticais. Na Martinica, por sua vez, a espécie é observada mais facilmente na entrada e dentro de cavernas ou fendas.

Distribuição. Atlântico Tropical e Subtropical Ocidental - Desde o Golfo do México até a região Sul do Brasil. Provavelmente, todos os registros fora do Oceano Atlântico são errôneos.

Comentários. *Terpios fugax* é uma espécie que se difere das demais distribuídas no Atlântico Tropical Ocidental pela presença de tilóstilos pequenos (<500 µm), tilos multilobados levemente achatados (Tabela 7) e coloração azul cobalto que se mantém após fixação. No Atlântico, a espécie mais parecida com *T. fugax* é *T. manglaris*, cujo tilo é achatado, em forma de cabeça de prego e quadrilobado Rützler e Smith (1993), bem diferente de *fugax*. Outras espécies incrustantes, azuis contendo tilóstilos já foram descritas como *T. fugax* para todo o mundo. Porém, diante das observações e modificações propostas aqui, todos os registros de *T. fugax* fora do OATO também devem ser revistos, pois, provavelmente, são

identificações errôneas. Um exemplo disto é a descrição de *T. fugax* do Oceano Pacífico Centro-Occidental que possui tilóstilo com quatro ou cinco lobos muito proeminentes (DE LAUBENFELS, 1954), diferindo da descrição do tipo e que possivelmente se trata de outra espécie.

Figura 17 – Tilóstilos de *Terpios* spp. do Brasil e da Martinica, *Terpios gelatinosus* e cf. *Terpios* (Mônaco), com detalhe para os tilos de cada indivíduo.



Legenda: *Terpios fugax* do Atlântico Tropical Ocidental (A), *Terpios gelatinosus* de Mônaco (B e C), cf. *Terpios* de Mônaco (D) e *Terpios belindae* do Panamá e da Bahia (E). A escala dos tilos é de 10µm e dos tilóstilos 100 µm.

Fonte: O autor, 2019.

Terpios gelatinosus (Bowerbank, 1866)

(Figuras 16, 17, 18 e 19 e Tabela 6 e 7)

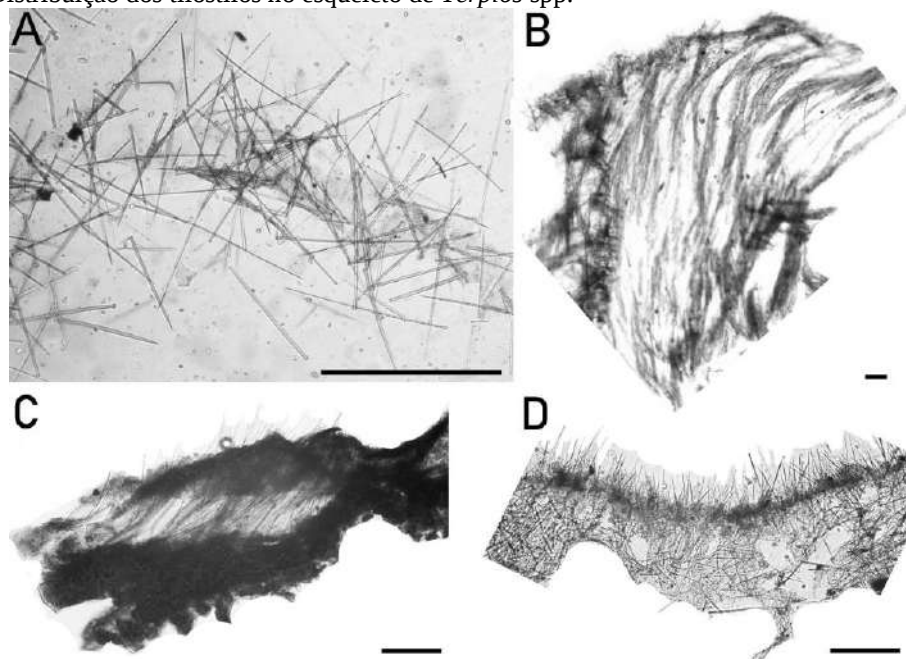
Material examinado. MNRJ: 21814, 21815

Descrição. As esponjas são finamente incrustantes e de pequenas dimensões. A superfície é lisa e microhispida. Os ósculos são pequenos e não visíveis a olho nu. A consistência é macia (Figura 16D). A cor em vida e após a fixação em etanol é azul-cobalto, mastambém pode ser amarelo-alaranjada, segundo Ackers *et al.*(1992).

Espículas. Os tilóstilos podem ter duas categorias de tamanho com tilos cilíndricos e multilobados (Figura 17B e C; Tabela 6 e 7). As espículas são retas ou levemente curvas.

Esqueleto. O esqueleto tem baixa densidade espicular. O esqueleto ectossomal é tangencial. O esqueleto coanossomalé confuso e possui vagos feixes espiculares que se cruzam em todas as direções (Figura18C).

Figura 18 – Distribuição dos tilóstilos no esqueleto de *Terpios* spp.



Legenda: *Terpios fugax* (A), *Terpios belindae* (B), *Terpios gelatinosus* (C) e cf. *Terpios* (D). A escala é de 200 μ m.

Fonte: O autor, 2019.

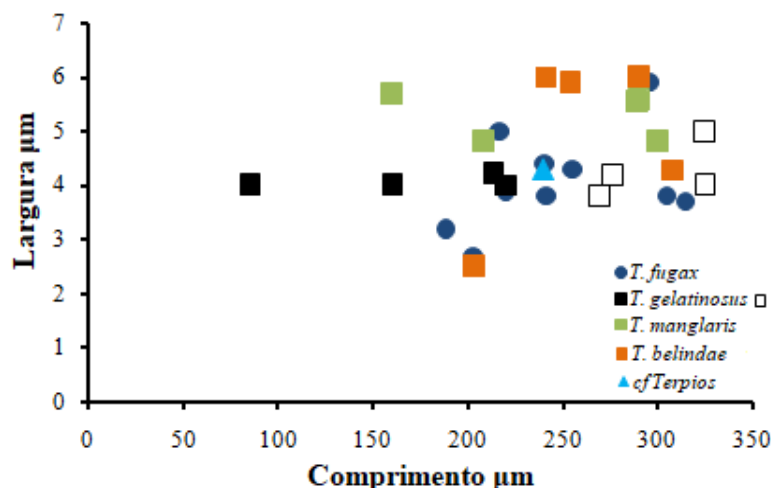
Ecologia. Infralitoral, na parte inferior de rochas e outros organismos. Em Mônaco, a espécie só é observada na entrada de cavernas ou fendas. Nestas regiões, os indivíduos são encontrados apenas no infralitoral (10-50 m).

Distribuição. Nordeste Atlântico e Mar Mediterrâneo.

Comentários. *Terpios gelatinosus* era considerada um sinônimo júnior de *T. fugax*, porém diferenças quanto à largura do tilóstilo e forma do tilo e a distribuição geográfica separam as espécies em duas (ACKERS *et al.*, 1992; VOULTSIADOU-KOUKOURA e VAN SOEST, 1993). Entretanto, uma publicação formal com a descrição da espécie nunca foi realizada. Talvez, esta definição ainda não tenha sido feita porque *T. gelatinosus* também pode ser amarelo-alaranjado e, por isso, é difícil distinguir esta espécie de *Protosuberites epiphytum* (Lamarck, 1815) ou *Pseudosuberites sulfureus* (Bowerbank, 1866). Em adição aos caracteres morfológicos, uma comparação será realizada no capítulo de filogenia desta tese. O posicionamento filogenético de espécimes de *T. gelatinosus* do Mediterrâneo (IDAN *et al.*,

2018) será comparado com os *T. fugax* trabalhados nesta tese. Sendo assim, *T. fugax* é considerada exclusiva do Atlântico Ocidental, enquanto *T. gelatinosus* é uma espécie do Mar Mediterrâneo, Mar Celta e Nordeste do Atlântico.

Figura 19 – Relação entre as médias do comprimento (μm) e da largura (μm) dos tilóstilos observadas no gênero *Terpios*.



Legenda: Símbolo círculo indica a distribuição de tamanho dos tilóstilos na espécie tipo *T. fugax*. Os quadrados se referem às demais espécies trabalhadas e que podem apresentar duas categorias de tilóstilos. O quadrado fechado indica a menor categoria e o quadrado aberto a maior. Cada cor condiz com uma espécie. O triângulo azul destaca um espécime similar a *T. fugax*, mas que não se insere neste gênero, apesar de apresentar média de tamanho semelhante.

Fonte: O autor, 2019.

cf. *Terpios*

(Figuras 16, 17, 18 e 19 e Tabela 6 e 7)

Material examinado. MNRJ: 21813

Descrição. O espécime é incrustante e a consistência é macia. A superfície é irregular e microhispida e os ósculos não são visíveis. A cor em vida é azul e após a fixação é bege esbranquiçada (Figura 16E).

Espículas. Os tilóstilos são as únicas espículas encontradas. O tilo é globoso com um lobo no ápice (Figura 17A; Tabela 6).

Esqueleto. O esqueleto tem baixa densidade espicular, possui vagos feixes espiculares e os tilóstilos protrudam a pinacoderme da esponja (Figura18D).

Ecologia. Entrada de cavernas ou fendas, no infralitoral (10-50 m).

Distribuição. Mar Mediterrâneo.

Comentários. Este espécime é muito parecido com *Terpios gelatinosus*, porém a forma do tilo arredondado o assemelha ao gênero *Protosuberites*. Outra característica que diferencia

este espécime do gênero *Terpios* é a perda de cor após a fixação. Análises filogenéticas podem ajudar na classificação do espécime.

Terpios belindae Rützler & Smith, 1993

(Figuras 16, 17, 18 e 19 e Tabela 6 e 7)

Material examinado. MNRJ: 4057, 6726, 8370, 15781, 15821

Descrição. A esponja tem crescimento incrustante com poros visíveis e ósculos levemente levantados, quase formando fístulas. A consistência é macia e a superfície é microhispida. A cor é laranja vivo, mas se desfaz após a fixação (Figura 16C).

Espículas. Os tilóstilos são encontrados em apenas uma categoria com tilo muito achatado e lobado (Figura 17E).

Esqueleto. O ectossoma não tem especialização, exceto a formação de alguns buquês ectossomais. O coanossoma possui baixa densidade espicular, com espículas geralmente sem organização (Figura 18B).

Ecologia. A esponja se fixa em substrato duro, seja rocha ou corais.

Distribuição. Atlântico Tropical e Subtropical Ocidental - Desde o Caribe (Panamá) até o Sudeste do Brasil (Rio de Janeiro).

Comentários. *Terpios belindae* é laranja e com possível formação de fístulas e isso a diferencia de todas as demais espécies do gênero distribuídas pelo Oceano Atlântico Tropical Ocidental. Além disso, esta é a única espécie do OATO que não tem uma razão constante entre o tamanho médio do comprimento e da largura dos tilóstilos (ver Figura 19). Neste trabalho, o limite austral de distribuição da espécie é ampliada até o Rio de Janeiro. Anteriormente, no Brasil, a espécie era restrita ao estado do Amapá (MOTHES *et al.*, 2006).

Terpios manglaris Rützler & Smith, 1993

(Figura 19 e Tabela 6 e 7)

Material examinado. MNRJ: 308, 1094

Descrição. A esponja tem crescimento incrustante com subcanais que terminam em ósculos. A cor é azul cobalto *in vivo*.

Espículas. Os tilóstilos têm uma pequena variação de tamanho que não permite dividir em duas categorias. O tilo geralmente é achatado e quadrilobado.

Tabela 6 – Comparação do tamanho dos tilóstilos e cor de diferentes espécies do gênero *Terpios* encontradas no Oceano Atlântico, Mar do Caribe e Mar Mediterrâneo.

Espécies	Locais	Tilóstilo		Tilo (cabeça)		Cor
		Comprimento	Largura	Comprimento	Largura	
<i>T. fugax</i> ^{*1}	Ilhas Virgens	315	3,7	5,3	3,3	Esverdeada
<i>T. fugax</i> ²	Caribe	150-460	2,5-5	4-6	5-8	Azul ou verde brilhante
<i>T. fugax</i> ^{**}	Martinica	105- <u>257,9</u> (57,1)-360	3- <u>6,3</u> (2,1)-13	5- <u>6,5</u> (2)-12	5- <u>8,7</u> (2,2)-12	Azul brilhante
<i>T. fugax</i> ^{**}	Bahia	116,2- <u>246,0</u> (75,7)-409,3	2,7- <u>4,5</u> (0,7)-6	3,5- <u>5,7</u> (1,8)-13,2	3,6- <u>6,7</u> (1,5)-9,1	Azul brilhante
<i>T. fugax</i> ^{**}	Ceará	148,6- <u>268,7</u> (42,9)-327,4	3,0- <u>4,8</u> (0,8)-6,2	3,8-5,6(1,2)-8,7	4,8- <u>6,8</u> (0,8)-8,3	Azul brilhante
<i>T. cf. fugax</i> ^{**}	Mônaco	80- <u>257,9</u> (91,5)-440	2- <u>4,0</u> (0,9)-8	3- <u>5,1</u> (1,4)-13	3- <u>5,4</u> (1,0)-10	Azul escuro brilhante
<i>T. cf. fugax</i> ³	Grécia	250-400	4-6			n.r.
<i>T. fugax</i> ^{**}	Rio de Janeiro	94,4- <u>189,0</u> (60,3)-320,5	1,7- <u>3,2</u> (1,4)-7,2		2,4- <u>5,4</u> (1,9)-9,7	Azul escuro brilhante
<i>T. gelatinosus</i> ^{*4}	Irlanda	Possivelmente duas categorias: grande variação de tamanho				Esverdeada, mas perdeu a cor no álcool
<i>T. cf. gelatinosus</i> ^{**}	Mônaco	100- <u>239,8</u> (83,1)-392	2- <u>4,3</u> (1,1)-7	4- <u>5,2</u> (0,5)-6	4- <u>5,5</u> (1,0)-8	Azul, mas perdeu a cor no álcool
<i>T. manglaris</i> ²	Belize	140-460	2,5-7	2,5-7	4,5-10	Azul cobalto
<i>T. manglaris</i> ⁵	Santa Catarina	104,5- <u>276,3</u> -475,0	4,6- <u>6,4</u> -12,3	4,6- <u>7,0</u> -11,5	5,8- <u>9,8</u> -12,9	Azul
<i>T. manglaris</i> ^{**}	Bahia	123,5- <u>203,2</u> (38,8)-288,5	1,7- <u>2,5</u> (0,9)-4,9		3,8- <u>6,0</u> (1,3)-9,2	Azul
<i>T. belindae</i> ²	Caribe	140-430	3-9	3-8	5-12,5	Vermelha a marrom
<i>T. belindae</i> ^{**}	Abrolhos	74,6-358,7	2,4-6,8		5,0-12,7	Laranja
<i>T. belindae</i> ^{**}	Rio de Janeiro	79,4- <u>241,2</u> (71,4)-367,7	1,2- <u>6,0</u> (1,8)-13,7		5,4-8,4(1,9)-13,7	Laranja

Legenda: *Holótipo, **presente estudo, referências: ¹Duchassaing e Michelotti, 1864; ²Rützler e Smith (1993); ³Voultsiadou-Koukoura e van Soest, 1993; ⁴Bowerbank, 1866;

⁵Lerner *et al.* (2005). A medida das 100 espículas está apresentada em µm como mínimo-média(desvio padrão)-máximo. n.r.= não registrado.

Fonte: O autor, 2019.

Tabela 7 – Comparação das características do tilo de diferentes espécies do gênero *Terpios* encontradas no Oceano Atlântico, Mar do Caribe e Mar Mediterrâneo.

Espécies	Locais	Tilo (cabeça)
<i>T. fugax</i> * ¹	Ilhas Virgens	Variável achatado ou arredondado, irregular e com suaves protuberâncias lobulares (multilobular 4-10)
<i>T. fugax</i> ²	Caribe	Variável, frequentemente arredondado e irregular
<i>T. cf. fugax</i> ³	Grécia	Achatado a cilíndrico e lobado
<i>T. fugax</i> **	Martinica	Variável, frequentemente arredondado, variando de lobado a multilobado
<i>T. gelatinosus</i> **	Mônaco	Cilíndrico como cabeça de cotonete e lobado, uni ou multilobado; algumas protuberâncias no pescoço
<i>T. fugax</i> **	Ceará	Achatado ou arredondado como cabeça de fósforo, com apenas um lobo ou multilobado
<i>T. fugax</i> **	Bahia	Arredondado como cabeça de fósforo, com apenas um lobo ou multilobado
<i>T. fugax</i> **	Rio de Janeiro	Variável, frequentemente arredondado, com apenas um lobo ou multilobado
<i>cf. Terpios</i> **	Mônaco	Globoso e com um lobo no ápice
<i>T. manglaris</i> * ²	Belize	Achatado como cabeça de prego e tetra lobado
<i>T. manglaris</i> **	Bahia	Achatado como cabeça de prego e tetra lobado
<i>T. manglaris</i> **	Rio de Janeiro	Achatado como cabeça de prego e tetra lobado
<i>T. belindae</i> * ²	Caribe	Achatado, bi, tetra ou multilobado
<i>T. belindae</i> **	Bahia	Achatado, bi, tetra ou multilobado
<i>T. belindae</i> **	Rio de Janeiro	Achatado, bi, tetra ou multilobado

Legenda: *Holótipo, **presente estudo, referências: ¹Duchassaing e Michelotti, 1864; ²Rützler e Smith, 1993; ³Voultsiadou-Koukoura e van Soest, 1993.

Fonte: O autor, 2019.

Esqueleto. O ectossoma é fino, com espessos subectossomais. O coanossoma é confuso, tendendo para plumoso nas proximidades do ectossoma.

Ecologia. Espécime fixado na raiz de uma árvore de mangue.

Distribuição. Atlântico Tropical e Subtropical Ocidental - Desde o Caribe (Panamá) até o Sul do Brasil (Santa Catarina).

Comentários. Apesar de ser azul e habitar ambientes rasos, o tilo quadrilobado da espécie é muito característico (RÜTZLER e SMITH, 1993) e com isso se difere de *T. fugax*. *Terpios manglaris* possui uma distribuição ampla, mas disjunta (Caribe e Brasil, Santa Catarina) (ver LERNER *et al.*, 2005). Neste estudo, registramos pela primeira vez a espécie para os estados da Bahia e do Rio de Janeiro.

Família Halichondriidae Gray, 1867

Gênero *Amorphinopsis* Carter, 1887

Espécie tipo. *Amorphinopsis excavans* Carter, 1887: 77 (descrição original).

Amorphinopsis atlantica Carvalho, Hajdu, Mothes & van Soest, 2004

(Figuras 20, 21 e 22 e Tabela 8)

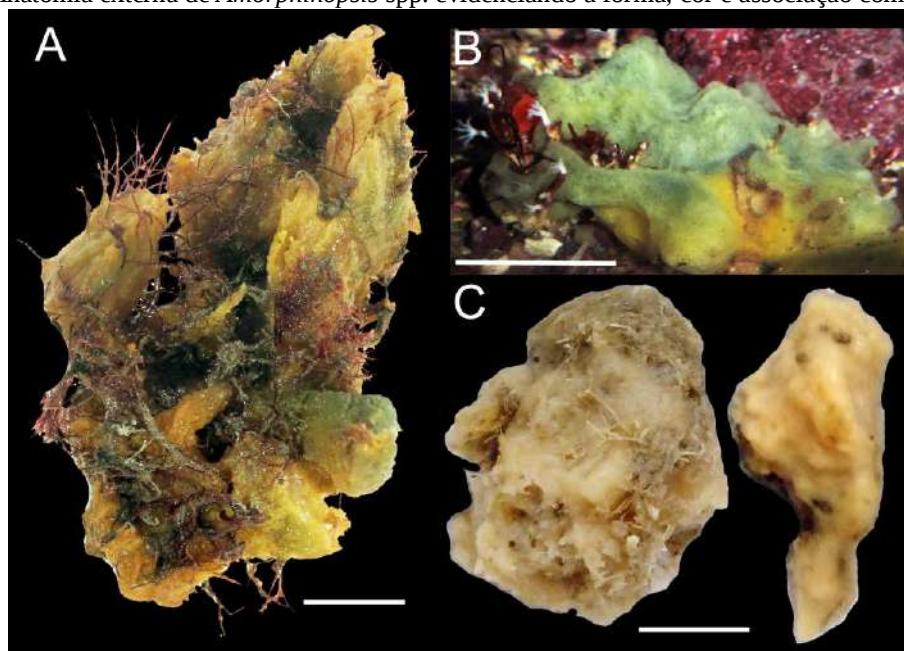
Material examinado. MNRJ: 363, 12704, 20814, 21586, 21617, 21745, 21931, 21939, 21942, 21944. UFPEPOR: 1143, 1974.

Descrição. A esponja pode crescer de forma massiva ou incrustante. A superfície varia de lisa a irregular e é compressível. A consistência é macia e friável. Os ósculos são grandes e dispostos aleatoriamente no corpo da esponja. A cor é verde amarelada externamente e amarela no seu interior (Figura 20A e B).

Espículas. As óxeas e estilos são observados em combinação. As óxeas geralmente são maiores do que os estilos, mas também podem ser tão pequenas quanto os menores estilos (Figura 21B).

Esqueleto. O ectossoma é destacável e com notável presença de canais subdermais. O esqueleto ectossomal não possui de tratos ou reticulação definida. O esqueleto coanossomal é confuso, com forte tendência a reticulado, contendo tratos pauci e multiespiculares. A formação de um buquê próximo ao ectossoma pode ser observada (Figura 21A).

Figura 20 – Anatomia externa de *Amorphinopsis* spp. evidenciando a forma, cor e associação com epífitas.



Legenda: (A e B) *A. atlantica* e (C) *Amorphinopsis* sp. As escalas são de 1 cm.

Fonte: O autor, 2019.

Ecologia. A esponja é encontrada em costão rochoso, tanto em paredes verticais quanto inclinadas. Sua presença não é muito comum. A alga *Jania* sp. se fixa no interior da esponja, sugerindo simbiose.

Distribuição. Endêmica do Brasil (Paraíba até São Paulo).

Comentários. A espécie é a única representante do gênero fora do Indopacífico (CARVALHO *et al.*, 2004). Santos *et al.* (2018) ampliaram a distribuição da espécie para a região Nordeste do Brasil, mais precisamente para os estados da Paraíba e Pernambuco. Os autores observaram a espécie na região intertidal, em poças de maré e em manguezais. É possível que haja espécimes de *Amorphinopsis atlantica* em outras localidades, como o estado da Bahia (comunicação pessoal com Dr. Eduardo Hajdu). Por isso, uma avaliação mais detalhada na coleção de Porifera do Museu Nacional é necessária.

Amorphinopsis sp.

(Figuras 20, 21 e 22 e Tabela 8)

Material examinado. MNRJ: 6777.

Descrição. O espécime observado estava dividido em dois pequenos fragmentos. A esponja é maciça. A superfície varia de lisa a crespa e é compressível. A consistência é macia. Nenhum

ósculo foi observado (Figura 20C). A cor é esverdeada *in vivo* e bege após a fixação (informações na etiqueta).

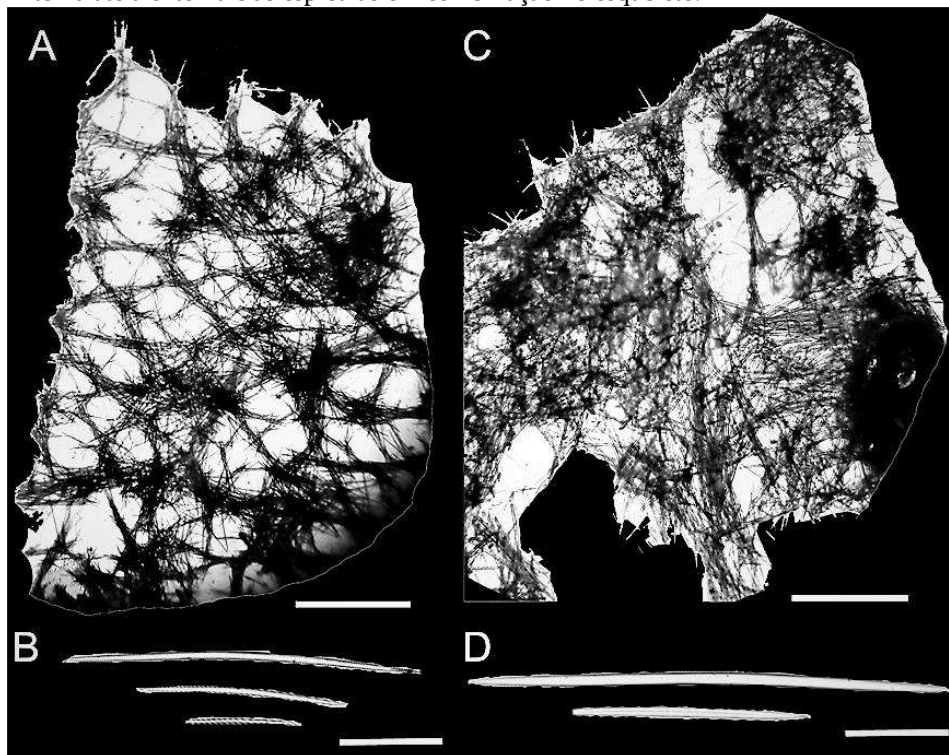
Espículas. As óxeas são divididas em duas categorias e os estilos em uma única categoria. As óxeas são fusiformes com pontas aceradas e podem ser menores do que os menores estilos. Os estilos são levemente curvos (Figura 21D).

Esqueleto. O ectossoma não possui especialização e é destacável. O esqueleto coanossomal é confuso, mas alguns tratos multiespiculares são observados (Figura 21C).

Ecologia. A esponja foi coletada em um naufrágio, entre 1-3 m de profundidade. A esponja cresce sobre cracas e apresenta algas como epibiontes.

Distribuição. Caribe (Trinidad e Tobago).

Figura 21 – Anatomia interna de *Amorphinopsis* spp. evidenciando a estrutura esquelética desde a porção mais interna até a externa e as espículas em combinação no esqueleto.



Legenda: (A e B) *A. atlantica* e (C e D) *Amorphinopsis* sp.. As escalas do esqueleto estão em 200 µm e das espículas em 100 µm.

Fonte: O autor, 2019.

Tabela 8 – Micrometria comparativa de diferentes espécies de *Amorphinopsis* e a variação nas medidas dentro de *A. atlantica*.

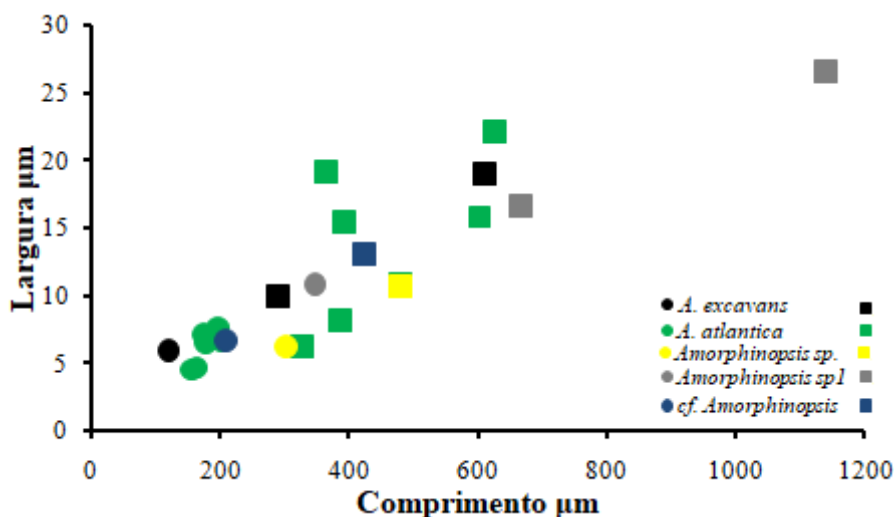
Voucher	Localidade	Estilos		Óxeas	
		Comprimento	Largura	Comprimento	Largura
<i>A. atlantica</i> ^{1*}	São Paulo	143,0- <u>178,6</u> -221,0	5,0- <u>6,6</u> -8,0	155,0- <u>392,3</u> -825,0	8,0- <u>15,5</u> -23,0
<i>A. atlantica</i> ^{3**}	São Paulo	156,0- <u>189,1</u> (16,3)-223,6	4,9- <u>7,2</u> (2,1)-16,1	314,0- <u>435,5</u> (68,1)-611,6	8,0- <u>13,4</u> (3,2)-20,9
<i>A. atlantica</i> ³	Rio de Janeiro	163,4- <u>196,9</u> (34,9)-274,3	3,0- <u>7,7</u> (2,8)-12,2	237,9- <u>601,9</u> (156,8)-825,6	6,2- <u>15,9</u> (5,7)-28,2
<i>A. atlantica</i> ²	Pernambuco	160- <u>204,0</u> -260	5- <u>6,7</u> -14	260- <u>480,0</u> -760	5- <u>11,0</u> -29
<i>A. atlantica</i> ²	Paraíba	142- <u>185,3</u> -228	4- <u>6,9</u> -10	450- <u>625,8</u> -787,0	12,0- <u>22,2</u> -28,0
<i>Amorphinopsis</i> sp. ³	Trinidad e Tobago,	205,8- <u>346,6</u> (59,7)-532,7	5,4- <u>10,9</u> (2,9)-21,9	I) 178,0- <u>664,4</u> (132,7)-837,5	I) 4,5- <u>16,6</u> (4,9)-26,6
	Caribe			II) 871,2- <u>1141,4</u> (191,1)-1595,7	II) 5,8- <u>26,7</u> (7,8)-43,6
				I) 200-375	I) 8-12
<i>A. excavans</i> ^{4*}	Arquipélago Mergui, Oceano Índico	120	6	II) 520-700	II) 18-20

Legenda: Valores: mínimo-média(desvio padrão)-máximo; em micrômetros; N= 30. Espécimes depositados no Museu Nacional (MNRJ), Universidade Federal de Pernambuco (UFPEPOR) e British Museum of Natural History (BMNH).¹Carvalho *et al.*, 2004; ²Santos *et al.*, 2018; ³presente estudo; ⁴Carter, 1887; *holótipo (MNRJ 353 e BMNH 1981.10.14.3), **parátipo remedido (MNRJ 363).

Fonte: O autor, 2019.

Comentários. Assim como a espécie tipo do gênero, *A. excavans*, *Amorphinopsis* sp. apresenta duas categorias de óxeas. Porém, as óxeas encontradas no espécime aqui descrito podem ser muito maiores do que a maior óxea registrada para o espécime tipo. Além disso, é improvável que *A. excavans* ocorra no Sul do Caribe, já que o registro da espécie é para o Oceano Índico. *Amorphinopsis* sp. se assemelha a *A. atlantica*, a única espécie do gênero fora do Índico, quanto a morfologia externa. Contudo, ambas se diferem pelo tamanho das óxeas e estilos e pelo tipo de esqueleto, muito mais reticulado em *A. atlantica* do que no morfotipo aqui descrito. Esta parece ser a segunda espécie do gênero *Amorphinopsis* para o continente americano, e a primeira para o Caribe.

Figura 22 – Relação entre as médias do comprimento (μm) e da largura (μm) das óxeas e dos estilos observados no gênero *Amorphinopsis*.



Legenda: Símbolo círculo indica a distribuição do tamanho dos estilos e os quadrados o tamanho das óxeas em diferentes espécies de *Amorphinopsis*. Cada cor se refere a uma espécie/morfotipo distinto.

Fonte: O autor, 2019.

Gênero *Halichondria* Fleming, 1828

Espécie tipo. *Spongia panicea* Pallas, 1766: 388 (descrição original).

Halichondria (Halichondria) melanadocia de Laubenfels, 1936

(Figuras 23, 24, 25 e 26 e Tabela 9)

Material examinado. MNRJ: 1092, 1096, 1520, 1536, 2587, 21396, 21652, 21659, 21803

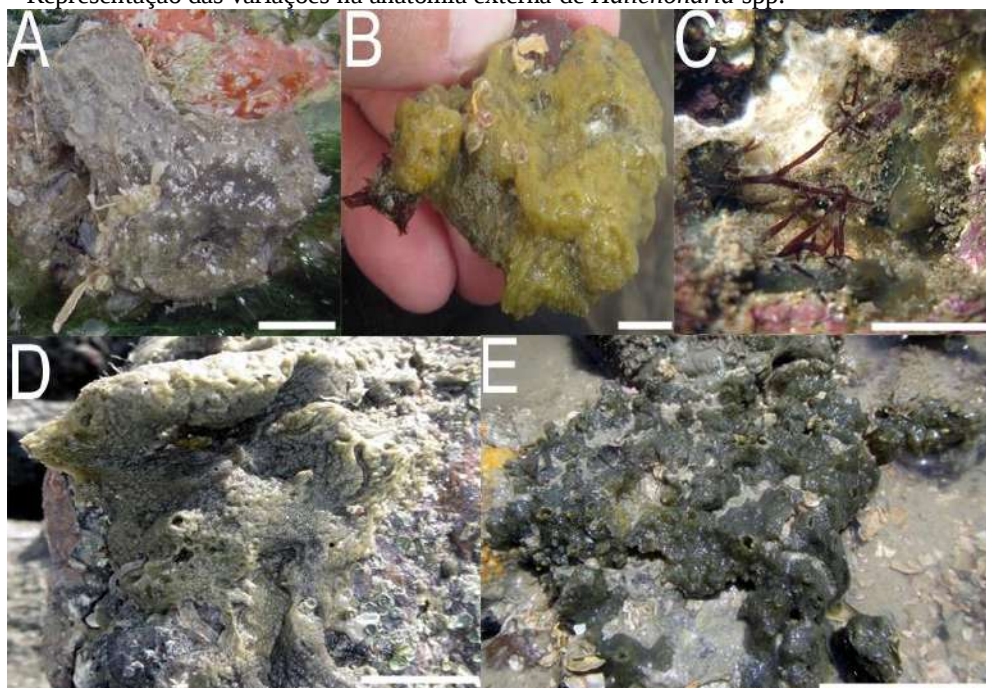
Descrição. A espécie apresenta crescimento incrustante ou maciço, com possível formação de ramos. Os ósculos são visíveis e com uma membrana perioscular circundante. A esponja é macia e compressível. A superfície é lisa, levemente conulosa e visualmente reticulada. A cor

é verde escura (musgo) quase preta externamente e verde amarelada internamente, mantendo a coloração escura no álcool (Figura 23E).

Espículas. Exclusivamente óxeas fusiformes, com grande variação (podendo formar duas categorias) de tamanho e pontas agudas ou arredondadas (Figura 24A).

Esqueleto. O esqueleto ectossomalé anisotrópico, destacável, com espículas paralelamente dispostas. O esqueleto coanossomal é desorganizado com espículas aleatoriamente dispostas, apesar de alguns tratos multiespiculares em direção ao ectossoma serem visíveis (Figura 25A).

Figura 23 – Representação das variações na anatomia externa de *Halichondria* spp.



Legenda: *Halichondria* sp. 1 (A), *Halichondria marianae* (B-D) e *Halichondria melanadocia* (E). Escalas são 1 cm (A-C), 2 cm (D-E).

Fonte: O autor, 2019.

Ecologia. Os espécimes foram coletados em costões rochosos rasos e manguezais caribenhos (3-5 m), expostos parcialmente a luz. No Caribe, a espécie é fortemente relacionada com gramas marinhas (ARCHER *et al.*, 2015).

Distribuição. Atlântico Tropical Ocidental - Amplamente distribuída pelo Caribe e Nordeste do Brasil.

Comentários. Os espécimes aqui descritos se distinguem da descrição original, pois as óxeas foram divididas em duas categorias de tamanho, chegando a mais de 600 µm e nenhum odor foi sentido (Tabela 9). Contudo, a forma externa, a manutenção da coloração negra nos espécimes após a fixação e o esqueleto interno são idênticos à descrição de Díaz *et al.* (1993). Esta espécie também se difere dos congêneres, inclusive da recém descrita *Halichondria*

marianae Santos, Nascimento & Pinheiro, 2018, principalmente, pela cor negra após a fixação. Aqui o espécime é revalidado para o Nordeste do Brasil, se distribuindo por toda a sua extensão costeira, desde o estado da Bahia até o do Maranhão. Apesar de haverem caracteres robustos para a identificação específica de *H. melanadocia*, reconstruções filogenéticas com os marcadores nucleares 18S e 28S têm indicado frequentemente que esta espécie se posiciona em um clado diferente do que contém a espécie tipo do gênero, *Halichondria panicea* (REDMOND *et al.*, 2013; THACKER *et al.*, 2013; GASTALDI *et al.*, 2018).

Figura 24 – Formas e tamanhos das óxeas fusiformes de *Halichondria* spp.



Legenda: *Halichondria melanadocia*(A), (B) *Halichondria* sp. 1 e *Halichondria marianae*(C). Todas as escalas são de 100 μ m.

Fonte: O autor, 2019.

Halichondria (Halichondria) marianae Santos, Nascimento & Pinheiro, 2018

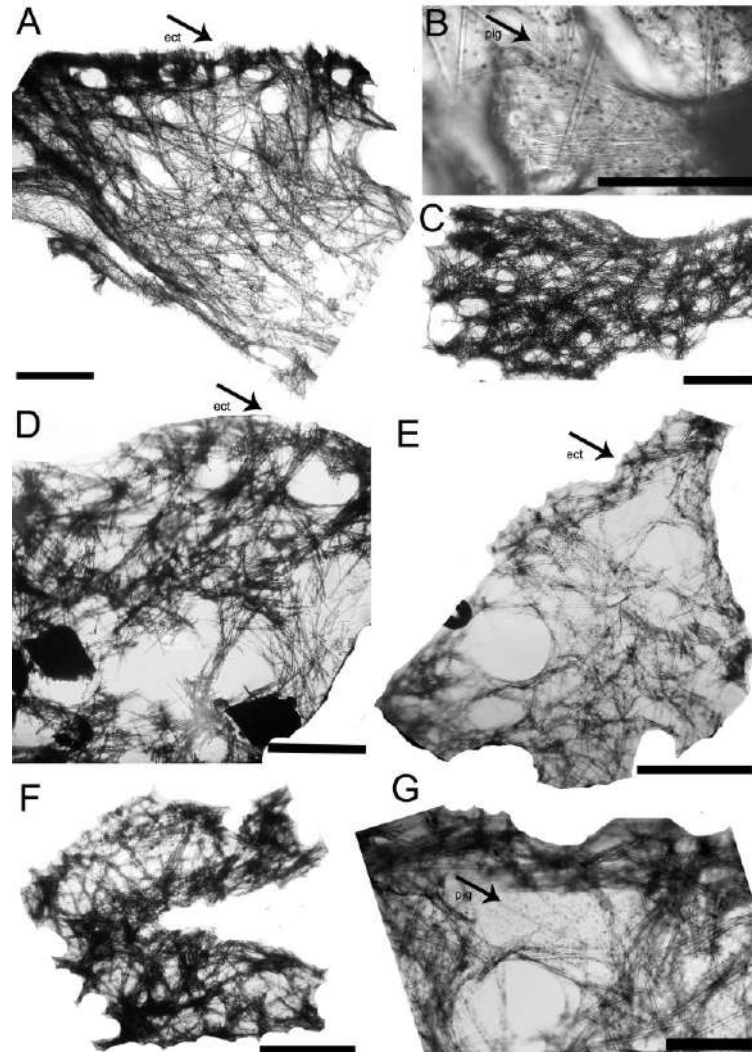
(Figuras 23, 24, 25 e 26 e Tabela 9)

Material examinado. MNRJ: 2079, 4716, 9422, 21342, 21345, 21363, 21400, 21439, 21706

Descrição. A esponja tem crescimento incrustante espesso com a formação de lobos, onde os ósculos se localizam. A superfície é rugosa, áspera e destacável. A textura da esponja é firme, macia e compressível. Os ósculos variam de 1,1 - 2,7 mm em diâmetro. A cor da esponja vai de amarelo amarronzado a verde escuro *in vivo* e tende a marrom acinzentada após a fixação (Figura 23B, C e D).

Espículas. As óxeas são fusiformes com pontas aceradas e são observadas em duas categorias de tamanho (Figura 24C).

Figura 25 – Esqueleto interno de diferentes espécies de *Halichondria* (*Halichondria*).



Legenda: *Halichondria melanadocia*: corte perpendicular (A), pigmentos na superfície (B) e corte tangencial (C), *Halichondria marianae*: corte perpendicular (D), *Halichondria* sp. 1: corte perpendicular (E), pigmentos na superfície (F) e corte tangencial (G). As siglas ect= ectossoma e pig= pigmentos. As escalas são de 200 μm.

Fonte: O autor, 2019.

Tabela 9 – Comparação entre as espécies do gênero *Halichondria* distribuídas entre o Caribe e a América do Sul.

Espécies	Localidade	Óxeas I		Óxeas II		Óxeas III	
		Comprimento	Largura	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura
<i>H. panicea</i> ¹	Europa		124-482	2-15			
<i>H. magniconulosa</i> ²	Caribe		108-369	3-7			
<i>H. modesta</i> ²	Jamaica		120-600	4,5-12			
<i>H. lutea</i> ²	Cuba		350-1200	3-15			
<i>H. marianae</i> ³	Paraíba		90- <u>340,4</u> -800	5- <u>11</u> -20			
<i>H. cebimarensis</i> ⁴	São Paulo		330- <u>461,2</u> -620	5- <u>9,1</u> -14			
<i>H. migottea</i> ⁴	São Paulo		102- <u>112,8</u> -121	3- <u>4,9</u> -6	194- <u>214,5</u> -233	2- <u>2,8</u> -4	262- <u>329,8</u> -417
<i>H. sulfurea</i> ⁴	São Paulo		107- <u>276,9</u> -446	8- <u>8,7</u> -12			8- <u>7,1</u> -10
<i>H. tenebrica</i> ⁴	São Paulo		116- <u>368,0</u> -650	5- <u>10,2</u> -17			
<i>H. elenae</i> ⁵	Argentina		185-458	5,1-19			
<i>H. melanadocia</i> ²	Caribe		100-450	2-10			
<i>H. melanadocia</i> *	Caribe	105,2- <u>169,6</u> (2,4)-270,9	2,4- <u>4,8</u> (1,5)-12,6	220,5- <u>428,5</u> (47,6)-505,1	1,8- <u>7,0</u> (2,4)-13,8		
	Nordeste, Brasil	122,2- <u>215,7</u> (44,9)-296,4	1,5- <u>5,0</u> (1,9)-13,4	308,4- <u>447,7</u> (63,2)-654,3	1,8- <u>7,6</u> (2,4)-19,5		
<i>H. marianae</i> *	Panamá, Caribe	145,2- <u>281,1</u> (98,3)-477,1	3,4- <u>7,2</u> (3,1)-15,2	525,3- <u>681,1</u> (87,8)-834,4	6,0- <u>16,4</u> (4,5)-26,3		
	Nordeste, Brasil	130,2- <u>285,2</u> (74,7)-489,1	1,7- <u>7,3</u> (3,0)-17,5	302,7- <u>624,9</u> (93,0)-856,8	2,7- <u>13,9</u> (4,1)-150,7		
<i>Halichondria</i> sp. 1*	Maranhão	244,5- <u>411,3</u> (188,9)-925,7	4,8- <u>12,4</u> (5,1)-26,8	1114,2- <u>1286,6</u> (144,7)-1560,1	21,7- <u>32,3</u> (7,2)-45,9		
<i>Halichondria</i> sp. 2*	Rio de Janeiro	85,7- <u>313,2</u> (136,7)-506,7	2,4- <u>7,8</u> (3,1)-16,3	513,2- <u>605,3</u> (76,6)-766,8	6,5- <u>14,9</u> (5,0)-26,6		
<i>Halichondria</i> sp. 3*	Caribe e Sudeste	448,5- <u>618,7</u> (131,0)-824,6	9,6- <u>21,8</u> (8,8)-33,0	1097,4- <u>1302,2</u> (184,0)-1758,2	16,2- <u>38,5</u> (15,3)-65,7		
<i>Halichondria</i> sp. 4*	Sudeste	101,6- <u>149,2</u> (30,1)-246,2	3,1- <u>5,9</u> (1,3)-9,4	259,0- <u>323,6</u> (35,7)-412,5	3,5- <u>8,9</u> (2,1)-13,9		
<i>Halichondria</i> sp. nov.*	Sudeste, Brasil	80,8- <u>135,8</u> (31,7)-187,3	1,3- <u>4,5</u> (2,3)-10,2				

Legenda: *presente estudo. As medidas estão em micrômetros (n= 50). ¹Erpenbeck e van Soest, 2002; ²Díaz *et al.*, 1993; ³Santos *et al.*, 2018; ⁴Carvalho e Hajdu, 2001; ⁵Gastaldi *et al.*, 2018; *presente estudo.

Fonte: O autor, 2019.

Esqueleto. O esqueleto é tipicamente halicondróide. O esqueleto ectossomal é tangencial e destacável e o esqueleto coanossomal possui óxeas em confusão na porção central com alguns tratos ascendentes nas regiões periféricas (Figura 25C).

Ecologia. Os espécimes foram coletados em poças de maré e mangue.

Distribuição. Atlântico Tropical Ocidental - Panamá (Caribe) e Nordeste (MA, até PE) e Sudeste (RJ) do Brasil.

Comentários. Os espécimes aqui analisados mostraram diferenças sutis quanto a descrição de Santos *et al.* (2018), tais como cor, forma e a divisão de duas categorias de óxeas, em vez de uma apenas. Porém, de forma geral, a espécie se diferencia de seus congêneres do Atlântico Tropical Ocidental e tem a sua distribuição ampliada para o Caribe e também para os estados do Maranhão, Ceará, Alagoas e Rio de Janeiro. As características morfológicas da espécie são muito parecidas com as de *H. melanadocia* e, por isso, a classificação desta espécie deve ser realizada com base em ferramentas adicionais, tais como citologia, reprodução, genética e química.

Halichondria sp. 1

(Figuras 23, 24, 25 e 26 e Tabela 9)

Material examinado. MNRJ: 21339

Descrição. O espécime tem crescimento incrustante espesso, com 4,0 x 2,0 cm de tamanho. A superfície é irregular e majoritariamente rugosa, em algumas partes também é reticulada. A consistência é macia e compressível. Apenas um ósculo foi observado (0,2 mm), no mesmo nível da superfície da esponja. A cor *in vivo* e após a fixação é acinzentada (Figura 23A).

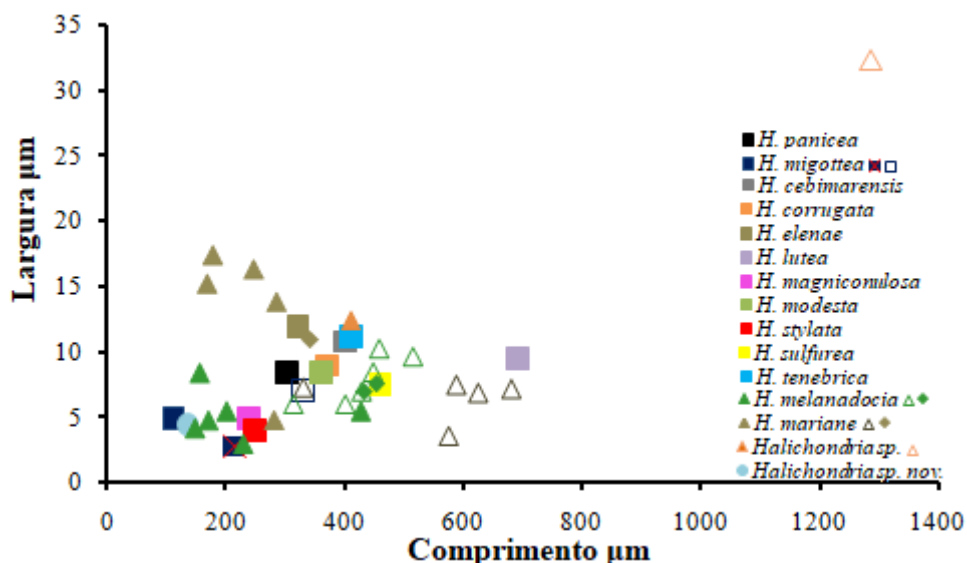
Espículas. Exclusivamente óxeas levemente curvas, divididas em duas categorias de tamanho (Figura 24B), ambas com grande variação (Figura 26).

Esqueleto. O ectossoma é destacável (não facilmente) e possui reticulação regular, com espículas entrecruzadas em um arranjo (para)tangencial. O coanossoma é tipicamente halichondróide, com espículas agrupadas, mas a maior parte dispersa e sem organização. Pouca espongina está presente na esponja (Figura 25B).

Ecologia. O espécime foi coletado em uma poça de maré, parcialmente fora d'água.

Distribuição. Brasil (Maranhão).

Figura 26 – Relação entre as médias do comprimento (μm) e da largura (μm) das óxeas observados no gênero *Halichondria*.



Legenda: Símbolo quadrado de cor diferente indica espécies usadas como comparação. Destas, apenas *Halichondria migottea* possui mais de uma categoria de óxeas, sendo quadrado fechado para a categoria menor, quadrado com X vermelho para a média e quadrado aberto para a maior. Os espécimes aqui descritos são indicados pelo símbolo triângulo fechado quando as óxeas são de categoria menor e aberto de categoria maior. Espécimes sem divisão de categorias são representados por losango fechado. A espécie nova é representada por círculo fechado.

Fonte: O autor, 2019.

Comentários. *Halichondria* sp. 1 se difere dos seus congêneres distribuídos no Oceano Atlântico Tropical pela presença de óxeas maiores do que 1200 μm . *Halichondria marianae* é a espécie mais parecida com o espécime aqui descrito, preferencialmente quanto a forma do esqueleto (sub)ectossomal. As outras quatro espécies do gênero registradas para o Brasil são exclusivas da região Sudeste e diferem de *Halichondria* sp. 1 em diversos caracteres anatômicos internos e externos: *Halichondria cebimarensis* é azul e maciça com espículas menores do que 800 μm em uma categoria, *H. migottea* possui espículas menores do que 200 μm e divididas em três categorias de tamanho, *H. sulfurea* é amarela *in vivo* com óxeas de tamanho equivalente a menos da metade do daquelas observadas em *Halichondria* sp. 1 e, por fim, *H. tenebrica* se difere das demais por ter hábito incrustante e cor arroxeada (ver descrições em CARVALHO e HAJDU, 2001). Diante de todas as características expostas, *Halichondria* sp. 1 muito provavelmente é uma nova espécie, com a morfologia externa muito semelhante à de *H. marianae* (SANTOS *et al.*, 2018). O maior problema com relação a este morfotipo é que apenas um espécime mostrou uma variação espicular acima do normal, chegando a mais de 1500 μm . A partir da obtenção dos dados moleculares, uma definição poderá ser tomada para este morfotipo.

Halichondria sp. 2

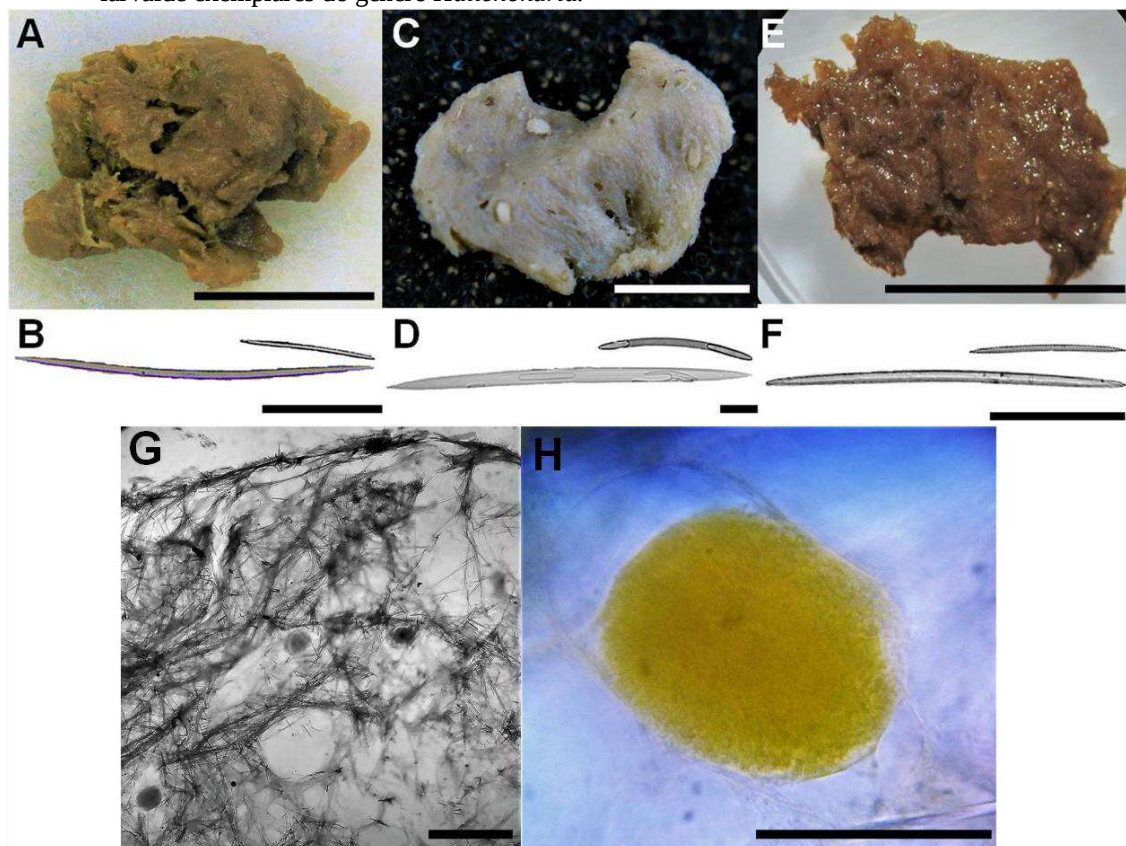
(Figura 27 e Tabela 9)

Material examinado. MNRJ: 21600, 21603, 20616 e 21754**Descrição.** Morfotipo com superfície irregular, ósculos pouco visíveis e consistência macia. Coloração marromapós a fixação (Figura 27A).**Espículas.** Óxeas fusiformes e ligeiramente curvas com pontas aceradas em duas categorias de tamanho (Figura 27B).**Esqueleto.** O esqueletoectossomal é destacável com reticulação semi-regular. O esqueleto coanossomal é tipicamente halichondróide.**Ecologia.** Intertidal. Sob ou sobre rochas em costões rochosos e sobre raízes de árvores de mangue. Preferencialmente em ambientes com pouca exposição à luz.**Distribuição.** Rio de Janeiro, Brasil.**Comentários.** *Halichondria* sp. 2 possui características externas similares a vários congêneres, porém é exclusiva do Rio de Janeiro e nenhuma outra espécie exclusiva do Sudeste do Brasil possui coloração marrom após a fixação. Além disso, as médias das duas categorias de óxeas não convergem com as de nenhuma outra espécies. Estudos genéticos são necessários para melhor entender o posicionamento deste morfotipo.*Halichondria* sp. 3

(Figuras 27 e Tabela 9)

Material examinado. MNRJ: 15744, 21678 e 21799**Descrição.** Morfotipo com superfície irregular e áspera. O crescimento é incrustante espesso e os ósculos são visíveis, quase vulcaniformes. A consistência é dura e frágil, quebradiça. A coloração é amarela ou branca *in vivo* e esbranquiçada ou bege após a fixação (Figura 27C).**Espículas.** Óxeas fusiformes e levemente curvas. As espículas estão em duas categorias de tamanho, sendo a maior, muito maior do que a menor categoria (Figura 27D).**Esqueleto.** A pinacoderme é destacável (não facilmente) e o esqueleto ectossomal é reticulado. O esqueleto halichondróide está presente.**Ecologia.** Ambientes ciáfilos (cavernas e fendas).**Distribuição.** Caribe e Rio de Janeiro, Brasil

Figura 27 – Anatomia externa, conjunto espicular (óxeas), organização esquelética e posicionamento e forma larval de exemplares do gênero *Halichondria*.



Lenda: A) Anatomia externa e B) óxeas de *Halichondria* sp. 2; C) Anatomia externa e D) óxeas de *Halichondria* sp. 3; E) Anatomia externa e F) óxeas de *Halichondria* sp. 4; G) estrutura esquelética e H) larva de MNRJ 21602, representante de *Halichondria* sp. 4. As escalas de A, C e E são 1 cm, B, D, F e H 100 μ m e G 300 μ m.

Fonte: O autor, 2019.

Comentários. *Halichondria* sp. 3 possui uma combinação única de duas categorias de espículas com grande amplitude de tamanho, coloração esbranquiçada e esqueleto ectossomal destacável e reticulado. O morfotipo se assemelha ao congênere de Cuba, *H. lútea* Alcolado, 1984, porém o último possui óxeas com menores dimensões. Análises genéticas também são necessárias para definir a classificação deste morfotipo, principalmente comparando os espécimes do Caribe e do Rio de Janeiro, haja visto a grande distância entre as localidades.

Halichondria sp. 4

(Figuras 27 e Tabela 9)

Material examinado. MNRJ: 62, 21602

Descrição. O espécime tem crescimento maciço com possível formação de lobos. A superfície é irregular e rugosa. A consistência é macia. O ósculo é proeminente, ocasionalmente no topo dos lobos. A cor após a fixação é marrom avermelhada (Figura 27E).

Espículas. Óxeas fusiformes com pontas aceradas em duas categorias de tamanho (Figura 27F).

Esqueleto. O esqueleto ectossomal é pouco destacável e tangencial. Há espaço entre a pinacoderme e o interior da esponja. O esqueleto coanossomal é halichondróide sem a protrusão de espículas, com poucos feixes pauciespiculares a multiespiculares (45-50 μm). Há câmaras (285-510 μm) na base do esqueleto (Figura 27G).

Ecologia. Costões rochosos. As larvas ovais (Figura 27H) de cor laranja (162,1 x 189,1 μm) envolvidos por uma membrana transparente indicam que o indivíduo MNRJ 21602 é uma esponja do sexo feminino com embriões e ovos na porção subectossomal. O posicionamento não linear sugere desenvolvimento assincrônico de uma espécie que apresenta reprodução sexuada e desenvolvimento vivíparo. Os ovos são vistos com um núcleo, enquanto os embriões possuem um folículo na fase de blástula e não são observados de forma agregada.

Distribuição. Sudeste do Brasil.

Comentários. O tamanho das óxeas de *Halichondria* sp. 4 divididas em duas categorias aproximam este morfotipo de *H. melanadocia*. Apesar de não ter informação da cor dos espécimes *in vivo*, a coloração após a fixação e a consistência dos indivíduos diferem daquelas encontradas no congêner. Assim, o morfotipo foi mantido e necessita de análises moleculares para uma classificação mais correta.

Halichondria sp. nov.

(Figuras 28 e Tabela 9)

Material examinado. MNRJ: 21596

Descrição. A esponja tem crescimento incrustante fino. A superfície é irregular e reticulada e os ósculos não foram observados. A cor é azul petróleo *in vivo* e bege após a fixação (Figura 28A e B).

Espículas. As óxeas estão em confusão junto com diversas espículas exógenas (Figura 28D).

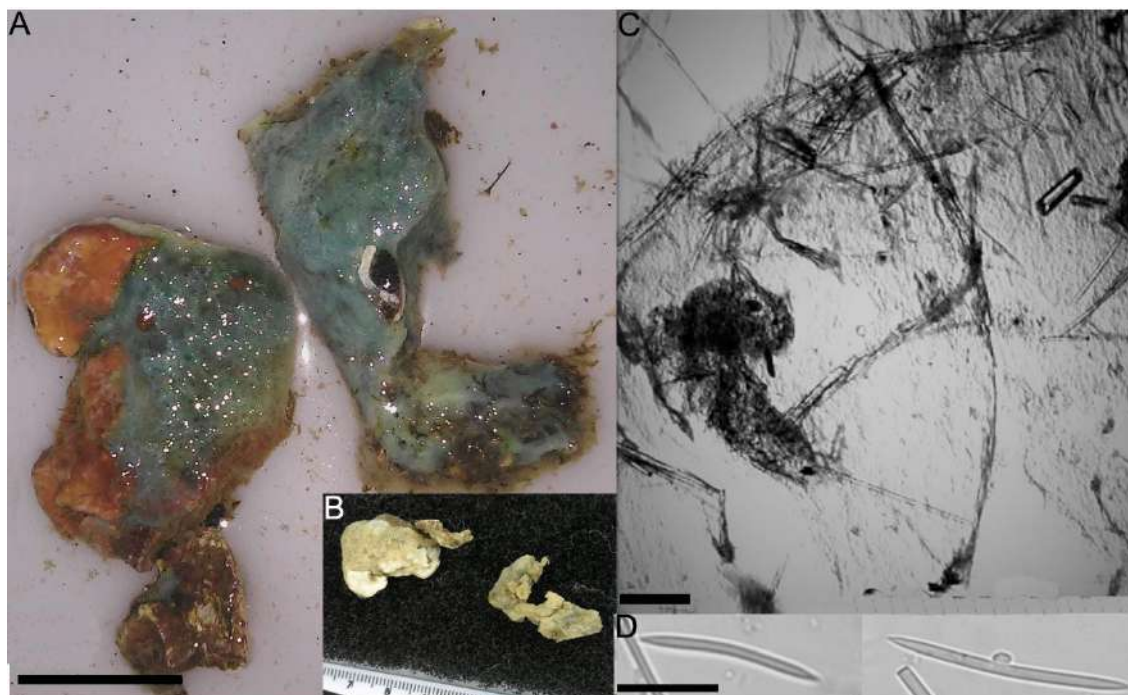
Esqueleto. A densidade espicular é muito baixa. O ectossoma é tangencial, sem protrusão espicular e o coanossoma é praticamente inexistente, a não ser pela presença de alguns tratos pauciespiculares. O interior da esponja é repleto de material exógeno, incluindo espículas diversas, aleatoriamente distribuídas no coanossoma (Figura 28C).

Ecologia. O espécime foi encontrado sob pequenas rochas e cobrindo um pedaço de concha há ~1 m de profundidade.

Distribuição. Brasil (Rio de Janeiro).

Comentários. A presença de espículas exógenas no esqueleto distingue o morfotipo aqui descrito das demais espécies de *Halichondria*. A espécie que este morfotipo mais se assemelha é com *H. cebimarensis*, somente pela cor. No restante, a última se difere por possuir crescimento maciço e espículas a partir de 330 μm , enquanto as óxeas da nova espécie não ultrapassam 200 μm (Tabela 9). Nenhuma outra espécie de *Halichondria* registrada no Brasil possui óxeas exclusivamente pequenas e esqueleto paucispicular como *Halichondria* sp. nov.

Figura 28 – Anatomia externa e interna de *Halichondria* sp. nov.



Legenda: (A) crescendo sobre um substrato calcáreo antes e (B) após a fixação, (C) imagem do esqueleto da esponja em corte perpendicular, evidenciando um fina camada ectossomal e um coanossoma pobre em espículas, exemplificação das (D) óxeas observadas na espécie. A escalas são (A) 1 cm, (C) 200 μm e (D) 100 μm .

Fonte: O autor, 2019.

Gênero *Hymeniacidon* Bowerbank, 1858

Hymeniacidon heliophila (Wilson, 1911)

(Figura 29 e 30 e Tabela 10)

Material examinado. MNRJ: 5094, 21598, 21770 até 21789 e 21800.

Descrição. A esponja tem hábito incrustante ou maciço com a formação de fístulas cônicas espaçadas. Os ósculos são envoltos por uma membrana, na extremidade fistular. A superfície é rugosa e hispida. A consistência é macia, compressível. A cor da esponja é laranja (Figura 29A).

Espículas. Estilos finos e levemente curvos, podendo apresentar variação para subtilóstilos (Figura 29C). A variação de tamanho das espículas do tipo (sub)estilo é pequena e são geralmente menores do que 500 μm (Figura 30).

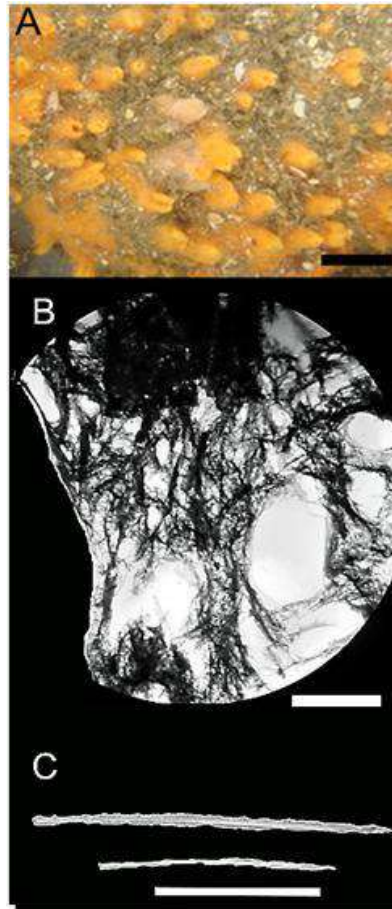
Esqueleto. O esqueleto ectossomal é composto por espículas dispersas. O esqueleto coanossomal é confuso sem grande especialização. Porém, pode haver formação de feixes espiculares ascendentes, agrupados por espongina, promovendo uma estrutura quase reticulada próxima à superfície (Figura 29B).

Ecologia. A esponja é frequentemente observada com a base repleta de grãos de areia, ocorrendo desde a zona entre-marés até 15 m de profundidade (MURICY e HAJDU, 2006). A população de uma localidade de Niterói, no estado do Rio de Janeiro, possui atividade química contra competidores bentônicos e peixes de águas rasas (RIBEIRO *et al.*, 2010, 2012).

Distribuição. Atlântico Tropical e Subtropical Ocidental - Desde os Estados Unidos até o Sudeste do Brasil.

Comentários. Externamente, a esponja é facilmente reconhecida pela sua coloração laranja, presença de fístulas rugosas e hábito de crescimento incrustante espesso ou maciço no intertidal. Internamente, a variação no tamanho dos estilos e no tipo de esqueleto é quase inexistente, com exceção da possível modificação de estilos para subtilóstilos em espécimes caribenhos (DÍAZ *et al.*, 1993; VAN SOEST, 2017). Recentemente, GASTALDI *et al.* (2018) evidenciaram que *H. heliophila* pode ser muito parecida com a espécie tipo, *H. perlevis*, a partir de dados moleculares. Muitos trabalhos no Brasil se referem a esta espécie como *affinis* (exemplo em LÔBO-HAJDU *et al.*, 2004), tendo em vista que a espécie não parece ser monofilética e pode demonstrar diferenciação no tipo de espícula, dependendo da região biogeográfica em que a população se insere. Portanto, estudos populacionais em todo o gradiente de distribuição da espécie ainda são necessários para inferir a real identidade de *H. heliophila*.

Figura 29 – Caracteres anatômicos externos e internos de *Hymeniacidon heliophila*.



Legenda: Espécime no infralitoral, *in vivo* (A), anatomia interna do esqueleto (B) e os estilos (C). As escalas são de 1 cm (A), 200 µm (B) e 100µm (C).

Fonte: O autor, 2019.

Hymeniacidon caerulea Pulitzer-Finali, 1986
(Figura 30 e 31 e Tabela 10)

Material examinado. MNRJ: 18768, 21672, 21681, 21801, 21804, 21817.

Descrição. A esponja varia de incrustante a maciça, sem a presença de fístulas. A superfície é lisa e a consistência é macia, compressível. A cor é azul *in vivo* e após a fixação é tende a azul-esverdeada (Figura 31A e C).

Espículas. Estilos finos e levemente curvos (Figura 31D).

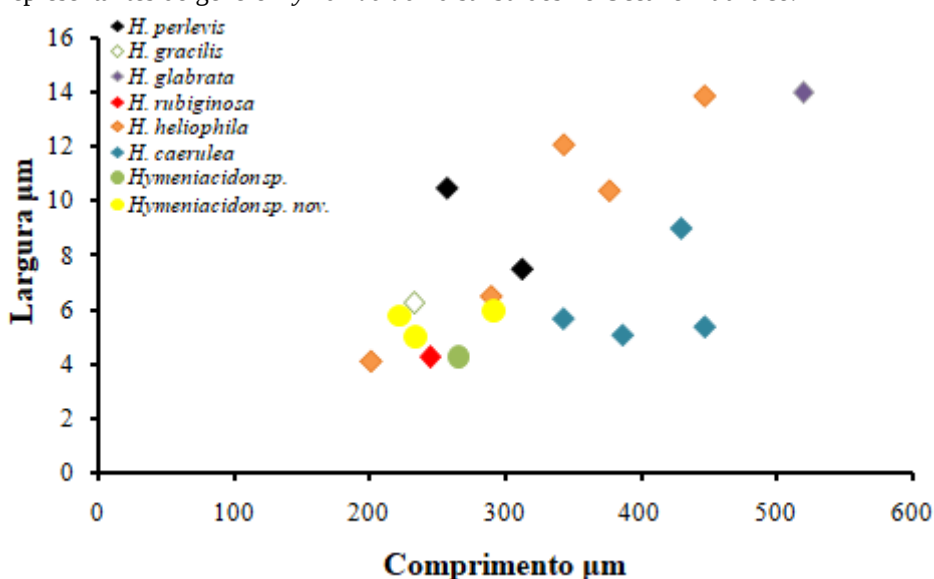
Esqueleto. O esqueleto ectossomal é destacável, porém tanto o esqueleto ectossomal quanto coanossomal é confuso e sem tratos definidos. A espécie possui espaços subectossomais (Figura 31B).

Ecologia. A esponja é frequentemente observada sobre corais e algas calcáreas e, na Martinica, em costões rochosos verticais.

Distribuição. Golfo do México, Caribe e Norte do Brasil (Foz do Amazonas).

Comentários. A esponja se diferencia das demais espécies do gênero pela cor azul e manutenção desta após a fixação. Apesar da média ser abaixo de 500 μm , como é comum para o gênero, muitas espículas são longas, excedendo o tamanho máximo representado na diagnose do gênero. *Hymeniacidon caerulea* e *H. glabrata* são as únicas espécies do gênero a possuir estilos frequentemente maiores do que o descrito na diagnose. Além disso, os espécimes aqui avaliados não contêm fístulas, característico de *Hymeniacidon*. Portanto, *H. caerulea* deve ser alocada em um novo gênero.

Figura 30 – Relação entre as médias do comprimento (μm) e da largura (μm) dos estilos observados em alguns representantes do gênero *Hymeniacidon* distribuídos no Oceano Atlântico.



Legenda: Losango representa espécies conhecidas na literatura e círculo novas espécies/morfotipo. Cada cor representa uma espécie/morfotipo diferente.

Fonte: O autor, 2019.

Hymeniacidon sp. nov.
(Figura 30 e 32 e Tabela 10)

Material examinado. MNRJ: 21346, 21360, 21390.

Descrição. A esponja tem uma base maciça e fístulas cônicas cobrindo toda a porção apical do corpo, sem a presença de ósculos visíveis. A superfície é rugosa e enrugada. A consistência é macia e friável. A cor é amarela pálida (Figura 32A).

Espículas. Estilos finos e levemente curvos (Figura 32C).

Esqueleto. O esqueleto ectossomal não é facilmente destacável nem definido, mas tende a formar uma crosta paratangencial, com cavidades subectossomais. O coanossoma é confuso, mas tratos multiespiculares estão presentes, assim como uma condensação de tratos axiais longitudinais, em especial nas fístulas (Figura 32B).

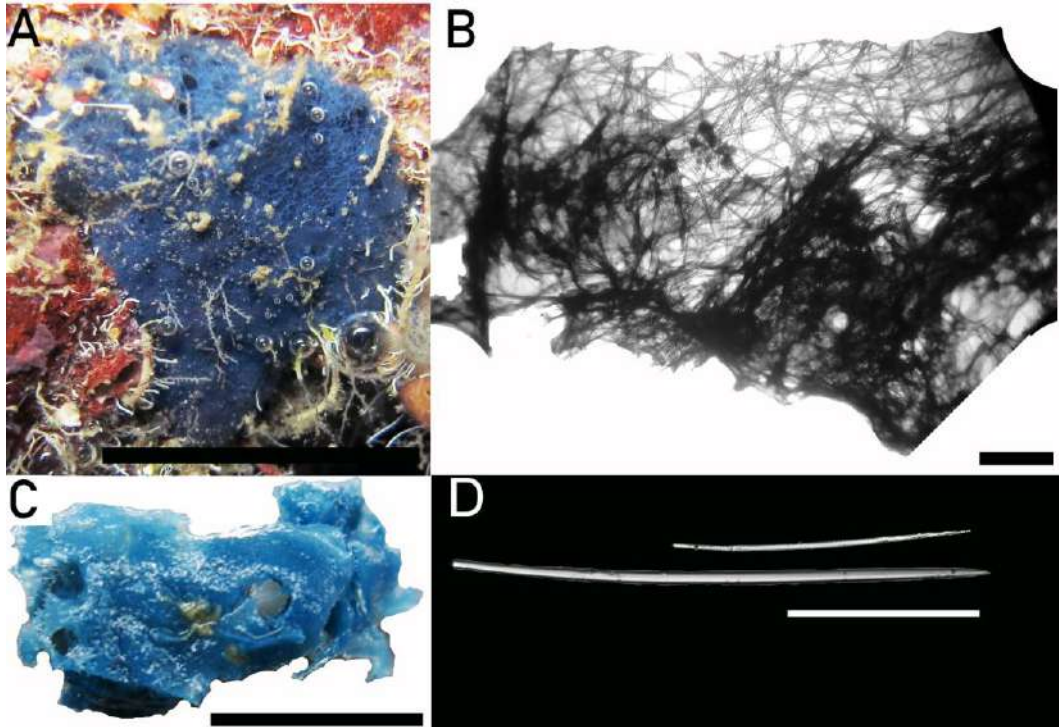
Tabela 10 – Comparação dos tipos e tamanhos das espículas e cores de *Hymeniacidon* spp. e *Rhaphidostyla* spp.

Espécies	Localidade	Estilos		Óxeas		Cor
		Comprimento	Largura	Comprimento	Largura	
<i>H. perlevis</i> ¹	Argentina	110-404	5-16			Amarela
<i>H. glabrata</i> ²	Caribe	240-800	4-24			Amarela pálida
<i>H. heliophila</i> ³	EUA e Caribe	130-450	3-10			Laranja ou amarela
<i>H. heliophila</i> ⁶	Flórida	110,1- <u>224,8</u> (59,4)-303,1	1,7- <u>3,7</u> (1,3)-6,6			Laranja ou amarela
<i>H. heliophila</i> ⁶	Rio de Janeiro	106,9- <u>414,2</u> (62,5)-566,6	1,2-11,5(1,9)-11,5			Laranja
<i>H. caerulea</i> ⁴	Caribe	232- <u>429,6</u> (122,6)-613	4,8- <u>9,0</u> (3,8)-16,6			Azul
<i>H. caerulea</i> ⁶	Foz do Amazonas	191,4- <u>386,2</u> (102,1)-563,9	3,0- <u>5,1</u> (1,7)-8,5			Azul
<i>H. caerulea</i> ⁶	Martinica	124,1- <u>376,5</u> (87,5)-620,5	2,7- <u>5,0</u> (3,0)-14,5			Azul
<i>H. caerulea</i> ⁶	Golfo do México	329,1- <u>342,4</u> (68,0)-453,0	4,3- <u>5,7</u> (1,7)-7,8			Azul
<i>Hymeniacidon</i> sp. ⁶	Rio de Janeiro	150,4- <u>197,0</u> (19,0)-284,5	1,9- <u>4,1</u> (1,2)-6,5			Amarela
<i>Hymeniacidon</i> sp. nov. ⁶	Maranhão	128,5- <u>248,7</u> (91,0)-495,9	1,9- <u>5,6</u> (1,8)-10,9			Amarela pálida
<i>H. gracilis</i> ⁵	Oceano Pacífico	200,0- <u>233,3</u> (18,3)-260,0	3,7- <u>6,3</u> (1,7)-8,7			Branca
<i>Rhaphidostyla kitchingi</i> ⁶	Irlanda			133,0-216,5(23,2)-269,0	2,0- <u>2,0</u> (0,6)-5,0	Bege esbranquiçada a acinzenada
<i>Rhaphidostyla</i> sp. nov. ⁶	Bahia	190,8- <u>219,0</u> (10,6)-238,6	4,1- <u>5,5</u> (0,8)-6,9	102,8- <u>169,3</u> (29,5)-262,3	3,2- <u>6,8</u> (1,8)-9,3	Branca
<i>Rhaphidostyla</i> sp. nov. ⁶	Rio de Janeiro	168,4- <u>209,3</u> (15,2)-235,6	2,9- <u>4,7</u> (0,8)-6,0	100,5- <u>159,9</u> (29,9)-222,2	4,3- <u>6,7</u> (1,5)-10,1	Branca

Legenda: Valores: mínimo-média(desvio padrão)-máximo; em micrômetros; N= 50. Espécimes depositados no Museu Nacional (MNRJ). ¹Gastaldi *et al.*, 2018; ²Burton, 1954; ³Díaz *et al.*, 1993; ⁴Valderrama e Zea, 2013; ⁵Núñez-Pons *et al.*, 2017, ⁶presente estudo.

Fonte: O autor, 2019.

Figura 31 – Anatomia externa e interna de dois exemplares de *Hymeniacidon caerulea* do Caribe.



Legenda: (A) *in vivo*, (C) após a fixação, (B) a anatomia interna com o esqueleto halichondróide e (D) os estilos finos. As escalas das esponjas *in situ* e *ex situ* estão em 1 cm, o esqueleto em 200 µm e os estilos em 100 µm.

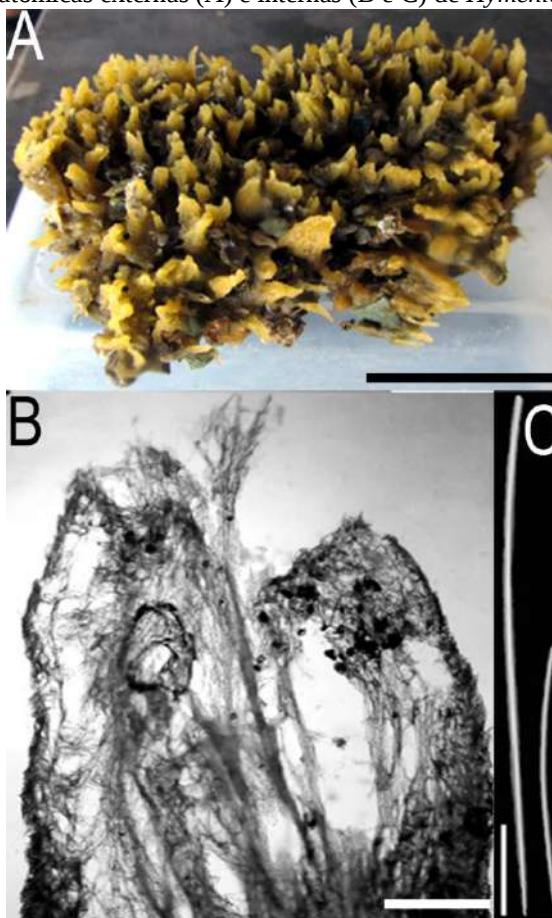
Fonte: O autor, 2019.

Ecologia. A esponja é observada em poças de maré, com a base frequentemente coberta por areia.

Distribuição. Maranhão, Brasil.

Comentários. Este é o único representante do gênero encontrado no Nordeste do Brasil até o momento. A espécie possui uma anatomia interna e externa comum ao do gênero. No Brasil, *Hymeniacidon* sp. nov. é parecida em muitas características com *H. heliophila*, exclusiva da região Sudeste e *H. perlevis* (registro duvidoso). Porém, a esponja se diferencia dos congêneres pela presença de fístulas uniformemente arranjadas em todo o corpo sem ósculos no ápice. Esta nova espécie também se difere de outras duas espécies registradas para o Caribe, *H. caerulea* e *H. glabrata*, pois ambas possuem espículas maiores do que 500 µm e possuem um tipo de crescimento sem a formação de fístulas cônicas e uniformes.

Figura 32 – Características anatômicas externas (A) e internas (B e C) de *Hymeniacion* sp. nov.



Legenda: As escalas são (A) 5 cm, (B) 500 μ m, (C) estilos 50 μ m.
Fonte: O autor, 2019.

Rhaphidostyla sp. nov.

(Figuras 33 e Tabela 10)

Material examinado. UERJPOR: 65, 190, 198, 215, 218, 343, 351, 393, MNRJ: 2575, 19469.

Descrição. A espécie apresenta crescimento variando de incrustante a maciça com fístulas bifurcadas, medindo mais de 5 x 3 cm na base e 3 x 2 cm nas fístulas. Os ósculos são protegidos por uma membrana perioscular e estão distribuídos de forma irregular no corpo, muitas vezes posicionados no ápice de fístulas. A superfície é macia e irregular, com canais subdermais conspícuos. A consistência é macia e elástica. A esponja parece esfarelar facilmente, principalmente após a fixação. Os estilos são maiores do que as óxeas, mas estas são geralmente mais largas. A coloração é branca (Figura 33A, B, C e D).

Espículas. Estilos e óxeas sem especificidade quanto ao posicionamento no interior da esponja. Os estilos são retos ou levemente curvos, podendo variar para subtilóstilos ou

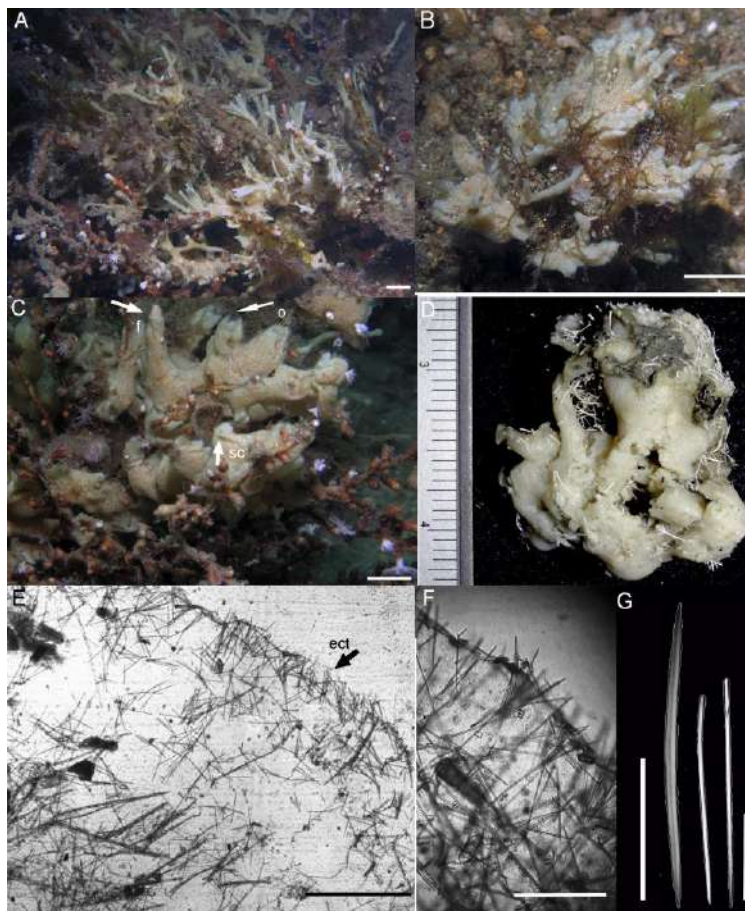
rabdóstilos, em poucos casos. As óxeas são robustas e levemente curvas com terminações aceradas, pontiagudas ou hastadas (Figura 33G).

Esqueleto. O esqueleto ectossomal é composto por uma fina camada de estilos paralelos a superfície e facilmente destacável, estando alguns deles em forma de tufos e em profusão à superfície. Na região subdermal há uma mistura de estilos e óxeas tangencialmente dispostas à superfície. O esqueleto coanossomal é composto de espículas aleatoriamente orientadas e sem a formação de tratos e malhas robustas. A arquitetura é do tipo halicondróide com poucos tratos pauci ou multiespiculares ascendentes e ausência de espongina. A presença de grãos de areia no coanossoma dá a impressão de que a esponja seja facilmente esfarelada (Figura 33E e F).

Ecologia. A espécie pode ser encontrada em grande quantidade em baías, nas proximidades de regiões portuárias, nos estados do Rio de Janeiro e Bahia. Os espécimes são observados expostos à luz ou dentro de fendas, se fixando em pedaços de corais, moluscos e pequenos pedaços de rocha entre 2-15 m de profundidade. Diversos endobiontes *Amphiroa brasiliana* Decaisne 1842 and *Hypnea cervicornis* J. Agardh, 1851 (Figura 33B e D) e *Ophiactis savignyi* (Müller & Troschel, 1842) foram observados nos espécimes coletados. A espécie está comumente sobrecrecendo o octocoral *Carijoa riisei* (Duchassaing & Michelotti, 1860) (Figura 33A e C), e em menor quantidade, em interação com os corais invasores *Tubastraea coccínea* Lesson, 1829 and *T. tagusensis* Wells, 1882 e o ofiúro exótico *Ophiothela mirabilis* Verrill, 1867.

Distribuição. Brasil (Baía de Todos os Santos, Bahia e Rio de Janeiro).

Figura 33 – Prancha ilustrativa de exemplares de *Rhaphidostyla* sp. nov. encontrados na Baía de Ilha Grande (RJ).



Legenda: A, B e C ilustram associações com o octocoral *Carijoa riisei* e com algas verdes e vermelhas; D- espécime preservado com forma maciça e fístulas e repleto de epífitos, E- corte coanossomal; F- detalhe de tufos atravessando o ectossoma; G- óxea e estilos. f= fístula, o- ósculo e sc= subcanal. Escalas: A, B e C 2 cm, D- escala em régua (cm), E 200 μ m, F 50 μ m e G 100 μ m.

Fonte: Fotos em campo Dr. Eduardo Leal Esteves, fotos em laboratório, o autor, 2014. Prancha, 2019.

Comentários. Este morfotipo se trata de uma nova espécie devido ao seu conjunto de caracteres morfológicos únicos. A espécie possui uma combinação de óxeas e estilos que se assemelha aos gêneros *Amorphinopsis*, *Ciocalapata*, *Ciocalypta* e *Laminospongia*. O último gênero possui crescimento lamelar, completamente diferente do morfotipo aqui estudado. O gênero *Ciocalapata* não forma fístulas e o esqueleto tem tratos trabeculares, enquanto a espécie aqui descrita pode apresentar papilas ou fístulas e os tratos ou malhas não são robustos ou trabeculares. Já o gênero *Ciocalypta* se diferencia deste pela presença de uma superfície com projeções fistulares transparentes, possuindo um eixo espicular central de estilos e óxeas em duas categorias de tamanho e com tratos secundários robustos (ERPENBECK e VAN SOEST, 2002), ausentes na espécie aqui descrita. Apesar de *Amorphinopsis* se enquadrar nos tipos de espículas presentes na espécie aqui estudada, o tipo

de crescimento, a forma do esqueleto e os tamanhos dos estilos e das óxeas são pouco similares.

Análises moleculares preliminares com o marcador 18S evidenciaram uma similaridade destes indivíduos com *Rhaphidostyla kitchingi* (Burton, 1935) da Irlanda, atualmente considerada um sinônimo júnior de *Hymeniacidon*. Paralelamente, ambas as espécies se mostraram distantemente relacionadas das demais espécies de *Hymeniacidon*, sobretudo *H. perlevis*, espécie tipo. Ambas as espécies são muito parecidas morfológicamente, com exceção da ausência de óxeas na espécie irlandesa (BURTON, 1935). Devido às similaridades morfológicas e moleculares, propõe-se que o gênero *Rhaphidostyla* Burton, 1935 seja ressuscitado e que a nova espécie seja incluída neste gênero. A hipótese de ser uma espécie introduzida pode ser testada, uma vez que as populações são esparsas e densas. Porém, a característica espicular potencializa a possibilidade desta espécie ser nova para a ciência.

Embora HOOPER *et al.*, (1997) tenha descrito *Hymeniacidon gracilis* (Hentschel, 1912) para a Austrália contendo coloração laranja-avermelhada pálida, recentemente esta espécie foi descrita para o Havaí com uma morfologia muito parecida com a de *Rhaphidostyla* sp. nov., inclusive com a coloração branca (NÚÑEZ-PONS *et al.*, 2017). A grande diferença entre *H. gracilis* e *Rhaphidostyla* sp. nov. é que a primeira apresenta exclusivamente estilos que não ultrapassam 400 µm. Assim, *H. gracilis* de diferentes localidades devem ser comparadas em nível morfológico para identificar se existe cromovariação na espécie e reconstruções filogenéticas devem ser realizadas para saber se a espécie pertence ao gênero ressuscitado ou se mantém no gênero original, *Hymeniacidon*.

Gênero *Topsentia* Berg, 1899

Espécie tipo: *Anisoxya glabra* Topsent, 1898b: 234 (by original designation).

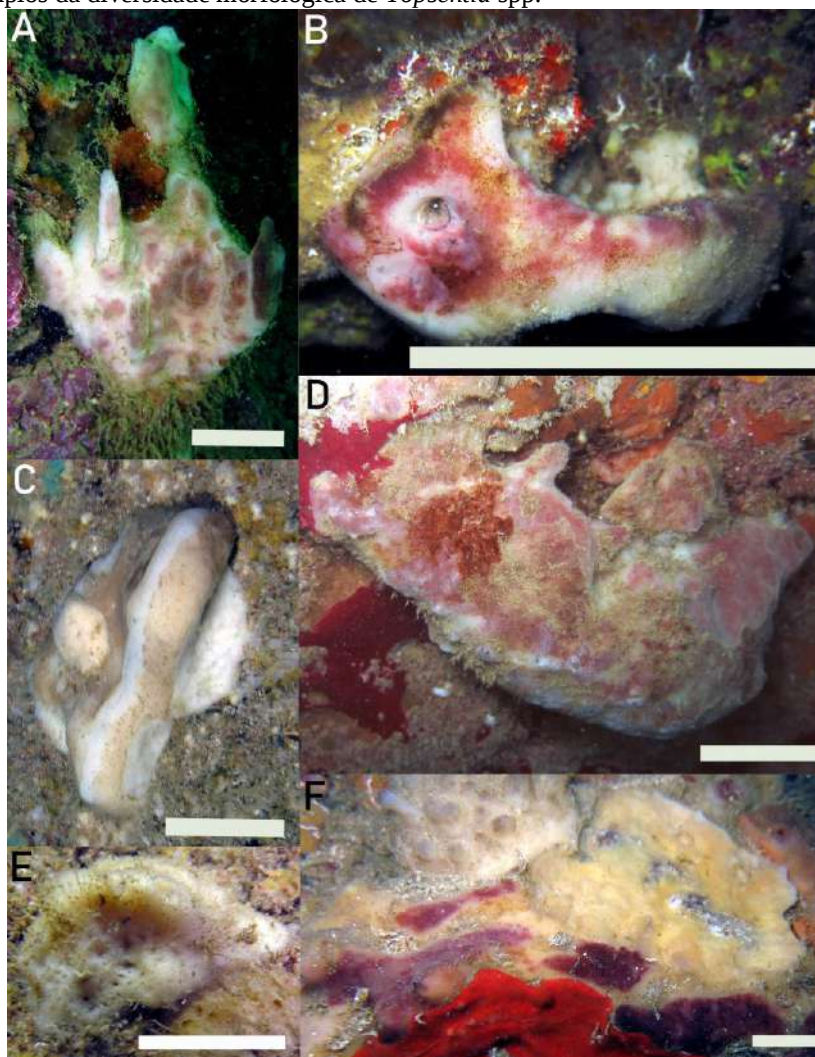
Topsentia cf. *bahamensis* Díaz, van Soest & Pomponi, 1993

(Figuras 34, 35 e 36 e Tabela 11)

Material examinado. MNRJ: 21684a, 21684c, 21802, 21816.

Descrição. A esponja é amorfa, mas pode haver espécimes maciços e com projeções fistulares, fusionadas pela base. A superfície é hispida e irregular. A consistência é dura, mas quebradiça, apenas levemente compressível nas porções maciças. A cor externa em vida é branca ou bege e após fixação é bege (Figura 34C e E).

Figura 34 – Exemplos da diversidade morfológica de *Topsentia* spp.



Legenda: *Topsentia ophiraphidites* (A, B e F), *Topsentia* cf. *bahamensis* (D e E) e *Topsentia* sp. nov. (C). A escala é de 2 cm.

Fonte: O autor, 2019.

Espículas. As óxeas não são malformadas, fusiformes e divididas em duas categorias de tamanho (Figura 35B). A presença de óxeas em diferentes categorias de tamanho é muito comum neste gênero (Figura 36).

Esqueleto. O esqueleto ectossomal não tem e o esqueleto coanossomal é denso e confuso, com pouca espongina, formado por óxeas distribuídas aleatoriamente. Às vezes, pode haver tratos ascendentes (Figura 33B).

Ecologia. A espécie é encontrada em substratos duros com alguma proteção à luz e à ação de ondas.

Distribuição. Golfo do México, Bahamas e Pequenas Antilhas (Caribe).

Comentários. A espécie apresenta apenas óxeas com grande variação de tamanho, um esqueleto confuso, sem formação nítida de tratos e pouca espongina, caracterizando-a no gênero *Topsentia* (ERPENBECK e VAN SOEST, 2002). As óxeas malformadas, em duas

categorias de tamanho e a ausência de ofirráfides nos espécimes aqui descritos diferem *T. cf. bahamensis* dos seus congêneres caribenhos, *T. ophiraphidites* e *T. pseudoporrecta*. A espécie aqui descrita está sendo caracterizada como *confer* (cf.), pois não possui projeções fistulares, nem esqueleto com arranjo tendendo a radial, como descrito no tipo (DÍAZ *et al.*, 1993). Estes mesmos autores descreveram a espécie *T. pseudoporrecta* para grandes profundidades (>200 m) na região caribenha, contendo uma base subesférica, projeção oscular em forma de cavidade, oposto de *T. bahamensis*.

Topsentia ophiraphidites (de Laubenfels, 1934)

(Figuras 34, 35 e 36 e Tabela 11)

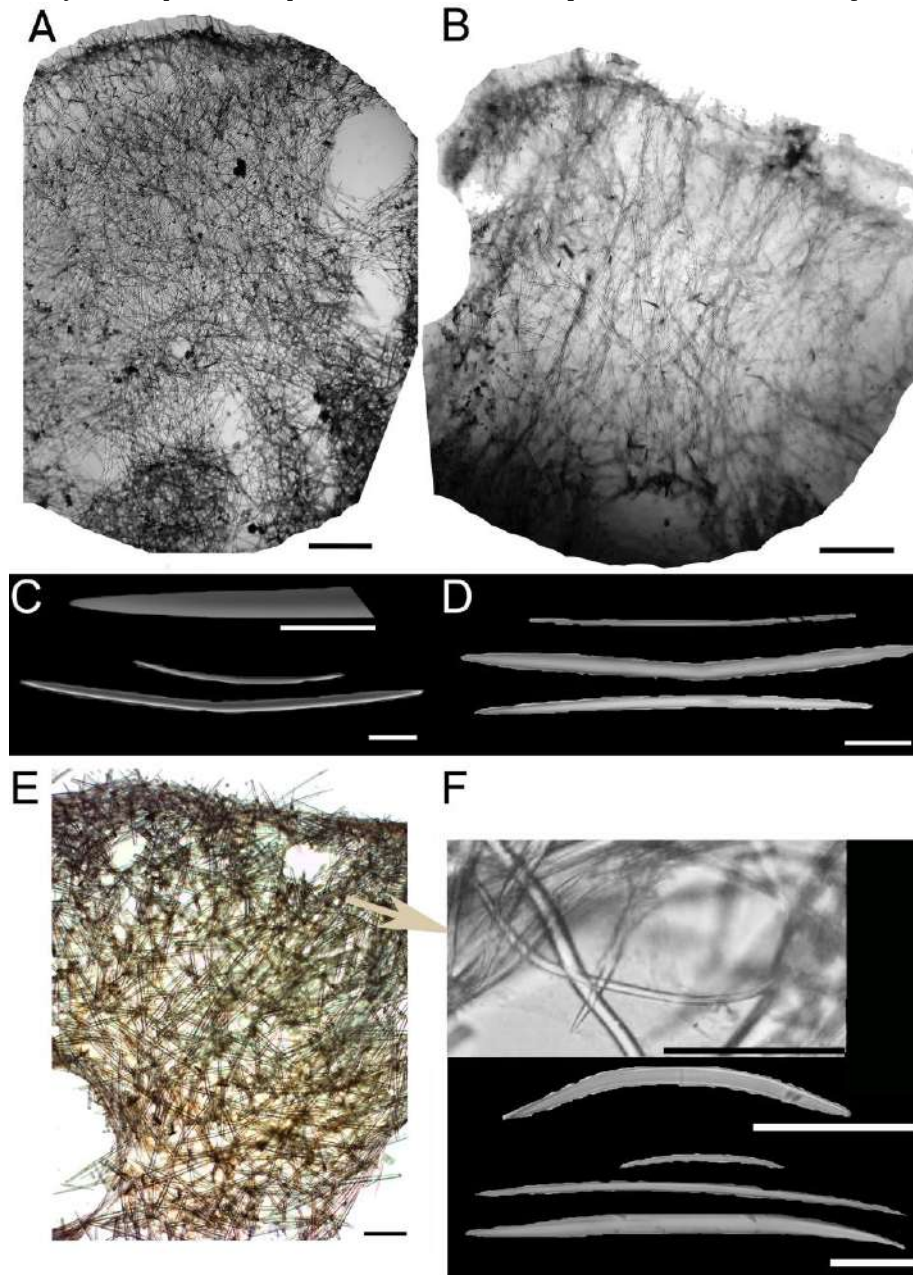
Material examinado. MNRJ: 8345, 21684, 21684b, 21684d.

Descrição. Esponja maciça, ora com projeções fistulares ou lobulares grossas, fusionadas pela base, com cerca de 20 cm de diâmetro. A superfície é microhispida com relevo irregular. Os ósculos são pequenos (1 mm), dispersos, normalmente situados no topo de pequenas projeções vulcaniformes. A consistência é dura, mas quebradiça, apenas levemente compressível nas porções maciças. A cor externa em vida é branca ou cinza (menos comum) com manchas vinho, creme ou cinza-amarronzada na superfície. Internamente, a coloração é branca e após a fixação em álcool, a esponja torna-se bege, com a maioria das manchas desaparecendo por completo (Figura 34).

Espículas. As óxeas são curvas e pode haver estrongilóxeas na região central. Tanto as óxeas grandes quanto as pequenas parecem malformadas, sinuosas e são encontradas em duas ou três categorias de tamanho. Há óxeas ofirráfides que formam quase um trapézio (Figura 35C).

Esqueleto. O esqueleto ectossomal não tem especialização e não é destacável, apesar de apresentar tufo de óxeas pequenas justapostas e atravessando a superfície. O esqueleto coanossomal é denso e confuso, com pouca espongina, formado por óxeas distribuídas aleatoriamente e, às vezes, formando feixes vagos sob a superfície (Figura 35E e F).

Figura 35 – Ilustração da arquitetura esquelética e da forma das espículas encontradas em *Topsentia* spp.



Legenda: *Topsentia* sp. nov.(A e C), *Topsentia* cf.*bahamensis* (B e D) e *Topsentia* *ophiraphidites* (E e F).
Escala dos esqueletos estão em 200µm, das óxeas em 100 µm e da extremidade de uma óxea em 25 µm (C).

Fonte: O autor, 2019.

Tabela 11 – Comparação espicular de *Topsentia* spp. do Atlântico, Mar do Caribe, Golfo do México e o tipo do Mar Mediterrâneo.

Espécimes	Local	Óxea I	Óxea II	Óxea III	Óxea sinuosa
<i>T. glabra</i>	Açores, Mediterrâneo ¹	500-930 / 13-20	100-200 / 3-6		Ausente
<i>T. pseudoporrecta</i>	Caribe Central ²	260-480 / 7-12	475-900 / 10-25	1000-1800 / 25-60	Ausente
<i>T. bahamensis</i>	Bahamas ²	200-300-500 / 6-9-13	500-650-800 / 8-19-32		Ausente
<i>T. cf. Bahamensis</i>	Martinica*	143,0- <u>264,6</u> (96,5)-461,4 / 6,8- <u>7,9</u> (2,6)-16,2	528,0- <u>682,4</u> (91,3)-888,9 / 9,9- <u>19,5</u> (5,8)-31,8		Ausente
<i>T. cf. Ophiraphidites</i>	Caribe ²	160-400 / 4-10	350-800 / 6-20	600-1100 / 15-40	Ausente
	Maranhão ³	110-390 / 2,5-10	370-1300 / 5-27,5(40)		Ausente
	Bacia Potiguar ⁴	172- <u>356</u> -618			Ausente
	Fernando de Noronha ⁵	300- <u>514</u> -740/6-9-14			Ausente
	BTS, Bahia ⁶	239-1126 / 7-30			Ausente
<i>T. ophiraphidites</i>	B. Camamu, Bahia ⁷	194,2- <u>236,1</u> -260,7 / 5,3-6,3-8	279,3- <u>377,6</u> -473,5 / 8- <u>10,4</u> -13,3	650- <u>809,7</u> -980 / 20- <u>26,7</u> -40	Presente
	Martinica*	193,2- <u>301,4</u> (72,1)-475,5 / 4,3- <u>8,4</u> (2,6)-15,0	411,2- <u>617,3</u> (125,3)-877,5 / 6,0- <u>17,3</u> (6,5)-32,0	942,8- <u>1061,6</u> (231,9)-1469,7 / 30,9- <u>38,4</u> (13,3)-61,2	Presente
	Bahia*	118,5- <u>259,1</u> (66,3)-375,0 / 4,2- <u>7,1</u> (1,8)-9,0	454,6- <u>651,7</u> (69,7)-723,6 / 3,4- <u>15,0</u> (4,1)-21,0	793,5- <u>867,9</u> (140,6)-1260,0 / 20,1- <u>23,4</u> (3,6)-32,2	Presente
<i>Topsentia</i> sp. nov.	Golfo do México*	237,2- <u>321,0</u> (61,3)-440,6 / 4,8- <u>10,8</u> (2,7)-15,0	461,6- <u>593,6</u> (80,8)-728,6 / 9,7- <u>16,8</u> (4,8)-26,6	761,6- <u>853,8</u> (86,5)-1010,6 / 15,5- <u>20,9</u> (6,2)-32,3	Ausente
	Fernando de Noronha*	122,2- <u>300,6</u> (58,0)-376,6 / 2,2- <u>3,8</u> (1,4)-8,8	236,3- <u>421,6</u> (70,9)-772,4 / 3,0- <u>7,5</u> (2,7)-17,6	497,4- <u>642,2</u> (84,6)-904,5 / 3,5- <u>12,6</u> (4,4)-27,6	Ausente
	Ceará*	255,0- <u>447,2</u> (126,5)-871,9 / 3,0- <u>9,2</u> (4,0)-25,8	1094,3- <u>1131,6</u> (91,6)-1304,6 / 18,1- <u>27,2</u> (6,4)-35,5		Ausente
	Bahia*	I)138,6- <u>323,0</u> (118,5)-520,6 / 2,4- <u>5,6</u> (2,1)-11,9	577,4- <u>731,6</u> (109,8)-1003,1 / 3,0- <u>13,0</u> (4,7)-24,9		Ausente

Legenda: As medidas são apresentadas como mínimo-média(desvio padrão)-máximo, em micrômetros (µm) e como comprimento / largura. *presente estudo, ¹Topsent, 1898,

²Díaz *et al.*, 1993, ³Mothes *et al.*, 2004, ⁴Muricy *et al.*, 2008, ⁵Moraes, 2011, ⁶Hajdu *et al.*, 2011 e ⁷Lage, 2013.

Fonte: O autor, 2019.

Ecologia. A espécie é encontrada em substratos duros com alguma proteção à luz, entre 5-25 m de profundidade e em ambientes com baixo hidrodinamismo. Espécimes do gênero já foram coletados a mais de 50 m de profundidade na região amazônica. Diversos epibiontes foram encontrados, especialmente animais com crescimento incrustante. A coloração na superfície é provavelmente devido a associação com cianobactérias.

Distribuição. Atlântico Tropical Ocidental, desde o Caribe até o estado da Bahia (Brasil), incluindo as ilhas oceânicas, exceto o Arquipélago de São Pedro e São Paulo.

Comentários. Os espécimes aqui descritos são similares os demais registrados por de Laubenfels (1954) e Díaz *et al.* (1993), no Caribe devido à presença de óxeas fusiformes e estrongilóxeas com grande variação de tamanho, deformadas e sinuosas. Estas últimas são características de *T. ophiraphidites*, em especial, quando observadas nas menores espículas (Figura 35D). A espécie tem sido descrita para todo o litoral nordeste brasileiro (ver Tabela 11), porém a maioria das identificações deve tratar de outra espécie, com exceção de Lage (2013). As óxeas sinuosas, ofirráfides, só foram encontradas para uma amostra da Bahia no tocante e Lage foi a única autora a descrever tais óxeas, no Brasil. Mothes *et al.* (2004) e Muricy *et al.* (2008) encontraram óxeas, estrongilos e estrongilóxeas nos exemplares maranhenses e potiguares, diferenciando-os das espículas características de *T. ophiraphidites*. Por sua vez, Hajdu *et al.* (2011) e Moraes (2011) descreveram exclusivamente óxeas, com grande variação de tamanho, para espécimes da Bahia e das Ilhas Oceânicas Brasileiras, respectivamente. As amostras de *Topsentia*, sem óxeas sinuosas, mas similares, anatomicamente, a *T. ophiraphidites*, estão descritas abaixo como *Topsentia* sp. nov.

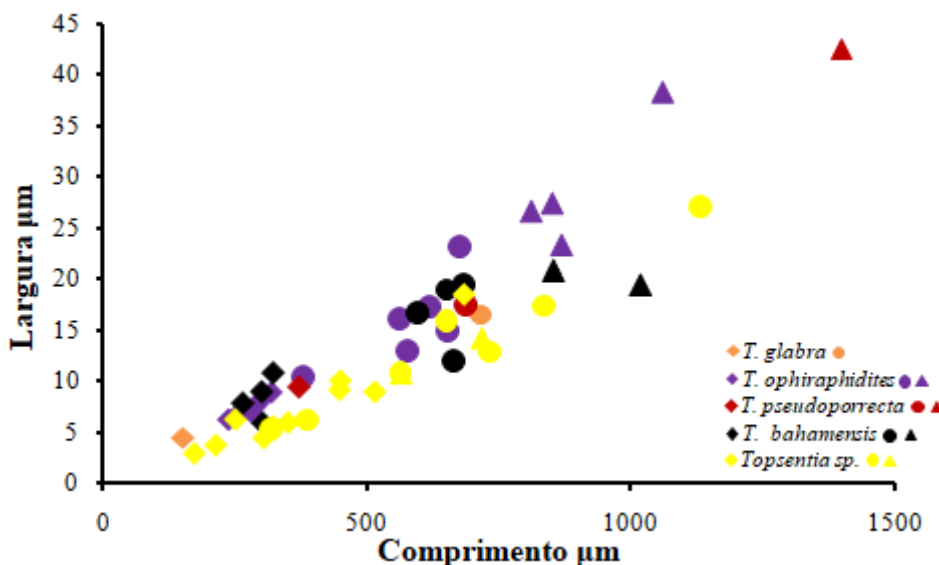
Topsentia sp. nov.
(Figuras 34, 35 e 36 e Tabela 11)

Material examinado. MNRJ: 20224, 21714, 21727, 21728, 21729, 21730, 21731, 21734, 21736, 21737.

Descrição. A esponja é maciça com projeções fistulares ou lobulares fusionadas pela base. A superfície é microhispida com relevo irregular e quase lisa. Os ósculos são pequenos, dispersos, normalmente situados no topo de pequenas projeções vulcaniformes. A consistência é dura, mas quebradiça. A cor é externa em vida, branca ou cinza (menos comum) com manchas vinho e creme na superfície. Internamente a coloração é esbraquiçada (Figura 32). No álcool torna-se bege, com a maioria das manchas desaparecendo por completo.

Espículas. Óxeas curvas fusiformes grossas ou finas, em duas ou três categorias de tamanho. Não há óxeas sinuosas (Figura 33).

Figura 36 – Relação entre as médias do comprimento (μm) e da largura (μm) das óxeas observados no gênero *Topsentia*.



Legenda: Cada símbolo representa uma categoria de tamanho diferente para as óxeas em *Topsentia* spp. Losango indica a menor categoria, círculo a média e triângulo a maior. Cada cor representa uma espécie/morfotipo diferente.

Fonte: O autor, 2019.

Esqueleto. Esqueleto ectossomal sem especialização, formado por óxeas pequenas justapostas e atravessando a superfície. Esqueleto coanossomal denso e confuso, óxeas distribuídas aleatoriamente (Figura 35).

Ecologia. As esponjas habitam áreas protegidas da luz e de forte hidrodinamismo. Invertebrados de táxons são encontrados sobre ou dentro dos espécimes.

Distribuição. Ceará, Fernando de Noronha e Bahia, Brasil.

Comentários. *Topsentia* sp. nov. se difere de *T. ophiraphidites* pela ausência de pequenas óxeas sinuosas, a qual é denominada ofirráfide, e que é o caráter diagnóstico da segunda espécie. Além disso, muitas óxeas finas foram observadas no morfotipo aqui descrito, o que não ocorre em *T. ophiraphidites*. A ausência de ofirráfides já foi evidenciada em alguns trabalhos no nordeste do Brasil (MURICY *et al.*, 2008; HAJDU *et al.*, 2011; MORAES, 2011). No Brasil, *T. ophiraphidites* tem a sua distribuição mantida apenas para o estado da Bahia, tanto na Baía de Todos os Santos quanto na Baía de Camamu.

3.5 Discussão

A ordem Suberitida é aceita, mas a sua definição ainda permanece em debate porque a descrição do grupo é considerada insatisfatória. Basicamente, as esponjas são identificadas pelos tipos espiculares e como eles se distribuem no esqueleto, adicionados a caracteres externos, como forma de crescimento, tipo de superfície, consistência e cor (ver exemplos em DE VOS *et al.*, 1991). Esta confusão se dá porque as famílias Stylocordylidae, Suberitidae e Halichondriidae formam um grupo monofilético (ver Capítulo 3 e referências em CHOMBARD e BOURY-ESNAULT, 1999; MORROW e CÁRDENAS, 2015), mas, morfológicamente, estas famílias possuem características muito distintas, sendo inclusive diagnosticadas por ausência de caracteres. Um exemplo clássico é a diagnose de Suberitidae como sendo um grupo representado pela ausência de um córtex reconhecível (VAN SOEST, 2002b) ou pela presença de poucos caracteres, como esqueleto ectossomal tangencial e coanossomal confuso e ausência de microscleras em Halichondriidae (ALVAREZ e HOOVER, 2010). Entretanto, as diagnoses atuais das famílias não condizem com as descrições de todos os representantes de cada uma dessas famílias (VAN SOEST *et al.*, 1990). Neste exemplo, os autores evidenciaram que a diagnose de Halichondriidae só era bem aplicada para o gênero tipo, ou seja, para o gênero *Halichondria*. Mesmo assim, reconstruções filogenéticas com marcadores nucleares têm indicado parafilia no gênero (REDMOND *et al.*, 2013; THACKER *et al.*, 2013; GASTALDI *et al.*, 2018). Esta parafilia sugere que as espécies *H. marianae* e *H. melanadocia* (Atlântico Tropical Ocidental), *H. magniconulosa* (Caribe) e *H. okadai* (Japão) descritas como *Halichondria* e que formam um complexo de espécies, provavelmente, não são do gênero *Halichondria*, pois estão pouco relacionadas com o clado onde a espécie tipo *H. panicea* se insere. Os demais gêneros da família, naquele momento ainda tratada como ordem Halichondrida, apresentam características adicionais e, algumas vezes, opostas às da diagnose do grupo. Assim, a reexaminação dos holótipos de todos os gêneros é fundamental para que se tenha uma real clareza dos caracteres morfológicos diagnósticos dos gêneros de Suberitida.

Neste capítulo foi possível redescrever espécies e descrever novas espécies, utilizando exclusivamente características morfológicas. Por outro lado, alguns morfotipos foram discriminados, porém a identificação específica não foi possível de ser realizada devido à sobreposição de caracteres com espécies já conhecidas. Sendo assim, pode-se dizer que existem características diagnósticas para os representantes de Suberitida e por isso a

redefinição de alguns grupos é necessária. Dentre as 29 descrições e redesccrições, cinco se tratam de novas espécies, sendo um gênero ressuscitado para alocar uma delas. Algumas espécies foram mantidas como sp., porque as diferenças ainda não são robustas o suficiente para definí-las como novas espécies ou alocar em espécies já existentes e, por isso, a taxonomia integrativa é fundamental (BOURY-ESNAULT *et al.*, 2013). Esta decisão poderia ser tomada ao observar as relações de tamanho das principais espículas de cada gênero, como indicado nos gráficos de dispersão, mas a classificação taxonômica baseada exclusivamente na análise do tipo e tamanho das espículas de Porifera já se mostrou muito equivocada, principalmente em gêneros contendo espículas com ampla variação de tamanho e diferentes categorias de tamanho. Para dimensionar tal equívoco basta comparar os grupos existentes no *Systema Porifera* (HOOPER e VAN SOEST, 2002a) com a última proposta de Morrow e Cárdenas (2015) que levaram em consideração a taxonomia integrativa. Diversas descrições foram consideradas como cf., pois ainda são necessárias mais comparações, sobretudo com espécimes da região tipo de cada espécie. Em 2016, por exemplo, Erpenbeck e colaboradores afirmaram que a taxonomia de Porifera só faz sentido se for feita quando comparada ao material tipo. A partir da comparação com o tipo, pode-se definir neste estudo que o morfotipo cf. *Terpios* não se trata de uma espécie do gênero *Terpios*, uma vez que o tilóstilo globoso e a perda de cor após a fixação não são característicos do gênero (RÜTZLER e SMITH, 1993). Grande parte dos UTOs que são considerados como possíveis novas espécies de Suberitida foram coletados em habitats de fácil acesso, como poças de maré e costões rochosos rasos (<5 m). Assim, fica evidente que a diversidade de Porifera ainda é subestimada nas regiões tropicais do continente americano e que ainda existem diversas esponjas esperando para serem descritas em áreas que despendem de baixo custo energético e financeiro.

Para a família Suberitidae, três gêneros foram identificados neste estudo: *Aaptos*, *Suberites* e *Terpios*. *Aaptos* sp. 1, *Aaptos* sp. 2 e *Aaptos* sp. 3 possuem características morfológicas singulares em combinação, porém as características morfológicas normalmente utilizadas na descrição de poríferos, como tipo de espícula, arquitetura esquelética, forma de crescimento e cor, variam pouco dentro do gênero (KELLY-BORGES e BERGQUIST, 1994). Exemplos desta pouca variação de caracteres pode ser evidenciada pela presença de espículas mucronadas ou telescópicas encontradas em *Aaptos* sp. 1, mas que também podem ser vistas em espécies registradas por Carvalho *et al.* (2013) e por Moraes (2011) para a Bacia Potiguar e para o Atol das Rocas, mesma localidade do morfotipo aqui analisado. O último autor, descreveu esta espécie como *Aaptosa aptos* (Schmidt, 1864), contudo, após uma

revisão para o Brasil, Carvalho *et al.* (2013) definiram que a espécie não ocorre no país. Para *Aptos* sp. 2, a presença de óxeas pode ser considerado um forte caráter diagnóstico, pois nenhuma outra espécie de *Aptos* descrita para o Brasil até o momento possui esta espícula em seu conjunto esquelético. Entretanto, as óxeas observadas no esqueleto do morfotipo não são abundantes, o que gera uma dúvida quanto a sua real existência. Por fim, o morfotipo 3 está localizado no Rio de Janeiro e possui estrongilóxeas maiores do que 2000 µm com pontas são agudas e não telescópicas, diferenciando-se das demais espécies. Possivelmente, este morfotipo se trata de *Aptos* sp., como descrita por Muricy e Hajdu (2006) para a região Sudeste. Solé-Cava *et al.* (1981) descreveram *Aptos aptos* para o estado do espírito Santo, também na região Sudeste. Porém, a inexistência da menor categoria de estrongilóxeas e os estilos maiores do que do tipo de *A. aptos* (ver revisão em KELLY-BORGES e BERGQUIST, 1994) indica que esta identificação foi errônea. Adicionalmente, os exemplares avaliados por Solé-Cava *et al.* (1981) não possuem espículas maiores do que 1600 µm, diferenciando-a também do morfotipo *Aptos* sp. 3. Sendo assim, é possível que mais três espécies de *Aptos* sejam descritas para o litoral brasileiro, somando-se às já descritas *A. aglutinans*, *A. bergmanni*, *A. hajdui* e *A. potiguarensis*.

A maior representação do gênero *Suberites* é dada em águas frias com apenas 10% de suas espécies distribuídas nas águas tropicais ocidentais do Atlântico. No presente estudo, a ampla distribuição de *Suberites aurantiacus* por toda a região Tropical e Subtropical Atlântica foi corroborada. A espécie possui, desde o Golfo do México (RÜTZLER *et al.*, 2009) até o estado de Santa Catarina (MURICY *et al.*, 2015), no Brasil, o mesmo padrão morfológico com crescimento maciço, superfície rugosa e aveludada, cor verde externamente e esqueleto quase radial composto por tilóstilos em duas categorias de tamanho e buquês abertos. A única exceção para a espécie, evidenciada em espécimes para o Caribe (COLLIN *et al.*, 2005) e Brasil (MURICY e HAJDU, 2006), é a de que a típica coloração verde externamente pode variar desde vermelho até roxo, sendo a cor amarela internamente invariável. A variação de cor existente em *S. aurantiacus* é um caráter que deve ser levado em consideração, mas não pode ser superior às características esqueléticas da espécie. Aqui, *Suberites* sp. nov. e *Suberites* sp. 1 se enquadram na variação de cor de *S. aurantiacus*, porém divergem, especialmente, na forma dos buquês ectossomais. Além disso, *Suberites* sp. nov. possui tilóstilos muito maiores do que *S. aurantiacus*, o que difere ambas as espécies, em definitivo. O tipo de buquê ectossomal é um caráter que nunca foi levado em consideração na taxonomia alfa do gênero, a qual elenca majoritariamente a presença de tilóstilos em duas categorias de tamanho e a forma do corpo, como características diagnósticas (RÜTZLER e SMITH, 1993).

Porém, a cor é um caráter tão plástico em Porifera, que algumas espécies podem apresentar cores diferentes, mas o mesmo genótipo (LÓPEZ-LEGENTIL *et al.*, 2010). Diferentes morfotipos da espécie *S. diversicolor* da Indonésia possuem duas linhagens genéticas distintas Becking *et al.* (2013), evidenciando plasticidade fenotípica no primeiro caso e cripticismo no segundo. Portanto, para resolver a taxonomia de *Suberites*, é fundamental que detalhes morfológicos sejam levados em consideração, sendo os principais deles, a forma do buquê e o tipo de tilo que caracteriza cada espécie.

Terpios fugax é a espécie tipo do gênero e que tem uma distribuição exclusiva para o Oceano Atlântico, nas Américas Central e Sul (DUCHASSAING e MICHELOTTI, 1864; RÜTZLER e SMITH, 1993; MURICY e HAJDU, 2006; PÉREZ *et al.*, 2017). Contudo, diversos autores registraram, erroneamente, a espécie para o litoral da Europa (STEPHENS, 1915; TOPSENT, 1934; BOURY-ESNAULT, 1971; BOURY-ESNAULT e LOPES, 1985; CRUZ, 2002), África (LÉVI, 1952) e para o Oceano Índico (THOMAS, 1985). O equívoco na identificação da espécie se dá pela sua cor azul em crostas extremamente finas, fixadas em substratos duros. Esta é uma característica quase que exclusiva em Porifera. O que diferencia *T. fugax* dos seus congêneres azuis, *T. manglaris* no Atlântico Ocidental e *T. gelatinosus* na Europa e Atlântico Oriental é a forma do tilo, nos tilóstilos. Os tilos dos espécimes aqui descritos para *T. fugax* se assemelham muito com a variação apresentada por Rützler e Smith (1993) para o Caribe. O mesmo pode ser dito para o único exemplar de *T. manglaris* obtido neste estudo, o qual apresentou um tilo achatado e quadrilobado como descrito pelos autores supracitados. Por sua vez, os três exemplares obtidos do mar Mediterrâneo possuem particularidades que indicam ser espécies diferentes. MNRJ 21813 possui tilo globoso e perde a cor após a fixação, caracterizando-se como fora de *Terpios*. Possivelmente, este morfotipo se refere a uma *Protosuberites*, mas a classificação só será realizada após a filogenia. Por sua vez, MNRJ 21814 e 21815 não perdem a cor azul e possuem tilo alongado e multilobado aproximando-se a *T. gelatinosus*. As reconstruções filogenéticas com esta espécie contam histórias diferentes ao compararmos os dados de 28S de Morrow *et al.* (2012) e de Idan e colaboradores (2018) e, portanto, uma definição não pode ser tomada. Porém, é possível que *T. gelatinosus* seja uma espécie separada de *T. fugax*. Por outro lado, os espécimes com tilos cilíndricos em vez de multilobados e que se mantêm na cor azul, correspondem a uma nova espécie de Suberitidae. Além das espécies de cor azul, aqui foram analisados espécimes de *Terpios* na coloração laranja para o Nordeste e Sudeste do Brasil, os quais representam a espécie *T. belindae*, cujos tilos são achatados e multilobados (RÜTZLER e SMITH, 1993). Sendo assim, a distribuição da espécie previamente descrita inicialmente para Belize e,

posteriormente, para o estado do Amapá (MOTHES *et al.*, 2006), agora amplia-se até o Rio de Janeiro, incluindo o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, no estado da Bahia.

Com relação à família Halichondriidae, 15 UTOs representando quatro ou cinco gêneros foram descritos no presente estudo. Esta dúvida se deve ao fato de a presença de *Topsentia* em Halichondriidae ser extremamente duvidosa. Até o momento, *Amorphinopsis atlantica* era a única representante do gênero localizada no Oceano Atlântico (CARVALHO *et al.*, 2004; VAN SOEST *et al.*, 2019). De acordo com o tamanho das espículas (óxeas e estilos) parece que existe uma nova espécie de *Amorphinopsis* para as Américas, desta vez para o sul do Caribe. A definição deste espécime como uma nova espécie só não foi realizada com base nos caracteres morfológicos, porque os fragmentos obtidos na coleção de Porifera do MNRJ são muito pequenos, impossibilitando a descrição minuciosa dos caracteres externos, apesar da estrutura esquelética apontar grandes diferenças com relação ao congênere da América do Sul atlântica, o qual possui apenas uma categoria de óxeas com valores máximos de 825 μm (CARVALHO *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2018), enquanto o novo morfotipo possui duas categorias de óxeas ultrapassando 1500 μm . O espécime analisado aqui, se enquadra em *Amorphinopsis* por apresentar o conjunto espicular com duas categorias de óxeas e uma categoria menor de estilos em um esqueleto levemente confuso como as características descritas para a espécie tipo *A. excavans* (CARTER, 1887) no Oceano Índico e uma morfologia externa similar a de *A. atlantica*.

De acordo com as características morfológicas, foi constatada a presença de *Halichondria melanadocia* para os estados do Maranhão, Pernambuco e Bahia e para o Caribe. *Halichondria marianae* é outra espécie do gênero que observada em ambas as regiões. A segunda espécie, por exemplo, foi diagnosticada pela presença da combinação de óxeas maiores do que 500 μm e coloração verde escura (SANTOS *et al.*, 2018), diferenciando-a de *H. melanadocia* que é descrita com óxeas chegando a 450 μm e cor preta acinzentada externamente e verde amarelada internamente (DE LAUBENFELS, 1936; DÍAZ *et al.*, 1993). Neste estudo, foram tratados como *H. melanadocia* os espécimes cujas espículas não ultrapassaram 700 μm e que apresentavam coloração verde escura a preta, com o interior verde amarelado. Aqui, todos os espécimes tiveram duas categorias de óxeas, assim como foi observado em um espécime do Caribe por (DÍAZ *et al.*, 1993). Já *H. marianae* foi descrita pela observação de óxeas fusiformes em duas categorias de tamanho e ultrapassando os 800 μm , tanto no Nordeste do Brasil quanto no Caribe. Além disso, foram observados espécimes na cor verde e amarela. Grande parte dos representantes deste gênero é de difícil identificação morfológica, pois apresentam um conjunto espicular pouco variável (DÍAZ *et al.*, 1993;

ALVAREZ e HOOPER, 2010), aumentando o poder diagnóstico para os caracteres fenotípicos, os quais podem variar grandiosamente de acordo com as condições ambientais. Embora a dispersão das médias das óxeas não tenha se mostrado uma ferramenta útil na diferenciação de espécies de *Halichondria*, sugere-se que as diagnoses das espécies deste gênero sejam mais minuciosas, evidenciando especificidades quantitativas, aliadas às qualitativas. Ambas as espécies precisam ter as suas diagnoses revistas, adicionando-se as medidas máximas e mínimas de ambas as categorias espiculares e evidenciando toda a variação externa das espécies.

Ainda com relação ao gênero *Halichondria*, o único espécime encontrado para o Maranhão com cor acinzentada e superfície rugosa, *Halichondria* sp. 1 se distingue das demais espécies de *Halichondria* distribuídas pelo Atlântico Ocidental pela presença de óxeas em duas categorias, sendo a segunda superior a 1200 μm . Devido à presença desta espécie, a dispersão das médias das óxeas não se mostrou uma estratégia boa o suficiente para diferenciar as espécies. A única espécie encontrada na região que possui óxeas maiores do que 1000 μm é *H. lútea* de Cuba. Porém, ambas as espécies se diferenciam quanto à forma de crescimento, cor e habitat (DÍAZ *et al.* 1993). No Brasil, *H. marianae* é a espécie mais similar ao morfotipo sp. 1 descrito aqui, mas grandes diferenças internas e externas são observadas. Por fim, *Halichondria* sp. nov. encontrada na Baía da Ilha Grande, Rio de Janeiro, não possui muitos caracteres diagnósticos de *Halichondria*, mas ao mesmo tempo suas características morfológicas a tornam uma espécie totalmente diferente das demais já descritas para a região Sudeste do Brasil (CARVALHO e HAJDU, 2001). De acordo com vanSoest *et al.* (2019), existem 15 espécies válidas de *Halichondria* (*Halichondria*) para o Oceano Atlântico Tropical e Subtropical. Destas, nove espécies são restritas para a região Tropical (Mar do Caribe, Golfo do México e Flórida), quatro são exclusivas para a região costeira do Brasil (Sudeste) e *H. marianae* e *H. melanadocia* são compartilhadas entre estas regiões (Caribe e Nordeste brasileiro). A identificação das espécies de *Halichondria* precisa ser feita através da separação de categorias de espículas e com o auxílio de ferramentas moleculares para que se possa distinguir variação interpopulacional de interespecífica.

Hymeniacidon é um gênero amplamente distribuído com mais de 50 espécies existentes, sendo a sua maior representatividade em águas temperadas (VAN SOEST *et al.*, 2019). Para o OATO, Mar do Caribe e Golfo do México, apenas três espécies são descritas. Apesar de *Hymeniacidon heliophila* ser considerada amplamente distribuída na região (desde os EUA até o Sudeste do Brasil), as espículas dos espécimes do Rio de Janeiro são exclusivamente estilos, assim como na diagnose do gênero (ERPENBECK e VAN SOEST,

2002), mas diferindo dos possíveis subtilóstilos descritos para os espécimes dos EUA e Caribe (DÍAZ *et al.*, 1993; VAN SOEST, 2017). Esta diferença indica que possivelmente os espécimes de *H. heliophila* do Brasil representam uma espécie distinta. Recentemente, em uma revisão da espécie tipo do gênero, *H. perlevis*, Gastaldi e colaboradores (2018) elucidaram a existência de lobos nos estilos de indivíduos da Argentina e indicaram o agrupamento desta espécie com *H. sinapium* e *H. heliophila*, por meio de uma filogenia com a subunidade da citocromo c oxidase (COX1). A partir do exposto é possível, algumas hipóteses podem ser criadas: i) *H. heliophila* do Sudeste do Brasil representa uma nova espécie dentro do gênero, contendo exclusivamente estilos curtos, ii) *H. perlevis* da Argentina, assim como *H. heliophila* do Caribe, ambas com capacidade de produzir subtilóstilos como megascleras, são representantes de um novo gênero e iii) se as duas hipóteses anteriores forem refutadas por dados morfológicos e moleculares comparando indivíduos das localidades tipo de cada espécie, a diagnose do gênero *Hymeniacidon* deve ser modificada. Apesar de faltarem dados comparativos das espécies de localidades tipo, é muito provável que a diagnose do gênero tenha que ser modificada para espécies contendo estilos e subtilóstilos, já que essas espécies parecem formar um complexo de espécies fortemente relacionado.

Ainda sobre o gênero *Hymeniacidon*, neste estudo uma nova espécie foi identificada para o estado do Maranhão, apresentando um corpo coberto por fístulas cilíndricas. *Hymeniacidon caerulea* foi observada tanto em águas caribenhas quanto brasileiras, sendo este o primeiro registro da espécie para o litoral do Brasil. A espécie foi registrada no corredor de esponjas marinhas, localizado abaixo da foz do Rio Amazonas (COLLETTE e RÜTZLER, 1977; MOURA *et al.*, 2016), ambiente que forma um complexo sistema recifal e faz desta região, uma faixa transitória entre as faunas caribenhas e brasileiras. A dispersão dos valores médios dos estilos indica baixa amplitude no tamanho dessas espículas e indica que a grande maioria das espécies analisada possui uma média de espículas com valores menores do que 500 µm, como descrito na diagnose do gênero (ERPENBECK e VAN SOEST, 2002). Sendo assim, qualquer espécie sem papilas e contendo uma média dos estilos maior do que 500 µm ou em mais de uma categoria deve ser descrita em um gênero distinto.

Rhaphidostyla sp. nov. foi registrada para as baías de Todos os Santos (Bahia) e Ilha Grande (Rio de Janeiro). Este morfotipo possui cor branca, presença de fístulas bifurcadas e estilos e óxeas como megascleras, mas sem localização específica no esqueleto, aproximando-o de Halichondriidae (preferencialmente, *Amorphinopsis*, *Ciocalapatae* *Ciocalypa*) e distingue de Myxillidae e Raspaillidae (VAN SOEST *et al.*, 1990). Contudo, análises

filogenéticas com o marcador nuclear 18S apontaram a similaridade da espécie com *Hymeniacidon kitchingi*, porém ambas em um ramo muito longo, indicando alta taxa de mutação presente nestas espécies atualmente. A ressurreição do gênero *Rhaphidostyla* Burton, 1935 deve ser realizada para alocar *R. kitchingi* e a nova espécie de *Rhaphidostyla* aqui descrita. Diante de tantas contradições aquele gênero, a alta similaridade morfológica entre as espécies e o baixo grau de variação esquelético entre as espécies (DÍAZ *et al.*, 1993; ERPENBECK e VAN SOEST, 2002) fica evidente que estudos filogenéticos são essenciais para compreender o posicionamento das espécies de *Hymeniacidon* e delimitar sua variação morfológica dentro da família Halichondriidae.

Dentro do gênero *Topsentia*, três morfotipos foram evidenciados de acordo com a forma e tamanho das óxeas e estrutura esquelética. *Topsentia* cf. *bahamensis*, foi diagnosticada por apresentar espículas robustas, em duas ou três categorias de tamanho, sendo as óxeas ora lisas ora deformadas e com esqueleto confuso, corroborando a diagnose do tipo encontrado na região caribenha (DÍAZ *et al.*, 1993). As projeções fistulares descritas para os espécimes tipos, não foram observadas nos indivíduos descritos aqui, sendo esta a maior diferença encontrada. Espécimes de *Topsentia ophiraphidites* foram encontrados tanto do Caribe quanto no Brasil, corroborando descrições prévias (DE LAUBENFELS, 1934; DÍAZ *et al.*, 1993). Contudo, na Amazônia Azul, outro morfotipo de *Topsentia* foi encontrado, o qual foi aqui determinado como *Topsentia* sp. nov. A maior diferença morfológica entre ambos os morfotipos é que *T. ophiraphidites* possui óxeas pequenas sinuosas, ou seja, muito deformadas, as quais não são observadas em *Topsentia* sp. nov. A dispersão do tamanho das espículas no gênero mostra claramente a diferenciação no tamanho das espículas de categorias distintas, sendo esta uma forma adicional na descrição de espécies do gênero.

A decisão de separar *T. ophiraphidites* do Brasil e do Caribe em dois morfotipos distintos se dá pelo fato das pequenas óxeas modificadas, serem chamadas ofirráfides e darem o nome à espécie. Exemplares de *T. ophiraphidites* parecem se distribuir pela região caribenha e nas baías do estado da Bahia, Nordeste do Brasil (DÍAZ *et al.*, 1993, LAGE, 2013), enquanto *Topsentia* sp. nov. é encontrado ao longo do litoral nordestino do Brasil e nas ilhas oceânicas brasileiras (MURICY *et al.*, 2008; HAJDU *et al.*, 2011; MORAES, 2011). Estudos experimentais com *Topsentia* sp. nov. e *T. ophiraphidites* são necessários para testar a hipótese de crescimento e modificação no tipo espicular em ambientes com diferentes concentrações de sílica. Isto se faz necessário devido a capacidade de esponjas, como a poecilosclerida *Crambe crambe* (Schmidt, 1862), produzirem espículas altamente deformadas e compactas, do tipo desma, em ambientes com altas concentrações de sílica, assim como,

suprimir tal espícula em ambientes com menor disponibilidade deste composto (MALDONADO *et al.*, 1999).

Apesar da identificação de diversas espécies ter sido realizada com sucesso neste estudo, a necessidade de utilizar a taxonomia integrativa em Suberitida é evidente. Isso se dá porque a maioria dos gêneros possui caracteres diagnósticos pouco variáveis, como esqueleto confuso, mas com possível formação de tratos, sem muita definição, em Halichondriidae (ERPENBECK e VAN SOEST, 2002), e a formação de um esqueleto radial ou tendendo para radial com terminações em buquês ou em uma paliçada, em Suberitidae, mas sem uma definição de córtex desenvolvido (VAN SOEST, 2002b). Por outro lado, a maioria dos caracteres normalmente utilizados na diagnose das espécies de Suberitida é plástica, tais como a forma de crescimento e a cor nos gêneros *Suberites*, *Halichondria* e *Hymeniacidon*. O tipo espicular, que geralmente é diagnóstico de gêneros, não pode ser utilizado sozinho em Suberitida, uma vez que a diagnose da ordem aponta a ausência de microscleras, mas centrotilotos e tricotragmas podem ser encontrados em *Stylocordyla*, *Epipolasis*, *Suberites* e *Rhizaxinella* (VAN SOEST, 2002a,b). Além disso, óxeas e estilos, em conjunto, são comuns nos gêneros *Amorphinopsis*, *Ciocalapata*, *Ciocalypta* e *Laminospongia* (Halichondriidae), enquanto, *Vosmaeria* pode ter tilóstilos em adição às óxeas (ERPENBECK e VAN SOEST, 2002). Ou seja, o conjunto espicular e a sua distribuição no esqueleto em Suberitida não são suficientes para identificar espécies. Por isso, o detalhamento nos caracteres morfológicos externos e internos aliado aos estudos citológicos e reprodutivos e a utilização de ferramentas moleculares, como realizado em Ereskovsky *et al.* (2014), é fundamental para a descrição das espécies desta ordem.

4. A UTILIZAÇÃO DA METABOLÔMICA EM PROL DE UMA TAXONOMIA INTEGRATIVA EM SUBERITIDA²

4.1 Introdução

As esponjas são exímias produtoras de substâncias químicas, apresentando uma grande diversidade de substâncias (KORNPROBST, 2005). Em 2016, Blunt e colaboradores, em sua revisão anual sobre Produtos Naturais Marinhos, apontaram os poríferos como os maiores produtores de compostos químicos do ambiente marinho, dado corroborado por Ióca *et al.*, (2018), em uma revisão para o Brasil. O interesse pela química das esponjas teve início com Bergmann e Freeney (1950) descrevendo novos nucleosídeos para esponjas e desde então a descoberta de novos metabólitos parece não ter fim. Hoje se sabe que grande parte dos produtos químicos tóxicos produzidos por esponjas, são provenientes de microrganismos associados (HENTSCHEL *et al.*, 2006) e a elucidação da origem dos compostos ainda é a principal barreira no estudo de metabólitos em esponjas marinhas. Porém, estudos metagenômicos (YANG *et al.*, 2011) e a excitação de células específicas em esponjas podem ser capazes de elucidar a real origem do composto químico (TERNON *et al.*, 2016).

A classe de substâncias químicas mais estudada em Porifera é a dos esteróis, um álcool secundário ligado a um composto tetracíclico (três anéis hexagonais e um pentagonal) e uma cadeia lateral ligada ao C₁₇ (BERGMANN, 1949, 1962; SICA *et al.*, 1978; MAKARIEVA *et al.*, 1983; BERGQUIST *et al.*, 1991b; SARMA *et al.*, 2005). Por sua vez, os alcalóides também são comuns nestes invertebrados e podem ser provenientes de aminoácidos, terpenos e esteróis (NAKAMURA *et al.*, 1987; KOBAYASHI *et al.*, 1997; OHNO *et al.*, 2011) e normalmente possuem sufixo -ína, em sua nomenclatura.

Nas últimas décadas, a quantidade de esteróis isolados em esponjas marinhas tem sido pequena e as novas classes de compostos químicos que vêm ganhando espaço é a de terpenos e peptídeos. Junto com os alcalóides, essas três classes representam mais de 50% das novas substâncias descritas (MEHBUB *et al.*, 2014). Estes autores evidenciaram que as atuais

² Parte deste capítulo será publicado na revista Metabolomics sob autoria de Humberto F. M. Fortunato, Stephane Greff, Gisele Lôbo Hajdu e Thierry Pérez com o título “*Untargeted metabolomics analysis evidenced putative chemomarkers and plastic pollutants in spiculate marine sponges (Porifera: Suberitida)*” (in press).

Suberitida, antigas ordens Halichondrida e Hadromerida, representam juntas, o segundo maior grupo de esponjas estudadas na busca por novos compostos na última década.

Assim como apresentam grande diversidade morfológica, as Suberitida também produzem metabólitos de distintas classes (Tabela 12; as massas exatas foram calculadas no ChemCalc (PATINY e BOREL, 2013). Os esteróis, os alcalóides e os terpenos representam as classes de substâncias mais comumente encontradas, enquanto que os ácidos graxos não são tão comuns na ordem (KORNPROBST, 2005). Diante de toda a diversidade de metabólitos presentes nos poríferos, os esteróis e os alcalóides têm sido considerados como os mais abundantes e, ainda, com possível função taxonômica (BERGQUIST *et al.*, 1991a; BARNATHAN *et al.*, 2004; KORNPROBST, 2005). Erpenbeck e van Soest (2007) informaram que poucos compostos parecem ter potencial quimiotaxonômico em Porifera, dificultando a ação desta ferramenta na sistemática. Contudo, nos últimos anos, técnicas de espectrometria de massa em tandem vêm elucidando vias metabólicas e compostos específicos em tecido orgânico, favorecendo a utilização deste tipo de técnica na identificação de compostos químicos, inclusive na taxonomia (DA SILVA *et al.*, 2015).

A família Halichondriidae é rica em esteróis polimetilados e trissulfatados (ex: topsentinol e ophirasterol), sesqui e diterpenos nitrogenados (ex: isonitrila), os quais são compartilhados com a família Axinellidae (POMPONI *et al.*, 1991; KORNPROBST, 2005). Neste grupo, diversos metabólitos apresentam atividades antiinflamatórias, antitumorais e antivirais (MIOSO *et al.*, 2017), sendo os poliéteres ácido ocadáico (TACHIBANA *et al.*, 1981) e as halichondrinas (HIRATA e UEMURA, 1986) altamente tóxicos. Porém, halichondrina B possui baixa concentração nas esponjas, impossibilitando a sua comercialização (SIPKEMA *et al.*, 2005). Os representantes da família Halichondriidae possuem uma forte relação com microbiontes (DUCKWORTH e POMPONI, 2005; XUE e ZHANG, 2009), os quais produzem compostos bioativos (THOMAS *et al.*, 2010). Dentro desta família, os gêneros *Halichondria*, *Hymeniacidon* e *Topsentia* são relativamente bem estudados, enquanto o conhecimento sobre a química de *Amorphinopsis* é praticamente nulo (PATEL, 2010; BLUNT e MUNRO, 2016).

Tabela 12 – Algumas substâncias químicas já isoladas de diferentes gêneros de Suberitida. (continua)

Gênero	ID*	Substância	Classe	Formula	Massa (g/mol)	Referências
<i>Aptos</i>	L728	Aaptamina	Alcalóide	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₂	228.0898	Nakamura <i>et al.</i> , 1982
	L18677	Ciliatamida A	Polipeptídeo	C ₂₆ H ₃₉ N ₃ O ₃	427.2835	Nakao <i>et al.</i> , 2008
	L18678	Ciliatamida B	Polipeptídeo	C ₂₄ H ₃₇ N ₃ O ₃	415.2835	Nakao <i>et al.</i> , 2008
	L18679	Ciliatamida C	Polipeptídeo	C ₂₅ H ₃₇ N ₃ O ₃	441.2991	Nakao <i>et al.</i> , 2008
	L6257	Aaptosina	Alcalóide	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₂	228.0898	Rudi e Kashman, 1993
<i>Halichondria</i>	L20110	Aaptanona	Alcalóide	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₄	258.0640	Utkina <i>et al.</i> , 2009
	L23935	Halichroma A	Alcalóide	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O	276.1262	Abe <i>et al.</i> , 2012
	L21813	Franknolídeo A-C	Esterol	C ₂₉ H ₃₉ ClO ₁₁ P	629.1918	Zhang <i>et al.</i> , 2010
	L15763	Halichonadina A	Sesquiterpeno	C ₃₁ H ₅₂ N ₂ O	468.4080	Ishiyama <i>et al.</i> , 2005
	L15764	Halichonadina B	Sesquiterpeno	C ₁₇ H ₂₉ NO ₂	279.2198	Ishiyama <i>et al.</i> , 2005
	L15765	Halichonadina C	Sesquiterpeno	C ₁₆ H ₂₅ N	231.1987	Ishiyama <i>et al.</i> , 2005
	L15766	Halichonadina D	Sesquiterpeno	C ₁₅ H ₂₇ N	221.2143	Ishiyama <i>et al.</i> , 2005
	24853965	Halichonadina E	Sesquiterpeno	C ₃₁ H ₅₂ N ₂ O	468.4080	Kozawa <i>et al.</i> , 2008
	L14021	Halichondramina	Alcalóide	C ₃₂ H ₅₆ N ₂	468.4443	Chill <i>et al.</i> , 2002
	10010725	Halichondramida	Macrolídeo	C ₄₄ H ₆₀ N ₄ O ₁₂	836.4207	Kernan e Faulkner, 1987
		Halistanol	Esterol	C ₂₉ H ₅₂ O ₃	448.3917	Fusetani <i>et al.</i> , 1981
		Hilindramida	Macrolídeo	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₅	466.2467	Kanazawa <i>et al.</i> , 1993
	5488895	Halichondrina B	Macrolídeo	C ₆₀ H ₈₆ O ₁₉	1110.576	Hirata e Uemura, 1986
	44581723	Homohalichondrina B	Macrolídeo	C ₆₁ H ₈₆ O ₁₉	1122.576	Hirata e Uemura, 1986
	101451497	Norhalichondrina A	Macrolídeo	C ₅₉ H ₈₂ O ₂₁	1126.535	Hirata e Uemura, 1986
<i>Hymeniacidon</i>	L4893	Manzacidina A	Alcalóide	C ₁₂ H ₁₄ BrN ₃ O ₄	343.0168	Kobayashi <i>et al.</i> , 1991
	L4894	Manzacidina B	Alcalóide	C ₁₂ H ₁₄ BrN ₃ O ₅	359.0117	Kobayashi <i>et al.</i> , 1991
	L4895	Manzacidina C	Alcalóide	C ₁₂ H ₁₄ BrN ₃ O ₄	343.0168	Kobayashi <i>et al.</i> , 1991
	L1069	1,9-dimetil-6-imino-8-oxopurina	Alcalóide	C ₇ H ₉ N ₅ O	179.0807	Ciminoet <i>et al.</i> , 1985
	L21723	Monamphilectina A	Alcalóide	C ₂₆ H ₃₉ N ₃ O ₂	425.3042	Avilés e Rodríguez, 2010
	3035462	Hymenialsidina	Alcalóide	C ₁₁ H ₁₀ BrN ₅ O ₂	323.0017	Ciminoet <i>et al.</i> , 1982
	L2414	Hymenidina	Alcalóide	C ₁₁ H ₁₁ Br ₂ N ₅ O	386.9331	Kobayashi <i>et al.</i> , 1986
	L831	3β-hidroximetil-24-methyl-A-nor-5-α-colestanol	Esterol	C ₂₈ H ₄₈ O	400.0735	Teshimaet <i>et al.</i> , 1980
	L10156	Tauroacidina A	Alcalóide	C ₁₃ H ₁₆ Br ₂ N ₆ O ₅ S	525.9270	Kobayashi <i>et al.</i> , 1997

Tabela 12 – Algumas substâncias químicas já isoladas de diferentes gêneros de Suberitida. (conclusão)

Gênero	ID*	Substância	Classe	Formula	Massa (g/mol)	Referências
<i>Hymeniacidon</i>	L10157	Tauroacidina B	Alcalóide	C ₁₃ H ₁₇ BrN ₆ O ₅ S	448.0164	Kobayashi <i>et al.</i> , 1997
	101720684	9-isocyanopupukeanana	Sesquiterpeno	C ₁₅ H ₂₅ N	219.1987	Burreson <i>et al.</i> , 1975
<i>Suberites</i>		Suberitenona A	Sesterterpeno	C ₂₇ H ₄₀ O ₄	428.2926	Shin <i>et al.</i> , 1995
		Suberitenona B	Sesterterpeno	C ₂₇ H ₄₂ O ₅	446.3032	Shin <i>et al.</i> , 1995
		Caminatano	Sesterterpeno	C ₂₅ H ₄₆	346.3599	Díaz-Marrero <i>et al.</i> , 2003
		Caminatal	Sesterterpeno	C ₂₇ H ₃₈ O ₅	442.2719	Díaz-Marrero <i>et al.</i> , 2003
		19-episuberitenona	Sesterterpeno	C ₂₇ H ₄₂ O ₄	352.2766	Díaz-Marrero <i>et al.</i> , 2004
<i>Terpios</i>	L18739	Terpiosídeo A	Glicolípídeo	C ₅₅ H ₁₀₇ NO ₁₄	1005.7691	Costantino <i>et al.</i> , 2008
	L21374	TerpiosídeoB	Glicolípídeo	C ₇₃ H ₁₃₇ NO ₂₈	1475.9327	Costantino <i>et al.</i> , 2010
	L906	5 α -24-norcolestano-3 β -ol	Esterol	C ₂₆ H ₄₆ O	374.3548	Deseth <i>et al.</i> , 1979
	L14335	Terpíodieno	Álcool	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	194.0943	Teruya <i>et al.</i> , 2002
	L15312	Nakiterpiosinona	Esterol	C ₂₇ H ₂₉ BrCl ₂ O ₇	614.0474	Teruya <i>et al.</i> , 2004
	L14827	Nakiterpiosina	Esterol	C ₂₇ H ₃₁ BrCl ₂ O ₇	616.0631	Teruya <i>et al.</i> , 2003
<i>Topsentia</i>	L14991	Ophirasterol	Esterol	C ₃₁ H ₅₀ O	438.3861	Calderón <i>et al.</i> , 2004
	L22227	24-etil-24-metilcolesterol	Esterol	C ₃₀ H ₅₂ O	428.4018	Echigo <i>et al.</i> , 2011
	L8225	Ophirapstanol trissulfatado	Esterol	C ₃₁ H ₅₃ N ₃ O ₁₂ S ₃	755.2791	Gunasekera <i>et al.</i> , 1994
	L17480	24R-isopropenilcolesta-5,22E-dien-3 β -ol	Esterol	C ₃₀ H ₄₈ O	424.3705	Echigo <i>et al.</i> , 2006
		Topsentiasterol A-B	Esterol	C ₃₀ H ₄₃ O ₁₆ S ₃ Na ₃	801.1488	Fusetani <i>et al.</i> , 1994
	91935892	Topsentiasterol E	Sterol	C ₃₁ H ₄₈ O ₁₃ S ₃ Na ₃	725.2340	Fusetani <i>et al.</i> , 1994
		Topsentina A	Alcalóide	C ₂₀ H ₁₄ N ₄ O	326.1168	Bartik <i>et al.</i> , 1987
		Topsentina B1	Alcalóide	C ₂₀ H ₁₄ N ₄ O ₂	342.1116	Bartik <i>et al.</i> , 1987
		Topsentina B2	Alcalóide	C ₂₀ H ₁₄ N ₄ O ₂ Br	407.0300	Bartik <i>et al.</i> , 1987
		Topsentinol K	Esterol	C ₃₀ H ₅₂ O ₃	460.3926	Dai <i>et al.</i> , 2010
		Topsentinol K trissulfatado	Esterol	C ₃₀ H ₄₉ O ₁₂ S ₃ Na ₂	743.2181	Dai <i>et al.</i> , 2010
		Topsentinol L	Esterol	C ₃₀ H ₅₂ O ₃	460.3920	Dai <i>et al.</i> , 2010
		Topsentolídeo A	Lípídeo	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	339.1927	Luo <i>et al.</i> , 2006
	44512489	Axisonitrila-3	Sesquiterpeno	C ₁₆ H ₂₅ N	231.1987	Alvi <i>et al.</i> , 1991

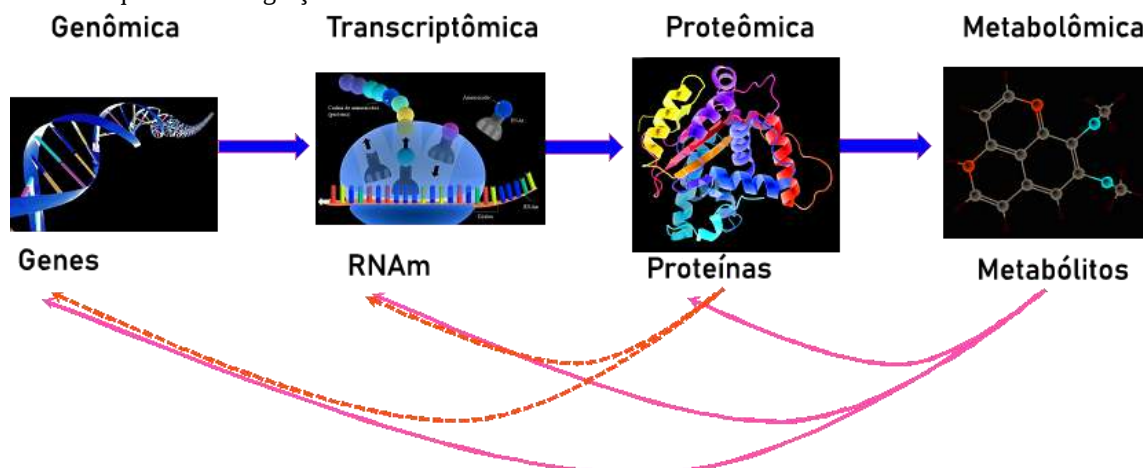
Legenda: As informações foram obtidas através de busca em artigos e nas plataformas MarinLit e PubChem, com acesso entre 31/08/2016 e 15/02/2019. *Identificação (ID) com L= dados provenientes do MarinLit, sem L=dados provenientes do PubChem e sem ID= dados provenientes de artigos científicos.

Fonte: O autor, 2019.

Na família Suberitidae, por sua vez, encontra-se o alcalóide aptamina, o qual é considerado um marcador químico, para o nível de família (BERGQUIST *et al.*, 1991a; VAN SOEST, 2002b), e com potente ação bioativa (NAKAMURA *et al.*, 1982; SHEN *et al.*, 1999; YU *et al.*, 2014). Esta família se caracteriza pela presença de sesterterpenos (DÍAZ-MARRERO *et al.*, 2004) e carotenóides aromáticos (KORNPROBST, 2005), mas ausência de triterpenos. Os esteróis majoritários são da classe dos estanois (MISHRA *et al.*, 1996), seguidos pelos peroxiesteróis (BARNATHAN, 1993) e esteróis halogenados (GAO *et al.*, 2010). A terceira família da ordem, Stylocordylidae, ainda tem a sua química desconhecida.

Atualmente, vivemos a era das ômicas, ramos da bioquímica que identificam e quantificam toda a estrutura molecular dos organismos, através do desenvolvimento de tecnologias ultramodernas (Figura 37). O funcionamento molecular está relacionado com a transcrição do DNA em um RNAm, o qual é traduzido em uma proteína. Esta é responsável pela transformação dos metabólitos, o produto final do metabolismo celular (VILLAS-BÔAS e GOMBERT, 2006). Assim, o transcriptoma, o proteoma e o metaboloma são reflexos das informações genéticas codificadas. A genômica se dedica a identificar a sequência completa do DNA de um indivíduo, podendo relacionar as características genéticas com processos evolutivos (GIBSON e MUSE, 2004; SEEHAUSEN *et al.*, 2014), através do sequenciamento de nova geração. A proteômica mapeia todas as proteínas expressas em um indivíduo e a transcriptômica é o conjunto de todos os RNAm transcritos por um organismo (VILLAS-BÔAS e GOMBERT, 2006). Estas áreas cresceram muito rapidamente com a criação de novas tecnologias, máquinas e softwares (ANDERSON e ANDERSON, 1998; HEGDE *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2016).

Figura 37 – Esquema da integração de ferramentas de estudo na era das ômicas.



Fonte: Modificado de Villas-Bôas e Gombert (2006), pelo autor, 2019.

A metabolômica é outra ferramenta das ômicas já bem estabelecida e que foca no mapeamento quali-quantitativo de metabólitos de baixo peso molecular dentro da célula, tecido ou fluido (FIEHN, 2002; KELL, 2004; VILLAS-BÔAS e GOMBERT, 2006), evidenciando o que está acontecendo atualmente em um indivíduo, uma vez que se encontra no final do processo de expressão molecular (VILLAS-BÔAS e GOMBERT, 2006). Os grandes benefícios desta ferramenta é que podem ser utilizadas desde o nível específico até o nível ecossistêmico (BUNDY *et al.*, 2009), gerando grande quantidade de dados utilizando pouco material biológico ou ambiental e possibilitando a identificação de eventos evolutivos. Por outro lado, por mais avançada que esteja a tecnologia, a interpretação dessa gigantesca quantidade de dados ainda é um obstáculo a ser vencido. Neste sentido, diversos programas em plataformas *on-line* e programas de linhas de comando têm sido desenvolvidos nos últimos anos (KATAJAMAA *et al.*, 2006; XIA *et al.*, 2009; DE LIVERA e BROWNE, 2014; WANG *et al.*, 2016), mas melhorias e definições quanto aos limites dos parâmetros a serem utilizados ainda são necessárias.

A metabolômica pode ser realizada de duas formas, de acordo com a proposta de Fiehn (2002): 1) Análises alvo – análise de um pequeno grupo específico de metabólitos, 2) Perfil metabólico – análise de todos os metabólitos ou produtos derivados detectados em um indivíduo. Na metabolômica, assinatura metabólica, o código de barras metabólico, tem o objetivo de realizar uma rápida classificação dos compostos para caracterização fenotípica, mas sem a identificação destes compostos. Normalmente, os estudos metabolômicos utilizam técnicas de cromatografia acopladas a detectores químicos, como a ressonância magnética nuclear (RMN; DONA *et al.*, 2016) ou espectrometria de massas de ionização (em inglês, ESI-MS; DEMARQUE *et al.*, 2016) para realizar a identificação dos metabólitos. Porém, ambas as técnicas possuem limitações e o ideal é que fossem aplicadas em conjunto. A técnica de RMN é simples e não degrada a amostra, mas pode contaminar a mesma com solventes deuterados, possui baixa sensibilidade e seletividade, o que compromete a interpretação dos dados, caso os sinais não sejam detectados antes da análise como solventes. A técnica de MS também necessita de pouca quantidade de material, proporcionando análises rápidas e com alta sensibilidade, permitindo a identificação de uma assinatura química da amostra, incorporando os compostos de baixa concentração. No entanto, a supressão de ionização dos sinais obtidos é um problema quando a técnica é empregada de forma isolada (CANUTO *et al.*, 2018). Em uma revisão recente, QUINN e colaboradores (2017) afirmam que as análises de espectrometria de massas (MS) são amplamente utilizadas e que podem ter diversas utilidades, inclusive na identificação em massa de compostos químicos com

potencial medicinal. Estes autores definem que o método de MS com alvo detecta íons específicos e/ou transições do precursor para o produto, enquanto o método sem alvo obtém o espectro de massa de todos os íons detectados na amostra.

A técnica de espectrometria de massa em tandem (MS/MS ou MS2) é um método de MS que combina diversos analisadores de massa em um instrumento permitindo a filtragem e a fragmentação de um íon precursor, assim como de seus fragmentos, para a identificação de compostos químicos (QUINN *et al.*, 2017). Porém, até o momento, apenas 1,8% dos metabólitos detectados em análises de metabolômica sem alvo são identificadas, limitando a utilidade dos dados obtidos com a técnica de MS (DA SILVA *et al.*, 2015). Porém este problema também é encontrado quando se utiliza da técnica de ressonância, uma vez que a base de dados comparativos em NMR também não é grande para o Filo Porifera.

A utilização de redes espectrais tem aumentado na última década, pois eleva a razão entre parâmetros detectados e identificados. O benefício da utilização de espectros de MS2 se dá, pois eles são comparados contra outros espectros, as redes espectrais relacionam, antes da identificação final e estas relações são feitas por consenso e não por identificação individual de cada espectro. Sendo assim, a probabilidade de identificar os compostos aumenta, fazendo das redes espectrais, uma ferramenta mais eficiente e confiável na identificação metabólica (GUTHAUS *et al.*, 2012). Diversos estudos têm integrado as informações biológicas e químicas às redes espectrais (CLINE *et al.*, 2007; DOCKSTADER *et al.*, 2011; GUTHAUS *et al.*, 2012; WATROUS *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2016; OLIVON *et al.*, 2017a; DÜHRKOP *et al.*, 2019), por meio de diferentes plataformas *on-line* que têm sido criadas para facilitar a observação, interpretação (SHANNON *et al.*, 2003; XIA *et al.*, 2015) e compilação de bibliotecas informativas (DENNIS *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2005; HORAI *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2019; DOMINGO-ALMENARA *et al.*, 2019).

A utilização da metabolômica como uma ferramenta auxiliar a taxonomia de Porifera vêm mostrando resultados relevantes, sobretudo para a classe Homoscleromorpha (IVANISEVIC *et al.*, 2011a; PÉREZ *et al.*, 2011), em uma nova onda da quimiossistemática. As espécies destes trabalhos foram descritas com a utilização de diferentes técnicas, sendo uma delas o *fingerprint*, o código de barras metabólico ou assinatura metabólica. Assim, os autores conseguiram corroborar as informações anatômicas e moleculares de diferentes espécies do Mar Mediterrâneo. Após estes estudos, eles concluíram que a utilização da assinatura metabólica pode auxiliar na identificação de espécies, inclusive aquelas que possuem plasticidade fenotípica e, assim, gerar dados robustos para a filogenia do grupo.

Quando a assinatura metabólica e a química de produtos naturais são comparadas, fica clara a superioridade da primeira técnica em relação à segunda, uma vez que a assinatura metabólica permite o rápido acesso a uma grande quantidade de metabólitos, indicando com maior precisão a quantidade de compostos compartilhados pelas espécies, favorecendo os estudos filogenéticos (BOURY-ESNAULT *et al.*, 2013). Um bom exemplo disto foi observado quando se comparou o estudo de Loukaci *et al.* (2004) com o de Ivanisevic *et al.* (2011a), onde o primeiro apontou uma clara diferença entre os compostos com maior intensidade para duas espécies irmãs, enquanto que o segundo registrou as diferenças nos metabólitos, mas também evidenciou uma similaridade de 95% em todo o metaboloma das espécies. Mais recentemente, os perfis químicos também se mostraram efetivos na sistemática de diferentes seres vivos, tais como plantas terrestres (GALLON *et al.*, 2018), bactérias marinhas (BAUERMEISTER *et al.*, 2018), zoantídeos (CACHET *et al.*, 2015; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2018) e corais pétreos (SANTACRUZ *et al.*, 2019). Sendo assim, a metabolômica se fixa como uma ferramenta de grande potencial taxonômico, quando aplicada juntamente com a morfologia, e pode auxiliar na compreensão da produção química das esponjas marinhas e evidenciar compostos sinapomórficos.

4.2 Objetivos

Objetivo geral:

- a) Relacionar o conjunto metabólico de Suberitida com as características morfológicas de espécies distribuídas no Brasil e na Martinica.

Objetivos específicos:

- a) Realizar os perfis químicos das espécies;
- b) Quantificar e qualificar os metabólitos por meio de análises multivariadas e fragmentação iônica;
- c) Interpretar o relacionamento dos íons detectados como VIPs para a utilização na taxonomia;
- d) Avaliar a bioatividade dos compostos químicos com possível importância econômica.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Extração química

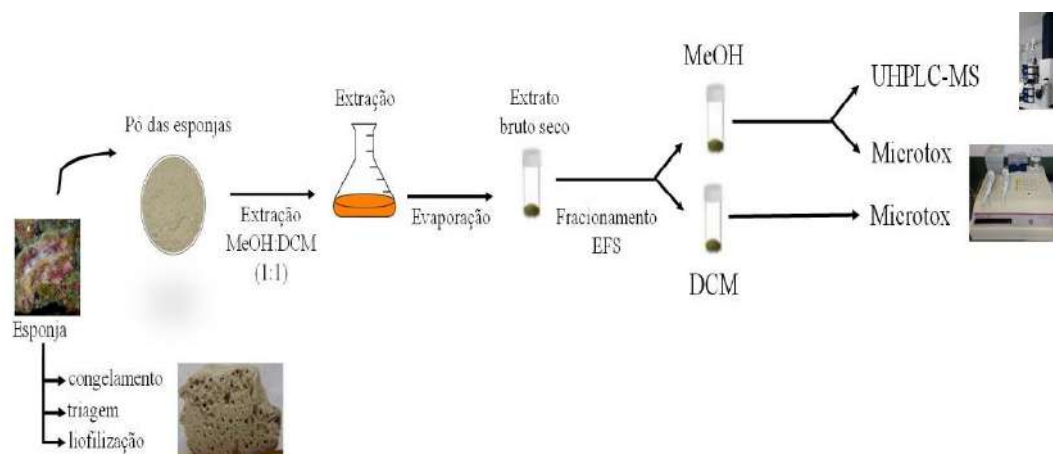
As 52 amostras utilizadas para o estudo químico foram congeladas, liofilizadas, transformadas em pó e tiveram amassa seca medida. Testes piloto foram realizados para saber a quantidade necessária de peso seco de cada amostra a fim de obter a concentração mínima necessária para a realização das análises metabolômicas e de bioatividade. Estes testes foram realizados usando 100 mg do pó das amostras, como desenvolvido pelo programa MALLABAR (Métabolomique Appliquée à L'étude de LA Biodiversité mARine; Tabela 13). Os códigos estão relacionados com a espécie e condição de coleta (local; local + estação do ano exclusivamente para *H. heliophila*): Am – *Amorphinopsis atlantica*; Hm – *Halichondria melanadocia*; Hh – *Hymeniacion heliophila*; Hy- *Rhaphidostyla* sp. nov.; Hc – *Hymeniacion caerulea*; To – *Topsentia* spp.; Tf – *Terpios fugax*; Dr – *Dracopis reticulatum*; Gc – *Geodia corticostylifera*; Ge – *Geodia* sp.1; GeB – *Geodia* sp.2; Nc – *Neopetrosia carbonaria* (Ordem Haplosclerida); aff. Top – aff. *Topsentia*; Ba – Bahia; Ce – Ceará; FN – Fernando de Noronha; Mar – Martinica; RJ – Rio de Janeiro; v – verão; i – inverno.

De acordo com os resultados do teste piloto, a utilização de 100 mg de material foi suficiente para adquirir a quantidade necessária de extrato para as análises e por isso o protocolo MALLABAR foi seguido. O pó das amostras foi extraído em uma mistura de (Metanol:Diclorometano [MeOH:DCM]; 1:1) para obtenção do máximo de metabólitos possível com um amplo espectro de polaridade. Iniciou-se a extração com a adição de 2 mL de solvente, o qual foi levado ao ultrassom por 2 min. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e colocado em frasco com 100 mg de sílica C₁₈ (C₁₈ Polygoprep 60–50, Macherey–Nagel® sem tampa) para absorver o extrato e não produzir umagraxa. Este processo foi repetido mais duas vezes para completar 6 mL de solvente e deixou-se evaporar à temperatura ambiente (Figura 38).

A segunda etapa da extração foi desenvolvida em fase sólida (Strata C18–E, 500 mg, 6 mL, Phenomenex®), com o objetivo de retirar os sais do extrato e fracionar o extrato nas porções polar e apolar. Nesta metodologia, metabólitos muito polares podem ser eluídos simultaneamente com os sais (IWASAKI *et al.*, 2012). Iniciou-se a etapa com a lavagem das

seringas com 10 mL MeOH e condicionamento com 10 mL água deionizada. Em seguida, o fracionamento da fase polar foi realizado com a adição de 5 mL MeOH, enquanto o fracionamento da fase apolar foi obtido ao adicionar 5 mL DCM (CH_2Cl_2). Por fim, o material foi evaporado e assim obtivemos os extratos orgânicos das esponjas na fase polar e apolar.

Figura 38 – Fluxograma do processo de extração para as análises de metabolômica e bioatividade.



Fonte: Modificado de Greff, 2016, pelo autor, 2019.

Fotos: O autor.

As amostras extraídas em DCM foram testadas em análises de bioatividade por Microtox. O mesmo foi feito com as amostras em MeOH, mas primeiro estas foram reduzidas a 1 mg.mL^{-1} e colocadas na máquina UHPLC/MS para a obtenção dos cromatogramas das amostras (assinaturas metabólicas). As análises cromatográficas foram realizadas com o sistema UHPLC Thermo Scientific™ Diomex Ultimate 3000 acoplado em um espectrômetro de massa (em inglês, MS) de alta resolução Q-ToF Bruker Impact II™. A coluna utilizada foi Acclaim RSLC C18 (2.1 mm x 150 mm, 2,2 μm , ThermoScientific®) mantida a 40°C , com volume de injeção de 2 μL . Uma mistura de água pura com acetato de nitrila foi utilizada: A- água pura + 10 mM formato de amônio + 0.1% ácido fórmico; B- ACN:água pura + (95:5) + 10 mM formato de amônio + 0.1% ácido fórmico. A aplicação do solvente variou com o tempo, sendo aplicado nas seguintes proporções, em %: A:B até 2 min (90:10); até 14 min (0:100); até 17 min (90:10). Os extratos de MeOH foram injetados randomicamente de acordo com as suas características (espécie, local, estação do ano) para diminuir o efeito de memória na máquina. O *pool* (todas as amostras juntas em um frasco) foi adicionado a cada seis amostras para manter a calibração interna constante (abaixo de 2 ppm) devido a mudança no espectrômetro de massa ao longo do tempo.

Tabela 13 – Informações gerais sobre a quantidade de material utilizado e extrato obtido. (continua)

MNRJ	Código	Massa seca inicial (g)	Extrato obtido (mg)	Extrato de MeOH seco final (mg)	Extrato de DCM seco final (mg)
21730	ToFN1	25,8	34,3	3,4	0,2
21728	ToFN2	21,2	30,5	5,4	0,6
21729	ToFN3	15,1	29,5	5,8	0,6
21731	ToFN4	15,3	31,3	6,1	0,7
21733	ToFN5	19,4	32,5	6,0	0,6
21734	ToFN6	32,9	31,2	6,4	0,8
21736	ToFN7	89,6	28,1	6,3	0,6
21714	ToBA1	26,9	14,5	1,4	0,6
20224	ToCE1	12,9	14,3	1,1	0,7
21684d	ToMar1	14,8	16,4	1,4	0,7
21684	ToMar2	7,2	21,1	1,9	1,2
21630	TfBA1	0,2	10,8	1,4	0,9
21638	TfBA2	0,2	8,3	1,5	0,7
21639	TfBA3	0,2	8,3	0,8	0,5
21696	TfCE1	0,3	21,2	1,6	0,8
21672	HcMar1	0,6	24,5	2,0	0,9
21679f	HcMar2	0,3	27,4	1,6	0,6
21679g	HcMar3	0,9	20,0	1,7	0,8
21745	AmRJ1	12,6	27,2	1,4	1,2
21652	HmBA1	0,7	11,7	1,6	0,5
21659	HmBA2	0,6	34,7	3,6	1,7
19469	HyRJ1	50,6	25,5	2,9	1,5
UERJOR65	HyBA1	36,7	21,0	0,9	0,8
21770	HhRJv1	1,2	37,8	2,9	1,9
21771	HhRJv2	1,6	31,3	2,7	2,1
21772	HhRJv3	1,1	36,5	3,7	2,9
21773	HhRJv4	0,6	15,8	3,8	2,9
21774	HhRJv5	1,3	38,7	3,4	2,4
21775	HhRJv6	0,7	21,7	1,8	1,2
21776	HhRJv7	1,0	34,0	3,6	2,8
21777	HhRJv8	0,9	26,9	2,9	2,3
21778	HhRJv9	0,8	25,9	2,1	1,7
21779	HhRJv10	1,8	36,0	2,8	2,3
21780	HhRji1	0,5	26,3	2,2	2,2
21781	HhRji2	0,4	29,4	2,6	2,2
21782	HhRji3	0,8	24,7	2,5	2,0
21783	HhRji4	0,7	39,0	2,3	2,1
21784	HhRji5	0,4	38,1	4,0	3,2
21785	HhRji6	0,4	30,1	3,0	3,0
21786	HhRji7	0,5	31,2	2,4	2,1

Tabela 13 – Informações gerais sobre a quantidade de material utilizado e extrato obtido. (conclusão)

Amostras	Código	Massa seca inicial (g)	Extrato obtido (mg)	Extrato de MeOH seco final (mg)	Extrato de DCM seco final (mg)
21787	HhRji8	0,8	25,8	2,9	2,8
21788	HhRji9	1,2	34,4	2,4	2,0
21789	HhRji10	0,6	27,8	4,0	0,7
21674	NcMar1	0,6	23,9	1,3	1,2
21682	NcMar2	0,7	25,4	1,1	0,7
21675	NcMar3	1,3	18,5	2,5	1,1
21710	DrCE1	7,1	18,0	1,0	0,4
21711	DrCE2	2,3	13,6	1,9	0,8
21712	GcCE1	3,9	17,7	1,3	0,7
21713	GcCE2	3,9	41,2	3,9	3,4
21651	Ge	40,3	9,9	1,5	0,7
21670	GeB / aff. Top	47,4	42,2	7,8	1,0

Legenda: Am- *Amorphinopsis atlantica*, Hm- *Halichondria melanadocia*, Hc- *Hymeniacion caerulea*, Hhi- *H. heliophila* inverno, Hhv- *H. heliophila* verão, Hy- *Rhaphidostyla* sp. nov., Te- *T. fugax*, To- *Topsentia* sp. nov. (Fernando de Noronha, Ceará e Bahia), To- *Topsentia ophiraphidites* (Martinica), Mar- Martinica, FN- Fernando de Noronha, CE- Ceará, BA- Bahia, RJ- Rio de Janeiro. Grupos externos Dr- *Dragmacidon reticulatum*, Gc- *Geodia corticostylifera*, Ge- *Geodia* sp.1, GeB- *Geodia* sp.2, Nc- *Neopetrosia carbonaria*, cf. Top – aff. *Topsentia*.

Fonte: O autor, 2019.

4.3.2 Análise metabólica por testes multivariados

As análises cromatográficas foram realizadas apenas com o modo positivo pelo Bruker CompassTM Data Analysis (versão 4.2), uma vez que o modo negativo detectou somente 10 % dos íons encontrados no modo positivo, todos em baixa concentração. Os cromatogramas foram registrados em .cdf e os dados foram processados com o pacote XCMS (SMITH *et al.*, 2006) em R (versão 3.3.0) para obter uma matriz de massa molecular (m/z) vs. tempo de retenção (s). Para tal, os dados foram normalizados (peakwidth = c (2,40), ppm = 2) sem limite de pré-filtro (PATTI *et al.*, 2012), assim toda a variação iônica foi obtida. O tempo de correção foi determinado pelo método "obiwarp", em seguida realizou-se o agrupamento (bw = 10, minfrac = 0.3, minsamp = 1), filtragem dos picos (Fillpeaks), e finalmente a geração da matriz foi exportada para Excel. Normalizações e filtrações em cada íon foram realizadas em Excel, objetivando eliminar os compostos amplamente variáveis, reduzir o ruído, remover produtos de adição, isótopos e manter os picos mais intensos (VAN DER KLOET *et al.*, 2009). Os metabólitos foram compilados no software Bruker e a partir dos cromatogramas, os íons obtidos da matriz foram comparados com as plataformas *on-line* MarinLit, PUBCHEM e

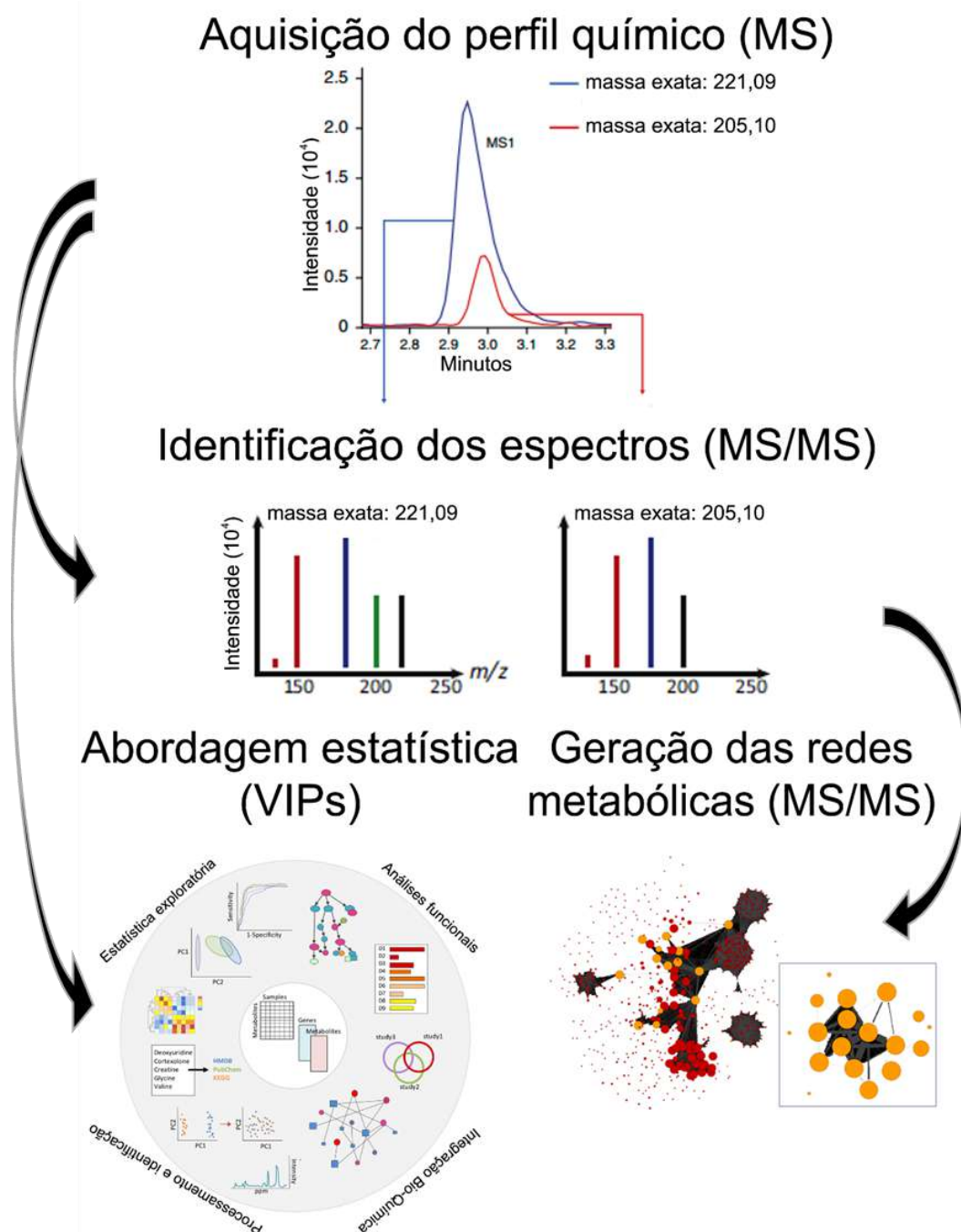
ChemSpider para identificar os principais metabólitos de cada amostra, com foco nos VIPs, os quais podem ser específicos para determinada espécie ou gênero e serem utilizados como marcadores moleculares a nível quimiossistemático.

A plataforma *on-line* MetaboAnalyst 3.0 (XIA *et al.*, 2015) foi utilizada para conduzir testes estatísticos ANOVA ou teste T student e análises multivariadas, com os dados transformados em log. Os dados foram filtrados pelas intensidades médias para retirar os ruídos da amostra (HACKSTADT e MESS, 2009), foram centralizados (a intensidade média de todas as amostras foi subtraída pela intensidade de cada íon) e normalizados (divisão pelo desvio padrão relativo da intensidade do íon de todas as amostras). Desta forma, fomos capazes de observar a significância de cada composto químico, assim como sua relação com cada amostra, definindo as variáveis (Importância Variável em Projeção, em inglês VIP). Neste caso, os VIPs são interpretados como os metabólitos que mais contribuem para a discriminação das amostras de acordo com a análise de uma ou mais variáveis, sendo eles possivelmente usados para corroborar a identificação de marcadores químicos. Análises multivariadas foram realizadas através do método de ligação completa (coeficiente de Spearman) e com nível de confiança de 95%, permitindo a geração de gráficos de agrupamento por meio da Análise de Componentes Principais e Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (em inglês, PCA e PLSDA), e dendrogramas, com o objetivo de avaliar a similaridade entre as assinaturas metabolômicas das amostras. Uma matriz foi criada para a confecção de um mapa de calorrelacionando os principais metabólitos com as amostras, utilizando o método de ligação completa com o coeficiente de correlação de Pearson.

4.3.3 Visualização e interpretação metabólica por redes moleculares

Para maior detalhamento dos picos encontrados nos cromatogramas e facilidade de quantificação dos metabólitos, nós realizamos a fragmentação dos íons por meio de um sistema de cromatografia líquida de altodesempenho acoplado à espectrometria de massas em tandem com ionização eletro *spray* (em inglês, HPLC-ESI-MS/MS). Os arquivos de dados brutos em tandem foram convertidos do formato de arquivo .raw para .mzXML pelo software Data Analysis da Bruker. Neste formato, os dados foram incorporados à plataforma de rede molecular GNPS (WANG *et al.*, 2016; Figura 39).

Figura 39 – Fluxograma das etapas de trabalho de metabolômica sem alvo.



Legenda: O perfil químico é obtido e metabólitos específicos (VIPs) são selecionados (MS). A identificação deles é feita através de MS/MS. O perfil químico da amostra é analisado estatisticamente e a relação entre os metabólitos é visualizada por meio de redes metabólicas.

Fonte: MS (Google imagens) e MS/MS (QUINN *et al.*, 2017), VIPs (Google imagens) e Redes metabólicas (site do Cytoscape), modificado pelo autor, 2019.

Na plataforma GNPS, os espectros MS/MS (MS2) foram combinados com o algoritmo MScluster, considerando valores padrões para o cosseno = 0,7 para criar espectros MS2 de consenso. O valor de cosseno expressa o ângulo entre um par de espectros. Estes espectros foram utilizados para gerar redes de metabólitos, a partir de massas iniciais com uma

tolerância de íons de fragmento em tandem = 0,02 Da, íons comuns = 6 e K = 10, valores estes padrões para as análises dos parâmetros em MS e MS2. Os valores de cosseno foram utilizados para criar as bordas, as quais ligam dois nós de metabólitos, sendo representadas por uma semelhança espectral significativa, expressa como o valor de cosseno entre um par de espectros MS/MS (QUINN *et al.*, 2017). A borda é usada para auxiliar na visualização da relação entre os nós, ou seja, quanto maior a espessura da borda de cada nó, maior a relação entre os metabólitos. Assim, os nós representam os íons parentais, enquanto a espessura da borda significa a pontuação do cosseno entre dois nós (SHANNON *et al.*, 2003).

As redes metabólicas foram observadas no software Cytoscape® a partir de redes de conexão entre metabólitos com nós e bordas individuais. O desenvolvimento das redes metabólicas tem o objetivo de visualizar e interpretar todo o conjunto químico de uma amostra detectada com a MS, tirando proveito do poder dos dados não direcionados da MS que têm sido historicamente subutilizados (QUINN *et al.*, 2017). Assim, as redes podem agrupar famílias de compostos com íons conhecidos ou desconhecidos na literatura. Para tentar identificar os compostos químicos, a plataforma GNPS e o Cytoscape® integram diversas bibliotecas *on-line* (METLIN, METFRAG, PUBCHEM e LIPIDMAPS). Além delas, os fragmentos aqui obtidos foram comparados com a literatura (artigos e livros) para tentar identificar o máximo de compostos.

4.3.4 Teste de bioatividade Microtox®

As amostras de MeOH e DCM foram diluídas em uma solução de água do mar artificial e acetona 2% para obter uma concentração de 2 mg.mL⁻¹, seguindo o protocolo de Martí *et al.* (2003) (ver Anexo A). Os extratos foram pesados e as soluções foram testadas contra a bactéria *Aliivibrio fischeri* (cepa NRRL B-11177), através do teste padrão de Microtox® (Microbics, Carsbad, CA, USA; MARTÍ *et al.*, 2003).

A bioatividade foi avaliada pelo valor de bioluminescência produzido pela bactéria. O metabolismo da bactéria é responsável pela produção de luz, a qual diminui em presença de agentes tóxicos (JOHNSON, 2005). A toxicidade dos compostos foi obtida a partir do EC₅₀ (µg.mL⁻¹), uma medida de avaliação (dose-resposta) da diminuição de 50% da população exposta a determinado composto após um período de tempo. Logo, quanto mais baixo o valor de EC₅₀ maior será a bioatividade dos compostos químicos presentes na amostra.

Uma PCA foi realizada para tentar inferir as famílias de metabólitos mais tóxicas, enquanto o teste de Student inferiu diferenças estatísticas entre diferentes populações de espécies ou, no caso de *Hymeniacidon heliophila*, a mesma população em estações do ano diferentes.

4.4 Resultados

4.4.1 Perfis cromatográficos (assinaturas metabólicas)

De uma forma geral, os perfis químicos das diferentes espécies de Suberitida e dos três grupos externos (*Dragmacidon reticulatum* Ordem Axinellida, *Geodia* spp. Ordem Tetractinellida e *Neopetrosia carbonaria* Ordem Haplosclerida) analisados neste trabalho são similares (Figura 40). Mesmo assim diferenças foram observadas em nível de Ordem, Família, Gênero e Espécie. Distinções intra-específicas tanto no espaço quanto no tempo também foram observadas. Após as filtrações e normalizações foram detectados 333 íons ao longo de 960 s (16 min), sendo o composto majoritário, detectado em 657 s e contendo a provável fórmula molecular $C_{20}H_{34}O_8$, com massa de 403,23, calculados pelo Bruker, através da opção “Fórmula Esperta”. Outros sete picos com alta intensidade foram detectados, sendo as amostras com maior intensidade as de *Neopetrosia carbonaria* da Martinica, *Terpios fugax* da Bahia, *Topsentia* sp. nov. do Ceará e de Fernando de Noronha e *Hymeniacidon heliophila* do Rio de Janeiro, para o período do verão (Tabela 14). Dos metabólitos mais intensos, três estão diretamente relacionadas à plastificantes, o di(2-etilhexil) ftalato (em inglês, DEHP), o acetiltributilcitrato (em inglês, ATBC) e o tributilcitrato (em inglês, TBC).

Ainda na Figura 40, os metabólitos foram separados em três grandes grupos quanto à polaridade (metodologia seguida no laboratório, ver referências com esponjas (IVANISEVIC, 2011) e algas (GREFF, 2016). Até três minutos, pode-se notar claramente alguns picos de baixa e média intensidade, representando metabólitos polares. Entre três e treze minutos há uma larga faixa de compostos de média polaridade, os quais podem ser subdivididos pela intensidade e frequência de ocorrência. Por fim, após 13 minutos compostos apolares de baixa intensidade foram obtidos. A separação das polaridades é importante para tentar discernir compostos específicos para a taxonomia e com relação à toxicidade.

Tabela 14 – Principais picos detectados nos perfis metabólicos das espécies de Suberitida.

Amostra mais intensa	Intensidade do pico	Tempo (min)	Tempo (s)	Massa (m/z)	Erro (ppm)	mSigma	Fórmula molecular mais provável
NpMar2	$2,5 \times 10^6$	10,9	657	403,23	-1,9	87,3	$C_{20}H_{34}O_8$
ToCE1	$1,2 \times 10^6$	0,5	31	112,09	-1,9	4,3	$C_5H_9N_3$
NpMar2	$2,5 \times 10^5$	5,9	354	163,13	1,1	4,4	$C_8H_{18}O_3$
HhRJv7	$1,5 \times 10^6$	7,3	438	191,16	-0,5	4,6	$C_{10}H_{22}O_3$
TfBA1	$0,8 \times 10^6$	10,4	624	361,22	0,4	10,6	$C_{18}H_{32}O_7$
NpMar1	$0,4 \times 10^6$	12,5	750	384,35	-1,0	8,8	$C_{23}H_{45}NO_3$
ToFN2	$0,5 \times 10^6$	13,6	816	391,28	-0,6	16,7	$C_{24}H_{38}O_4$
HhRJv7	$2,5 \times 10^5$	14,6	876	338,34	0,5	20,2	$C_{22}H_{43}NO$

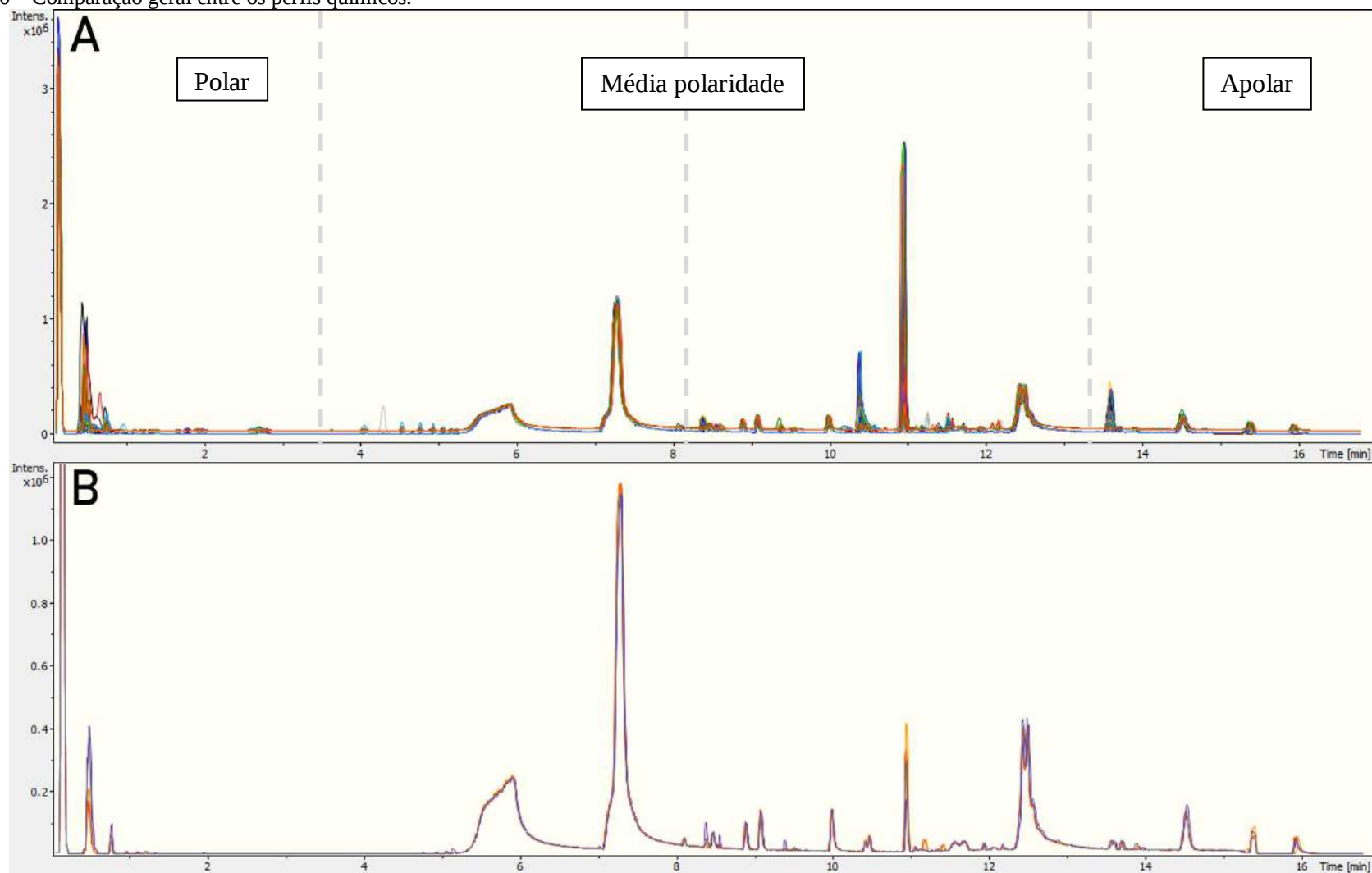
Legenda: Np- *Neopetrosia carbonaria* Martinica, Hhv- *H. heliophila* verão, TfB- *T. fugax* Brasil, ToCE- *Topsentia* sp. nov. do Ceará, ToFN- *Topsentia* sp. nov. de Fernando de Noronha.

Fonte: O autor, 2019.

Apesar da similaridade geral nos perfis químicos (Figura 40), algumas especificidades podem ser observadas ao detalhar as amostras. Para a família Suberitidae, por exemplo, o poluente plástico o di(2-etilhexil) ftalato identificado nos picos em 624 s são muito mais intensos do que os observados na família Halichondriidae (Figura 41). Nesta, por sua vez, foram observados muito mais picos de baixa intensidade e de caráter polar em, mais ou menos, 30 s do que em Suberitidae. Outros dois picos que aparecem em espécies de Halichondriidae e não aparecem de forma intensa em Suberitidae são encontrados em aproximadamente 250 s e 820 s.

Diferenças entre gêneros também foram observadas neste estudo. dois picos fugiram do padrão e foram específicos para as amostras relacionadas à *Rhaphidostyla* sp. nov. O espécime da Bahia foi a única amostra cujo pico em 257 s, contendo a provável fórmula molecular C_8H_9NO , com massa de 136,08, enquanto o pico em 678 s foi observado também na amostra desta espécie para o Rio de Janeiro, com uma massa de 434,36 e $C_{27}H_{47}NO_3$. O perfil químico desta espécie se aproximou mais do perfil de *Amorphinopsis atlantica* do que de *Hymeniacidon heliophila*, ambas coletadas no estado do Rio de Janeiro. A amostra de *A. atlantica* teve alta intensidade no pico majoritário, enquanto que as amostras de *H. heliophila* não evidenciaram nenhuma especificidade quando comparada às demais. A característica química mais parecida entre *Amorphinopsis* e a nova espécie, neste caso, corrobora a similaridade morfológica, com relação a uma característica pouco comum em Halichondriidae, a combinação espicular de óxeas e estilos verdadeiros.

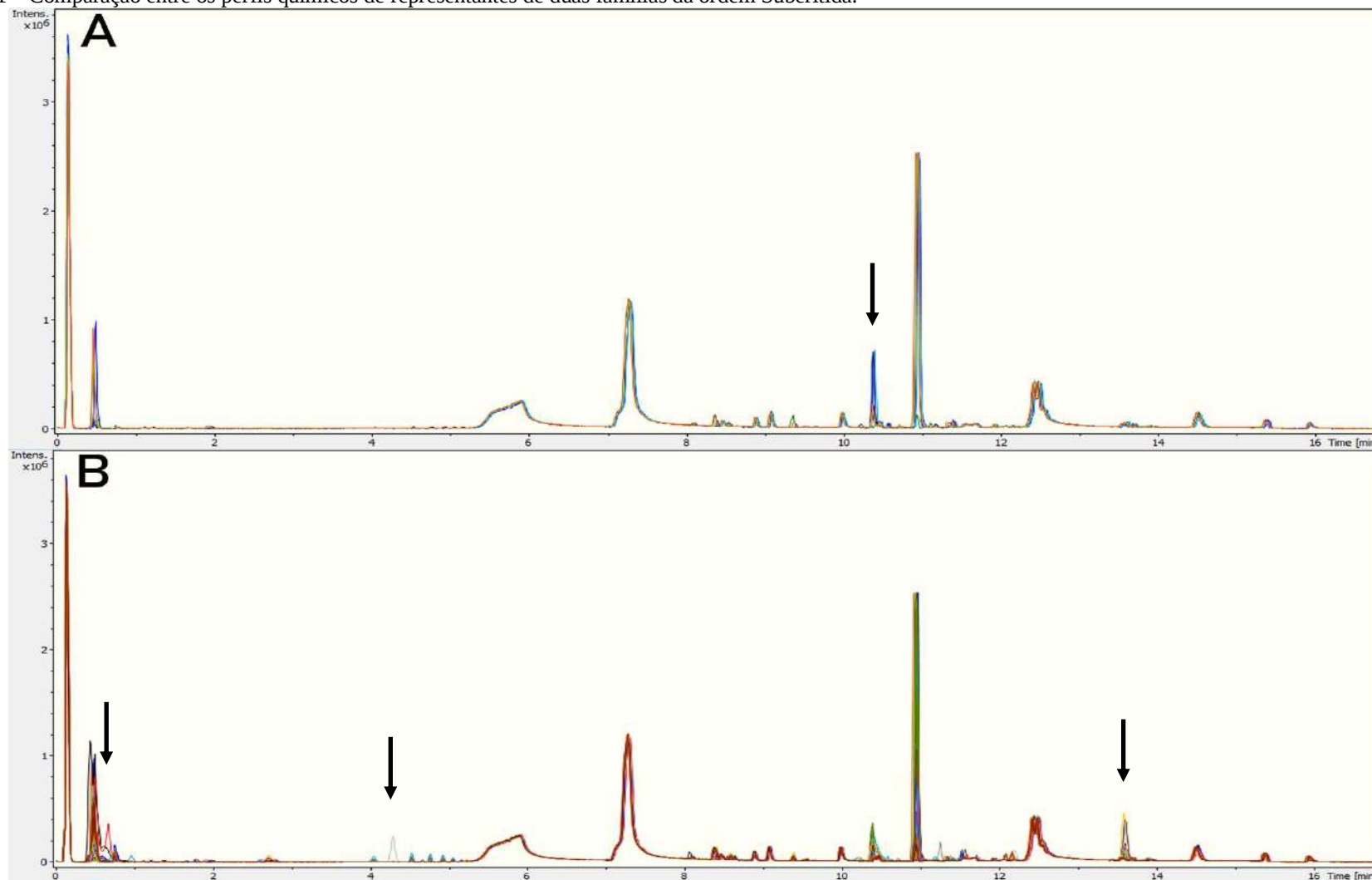
Figura 40 – Comparação geral entre os perfis químicos.



Legenda: A) geral e B) grupos externos *Drummacidon reticulatum* (cores quentes) e *Geodia* spp. (cores frias).

Fonte: O autor, 2019.

Figura 41 – Comparação entre os perfis químicos de representantes de duas famílias da ordem Suberitida.



Legenda: A) Suberitidae e B) Halichondriidae. As setas indicam as principais diferenças entre os grupos de amostras.

Fonte: O autor, 2019.

Com o objetivo de comparar perfis químicos de espécies com ampla distribuição, espécimes com o morfotipo azul incrustante foram coletados na Bahia, Ceará e Martinica, inicialmente identificados como *Terpios fugax*. No entanto, os perfis químicos das amostras da região costeira do Brasil foram ligeiramente diferentes dos perfis caribenhos. As principais diferenças foram observadas nos picos de alta intensidade de 30 s nas amostras do Caribe e 624 s nas da Bahia. Estas diferenças aproximaram as amostras do Caribe das amostras de *Halichondria* sp. da Martinica, separando-as da família Suberitidae.

Na Bahia e na Martinica, também foram coletados espécimes com o morfotipo com cromovariação de verde musgo a preto, e morfotipovariando de incrustante espesso a maciço, primariamente identificado como *Halichondria melanadocia*. Apesar da alta similaridade dos perfis químicos, as amostras do Caribe tiveram uma intensidade superior às da Bahia, de uma forma geral. Isto pode ser claramente observado nos picos de 624 e 657 s nas amostras caribenhas. Por sua vez, as amostras brasileiras tiveram picos de baixa intensidade em 288, 498 e 708 s, os quais não foram observados nas demais amostras de *Halichondria*. Essas diferenças apontam que estes morfotipos se tratam de duas espécies diferentes.

Para as amostras de *Topsentia* spp. do Brasil e da Martinica, diferenças em nível específico foram observadas a partir dos perfis químicos. As amostras da Martinica tiveram uma intensidade menor do que as da região costeira do Brasil (Bahia e Ceará) e das ilhas oceânicas de Fernando de Noronha. Apenas metabólitos apolares, até 30 s tiveram altas intensidades nas amostras da Martinica, enquanto as amostras brasileiras tiveram picos de altas intensidades para metabólitos apolares 30 s e de média polaridade 480, 492, 660, 822 s. Utilizando as assinaturas metabólicas, notamos também diferenças sutis entre os espécimes brasileiros, porém estas não parecem indicar diferença específica. Alguns exemplos são: a amostra do Ceará teve uma intensidade muita alta em 30 s, uma amostra da Bahia teve uma intensidade discrepante em 660 s e a uma amostra de Fernando de Noronha sobressaiu em 822 s. De uma forma geral, o metabólito em 660 s teve alta intensidade, o que não foi observado nos espécimes de *Topsentia* spp., mesmo a amostra citada acima foi menor do que o comum observado.

Perfis químicos de *H. heliophila* foram realizados entre estações do ano: verão e inverno. De uma forma geral, a intensidade dos compostos químicos no inverno foi maior do que no verão, sendo isso evidenciado nos picos de 30, 660 e 822 s. Uma clara variação na diversidade de compostos químicos pode ser observada em diferentes estações do ano nesta espécie.

4.4.2 Análises multivariadas

Um total de 7134 íons foi determinado para as amostras de Suberitida e as três espécies utilizadas como grupos externos (*D. reticulatum*, *G. corticostylifera* e *N. carbonaria*) antes do tratamento dos dados no R e Excel. Destes, 333 íons foram observados e utilizados na matriz massa vs. tempo para a realização de análises estatísticas. Por fim, 30 íons foram determinados como VIPs com um score acima de um (Tabela 15).

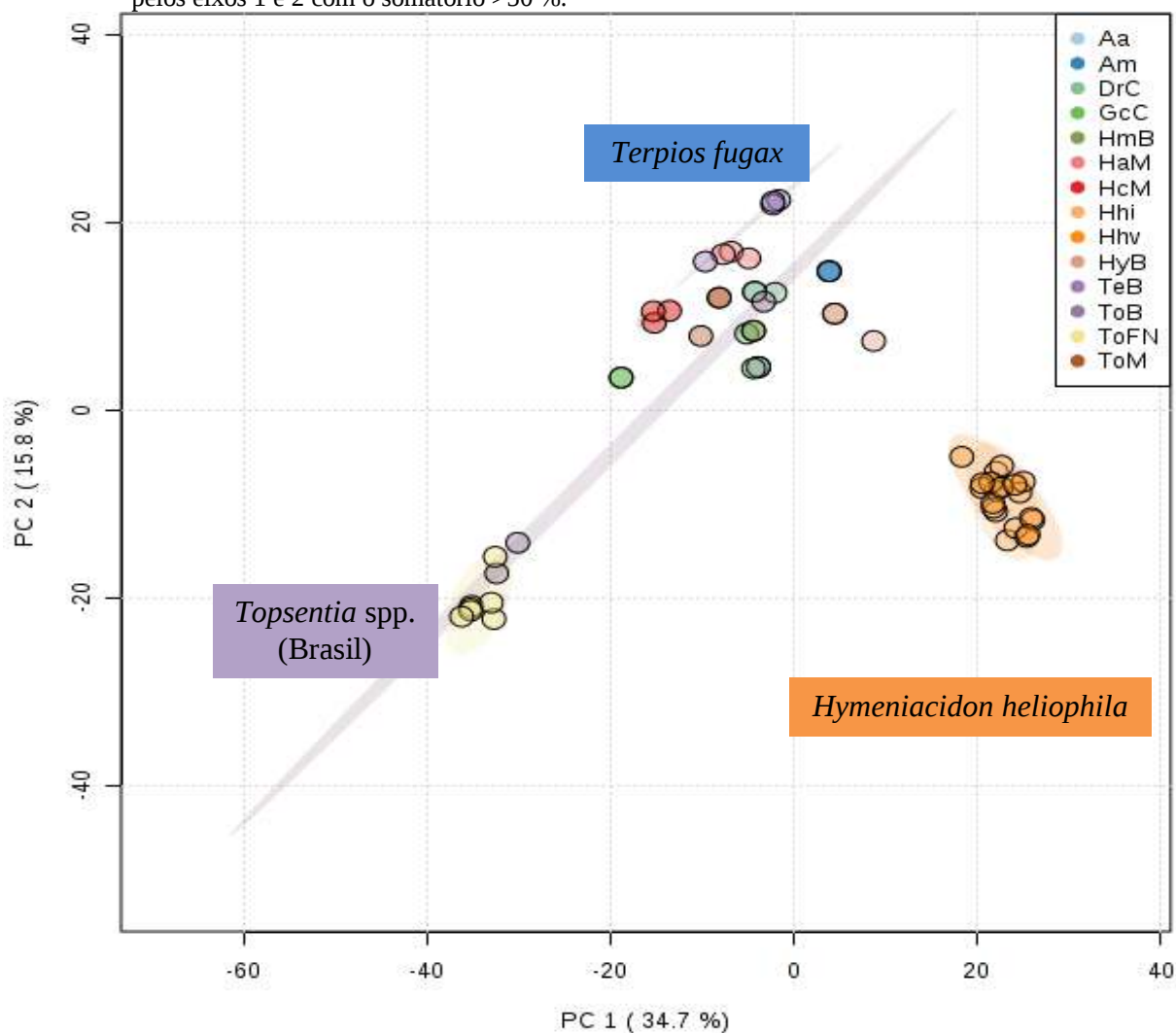
As diferenças observadas nos cromatogramas foram corroboradas com os gráficos obtidos através das análises multivariadas. Os dois primeiros eixos da PCA (Figura 42), por exemplo, explicaram mais de 50% da variação dentro e entre grupos de acordo com a presença e intensidade dos metabólitos em cada amostra. Dentro de um nível de confiança de 95%, foram identificados grupos específicos para as amostras de *Hymeniacidon heliophila*, *Hymeniacidon caerulea*, *Terpios fugax* e *Topsentia* do Brasil. As demais amostras se aglomeraram no meio do gráfico sem diferenciação óbvia. Por fim, os grupos externos tiveram respostas diferentes, uma vez que *D. reticulatum* agrupou com a maioria das Suberitida, enquanto *G. corticostylifera* e *N. carbonária* se separaram dos demais evidenciando a presença de diferentes metabólitos nas ordens.

No dendrograma observa-se a formação de cinco grupos (Figura 43). O primeiro grupo se refere às amostras de *H. heliophila* do inverno e do verão, as quais se sobrepuseram indicando pouca variação química sazonal. O segundo contém as amostras de *Topsentia* sp. nov. de Fernando de Noronha, Bahia e Ceará, as quais não possuem a espícula ofirráfide, característica de *T. ophiraphidites*. As amostras de *Topsentia* e *Geodia* spp. formaram o quarto e quinto grupos, com uma diferenciação entre *Topsentia* sp. nov. e *T. ophiraphidites* (possui ofirráfide) e *Geodia* spp. O quarto grupo foi formado por espécies de Halichondriidae, *Halichondria melanadocia* da Bahia, *Amorphinopsis atlantica* do Rio de Janeiro e *Rhaphidostyla* sp. nov. O último grupo foi formado por *H. caerulea* (Halichondriidae) da Martinica, *Terpios fugax* (Suberitidae) do Brasil e os grupos externos *D. reticulatum* (Brasil) e *N. carbonária* da Martinica. Neste grupo, a amostra de *Terpios fugax* do Ceará agrupou com *N. carbonaria* e não com as demais amostras da Bahia, indicando uma provável contaminação no processamento.

Neste estudo, o agrupamento com base em dados metabólicos corrobora as conclusões morfológicas, uma vez que o morfotipo de *Halichondria* da Bahia se separou do morfotipo da Martinica, que é na verdade *N. carbonaria*, espécie de outra ordem. Outro exemplo é

referente a espécie *Rhaphidostyla* sp. nov., a qual não deve ser considerada no gênero *Hymeniacidon*, nem sinônimo júnior, devido à grande distância com seus congêneres aqui analisados, *H. heliophila* e *H. caerulea*. De forma geral, as amostras aqui testadas se agruparam primeiramente por grau filogenético e não por região geográfica.

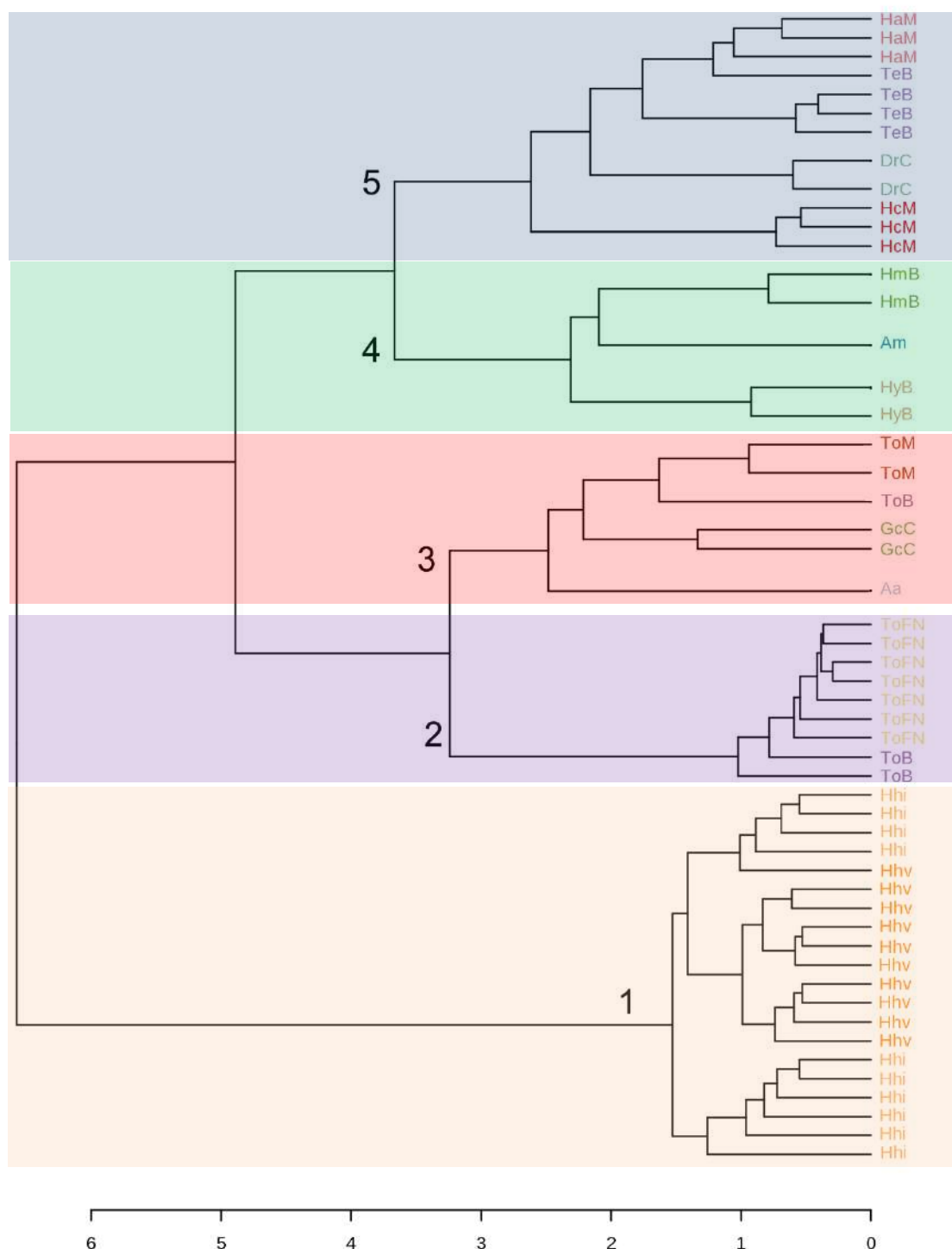
Figura 42 – Distribuição das espécies de Suberitida e dos grupos externos a partir da análise de PCA explicada pelos eixos 1 e 2 com o somatório >50 %.



Legenda: Am- *Amorfinopsis atlantica*, Hm- *Halichondria melanadocia*, Hc- *Hymeniacidon caerulea*, Hhi- *H. heliophila* inverno, Hhv- *H. heliophila* verão, Hy- *Rhaphidostyla* sp. nov., Te- *T. fugax*, To- *Topsentia* sp. nov. (Fernando de Noronha, Ceará e Bahia), To- *Topsentia ophiraphidites* (Martinica), M- Martinica, FN- Fernando de Noronha, C- Ceará, B- Bahia. Grupos externos Dr- *Dragmacidon reticulatum*, Gc- *Geodia corticostylifera*, Aa=Ge- *Geodia* sp.1, HaM=NcM- *Neopetrosia carbonaria*.

Fonte: O autor, 2019.

Figura 43 – Agrupamento de espécies gerado com o coeficiente de Spearman e o método de ligação completa, a partir das assinaturas metabólicas.



Legenda: Os números de 1 a 5 em cores indicam os diferentes grupos formados por similaridade metabólica (ver detalhes no texto acima). 1) Hhi- *H. heliophila* inverno, Hhv- *H. heliophila* verão, 2) ToB e ToFN- *Topsentia* sp. nov. (Fernando de Noronha, Ceará e Bahia), 3) Aa=Ge- *Geodia* sp.1 (Bahia), GcC- *Geodia corticostylifera* (Ceará), ToB e ToM- *Topsentia ophiraphidites* (Bahia e Martinica), 4) Am- *Amorphinopsis atlantica*, Hm- *Halichondria melanadocia*, HyB- *Rhaphidostyla* sp. nov. (Brasil) e 5) HcM- *Hymeniacidon caerulea* (Martinica), Te- *T. fugax* (Bahia), DrC- *Dragmacidon reticulatum* (Ceará), HaM=NcM- *Neopetrosia carbonaria* (Martinica).

Fonte: O autor, 2019.

Tabela 15 – VIPs identificados nos testes estatísticos aplicados pelo programa MetaboAnalyst 3.0. (continua)

Rede de metabólitos		MS							MS2		Amostra principal
VIP	Metabólito	Massa/tempo de retenção (mz/RT)	Massa exata	Intensidade (casos - % espectro)	Fórmula molecular	Erro (ppm)	mSigma	Aduto	Fragmento (m/z)	Fragmento (%)	
1	Fosfocolina PC(O-16:0/0:0)	M482T626	482,361	346616 - 100	C ₂₄ H ₅₃ NO ₆ P	0,7	20,9	[M+H] ⁺	104,1073	965504	HhRJv
									482,3608	206620	
									184,0735	163290	
									86,0964	92906	
									105,1107	52746	
2	Fosfocolina PC(O-18:1/0:0)	M508T638	508,3762	18676 - 75.6	C ₂₆ H ₅₅ NO ₆ P	-2,1	6,7	[M+H] ⁺	104,1072	63348	HhRJv
									184,0735	15416	
									508,3769	14962	
									86,0965	4842	
3	Fosfocolina PC (O-17:0/0:0)	M497T661	496,3762	34564 - 100	C ₂₅ H ₅₅ NO ₆ P	-1,5	5,6	[M+H] ⁺	104,1074	104510	HhRJv
		M518T653	518,3614	3315 -9.6	C ₂₅ H ₅₄ NNaO ₆ P	-0,3	9	[M+Na] ⁺	496,3777	31672	
									184,0737	24926	
									86,0966	8900	
									497,3816	8736	
4	Fosfoglicerol PG(16:0/0:0)	M485T564	485,2879	18540 - 61.85	C ₂₂ H ₄₆ O ₉ P	-1,2	16	[M+H] ⁺	313,2735	102864	HhRJv
									155,0102	7932	
									173,0212	4910	
									95,0857	4684	
									98,984	3470	

Tabela 15 – VIPs identificados nos testes estatísticos aplicados pelo programa MetaboAnalyst 3.0. (continuação)

Rede de metabólitos		MS							MS2		Amostra principal
VIP	Metabólito	Massa/tempo de retenção (mz/RT)	Massa exata	Intensidade (casos - % espectro)	Fórmula molecular	Erro (ppm)	mSigma	Aduto	Fragmento (m/z)	Fragmento (%)	
5	Metil-guanina	M166T32	166,0725	186406 – 100	C ₆ H ₈ N ₅ O	1	1,7	[M+H] ⁺	166,0723	266692	HhRJi
		M331T29	331,1374	105997 - 56.86				[2M+H] ⁺	138,0774	12084	
									125,0457	19450	
									166,0878	19340	
									151,0486	13112	
6	Adenina	M136T45	136,0618	235777 – 100	C ₅ H ₆ N ₅	-1	7,2	[M+H] ⁺	136,0612	5692	HhRJv
									119,0358	1356	
									137,0451	538	
									137,0646	498	
									91,0546	248	
				94,0424	192						
7	Quinolona	M146T345	146,0601	23644 - 12.36	C ₉ H ₈ NO	0,9	12,1	[M+H] ⁺	118,0651	52592	HhRJi
8	n.r.	M520T453	520,3649	4132 - 5.1	C ₃₁ H ₄₆ N ₅ O ₂	-0,5	14,5	[M+H] ⁺	520,365	26474	HhRJv
									136,0617	2310	
									90,9763	366	
									80,9483	312	
9	Capnina	M352T546	352,2518	19925 - 22.3	C ₁₇ H ₃₈ NO ₄ S	-1,4	11,4	[M+H] ⁺	124,0062	7048	HhRJi
		M374T547	374,2341					[M+Na] ⁺	334,2415	5734	
									252,2684	2708	
									95,0856	2044	
									81,0696	1816	
								105,9958	1184		

Tabela 15 – VIPs identificados nos testes estatísticos aplicados pelo programa MetaboAnalyst 3.0. (continuação)

Rede de metabólitos				MS				MS2			Amostra principal
VIP	Metabólito	Massa/tempo de retenção (mz/RT)	Massa exata	Intensidade (casos - % espectro)	Fórmula molecular	Erro (ppm)	mSigma	Aduto	Fragmento (m/z)	Fragmento (%)	
10	Peptídeo	M348T606	348,2746	2645 - 12.2	C ₁₈ H ₃₈ NO ₅	0	43,4	[M+H] ⁺	71,0492	4626	HyRJ
									69,0697	3318	
									95,0858	3284	
									81,0701	2890	
									219,211	2688	
11	Ftalato	M335T716	335,2221	32685 – 100	C ₂₀ H ₃₁ O ₄	-1,2	5,8	[M+H] ⁺	55,054	2532	HhRji
									149,0233	72778	
									57,0698	13148	
									150,027	7652	
									71,0855	7064	
12	Ácido graxo	M433T808	433,368	4609 - 22.1	C ₂₈ H ₄₉ O ₃	-0,6	91,2		167,0334	3820	HhRji
									83,0856	2486	
									71,0853	2488	
									95,0853	2362	
									81,0694	2234	
13	Esterol	M679T441	679,261	22293 - 5.8	C ₂₆ H ₅₁ N ₂ O ₁₂ S ₃	-3,1	15,7	[M+NH ₄] ⁺	57,0699	1982	ToFN
									131,0855	1570	
		M662T441	662,233	2753 - 0.6	C ₂₆ H ₄₈ NO ₁₂ S ₃	-0,8	34,5	[M+H] ⁺	147,1174	1554	GcCE
									351,3046	55112	
									369,3151	33920	
									386,3419	6254	
									255,2115	4458	
97,1015	4132										
404,3524	2998										

Tabela 15 – VIPs identificados nos testes estatísticos aplicados pelo programa MetaboAnalyst 3.0. (continuação)

Rede de metabólitos		MS						MS2		Amostra principal	
VIP	Metabólito	Massa/tempo de retenção (mz/RT)	Massa exata	Intensidade (casos - % espectro)	Fórmula molecular	Erro (ppm)	mSigma	Aduto	Fragmento (m/z)	Fragmento (%)	
14	Esterol	M642T455	642,3347	24223 - 31.8	C ₂₉ H ₅₆ NO ₁₀ S ₂	-1	19,7	[M+H] ⁺	447,384	35200	ToFN
									271,2054	11802	
									301,2526	10810	
									283,2422	10606	
									411,3626	10602	
									127,1117	10052	
15	Esterol	M693T466	693,2763	14591 - 30.15	C ₂₇ H ₅₃ N ₂ O ₁₂ S ₃	0,2	22,8	[M+NH ₄] ⁺	365,3206	70984	ToFN
									383,3313	53586	
									111,1168	37154	
									255,2107	19820	
									69,0696	17344	
									400,3578	10516	
16	Esterol	M723T506	723,3233	145363 – 100	C ₂₉ H ₅₉ N ₂ O ₁₂ S ₃	-1,9	9,3	[M+NH ₄] ⁺	283,2423	54404	ToCE
		M724T505	724,3263						395,3675	624912	ToCE
									413,3783	426098	
									430,405	121424	
17	Esterol	M730T506	728,2791	5238 - 19.0	C ₃₁ H ₅₄ NO ₁₂ S ₃	1,6	15,7	[M+H] ⁺	435,3603	8750	HcMar
									395,3677	6108	
									453,3716	3422	
									413,3771	2180	
									417,3483	588	
									533,3284	510	

Tabela 15 – VIPs identificados nos testes estatísticos aplicados pelo programa MetaboAnalyst 3.0. (continuação)

Rede de metabólitos		MS					MS2		Amostra principal			
VIP	Metabólito	Massa/tempo de retenção (mz/RT)	Massa exata	Intensidade (casos - % espectro)	Fórmula molecular	Erro (ppm)	mSigma	Aduto	Fragmento (m/z)	Fragmento (%)		
18	Esterol	M737T521	737,3369	19123 - 75.6	C ₃₀ H ₆₁ N ₂ O ₁₂ S ₃	-0,2	6,4	[M+NH4] ⁺	409,3837	14922	ToFN	
		M739T523	739,3398						427,394	10070	ToFN	
									97,1009	2134		
									444,4219	2072		
									283,2437	1866		
									542,3914	976		
19	Esterol	M608T644	608,3295	4310 - 33.8	C ₂₉ H ₅₄ NO ₈ S ₂	-1,4	23,5	[M+H] ⁺	395,3682	2018	ToFN	
									413,3775	1386		
									309,2793	260		
									89,0595	420		
									159,1158	382		
									241,1953	352		
20	Esterol	M735T519	735,3232	61055 – 10	C ₃₀ H ₅₉ N ₂ O ₁₂ S ₃	-2,1	15,6	[M+NH4] ⁺	97,1014	255698	ToCE	
									425,3785	145566		
									407,368	130674		
									309,2581	86912		
									95,0857	85954		
									255,211	47644		
21	Esterol	M434T676	434,3629	192180 – 100	C ₂₇ H ₄₈ NO ₃	0,8	18,8	[M+NH4] ⁺	399,3264	46830	HyRJ	
			417,3359		C ₂₇ H ₄₅ O ₃				[M+H] ⁺	219,2109		46754
									381,3155	40056		
									95,0857	38278		
									269,1901	37586		
									107,0855	29210		

Tabela 15 – VIPs identificados nos testes estatísticos aplicados pelo programa MetaboAnalyst 3.0. (continuação)

Rede de metabólitos				MS				MS2			Amostra principal
VIP	Metabólito	Massa/tempo de retenção (mz/RT)	Massa exata	Intensidade (casos - % espectro)	Fórmula molecular	Erro (ppm)	mSigma	Aduto	Fragmento (m/z)	Fragmento (%)	
22	Alcalóide geodiamolídeo	M614T426	612,2279	36038 - 92.15	C ₂₈ H ₄₃ BrN ₃ O ₇	-0,4	17,1	[M+H] ⁺	228,0016	37804	GcCE
		M636T425	634,2107					[M+Na] ⁺	345,0439	31802	
									268,1903	18926	
									240,1958	13498	
									197,1533	11442	
									179,1428	10552	
23	Alcalóide geodiamolídeo	M682T435	660,2151	65251 - 9.3	n.r.			[M+H] ⁺	275,9882	257164	GcCE
			682,1974					[M+Na] ⁺	393,0312	199738	
									268,1911	70124	
									240,1961	44332	
									321,9941	36732	
									197,1538	31348	
24	Alcalóide geodiamolídeo	M240T310	237,9972	21296 – 100	C ₉ H ₉ BrN ₃	0	0,1	[M+H] ⁺	220,971	62264	GcCE
									195,9762	2376	
25	Alcalóide geodiamolídeo	M573T597	573,3412	12405 - 97.88	C ₂₉ H ₄₅ N ₆ O ₆	-1,8	8,6	[M+H] ⁺	411,2871	938	GcCE
									313,3105	2360	
									261,0373	33020	
									243,026	908	
26	Alcalóide geodiamolídeo	M485T694	485,346	22057 - 62.3	C ₂₇ H ₄₉ O ₇	3,1	16,7	[M+H] ⁺	89,0596	92950	GcCE
									133,0861	47888	
									45,0333	26654	
									283,1757	18354	
									177,1127	15934	
									239,1493	4354	

Tabela 15 – VIPs identificados nos testes estatísticos aplicados pelo programa MetaboAnalyst 3.0. (conclusão)

Rede de metabólitos		MS							MS2		Amostra principal
VIP	Metabólito	Massa/tempo de retenção (mz/RT)	Massa exata	Intensidade (casos - % espectro)	Fórmula molecular	Erro (ppm)	mSigma	Aduto	Fragmento (m/z)	Fragmento (%)	
27	Alcalóide haliclorína	M406T343	406,2144	5764 - 3.5	C ₂₃ H ₃₃ ClNO ₃	-1,8	45,6	[M+H+]	308,1765	1530	TeBA
									388,2016	1484	
									152,0703	1478	
									126,055	1032	
									91,0542	918	
									166,0868	778	
28	Sesquiterpeno	M365T681	343,2118	61259 – 100	C ₁₈ H ₃₁ O ₆	-0,7	10,7	[M+H+]	98,984	1232	HcMar
			365,1935	22233 - 37.3	C ₁₈ H ₃₀ NaO ₆	-0,4	3,9	[M+Na+]	240,2318	1014	
									45,0333	908	
									89,0599	752	
									139,0033	630	
									81,0699	496	
29	Glicolípídeo	M530T685	530,406	81372 – 100	C ₂₉ H ₅₆ NO ₇	-0,9	7,1	[M+H+]	512,3952	8940	TeBA
									468,4048	1506	
30	n.r.	M322T193	322,0967	n.r.	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₅	4,9	64,8	[M+H+]	102,1282	11546	NpMar, TeBA
									194,1180	7362	
									226,9502	2306	

Legenda: Os dados moleculares foram obtidos no *software* da Bruker e a identificação dos metabólitos foi realizada através de bibliotecas *on-line*. Gc= *Geodia corticostylifera*, Hc= *Hymeniacidon caerulea*, Hh= *Hymeniacidon heliophila*, Hy= *Rhaphidostyla* sp. nov., Np= *Neopetrosia carbonaria*, Te= *Terpios fugax*, To= *Topsentia* sp. nov., BA= Bahia, CE= Ceará, FN= Fernando de Noronha, MAR= Martinica, RJ= Rio de Janeiro, i= inverno, v= verão.

Fonte: O autor, 2019.

As diferenças dentro e entre os grupos citadas acima ficam ainda mais claras quando se observa o mapa de calor de amostras por íons (Figura 44). Neste caso, ainda mais grupos foram formados, pois a intensidade dos metabólitos em cada amostra foi levada em consideração e não só a presença ou ausência, como no agrupamento anterior. Assim, sete grupos foram formados para as amostras e cinco para os íons classificados como VIPs.

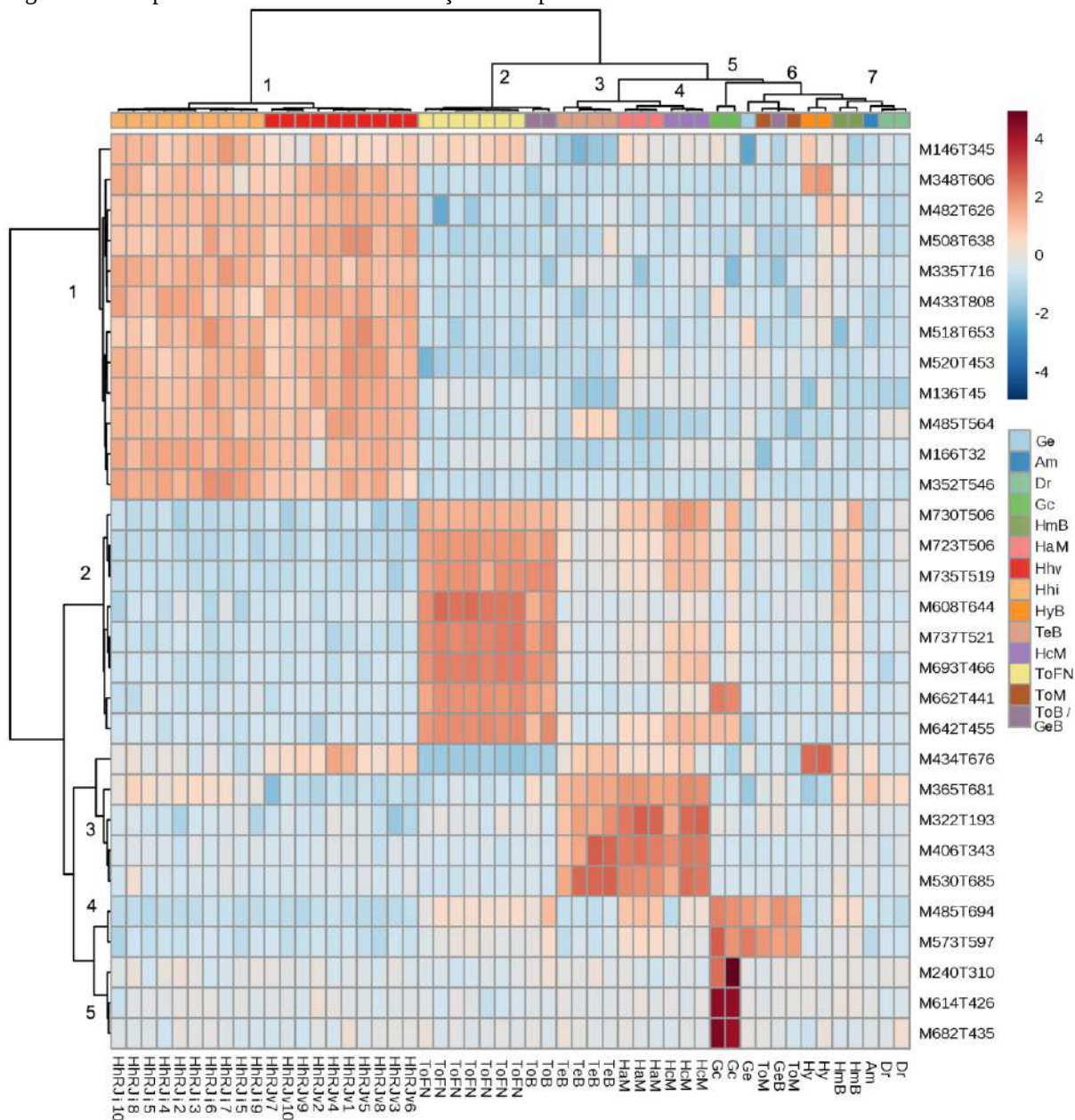
Olhando para os agrupamentos formados nas amostras, o 1º grupo foi formado por indivíduos de *H. heliophila*, o 2º *Topsentia* sp. nov. do Brasil, o 3º *T. fugax* do Brasil, o 4º *N. carbonaria* e *H. caerulea* da Martinica, o 5º *G. corticostylifera*, o 6º *T. ophiraphidites* e as *Geodia* sp. 1 e sp. 2, as demais amostras formaram o 7º grupo. Neste último grupo, destaca-se a presença de um íon muito forte nas amostras de *Rhaphidostyla* sp. nov. Por outro lado, *A. atlantica* e *D. reticulatum* não possuem nenhum VIP com alta intensidade e, assim como *Halichondria melanadocia* do Brasil, não possuem nenhum íon específico. Os grupos de VIPs, íons com alta intensidade, teve o primeiro grupo destinado para as amostras de *H. heliophila*, o segundo para as de *Topsentia* sp. nov. do Brasil, o terceiro para as amostras de *N. carbonaria*, *H. caerulea* da Martinica e *T. fugax* do Brasil, o quarto grupo para *T. ophiraphidites* e as espécies de *Geodia* e o quinto grupo, exclusivamente para os compostos com alta intensidade encontrados nas amostras de *G. corticostylifera*.

4.4.3 Visualização e interpretação metabólica por redes moleculares

A visualização dos íons e suas relações foram realizadas no programa Cytoscape, mas apenas 14 íons foram identificados a partir de dados já conhecidos. Um total de 18 redes metabólicas foi observado com quatro grandes famílias de compostos identificadas (Figura 45). A primeira rede metabólica foi praticamente específica para as amostras de *Topsentia* sp. nov. do Brasil (cor roxa) composta por esteróis aminosulfatados. A segunda rede contém basicamente amostras de *Hymeniacidon heliophila* (cor laranja) composta por fosfolipídios ligados por uma ponte tipo fosfodiéster a uma base nitrogenada. A terceira rede é formada por glicolipídios, preferencialmente em amostras de *Terpios fugax* da Bahia (cor azul escuro) e *N. carbonaria* e *H. caerulea* da Martinica (cor verde e azul claro, respectivamente). Por fim, a quarta rede metabólica é específica para amostras de *G. corticostylifera* composta por substâncias halogenadas, especialmente compostos clorados e

bromados. Nesta rede foi encontrada a família de alcalóides Geodiamolídeo, os quais possuem atividade citotóxica, previamente identificada nesta espécie.

Figura 44 – Mapa de calor indicando a ordenação das espécies frente a intensidade dos metabólitos VIP.



Legenda: A coloração varia de acordo com a intensidade, onde 4 é muito intenso e -4 pouco intenso. Legenda: Am- *Amorphinopsis atlantica*, Hm- *Halichondria melanadocia*, Hc- *Hymeniacidon caerulea*, Hhi- *H. heliophila* inverno, Hhv- *H. heliophila* verão, Hy- *Rhaphidostyla* sp. nov., Te- *T. fugax*, To- *Topsentia* sp. nov. (Fernando de Noronha, Ceará e Bahia), To- *Topsentia ophiraphidites* (Martinica), Mar-Martinica, FN- Fernando de Noronha, CE- Ceará, BA- Bahia, RJ- Rio de Janeiro. Grupos externos Dr- *Dragmacidon reticulatum*, Gc- *Geodia corticostylifera*, Ge- *Geodia* sp.1, GeB- *Geodia* sp.2, Nc- *Neopetrosia carbonaria*.

Fonte: O autor, 2019.

Figura 45 – Redes metabólicas com famílias de compostos específicas obtidas a partir de fragmentos de íons precursoros em análise em tandem e suas prováveis fórmulas moleculares, à direita. (continua)

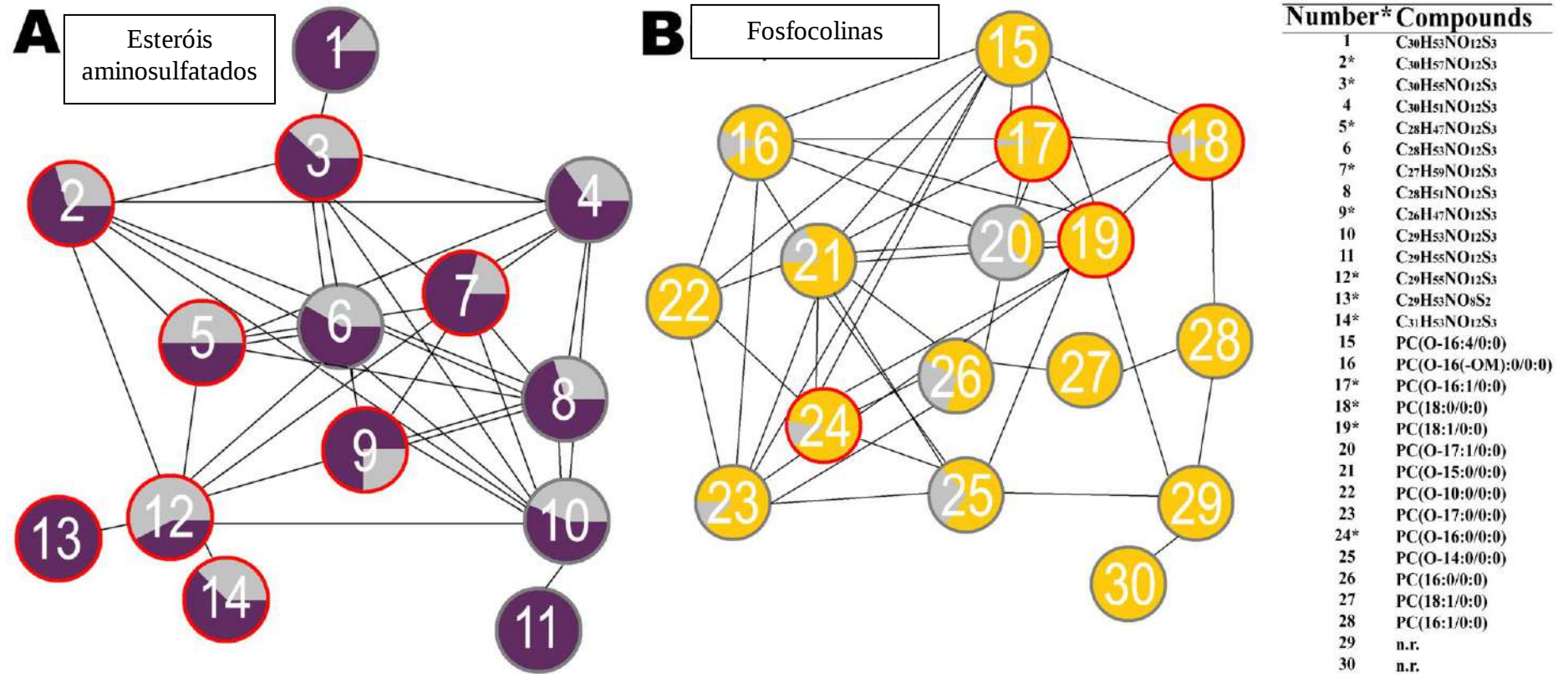
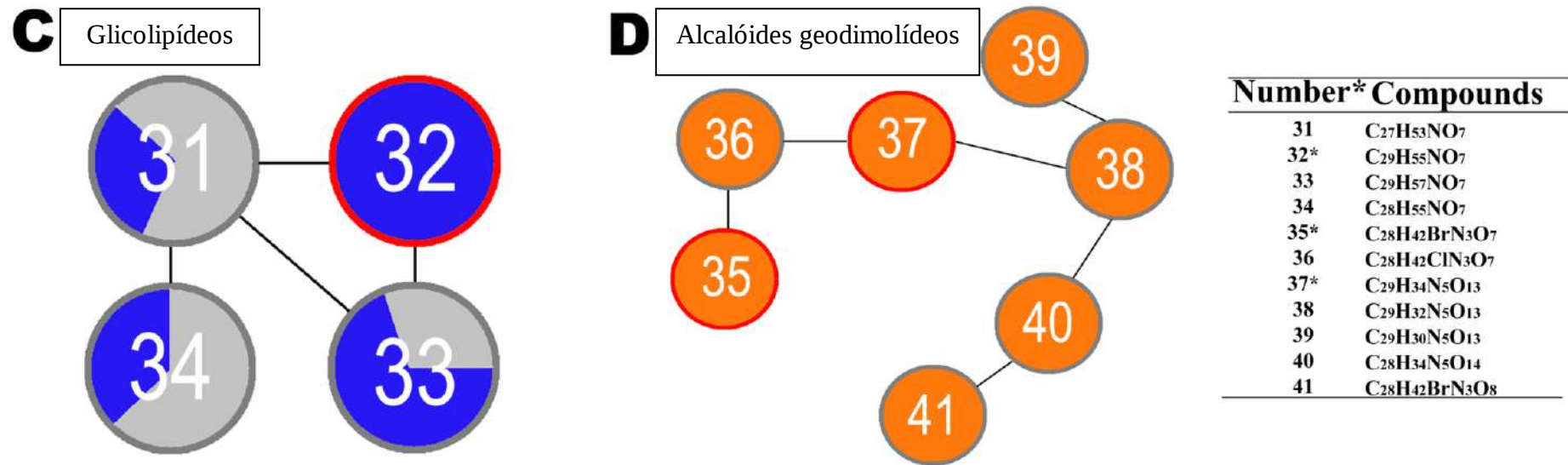


Figura 45 – Redes metabólicas com famílias de compostos específicas obtidas a partir de fragmentos de íons precursoros em análise em tandem e suas prováveis fórmulas moleculares, à direita. (conclusão)



Legenda: As bordas vermelhas e os números com * nas legendas à direita indicam íons VIP. As cores dentro dos círculos indicam o percentual em que o metabólito é expresso nas diferentes espécies, sendo a cor cinza aquela que representa outras espécies além de A) *Topsentia* sp. nov. (esteróis aminosulfatados), B) *Hymeniacidon heliophila* (fosfocolinas), C) *Terpios fugax* (glicolipídeos), D) *Geodia corcostylifera* (alcalóides do tipo geodiamolídeo).

Fonte: O autor, 2019.

4.4.4 Toxicidade dos metabólitos pelo teste de Microtox®

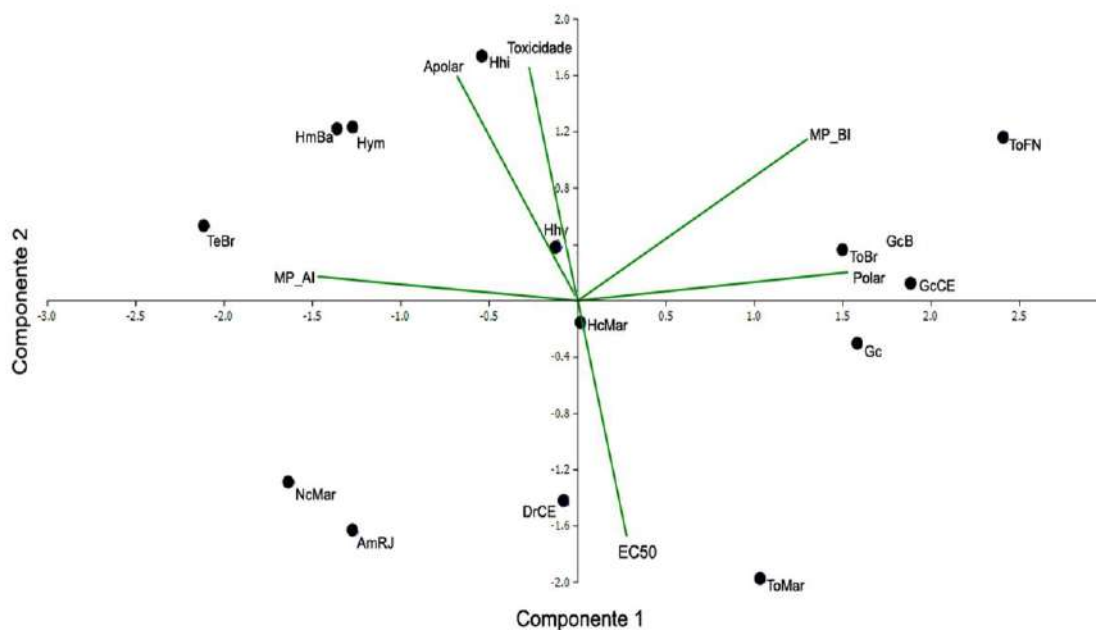
As amostras do Brasil foram mais efetivas contra a bactéria *Aliivibrio fischeri* do que as da Martinica (teste t de Student). Entretanto, apenas as amostras de *Terpios fugax* e *Halichondria melanadocia*, ambas da Bahia, obtiveram alta eficácia contra a cepa bacteriana ($EC_{50} = 8,6$ e $8,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). As espécies que normalmente sofre com epibiose, como *Geodia* sp.1, *Amorphinopsis atlantica* e *Topsentia ophiraphidites*, por exemplo, não apresentaram nenhum sinal de potencial tóxico desde as amostras da Martinica até o Rio de Janeiro.

Apesar da toxicidade não ter sido alta nos gêneros *Hymeniacidon* e *Topsentia*, diferenças intraespecíficas e interespecíficas foram observadas. As amostras de *Topsentia* sp. nov. de Fernando de Noronha ($EC_{50} = 130,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram significativamente mais tóxicas ($p = 0,031$) do que as do litoral brasileiro ($EC_{50} = 212,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e da Martinica ($EC_{50} = 408,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Tanto as amostras de *Hymeniacidon heliophila* quanto as de *H. caerulea* apresentaram uma média de $EC_{50} = 150,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ao se comparar as toxicidades dos compostos químicos dentro de uma mesma população de *H. heliophila*, uma diferença significativa foi observada ($p = 0,013$), com as amostras do inverno sendo mais tóxicas do que as do verão.

No quadrante esquerdo superior da Figura 46 notam-se as amostras e o grau de polaridade dos compostos que explicam as maiores toxicidades encontradas neste estudo. As amostras mais tóxicas são referentes a compostos apolares (após 13 minutos) e todos exemplares com maior potencial tóxico são do Brasil. Os compostos apolares foram mais relacionados com as amostras de *H. heliophila*, *Rhaphidostyla* sp. e *H. melanadocia*, enquanto as amostras de *T. fugax* se relacionaram mais com os compostos de média polaridade de alta intensidade. Já no quadrante superior da direita, os compostos de *Topsentia* spp. do Brasil e *G. corticostylifera* do Ceará parecem apresentar mais compostos polares. Nenhuma espécie se relacionou fortemente com os compostos de média polaridade de baixa intensidade. No quadrante inferior da direita, *Geodia* sp.1 se mostrou próxima dos compostos polares, enquanto *T. ophiraphidites* da Martinica foi a amostra com maior EC_{50} . Por fim, no quadrante inferior da esquerda, *A. atlantica*, *H. caerulea*, *N. carbonaria* e *D. reticulatum* não se relacionaram positivamente com nenhum grau de polaridade e não apresentaram altos valores de toxicidade.

Tanto na PCA quanto no cromatograma de *H. heliophila*, houve diferença entre as amostras do verão e do inverno. No inverno, os compostos apolares parecem ser mais intensos do que nas amostras do verão. Este maior número de compostos apolares é o que faz as amostras do inverno serem significativamente mais tóxicas do que as do verão.

Figura 46 – Resposta ecotoxicológica das esponjas e dos graus de polaridade dos metabólitos frente à bactéria *Aliivibrio fischeri*.



Legenda: Am- *Amorfinopsis atlantica*, Hm- *Halichondria melanadocia*, Hc- *Hymeniacidon caerulea*, Hhi- *H. heliophila* inverno, Hhv- *H. heliophila* verão, Hy- *Rhaphidostyla* sp. nov., Te- *T. fugax*, To- *Topsentia* sp. nov. (Fernando de Noronha, Ceará e Bahia), To- *Topsentia ophiraphidites* (Martinica), Mar- Martinica, FN- Fernando de Noronha, CE- Ceará, BA- Bahia, RJ- Rio de Janeiro. Grupos externos Dr- *Drumacidon reticulatum*, Gc- *Geodia corticostylifera*, Gc- *Geodia* sp.1, GcB- *Geodia* sp.2 Brasil, Nc- *Neopetrosia carbonaria*. MP_AI- média polaridade de alta intensidade e MP_BI- média polaridade de baixa intensidade.

Fonte: O autor, 2019.

4.5 Discussão

Neste capítulo, as assinaturas químicas de diferentes espécies de esponjas foram avaliadas com o objetivo de evidenciar a diversidade química dos organismos, assim como testar se essa diversidade se distingue entre táxons e, consequentemente, testar se a metabolômica pode ser uma boa ferramenta de auxílio na taxonomia das esponjas da ordem Suberitida. Esta abordagem preterida nos primeiros anos de desenvolvimento da metabolômica, possivelmente porque a taxonomia não tem o mesmo *glamour* do que as áreas

industriais. Quando a metabolômica foi criada, diversas aplicações foram imaginadas, tais como a previsão de novas vias metabólicas, o aumento da produção de metabólitos em vias bioquímicas importantes usando a engenharia química, a investigação dos efeitos biológicos em interações interespecíficas e a avaliação química entre organismos (FIEHN, 2002). Hoje, com o desenvolvimento de técnicas de análise robustas, como HPLC/MS e RMN, a discriminação de táxons é possível quando se comparam dados morfológicos com dados químicos.

Historicamente, o potencial químico do filo Porifera tem sido investigado com o objetivo de elucidar compostos com potencial bioativo, olhando especificamente para alguns grupos de substâncias, como esteróis (DE ROSA *et al.*, 1973; MINALE e SODANO, 1974; FUSETANI *et al.*, 1981), alcalóides (OH *et al.*, 2006; LAVILLE *et al.*, 2009) e mais recentemente terpenóides (NAKAMURA *et al.*, 1984; CARLETTI *et al.*, 2003; WEGERSKI *et al.*, 2006; OHNO *et al.*, 2011). Apesar de este tipo de estudo ter permitido inclusive a identificação de alguns compostos com potencial quimiossistemático (BERGQUIST *et al.*, 1991a; VAN SOEST *et al.*, 1996; DÍAZ-MARRERO *et al.*, 2004), eles não demonstram a real diversidade de compostos existentes do filo, uma vez que focam em uma pequena parcela da diversidade e, normalmente, em picos representados por compostos majoritários. De forma distinta, a metabolômica permite uma visão global do conjunto de substâncias químicas presentes em indivíduos. Através da utilização dos perfis químicos, diferenças desde o nível de ordem até o nível de espécie foram identificadas e, embora pouca variação tenha sido registrada nos picos de alta intensidade, a metabolômica cumpriu a sua função, pois foi eficiente ao elucidar os detalhes químicos de cada espécime.

A alta diversidade de metabólitos encontrados neste estudo entra em concordância com observações pretéritas de que as esponjas representam uma fonte rica de metabólitos com uma diversidade e potencial bioativo notável (KORNPROBST, 2005; BLUNT *et al.*, 2016). Embora a identificação de compostos bioativos seja fundamental para entender a função dos metabólitos e a evolução das espécies, uma visão global permite conhecer a diversidade química de um organismo (FIEHN, 2002), indicando como este organismo está respondendo atualmente aos múltiplos fatores que atuam sobre ele, além de permitir a identificação de marcadores específicos para determinados grupos. Assim, a metabolômica ganha força nos dias atuais, pois é uma ferramenta viável para os mais diversos tipos de estudos químicos, ecológicos, sistemáticos e evolutivos.

Com o objetivo de evidenciar a diversidade total de metabólitos expressos por um indivíduo, a abordagem de metabolômica global foi capaz de elucidar não só metabólitos

primários e especializados oriundos das esponjas, como também poluentes derivados da produção de plásticos em todas as esponjas, como o di(2-etilhexil) ftalato, o acetiltributilcitrato e o tributilcitrato, comumente utilizados como aditivos na produção de cloreto de polivinil, o PVC (HAUSER e CALAFAT, 2005). Destes compostos, o DEHP é o mais tóxico, apresentando solubilidade na água do mar entre 1,16 mg/L e 0,16 mg/L (GIAM *et al.*, 1980; HOWARD *et al.*, 1985) e afetando juvenis do peixe *Clarias gariepinus* Burchell, 1822 com 80 µg/L de forma subletal (IKELE *et al.*, 2016). O TBC e o ATBC são substitutos do DEHP e são capazes de produzir diarreia em ratos quando expostos em altas concentrações (FINKELSTEIN e GOLD, 1959). Estes compostos foram significativamente menos tóxicos do que o DEHP em um experimento de longa exposição realizado para avaliar os seus efeitos contra a fecundidade do peixe zebra *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) (MUHAMMED *et al.*, 2018). Apesar de poucos estudos terem mostrado a presença e o efeito de microplásticos em poríferos (BAIRD, 2016; KARLSSON *et al.*, 2017), a contaminação de esponjas marinhas por bifenilpoliclorado (PCB, em inglês) é conhecida há pelo menos duas décadas (Pérez *et al.*, 2003). Assim como os demais poluentes, o PCB também pode ser utilizado como plastificante. A alta intensidade de DEHP, TBC e ATBC em todas espécies aqui estudadas indicam a necessidade urgente de estudos na área. Assim, a metabolômica prova ser uma ferramenta pronta para ser aplicada tanto na identificação de compostos produzidos pelas espécies, mas também como forma de detecção de poluentes.

As diferenças observadas nos perfis químicos para espécies da classe Demospongiae neste estudo seguem o que foi demonstrado para a ordem Verongiida, na qual duas novas espécies de *Hexadella* foram identificadas, por meio de perfis químicos (REVEILLAUD *et al.*, 2012). Os autores deste estudo, inclusive, adicionaram as características metabólicas na chave de identificação das espécies. Atualmente, a classe Homoscleromorpha é a que apresenta mais e melhores resultados na questão da utilização das assinaturas químicas como uma ferramenta adicional à taxonomia de Porifera, muito porque este grupo possui poucos caracteres morfológicos, sendo alguns gêneros representados pela ausência de esqueleto. Sendo assim, os espongiólogos precisam criar mecanismos para encontrar caracteres sinapomórficos para descrever as espécies. Em Homoscleromorpha, diversos estudos com diferentes espécies e em distintas localidades já foram capazes de elucidar diferenças específicas quanto aos caracteres metabólicos, os quais corroboram alguns caracteres morfológicos e filogenéticos (IVANISEVIC *et al.*, 2011a; PÉREZ *et al.*, 2011; RUÍZ *et al.*, 2014). Sendo assim, é possível que a metabolômica auxilie na taxonomia de diferentes grupos de esponjas, mesmo aqueles que já possuem alguns caracteres morfológicos com sinal

filogenético. Exemplos positivos com diferentes grupos de difícil classificação já foram evidenciados, como no Reino Plantae, onde a identificação baseada em perfis químicos em nível de gênero corroborou dados filogenéticos e alguns marcadores químicos foram elucidados para diferentes gêneros da tribo Vernonieae (GALLON *et al.*, 2018). Dois morfotipos do coral *Parazoanthus axinellae* (Schmidt, 1862) mostraram ter uma grande diferenciação química, corroborando a identificação morfológica (CACHET *et al.*, 2015). Porém, o marcador mitocondrial COX1 não foi capaz de evidenciar nenhum suporte filogenético para diferenciar estes morfotipos. O mesmo problema foi evidenciado em um estudo recente com esponjas (RUÍZ, 2017), onde os VIPs foram identificados, mas o agrupamento hierárquico com as análises metabolômicas para a família Plakinidae não corroboraram as relações genéticas entre os gêneros. Por outro lado, no mesmo estudo, distinções entre os gêneros na família Oscarellidae foram observadas. Antes dos estudos de metabolômica, Erpenbeck e van Soest (2007) criticaram duramente a utilização de compostos químicos na sistemática. Porém, após os avanços na obtenção e interpretação dos dados de metabolômica, a utilização desta ferramenta na taxonomia integrativa parece trazer mais benefícios do que malefícios na sistemática do filo.

No presente estudo, a diferença na composição química das espécies foi maior do que a diferença geográfica, uma vez que não foram observados VIPs metabólicos com altas intensidades em uma população e ausência em outra. A principal diferença no nível taxonômico, em detrimento de caracteres sazonais ou geográficos, parece ser comum no Filo Porifera, uma vez que este mesmo resultado já foi observado para duas espécies de *Haliclona* (REVERTER *et al.*, 2018) e para a espécie *Crambe crambe* (Schmidt, 1862) (TERNON *et al.*, 2017), ou seja, não houve evidência da produção de compostos específicos para diferentes regiões geográficas. Porém, generalizações não podem ser feitas, já o que os VIPs identificados nos perfis químicos de amostras da classe Homoscleromorpha do Mediterrâneo foram diferentes daqueles obtidos em amostras do Caribe (RUÍZ, 2017). Este resultado segue o observado em outros grupos (zoantídeos e actinobactérias) no Oceano Atlântico Ocidental, os quais apontaram que as diferenças químicas foram primeiramente referentes à distribuição geográfica e posteriormente às características taxonômicas (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2018; BAUERMEISTER *et al.*, 2018). Isso mostra que o metabolismo é variável de acordo com o ambiente, mas que grande parte do metaboloma se mantém constante e as diferenças em níveis hierárquicos mais baixos podem ser evidenciados, auxiliando na taxonomia.

A abordagem global utilizada aqui evidenciou metabólitos mais específicos para determinado grupo do que para outro, permitindo a separação de espécies, inicialmente

coletadas como se tratando de uma só espécie, como por exemplo os morfotipos azuis (*Terpios fugax* e *Hymeniacidon caerulea*) os morfotipos verde musgo ou preto (*Halichondria melanadocia* e *Neopetrosia carbonaria*) e *Topsentia* spp. Essas diferenciações somente foram possíveis devido ao desenvolvimento de técnicas analíticas de fragmentação dos íons, as análises estatísticas, principalmente as multivariadas, e as redes de metabólitos. Assim como estas técnicas foram capazes de mostrar diferenças em um estudo taxonômico, elas também têm sido empregadas com sucesso em trabalhos com diferentes propósitos. As influências ambientais e taxonômicas foram avaliadas e claramente observadas em um estudo realizado na região costeira do Brasil com os zoantídeos *Palythoa* (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2018). Por sua vez, alguns autores evidenciaram que o fluxograma metodológico seguindo essas técnicas permite a descoberta mais rápida de metabólitos bioativos com potencial medicinal (OLIVON *et al.*, 2017b; QUINN *et al.*, 2017; NOTHIAS *et al.*, 2018; VELENOSI *et al.*, 2019). E, de forma mais teórica, Allard e colaboradores (2016) mostraram que a integração entre essas ferramentas otimiza o fluxograma experimental, inclusive com a adição de outras técnicas, como MS/MS *in-silico* e Olivon *et al.* (2017c) apontam que um pré-processamento utilizando o programa MZ-Mine2 aumenta as chances de obter uma rede metabólica mais realista. Apesar da combinação destas ferramentas ter sido fundamental para filtrar e elucidar as principais características químicas presentes nas amostras analisadas neste estudo, o desenvolvimento de análises mais robustas, a padronização nas configurações dos programas e o desenvolvimento de uma biblioteca de metabólitos de Porifera ainda são requeridas na área para que comparações, neste grupo, possam ser realizadas em nível mundial.

Os esteróis e os alcalóides são os principais grupos de substâncias químicas encontradas nos representantes de Suberitida. Adicionalmente, os lipídeos foram comuns nas nossas amostras o que difere do conhecido na literatura (KORNPROBST, 2005). Assim, pode-se dizer que a metabolômica foi uma ferramenta importante na detecção destes compostos tão comuns e abundantes no metabolismo primário e secundário de animais.

As estruturas aminosulfatadas aqui identificadas, quase que exclusivamente, para os espécimes de *Topsentia* sp. nov. de Fernando de Noronha são compostos muito diferentes dos observados nas esponjas até o momento (KORNPROBST, 2005). Alguns exemplos de compostos aminosulfatados encontrados em esponjas são os alcalóide tauroacidina (ex. *Hymeniacidon* spp.) e dercitamida (ex. *Negombata magnifica* (Keller, 1889)), o macrolídeo latrunculina B (ex. Latrunculiidae), benzotiazol (ex. *Tedania ignis* (Duchassaing & Michelotti, 1864)) e hipotaurociamina (*Agelas* sp.), porém ophirapstanol trissulfato é o único esterol aminosulfatado já isolado em uma esponja (*Topsentia* sp., GUNASEKERA *et al.*,

1994). Hipotauriamina e tauroacidina são provenientes de classes de compostos consideradas com potencial quimiossistemático (ERPENBECK e VAN SOEST, 2007). Por outro lado, o alcalóide piridoacridina (dercitamida) e o benzotiazol provavelmente são de origem microbiana. Sendo assim, é possível que a classe de esterol aminosulfatado encontrado em *Topsentia* sp. nov. seja proveniente tanto de origem animal quanto microbiana.

Alguns esteróis sulfatados (ex., halistanol) já foram descritos para a família Halichondriidae (FUSETANI *et al.*, 1988; KANAZAWA *et al.*, 1992) e para o próprio gênero *Topsentia* (MCKEE *et al.*, 1993), porém nenhum deles possui moléculas de nitrogênio em combinação com o esterol sulfatado. Este esterol não aminado possui atividade citotóxica e antibacteriana em *Petromica citrina* Muricy, Hajdu, Minervino, Madeira & Peixinho, 2001, podendo ser um composto medicinal alternativo, uma vez que os microrganismos têm se mostrado resistentes às drogas comumente utilizadas (MARINHO *et al.*, 2012). Mais recentemente, os halistanóis sulfatados isolados de *Halichondria* sp. do Japão demonstraram ter atividade contra as SIRT 1-3 (NAKAMURA, 2018), sirtuínas que parecem estar relacionadas no silenciamento de genes e envolvidas na preservação de tecidos (YAMAMOTO *et al.*, 2007; DONMEZ *et al.*, 2010). Apesar de vários testes ainda serem necessários, é possível que esta classe de esteróis seja útil no tratamento de doenças citotóxicas.

Em Porifera, as únicas estruturas combinando ao menos uma molécula de nitrogênio e enxofre foram identificadas para o gênero *Polymastia*, como polymastiamida (KONG e ANDERSEN, 1993), *Lamellodysidea*, como peptídeos dysidenina e derivados, mas este possui também moléculas de cloro (KAZLAUSKAS *et al.*, 1977) e *Amorphinopsis* e *Axinyssa*, como as axisonitrilas sesquiterpenoídicas aminosulfatadas (WEGERSKI *et al.*, 2006). Apesar de cada uma destas substâncias ser de uma classe de compostos diferente, inclusive as encontradas em *Topsentia*, todos os gêneros mencionados possuem relação íntima com microrganismos, os quais podem ser os reais produtores destes compostos aminosulfatados. Esta hipótese pode ser corroborada junto ao trabalho desenvolvido por Flatt e colaboradores (2005), onde os autores evidenciaram a presença dos peptídeos contendo nitrogênio, enxofre e cloro tanto na esponja *Lamellodysidea herbacea* (Keller, 1889) quanto na cianobactéria simbiote *Oscillatoria spongeliae* Schulze ex Gomont, 1892. De qualquer forma, este tipo de estrutura é único no filo Porifera (e seus simbioses) e por isso merece ser estudo mais profundamente. Neste caso, o metabólito já foi reconhecido e por isso a técnica de metabolômica com alvo deve ser aplicada em combinação com a técnica de RMN. Além disso, estudos para determinar a diversidade da comunidade bacteriana nas esponjas de

Fernando de Noronha, assim como extrações químicas dos principais grupos devem realizadas para identificar qual organismo produz tais esteróis.

Os lipídeos, por sua vez, são substâncias comuns aos seres vivos e geralmente são representados por pequenas moléculas formadas por carbono, hidrogênio e oxigênio que podem se diluir ou não em solução aquosa. Outros tipos de lipídeos podem conter fósforo, nitrogênio e enxofre. A estrutura não usual da camada fosfolipídica nas membranas celulares das esponjas pode ser uma das chaves para o sucesso adaptativo deste grupo aos mais distintos habitats aquáticos (DJERASSI e LAM, 1991), porém nenhuma evidência foi trazida a luz até o momento (GENIN *et al.*, 2008). Contendo fósforo e nitrogênio, por exemplo, encontramos neste estudo as fosfocolinas que são moléculas intermediárias na síntese dos fosfolipídeos e são encontradas exclusivamente em células animais. As fosfocolinas foram identificadas majoritariamente para as amostras de *Hymeniacidon heliophila* do Rio de Janeiro, enquanto os glicolipídeos foram encontrados em amostras de *Terpios*, *Halichondria* e *Hymeniacidon*. Alguns trabalhos mostraram que as fosfocolinas podem ser os principais tipos de fosfolipídeos em esponjas (CARBALLEIRA *et al.*, 1989; CARBALLEIRA e REYES, 1990; CARBALLEIRA e SHALABI, 1990). Estes lipídeos podem estar amplamente distribuídos em animais marinhos, atuando em diversas funções biológicas, principalmente em mecanismos de defesa adaptativa. Os fosfolipídeos, por exemplo, podem ser produzidos como moléculas de defesa contra reações inflamatórias em mamíferos (ZIMMERMANN *et al.*, 1992), enquanto na esponja *Suberites domuncula*, as substâncias de fator ativador de plaquetas (em inglês, lyso-PAF) impediram o crescimento epibionte e controlaram o crescimento bacteriano (MÜLLER *et al.*, 2004). As lyso-PAF encontradas na esponja *Spirastrella abata* são capazes de inibir a via metabólica do colesterol (SHIN *et al.*, 1999) e impedir o desenvolvimento de células cancerígenas (ALAM *et al.*, 2001). Os glicolipídeos são estruturas com longas cadeias que também possuem funções biológicas em esponjas marinhas. Até o momento, os glicosfingolipídeos (GSL) podem apresentar forte atividade antitumoral e imunoestimulante (NATORI *et al.*, 1993) e potencial antiinflamatório por inibir a produção de óxido nítrico (BORBONE *et al.*, 2001). Mesmo com estas funções já identificadas, estudos específicos com os glicolipídeos ainda são necessários para evidenciar detalhadamente as funções biológicas realizadas por estes lipídeos em esponjas (COSTANTINO *et al.*, 2010). Além disso, acredita-se que os glicolipídeos estejam envolvidos em processos de reconhecimento celular. Caso estes compostos tenham essa função, os glicolipídeos podem ser utilizados como marcadores moleculares taxonômicos, pois estes lipídeos se comportam de forma espécie-específica.

Os compostos apolares e os de média polaridade foram os principais responsáveis pelo aumento na toxicidade das amostras. Além disso, a toxicidade de amostras de acordo com a variação sazonal, mesmo dentro de um único ano, foi evidente para as amostras de *Hymeniacidon heliophila*. Ao contrário do observado na literatura, a toxicidade nesta espécie foi maior no período reprodutivo (inverno), quando geralmente a espécie evita gastar energia em defesa e aumenta o gasto energético em estratégias reprodutivas e crescimento dos descendentes (PEREIRA, 2009). Além disso, geralmente, os maiores valores de bioatividade em esponjas ocorre no verão ou outono (TURON *et al.*, 1996, 2009; IVANISEVIC *et al.*, 2011b), mas também já foram encontradas espécies com alta toxicidade no inverno e ausência de compostos tóxicos no verão (FERRETI *et al.*, 2009). Apesar de nenhum metabólito ter sido identificado como bioativo neste estudo, esta população de *H. heliophila* da praia de Itaipú, em Niterói (RJ) já é reconhecida pela produção de substâncias bioativas, uma vez que estudos com o extrato bruto desta população revelou propriedade antiincrustantes e defesa química contra predadores tropicais (RIBEIRO *et al.*, 2010, 2012). Por isso, coletar amostras desta população temporalmente é fundamental para entender a real variação dos compostos químicos e tentar elucidar as vias metabólicas produtoras de substâncias bioativas e, se possível, sintetizar compostos com atividades medicinais.

Apesar das técnicas aqui empregadas não favorecerem a identificação dos compostos bioativos, a bioatividade de algumas amostras foram notadas tanto no gradiente temporal quanto no espacial, o que é importante quando não se conhece o potencial e a diversidade metabólica das espécies (MARTÍ *et al.*, 2003). O estudo sobre a variação intraespecífica na produção de compostos químicos é, até hoje, de grande interesse na área da Ecologia Química, porque é nesse nível de estudo que podem ser elucidadas respostas evolutivas (HAY, 1996). Variações na bioatividade de organismos marinhos ao longo de um gradiente latitudinal são comuns devido às especificidades locais, seja competição e predação ou disponibilidade de nutriente e luz. Embora haja diferença na bioatividade de compostos de uma mesma espécie em grandes zonas latitudinais (BAKUS e GREEN, 1974), esta diferença não é necessariamente estatística, quando se trata o dado metabólico globalmente (MCCLINTOCK, 1987; BECERRO *et al.*, 2003; GREFF *et al.*, 2017). Assim, a evidência de maior bioatividade em amostras do Brasil em relação às da Martinica a partir das análises com o Microtox contrapõem a Hipótese de Gradiente Latitudinal. Em paralelo às análises de metabolômica, o teste de bioatividade por Microtox parece ser uma boa ferramenta comparativa, permitindo a detecção de possíveis mudanças intra e interpopulacional, seja quanto a diversidade metabólica ou seu potencial bioativo.

5 FILOGENIA E SISTEMÁTICA MOLECULAR DA ORDEM SUBERITIDA

5.1 Introdução

A filogenia é um ramo da biologia que visa reconstruir a história evolutiva dos grupos a partir de relações de parentesco entre táxons. Assim, um grupo monofilético é aquele que compartilha um ancestral comum mais recente entre dois táxons do mesmo nível de classificação (BIGELOW, 1956), enquanto qualquer táxon que não compartilhe um ancestral comum mais recente é considerado um grupo merofilético e não deve ser considerado um grupo natural (BERNARDI, 1981). As diferenças moleculares obtidas nas filogenias podem ser utilizadas para adicionar suporte e resolução às sinapomorfias sugeridas na taxonomia alfa, por meio da sistemática molecular (LÔBO-HAJDU, 2006). Estas ferramentas devem ser aplicadas juntas para melhorar a compreensão de grupos que apresentam poucos caracteres diagnósticos.

As características morfológicas são muitas vezes consideradas como pouco informativas, pois geralmente são anotadas como presença e ausência, o que pode subestimar a função destes caracteres, uma vez que eles estão sujeitos à convergência e paralelismo (JENNER, 2004). Por outro lado, dados moleculares são capazes de inferir diferenças tanto em nível intraespecífico quanto interespecífico, por meio da sistemática molecular. Porém, eles também estão propensos a problemas, como a convergência de ramos longos, a qual pode ser observada em filogenias reconstruídas com grupos distantemente relacionados, gerando uma interpretação errônea sobre o grupo avaliado (HILLIS e WIENS, 2000). Fato é que qualquer metodologia apresenta prós e contras, por isso o que deve ser considerado na sistemática molecular é se a técnica utilizada esta de acordo com a pergunta realizada, pois só assim os resultados indicarão caminhos verdadeiros acerca da filogenia do grupo (ver HILLIS *et al.*, 1996). Por isso, para cada tipo de estudo é necessário empregar marcadores moleculares com taxas de mutação maiores ou menores de acordo com o problema em questão (MORITZ e HILLIS, 1996).

A inferência evolutiva do marcador nuclear 28S é relativamente bem suportada em Porifera. Este marcador possui sinal filogenético e por isso é um dos mais utilizados em reconstruções filogenéticas no filo, constituindo uma grande base de dados comparativa. Um ponto negativo nos estudos filogenéticos com 28S é que cada grupo de pesquisa utiliza um

fragmento do gene distinto, limitando a comparação. Para resolver este problema, é necessária a utilização de espécimes contendo o gene completo sequenciado, assim a comparação se torna possível. Além disso, o 28S tem demonstrado ambiguidade na classe Demospongiae, sugerindo assim uma evolução diferenciada do marcador (DE PAULA 2013). Por este motivo, BORCHIELLINI *et al.* (2000) sugeriram que a região D1-D2 fosse utilizada para recuperar relações interespecíficas, enquanto o nível D3-D5 seja aplicado em estudos no nível de família devido ao seu maior grau de conservação.

O espaçador interno transcrito ITS (“internal transcribed spacer”) tem provado ser um bom marcador molecular, sendo capaz de elucidar a estrutura e a história evolutiva de grupos proximamente relacionados. Devido à alta taxa mutacional, este marcador tem sido mais utilizado em estudos de nível populacional. Porém, relações interespecíficas já foram demonstradas em esponjas marinhas de diferentes ordens, como *Hymeniacidon* Bowerbank, 1858 (Suberitida), *Mycale* Gray, 1867 (Poecilosclerida), *Aplysina* Nardo, 1834 (Verongida) e *Geodia* Lamarck, 1815 (Tetractinellida) (LÔBO-HAJDU *et al.*, 2001, 2004). Outro benefício deste marcador é a possibilidade de observar a estrutura secundária do gene que pode ser considerada um fenótipo e, assim ser utilizada como uma estratégia molecular na separação de espécies. Estudos com fungos (RAMPERSAD, 2014) plantas medicinais (ZHANG *et al.*, 2015), corais (GRAJALES *et al.*, 2007), entre outros, já foram realizados neste sentido e mostraram um bom poder auxiliar à taxonomia alfa. Isto se dá porque a estrutura secundária do ITS2 possui padrões curtos e recorrentes no DNA (em inglês *motifs*) mais conservados, que facilitam a fixação de alinhamentos múltiplos, permitindo maior definição dos relacionamentos em níveis taxonômicos mais elevados do que o nível de gênero (KJER, 1995).

O 16S é um marcador mitocondrial conservado, pouco testado em estudos de filogenia no grupo Porifera e que apresenta resultados conflitantes. Até o momento, pode-se dizer que este marcador é capaz de evidenciar uma alta diversidade haplotípica, podendo ser uma opção para estudos de relações genéricas e específicas (LÓPEZ-LEGENTIL *et al.*, 2010; DE PAULA, 2013; VENTURA, 2014). Este marcador apresentou uma alta razão entre amostras amplificadas e sequenciadas de boa qualidade em estudos realizados com ordens de Porifera distantemente relacionadas, no Laboratório de Genética Marinha da UERJ (DE PAULA, 2013; VENTURA, 2014, presente estudo).

O COX1 é um gene mitocondrial, mais variável do que o 16S, e amplamente utilizado em Porifera (WÖRHEIDE, 2006; WANG e LAVROV, 2007; LAVROV *et al.*, 2008; LÓPEZ-LEGENTIL e PAWLIK, 2009), permitindo grande grau de comparação. Porém, problemas

quanto a variabilidade do gene, que pode ser muito distinta dependendo dos grupos estudados (ver ERPENBECK *et al.*, 2006b; DE PAULA *et al.*, 2012) e a dificuldade técnica na amplificação das amostras (VARGAS *et al.*, 2012) são pontos negativos com relação a este marcador. Assim, alta variabilidade deste gene pode minimizar o poder filogenético do marcador.

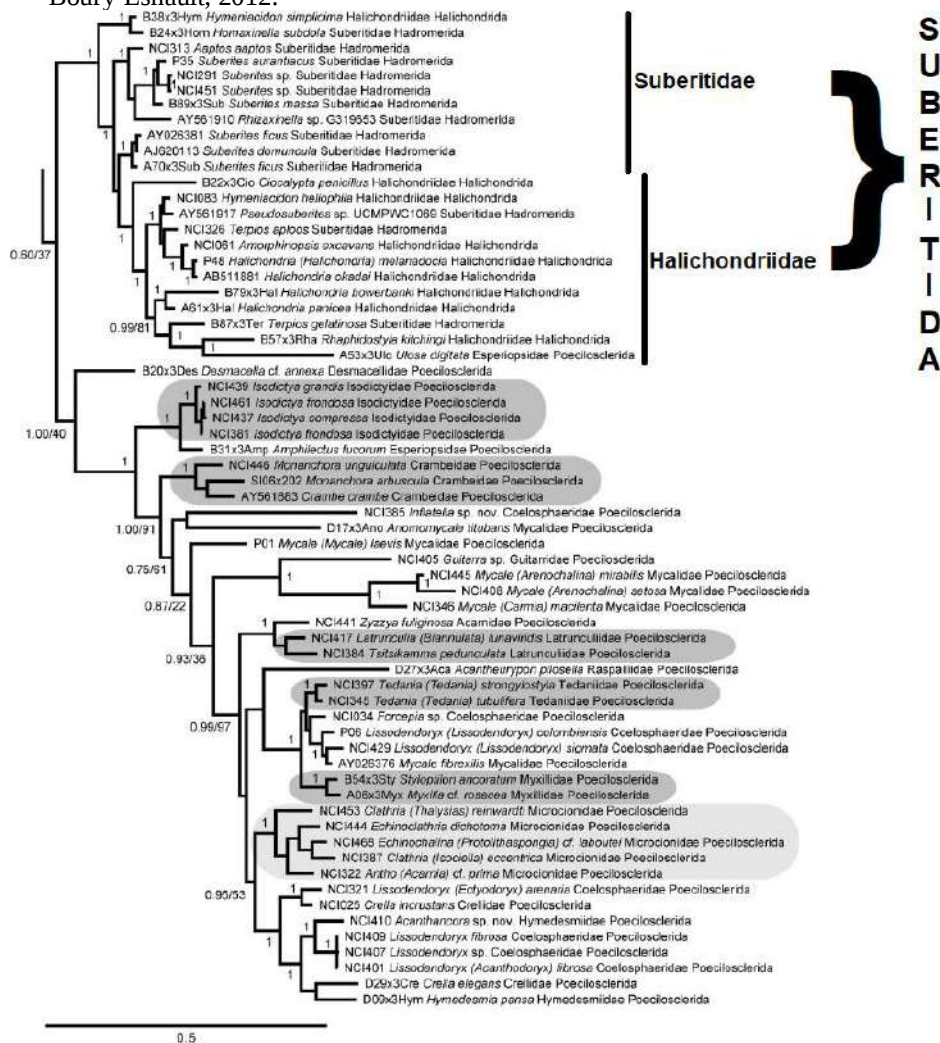
Por fim, o gene codificante para a subunidade II da citocromo c oxidase COX2 foi utilizado por ser um marcador mitocondrial com rápida substituição haplotípica, divergindo dos demais marcadores mitocondriais testados e mencionados acima. Pouquíssimos estudos com este marcador foram realizados com esponjas até o momento. No presente estudo, das sete amostras amplificadas, nenhuma foi sequenciada com sucesso, assim como no estudo realizado com o gênero *Mycale* por de Paula (2013).

Em Porifera, por exemplo, a sistemática molecular tem sido fundamental para a interpretação das relações entre os grupos. Mesmo assim, as reconstruções filogenéticas não corroboram as características fenotípicas, em alguns casos. “Lithistida”, por exemplo, é caracterizada pela presença de espículas com alta concentração de sílica, as desmas, formando um esqueleto rígido (PISERA e LÉVI, 2002). Contudo, um recente estudo integrativo sugeriu que as desmas não parecem ter sinal filogenético (SCHUSTER *et al.*, 2015). Em Suberitida, diversos trabalhos não são capazes de relacionar as espécies de Halichondriidae em um grupo monofilético, seja utilizando dados morfológicos, genéticos ou químicos, em separados ou em conjunto (ERPENBECK *et al.*, 2006a,b, 2007, 2012).

Diversas relações dentro da ordem Suberitida ainda não foram devidamente compreendidas. Segundo a nova proposta de classificação de MORROW e CÁRDENAS (2015), esta ordem é considerada monofilética, mas suas maiores famílias não. A ordem é definida por poucos caracteres morfológicos e pela sinapomorfia molecular de uma deleção de um pequeno *loop* de 25 pares de base na região D2 do gene nuclear 28S (DNAr). Estes dados corroboram estudos filogenéticos prévios com o grupo, os quais conseguem agrupar as famílias Suberitidae e Halichondriidae (CHOMBARD e BOURY-ESNAULT, 1999; LAVROV *et al.*, 2008; MORROW *et al.*, 2012; REDMOND *et al.*, 2013; THACKER *et al.*, 2013). Porém, ao analisar as relações de parentesco nos níveis de gênero, muitas relações são dúvidas, seja pela identificação prévia errada, seja pela necessidade de uma revisão em diversos gêneros que compõem as famílias Suberitidae e Halichondriidae. A Figura 47 expõe a polifilia nas famílias Suberitidae e Halichondriidae, assim como nos gêneros *Halichondria*, *Hymeniacidon*, *Suberites* e *Terpios*.

Diante de tantos benefícios que a sistemática molecular vem trazendo para a classificação de Porifera e, paralelamente, o grande número de relações filogenéticas ainda confusas, a melhor forma de estudar a taxonomia das esponjas parece ser através da integração das mais diversas ferramentas existentes. Dentro da ordem Suberitida ainda são necessários estudos específicos em níveis de família e gênero para que se possam compreender as relações filogenéticas dentro do grupo.

Figura 47 – Topologia baiesiana da relação filogenética na subclasse Heteroscleromorpha Cárdenas, Pérez, Boury-Esnault, 2012.



Legenda: Análise filogenética com o marcador nuclear 28S indica a Ordem Suberitida, representada pelas famílias Suberitidae e Halichondriidae e as demais ordens da subclasse Heteroscleromorpha.

Fonte: Modificado de THACKER *et al.*, 2013, pelo autor, 2019.

5.2 Objetivos

Objetivo geral:

- a) Reconstruir a filogenia da Ordem Suberitida a partir de amostras sequenciadas neste estudo e comparadas com outras já depositadas no GenBank.

Objetivos específicos:

- a) Levantar hipóteses filogenéticas desde o nível de ordem até o nível de espécie, através da relação das espécies;
- b) Comparar o resultado das relações filogenéticas com quatro marcadores moleculares distintos;
- c) Testar a utilização da estrutura secundária do ITS2 na taxonomia;
- d) Comparar a história de relação filogenética com os resultados morfológicos e assinaturas químicas;
- e) Delimitar os grupos de Suberitida da forma integrativa e realista.

5.3 Material e Métodos

O processamento experimental das esponjas e o início da análise dos dados moleculares foram conduzidos no Laboratório de Genética Marinha (LGMar) da UERJ, cujas etapas principais são mostradas na Figura 48 e detalhadas nas seções abaixo. Os protocolos e as amostras utilizados nos experimentos são descritos em detalhes no Apêndices A e B.

5.3.1 Extração e quantificação dos ácidos nucleicos

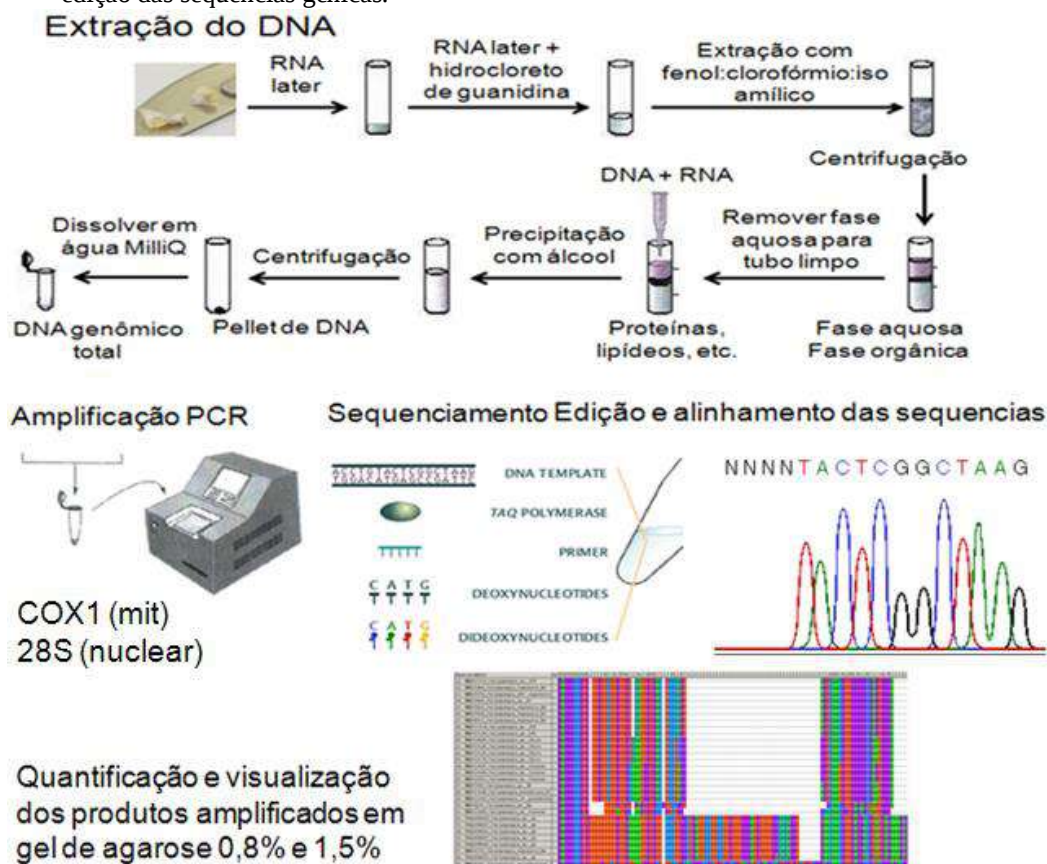
O DNA genômico total das esponjas foi extraído de acordo com dois protocolos pré-estabelecidos por pesquisadores do LGMar (LÔBO-HAJDU *et al.*, 1999; SALGADO *et al.*, 2007; Anexo B): um utilizando tampão de lise contendo Hidroclorato de Guanidina (GuHCl) e outro contendo Brometo de Cetil-Trimetil Amônio (CTAB). Brevemente, a descrição do

protocolo consiste na reidratação da amostra em tris-HCl/EDTA, seguida da substituição deste solvente pelo tampão de lise. A amostra é macerada e incubada contendo proteinase K e β -mercaptoetanol. Inicia-se então um processo de remoção de qualquer matéria orgânica, exceto DNA a partir de centrifugação e utilização do solvente orgânico clorofórmio, isopropanol e etanol 70%. Por fim, a amostra é seca e ressuspensa em RNase para quantificação dos ácidos nucleicos.

A quantificação do DNA foi feita por leitura da densidade ótica em espectrofotômetro de volumes reduzidos (Nanodrop™ 2000c, Thermo Scientific). A absorbância de ácidos nucleicos em 260 nm pode ser utilizada para estimar a sua concentração na amostra, uma vez que a uma concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$ e a um comprimento de percurso de 1 cm, o DNA dupla fita tem absorbância (A_{260}) igual a 1. A razão A_{260}/A_{280} é comumente utilizada para avaliar a contaminação de proteínas do DNA, ao passo que a razão A_{260}/A_{230} é um indicativo da presença de diversos contaminantes na amostra, tais como carboidratos, peptídeos, fenóis, ureia, ácido húmico e sais caotópicos, como o hidrocloreto de guanidina. Como diretriz, uma razão A_{260}/A_{280} com valores de 1,8 – 2,2 indicam um grau de pureza para proteínas tipicamente adequado para análise, enquanto que a razão A_{260}/A_{230} ideal deveria ser maior que 1,5 e idealmente próxima a 1,8.

Uma avaliação qualitativa do DNA foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, visualizados após incubação em brometo de etídeo a 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Anexo C). O protocolo se baseia na estimativa da concentração de DNA obtida por meio de uma corrida em um gel de Tris acetato/borato EDTA (por eletrovoltagem) e visualizado sob luz ultravioleta (UV) após coloração com brometo de etídio. A concentração final do DNA é avaliada pelos valores estabelecidos por Amos e Hoelzel (1991) modificado, seguindo de 1 - DNA não degradado até 6 - ausência de DNA.

Figura 48 – Fluxograma das etapas do estudo genético das esponjas marinhas, desde a extração de DNA até a edição das sequências gênicas.



Fonte: Adaptado de Lôbo-Hajdu *et al.*, 2004.

5.3.2 Marcadores moleculares e amplificação de DNA

Os marcadores moleculares nucleares e mitocondriais selecionados apresentam boa resolução para a Classe Demospongiae. A amplificação do DNA por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada para cinco marcadores moleculares, sendo dois nucleares (28S e ITS2) e três mitocondriais (16S, COX1 e COX2/RIM, onde RIM se refere a Região Intergênica Mitocondrial, *Intergenic Region of Mitochondrial DNA*). Os *primers* e as regiões gênicas testadas foram escolhidos devido as suas utilizações e variações já conhecidas para o Filo (Tabela 16).

Tabela 16 – *Primers* utilizados durante este trabalho para os diferentes marcadores moleculares.

Gene	Primers	Sequência 5' - 3'	Referência
28S	C1	ACCCGCTGAATTTAAGCAT	BORCHIELLINI <i>et al.</i> , 2004
	D2	TCCGTGTTTCAAGACGGG	CHOMBARD <i>et al.</i> , 1998
ITS2	SP5.8bF	AATCATCGAGTCTTTGAACG	THACKER e STARNES, 2003
	SP28cR	CTTTTCACCTTTCCTCA	
	-	-	-
	28rev	GTTAGTTTCTTTTCCTCCGCTT	LÔBO-HAJDU <i>et al.</i> , 2004
16S	diplo-RNL-f1	TCGACTGTTTACCAAAAACATAGC	LAVROV <i>et al.</i> , 2008
	diplo-RNL-r1	AATTCAACATCGAGGTSGGAAAC	
COX1	dgLCO-1490	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	MEYER (2003)
	dgHCO-2198	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	
COX2	dsCOX2-f1	TGGNGCAAATCATTCTTTATGC	D. Lavrov (comunicação pessoal)
/ RIM	dsATP6-r1	CTACATTAAATTGATCAAAATANGC	

Fonte: Referências na tabela.

A amplificação do DNA por meio da PCR foi realizada para cinco marcadores moleculares objetivando diferentes tipos de inferência evolutiva (Tabela 16). As reações foram realizadas com volume total de 30 µL, contendo: 0.75 U de DNA polimerase GoTaq (Promega), em tampão próprio contendo 1,5 mM de MgCl₂, 0,133 mM de dNTP (Promega), 0,16 µM de cada *primer* (senso e antiseno) e cerca de 20–100 ng de DNA fita molde. Dois programas de termociclagem foram empregados distintamente para os marcadores nucleares e mitocondriais. Para a amplificação dos marcadores nucleares (28S e ITS2) foi adotado um protocolo de termociclagem baseado em Thacker *et al.* (2013), com *touchdown*, o qual diminui a iniciação *off-target*, e aumenta assim a especificidade das reações, que consistiu em: uma fase inicial de desnaturação em 85°C por 5 min; 10 ciclos de amplificação com desnaturação em 94°C por 45s, pareamento em 55°C por 1 min, com diminuição de 1°C por ciclo, e extensão em 72°C por 2 min; 20 ciclos de amplificação com desnaturação em 94°C por 45s, pareamento em 55°C por 1 min e extensão em 72°C por 2 min; e uma fase final de extensão em 72 °C por 10 min. Para a amplificação dos marcadores mitocondriais (COX1, 16S e COX2/RIM) foi adotado um protocolo de termociclagem com *touch-up* (DE PAULA, 2013), o qual maximiza a iniciação das reações quando utilizando *primers* heterólogos, que consistiu em: uma fase inicial de desnaturação em 92°C por 4 min; 5 ciclos de amplificação com desnaturação em 92°C por 30 s, pareamento em 44°C por 45 s e extensão em 72°C por 1 min; 35 ciclos de amplificação com desnaturação em 92°C por 30 s, pareamento em 51°C por 45 s e extensão em 72°C por 1 min; e uma fase final de extensão em 72°C por 6 min.

5.3.3 Sequenciamento, edição e alinhamento múltiplo das sequências gênicas novas e comparativas

O sequenciamento das amostras foi conduzido no Laboratório Central (LC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), na forma de prestação serviço de caráter multiusuário e interdisciplinar, no âmbito da Plataforma Tecnológica de Genômica e Expressão Gênica. Cerca de 20 µL das purificações resultantes, contendo entre 10 – 50 ng/µL de produto de PCR, foi sequenciado utilizando o kit de sequenciamento de ciclo BigDye Terminator v3.1 e sequenciador automático ABI3500 (Applied Biosystems).

A edição das sequências foi conduzida nos programas SeqMan Pro v7.1.0 (Lasergene, DNASTAR®) e MEGA 6 (TAMURA *et al.*, 2013), no sentido 5'3' e no sentido reverso. Após edição, as sequências foram comparadas por meio de algoritmo BLAST® contra o banco de dados do GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), principalmente com o intuito de avaliar se as sequências obtidas pertenciam a contaminantes.

As sequências foram alinhadas no programa MAFFT v7.222 (KATO e STANDLEY, 2013), por meio de alinhamento múltiplo, o qual é iterativo e demonstra bons resultados em testes simulados (WILM *et al.*, 2006). As sequências de 28S, 16S e COX1 foram alinhadas com o algoritmo iterativo de busca local E-INS-i, uma vez que estes alinhamentos compreenderiam sequências de diferentes tamanhos e comprimentos, incluindo sequências gênicas completas. Por sua vez, o alinhamento do ITS2 foi construído utilizando o algoritmo iterativo de busca global G-INS-i, uma vez que somente sequências completas foram incluídas nas análises.

Sequências provenientes de esponjas heteroscleromorfas foram obtidas do banco de dados público de DNA, GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para estender a comparação das amostras sequenciadas no presente estudo aos dados da literatura (Tabela 17). Contudo, devido a limitações computacionais, e para balancear os padrões filogenéticos entre as sequências, e a minimizar os vieses dos modelos evolutivos, as sequências obtidas foram selecionadas de forma a compreender as maiores sequências de nucleotídeos, e com a maior cobertura dos marcadores sequenciados neste trabalho, abrangendo os taxons mais divergentes, evitando quando possível pseudoreplicações dentro de cada linhagem.

Tabela 17 – Quantitativo de sequências comparativas incluídas nas análises filogenéticas de cada ordem de Heteroscleromorpha por marcador molecular.

Ordem	28S	COX1	16S	ITS2
Spongillida	-	2 ^a	1	-
Scopalinida	2	- [2]	0	-
Axinellida	11	19 [20]	2	-
Biemnida	3	4	0	-
Tetractinellida	7 [6]	0	1	-
Bubarida	1 [5]	7	0	-
Agelasida	10	9 [11]	2	-
Poecilosclerida	32	25 [26]	3	-
Desmacellida	1	2	0	-
Clionaida	6	5	0	-
Tethyida	9	2	1	-
Trachycladida	3	-	0	-
Polymastiida	1	6	1	-
Suberitida	21 [84]	39 [139]	3	25 [108]
<i>incertaesedis</i>	4 [3]	8 [11]	1	-
Total	111 [176]	128 [237]	15	25 [108]

Legenda: Números entre colchetes referentes ao quantitativo incluídos nas análises apresentadas no Apêndice B.

^aUma destas pertencente a *Vetulina*, não oficialmente uma esponja Spongillida.

Fonte: O autor, 2019.

Uma vez que vários grupos antes alocados em Suberitidae e Halichondridae tem se mostrado próximos a outros não relacionados a estas famílias para o alinhamento do marcador filogenético 28S, uma ampla comparação de sequências dentro da subclasse Heteroscleromorpha foi realizada para abranger o maior número possível de ordens. O mesmo critério foi utilizado para o marcador COX1, mesmo sendo esse um marcador com menor potencial de resolução filogenética em níveis taxonômicos superiores. Isto porque muitos grupos de Suberitida, tais como *Vosmeria* e *Stylocordyla*, não apresentavam até o momento sequências disponíveis com o marcador 28S, e devido à arguições recentes de que *Ciocalyptra* pode não está proximalmente relacionado à Suberitida (GUTEKUNST *et al.*, 2018). Nenhuma sequência de Tetractinellida foi incluída no alinhamento final do COX1, uma vez que estas mostraram, em análises preliminares (dados não mostrados), uma taxa evolutiva muito mais elevada do que as demais. Apesar de ter um menor número de sequências comparativas, o marcador 16S também foi comparado com outras ordens da subclasse Heteroscleromorpha. Por fim, para ITS2, foram adicionadas apenas sequências de Suberitida, uma vez que tal marcador apresenta evolução muito rápida, não possuindo sinal filogenético forte entre comparações acima do nível familiar. Para um resumo da quantidade de sequências comparativas incluídas nas análises ver Tabela 17. A lista completa das sequências comparativas (459) utilizadas neste trabalho com seus números de acesso no GenBank está registrada no Apêndice B.

5.3.4 Anotação e estrutura secundária do ITS2

Sequências de ITS2 representativas dos principais clados de Suberitida foram anotadas em formato XFASTA (Apêndice C) utilizando algoritmo de Modelo Escondido de Markov (HMM, *Hidden Markov Model*) como implementado no site ITS2 database (KELLER *et al.*, 2009; <http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>). A anotação das regiões 5.8S distal e 28S proximal foi possível utilizando diferentes modelos de busca com base nos diversos bancos de dados taxonômicos disponíveis e são evidenciadas pelas cores azul (5.8S) e vermelho (28S). As estruturas secundárias do ITS2 foram preditas por meio do método de busca do RNAfold. As buscas foram feitas utilizando as configurações padrão de busca, tendo sido escolhidos os centróides das estruturas com valores mínimos de energia livre (MFE, *Minimum Free Energy*), para serem desenhadas com o programa forna. Ambos os programas foram implementados no servidor da internet ViennaRNA (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>).

5.3.5 Reconstruções filogenéticas

As relações filogenéticas entre as linhagens evolutivas foram recuperadas utilizando o método de Máxima Verossimilhança (ML, *Maximum Likelihood*) implementado no programa RaxML v8.2.4 (STAMATAKIS 2014). As buscas das árvores com melhor pontuação de ML foram conduzidas, para todos os marcadores, utilizando o modelo de Tempo Geral Reversível (GTR, *General Time Reversible*) de substituição de nucleotídeos, sob o modelo GAMMA de heterogeneidade de taxa. O suporte dos ramos foi estimado por 500 réplicas de *bootstrap* rápido.

Devido ao baixo sinal filogenético do marcador ITS2, uma árvore suporte binária foi utilizada, baseada nas relações obtidas com o marcador 28S, de forma que os táxons livres (não contidos na árvore suporte binária) sejam adicionados às melhores posições com base em sua probabilidade. Para facilidade computacional e de apresentação, somente sequência únicas foram utilizadas nas reconstruções apresentadas ao longo do texto. Para topologias com a completude das sequências alinhadas, ver Apêndice D. Para as reconstruções utilizando o marcador COX1, por se tratar de uma região codificante de proteínas, os modelos

evolutivos foram particionados de forma a tratar as primeiras e segundas posições do códon diferentemente das terceiras posições. De forma a balancear a representatividade de sequências do complexo *H. perlevis* no alinhamento do marcador COX1, somente uma sequência de cada haplótipo e/ou população por artigo foi incluída nas análises, reduzindo as sequências disponíveis no GenBank de 60 para nove, incluindo a sequência proveniente do mitogenoma de *H. sinapium* (NC_022450). Todas as sequências obtidas no Genbank e utilizadas neste trabalho estão compiladas no Apêndice B.

5.4 Resultados

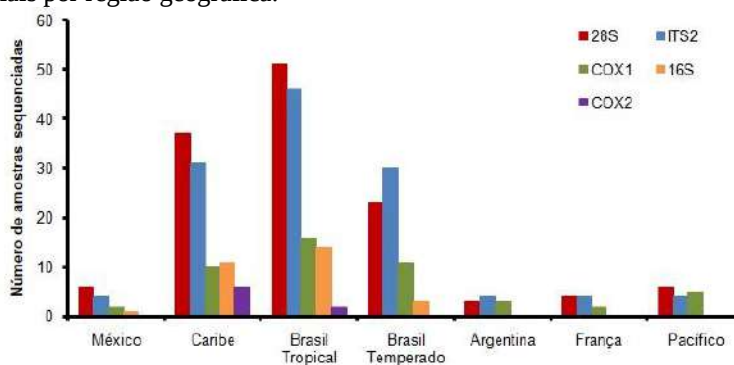
Um total de 706 amplificações foram realizadas com cinco marcadores moleculares diferentes, porém apenas 339 (48%) tiveram resultado bom o suficiente para serem sequenciadas (Figura 49). Destas, 130 foram realizadas com as subunidades rRNA 28S, 123 com ITS2, 29 com 16S, 49 com a subunidade da subunidade I dicitocromocoxidase (COX1) e oitocom a subunidade II da citocromo coxidase (COX2). A razão entre amostras amplificadas e sequenciadas de boa qualidade que foram utilizadas nas reconstruções filogenéticas variou entre os marcadores, sendo o 28S = 73%, ITS2 = 47%, 16S = 90%, COX1 = 55% e COX2 = 0%.

Após a edição, o alinhamento das sequências e a remoção completa de posições com intervalos, cada região amplificada teve um número de sítios variáveis e conservados distinto. O alinhamento do 28S produziu uma média de 820 pares de base (pb), o ITS2 275 pb, o COX1 640 pb e o 16S 665 pb, sem intervalos ou deleções.

De acordo com os resultados obtidos por meio das reconstruções filogenéticas, uma mudança profunda na Ordem Suberitida parece ser necessária. Recordando brevemente, a ordem é dividida em três famílias e 28 gêneros, incluindo os duvidosos (*incertae sedis*). A partir deste estudo, haverá a proposição da criação dos gêneros *Ditylos*, *Solistyla* e *Tenebria* e ressurreição do gênero *Rhaphidostyla* Burton, 1935. O gênero *Ditylos* é representado por espécies com crescimento maciço ou incrustante espesso, tilóstilos fusiformes e separados em duas categorias de tamanho. O esqueleto coanossomal tende a reticulado, enquanto o ectossomal não apresenta especificações, a não ser pela presença de buquês de tilóstilos de menor tamanho. Geralmente, as espécies possuem cromovariação. As espécies estão distribuídas, majoritariamente, em águas rasas e mesofóticas, desde a zona equatorial até

subtropical ou temperado quente. Geneticamente, tanto o marcador nuclear 28S quanto os marcadores mitocondriais 16S e COX1 alocam o gênero em um clado separado do clado de *Suberites*, com alto suporte estatístico. O gênero *Solistyla* é representado pela espécie *Solistyla caerulea*, cujos estilos são frequentemente maiores do que 500 µm. A superfície é irregular e não há formação de fístulas. Geneticamente, tanto o marcador nuclear 28S quanto os marcador mitocondrial COX1 alocam o gênero em um clado separado do clado de *Suberites*, com alto suporte estatístico. O gênero *Tenebria* é composto por espécies de águas (sub)tropicais e temperadas. O crescimento varia de incrustante a maciço com a possível formação de lobos, onde os ósculos se localizam. A superfície é destacável, rugosa e hispida devido à protrusão de espículas napinacoderme. O esqueleto é formado exclusivamente por óxeas em uma ou duas categorias de tamanho. No gênero *Rhaphidostyla* a média do tamanho dos estilos é curta e fina. Em *Rhaphidostyla* sp. nov. há a adição de óxeas aos estilos. Geneticamente, tanto os marcadores nucleares 28S e ITS2 quanto o marcador mitocondrial 16S alocam o gênero em um clado separado do clado de *Hymeniacidon*, com alto suporte estatístico. O mesmo pode ser observado no dendograma e no mapa de calor dos metabólitos (Capítulo 2).

Figura 49 – Representação gráfica do número de novas amostras sequenciadas com marcadores nucleares e mitocondriais por região geográfica.



Fonte: O autor, 2019.

5.4.1 Interpretação das reconstruções filogenéticas

De uma forma geral, as árvores filogenéticas geradas com os diferentes marcadores mostraram um padrão quanto ao relacionamento das famílias, gêneros e espécies. Os gêneros *Axinyssa*, *Ciocalypta* e *Topsentia* se distribuem de forma polifilética, com alguns representantes agrupando com Suberitida e outros formando um clado distantemente

relacionado. Este clado é designada como “Topsentiida” neste trabalho. O gênero *Protosuberites* é polifilético dentro de Suberitida, enquanto os gêneros *Amorphinopsis*, *Halichondria* e *Hymeniacidon* formam um grande complexo de espécies.

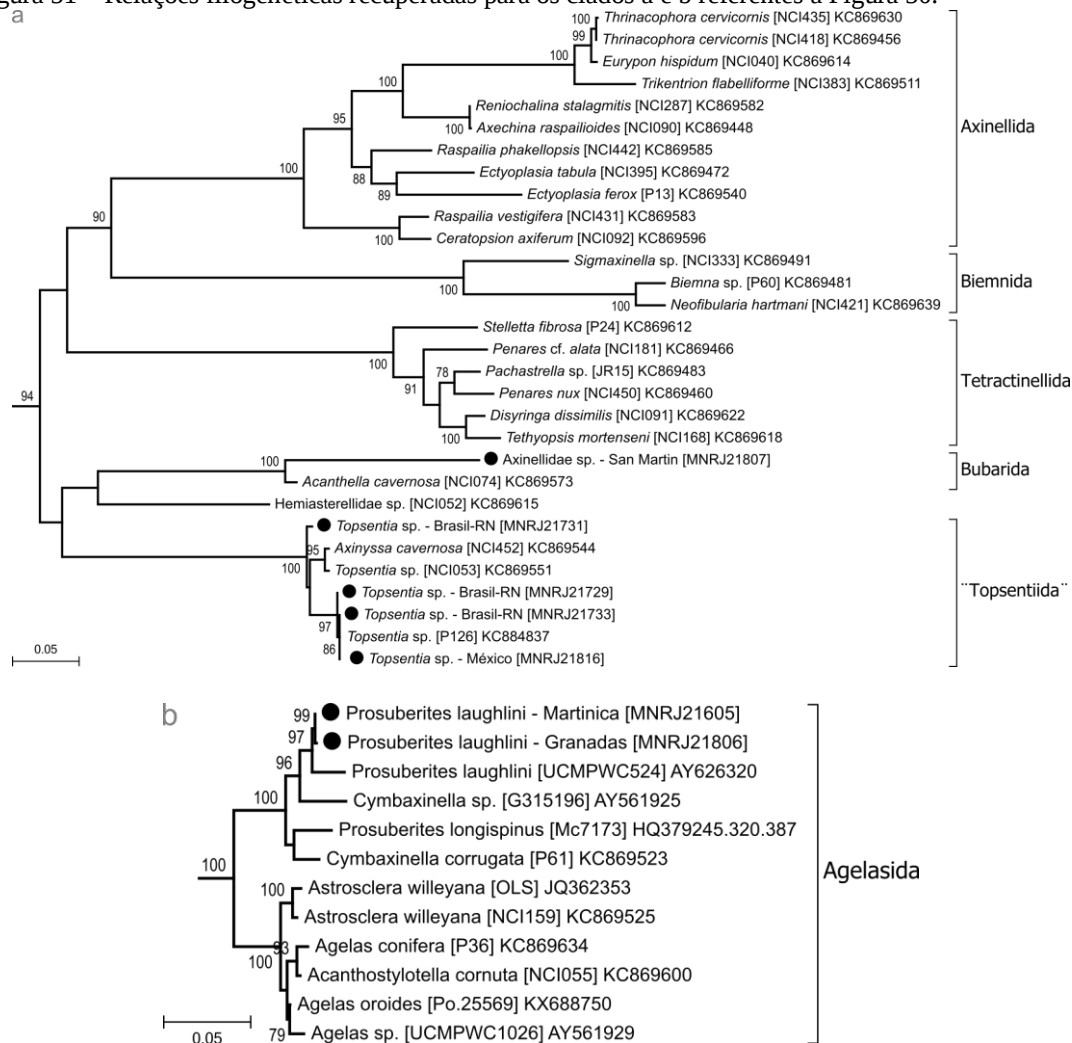
O marcador nuclear 28S (fragmento D1-D2) foi capaz de recuperar relações monofiléticas desde o nível de ordem (Figura 50) até o nível específico com alto valor de suporte (Figuras 51, 52 e 53), em média. Através deste marcador a ordem Polymastiida deve ser considerada como irmã de Suberitida. O gênero *Topsentia*, previamente considerado *incertae sedis*, foi alocado fora da ordem Suberitida e com uma baixa relação com a ordem em questão. As amostras do Brasil, do Caribe e do México formaram um clado com suporte de 100% (Figura 50-51). Possivelmente, a amostra de *Axinyssa cavernosa* (Topsent, 1897) usada como material comparativo se trata de uma *Topsentia* e deve ser reexaminada morfologicamente. Ambos os gêneros possuem características morfológicas similares que podem facilmente enganar a identificação.

Na Figura 53, ilustra-se a reconstrução filogenética de Suberitida com o marcador 28S, com suporte de 100%. Nesta árvore observamos a presença de quatro clados. O clado A é formado por uma ramificação muito antecipada em relação às demais, contendo amostras de *Homaxinella subdola* (Bowerbank, 1866) e *Pseudosuberites sulphureus* (Bowerbank, 1866). Os representantes deste clado estão inseridos na família Suberitidae. O clado B possui 99% de suporte e contém representantes dos gêneros *Rhizaxinella*, *Aaptos* e *Ditylos* spp. Neste clado, *Rhizaxinella* é o gênero menos derivado, enquanto os outros dois gêneros são grupos-irmãos. No clado constituído por *Aaptos* spp. observa-se a presença da espécie tipo *Aaptos aaptos* se diferenciando de vários espécimes de *Aaptos* sp. 1, *Aaptos* sp. 2 e *Aaptos* sp. 3 do Brasil. Os representantes de *Ditylos*, por sua vez, se separam em três ramos, com altos valores de suporte. Além disso, estes representantes não se relacionam com a espécie tipo do gênero, sugerindo que as espécies deste clado são, a verdade, representantes de outro gênero. Os representantes deste clado estão inseridos na família Suberitidae.

O clado C é constituído exclusivamente pelo gênero *Suberites*, contendo *S. domuncula* (espécie tipo) e mais três espécies do gênero, todas de águas frias e com associação com gastrópodes. Esta associação aproxima os gêneros *Protosuberites* e *Pseudospongosorites* a este clado. Entretanto, estes gêneros não foram analisados nesta filogenia com este marcador. O representante deste clado está inserido na família Suberitidae.

O clado D tem um suporte de 90% e inclui grande parte dos gêneros de Suberitida, sendo todas as Halichondriidae e algumas Suberitidae. O primeiro ramo que se destaca é representado pelo MNRJ 21813 cf. *Terpios* (90% de suporte). Na sequência, observa-se um

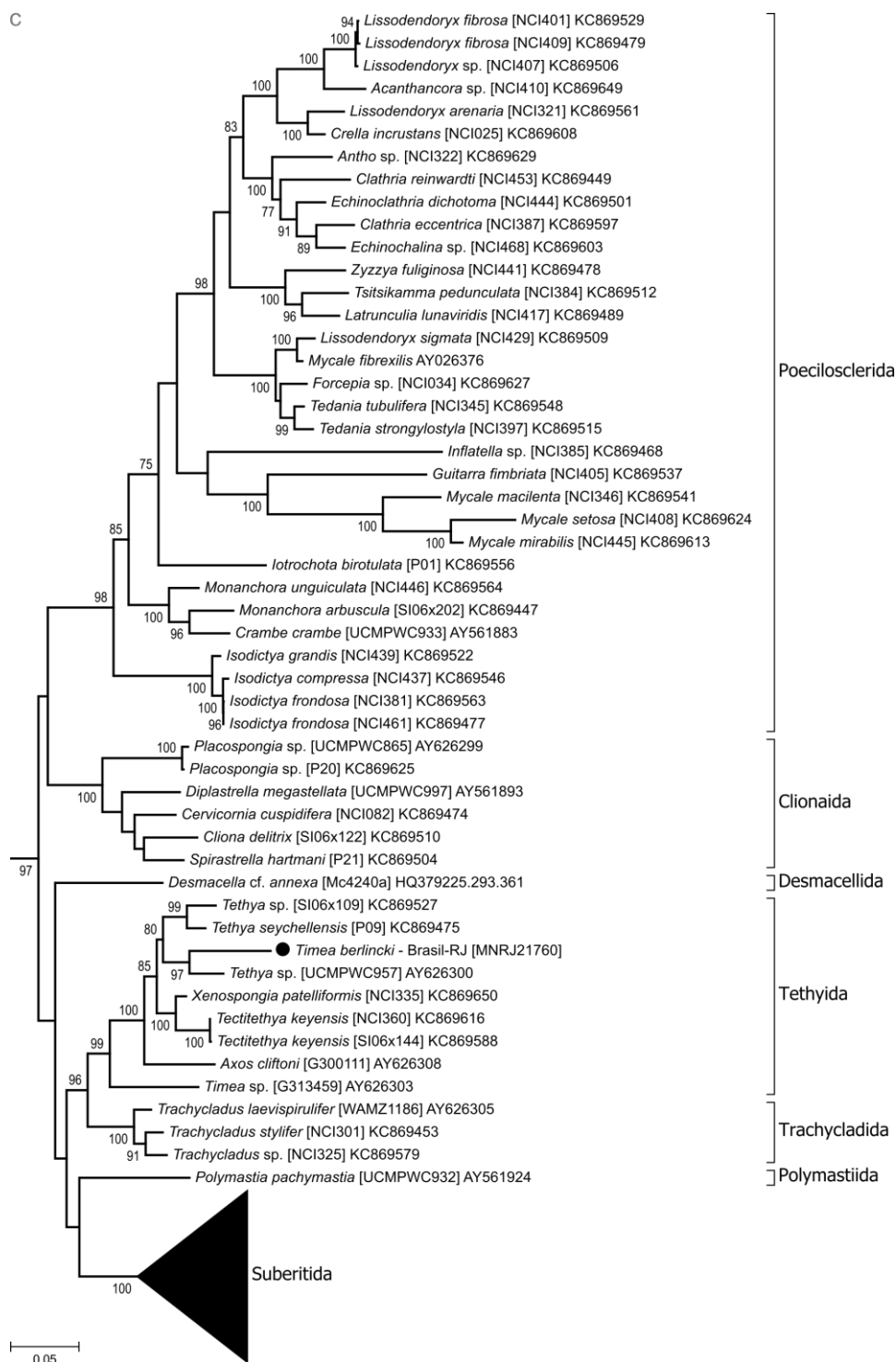
Figura 51 – Relações filogenéticas recuperadas para os clados a e b referentes a Figura 50.



Legenda: Os círculos fechados indicam amostras sequenciadas neste trabalho, enquanto as demais foram retiradas do GenBank. Apenas valores de suporte acima de 70% estão indicados.

Fonte: O autor, 2019

Figura 52 – Relações filogenéticas recuperadas para o clado c referente à Figura 50.



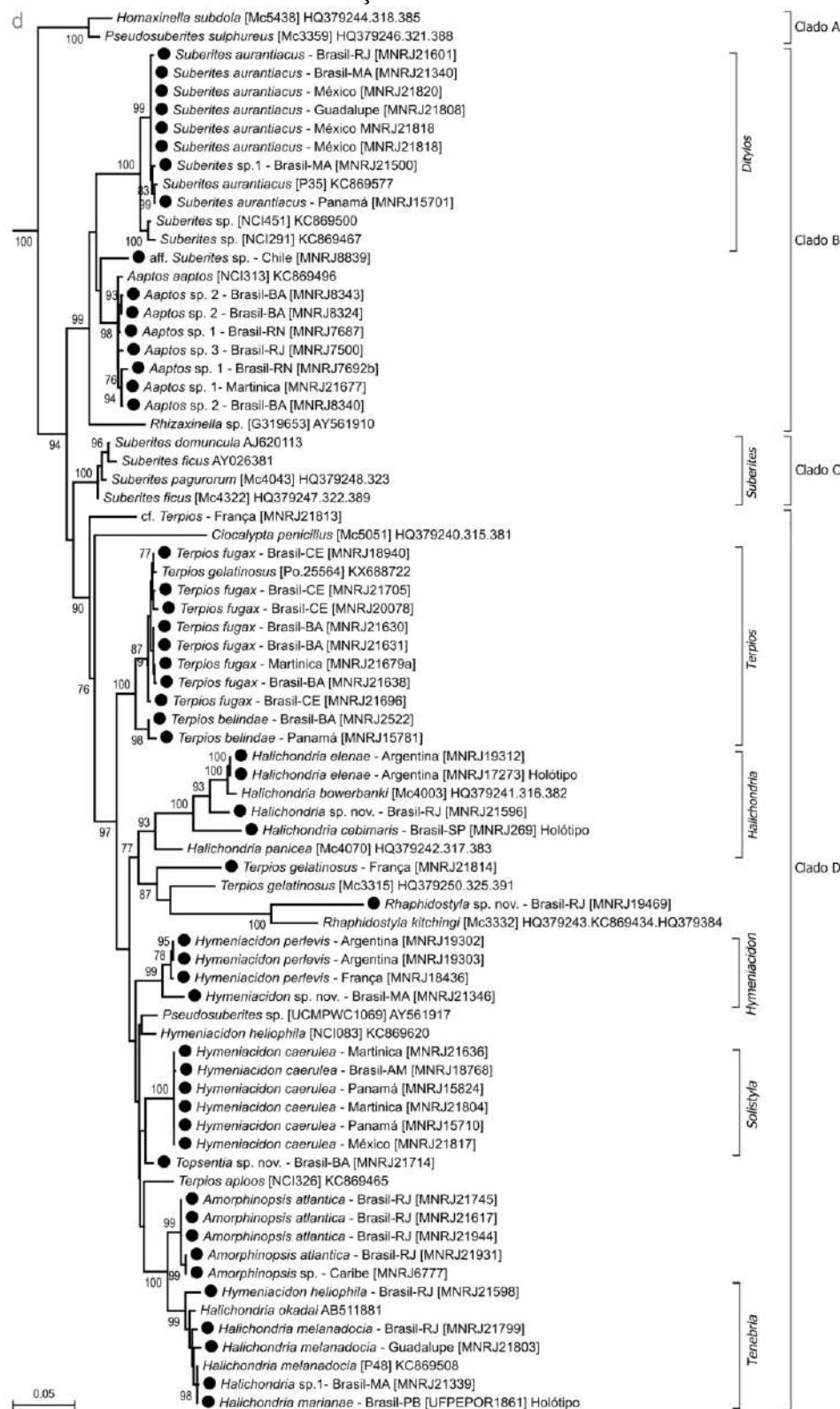
Legenda: Ver Figura 56. O círculo fechado indica amostra sequenciada neste trabalho, enquanto as demais foram retiradas do GenBank. A ordem Suberitida está colapsada e seus representantes são mostrados a seguir.

Fonte: O autor, 2019.

Ainda neste clado, agora com 97% de suporte, observa-se exemplares da espécie tipo de *Terpios* (*T. fugax*), *Halichondria* (*H. panicea*), *Hymeniacidon* (*H. perlevis*) e *Rhaphidostyla* (*R. kitchingi*). Estes gêneros também são representados por outras espécies, cujo parentesco não se aproxima ao da espécie tipo, como é o caso, em *Terpios*, de *T. aaplos* e *T. gelatinosus*. O gênero *Halichondria stricto sensu* tem suporte de 93% e conta com cinco espécies, incluindo a espécie tipo *H. panicea* e uma nova espécie do Rio de Janeiro. Enquanto isso, na extremidade inferior da árvore, outras três espécies de *Halichondria* formam um complexo de espécies com suporte de 99%. Por isso, há necessidade da criação do gênero *Tenebria*, o qual passa a alocar *T. okadai*, *T. melanadocia* e *T. marianae*, por mais que essas espécies possam representar um complexo. Por sua vez, o gênero *Hymeniacidon* é representado em dois clados distintos, um composto pelo complexo que contém a espécie tipo *H. perlevis* e uma nova espécie endêmica do estado do Maranhão e o outro composto por *H. caerulea*. Porém, este último clado possui 100% de suporte estatístico e, portanto, há necessidade de criar o gênero *Solistyla* para alocar *S. caerulea*. Diferentes amostras de *Hymeniacidon heliophila* agrupam em clados distintos. O clado de *Rhaphidostyla* tem suporte de 100%, mas com a presença de ramos longos e tendo como grupo-irmão amostras erroneamente diagnosticadas como *Terpios gelatinosus*. Por fim, os ramos com as amostras de *Amorphinopsis* spp. se localizaram como um grupo irmão de *Tenebria*.

A árvore reconstruída com o ITS2 (Figura 54) utilizando exclusivamente amostras de *Suberitida* ilustra um padrão similar ao obtido com o 28S, mesmo com um número menor de amostras comparativas. Nesta reconstrução, os gêneros *Aaptos*, *Ditylos* e *Rhizaxinella* também formaram um clado, porém uma amostra de *Hymeniacidon heliophila*, possivelmente erroneamente identificada, agrupou neste clado. Com 100% de suporte, três ramos se separaram ao mesmo tempo: i) um espécime de *Suberites ficus* (Johnston, 1842) junto com uma amostra de *Halichondria* sp., ii) um ramo longo representado por *Ciocalyptra* sp. e iii) um clado de MNRJ 21813 cf. *Terpios* do Mediterrâneo e PROERG 66, uma amostra de profundidade do Rio de Janeiro não avaliada morfológicamente. O último clado da árvore apresentou 97% de suporte contendo representantes dos gêneros *Rhaphidostyla*, *Halichondria*, *Terpios*, *Hymeniacidon*, *Amorphinopsis*, *Pseudosuberites*, *Solistyla* e *Tenebria*, todos da família Halichondriidae, aquela com maior representatividade na filogenia do ITS2.

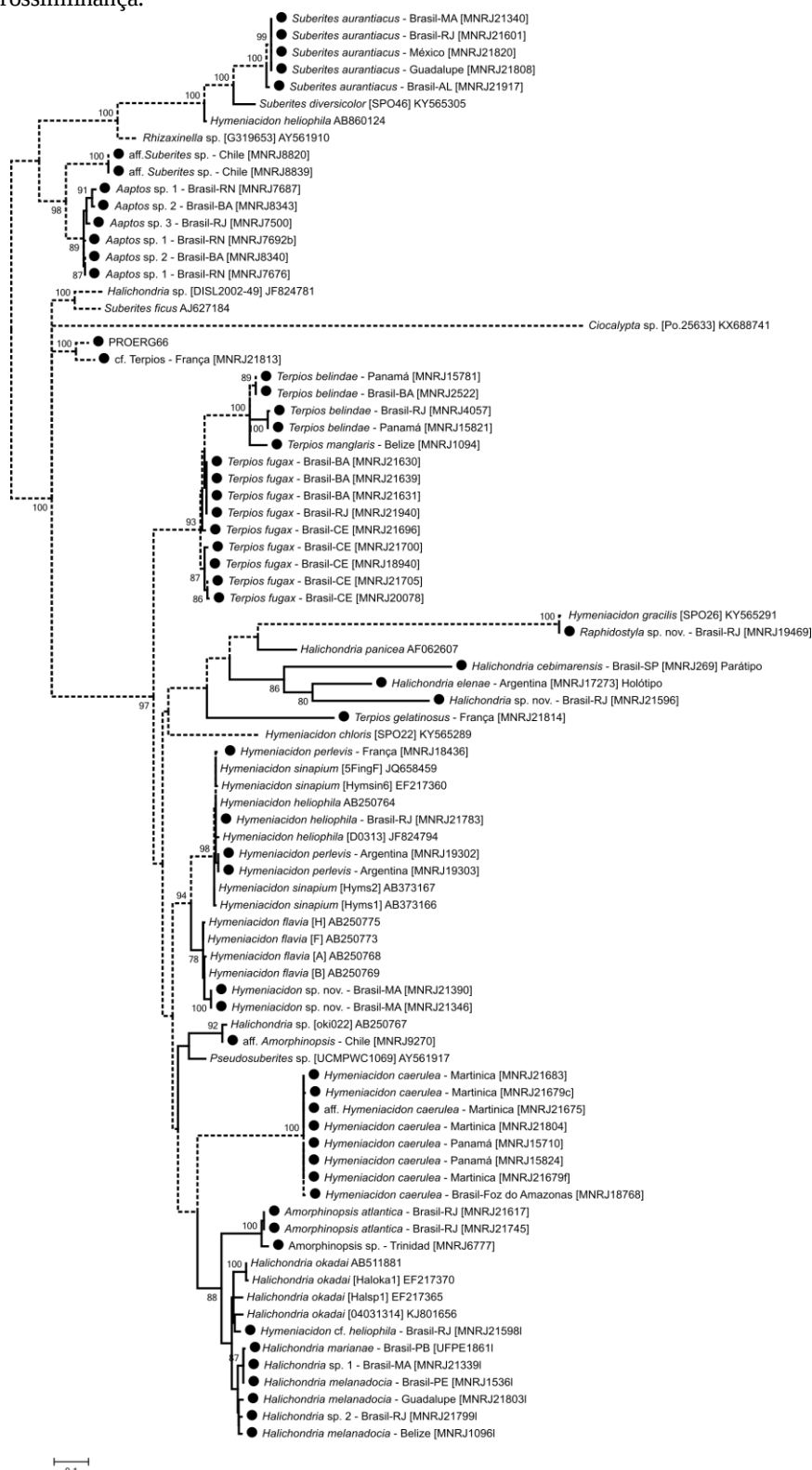
Figura 53 – Relações filogenéticas recuperadas para as esponjas suberitidas (d) utilizando o marcador 28S com o método de Verossimilhança Máxima.



Legenda: Os círculos fechados indicam amostras sequenciadas neste trabalho, enquanto as demais foram retiradas do GenBank. Apenas valores de suporte acima de 70% estão indicados. As espécies são seaparasadas em novas famílias e subfamílias.

Fonte: O autor, 2019.

Figura 54 – Reconstrução filogenética da ordem Suberitida utilizando o marcador ITS2 pelo método de Máxima Verossimilhança.

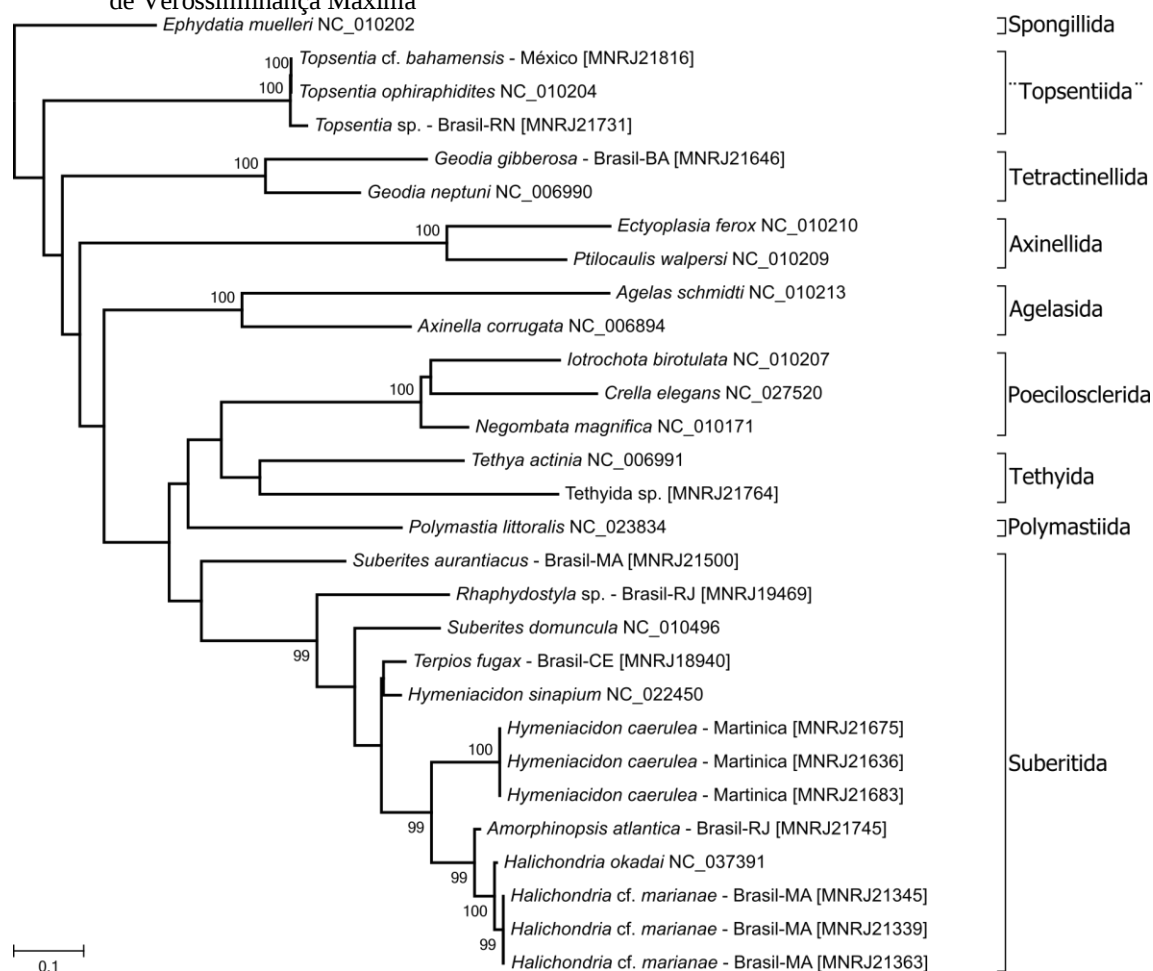


Legenda: Os valores de suporte acima de 80% são indicados sobre ou sob os nós. Os círculos fechados são referentes a amostras sequenciadas neste trabalho. A linha pontilhada indica os indivíduos cuja estrutura secundária foi avaliada (ver detalhe das estruturas na Figura 62).

Fonte: O autor, 2019.

Mesmo com um baixo número de amostras comparativas com o marcador mitocondrial 16S, os representantes da ordem Suberitida formaram um grupo monofilético com 99% de suporte filogenético (Figura 55). Claramente, as amostras de *Topsentia* formaram um grupo distinto e mais basal do que as demais amostras comparativas, corroborando com a reconstrução pelo gene nuclear 28S. Também foi observada uma similaridade na formação da família Halichondriidae, contendo os gêneros *Amorphinopsis* e os novos gêneros *Solistyla* e *Tenebria*. Neste caso, o novo gênero *Ditylos* foi o representante menos derivado de Suberitida, enquanto *Rhaphidostyla* não agrupou com as demais Halichondriidae, diferindo das reconstruções com os marcadores nucleares. Com relação ao nível de ordem, o padrão obtido com o 16S é similar ao de 28S.

Figura 55 – Relação filogenética da subclasse Heteroscleromorpha Cárdenas, Pérez, Boury-Esnault, 2012 desde o nível de ordem até o nível específico, utilizando o marcador mitocondrial 16S por meio do método de Verossimilhança Máxima

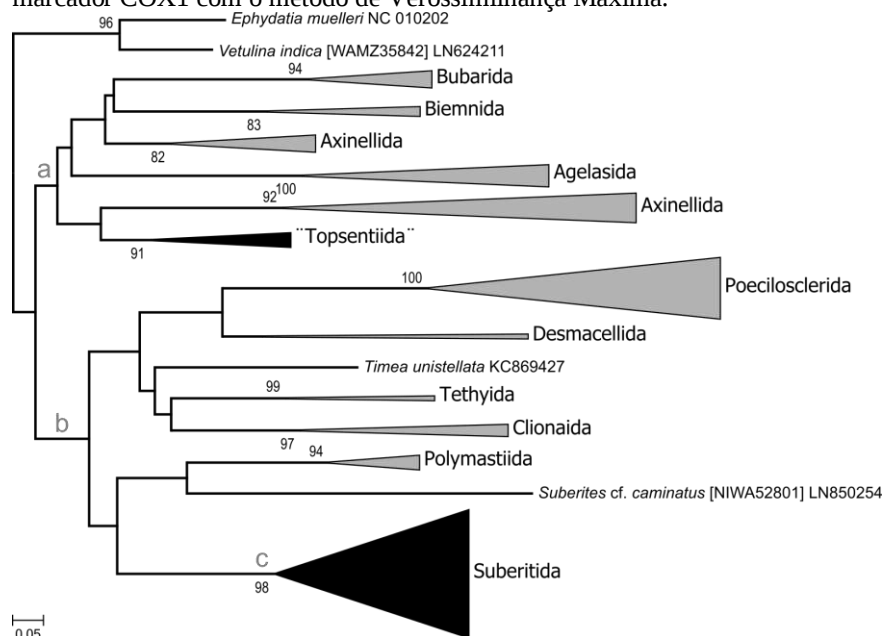


Legenda: Os números sobre os ramos da árvore indicam o valor de suporte após 500 réplicas de *bootstrap*. Os nomes à direita indicam as ordens específicas de cada clado. As amostras de *Topsentia* formaram uma ordem distinta e mais basal do que as representantes suberitidas.

Fonte: O autor, 2019.

No geral, as relações obtidas a partir do gene mitocondrial COX1 (Figura 56-59) corroboram as relações anteriores, tanto no nível de ordem (Figuras 56, 57 e 58) quanto no nível de família e gênero (Figura 59). Em Suberitida, a formação de três clados com suporte acima de 90% dão robustez estatística às reconstruções filogenéticas. O clado A contou com amostras dos gêneros *Ditylos*, *Rhizaxinella* e *Stylocordyla*. De acordo com esta filogenia e com caracteres morfológicos, o clado A deve integrar todos os membros dos gêneros *Stylocordyla*, *Aaptos*, *Rhizaxinella* e *Ditylos*, tais como forma de crescimento oval ou globoso, esqueleto radial ou tendendo para axial com uma paliçada no ectossoma, apesar do conjunto espicular ser diferente. O clado B foi representado pelo gênero *Suberites* e o clado C por diversos gêneros, incluindo os novos *Solistyla* e *Tenebria* que, mais uma vez, se separaram de *Hymeniacidon* e *Halichondria*, respectivamente. Por sua vez, um representante de *Homaxinella* e *Pseudosuberites nudus* Koltun, 1964 agruparam no clado C e não formaram um clado específico, como visto na reconstrução do marcador 28S. Assim como *Stylocordyla*, dois outros gêneros foram representados pela primeira vez neste trabalho: *Protosuberites* e *Plicatellopsis*, os quais se mostraram próximos a *Terpios* e *Homaxinella*, respectivamente. Nenhum representante de *Raphidostyla* foi analisado com o COX1.

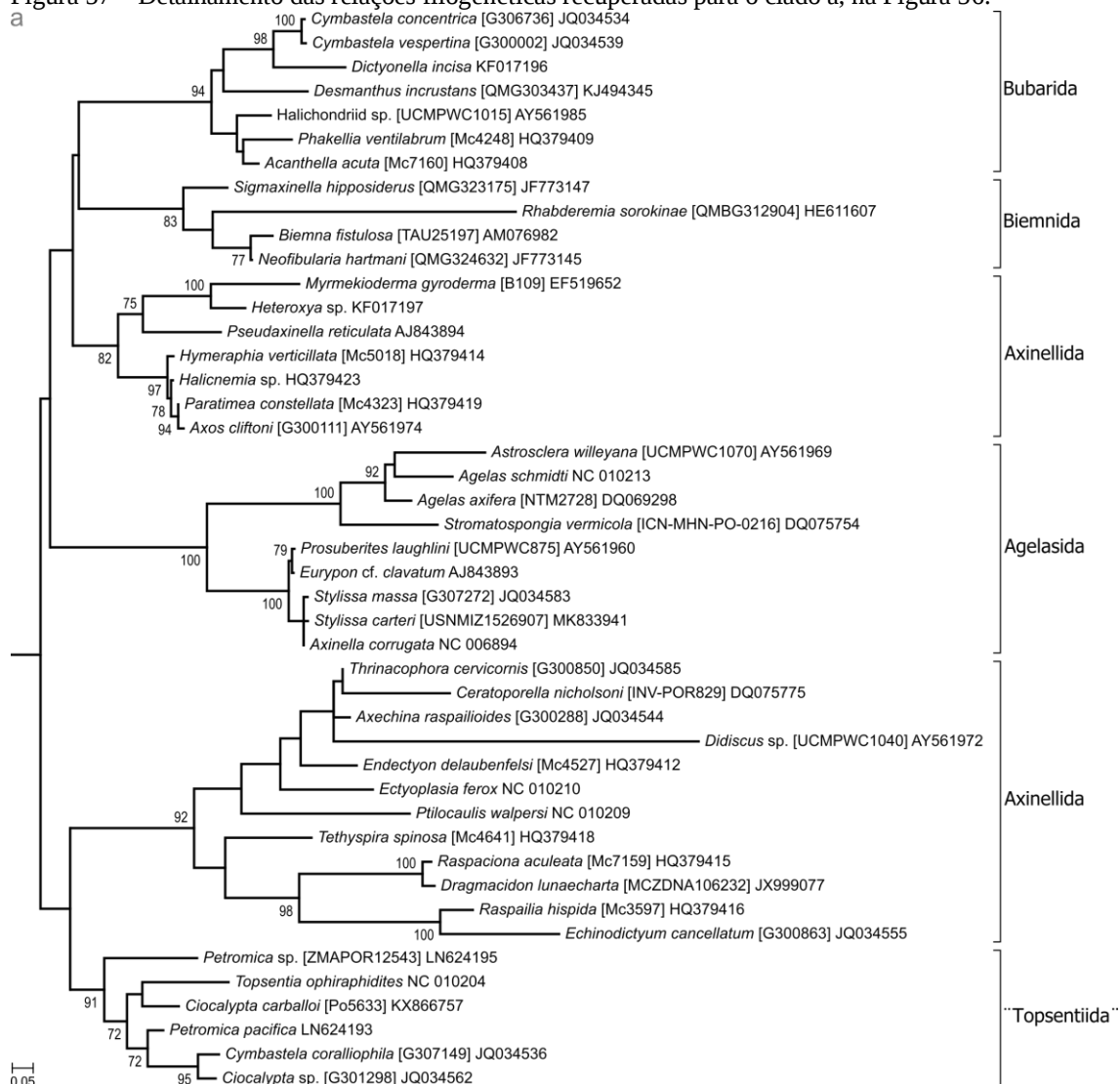
Figura 56 – Relações filogenéticas recuperadas para as esponjas heteroscleromorfas utilizando o marcador COX1 com o método de Verossimilhança Máxima.



Legenda: Árvore desenhada em escala. Os valores indicados correspondem ao suporte nos ramos após 500 réplicas de *bootstrap*. Os ramos terminais foram colapsados de acordo com a alocação ordinal das espécies para facilidade de comparação, e detalhadas abaixo (a-c).

Fonte: O autor, 2019.

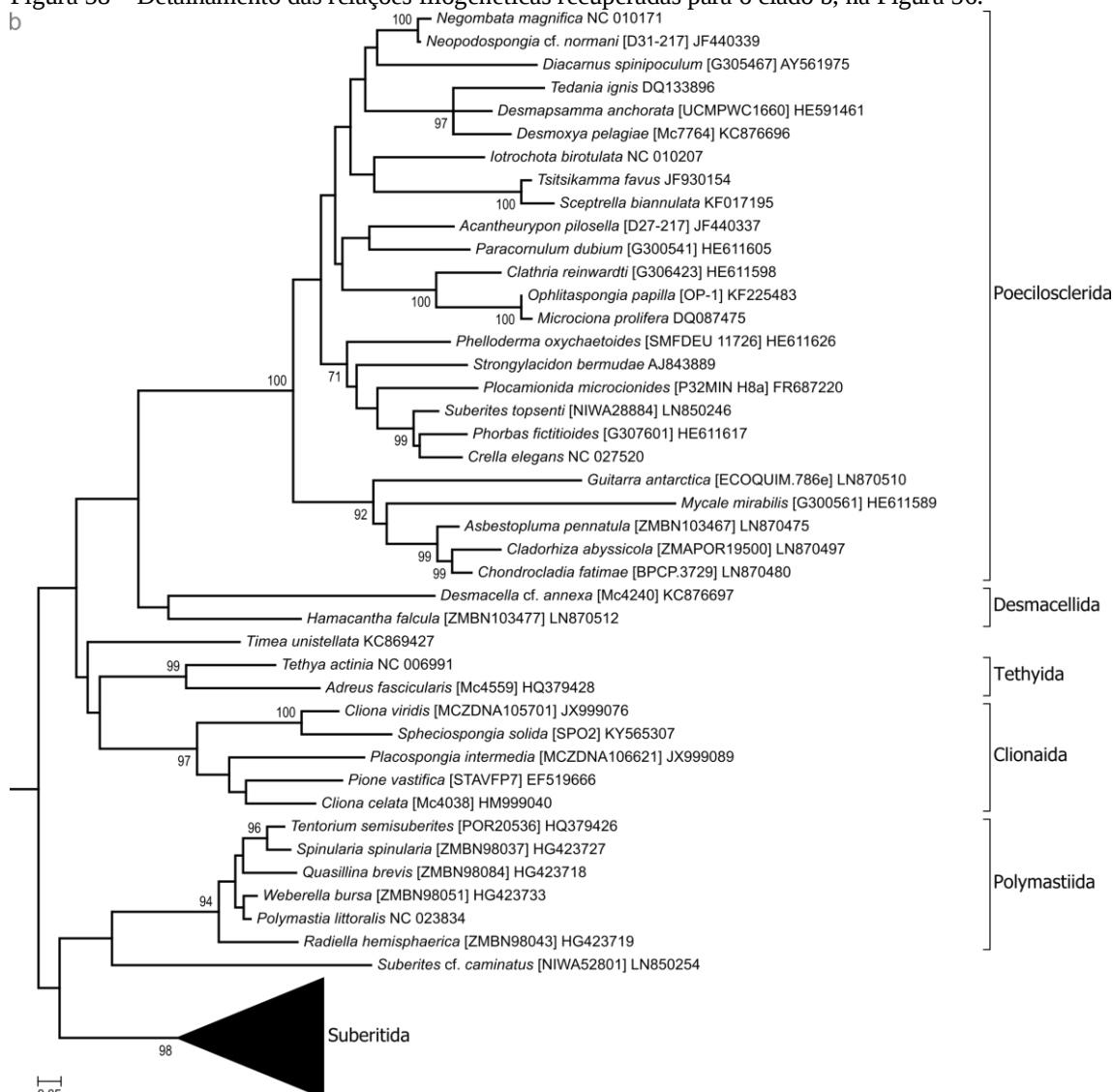
Figura 57 – Detalhamento das relações filogenéticas recuperadas para o clado a, na Figura 56.



Legenda: Árvore desenhada em escala. Os valores indicados correspondem ao suporte nos ramos após 500 réplicas de *bootstrap*. Os códigos indicam os números das amostras depositadas nos bancos de dados.

Fonte: O autor, 2019.

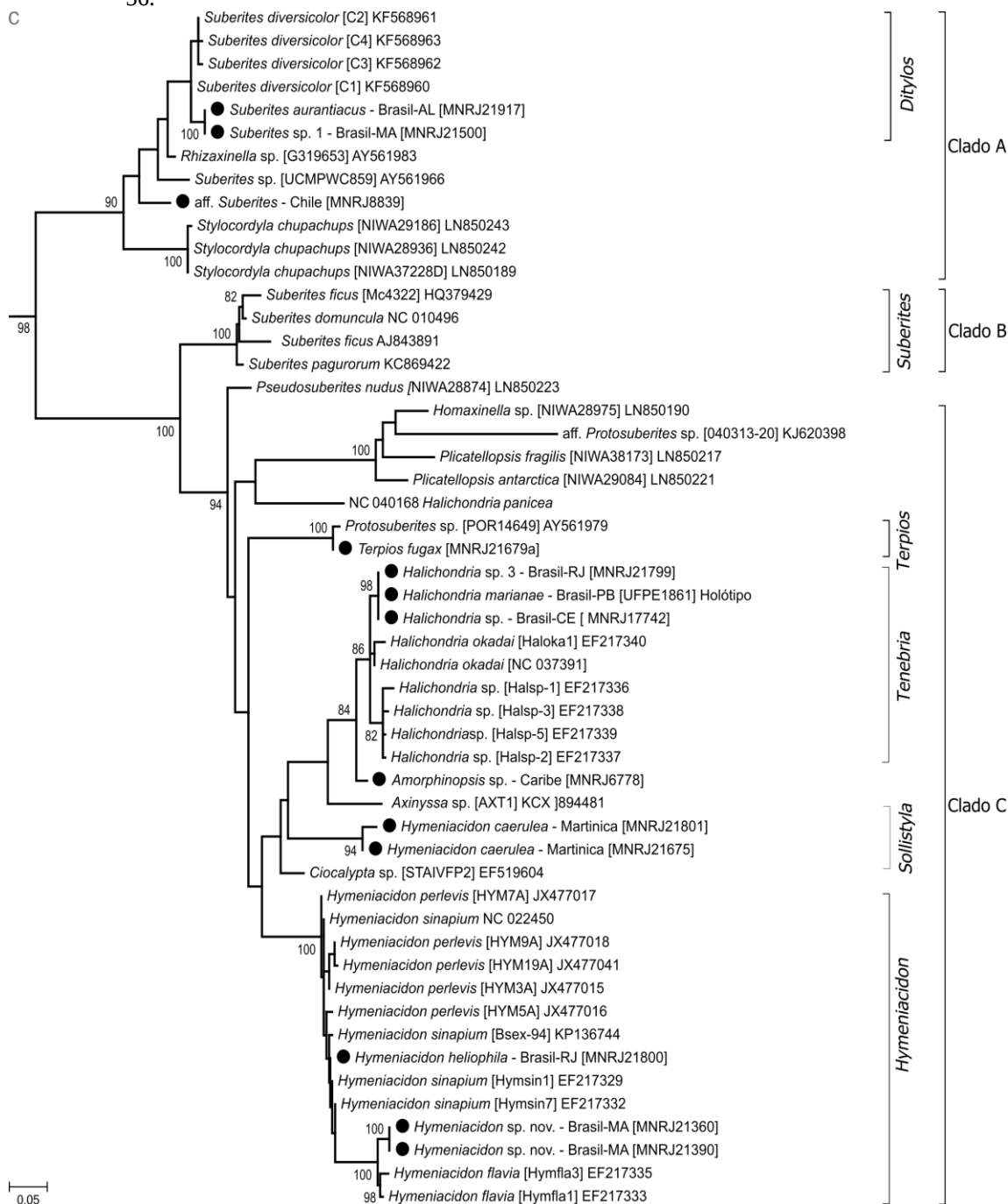
Figura 58 – Detalhamento das relações filogenéticas recuperadas para o clado b, na Figura 56.



Legenda: Árvore desenhada em escala. Os valores indicados correspondem ao suporte nos ramos após 500 réplicas de *bootstrap*. O ramo terminal colapsado está de acordo com a alocação ordinal das espécies para facilidade de comparação (ver detalhe na Figura 59).

Fonte: O autor, 2019.

Figura 59 – Detalhamento das relações filogenéticas recuperadas para o clado c, (Ordem Suberitida), na Figura 56.



Legenda: Árvore desenhada em escala. Os valores indicados correspondem ao suporte nos ramos após 500 réplicas de *bootstrap*. Os códigos indicam os números das amostras depositadas nos bancos de dados.

Fonte: O autor, 2019.

5.4.2 Interpretação da estrutura secundária do ITS2

A estrutura secundária do ITS2 serve como um fenótipo e por isso pode ser utilizado como uma estratégia complementar para a identificação de espécies. A Figura 60 ilustra como 15 espécies diferentes de Suberitida carregam 15 estruturas únicas do ITS2. As estruturas têm um *loop* central do qual saem de três a seis hastes, com pequenos *loops* internos e com uma proeminência circular em cada terminação. A energia (MFE) gasta para criar estas estruturas é demonstrada como um delta G em kcal/mol. O gene é transcrito no sentido 3'5' da esquerda para a direita (onde se inicia a transcrição no final do gene 5.8S e termina no início do 28S), contornando o *loop* central. A primeira haste é de onde se inicia a transcrição e a última haste é a mais próxima, à direita.

No novo gênero *Ditylos*, com o representante *D. aurantiacus*, o espaçador interno está estruturado com *loop* central e quatro hastes. Na haste I há duas instabilidades que entortam a hélice, na II forma-se um *loop* interno pequeno e termina na maior proeminência do gene, na haste III há dois *loops* pequenos, uma instabilidade e uma proeminência pequena e na haste IV há intercalam-se uma instabilidade e um *loop* interno pequeno, três vezes, mais uma instabilidade e por fim uma proeminência. As hastes I e III têm tamanho médio, a haste II é pequena e a haste IV é a maior nesta estrutura. A energia necessária para romper a estrutura secundária é $\Delta G = -64,20$ kcal/mol.

No gênero *Rhizaxinella*, o ITS2 está estruturado com *loop* central e cinco hastes. Na haste I há duas instabilidades que entortam a hélice, na II formam-se dois *loop* interno pequenos, mas antes do segundo há uma instabilidade, e termina em uma proeminência, na haste III há uma instabilidade e uma proeminência pequena, na haste IV há uma sequência de três *loops* pequenos, um médio e mais um pequeno e uma instabilidade que termina em uma proeminência e a haste V é curta e possui apenas uma proeminência terminal. As hastes I e III têm tamanho médio, a haste II é um pouco maior, a haste IV é a maior nesta estrutura e a V é muito curta. A energia necessária para romper a estrutura secundária é $\Delta G = -64,60$ kcal/mol.

No gênero *Aaptos*, o gene está estruturado com *loop* central e cinco hastes. Na haste I há duas instabilidades que entortam a hélice, na II formam-se dois *loop* interno pequenos e termina na maior proeminência do gene, a haste III apresenta uma instabilidade e uma proeminência pequena, na haste IV há um grande *loop* interno uma instabilidade, um pequeno *loop* e outra instabilidade e termina em uma pequeno proeminência circular, na haste V há uma pequena instabilidade e uma proeminência pequena. As hastes I, II e IV tem o dobro do

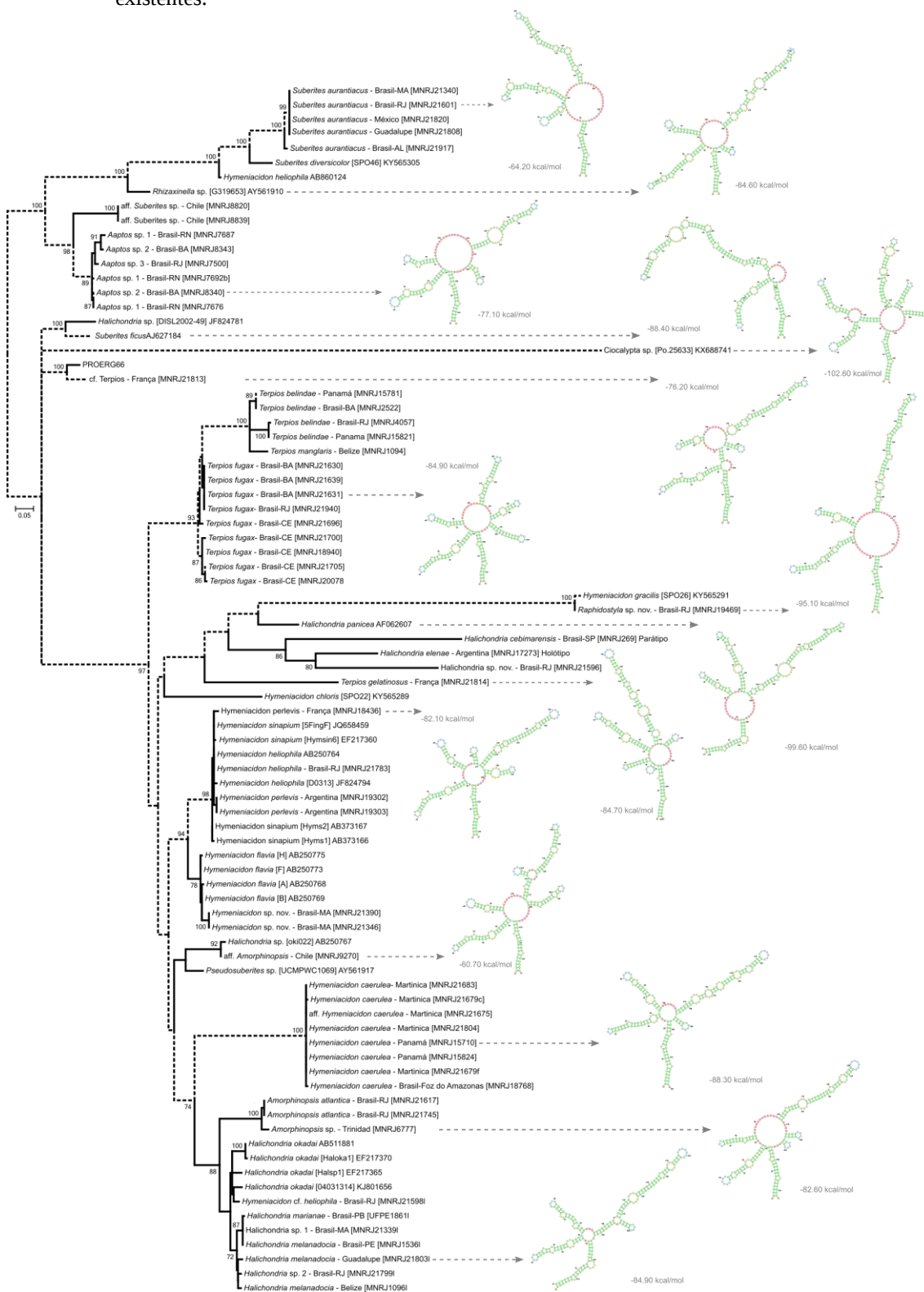
tamanho das haste III e V, sendo esta última a menor haste da estrutura. A energia necessária para romper a estrutura secundária é $\Delta G = -77,10$ kcal/mol.

A amostra de *Suberites ficus* se trata de uma Suberitidae. O espaçador no gênero *Suberites* (*stricto sensu*) está estruturado com *loop* central e três hastes, sendo a III muito maior do que as demais. Na haste I há duas instabilidades que entortam a hélice, na II forma-se um *loop* interno, duas instabilidades e termina em uma proeminência terminal pequena, na haste III tem um início de *loop* próximo ao *loop* central, duas instabilidades seguidas, um *loop* pequeno, dois inícios de *loop*, um *loop* grande, uma instabilidade e um *loop* pequeno antes da proeminência terminal. A energia necessária para romper a estrutura secundária é $\Delta G = -88,40$ kcal/mol.

O gênero *Ciocalypta* apresenta uma estrutura muito diferente daquelas descritas acima. Devido ao ramo muito longo, esta estrutura foi a que gastou maior energia para ser construída. Neste caso, o ITS2 está estruturado com um *loop* central e com a formação de um segundo *loop* central na haste II. Na haste I há duas instabilidades que entortam a hélice, na II forma-se o início de um *loop* central, menor do que o anterior, que dá origem a duas hastes, uma contendo um *loop* interno (a) e uma terminação circular e a outra haste (b) com duas instabilidades que parecem tender para a formação de um *loop* interno pequeno. Na haste III há dois *loops* pequenos, uma instabilidade e uma proeminência pequena e na haste IV há intercalam-se uma instabilidade e um *loop* interno pequeno, três vezes, mais uma instabilidade e por fim uma proeminência. As hastes I e III têm tamanho médio, a haste II é pequena e a haste IV é a maior nesta estrutura. A energia necessária para romper a estrutura secundária é $\Delta G = -102,60$ kcal/mol.

No MNRJ 21813 cf. *Terpios*, o ITS2 está estruturado com *loop* central e quatro hastes. Diferindo das demais, a haste I possui um início de *loop* central antes do *loop* central propriamente dito da estrutura. O pequeno *loop* central na haste I divide esta haste em (a) e (b), sendo (a) marcada por duas instabilidades que entortam a hélice, e (b) por um *loop* interno e duas instabilidades que terminam em uma proeminência arredondada. A haste II é curta, tem um *loop* interno e termina em uma proeminência, na haste III há dois *loops* seguidos de uma instabilidade, mais dois *loops* pequenos, outra instabilidade e uma proeminência e na haste IV há apenas uma proeminência terminal. As hastes I forma duas hélices compridas, as hastes II e IV são curtas e a haste III é longa. A energia necessária para romper a estrutura secundária é $\Delta G = -76,20$ kcal/mol.

Figura 60 – Comparação da estrutura secundária do gene ITS2 dentro da ordem Suberitida, reconstruída com o método de Máxima Verossimilhança para sequências geradas neste estudo e sequências já existentes.



Legenda: O valor de suporte dos clados está acima dos nós. Cada estrutura do ITS corresponde a uma espécie e os números romanos de I até VI indicam o número de hastes em cada estrutura. Cada haste é contada da terminação arredondada (azul) até o *loop* central (vermelho). A energia para a formação de cada estrutura é dada como um delta G (ΔG) em kcal/mol.

Fonte: O autor, 2019.

Terpios fugax tem uma estrutura do espaçador interno contendo um *loop* central e seis hastes. Na haste I há duas instabilidades, a haste II tem um *loop* e duas instabilidades, a haste III tem uma instabilidade, a IV tem duas instabilidades e um *loop* interno, a V tem um *loop* e a VI não possui *loop* nem instabilidade, somente a terminação circular, comum a todas as hastes, exceto a I por ser o ponto de início e término da transcrição. As hastes tem um tamanho quase homogêneo, sendo a II um pouco maior e a V um pouco menor do que as demais. A energia necessária para romper a estrutura secundária é $\Delta G = -84,90$ kcal/mol.

A nova espécie de *Rhaphidostyla* possui uma estrutura com *loop* central grande e quatro hastes. Esta estrutura é a que possui o maior *loop* central. Na haste I há duas instabilidades que entortam a hélice, na II há uma instabilidade, dois *loops* pequenos e outra instabilidade terminando em uma proeminência pequena, na haste III há um *loop* e uma proeminência terminal pequena e na haste IV há três *loops*, o início de um quarto *loop* e uma sequência de quatro instabilidades que terminam em uma proeminência. As hastes I e II têm tamanho médio, a haste III é pequena e a haste IV é a maior nesta estrutura. A energia necessária para romper a estrutura secundária é $\Delta G = -95,10$ kcal/mol.

O espaçador em *Halichondria panicea* está estruturado com *loop* central e quatro hastes, sendo a I e III com tamanho médio, a haste II a menor e a haste IV é a maior nesta estrutura. Na haste I há uma instabilidade e um *loop* interno que entorta a direção da hélice. No lado oposto do *loop* central se encontram as hastes II, III e IV. A haste II forma uma instabilidade e um *loop* interno, a haste III forma dois *loops* de diferentes tamanhos e tem uma instabilidade próxima a proeminência terminal e a haste IV tem dois *loops* pequenos, uma instabilidade, um *loop* interno grande, mais uma instabilidade seguida de um *loop* pequeno e finalmente uma instabilidade e uma proeminência terminal pequena. A energia necessária para romper a estrutura secundária é $\Delta G = -99,60$ kcal/mol.

A amostra de *Terpios gelatinosus* da França tem uma estrutura com a formação de um *loop* central e seis hastes. Na haste I há duas instabilidades, a haste II está começando a se diferenciar e é muito curta contando apenas com dois haplótipos na haste e seis formando a proeminência terminal. A haste III não possui instabilidades, a IV tem dois *loops* internos e a terminação circular, a haste V tem cinco *loops* e a VI não possui *loop* nem instabilidade. As hastes I e IV têm tamanho médio, as hastes II, III e VI são curtas e a haste V é a maior nesta estrutura. A energia necessária para romper a estrutura secundária é $\Delta G = -84,70$ kcal/mol.

Hymeniacidon perlevis é estruturado com *loop* central e seis hastes no ITS2. Na haste I há duas instabilidades que entortam a hélice, na II forma-se um *loop* interno e duas instabilidades que terminam em uma proeminência, na haste III há um *loops*, na haste IV há

apenas a terminação proeminente circular, na haste V há três *loops* internos pequenos e na haste VI há um *loop* e a proeminência terminal. As hastes I, II e III têm tamanho médio, as hastes IV e VI são curtas e a V é a maior nesta estrutura. A energia necessária para romper a estrutura secundária é $\Delta G = -82,10$ kcal/mol.

Quatro representantes de gêneros distintos da família Halichondriidae foram selecionados para comparação das estruturas secundárias do ITS2, cf. *Amorphinopsis* sp. (possivelmente uma espécie de *Johannesia*), *Solistyla caerulea*, *Amorphinopsis atlantica* e *Tenebria melanadocia*. O primeiro representante tem o gene está estruturado com um *loop* central e cinco hastes. Na haste I há duas instabilidades que entortam a hélice, na II forma-se um *loop* interno pequeno, duas instabilidades e termina na maior proeminência do gene, na haste III há um *loop* pequeno uma proeminência terminal, na haste IV há um início de *loop* central dando origem a uma nova haste (b), enquanto a haste IV (a) possui um *loop* interno pequeno e uma instabilidade e a haste V possui um *loop* interno pequeno, uma instabilidade e uma proeminência terminal pequena. As hastes I, II e IV têm tamanho médio parecido e as hastes III e V são pequenas. A formação inicial de um novo *loop* central na haste IV é um diferencial neste grupo, distinguindo-o do gênero *Amorphinopsis*. A energia necessária para romper a estrutura secundária é $\Delta G = -60,70$ kcal/mol.

Em *Solistyla caerulea*, o gene está estruturado com *loop* central e cinco hastes. Na haste I há três instabilidades que entortam a hélice, na II forma-se um *loop* interno pequeno, uma instabilidade e termina na maior proeminência do gene, na haste III há dois *loops* pequenos, na haste IV há cinco *loops* interno, terminando em uma proeminência e a haste V contém apenas a proeminência terminal. A haste IV é a mais diferenciada nesta estrutura. A energia necessária para romper a estrutura secundária é $\Delta G = -88,30$ kcal/mol.

A espécie *Amorphinopsis atlantica* apresenta um espaçador interno estruturado com *loop* central e seis hastes. Na haste I há duas instabilidades que entortam a hélice, na II formam-se dois *loops* internos, na haste III há uma instabilidade, na haste IV há uma instabilidade e três *loops* internos. As hastes V e VI são muito curtas e possuem apenas as proeminências terminais, comuns a todas as hastes. A haste IV é a mais diferenciada na estrutura. A energia necessária para romper a estrutura secundária é $\Delta G = -82,60$ kcal/mol.

Na espécie *Tenebria melanadocia*, o gene está estruturado com *loop* central e quatro hastes, sendo a IV com a formação inicial de um *loop* central. Na haste I há duas instabilidades, sendo a segunda muito maior do que nas demais estruturas, formando quase um *loop* interno. Dois *loops* internos são encontrados na haste II, assim como uma instabilidade e termina em uma proeminência, na haste III há duas instabilidades pequenas

tendendo para *loops*. Na haste IV há um início de *loop* central dando origem a uma nova haste (b), enquanto a haste IV (a) possui três *loops* internos de tamanhos distintos e uma proeminência terminal. A haste IV é a maior desta estrutura. A energia necessária para romper a estrutura secundária é $\Delta G = -84,90$ kcal/mol.

Em um breve resumo sobre as estruturas mencionadas acima, pode-se notar que as estruturas secundárias mais diferentes são as de *Ciocalypa* sp. e cf. *Terpios*, sendo a primeira a que necessita de maior energia para a formação da estrutura secundária. Ambos os representantes estão alocados entre as famílias Suberitidae e Halichondriidae. *Suberites fícus* é a única representada exclusivamente com três hastes, ou seja, houve a perda de uma haste. Na família Suberitidae encontram-se estruturas variando de quatro a cinco hastes com um gasto energético médio de -68 kcal/mol, enquanto Halichondriidae contém estruturas variando de quatro a seis hastes com um gasto energético médio de -80 kcal/mol. *Terpios fugax* possui uma estrutura com gasto energético de -84,90 kcal/mol e seis hastes com pouca variação de tamanho muito diferente daquelas encontradas nos congêneres do mar Mediterrâneo.

5.5 Discussão

A partir das reconstruções filogenéticas com diferentes marcadores moleculares, o objetivo deste capítulo foi tentar encontrar evidências genéticas que auxiliem no agrupamento dos organismos em clados cada vez menos inclusivos. Em paralelo, a estrutura secundária de espécimes de clados distintos foi realizada com o marcador ITS2, a qual pode ser interpretada como um fenótipo e, consequentemente, como um caráter taxonômico (SÁNCHEZ *et al.*, 2007). Em geral, as estruturas secundárias seguem a proposta de Coleman (2007) para eucariotos, na qual a estrutura é composta por um anel central e quatro hélices. Apesar dessa similaridade, algumas espécies ou morfotipos, parecem ter estruturas com mais de quatro hélices, sugerindo variação intraordinal. Com estas duas metodologias, o principal interesse deste estudo é na identificação de características derivadas compartilhadas, sendo uma característica compartilhada aquela presente em duas linhagens e uma característica derivada àquela que evoluiu na linhagem conduzindo a um clado e que coloca os membros desse clado apartados de outros. As reconstruções filogenéticas mostraram diferenças mais profundas do que aquelas obtidas nas outras ferramentas, porém complementares e que, quando corroboradas, permitiram a identificação de grupos novos.

Os clados recuperados com os marcadores moleculares corroboram estudos prévios que recuperaram relações filogenéticas com Suberitida, desde Chombard e Boury-Esnault (1999). Apesar da maior parte dos clados dentro deste grupo apresentar alto suporte estatístico, as relações dentro da família Halichondriidae continuam confusas, com baixos valores de suporte e muitas parafilias no nível de gênero. Análises filogenéticas em nível de ordem revelaram que o clado contendo espécimes de Suberitida pode mostrar relações diferentes dependendo do tipo marcador (nucleares e mitocondriais) ou com o mesmo marcador, quando diferentes espécimes ou regiões do gene são utilizados (BORCHIELLINI *et al.* 2004; NICHOLS 2005; LAVROV *et al.* 2008). Muitas das espécies trabalhadas nas filogenias estão classificadas como sp. ou estão erroneamente identificadas, o que dificulta a conclusão sobre as relações entre os grupos, especialmente na porção distal dos ramos das árvores. Portanto, refazer a descrição morfológica destes indivíduos é essencial para melhorar a compreensão filogenética de Suberitida.

Os marcadores nucleares 28S e o ITS2 reconstruíram praticamente a mesma relação filogenética, convergindo com as relações recuperadas por Thacker e colaboradores (2013). O marcador mitocondrial 16S recuperou relações congruentes com os anteriores e parece ser um bom marcador para as Suberitida. Por sua vez, o COX1 foi o que apresentou maiores divergências quanto às filogenias, tanto com mudanças na ordem dos ramos quanto no menor suporte dos clados, assim como observado em Morrow *et al.* (2013). Além do espaçador ITS2 servir positivamente para as reconstruções filogenéticas, as estruturas secundárias do marcador foram obtidas e podem ser utilizadas como fenótipos. Pelo ITS2 ser um marcador que acumula mais taxa de mutação, as relações dentro de Halichondriidae formaram um maior número de clados do que no 28S, principalmente nos complexos de espécies e entre populações (para detalhes ver Apêndice D). Alguns exemplos do potencial de uso do ITS2 em nível populacional são a formação de duas populações de *Terpios fugax*, uma juntando as amostras do Rio de Janeiro e Bahia e a outra com espécimes exclusivos do Ceará. Outro exemplo é com relação às *Amorphinopsis*, as duas amostras do Rio de Janeiro se distanciaram ligeiramente da amostra do Caribe (Trinidad e Tobago). Já com relação ao complexo de *Tenebria*, a espécie *okadai* se mostrou como um grupo-irmão de *melanadocia* e *marianae*. As amostras destas duas espécies se distanciaram com relação às localidades, sendo as amostras do Nordeste do Brasil mais relacionadas entre si do que com as amostras caribenhas e uma amostra do Rio de Janeiro. Adicionalmente, fica a proposta de se utilizar a estrutura secundária deste gene como uma ferramenta complementar à taxonomia, assim como já é feito com corais (SÁNCHEZ *et al.*, 2007). Os pontos negativos sobre a utilização dos

marcadores moleculares é que a razão entre amostras amplificadas e amostras com boas sequências, no geral, variou de média para baixa. Vale ressaltar também que nenhuma sequência do gene mitocondrial COX2 apresentou resultado satisfatório para as suberitidas.

As filogenias do 28S, 16S e COX1 mostraram que algumas amostras de *Topsentia* são alocadas fora de Suberitida, corroborando as observações de Redmond *et al.* (2013) e Schuster *et al.* (2015) com os marcadores 18S e COX1. *Topsentia* parece ser mais relacionada com alguns representantes dos gêneros *Axinyssa* e *Petromica* do que com as suberitidas, sendo os três gêneros considerados *incertae sedis* por Morrow e Cárdenas (2015). Porém, ao menos, uma amostra depositada no GENBANK parece estar identificada de forma errada, pois nossos resultados convergem com o questionamento de Erpenbeck *et al.* (2012) de que uma amostra de *T. ophiraphidites* agrupa com Halichondriidae, utilizando tanto o COX1 quanto o 28S, enquanto as demais estão distantemente relacionadas.

Quanto a base de Suberitida, com exceção do COX1, os demais marcadores apontam o clado menos derivado contendo representantes de *Homaxinella* e *Pseudosuberites*, corroborando estudos pretéritos (CHOMBARD e BOURY-ESNAULT, 1999; NICHOLS, 2005; MORROW *et al.*, 2012, 2013; THACKER *et al.*, 2013). Independente se este clado é mais derivado ou menos do que Stylocordylidae e Suberitidae, a sua relação de parentesco com os demais representantes de Suberitida é real devido ao alto suporte estatístico. Contudo, análises genéticas das espécies tipo ainda são requisitadas para melhor definir o clado filogeneticamente.

Apesar de nenhuma amostra de *Pseudosuberites* e *Plicatellopsis* ter sido trabalhada no tocante a molecular, os dados filogenéticos aqui obtidos em comparação com sequências disponíveis em bases de dados *on-line* indicam que *Pseudosuberites* é parafilética porque pode agrupar com representantes de Halichondriidae e *Homaxinella*, dependendo do marcador utilizado (MORROW *et al.*, 2012; REDMOND *et al.*, 2013; THACKER *et al.*, 2013) e *Plicatellopsis* pode ser um grupo irmão de *Homaxinella* (VARGAS *et al.*, 2015). *Homaxinella* e *Plicatellopsis* têm a capacidade de crescer de forma ereta, em águas profundas, contendo um esqueleto condensado ou axial e com a formação de buquês no ectossoma. Porém, *Homaxinella* possui um conjunto espicular exclusivo de estilos ou estilotos, enquanto *Plicatellopsis* só apresenta tilóstilos. Ambos os gêneros são exclusivos de águas frias e médias a altas latitudes. Apesar dessas similaridades morfológicas e genéticas, as árvores de consenso deste estudo indicaram maior aproximação de *Plicatellopsis* com amostras do gênero *Rhaphidostyla*, inviabilizando uma definição sobre a classificação deste gênero.

A família Suberitidae (*sensu* MORROW e CÁRDENAS, 2015) foi separada em mais dois clados, um específico para espécies de *Suberites* outro contendo *Rhizaxinella*, *Aptos* e *Ditylos*. Esta separação converge com as histórias contadas por filogenias passadas utilizando diferentes marcadores, Morrow (28S), Thacker (28S) e Redmond (18S). Diante deste novo posicionamento, é possível que duas ou três espécies de *Aptos* possam ser descritas, de acordo com a relação obtida com o marcador 28S. Assim, os gêneros *Rhizaxinella*, *Aptos* e *Ditylos*, parecem se unir ao gênero *Stylocordyla*, na família Stylocordylidae.

Comparando as *Protosuberites* aqui trabalhadas com as de Melis e colaboradores (2016), *P. ectyoninus* (Topsent, 1900) agrupou com MNRJ 21813 do Mar Mediterrâneo que contém um tilo globoso em vez de lobado e perde a cor após a fixação. Com o ITS2, *Protosuberites denhartogi* van Soest & de Kluijver, 2003 agrupou com *Terpios gelatinosus* e com o 28S e ITS2 *P. mereui* Manconi, 2016 e *Protosuberites* sp. (Panamá) agrupam com as amostras de *T. fugax*, como grupos irmãos de *P. denhartogi*, indicando polifiletismo no gênero *Protosuberites*. Melis e colaboradores (2016) descreveram *Protosuberites mereui* para o Mar Tirreno (Itália), comparando seis espécies de *Protosuberites* com *Suberites* e *Prosuberites* (base da árvore). Os autores encontraram alto suporte com a concatenação dos marcadores COX1, 18S e 28S, sendo *Protosuberites ectyoninus* a espécie menos derivada. Diante do exposto, fica clara a característica polifilética de *Protosuberites* nas análises aqui realizadas. A partir das características morfológicas e genéticas, é mais plausível considerar *Protosuberites* como *incertae sedis*, mas como grupo-irmão de *Suberites stricto sensu* (compondo a família Suberitidae), uma vez que convergem quanto ao posicionamento filogenético e apresentam interação com gastrópodes. Outro gênero que deve ser adicionado a Suberitidae, pois também interage com estes moluscos é *Pseudospongosorites* (VAN SOEST, 2002b; MCCORMACK e KELLY, 2002; MELIS *et al.*, 2016).

Outra questão confusa em Suberitida está relacionada com o agrupamento de *Terpios* com as Halichondriidae, ao invés de agrupar com as Suberitidae (MORROW e CÁRDENAS, 2015). Um alto suporte na formação de um clado específico para o gênero *Terpios* foi observado neste estudo, indicando que o gênero está incorporado à família Halichondriidae e não à família Suberitidae. Diante do fato de que a estratégia reprodutiva, as espículas e os esqueletos podem ser homoplásticos em esponjas (VAN SOEST *et al.*, 1990; CÁRDENAS *et al.*, 2011, 2012; MORROW *et al.*, 2012, 2013), a presença exclusiva de tilóstilos em *Terpios* não devem servir de impedimento para a alocação do gênero fora de Suberitidae. Dados não mostrados neste estudo apontam que *Terpios* e alguns representantes do gênero *Caulospongia* (ver amostradas comparativas no Apêndice D) estão intimamente relacionados a partir da

reconstrução filogenética com o marcador 28S. Diante das relações de parentesco evidenciadas por quatro marcadores distintos para a ordem Suberitida e pela similaridade no tipo de tilóstilo lobado, *Terpios* e *Caulospongia* devem ser relacionadas como grupos-irmãos na família Halichondriidae.

A família Halichondriidae *sensu* Morrow e Cárdenas (2015) possuía 15 gêneros. A partir deste estudo, quatro gêneros saem da família - *Topsentia* e *Axinyssa* provavelmente formam uma ordem independente “Topsentiida”, *Epipolasis* agrupa com Axinellidae (ERPENBECK *et al.*, 2012) e o seu tipo de esqueleto é apenas considerado um traço de homoplasia (ver HOOPEL, 1991) e *Ciocalypta*, possivelmente, forma uma família distinta em Suberitida. Por outro lado, *Terpios*, *Caulospongia* e *Ulosa* são definitivamente agrupados à família, *Rhaphidostyla* é reerguida como um gênero independente à *Hymeniacidon*, os gêneros *Solistyla* e *Tenebria* são criados e quatro subfamílias são criadas. Assim, a família Halichondriidae passa a contar com 17 gêneros.

A separação de *Ciocalypta* em uma possível nova família “Ciocalyptidae” é baseada nas evidências genéticas da espécie tipo, as quais são suportadas pela sinapomorfia da presença de uma membrana translúcida na parte externa do seu corpo, desde a base até o topo das fístulas pelo posicionamento da espécie ao serem analisadas reconstruções filogenéticas com marcadores nucleares e mitocondriais (ERPENBECK *et al.*, 2012; MORROW *et al.*, 2012; REDMOND *et al.*, 2013; THACKER *et al.*, 2013). Entretanto, reconstruções com COX1 indicam a existência de espécimes nomeados como *Ciocalypta* em clados diferentes. GUTEKUNST e colaboradores (2018) também observaram este fato ao descrever a espécie *Ciocalypta colorata* Gutekunst, Müller, Pohl, Brümmer, Malik, Fawzi, Erpenbeck & Lehnert, 2018, a qual foi descrita neste gênero pelas características morfológicas, mas agrupando no mesmo clado de *Topsentia* e *Cymbastela* o qual, na opinião deles, era um clado que ainda precisava ser nomeado e aqui, está sendo tratado como “Topsentiida”.

O suporte da família Halichondriidae é mais baixo do que quando comparado às demais famílias (90%) e provavelmente está relacionado à presença de ramos longos o que indica alta taxa de mutação ocorrendo no grupo. O clado de *Terpios* descrito acima contém exclusivamente espécies de *Terpios*, o clado comportando o gênero *Halichondria stricto sensu* contém cinco espécies, inclusive a espécie tipo *Halichondria panicea*. O clado com ramos mais longos é formado por exemplares de *Terpios gelatinosus*, *Rhaphidostyla kitchingi*, *Rhaphidostyla* sp. nov. e *Hymeniacidon gracilis* (provavelmente uma *Rhaphidostyla*). O grande clado de *Hymeniacidon* compreende a espécie tipo e outros representantes, inclusive a nova espécie descrita para o estado do Maranhão, com 99% de

suporte. Com 100%, *Solistyla caerulea* gen. nov. forma um clado distinto. Outro clado com 100% de suporte estatístico é formado por dois ramos de 99% de suporte, um de *Amorphinopsis* e outro para o complexo de espécies anteriormente pertencentes à *Halichondria* e que agora são renomeadas para *Tenebria* gen. nov. A criação destes novos gêneros é fundamental para a compreensão do grupo e são suportadas pelos principais marcadores moleculares (18S, o 28S, o ITS2, o COX1 e o 16S) utilizados em Porifera. Inclusive, ao separar *Johannesia* de *Vosmaeria*, Gerasimova e colaboradores (2008) reforçaram a necessidade de se criar gêneros novos quando os caracteres morfológicos e genéticos forem bem embasados e convergentes.

As análises morfológicas, químicas e genéticas dos gêneros aqui estudados são referentes a espécies distribuídas no OATO. A reconstrução filogenética obtida por Erpenbeck e colaboradores (2007) utilizando exclusivamente espécies caribenhas (em alguns casos com distribuição se estendendo até o Brasil) não são realistas, pois os exemplares tipos dos gêneros parecem ser, em grande parte, de mares europeus ou indonésios. Quando comparadas às análises filogenéticas realizadas no presente estudo, observa-se que agora as relações parecem mais robustas, definidas e suportadas estatisticamente, inferindo grandes mudanças no nível de família e gênero. Observações neste sentido têm sido feitas desde as primeiras reconstruções de Demospongiae que utilizam grande quantidade de representantes da ordem Suberitida (MORROW *et al.*, 2012, REDMOND *et al.*, 2013, THACKER *et al.*, 2013), mas nenhum autor sugeriu mudanças. A partir de agora, sugere-se que *Ciocalypta* seja realocada na antiga família Ciocalyptidae Hentschel, 1923, propomos também a criação de três novos gêneros, a ressurreição do gênero *Rhaphidostyla* Burton, 1935 e a criação de cinco novas espécies descritas no Capítulo 1 desta tese.

6 DISCUSSÃO GERAL: A TAXONOMIA INTEGRATIVA EM PROL DE UMA NOVA PROPOSTA SISTEMÁTICA

A partir deste trabalho, foram encontrados caracteres morfológicos diagnósticos, especificidades nas assinaturas metabólicas e uma homogeneidade nas relações filogenéticas com quatro marcadores moleculares com diferentes dinâmicas evolutivas. Sugere-se que a descrição de novas famílias, gêneros e espécies de suberitidas deva ser baseada na combinação de caracteres, uma vez que cada uma das áreas contribui com informações específicas e, ao mesmo tempo, complementares. Portanto, este capítulo final trará reflexões sobre a classificação do grupo sob a luz dos caracteres morfológicos, assinaturas químicas e sistemática molecular, em prol de uma taxonomia integrativa da ordem Suberitida.

6.1 Superando desafios

A identificação de espécimes em fragmentos ou pequenas crostas limitaram a descrição detalhada dos indivíduos, principalmente quando apenas o estudo morfológico foi realizado. O limite da identificação dada pelo tamanho diminuto impede que todos os caracteres dos indivíduos sejam diagnosticados tornando impraticável a comparação dos caracteres com as descrições dos tipos. Na ordem Suberitida, em especial, a maioria das descrições dos tipos foi feita do meio do século XX para trás, com descrições utilizando exclusivamente a taxonomia alfa em espécimes provenientes dos mares europeus. Infelizmente, boa parte desses exemplares foi descrito apenas superficialmente e por isso a comparação com espécimes coletados atualmente é árdua, dificultando ainda mais quando os exemplares são de regiões biogeográficas distintas. Tendo em vista a grande diversidade morfológica das suberitidas e as homoplasias em diversos caracteres morfológicos, principalmente em Halichondriidae (VAN SOEST *et al.*, 1990; ALVAREZ e HOOPER, 2010), a descrição correta e definitiva com a presença de caracteres diagnósticos depende da combinação de análises adicionais, tais como genética, ecologia, reprodução e química. Mesmo com tantas dificuldades, tanto os caracteres morfológicos quanto os moleculares foram capazes de apontar distinções entre as espécies. Alguns caracteres internos (subectossoma, categorias de tamanho das espículas e tipo de extremidade) e externos (tipo de

superfície e forma de crescimento) mostraram ser importantes para a distinção de espécies e agrupamento de gêneros em famílias.

A principal limitação no estudo da metabolômica se deu pelo baixo número de amostras obtidas, já que as análises estatísticas para estudos de perfil metabolômico requerem um *n* amostral alto para que a representação da espécie seja a mais correta possível. Outro ponto negativo na amostragem aqui realizada é que praticamente, apenas amostras da família Halichondriidae foram testadas, impedindo a extrapolação das características metabólicas para toda a ordem. Além disso, a identificação dos compostos químicos foi limitada pela ausência de uma biblioteca pública robusta de esponjas marinhas, já que grande parte dos compostos produzidos pelas esponjas não foram encontrados nas plataformas *on-line* convencionais. Outro limitante é que grande parte das análises em tandem são desenvolvidas por poucos grupos de pesquisadores, os quais não têm interesse no uso da metabolômica para a classificação biológica (VILLAS-BÔAS e GOMBERT, 2006; QUINN *et al.*, 2017). Neste sentido, ainda é necessário desenvolver diversos parâmetros e algoritmos para trabalhar com uma grande quantidade de grupos (OLIVON *et al.*, 2017). Por mais que ainda haja muita limitação no estudo metabolômico, principalmente de cunho taxonômico, a metabolômica serviu para evidenciar diferenças entre morfotipos semelhantes e apontar variações em complexos de espécies.

As análises filogenéticas aqui testadas convergiram com dados já publicados e sintetizados em Morrow e Cárdenas (2015). No entanto, durante as análises observou-se muitos erros de identificação de espécies, desatualização dos dados nas plataformas *on-line*, edição errada das sequências e comparação de regiões distintas do mesmo gene, gerando relações equivocadas e mantendo as dúvidas sobre a classificação de alguns grupos. Portanto, todo cuidado no manuseio e interpretação das sequências gênicas é necessário.

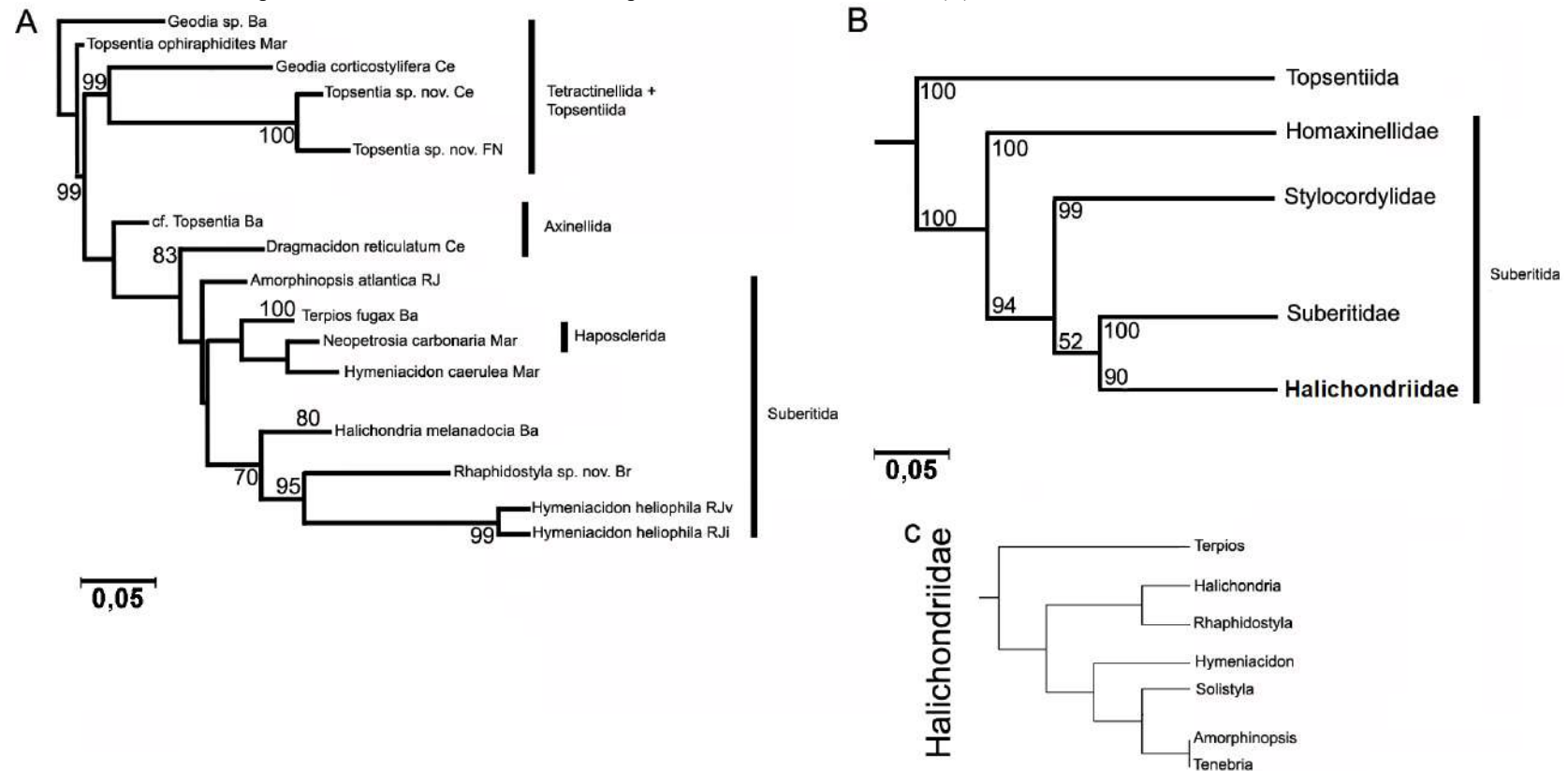
6.2 Convergência de relações a partir do uso de diferentes técnicas

Neste estudo as espécies de Suberitida mantiveram um padrão morfológico e químico, em especial quanto à forma de crescimento, cor, tipo e tamanho médio das espículas e assinatura química. Adicionalmente, tanto os caracteres morfológicos quanto os químicos se alinharam às histórias de parentesco filogenético em Suberitida. A evidência desta afirmação pode ser observada na Figura 61, a qual ilustra a convergência na história das relações de

parentesco entre as espécies estudadas, por meio de análises químicas e genéticas. Este resultado, assim como o encontrado por Ivanisevic e colaboradores (2011a), reafirma o potencial positivo de a metabolômica ser utilizada como uma ferramenta adicional à sistemática. Desta vez, com exemplificação em um grupo contendo espículas e esqueleto com algum nível de organização.

Na classificação de Morrow e Cárdenas (2015), *Axinyssa* é considerado em Bubarida, com ressalvas, e *Petromica* e *Topsentia* são *incertae sedis*, mas próximos de Bubarida. Morfologicamente, *Topsentia* e *Petromica* possuem um esqueleto denso, com reticulação confusa, as quais se agrupam em tratos ascendentes no esqueleto (VAN SOEST e ZEA, 1986; MURICY *et al.*, 2001). *Topsentia* e *Axinyssa* compartilham a perda de um ectossoma especializado e apresentam óxeas fusiformes retas ou deformadas de grandes dimensões desorganizadas no coanossoma. Por outro lado, divergem pelo fato de *Topsentia* ter alta densidade espicular e ausência de tratos de espongina, enquanto o oposto é observado em *Axinyssa* (detalhes em ERPENBECK e VAN SOEST, 2002) e por isso devem ser mantidas em gêneros distintos. Estes autores afirmam que a superfície conulosa característica de *Axinyssa* é proveniente da aglomeração de espículas apontando para a superfície da esponja. Essa é uma característica incomum em Halichondriidae e, adicionalmente, a perda do ectossoma enfatiza a possibilidade de *Axinyssa* ser deslocada de Halichondriidae (ERPENBECK *et al.*, 2012). Quimicamente, *Topsentia* e *Petromica* compartilham a produção de esteróis trissulfatados (KOSSUGA *et al.*, 2007), enquanto *Axinyssa aplysinoidea* (Dendy, 1922) pode produzir terpenóides nitrogenados (PATIL *et al.*, 1997) e aminosulfatados (KODAMA *et al.*, 2003), assim como os observados, quase que exclusivamente, nas amostras de *Topsentia* de Fernando de Noronha. De acordo com as assinaturas metabólicas e as análises filogenéticas aqui obtidas, *Topsentia* spp. pode ser considerado um grupo irmão de *Geodia* spp., convergindo com hipóteses filogenéticas levantadas e testadas por Morrow *et al.* (2013).

Figura 61 – Comparação entre as árvores moleculares geradas por análises de metabolômica (A) e filogenia com o marcador 28S (B) para amostras de Suberitida, Tetractinellida e “Topsentiida”, com maior detalhamento para a família Halichondriidae (C).



Legenda: As reconstruções de ambas as árvores foram realizadas no programa RAxML com o modelo GTRGAMMA com 1000 permutações do tipo *bootstrap*. Os valores de suporte mostrados na árvore A são acima 70% e na B 50%. Em (C) apresenta-se o detalhe de parentesco, por meio do método de *Neighbor Joining* (NJ) entre os gêneros de Halichondriidae que tiveram análises metabólicas testadas no presente estudo.

Fonte: O autor, 2019.

Corroborando dados moleculares pretéritos (MORROW *et al.*, 2012; SCHUSTER *et al.*, 2015), tanto por marcadores nucleares quanto por mitocondriais, os gêneros supracitados se aproximam e podem formar uma nova ordem. Mesmo assim, as espécies tipo ainda precisam ser analisadas para definir esta situação. Neste clado há representantes com capacidade de produzir desmas e outros sem esta capacidade aparente, mas que produzem metabólitos aminosulfatados. Também é possível separar as *Topsentia* do Brasil (sem ofirráfide) de *T. ophiraphidites*, tanto por meio da morfologia quanto pela divergência na assinatura química dos espécimes. As análises de COX1 ainda mostram um espécime de *T. ophiraphidites* dentro de Halichondriidae (GUTEKUNST *et al.*, 2018). Por mais que existam evidências de que *Topsentia* não é Suberitida, este espécime ainda precisa ser reavaliado para que uma definição sobre o gênero seja tomada. As amostras de *T. ophiraphidites* coletadas no presente estudo não tiveram boas sequências e por isso não foram utilizadas nas filogenias deste estudo.

O grande problema na separação das famílias Suberitidae e Halichondriidae em outros grupos está vinculado aos caracteres morfológicos capazes de distinguir essas novas famílias. As análises filogenéticas apontam *Homaxinella*, *Pseudosuberites*, *Spongosorites* e *Vosmaeria* na base de Suberitida. Anatomicamente, *Homaxinella* compartilha com *Caulospongia*, *Plicatellopsis*, *Rhizaxinella* e *Stylocordyla* o potencial de crescimento ereto contendo uma haste e esqueleto axial condensado (VAN SOEST, 2002b), sendo muito similar a *Plicatellopsis* (VAN SOEST, 2002b; LEHNERT e STONE, 2017). *Pseudosuberites* e *Spongosorites*, por sua vez, não se assemelham morfológicamente aos demais citados. A descrição do tipo de *Pseudosuberites*, *Pseudosuberites hyalina* (Ridley & Dendy, 1887), é pobre e sem detalhamento, dificultando a comparação. Além disso, a espécie foi registrada para distintas regiões do planeta, tornando a sua diagnose ainda mais duvidosa (detalhes em ERPENBECK e VAN SOEST, 2002). *Spongosorites* Topsent, 1896 possui 23 espécies, tem crescimento maciço ou incrustante espesso, pode apresentar óxeas, estrôngilos ou estilos em um esqueleto confuso sem a formação de papilas (ERPENBECK e VAN SOEST, 2002). Portanto, uma definição sobre o posicionamento filogenético dos gêneros só poderá ser tomada após uma revisão de sistemática molecular nestes gêneros, necessária para a comprovação ou rejeição deste parentesco. Em um estudo de *barcoding* com espécies da Antártica, VARGAS e colaboradores (2015) observaram uma proximidade entre os gêneros *Homaxinella* e *Plicatellopsis* com *Suberites ficus* e *Pseudosuberites nudus*, mas o suporte deste clado foi muito baixo e o mesmo não deve ser considerado.

Com relação ao gênero *Suberites*, alguns representantes formaram uma família (Suberitidae) e outros representantes agruparam com *Stylocordyla*, *Rhizaxinella* e *Aptos*, no clado B (28S) e A (COX1). As espécies tratadas como *Suberites*, por exemplo, *S. aurantiacus* e *S. diversicolor* devem ser transferidas para o gênero *Ditylos*, pois não agrupam com a espécie tipo de *Suberites*. Morrow e Cárdenas (2015) alocaram *Stylocordyla* em Suberitida pela similaridade morfológica e genética, porém em uma família monotípica. A união dos gêneros acima citados em Stylocordylidae pode ser explicada pela possível formação de um esqueleto com organização axial no coanossoma (espículas longas) e formação de uma paliçada ou buquês no ectossoma (espículas curtas) (ver VOULTSIADOU-KOUKOURA e VAN SOEST, 1993; KELLY-BORGES e BERGQUIST, 1994). Por outro lado, Suberitidae se difere de Stylocordylidae pois as espécies *Suberites domuncula*, *S. ficus* e *S. pagurorum* Solé-Cava & Thorpe, 1986 apresentam esqueleto coanossomal confuso e estão intimamente relacionadas com espécies de gastrópodes (SOLÉ-CAVA e THORPE, 1986; VOULTSIADOU-KOUKOURA e VAN SOEST, 1993). Este tipo de associação necessita de um longo período de tempo para evoluir e por isso esta pode ser a característica mais marcante para diagnosticar o gênero *Suberites*. Esta característica é muito mais forte e menos plástica do que a forma de crescimento ou a tendência na formação de um esqueleto reticulado em vez de confuso, como geralmente se descrevem as suberitidas. Quimicamente, uma característica diagnóstica pode estar relacionada à produção de sesquiterpenos suberitanos e derivados, até o momento considerado com valor taxonômico (ERPENBECK e VAN SOEST, 2007). O problema neste caso é que o composto foi descrito para *Suberites caminatus* na Antártica (SHIN *et al.*, 1995; DÍAZ-MARRERO *et al.*, 2003), uma espécie com distribuição que atinge quase os dois Pólos e que necessita de revisão.

De acordo com as filogenias, ramos independentes surgem para separar cf. *Terpios* e *Ciocalypa penicillus*, entre as Suberitidae e Halichondriidae. Até o momento, a primeira é representada por duas amostras, MNRJ 21813 do Mediterrâneo e PROERG 66 é uma espécie de profundidade com 100% de suporte em Soestidae. Já o segundo ramo tem baixo suporte estatístico e tem ramos muito longos. Este tipo de ramo é uma característica padrão observado tanto por marcadores moleculares quanto mitocondriais. Além disso, neste novo ramo se encontra a espécie tipo *C. penicillus*, a qual se posiciona como grupo irmão de Halichondriidae e não dentro da família. *Ciocalypa* tem uma característica diagnóstica muito marcada que é a presença de uma membrana translúcida cobrindo seu corpo, em adição às papilas e ocorrência de óxeas e/ou estilos. Alguns espécimes desta família precisam ser

reavaliados morfológicamente, uma vez que são mais próximos de *Topsentiida* do que de *Ciocalyptidae*.

A classificação de *Halichondriidae* é historicamente confusa seja pela presença de poucos caracteres diagnósticos ou pela plasticidade morfológica (VAN SOEST *et al.*, 1990; ERPENBECK *et al.*, 2006a, 2012) observada tanto intra quanto interespecificamente, vide o complexo *Hymeniacidon perlevis* (GASTALDI *et al.*, 2018). Para dificultar ainda mais a organização do grupo, cinco gêneros (*Ciocalapata* de Laubenfels, 1936, *Cryptax* de Laubenfels, 1954, *Laminospongia* Pulitzer-Finali, 1983, *Sarcomella* Schmidt, 1868 e *Uritaia* Burton, 1932) não possuem nenhum exemplar sequenciado e, conseqüentemente, não são representados em nenhuma filogenia até o momento e por isso devem ser mantidos nas posições atuais, dentro de *Halichondriidae*. Destas *Cryptax*, *Laminospongia*, *Sarcomella* e *Uritaia* são monotípicas e *Ciocalapata* é representada por duas espécies. Por outro lado, os gêneros *Terpios* e *Ulosa* se inserem no clado de *Halichondria* na filogenia com o marcador 28S (ver THACKER *et al.*, 2013) e por isso são tratadas como uma *Halichondriidae* neste estudo.

A família *Halichondriidae* contém sete ramos altamente suportados (>85%), *Terpios*, *Halichondria*, *Rhaphidostyla*, *Hymeniacidon*, *Solistyla*, *Amorphinopsis* e *Tenebria*. Porém algumas questões ainda precisam ser esclarecidas no grupo, como a falta de monofiletismo em diversos gêneros. A hipótese mais plausível é que haja erros de identificação em algumas espécies, erros de sequenciamento ou falta de atualização dos dados nos bancos de dados. Para que esta hipótese seja comprovada ou refutada, é necessário rever morfológicamente os vouchers de *Axinyssa* sp., *Topsentia ophiraphidites* e *T. halichondroides* (Dendy, 1905) (THACKER *et al.*, 2013), *Pseudosuberites* sp., *Terpios aploos* de Laubenfels, 1954, *Halichondria* sp. que agrupa com *Suberites ficus* e *H. heliophila* que agrupa com *Tenebria*, os quais provavelmente configuram erros de identificação. Portanto, antes dessas amostras serem revistas morfológicamente nenhuma conclusão pode ser tomada definitivamente.

Terpios é grupo-irmão de *Caulospongia*, a sinonímia de *Terpios fugax* (Caribe) e *T. gelatinosus* (Mediterrâneo) parece ser inválida, pois as amostras do Mediterrâneo estão mais relacionadas com as *Rhaphidostyla* do que *Terpios fugax*. O gênero *Terpios* possui apenas tilóstilos e isso a aproxima de *Suberitidae*. Porém, tilóstilos são observados em diversas ordens de *Demospongiae* e por isso não são bons caracteres diagnósticos. Além disso, *Terpios fugax* parece diferir das demais *Suberitida* devido à produção de glicolipídeos, sobretudo os *terpiosídeos* (COSTANTINO *et al.*, 2008, 2010). Estes compostos ainda não são muito

conhecidos em esponjas, mas podem atuar no reconhecimento celular, o que sugere atuação espécie-específica, indicando a alta possibilidade de serem utilizados como marcadores moleculares na quimiosistemática.

Diante das observações das quatro árvores geradas com marcadores distintos, assim como o agrupamento do gênero com relação a sua assinatura química, *Terpios* poderia formar uma família independente ou uma subfamília dentro de Halichondriidae. O clado contém os gêneros *Terpios* e *Caulospongia* e, futuramente, pode conter *Protosuberites*. Por mais que, historicamente, *Terpios* seja alocado junto com *Suberites*, morfológicamente, geneticamente e quimicamente, os gêneros apresentam características muito distintas. Embora o tipo de crescimento de *Terpios* seja distinto do observado em *Caulospongia*, a presença exclusiva de tilóstilos lobados em ambos os aproxima e os distancia de *Suberites* (ver VAN SOEST, 2002b). O hábito incrustante com baixa densidade espicular com tilóstilos na posição vertical e atravessando a superfície, podendo formar buquês, se assemelha as características do gênero *Protosuberites*, sendo a principal diferença morfológica entre eles a tendência de *Protosuberites* formar um tilo em forma de cogumelo. Por outro lado, o potencial de algumas espécies de *Protosuberites* crescerem de forma arborescente aproxima este gênero de *Caulospongia*, filogeneticamente (28S) próxima de *Terpios*.

Sabe-se que o ambiente afeta diretamente a forma de crescimento das esponjas (BELL *et al.*, 2002), podendo inclusive aumentar a plasticidade da forma das espículas, como no caso dos tilóstilos (CHOMBARD *et al.*, 1998). *Terpios* e *Caulospongia* são demarcados pelos tilóstilos lobados e, em muitos casos, achatados. Porém, *Terpios* é representado por espécimes finamente incrustantes e distribuídos em águas tropicais e equatoriais (ver RÜTZLER e SMITH, 1993), enquanto *Caulospongia* cresce de forma ereta, apresentando esqueleto reticulado composto por tratos espiculares e distribuído predominantemente no litoral Austrália (ver FROMONT, 1998). Uma vez que as espículas destes gêneros são semelhantes, diferindo dos demais tipos de tilo encontrados nas antigas hadromeridas (HOOPER e VAN SOEST, 2002b), e as reconstruções filogenéticas agrupam estes gêneros no mesmo clado, é possível que estes gêneros sejam grupos irmãos. A hipótese mais plausível para explicar a diferenciação descomunal na forma de crescimento entre eles se debruça sobre a adaptação dos organismos frente ao estresse causado pelo ambiente. Da mesma forma que, sob condições extremas, a similaridade do habitat pode favorecer adaptações morfológicas similares, criando uma convergência fenotípica (BLANQUER e URIZ, 2007), viver em habitats distintos pode promover uma divergência fenotípica. Por mais difícil que seja

imaginar que *Terpios* possa ter crescimento vertical, isso se deve possivelmente porque, até o momento, este gênero tem se distribuído em áreas que favorecem a vida incrustante. Sendo assim, se *Terpios* se expandir ou colonizar áreas com forçantes abióticas que permitam ou forcem o crescimento ereto, como aquelas em que *Caulospongia* vive, esta espécie pode desenvolver melhor o seu esqueleto, formando tratos ascendentes ou axiais com espículas arranjadas em forma de buquês no ectossoma. O oposto pode servir também para *Caulospongia*. Alguns fatos que embasam esta hipótese são: i) existe uma *Terpios*, ainda não escrita, no Indo-Pacífico que vive no intertidal que pode apresentar crescimento em forma de macarrão, com hábito fistuloso (imagem de Ron Yeo em www.tidechaser.blogspot.com), diferindo das demais espécies que são incrustantes; ii) VAN SOEST (1991) sugeriu que a presença de esqueleto axial existe em indivíduos com crescimento ereto que necessitam de rigidez e flexibilidade, sendo esta hipótese aceita porque dentro das famílias com este tipo de esqueleto há também espécies incrustantes ou maciças que não necessitam de esqueleto axial condensado; iii) VAN SOEST, 2017 descreveu *Suberites crispolobatus* com receio, pois acreditava se tratar de *S. aurantiacus* possuindo longos ramos eretos e com pequenos lobos laterais para um ambiente lamoso (55-80 m). Contudo foi convencido (pelo Dr. Klaus Rützler) de que *S. aurantiacus* tem crescimento massivo. Fato é que *S. aurantiacus* é descrita para ambientes rasos e fixando-se em substrato duro e a variação ambiental pode sim induzir um tipo de crescimento diferenciado, como o ereto.

Os clados presentes em Halichondriidae podem ser diferenciados também pelo tipo de espícula e reticulação ectossomal. *Hymeniacidon* e *Solistyla* possuem estilos, *Halichondria* e *Tenebria* contém somente óxeas e *Amorphinopsis* e *Rhaphidostyla* apresentam estilos e/ou óxeas. Por sua vez, *Terpios* possui apenas tilóstilos lobados. O ectossoma é mais reticulado em *Halichondria* e *Tenebria* do que nos demais representantes, apesar do ectossoma ser possivelmente destacável em todos os gêneros, alguns mais facilmente do que outros.

Quimicamente, Halichondriidae possui isocianetos que são considerados marcadores taxonômicos (ERPENBECK e VAN SOEST, 2007), porém estes não foram identificados como VIPs nas assinaturas químicas deste estudo. Corroborando os dados genéticos, *Hymeniacidon heliophila*, *Solistyla caerulea* e *Rhaphidostyla* sp. nov. (todas previamente *Hymeniacidon*) agruparam em clados muito distantes quanto às assinaturas químicas e compostos VIP (Capítulo 2, Figura 44), indicando que se tratam de gêneros distintos. Nesta mesma figura, também ficou clara a proximidade entre *Tenebria melanadocia* e *Amorphinopsis atlantica* suportando o último clado na árvore do 28S (Figura 53). A distância

de *Hymeniacidon heliophila* em relação às demais Halichondriidae no estudo metabolômico, assim como a polifilia da espécie com marcadores genéticos (GASTALDI *et al.*, 2018) e a presença de subtilóstilos em espécimes caribenhos (DÍAZ *et al.*, 1993) reforça a necessidade de revisão desta espécie. Ademais, amostras agrupando em clados distintos devem representar contaminações, como o exemplo deste estudo, onde uma amostra de *H. heliophila* (MNRJ 21598) agrupou com o complexo de *Tenebria*. Certamente a sequência genética deste material se trata de uma contaminação, pois este espécime foi avaliado morfológicamente contendo exclusivamente estilos <500 µm, cor laranja e presença de papilas, tipicamente uma *H. heliophila*.

Rhaphidostyla kitchingi Burton, 1935 e *Uritaia* foram sinonimizadas com *Hymeniacidon* por Erpenbeck e van Soest, (2002), porém *Uritaia* continua com *status* de gênero até o momento (VAN SOEST *et al.*, 2019), pois duas categorias de estilos podem ser categorizadas neste gênero, em vez de apenas uma em *Hymeniacidon*. Já *Rhaphidostyla* agora é reerguida como um gênero, separado de *Hymeniacidon*. Este gênero possui tanto óxeas quanto estilos finos, em combinação ou sozinhos no esqueleto. O perfil químico das amostras do Rio de Janeiro e da Bahia também distinguem a nova espécie de *Rhaphidostyla* de *Hymeniacidon*. Tanto o estudo filogenético aqui realizado quanto as reconstruções de Redmond *et al.* (2013) e Thacker *et al.* (2013) mostraram que seus representantes estão apartados de *Hymeniacidon* e próximos de *Halichondria*, indicando que ambos os gêneros se localizam em clados distintos. *Rhaphidostyla* tem um suporte de 87%, sendo *R. kitchingi*, *Rhaphidostyla* sp. nov. e *Hymeniacidon gracilis* intimamente relacionadas. Todos os marcadores recuperaram um ramo longo neste clado, indicando que as espécies estão sofrendo mutações em taxas elevadas. Por haver convergência nos marcadores, isso não impede a ressurreição do grupo.

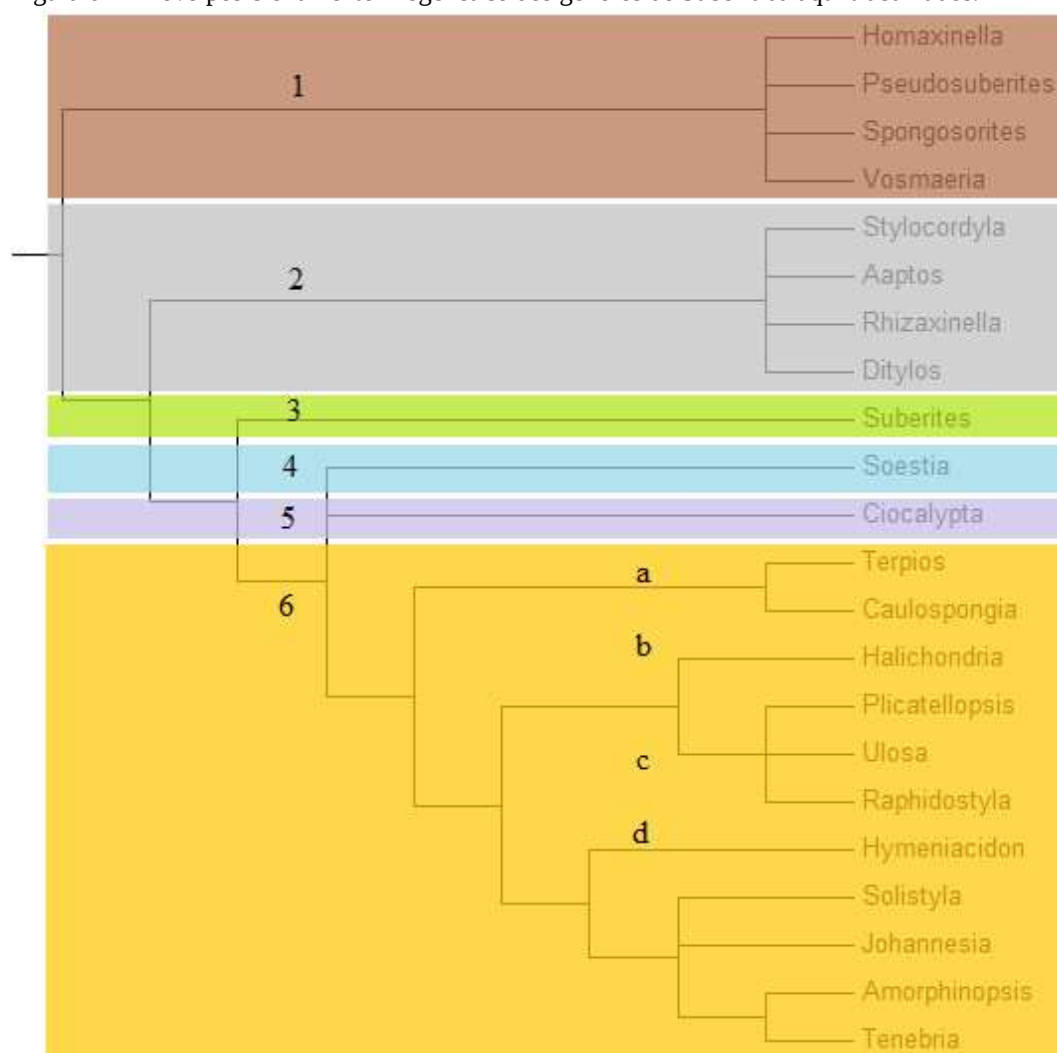
Além dos gêneros mencionados acima para compor Amphispiculinae, possivelmente *Ciocalapata*, *Cryptax*, *Johannesia*, *Laminospongia*, *Sarcomellae* *Uritaia* também fazem parte desta subfamília. *Ciocalapata* de Laubenfels, 1936 possui estilos e óxeas e portanto deve ser alocada nesta subfamília. *Cryptax orygmii* de Laubenfels, 1954 é um espécime mal descrito, pois a revisão no *Systema Porifera* apontou a existência exclusiva de óxeas em vez de tilóstilos e esqueleto entrecruzado, descritos por de Laubenfels na diagnose do gênero. *Laminospongia* está inserida em Halichondriidae simplesmente pela presença de óxeas e estilos e um esqueleto confuso. Claramente, Erpenbeck e van Soest (2002) propuseram a manutenção de *Laminospongia* como um gênero válido de Halichondriidae por não existir

evidência de sua posição filogenética em outro grupo. *Sarcomella* é outro exemplo de identificação extremamente duvidosa (descrição em SCHMIDT, 1868). Apesar de Topsent (1938) manifestar a presença de óxeas na espécie *S. medusa* Schmidt, 1868, ele enfatiza a má descrição do autor e classifica o gênero como enigmático. Apenas estes dois trabalhos citam a existência de *Sarcomella*. Com exceção de *Johannesia*, os demais gêneros são alocados próximos a *Amorphinopsis* como *incertae edis*, por não existir evidência filogenética do contrário. Estes gêneros são extremamente duvidosos e novos estudos são necessários, inclusive com a coleta de novos espécimes nas regiões onde os tipos foram descritos. O complexo de espécies compreendendo o novo gênero *Tenebria* contém *T. okadai*, *T. marianae*, *T. melanadocia*, *T. sulfurea* e *T. tenebrica*. Este nome remete a escuridão em grego, devido a dificuldade de identificação tanto com a taxonomia alfa quanto através da sistemática molecular, formando um complexo de espécies. Estas espécies compartilham a exclusividade de espículas do tipo óxea e uma ou duas categorias de tamanho. Todas as demais espécies de *Halichondria* de ambientes tropicais e subtropicais e de cor escura precisam ser revistas, pois podem pertencer ao gênero *Tenebria* em vez de *Halichondria*.

6.3 Novas propostas de diagnose e classificação em Suberitida

Uma profunda modificação nas relações de parentesco em Suberitida foi revelada por meio dos marcadores moleculares, convergindo com as assinaturas químicas das Halichondriidae e das *Topsentia* spp. Entretanto, ainda permanece o grande desafio de encontrar caracteres morfológicos diagnósticos para todos os novos grupos. A nova proposta de classificação está compilada na Figura 62 e na Tabela 18. Abaixo estão descritas as novas propostas de diagnose para cada família, subfamília e gênero criados.

Figura 62 – Novo posicionamento filogenético dos gêneros de Suberitida aqui trabalhados.



Legenda: Reconstrução filogenética de consenso (*Neighbor Joining*) de Suberitida para o nível de gênero. Cada grande clado com ramificações baseadas tanto em caracteres morfológicos quanto genéticos está indicado pelos números e cores diferentes na árvore. As letras indicam subdivisões de clados estatisticamente suportados dentro da família Halichondriidae.

Fonte: O autor, 2019.

Tabela 18 – Comparação entre a classificação antes e depois das propostas apresentadas no presente estudo e demonstradas na Figura 62. (continuação)

<i>sensu</i> (MORROW e CÁRDENAS, 2015)			Presente estudo			
Ordem	Família	Gênero	Ordem	Clado	Família	Gênero
Suberitida	Stylocordylidae	<i>Stylocordyla</i>	Suberitida	1	Suberitidae /	<i>Homaxinella</i>
		<i>Aaptos</i>				<i>Pseudosuberites*</i>
	Suberitidae	<i>Caulospongia</i>		2	Halichondriidae*	<i>Spongosorites</i>
		<i>Homaxinella*</i>				<i>Vosmaeria</i>
		<i>Plicatellopsis</i>				<i>Stylocordyla</i>
		<i>Protosuberites</i>				<i>Aaptos</i>
		<i>Pseudospongosorites</i>				<i>Rhizaxinella</i>
		<i>Pseudosuberites</i>				<i>Ditylos</i>
		<i>Rhizaxinella</i>				<i>Suberites</i>
		<i>Suberites</i>				<i>Pseudospongosorites</i>
		<i>Terpios*</i>				<i>Protosuberites*</i>
						<i>Soestia*</i>
	Halichondriidae	<i>Amorphinopsis</i>		4	Ciocalyptidae ¹	<i>Ciocalypta</i>
		<i>Axinyssa</i>		5		<i>Terpios</i>
		<i>Ciocalapata</i>		6		<i>Caulospongia</i>
		<i>Ciocalypta</i>				<i>Halichondria</i>
		<i>Cryptax</i>				<i>Rhaphidostyla</i> ¹
		<i>Epipolasis</i>				<i>Plicatellopsis*</i>
		<i>Halichondria</i>				<i>Ulosa</i> ^{2*}
		<i>Hymeniacidon</i>				
		<i>Johannesia</i>				<i>Amorphinopsis</i>
						<i>Ciocalapata</i>
Suberitida		<i>Laminospongia</i>	Suberitida		Halichondriidae “d”	<i>Cryptax*</i>
		<i>Sarcomella</i>				<i>Hymeniacidon</i>
		<i>Spongosorites</i>				

Tabela 18 – Comparação entre a classificação antes e depois das propostas apresentadas no presente estudo e demonstradas na Figura 62 (conclusão)

<i>sensu</i> (MORROW e CÁRDENAS, 2015)			Presente estudo			
Ordem	Família	Gênero	Ordem	Clado	Família	Gênero
Suberitida		<i>Topsentia</i> *	Suberitida	6	Halichondriidae “d”	<i>Johannesia</i>
		<i>Uritaia</i>				<i>Laminospongia</i> *
		<i>Vosmaeria</i>				<i>Sarcomella</i> *
						<i>Uritaia</i>
						<i>Solistyla</i>
						<i>Tenebria</i>
			Axinellida		Axinellidae	<i>Epipolasis</i> ²
			Topsentiida		Topsentiidae	<i>Axinyssa</i> ²
Poecilosclerida	Esperiopsidae	<i>Ulosa</i> *				<i>Topsentia</i> ²

Legenda: Nomes em negrito correspondem a novas propostas de classificação, ¹ressurreição de nomes, ²realocação na classificação e **incertae sedis*. Cada grande clado com ramificações baseadas tanto em caracteres morfológicos quanto genéticos está indicado pelos números e cores diferentes na árvore. As letras indicam subdivisões de clados estatisticamente suportados dentro da família Halichondriidae.

Fonte: O autor, 2019.

Clado 1

Gêneros *Homaxinella*, *Pseudosuberites*, *Spongosorites* e *Vosmaeria*. Crescimento ereto com a formação de hastes e extremidades digitiformes ou crescimento massivo com papilas. As espículas são tilóstilos, preferencialmente, mas modificações para estrôngilos, estilos e óxeas também podem ocorrer. O esqueleto é extra-axial, tendendo para confuso na periferia. O ectossoma não é especializado, mas há formação de espículas arranjadas em buquê. Distribuição restrita a águas temperadas e polares. Reconstruções filogenéticas do 28S (D1-D2) e COX1 (FOLMER) relacionam os gêneros, pois a descrição de *Hymeniacidon simplicima* se refere a uma espécie de *Pseudosuberites* (MORROW *et al.*, 2012). Contudo, outros espécimes de *Pseudosuberites* sp. são observados em diferentes clados nas reconstruções, indicando que o gênero possa ser polifilético.

Clado 2 – Família Stylocordylidae

Família contendo os gêneros *Aaptos*, *Ditylos*, *Rhizaxinella*, e *Stylocordyla*. A forma de crescimento ereto com a formação de uma haste e o tipo de esqueleto axial com modificação para radial aproximam *Rhizaxinella* e *Stylocordyla*. *Aaptos* e *Ditylos* possuem crescimento globular/ovóide ou massivo com ectossoma em paliçada ou buquês de espículas de pequenas dimensões. As espículas podem ser óxeas, estrongilóxeas ou tilóstilos, além de micróxeas ou tricodragmas. A distribuição preferencial das espécies é em zona temperada, desde o intertidal até águas profundas. Reconstruções filogenéticas com o gene mitocondrial COX1 aproximam os quatro gêneros (ver ilustração acima). Adicionalmente, marcadores moleculares nucleares e mitocondriais separaram *Ditylos* de *Suberites*, as verdadeiras Suberitidae. A diagnose de *Ditylos* indica espécies com crescimento maciço ou incrustante espesso, tilóstilos fusiformes e separados em duas categorias de tamanho. O esqueleto coanossomal tende a reticulado. Geralmente, as espécies possuem cromovariação. As espécies estão distribuídas, majoritariamente, em águas rasas e mesofóticas, desde a zona equatorial até subtropical.

Clado 3 – Família Suberitidae

Família contendo os gêneros *Suberites*, *Protosuberites* (*incertae sedis*) e *Pseudospongosorites*. Existe associação simbiótica com moluscos. O crescimento é incrustante ou maciço com arranjo esquelético mais ou menos confuso. As espículas são tilóstilos globosos com variação para subtilóstilos, retos ou curvos. As óxeas são exclusivamente observadas em *Pseudospongosorites*. A distribuição é majoritariamente

temperada. Geneticamente, *Protosuberites* é polifilética, pois existem espécies agrupando com os gêneros *Suberites*, *Rhaphidostyla*, *Soestia* e *Terpios*. Portanto, uma revisão do gênero é necessária. A associação com gastrópodes é o principal motivo para inserir *Protosuberites* em Suberitidae.

Clado 4

Clado contendo apenas dois indivíduos: MNRJ 21813 e PROERG 66, que não se enquadram em nenhum outro gênero até o momento e criados com base em evidências filogenéticas. Os quatro marcadores moleculares (28S, ITS2, 16S e COX1) testados neste estudo foram capazes de separar estes espécimes dos demais. Apenas o MNRJ 21813 foi avaliado morfológicamente, enquanto PROERG 66 agrupa geneticamente. O gênero não mantém a coloração após a fixação, tem crescimento incrustante e as espículas são exclusivamente tilóstilos globosos, paralelamente arranjados com a ponta aguda voltada para a superfície. A espécie avaliada é incrustante, de coloração azul *in vivo* e branca após a fixação. A perda de cor é um caráter importante para diferenciar os representantes deste clado de *Terpios*. Os indivíduos foram coletados em águas frias, MNRJ 21813 no Mediterrâneo e PROERG 66 na América do Sul. O nome *Soestia* foi dado a este clado meramente para facilitar a compreensão do leitor.

Clado 5 – Família Ciocalyptidae

Família contendo apenas o gênero *Ciocalypta*. Assim como o clado 4, este gênero divide as Suberitidae de Halichondriidae, geneticamente. O gênero possui uma característica única que é a presença de uma membrana translúcida no seu exterior. O crescimento é maciço na base com a formação de papilas. As espículas são óxeas e estilos, em combinação ou exclusivas. O esqueleto tende para axial, principalmente nas papilas. A distribuição é cosmopolita, exceto na Antártica.

Clado 6 – Família Halichondriidae

A maior família com suporte filogenético de 90% no 28S e 94% no COX1. A família é formada por um clado contendo 14 gêneros subdivididos em sete ramos e quatro subdivisões, com base nas amostras comparativas utilizadas neste estudo. A família é diagnosticada por espécies contendo exclusivamente megascleras, esqueleto confuso no coanossoma, mas com tendência de formação de tratos ascendentes e ectossoma reticulado e destacável. A relação

das subdivisões foi definida com base na filogenia do grupo, mas também a partir de atributos morfológicos e químicos.

Subdivisão A

Contém os gêneros *Terpios* e *Caulospongia*, identificados a partir de diferentes marcadores moleculares. Uma longa comparação dos gêneros foi realizada na discussão geral deste trabalho. É caracterizada por espécies com espículas tilóstilos contendo tilo lobado em uma única categoria de tamanho. As espécies têm cores vibrantes que se mantêm após a fixação em álcool. Geralmente as cores estão associadas ao tipo de cianobactéria simbiote. O esqueleto tem baixa densidade espicular, tanto em espécimes incrustantes quanto eretos. O tilo é voltado para o substrato e a ponta aguda para a superfície da esponja, a qual é geralmente hispida. Existem espécies com capacidade de crescer sobre corais, matando-os. A distribuição é geralmente tropical e subtropical, desde a zona intertidal até a zona mesofótica.

Subdivisão B

Esta subdivisão agrupa o clado de *Halichondria*, cujas espécies têm crescimento incrustante espesso a maciço, podendo apresentar fístulas. Quando as fístulas estão presentes, o subgênero é *Eumastia*, enquanto o subgênero *Halichondria* corresponde a espécies sem esta característica. As espículas são óxeas em *Halichondria*, com frequente divisão de categorias. O esqueleto é confuso no interior, com tendência a formação de tratos multiespiculares ascendentes, caracterizado como halichondróide. O ectossoma é destacável e reticulado. A distribuição é cosmopolita, mas com preferência para águas rasas em zonas subtropicais e temperadas.

Subdivisão C

Agrupa os gêneros *Rhaphidostyla*, *Plicatellopsis** e *Ulosa**. A subdivisão contém espécies com crescimento incrustante a maciço, com a presença de fístulas ou crescimento arborescente. As espículas são tilóstilos, óxeas e/ou estilos. O esqueleto tende a formar tratos multiespiculares ascendentes. A distribuição é disjunta, mas com preferência para águas tropicais e subtropicais. *Rhaphidostyla* pode apresentar óxeas e estilos em combinação ou em exclusividade. A assinatura química indica a presença de compostos polares de alta intensidade e as reconstruções filogenéticas separam o gênero de *Hymeniacidon*. Este gênero está sendo ressuscitado, uma vez que se difere em uma gama de fatores de *Hymeniacidon*.

Subdivisão D

A subdivisão é composta por 10 gêneros. O crescimento é geralmente maciço e com superfície irregular. As espículas são óxeas e/ou estilos com modificação para subtilóstilos. O esqueleto é formado por tratos anastomizados da base até a superfície. O ectossoma apresenta uma reticulação irregular e é destacável, mas não tão fácil quanto na subfamília Halichondriinae. O novo gênero *Solystyla* possui crescimento maciço sem a formação de papilas. O esqueleto é halichondróide, mas as espículas são estilos, frequentemente ultrapassando 500 μm . O novo gênero *Tenebria* é composto por espécies de águas tropicais e subtropicais. O crescimento varia de incrustante a maciço com a possível formação de lobos, onde os ósculos se localizam. A superfície nunca é lisa devido às espículas que protruam o ectossoma. O coanossoma é formado exclusivamente por óxeas em uma ou duas categorias de tamanho.

CONCLUSÕES

Os caracteres morfológicos, as assinaturas metabólicas e as reconstruções filogenéticas com marcadores nucleares e mitocondriais funcionaram tanto quando utilizados sozinhos quanto em combinação. Porém, alguns grupos não foram possíveis de ser identificados quando apenas a morfologia foi aplicada. Da mesma forma, amostras identificadas equivocadamente se mostraram ambíguas nos estudos moleculares, dificultando ou impedindo a identificação. Sendo assim, afirma-se que a integração de ferramentas é a melhor forma de identificar e classificar os representantes da ordem Suberitida.

Diante da vastidão de caracteres observados e delimitados neste estudo, a ordem Suberitida pode ser definida pela presença de caracteres e não mais pela ausência deles, uma vez que possui primariamente espículas monoaxônicas, esqueleto axial em espécies com crescimento ereto, geralmente com a formação de buquês no ectossoma e halichondróide em espécies com pequena espessura. O esqueleto ectossomal destacável tende para reticulado em Halichondriidae, enquanto as demais famílias não possuem ectossoma destacável com especialização. Espécies com crescimento exclusivamente ereto geralmente são restritas a regiões de altas latitudes ou altas batimetrias, enquanto espécies maciças, globosas e incrustantes são características de águas tropicais e rasas.

A nova proposta de classificação para a ordem Suberitida contém seis clados, um deles subdividido em quatro grupos (Tabela 18). Após as propostas, a ordem é representada por três famílias, 29 gêneros e 451 espécies. Destas espécies, 52 (11,5%) estão distribuídas no Oceano Atlântico Tropical Ocidental.

- a) Foram identificadas e descritas 19 espécies e 13 morfotipos a partir de caracteres morfológicos. Quatro novas espécies de Suberitida foram diagnosticadas e uma de *Topsentia*;
- b) Este foi o primeiro estudo focando na metabolômica de esponjas exclusivamente espiculadas. O conjunto metabólico dos representantes da Ordem Suberitida distribuídas no Brasil e na Martinica foi relacionado com sucesso com as características morfológicas e genéticas, além de ser capaz de identificar poluentes plásticos;

- c) As espécies tropicais *Terpios fugax* e *Halichondria melanadocia* evidenciaram alto potencial bioativo contra a cepa bacteriana de *Aliivibrio fischeri*. Estudos com foco nos glicolipídeos são promissores;
- d) A filogenia da Ordem Suberitida indicou um padrão altamente suportado por meio de quatro marcadores moleculares com diferentes taxas de mutação;
- e) A taxonomia integrativa elucidou a separação de grupos de espécies da Ordem Suberitida. A integração e comparação de dados morfológicos, metabólicos e genéticos apontaram uma classificação robusta;
- f) Representantes dos gêneros *Axinyssa* e *Topsentia* são alocados fora de Suberitida, indicando a presença de uma nova ordem (“Topsentiida”).

REFERÊNCIAS

- ABE T, KUKITA A, AKIYAMA K, NAITO T, UEMURA D. 2012. Isolation and structure of a novel biindole pigment substituted with an ethyl group from a metagenomic library derived from the marine sponge *Halichondria okadai*. *Chemical Letters* 41:728–729. DOI: 10.1246/cl.2012.728.
- ACKERS ROA, MOSS D, PICTON BE. 1992. Sponges of the British Isles ('Sponge V') a colour guide and working document. Marine Conservation Society: 1–175.
- ALAM N, BAE BH, HONG J, LEE CO, SHIN BA, IM KS, JUNG JH. 2001. Additional bioactive lyso-PAF congeners from the sponge *Spirastrella abata*. *Journal of Natural Products* 64:533–535.
- ALLARD PM, PÉRESSE T, BISSON J, GINDRO K, MARCOURT L, PHAM VC, ROUSSE F, LITAUDON M, WOLFENDER JL. 2016. Integration of molecular networking and in-silico MS/MS fragmentation for natural products dereplication. *Analytical Chemistry* 88:3317–3323. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04804.
- ALVAREZ B, HOOPER JNA. 2010. Taxonomic revision of the order Halichondrida (Porifera: Demospongiae) of northern Australia. Family Halichondriidae. The Beagle, Records of the Museums and Art Galleries of the Northern Territory 26:13–36.
- ALVI KA, TENENBAUM L, CREWS P. 1991. Anthelmintic polyfunctional nitrogen-containing terpenoids from marine sponges. *Journal of Natural Products* 54:71–78.
- AMOS W, HOELZEL AR. 1991 Long-term preservation of whale skin for DNA analysis. In: Hoelzel AR (Ed.) *Genetic Ecology of Whales and Dolphins*. International Whaling Commission Special, Cambridge. p. 99–104.
- ANDERSON NL, ANDERSON NG. 1998. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 19:1853–1861.
- ANJUM K, ABBAS SQ, SHAH SAA, AKHTER N, BATTOOL S, HASSAN SS. 2016. Marine sponges as a drug treasure. *Biomolecules & Therapeutics* 24:347–362.
- ANTCLIFFE JB, CALLOW RHT, BRASIER MD. 2014. Giving the early fossil record of sponges a squeeze. *Biological Reviews* 89:972–1004.
- APPELTANS W, AHYONG ST, ANDERSON G *et al.* 2012. The magnitude of global marine species diversity. *Current Biology* 22:2189–2202.
- ARCHER SK, STONER EW, LAYMAN CA. 2015. A complex interaction between a sponge (*Halichondria melanadocia*) and a seagrass (*Thalassia testudinum*) in a subtropical coastal ecosystem. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 465:33–40.

- AVILÉS E, RODRIGUÉZ AD. 2010. Monamphilectine A, a potent antimalarial β -Lactam from a marine sponge *Hymeniacidon* sp: Isolation, structure, semisynthesis, and bioactivity. *Organic Letters* 12:5290–5293.
- AYLING AL. 1980. Patterns of sexuality, asexual reproduction and recruitment in some infralitoral marine Demospongiae. *Biological Bulletin* 158:271–282.
- BAIRD CA. 2016. Measuring the effects of microplastics on sponges. Dissertação de Mestrado, Victoria University of Wellington, Nova Zelândia.
- BAKUS GJ, GREEN G. 1974. Toxicity in sponges and holothurians: a geographic pattern. *Science* 185:951–953.
- BARNATHAN G, VELOSAOTSY N, AL-LIHAIBI S, NJINKOUE JM, KORNPORST JM, VACELET J, BOURY-ESNAULT N. 2004. Unusual sterol composition and classification of three marine sponge families. *Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici Università di Genova* 68:201–208.
- BARNATHAN G. 1993. Acides gras et stérols d'éponges marines du Sénégal et de Nouvelle-Calédonie. Tese de Doutorado, Université de Nantes, França.
- BARTHEL D, GUTT J (1992) Sponge associations in the eastern Weddell Sea. *Antarctic Science* 4:137–150.
- BARTIK K, BRAEKMAN JC, DALOZE D, STOLLER C, HUYSECOM J, VANDEVYVER G, OTTINGER R. 1987. Topsentins, new toxic bis-indole alkaloids from the marine sponge *Topsentia genitrix*. *Canadian Journal of Chemistry* 65:2118–2121.
- BAUERMEISTER A, VELASCO-ALZATE K, DIAS T, MACEDO H, FERREIRA EG, JIMENEZ PC, LOTUFO TMC, LOPES NP, GAUDÊNCIO SP, COSTA-LOTUFO LV. 2018. Metabolomic fingerprinting of *Salinispora* from Atlantic oceanic islands. *Frontiers in Microbiology*. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03021.
- BEAZLEY LI, KENCHINGTON EL, MURILLO FJ, SACAU M. 2013. Deep-sea sponge grounds enhance diversity and abundance of epibenthic megafauna in the Northwest Atlantic. *ICES Journal of Marine Science* 70:1471–1490. DOI: 10.1093/icesjms/fst124.
- BECERRO MA, THACKER RW, TURON X, URIZ MJ, PAUL VJ. 2003. Biogeography of sponge chemical ecology: comparisons of tropical and temperate defenses. *Oecologia* 135:91–101.
- BECKING LE, ERPENBECK D, PEIJNENBURG KTCA, DE VOOGD NJ. 2013. Phylogeography of the sponge *Suberites diversicolor* in Indonesia: Insights into the evolution of marine lake populations. *Plos One* 8:e75996. DOI: 10.1371/journal.pone.0075996.
- BELANGER CL, JABLONSKI D, ROY K, BERKE SK, KRUG AZ, VALENTINE JW. 2012. Global environmental predictors of benthic marine biogeographic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:14046–14051.

- BELL JJ, BARNES DKA, TURNER JR. 2002. The importance of micro and macro morphological variation in the adaptation of a sublittoral demosponge to current extremes. *Marine Biology* 140:75–81.
- BERGMANN W, FREENEY RJ. 1950. The isolation of a new thymine pentoside from sponges. *Journal of the American Chemical Society* 72:2809–2810.
- BERGMANN W. 1949. Comparative biochemical studies on the lipids of marine invertebrates, with special reference to the sterols. *Journal of Marine Research* 8:137–176.
- BERGMANN W. 1962. Sterols: their structure and distribution. In Florkin M; Mason HS (Eds.) *Comprehensive Biochemistry* (Vol 3), New York and London: Academic Press, 103–162.
- BERGQUIST PR, CAMBIE RC, KERNAN MR. 1991a. Aaptamine, a taxonomic marker for sponges of the order Hadromerida. *Biochemical Systematics and Ecology* 19:289–290.
- BERGQUIST PR, KARUSO P, CAMBIE RC, SMITH DJ. 1991b. Sterol composition and classification of the Porifera. 3. *Biochemical Systematics and Ecology* 19:17–24.
- BERGQUIST PR, WELLS RJ. 1983. Chemotaxonomy of the Porifera: the development and current status of the field. In: Scheuer PJ. (Ed.) *Marine Natural Products. Chemical and Biological Perspectives*, Academic Press, New York, 1–50.
- BERGQUIST PR. 1972. Deep water Demospongiae from New Zealand. *Micronesica* 8:125–136.
- BERGQUIST PR. 1978. *Sponges*. London: Hutchinson, 268 p.
- BERNARDI N. 1981. Phylogenetic relationships, monophyletic group and related concepts. *Revista Brasileira de Entomologia* 25:323–326.
- BIGELOW RW. 1956. Monophyletic classification and evolution. *Systematic Biology* 5:145–146. DOI: 10.2307/2411915
- BLANQUER A, URIZ MJ. 2007. Cryptic speciation in marine sponges evidenced by mitochondrial and nuclear genes: a phylogenetic approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45:392–397.
- BLUNT J, MUNRO M. 2016. *MarinLit*. University of Canterbury, New Zealand. <http://pubs.rsc.org/marinlit/>.
- BLUNT JW, COPP BR, KEYZERS RA, MUNRO MHG, PRINSEP MR. 2016. Marine natural products. *Natural Product Reports* 33:382–431.
- BO M, BERTOLINO M, BAVESTRELLO G, CANESE S, GIUSTI M, ANGIOLILLO M, PANSINI M, TAVIANI M. 2012. Role of deep sponge grounds in the Mediterranean Sea: a case study in the southern Italy. *Hydrobiologia* 687:163–177.

- BORBONE N, DE MARINO S, IORIZZI M, ZOLLO F, DEBITUS C, IANARO A, PISANO B. 2001. New glycosphingolipids from the marine sponge *Aplysina rhax* and their potential as nitric oxide release inhibitors. *European Journal of Organic Chemistry* 24:4651–4656.
- BORCHIellini C, CHOMBARD C, LAFAY B, BOURY-ESNAULT N. 2000. Molecular systematics of sponges (Porifera). *Hydrobiologia* 420:15–27.
- BORCHIellini C, CHOMBARD C, MANUEL M, ALIVON E, VACELET J, BOURY-ESNAULT N. 2004. Molecular phylogeny of Demospongiae: implications for classification and scenarios of character evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32:823–837.
- BOTTING JP, MUIR LA. 2018. Early sponge evolution: a review and phylogenetic framework. *Palaeoworld* 27:1–29.
- BOURY-ESNAULT N. 1971. Spongiaires de La zone rocheuse de Banyuls-sur-mer II Systématique. *Vie & Milieu* 22:287–350.
- BOURY-ESNAULT N. 1973. Campagne de la Calypso au large des côtes atlantiques de l'Amérique du Sud (1961-1962). Spongiaires. Résultats scientifiques des campagnes de la Calypso 10:263–295.
- BOURY-ESNAULT N, LOPES MT. 1985. Les Démosponges littorales de l'Archipel des Açores. *Annales de l'Institut océanographique*. 61:149–225.
- BOURY-ESNAULT N, RÜTZLER K. 1997. Thesaurus of sponge morphology. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 55 p.
- BOURY-ESNAULT N, LAVROV DV, RUIZ CA, PÉREZ T. 2013. The integrative taxonomic approach applied to Porifera: a case study of the Homoscleromorpha. *Integrative and Comparative Biology* 53:416–427. DOI:10.1093/icb/ict042.
- BOWERBANK JS. 1864. A monograph of the british Spongiadae. Volume 1. Ray Society: London: I-XX, 290 pp.
- BOWERBANK JS. 1866. A monograph of the british Spongiadae. Volume 2. Ray Society: London: I-XX, 388 pp.
- BOWERBANK JS. 1874. A Monograph of the British Spongiadae. Volume 3. Ray Society: London: I-XVII, 367 pp.
- BUNDY JG, DAVEY MP, VIANI MR. 2009. Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics* 5:3–21.
- BURRESON BJ, SCHEUER PJ, FINER J, CLARDY J. 1975. 9-Isocyanopupukeanane, a marine invertebrate allomone with a new sesquiterpene skeleton. *Journal of the American Chemical Society*. DOI: 10.1021/ja00849a053
- BURTON M. 1954. Sponges. Pp. 215-239, pl. 9. In: The 'Rosaura' Expedition. Part 5. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology* 2:231–232.

BURTON M. 1935. Notes on british sponges, with a description of a new genus and species. *Annals and Magazine of Natural History*. 10:651–653.

CACHET N, GENTA-JOUE G, IVANISEVIC J, CHEVALDONNÉ P, SINNIGER F, CULIOLI G, PÉREZ T, THOMAS OP. 2015. Metabolomic profiling reveals deep chemical divergence between two morphotypes of the zoanthid *Parazoanthus axinellae*. *Scientific Reports* 5. DOI: 10.1038/srep08282

CALDERÓN GJ, CASTELLANOS L, DUQUE C, ECHIGO S, HARA N, FUJINOMOTO Y. 2004. Ophirasterol, a new C31 sterol from the marine sponge *Topsentia ophiraphidites*. *Steroids* 69:93–100.

CANUTO GAB, DA COSTA JL, DA CRUZ PLR, DE SOUZA ARL, FACCIO AT, KLASSEN A, RODRIGUES KT, TAVARES MFM. 2018. Metabolômica: Definições, estado-da-arte e aplicações representativas. *Química Nova* 41:75–91.

CARBALLEIRA NM, REYES ED. 1990. Novel very long chain fatty acids from the sponge *Petrosia pallasarca*. *Journal of Natural Products* 53:836–840.

CARBALLEIRA NM, SHALABI F, NEGRON V. 1989. 2-Hydroxy fatty acids from marine sponges 2. The phospholipid fatty acids of the Caribbean sponges *Verongula gigantea* and *Aplysina archeri*. *Lipids* 24:229–232.

CARBALLEIRA NM, SHALABI F. 1990. Identification of naturally-occurring trans $\Delta 5,9$ fattyacids from the sponge *Plakortis halichondroides*. *Lipids* 25:835–840.

CÁRDENAS P, XAVIER JR, REVEILLAUD J, SCHANDER C, RAPP HT. 2011. Molecular phylogeny of the Astrophorida (Porifera, Demospongiae) reveals an unexpected high level of spicule homoplasy. *Plos One* 6:e18318. DOI:10.1371/journal.pone.0018318.

CÁRDENAS P, PÉREZ T, BOURY-ESNAULT N. 2012. Sponge systematics facing new challenges. *Advances in Marine Biology*. 61:79–209.

CARLETTI I, LONG C, FUNEL C, AMADE P. 2003. Yardenone A and B: New cytotoxic triterpenes from the Indian Ocean sponge *Axinella* cf. *bidderi*. *Journal of Natural Products* 66:25–29.

CARTER HJ. 1887. Report on the Marine Sponges, chiefly from King Island, in the Mergui Archipelago, collected for the Trustees of the Indian Museum, Calcutta, by Dr. John Anderson, FRS, Superintendent of the Museum. *Journal of the Linnean Society, Zoology* 21: 61–84.

CARVALHO MS, HAJDU E, MOTHES B, VAN SOEST RWM. 2004. *Amorphinopsis* (Halichondridae: Demospongiae) from the Atlantic Ocean, with the description of a new species. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 84:925–930.

CARVALHO MS, HAJDU E. 2001 Comments on brazilian *Halichondria* Fleming (Halichondriidae, Halichondridae, Demospongiae), with the description of four new species from the Sao Sebastião Channel and its environs (Tropical Southwestern Atlantic). *Revista Brasileira de Zoologia* 18:161–180.

- CARVALHO MS, SILVA SM, PINHEIRO U. 2013. Two new species of *Aaptos* (Demospongiae, Hadromerida) from Brazil (western Atlantic). *Zootaxa* 3750:357–366.
- CAVALCANTI FF, KLAUTAU M. 2011. Solenoid: a new aquiferous system to Porifera. *Zoomorphology* 130:255–260.
- ÇELİK İ, CİRİK S, ALTMAGAC U, AYAZ A, ÇELİK P, TEKESOĞLU H, YLMAZ H, ÖZTENİK A. 2011. Growth performance of bath sponge (*Spongia officinalis* Linnaeus, 1759) farmed on suspended ropes in the Dardanelles (Turkey). *Aquaculture Research* 42: 1807–1815.
- CHILL L, YOSIEF T, KASHMAN Y. 2002. Halichondramine, a new tetracyclic bipiperidine alkaloid from the marine sponge *Halichondria* sp. *Journal of Natural Products* 65:1738–1741.
- CHOMBARD C, BOURY-ESNAULT N, TILLIER S. 1998. Reassessment of homology of morphological characters in tetractinellid sponges based on molecular data. *Systematic Biology*, 47:351–366. DOI: 10.1080/106351598260761.
- CHOMBARD C, BOURY-ESNAULT N. 1999. Good congruence between morphology and molecular phylogeny of Hadromerida, or how to bother sponge taxonomists. *Memoirs of the Queensland Museum* 44:100.
- CHU JWF, MALDONADO M, YAHIEL G, LEYS SP. 2011. Glass sponge reefs as a silicon sink. *Marine Ecology Progress Series* 441:1–14.
- CIMINO G, DE GIULIO A, DE ROSA S, DE STEFANO S, PULITI R, MATTIA CA, MAZZARELLA L. 1985. Isolation and X-ray crystal structure of a novel 8-oxopurine compound from a marine sponge. *Journal of Natural Products*. 48:523–528.
- CIMINO G, MORRONE R, SODANO G. 1982. New diterpenes from *Spongia officinalis*. *Tetrahedron Letters* 23:4139–4142.
- CIRANO M, LESSA GC. 2007. Oceanographic characteristics of Baía de Todos os Santos, Brazil. *Revista Brasileira de Geofísica* 25:363–387.
- CLINE MS, SMOOT M, CERAMI E, KUCHINSKY A, LANDYS N *et al.* 2007 Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nature Protocols* 2:2366–2382.
- COLEMAN AW. 2007. Pan-eukariote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucleic Acids Research* 35:3322–3329.
- COLLETTE BB, RÜTZLER K. 1977. Reef fishes over sponge bottoms off the mouth of the Amazon river. 3rd International Coral Reef Symposium 1:305–310.
- COLLIN R, DÍAZ MC, NORENBURG J, ROCHA RM, SÁNCHEZ JA, SCHULZE A, SCHWARTZ M, VALDÉS A. 2005. Photographic identification guide to some common marine invertebrates of Bocas Del Toro, Panama. *Caribbean Journal of Science* 41:638–707.

CORDANI U. 1970. Idade do vulcanismo no Oceano Atlântico Sul. Boletim do Instituto de Geociências e Astronomia da Universidade de São Paulo 1:9–75.

COSTA-LOTUFO LV, CARNEVALE NETO F, TRINDADE SILVA AEET, SILVA R, GUEIROS G *et al.* 2018. Chemical profiling of two congeneric sea mat corals along the Brazilian coast: adaptive and functional patterns. Chemical Communications. DOI: 10.1039/C7CC08411K.

COSTANTINO V, FATTORUSSO E, IMPERATORE C, MANGONI A, TETA R. 2008. Terpioside from the marine sponge *Terpios* sp., the first glycosphingolipid having an L-fucofuranose unit. European Journal of the Organic Chemistry 12:2130–2134.

COSTANTINO V, FATTORUSSO E, MANGONI A, TETA R, PANZA E, IANARO A. 2010. Terpioside B, a difucosyl GSL from the marine sponge *Terpios* sp. is a potent inhibitor of NO release. Bioorganic & Medicinal Chemistry 18:5310–5315.

CREED JC, PIRES DO, FIGUEIREDO MAO. 2007. Biodiversidade Marinha da Baía da Ilha Grande. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 416 p.

CROCKER LA, REISWIG HM. 1981. Host specificity in sponge-encrusting Zoanthidea (Anthozoa: Zoantharia) of Barbados, West Indies. Marine Biology 65:231–236.

CRUZ T. 2002. Esponjas marinas de Canarias. Banco de datos de biodiversidad de Canarias. Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente, Gobierno de Canarias, Santa Cruz de Tenerife, 258 p.

DA SILVA RR, DORRESTEIN PC, QUINN RA. 2015. Illuminating the ‘dark matter’ in metabolomics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 112:12549–12550.

DAI J, SORRIBAS A, YOSHIDA WY, KELLY M, WILLIAMS PG. 2010. Topsentinols, 24-isopropyl steroids from the marine sponge *Topsentia* sp. Journal of Natural Products 73:1597–1600.

DAYRAT B. 2005. Towards integrative taxonomy. Biological Journal of the Linnean Society 85:407–415.

DE GOEIJ JM, VAN DER BERG H, VAN OOSTVEEN MM, EPPING EHG, VAN DUYL FC. 2008. Major bulk dissolved organic carbon (DOC) removal by encrusting coral reef cavity sponges. Marine Ecology Progress Series 357:139–151.

DE LAUBENFELS MW. 1934. New sponges from the Puerto Rican deep. Smithsonian Miscellaneous Collections. 91:1–28.

DE LAUBENFELS MW. 1936. A Discussion of the Sponge Fauna of the Dry Tortugas in Particular and the West Indies in General, with Material for a Revision of the Families and Orders of the Porifera. Carnegie Institute of Washington Publication. 467:225 p.

DE LAUBENFELS MW. 1954. The Sponges of the West-Central Pacific. Oregon State Monographs. Studies in Zoology. 7:1–306.

- DE LIVERA AM, BROWNE JB. 2014. 'metabolomics' R Package.
- DE PAULA TS, ZILBERBERG C, HAJDU E, LÔBO-HAJDU G. 2012. Morphology and molecules on opposite sides of the diversity gradient: Four cryptic species of the *Cliona celata* (Porifera, Demospongiae) complex in South America revealed by mitochondrial and nuclear markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62:529–541.
- DE PAULA TS. 2013. Filogenia molecular, evolução de características morfológicas, variabilidade populacional, biogeografia e metabolômica comparativa: rumo a uma biologia integrativa para o gênero *Mycale* Gray, 1867 (Porifera). Tese de Doutorado, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
- DE ROSA M, MINALE L, SODANO G. 1973. Metabolism in Porifera-II. Distribution of sterols. *Comparative Biochemistry and Physiology* 46B:823–837.
- DE VOS L, RÜTZLER K, BOURY-ESNAULT N, DONADEY C, VACELET J. 1991. Atlas of sponge morphology. Smithsonian Institution Press, 117 p.
- DEGNAN BM, LEYS SP, LARROUX C. 2005. Sponge development and antiquity of animal pattern formation. *Integrative and Comparative Biology* 45:335–341.
- DELSETH C, TOLELA L, SCHEUER PJ, WELLS RJ, DJERASSI C. 1979. Minor and trace sterols. XI. Two new sterols from the Pacific sponges *Terpios zeteki* and *Dysidea herbacea*. *Helvetica Chimica Acta* 62:101–109. DOI: 10.1002/hlca.19790620115.
- DEMARQUE DP, CROTTI AEM, VESSECCHI R, LOPES JLC, LOPES NP. 2016. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Natural Product Reports* 33:367–524.
- DENNIS EA, BROWN HA, DEEMS RA, GLASS CK, MERRILL AH et al. (2005) The LIPID MAPS approach to lipidomics. In: Feng L, Prestwich GD (Eds.) *Functional Lipidomics*, CRC/Taylor and Francis, Boca Raton, FL, p. 1–15.
- DÍAZ MC, POMPONI AS, VAN SOEST RWM. 1993. A systematic revision of the Central West Atlantic Halichondrida (Demospongiae, Porifera). Part III. Description of valid species. *Scientia Marina* 57:283–306.
- DÍAZ MC, RÜTZLER K. 2001. Sponges: An essential component of Caribbean coral reefs. *Bulletin of Marine Science* 69:535–546.
- DÍAZ MC, VAN SOEST RWM, POMPONI AS. 1991. A systematic revision of the Central-Atlantic Halichondrida (Demospongiae, Porifera) Part I: Evaluation of characters and diagnosis of genera. In: Reitner J, Keupp H (Eds.) *Proceedings, International Conference on Fossil and recent sponges*, pp. 134–149.
- DÍAZ-MARRERO AR, BRITO I, CUETO M, SAN-MARTÍN A, DARIAS J. 2004. Suberitane network, a taxonomical marker for Antarctic sponges of the genus *Suberites*? Novel sesterterpenes from *Suberites caminatus*. *Tetrahedron Letters* 45:4707–4710.

- DÍAZ-MARRERO AR, BRITO I, DORTA E, CUETO M, SAN-MARTÍN A, DARIAS J. 2003. Caminatal, an aldehyde sesterterpene with a novel carbon skeleton from the Antarctic sponge *Suberites caminatus*. *Tetrahedron Letters* 44:5939–5942.
- DINIZ MTM, OLIVEIRA GP. 2016. Proposta de compartimentação em mesoescala para o litoral do Nordeste brasileiro. *Revista Brasileira de Geomorfologia* 17:565–590.
- DJERASSI C, LAM WK. 1991. Phospholipid studies of marine organisms. 25. Sponge phospholipids. *Accounts of Chemical Research* 24:69–75.
- DOCKSTADER K, NUNLEY K, KARIMPOUR-FARD A, MEDWAY A, NELSON P, PORT JD, LIGGETT SB, BRISTOW MR, SUCHAROV CC. 2011. Temporal analysis of mRNA and miRNA expression in transgenic mice overexpressing Arg- and Gly389 polymorphic variants of the β 1- adrenergic receptor. *Physiological Genomics* 43:1294–1306.
- DOHRMANN M, JANUSSEN D, REITNER J, COLLINS AG, WÖRHEIDE G. 2008. Phylogeny and evolution of glass sponges (Porifera, Hexactinellida). *Systematic Biology* 57: 388–405.
- DOMINGO-ALMENARA X, MONTENEGRO-BURKE RJ, GUIJAS C, MAJUMDER ELW, BENTON PH, SIUZDAK G. 2019. Autonomous METLIN-guided in-source fragment detection increases annotation confidence in untargeted metabolomics. *Analytical Chemistry* 91:3246–3253.
- DONA AC, KYRIAKIDES M, SCOTT F, SHEPHARD EA, VARSHAVI D, VESELKOV K, EVERETT JR. 2016. A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabonomics/metabolomics experiments. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 14:135–153.
- DONMEZ G, WANG D, COHEN DE, GUARENTE L. 2010. SIRT1 suppresses beta-amyloid production by activating the alpha-secretase gene ADAM10. *Cell* 142:320–332. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.020.
- DUCHASSAING P, MICHELOTTI G. 1864. Spongiaires de la Mer Caraïbe. *Natuurkundige verhandelingen van de Hollandsche maatschappij der wetenschappen te Haarlem*. 21:1–124.
- DUCKWORTH AR, POMPONI SA. 2005. Relative importance of bacteria, microalgae and yeast for growth of the sponge *Halichondria melanadocia* (de Laubenfels, 1936): A laboratory study. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 323:151–159.
- DÜHRKOP K, FLEISCHAUER M, LUDWIG M, AKSENOV AA, MELNIK AV, MEUSEL M, DORRESTEIN PC, ROUSU J, BÖCKER S. 2019. SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nature Methods*. DOI: 10.1038/s41592-019-0344-8.
- ECHIGO S, CASTELLANOS L, DUQUE C, UEKUSA H, HARA N, FUJIMOTO Y. 2011. C-24 Stereochemistry of Marine Sterols: (22E)-24-Ethyl-24-methylcholesta-5,22-dien-3b-ol and 24-Ethyl-24-methylcholest-5-en-3b-ol. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 22:997–1004.

ECHIGO S, HARA N, CALDERON GJ, DUQUE C, FUJIMOTO Y. 2006. C-24 Stereochemistry of marine sterols: (22E)-24-(isopropenyl)-22-dehydrocholesterol and 24-Isopropenylcholesterol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 54:1473–1477.

ERESKOVSKY AV, LAVROV DV, WILLENZ P. 2014. Five new species of Homoscleromorpha (Porifera) from the Caribbean Sea and re-description of *Plakina jamaicensis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 94:285–307.

ERESKOVSKY AV. 2004. Comparative embryology of sponges and its application for Poriferan phylogeny. *Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici Università di Genova* 68:301–318.

ERESKOVSKY AV. 2010. The comparative embryology of sponges. Saint-Petersburg University Press.

ERPENBECK D, BREEUWER JAJ, PARRA FJ, VAN SOEST RWM. 2006a. Speculation with spiculation? - Three independent gene fragments and biochemical characters *versus* morphology in demosponge higher classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38, 293–305.

ERPENBECK D, BREEUWER JAJ, VAN SOEST RWM. 2005. Implications from a 28S rRNA gene fragment for the phylogenetic relationships of halichondrid sponges (Porifera: Demospongiae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 43:93–99.

ERPENBECK D, DURAN S, RÜTZLER K, PAUL V, HOOPER JNA, WÖRHEIDE G. 2007. Towards a DNA taxonomy of Caribbean demosponges: a gene tree reconstructed from partial mitochondrial CO1 gene sequences supports previous rDNA phylogenies and provides a new perspective on the systematics of Demospongiae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 87:1563–1570.

ERPENBECK D, EKINS M, ENGHUBER N, HOOPER JNA, LEHNERT H *et al.* 2016. Nothing in (sponge) biology makes sense – except when based on holotypes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 96:305–311. DOI:10.1017/S0025315415000521.

ERPENBECK D, HALL K, ALVAREZ B, BÜTTNER G, SACHER K *et al.* 2012. The phylogeny of halichondrid demosponges: past and present re-visited with DNA-barcoding data. *Organisms, Diversity & Evolution*. 12:57–70.

ERPENBECK D, HOOPER JNA, WÖRHEIDE G. 2006b. CO1 phylogenies in diploblasts and the ‘Barcoding of Life’ - are we sequencing a suboptimal partition? *Molecular Ecology Notes* 6:550–553.

ERPENBECK D, VAN SOEST RWM. 2002. Family Halichondriidae. In: Hooper JNA, Van Soest RWM (Eds.) *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*. ©Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. p. 787–815.

ERPENBECK D, VAN SOEST RWM. 2007. Status and Perspective of Sponge Chemosystematics. *Marine Biotechnology*. 9:2–19.

ERPENBECK D, WÖRHEIDE G. 2007. On the molecular phylogeny of sponges (Porifera). *Zootaxa*. 1668:107–126.

FAILLER P, PÈTRE E, BINET T, MARÉCHAL JP. 2015. Valuation of marine and coastal ecosystem services as a tool for conservation: The case of Martinique in the Caribbean. *Ecosystem Services*. DOI: 10.1016/j.ecoser.2014.10.011i.

FAO. 2017. Sponges and their role in the marine environment.

FEDOREEV AS, PROKOF'EVA NG, DENISENKO VA, RABACHUK NM. 1988. Cytotoxic activity of aaptamines from suberitid marine sponges. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 22:615–618.

FERRETTI C, VACCA S, DE CIUCIS C, MARENGO B, DUCKWORTH AR *et al.* 2009. Growth dynamics and bioactivity variation of the Mediterranean demosponges *Agelas oroides* (Agelasida, Agelasidae) and *Petrosia ficiformis* (Haplosclerida, Petrosiidae). *Marine Ecology - an Evolutionary Perspective* 30:327–336.

FEUDA R, DORHMANN M, PETT W, PHILIPPEH, ROTA-STABELLI O *et al.* 2017. Improved modeling of compositional heterogeneity supports sponges as sister to all other animals. *Current Biology* 27:3864–3870.

FIEHN O. 2002. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48:155–171.

FINKELSTEIN M, GOLD H. 1959. Toxicology of the citric acid esters: Tributyl citrate, acetyl tributyl citrate, triethyl citrate, and acetyl triethyl citrate. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1, 283-298. doi: 10.1016/0041-008x(59)90113-9.

FIGLIORE CL, BAKER DM, LESSER MP. 2013. Nitrogen biogeochemistry in the Caribbean sponge, *Xestospongia muta*: A source or sink of dissolved inorganic nitrogen? *Plos One* 8:e72961. DOI: 10.1371/journal.pone.0072961.

FLATT PM, GAUTSCHI JT, THACKER RW, MUSAFIJA-GIRT M, CREWS P, GERWICK WH. 2005. Identification of the cellular site of polychlorinated peptide biosynthesis in the marine sponge *Dysidea* (*Lamellodysidea*) *herbacea* and symbiotic cyanobacterium *Oscillatoria spongeliae* by CARD-FISH analysis. *Marine Biology* 147:761–774.

FORTUNATO HFM. 2015. Biodiversidade e dinâmica estrutural de assembléias de esponjas marinhas (Filo Porifera) da Ilha Grande e cercanias, Rio de Janeiro, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

FREITAS MC, VIEIRA EHSF, ARAÚJO ME. 2009. Impact of the construction of the harbor at Pecém (Ceará, Brazil) upon reef fish communities in tide pools. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 52:187–195.

FROMONT J. 1998. Revision of the marine sponge genus *Caulospongia* Saville Kent, 1871 (Demospongiae: Hadromerida). Part 1. Morphological and skeletal characteristics. *Records of the Western Australian Museum* 19:65–89.

- FUSETANI N, MATSUNAGA S, KONOSU S. 1981. Bioactive marine metabolites II: Halistanol sulfate, an antimicrobial novel steroid from the marine sponge *Halichondria* cf. *moorei* Bergquist. *Tetrahedron Letters* 22:1985–1988.
- FUSETANI N, TAKAHASHI M, MATSUNAGA S. 1994. Topsentiasterol sulfates, antimicrobial sterol sulfates possessing novel side chains, from a marine sponge, *Topsentia* sp. *Tetrahedron* 50:7765–7770.
- GALLON ME, MONGE M, CASOTI R, DA COSTA FB, SEMIR J, GOBBO-NETO L. 2018. Metabolomic analysis applied to chemosystematics and evolution of megadiverse Brazilian Vernonieae (Asteraceae). *Phytochemistry* 150:93–105.
- GAO S, WANG Q, HUANG L, LUM L, CHEN C. 2010. Chemical and biological studies of nakiterpiosin and nakiterpiosinone. *Journal of the American Chemical Society* 132:371–383.
- GASTALDI M, DE PAULA TS, NARVARTE MA, LÔBO-HAJDU G, HAJDU E. 2018. Marine sponges (Porifera) from the Bahía San Antonio (North Patagonian Gulfs, Argentina), with additions to the phylogeography of the widely distributed *Cliona* aff. *celata* and *Hymeniacidon perlevis*, and the description of two new species. *Marine Biology Research*. DOI: 10.1080/17451000.2018.1506136.
- GAZAVE E, LAPÉBIE P, ERESKOVSKY AV, VACELET J, RENARD E, *et al.* 2012. No longer Demospongiae: Homoscleromorpha formal nomination as a fourth class of Porifera. *Hydrobiologia* 687:3–10.
- GENIN E, WIELGOSZ-COLLIN G, NJINKOUÉ JM, VELOSAOTSY NE, KORNPORST JM *et al.* 2008. New trends in phospholipid class composition of marine sponges. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 150:427–431.
- GENTA-JOUE G, THOMAS OP. 2012. Sponge chemical diversity: from biosynthetic pathways to ecological roles. *Advances in Marine Biology* 62:183-230. DOI: 10.1016/B978-0-12-394283-8.00004-7.
- GERASIMOVA E, ERPENBECK D, PLOTKIN A. 2008. *Vosmaeria* Fristedt, 1885 (Porifera, Demospongiae, Halichondriidae): revision of species, phylogenetic reconstruction and evidence for split. *Zootaxa* 1694:1–37.
- GIAM CS, ATLAS E, CHART HS, NEFF GS. 1980. Phthalate ester plasticizers, PCB, DDT residues in the Gulf of Mexico atmosphere. *Atmospheric Environment* 14:65-69.
- GIBSON G, MUSE SV. 2004. *A Primer of Genome Science*, 2nd Edition, Sinauer Associates Inc. p. 378.
- GODEFROY N, LE GOFF E, MARTINAND-MARI C, BELKHIR K, VACELET J, BAGHDIGUIAN S. 2019. Sponge digestive system diversity and evolution: filter feeding to carnivory. *Cell and Tissue Research* 377:341-351.
- GOEIJ JM DE, VAN DER BERG H, VAN OOSTVEEN MM, EPPING EH, VAN DUYL FC. 2008. Major bulk dissolved organic carbon (DOC) removal by encrusting coral reef cavity sponges. *Marine Ecology Progress Series* 357:139–151.

GOUDIE L, NORMAN M, FINN J. 2013. Sponges. Museum Victoria. p. 135.

GRAJALES A, AGUILAR C, SÁNCHEZ JA. 2007. Phylogenetic reconstruction using secondary structures of Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2, rDNA): finding the molecular and morphological gap in Caribbean gorgonian corals. BMC Evolutionary Biology. DOI: 10.1186/1471-2148-7-90.

GRAY JE. 1872. Notes on the classification of the sponges. Annals and Magazine of Natural History. 4: 442-461.

GREFF 2016 Métabolomique, effets biologiques et caractère invasif de la macroalgue *Asparagopsis taxiformis*. Tese de Doutorado, Aix-Marseille Université.

GREFF S, ZUBIA M, PAYRI C, THOMAS OP, PEREZ T. 2017. Chemogeography of the macroalgae *Asparagopsis*: metabolomics, bioactivity, and relation to invasiveness. Metabolomics. DOI: 10.1007/s11306-017-1169-z.

GUIDA VG (1976) Sponge predation in the oyster reef community as demonstrated with *Cliona celata* Grant. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 25:109-122.

GUNASEKERA SP, SENNETT SH, KELLY-BORGES M, BRYANT RW. 1994. Ophirapstanol trisulfate, a new biologically active steroid sulfate from the deep water marine sponge *Topsentia ophiraphidites*. Journal of Natural Products 57:1751-1754.

GUTEKUNST V, MÜLLER AU, POHL T, BRÜMMER F, MALIK H *et al.* 2018. A new fistulose demosponge species from the Persian Gulf. Zootaxa. DOI: 10.11646/zootaxa.4450.5.3.

HACKSTADT A, MESS AN. 2009. Filtering for increased power for microarray data analysis BMC Bioinformatics. DOI: 10.1186/1471-2105-10-11.

HAJDU E, DE PAULA TS, REDMOND NE, COSME B, COLLINS AG, LÔBO-HAJDU G. 2013. Mycalina: Another crack in the Poecilosclerida framework. Integrative and Comparative Biology 53:462–472.

HAJDU E, PEIXINHO S, FERNANDEZ J. 2011. Esponjas marinhas da Bahia: Guia de campo e laboratório. Museu Nacional, Série Livros 45. p. 276.

HARTMAN WD. 1982. Porifera. In: Parker, S.P. (Ed.), Synopsis and Classification of Living Organisms. McGraw-Hill, New York, 640–666.

HASELEY SR, VERMEER HJ, KAMERLING JP, VLIEGENTHART JFG. 2001. Carbohydrate self-recognition mediates marine sponge cellular adhesion. Proceedings of the National Academy of Sciences 98:9419–9424.

HATJE V, DE ANDRADE JB. 2009. Baía de Todos os Santos: Aspectos oceanográficos. EDUFBA. p.306.

HAUSER R, CALAFAT AM. 2005. Education, phthalates and human health. Occupational and Environmental Medicine 62:806-818.

HAY, M. E. 1996. Marine chemical ecology: What's known and what's next? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 200:103–134.

HENTSCHEL U, USHER KM, TAYLOR MW. 2006. Marine sponges as microbial fermenters. *Microbiology Ecology* 55:167–177.

HILDEMAN WH, JOHNSTON I, JOKIEL P. 1979. Immuno competence in the lowest Metazoan phylum: Transplantation immunity in sponges. *Science* 204:420–422.

HILL MS, LOPEZ NA, YOUNG KA. 2005. Anti-predator defenses in western North Atlantic sponges with evidence of enhanced defense through interactions between spicules and chemicals. *Marine Ecology Progress Series* 291:93–102.

HILLIS DM, MABLE BK, MORITZ C. 1996. Applications of Molecular Systematics. In: Hillis DM, Moritz C (Eds.) *Molecular Systematics*. © Sinauer Associates, Inc, Massachusetts U.S.A. p. 515–543.

HILLIS DM, WIENS JJ. 2000. Molecules versus morphology in systematics: conflicts, artifacts, and misconceptions. In: Wiens JJ (Ed.) *Phylogenetic Analysis in Morphological Data*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, p. 1–19.

HIRATA Y, UEMURA D. 1986. Halichondrins - antitumor polyether macrolides from a marine sponge. *Pure & Applied Chemistry* 58:701–710.

HOOVER JNA. 1991. Revision of the family Raspailiidae (Porifera: Demospongiae) with description of Australian species. *Invertebrate Taxonomy*, 5:1179–1418.

HOOVER JNA, VAN SOEST RWM. 2002a. *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*. ©Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

HOOVER JNA, VAN SOEST RWM. 2002b. Order Hadromerida Topsent, 1894. In: Hoover JNA, Van Soest RWM (Eds.) *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*. ©Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. p. 169–172.

HOOVER JNA, COOK SD, HOBBS LJ, KENNEDY JA. 1997. Australian Halichondriidae (Porifera: Demospongiae): I Species from the Beagle Gulf. In: Hanley JR, Caswell G, Megirian D, Larson HK (Eds.) *Proceedings of the Sixth International Marine Biological Workshop. The marine flora and fauna of Darwin Harbour, Northern Territory, Australia*. p 1–65.

HORAI H, ARITA M, KANAYA S, NIHEI Y, IKEDA T *et al.* 2010. MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of Mass Spectrometry* 45:703–714.

HOWARD PH, BANERJEE S, ROBILLARD KH. 1985. Measurement of water solubilities, octanol/water partition coefficients and vapor pressures of commercial phthalate esters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 4:653–661.

IDAN T, SHEFER S, FELDSTEIN T, YAHIEL R, HUCHON D, ILAN M. 2018. Shedding light on an East-Mediterranean mesophotic sponge ground community and the regional sponge fauna. *Mediterranean Marine Science* 19:84–106.

IÓCA LP, NICACIO KJ, BERLINCK RGS. 2018. Natural products from marine invertebrates and microorganisms in Brazil between 2004 and 2017: Still the challenges, more rewards. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 29:998–1031.

ISHIYAMA H, HASHIMOTO A, FROMONT J, HOSHINO Y, MIKAMIC Y, KOBAYASHI J. 2005. Halichonadins A–D, new sesquiterpenoids from a sponge *Halichondria* sp. *Tetrahedron* 61:1101–1105.

IVANISEVIC 2011 Métabolisme secondaire des éponges Homoscleromorpha: Diversité et fluctuation de son expression en fonction des facteurs biotiques et abiotiques. Tese de Doutorado, Aix-Marseille Université, França.

IKELE CB, MGBENKA BO, OLUAH NS. 2011. Histopathological effects of diethyl phthalate on *Clarias gariepinus* juveniles. *Animal Research International* 8:1431–1438.

IVANISEVIC J, THOMAS OP, LEJEUSNE C, CHEVALDONNÉ P, PÉREZ T. 2011a. Metabolic fingerprinting as an indicator of biodiversity: towards understanding inter-specific relationships among Homoscleromorpha sponges. *Metabolomics* 7:289–304.

IVANISEVIC J, THOMAS OP, PEDEL L, PENÉZ N, ERESKOVSKY AV, CULIOLI G, PÉREZ T. 2011b. Biochemical trade-offs: evidence for ecologically linked secondary metabolism of the sponge *Oscarella balibaloï*. *Plos One*. DOI:10.1371/journal.pone.0028059

IWASAKI Y, SAWADA T, HATAYAMA K, OHYAGI A, TSUKUDA Y, NAMEKAWA K, ITO R, SAITO K, NAKAZAWA H. 2012. Separation technique for the determination of highly polar metabolites in biological samples. *Metabolites* 2:496–515. DOI: 10.3390/metabo2030496.

JENNER RA. 2004. When molecules and morphology Clash: reconciling conflicting phylogenies of the Metazoa by considering secondary character loss. *Evolution & Development* 6:372–378.

JIMÉNEZ E, RIBES M. 2007. Sponges as a source of dissolved inorganic nitrogen: Nitrification mediated by temperate sponges. *Limnology and Oceanography* 52:948–958.

JOHNSON BT. 2005. Microtox® acute toxicity test. In: Blaise C, Féraud J-F (Eds.) *Small scale Freshwater Toxicity Investigations*. Springer, Netherlands. p. 69–105.

JOHNSTON G. 1842. *A History of British sponges and Lithophytes*. Lizars, Universidade de Chicago, p. 264.

KARLSSON TM, VETHAAK AD, ALMROTH BC, ARIESE F, VAN VELZEN M, HASSELLÖV M, LESLIE HA. 2017. Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: Method development and microplastic accumulation. *Marine Pollution Bulletin*. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2017.06.081.

- KANAZAWA S, FUSETANI N, MATSUNAGA S. 1992. Halistanol sulfates A-E, new steroid sulfates, from a marine sponge, *Epipolasis* sp. *Tetrahedron* 48:5467–5472.
- KANAZAWA S, FUSETANI N, MATSUNAGA S. 1993. Cylindramide: cytotoxic tetramic acid lactam from the marine sponge *Halichondria cylindroto* Tanita & Hoshino. *Tetrahedron Letters* 34:1065–1068.
- KATAJAMAA M, MIETTINEN J, ORESIC M. 2006. MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics* 22:634–636.
- KATOH K, STANDLEY DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30:772–780.
- KAZLAUSKAS R, LIDGARD O, WELLS RJ. 1977. A novel hexachlorometabolite from the sponge *Dysidea herbacea*. *Tetrahedron Letters* 18:3183–3186.
- KELL DB. 2004. Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Current Opinion in Microbiology* 7:296–307.
- KELLY-BORGES M, BERGQUIST PR. 1994. A redescription of *Aaptos aaptos* with descriptions of new species of *Aaptos* (Hadromerida: Suberitidae) from northern New Zealand. *Journal of Zoology* 234:301–323.
- KERNAN MR, FAULKNER JD. 1987. Halichondramide, an antifungal macrolide from the sponge *Halichondria* sp. *Tetrahedron Letters* 28:2809–2812.
- KIM S, CHEN J, CHENG T, GINDULYTE A, HE J *et al.* 2019. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Research* 47:D1102–1109. DOI: 10.1093/nar/gky1033.
- KJER KM. 1995. Use of rRNA secondary structure in phylogenetic studies to identify homologous positions: an example of alignment and data presentation from the frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4:314–330.
- KLAUTAU M, AZEVEDO F, CÓNDOR-LUJÁN B, RAPP HT, COLLINS A, RUSSO CAM. 2013. A molecular phylogeny for the Order Clathrinida rekindles and refines Haeckel's taxonomic proposal for calcareous sponges. *Integrative and Comparative Biology* 53:447–461.
- KNAPP IS, FORSMAN ZH, WILLIAMS GJ, TOONEN RJ, BELL JJ. 2015. Cryptic species obscure introduction pathway of the blue Caribbean sponge (*Haliclona* (*Soestella*) *caerulea*), (order: Haplosclerida) to Palmyra Atoll, Central Pacific. *PeerJ* 3:e1170. DOI: 10.7717/peerj.1170.
- KOBAYASHI J, INABA K, TSUDA M. 1997. Tauroacidins A and B, new bromopyrrole alkaloids possessing a taurine residue from *Hymeniacidon* sponge. *Tetrahedron* 53:16679–16682.

- KOBAYASHI J, KANDA F, ISHIBASHI M, SHIGEMORI H. 1991. Manzacidins A-C, novel tetrahydropyrimidine alkaloids from the Okinawan marine sponge *Hymeniacidon* sp. *The Journal of Organic Chemistry* 56:4574-4576.
- KOBAYASHI J, OHIZUMI Y, NAKAMURA H, HIRATA Y. 1986. A novel antagonist of serotonergic receptors, hymenidin, isolated from the Okinawan marine sponge *Hymeniacidon* sp. *Experientia* 42:1176-1177.
- KODAMA K, HIGUCHI R, MIYAMOTO T, VAN SOEST RWM. 2003. (-)Axinyssene: A novel cytotoxic diterpene from a Japanese marine sponge *Axinyssa* sp. *Organic Letters*, 5:169-171. DOI: 10.1021/ol027202f.
- KONG F, ANDERSEN RJ. 1993. Polymastiamides B-F, novel steroid/amino acid conjugates isolated from the Norwegian marine sponge *Polymastia boletiformis*. *The Journal of Organic Chemistry* 58:6924-6927.
- KORNPORST J-M. 2005. Substances naturelles d'origine marine. Tec & Doc Lavoisier. p. 1830.
- KOZAWA S, ISHIYAMA H, FROMONT J, KOBAYASHI J. 2008. Halichonadin E, a dimeric sesquiterpenoid from the sponge *Halichondria* sp. *Journal of Natural Products* 71:445-447.
- LAGE A. 2013. Taxonomia e distribuição de Halichondrida (Porifera, Demospongiae) da Baía de Camamu e adjacências. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Bahia.
- LAVILLE R, AMADE P, THOMAS OP. 2009. 3-Alkylpyridinium salts from Haplosclerida marine sponges: Isolation, structure elucidations, and biosynthetic considerations. *Pure and Applied Chemistry* 81:1033-1040.
- LAVROV DV, WANG X, KELLY M. 2008. Reconstructing ordinal relationships in the Demospongiae using mitochondrial genomic data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49:111-124.
- LEGRAND H, LENFANT P, SOTHERAN IS, FOSTER-SMITH RL, GALZIN R, MARÉCHAL JP. 2012. Mapping marine benthic habitats in Martinique (French West Indies). *Caribbean Journal of Science* 46:267-282.
- LEHNERT H, STONE RP. 2017. Two new species of Suberitida (Porifera, Heteroscleromorpha) from the Bering Sea. *Zootaxa*. DOI:10.11646/zootaxa.4338.3.9
- LERNER C, MOTHES B, CARRARO JL. 2005. Novos registros e ampliação de limites meridionais de distribuição de poríferos (Porifera, Demospongiae) no Atlântico sudoeste. *Revista Brasileira de Zoologia* 22:596-612.
- LESSA GC, BITTENCOURT ACSP, BRICHTA A, DOMINGUEZ JML. 2000. A reevaluation of the late quaternary sedimentation in Todos os Santos Bay (BA), Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 72:573-590.

- LÉVI C. 1951. L'oviparité chez les spongiaires. Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences 233:272–274.
- LÉVI C. 1952 Spongiaires de la cote du Senegal. Bulletin de l'Institut Français d'Afrique Noire 14: 34–59.
- LÉVI C. 1953. Sur une nouvelle classification des Démosponges. Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences, 236:853–855.
- LÉVI C. 1956 Étude des *Halisarca* de Roscoff: embryologie et systématique des démosponges. Archives de Zoologie Expérimentale et Générale 108:611–616.
- LÉVI C. 1973. Systématique de la classe des Demospongiaria (Démosponges). In: Brien P, Lévi C, Sarà M, Tuzet O, Vacelet J (Eds.) Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. III. Spongiaires Paris: Masson et Cie. p. 577–631.
- LEYS SP. 2015. Elements of a 'nervous system' in sponges. The Journal of Experimental Biology 218:581–591.
- LEYS S, DEGNAN BM. 2001. Cytological basis of photoresponsive behavior in a sponge larva. Biological Bulletin 201:323–338.
- LEYS SP, HILL A. 2012. The physiology and molecular biology of sponge tissues. In Advances in marine biology (Vol. 62, pp. 1-56). Academic Press.
- LEYS SP, RIESGO A. 2012. Epithelia, an evolutionary novelty of metazoans. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution 318(6): 438-447.
- LÔBO-HAJDU G, GUIMARÃES ACR, SALGADO A, LAMARÃO FRM, VIEIRALVES T *et al.* 2004. Intragenomic, intra and interspecific variation in the rDNA ITS of Porifera revealed by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici Università di Genova 68:413–423.
- LÔBO-HAJDU G, MANSURE JJ, SALGADO-MENDES AM, HAJDU E, MURICY G, ALBANO RM. 1999. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis can reveal intraspecific evolutionary patterns in Porifera. Memoirs of the Queensland Museum 44:317–328.
- LÔBO-HAJDU G, SALGADO A, GUIMARÃES ACR, LAMARÃO FRM, ALBANO RM *et al.* 2001. Use of PCR-linked single strand conformation polymorphism of rDNA ITS sequences to distinguish species of Porifera. In: IX COLACMAR, Congreso Latino-americano sobre Ciencias del Mar, San Andrés Isla, Colômbia: 158.
- LÔBO-HAJDU G. 2006. Dados morfológicos *versus* dados moleculares em sistemática: controvérsia ou congruência? In: Brito P, Figueiredo F, Gallo V, Silva HM (Eds.) Paleontologia de Vertebrados: Grandes Temas e Contribuições Científicas. Interciência, Brasil.

- LÓPEZ-LEGENTIL S, ERWIN PM, HENKEL TP, LOH TL, PAWLIK JR. 2010. Phenotypic plasticity in the Caribbean sponge *Callyspongia vaginalis* (Porifera: Haplosclerida). *Scientia Marina* 74:445–453.
- LÓPEZ-LEGENTIL S, PAWLIK JR. 2009. Genetic structure of the Caribbean giant barrel sponge *Xestospongia muta* using the I3-M11 partition of COI. *Coral Reefs* 28:157–165.
- LOUKACI A, MURICY G, BROUARD J-P, GUYOT M, VACELET J, BOURY-ESNAULT N. 2004. Chemical divergence between two sibling species of *Oscarella* (Porifera) from the Mediterranean Sea. *Biochemical Systematics and Ecology* 32:893–899.
- LUDEMAN DA, FARRAR N, RIESGO A, PAPS J, LEYS SP. 2014. Evolutionary origins of sensation in metazoans: functional evidence for a new sensory organ in sponges. *BMC Evolutionary Biology*. DOI: 10.1186/1471-2148-14-3.
- LUO X, LI F, HONG J, LEE CO, SIM CJ, IM KS, JUNG JH. 2006. Cytotoxic oxylipins from a marine sponge *Topsentiasp.* *Journal of Natural Products* 69:567–571.
- MAKARIEVA TN, SHUBINA LK, KALINOVSKII AI, STONIK VA, ELYAKOV GB. 1983. Steroids in Porifera. II Steroid derivatives from two sponges of the family Halichondriidae. Sokostraterol sulfate, a marine steroid with a new pattern of side chain alkylation. *Steroids* 42:267–281.
- MALDONADO M, CARMONA MC, URIZ MJ, CRUZADO A. 1999. Decline in Mesozoic reef-building sponges explained by silicon limitation. *Nature* 401:785–788.
- MALDONADO M. 2006. The ecology of the sponge larva. *Canadian Journal of Zoology* 84:175–194.
- MARINHO PR, SIMAS NK, KUSTER RM, DUARTE RS, FRACALANZZA SEL *et al.* 2012. Antibacterial activity and cytotoxicity analysis of halistanol trisulphate from marine sponge *Petromica citrina*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* DOI:10.1093/jac/dks229.
- MARTÍ R, FONTANA A, URIZ MJ, CIMINO G. 2003. Quantitative assessment of natural toxicity in sponges: Toxicity bioassay versus compound quantification. *Journal of Chemical Ecology* 29:1307–1318.
- MCCLINTOCK JB. 1987. Investigation of the relationships between invertebrate predation and biochemical composition, energy content, spicule armament, and toxicity of benthic sponges at McMurdo Sound, Antarctica. *Marine Biology* 94:479–487.
- MCCORMACK G, KELLY M. 2002. New indications of the phylogenetic affinity of *Spongosorites suberitoides* Díaz *et al.*, 1993 (Porifera, Demospongiae) as revealed by 28S ribosomal DNA. *Journal of Natural History* 36:1009–1021.
- MCKEE TC, CARDELLINA II JH, TISCHLER M, SNADER KM, BOYD MR. 1993. Ibisterol sulfate, a novel HIV-inhibitory sulfated sterol from the deep water sponge *Topsentia* sp. *Tetrahedron Letters* 34:389–392.

- MEHBUB MF, LEI J, FRANCO C, ZHANG W. 2014. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives. *Marine Drugs* 12:4539–4577.
- MELIS P, RIESGO A, TABOADA S, MANCONI R. 2016. Coping with brackish water: A new species of cave-dwelling *Protosuberites* (Porifera: Demospongiae: Suberitidae) from the Western Mediterranean and a first contribution to the phylogenetic relationships within the genus. *Zootaxa* 4208:349–364.
- MENEGOLA C, PEIXINHO S. 2017. Esponjas (Porifera: Calcarea, Homoscleromorpha e Demospongiae). In: Nunes JM, Matos MR (Orgs.) *Litoral Norte da Bahia: Caracterização Ambiental, Biodiversidade e Conservação*, EDUFBA. p. 215–234.
- MEYER CP. 2003. Molecular systematics of cowries (Gastropoda: Cypraeidae) and diversification patterns in the tropics. *Biological Journal of the Linnean Society* 79:401–459.
- MILOSLAVICH P, DÍAZ JM, KLEIN E, ALVARADO JJ, DÍAZ C. *et al.* 2010. Marine biodiversity in the Caribbean: Regional estimates and distribution patterns. *Plos One* 5:e11916. DOI: 10.1371/journal.pone.0011916.
- MILOSLAVICH P, KLEIN E, DÍAZ JM, HERNÁNDEZ CE, BIGATTI G. *et al.* 2011. Marine biodiversity in the Atlantic and Pacific coasts of South America: Knowledge and gaps. *PlosOne* 6:e14631. DOI:10.1371/journal.pone.0014631.
- MINALE L, SODANO G. 1974. Marine Sterols: 19-Nor-stanols from the sponge *Axinella polypoides*. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions* 1:1888–1892. DOI: 10.1039/P19740001888.
- MIOSO R, MARANTE FJT, BEZERRA RS, BORGES FVP, SANTOS BVO, LAGUNA IHB. 2017. Cytotoxic compounds derived from marine sponges. A review (2010–2012). *Molecules*. DOI: 10.3390/molecules22020208.
- MISHRA PD, WAHIDULLAH S, SOUZA LDD, KAMAT SY. 1997. Steroids from marine sponges *Suberites vestigium* and *Chrotella australensis*. *Indian Journal of Chemistry* 36B:719–721.
- MONTENEGRO-GONZÁLEZ J, ACOSTA A. 2010. Habitat preference of *Zoantharia* genera depends on host sponge morphology. *Scientiarum* 15:110–121.
- MORAES FC (2011) *Esponjas das ilhas oceânicas brasileiras*. Museu Nacional, Rio de Janeiro, p. 252.
- MORITZ C, HILLIS DM. 1996. Molecular Systematics: Context and Controversies. In: Hillis DM, Moritz C (Eds.) *Molecular Systematics*. ©Sinauer Associates, Inc, Massachusetts U.S.A. p. 515-543.
- MORROW C, CÁRDENAS P. 2015. Proposal for a revised classification of the Demospongiae (Porifera). *Frontiers in Zoology* 12:7. DOI: 10.1186/s12983-015-0099-8

- MORROW CC, REDMOND NE, PICTON BE, THACKER RW, COLLINS AG *et al.* 2013. Molecular phylogenies support homoplasy of multiple morphological characters used in the taxonomy of Heteroscleromorpha (Porifera: Demospongiae). *Integrative and Comparative Biology*. DOI: 10.1093/icb/ict065.
- MORROW CC; PICTON BE; ERPENBECK D; BOURY-ESNAULT N; MAGGS CA; ALLCOCK AI. 2012. Congruence between nuclear and mitochondrial genes in Demospongiae: A new hypothesis for relationships within the G4 clade (Porifera: Demospongiae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62:174-190.
- MOTHES B, CAMPOS MA, LERNER CB, FERREIRA-CORREIA MM. 2004. Esponjas (Demospongiae, Halichondrida) da costa do Maranhão, Brasil. *Iheringia* 94:149–154.
- MOTHES B, CAMPOS MA, LERNER CB, MENEGOLA C. 2006. Esponjas (Porifera, Demospongiae) da plataforma continental ao largo do estado do Amapá, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 23:667–677.
- MOURA RL; AMADO-FILHO GM; MORAES FC, BRASILEIRO OS, SALOMON OS. *et al.* (2016) An extensive reef system at the Amazon river mouth. *Science Advances* 2:e1501252.
- MUEHE D, SUCHAROV EC. 1981. Considerações sobre o transporte de sedimentos na plataforma continental nas proximidades das Ilhas Maricás, RJ. *Revista Brasileira de Geociências* 11:238-246.
- MUEHE D. 1998 O litoral brasileiro e sua compartimentação. In: Cunha SB, Guerra AJT (Orgs.) *Geomorfologia do Brasil*. Editora Bertrand Brasil S.A, Rio de Janeiro. p. 273-349.
- MUHAMMED S, ZHANG Z, PAVASE TR, GUO H. 2018. Long-term exposure of two plasticizers di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and acetyl tributyl citrate (ATBC): toxic effects on gonadal development and reproduction of zebrafish (“*Danio rerio*”). *Indian Journal of Geo Marine Sciences* 47:789-787.
- MÜLLER WEG, KLEMT M, THAKUR NL, SCHRÖDER HC, AIELLO A, D'ESPOSITO M, MENNA M, FATTORUSSO E. 2004. Molecular/chemical ecology in sponges: Evidence for an adaptive antibacterial response in *Suberites domuncula*. *Marine Biology* 144:19–29.
- MÜLLER WEG, MÜLLER IM. 2003. Origin of the Metazoan immune system: Identification of the molecules and their functions in sponges. *Integrative and Comparative Biology* 43:281–292.
- MURICY G, BOURY-ESNAULT N, BÉZAC C, VACELET J. 1996. Cytological evidence for cryptic species. *Canadian Journal of Zoology* 74:881–896.
- MURICY G, HAJDU E, MINERVINO JV, MADEIRA AV, PEIXINHO S. 2001. Systematic revision of the genus *Petromica* Topsent (Demospongiae: Halichondrida), with a new species from the southwestern Atlantic. *Hydrobiologia* 443:103–128.
- MURICY G, HAJDU E. 2006. Porifera Brasilis. Guia de identificação das esponjas mais comuns do Sudeste do Brasil. Museu Nacional, Rio de Janeiro. 104 pp.

- MURICY G. 2017. Porifera in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. PNUD. Acesso em 06-06-2017 <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/6>>.
- MURICY G, ESTEVES EL, MORAES F, SANTOS JP, SILVA SM, KLAUTAU M, LANNA E. 2008. Biodiversidade marinha da Bacia Potiguar – Porifera. Museu Nacional, Rio de Janeiro, p. 156.
- MURICY G, LOPES DA, HAJDU E CARVALHO MS, MORAES FC *et al.* 2011 Catalogue of Brazilian Porifera, Museu Nacional, Rio de Janeiro, p. 299.
- NAKAMURA F, KUDO N, TOMACHI Y, NAKATA A, TAKEMOTO M *et al.* 2018. Halistanol sulfates I and J, new SIRT1–3 inhibitory steroid sulfates from a marine sponge of the genus *Halichondria*. The Journal of Antibiotics 71:273–278.
- NAKAMURA H, KOBAYASHI J, HIRATA Y. 1987. Aaptamines. Novel benzo[de][1,6]naphthyridines from the Okinawan marine sponge *Aaptos aaptos*. Journal of the Chemical Society 1:173–176.
- NAKAMURA H, KOBAYASHI J, OHIZUMI Y, MITSUBISHI-KASEI, HIRATA Y. 1984. Novel bisabolene-type sesquiterpenoids with a conjugated diene isolated from the okinawan sea sponge *Theonella* cf. *swinhoei*. Tetrahedron Letters 25:5401–5404. DOI: 10.1016/s0040-4039(01)91295-x.
- NAKAMURA H, KOBAYASHI J, OHIZUMI Y. 1982. Isolation and structure of aaptamine a novel heteroaromatic substance possessing α -blocking activity from the sea sponge *Aaptos aaptos*. Tetrahedron Letters 23:5555–5558.
- NAKAO Y, KAWATSU S, OKAMOTO C, OKAMOTO M, MATSUMOTO Y. 2008. Ciliatamides A-C, bioactive lipopeptides from the deep-sea sponge *Aaptos ciliata*. Journal of Natural Products 71:469–472.
- NATORI T, KOEZUKA Y, HIGA T: 1993. Agelasphins, novel -galactosylceramides from the marine sponge *Agelas mauritanus*. Tetrahedron Letters 34:5591–5592.
- NICHOLS SA. 2005. An evaluation of support for order-level monophyly and interrelationships within the class Demospongiae using partial data from the large subunit rDNA and cytochrome oxidase subunit I. Molecular Phylogenetics and Evolution 34:81–96.
- NOTHIAS LF, NOTHIAS-ESPOSITO M, DA SILVA R, WANG M, PROTSYUK I *et al.* 2018. Bioactivity-based molecular networking for the discovery of drug leads in natural product bioassay-guided fractionation. Journal of Natural Products 81:758–767.
- NÚÑEZ-PONS L, CALCINAI B, GATES RD. 2017. Who's there? First morphological and DNA barcoding catalogue of the shallow Hawai'ian sponge fauna. Plos One 12:e0189357. DOI: 10.1371/journal.pone.0189357
- OH KB, MAR W, KIM S, KIM JY, LEE TH *et al.* 2006. Antimicrobial activity and cytotoxicity of bis(indole) alkaloids from the sponge *Spongosorites* sp. Biological and Pharmaceutical Bulletin 29:570-573.

- OHNO O; CHIBA T, TODOROKI S, YOSHIMURA H, MARU N *et al.* 2011. Halichonines A, B, and C, novel sesquiterpene alkaloids from the marine sponge *Halichondria okadai* Kadota. *Chemical Communications* 47:12453–12455.
- OLIVON F, ALLARD PM, KOVAL A, RIGHI D, GENTA-JOUE *Get al.* 2017a. Bioactive natural products prioritization using massive multi-informational molecular networks. *ACS Chemical Biology* 20:2644–2651. DOI: 10.1021/acscchembio.7b00413
- OLIVON F, GRELIER G, ROUSSI F, LITAUDON M, TOUBOUL D. 2017c. MZmine 2 data-preprocessing to enhance molecular networking reliability. *Analytical Chemistry* 89:7836–7840. DOI:10.1021/acs.analchem.7b01563
- OLIVON F, ROUSSI F, LITAUDON M, TOUBOUL D. 2017b. Optimized experimental workflow for tandem mass spectrometry molecular networking in metabolomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409:5767–5778. DOI: 10.1007/s00216-017-0523-3.
- PANCER Z, SKOROKHOD A, BLUMBACH B, MÜLLER WE. 1998. Multiple Ig-like featuring genes divergent within and among individuals of the marine sponge *Geodia cydonium*. *Gene* 207:227–233.
- PATEL K. 2010. Extraction de métabolites bioactifs d'éponges marines du Pacifique Sud. Tese de Doutorado, Museu National d'Histoire Naturelle, França.
- PATIL AD, FREYER AJ, REICHWEIN R, BEAN MF, FAUCETTE L. 1997. Two new nitrogenous sesquiterpenes from the sponge *Axinyssa aplysinoides*. *Journal of Natural Products* 60:507–510. DOI: 10.1021/np960652u.
- PATINY L, BOREL A. 2013. ChemCalc: a building block for tomorrow's chemical infrastructure. *Journal of Chemical Information and Modeling*. DOI: 10.1021/ci300563h.
- PATTI GJ, YANES O, SHRIVER L, COURADE JP, TAUTENHAHN R *et al.* 2012. Metabolomics implicates altered sphingolipids in chronic pain of neuropathic origin. *Nature Chemical Biology* 8:232–234. DOI:10.1038/nchembio.767.
- PAWLIK JR, LOH TL, MCMURRAY SE. 2018. A review of bottom-up vs. top-down control of sponges on Caribbean fore-reefs: what's old, what's new, and future directions. *PeerJ* 6:e4343. DOI: 10.7717/peerj.4343.
- PAWLIK JR. 2011. The chemical ecology of sponges on Caribbean reefs: Natural products shape natural systems. *Bioscience* 61:888–898.
- PERDICARIS S, VLACHOGIANNI T, VALAVANIDIS A. 2013. Bioactive natural substance from marine sponges: new developments and prospects for future pharmaceuticals. *Natural Products Chemistry & Research*. DOI: 10.4172/2329–6836.1000115
- PEREIRA RC. 2009. Ecologia Química Marinha. In: Pereira RC, Soares-Gomes A (Orgs.) *Biologia marinha, Interciência*, Rio de Janeiro. p. 473–504.

PÉREZ T, WAFO E, FOURT M, VACELET J. 2003. Marine sponges as biomonitor of polychlorobiphenyl contamination: Concentration and fate of 24 congeners. *Environmental Science & Technology* 37:2152–2158.

PÉREZ T, DÍAZ MC, RUIZ C, CÓNDR-LUJÁN B, KLAUTAU M *et al.* 2017. How a collaborative integrated taxonomic effort has trained new spongiologists and improved knowledge of Martinique Island (French Antilles, eastern Caribbean Sea) marine biodiversity. *Plos One*. 12:e0173859. DOI: 10.1371/journal.pone.0173859.

PÉREZ T, IVANISEVIC J, DUBOIS M, PEDEL L, THOMAS OP *et al.* 2011. *Oscarella balibalo*, a new sponge species (Homoscleromorpha: Plakinidae) from the Western Mediterranean Sea: cytological description, reproductive cycle and ecology. *Marine Ecology* 32:174–187.

PIEL J. 2004. Metabolites from symbiotic bacteria. *Natural Product Reports* 21:519–538.

PISERA A, LÉVI C. 2002. ‘Lithistid’ Demospongiae. In: Hooper JNA, Van Soest RWM (Eds.) *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*. ©Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. p. 299–301.

POLINI A, PAGLIARA S, CAMPOSEO A, CINGOLANI R, WANG X. 2012. Optical properties of in-vitro biomineralised silica. *Scientific Reports*. DOI: 10.1038/srep00607.

POMPONI AS. 2006. Biology of the Porifera: cell culture. *Canadian Journal of Zoology*. 84:167–174.

POMPONI AS, WRIGHT AE, DÍAZ MC, VAN SOEST RWM. 1991. A systematic revision of the Central Atlantic Halichondrida (Demospongiae, Porifera). Part II. Patterns of distribution of secondary metabolites. In: Reitner J, Keupp H (Eds.), *Proceedings, International Conference on Fossil and recent sponges*. p.134–149

PROKSCH P. 1994. Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge-feeding nudibranchs. *Toxicon* 32:639–655.

PROKSCH P, EDRADA RA, EBEL R. 2002. Drugs from the seas-current status and microbiological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59:125–134. DOI: 10.1007/s00253-002-1006-8.

QUINN RA, NOTHIAS LF, VINING O, MEEHAN M, ESQUENAZI E, DORRESTEIN PC. 2017. Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism, and precision medicine strategy. *Trends in Pharmacological Sciences* 38:143–154.

RAMPERSAD SN. 2014. ITS1, 5.8S and ITS2 secondary structure modeling for intra-specific differentiation among species of the *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato species complex. *Springerplus* 3:684. DOI: 10.1186/2193-1801-3-684.

REDMOND NE, MORROW CC, THACKER RW, DÍAZ MC, BOURY-ESNAULT N, *et al.* 2013. Phylogeny and systematics of Demospongiae in light of new small-subunit ribosomal DNA (18S) sequences. *Integrative and Comparative Biology* 53:388–415.

REISWIG HM. 2006. Classification and phylogeny of Hexactinellida (Porifera). Canadian Journal of Zoology 84:195–204.

REVEILLAUD J, ALLEWAERT C, PÉREZ T, VACELET J, BANAIGS B, VANREUSEL A. 2012. Relevance of an integrative approach for taxonomic revision in sponge taxa: case study of the shallow-water Atlanto-Mediterranean *Hexadella* species (Porifera: Ianthellidae: Verongida). Invertebrate Systematics 26:230–248

REVERTER M, TRILABAT MA, PÉREZ T, THOMAS OP. 2018. Metabolome variability for two Mediterranean sponge species of the genus *Haliclona*: specificity, time, and space. Metabolomics. DOI: 10.1007/s11306-018-1401-5.

RIBEIRO SM, BIANCO EM, ROGERS R, SOUZA CF, PEREIRA RC. 2012 Antifoulant property of the marine sponge *Hymeniacidon heliophila* (Demospongiae: Halichondrida). Brazilian Journal of Oceanography 60:255-257.

RIBEIRO SM, BIANCO EM, ROGERS R, TEIXEIRA VL, PEREIRA RC. 2010. Chemical defense of *Hymeniacidon heliophila* (Porifera: Halichondrida) against tropical predators. Brazilian Journal of Oceanography 58:315-321.

RIBEIRO SM, ROGERS R, RUBEM AC, DA GAMA BAP, MURICY G, PEREIRA RC. 2013. Antifouling activity of twelve demosponges from Brazil. Brazilian Journal of Biology 73:501–506.

RIDLEY SO, DENDY A. 1886. Preliminary report on the Monaxonida collected by H.M.S. "Challenger". The Annals and Magazine of Natural History 18:470–493.

ROBERTSON DR; CRAMER KL. 2014. Defining and dividing the greater Caribbean: insights from the biogeography of shorefishes. Plos One e102918:1–16.

ROBERTSON DR, PEREZ-ESPAÑA H, LARA EN, PUC ITZA F, SIMÕES N. 2016. The fishes of Cayo Arcas (Campeche Bank, Gulf of Mexico): an updated checklist. Zookeys 640:139–155.

RUDI A, KASHMAN Y. 1993. Aaptosine - A new cytotoxic 5,8-diazabenz[cd]azulene alkaloid from the Red Sea sponge *Aaptos aaptos*. Tetrahedron Letters 34:4683–4684.

RUIZ C. 2017. Apport de la Taxonomie intégrative à la compréhension des mécanismes à l'origine de la biodiversité des spongiaires dans les grottes sous-marines. Tese de Doutorado, Aix-Marseille Université, França.

RÜTZLER K. 1978. Sponges in coral reefs. In: Stoddard DR; Johannes RE (Eds.) Coral reefs: research methods. p. 21–35.

RÜTZLER K, SMITH KP. 1993. The genus *Terpios* (Suberitidae) and new species in the “*Lobiceps*” complex. Scientia Marina 57:381–393.

- RÜTZLER K, VAN SOEST RWM, PIAONTONI C. 2009. Sponges (Porifera) of the Gulf of México. In: Felder DL, Camp DK (Eds). Gulf of Mexico origin, waters and biota. Biodiversity, Texas A & M University Press, College Station, 1:285–313.
- SALANI S; LOTUFO TMC; HAJDU E. 2006. *Sigmaxinella cearense* sp. nov. from sandstone reefs off Fortaleza (Ceará State, Brazil) (Desmacellidae, Mycalina, Poecilosclerida, Demospongiae). Zootaxa 1369:43–53.
- SALGADO A, VIEIRALVES T, LAMARÃO FRM, ASSUMPÇÃO LLM, GOMESD *et al.* 2007. Field preservation and optimization of a DNA extraction method for Porifera. In: Custódio MR, Lôbo-Hajdu G, Hajdu E, Muricy G. (Eds.) Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. p. 555–560.
- SALVADOR MVS, SILVA MAM. 2002. Morphology and sedimentology of the Itaipú Embayment – Niterói / RJ. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 74:127–134.
- SÁNCHEZ JA, AGUILAR C, DORADO D, MANRIQUE N. 2007. Phenotypic plasticity and morphological integration in a marine modular invertebrate. BMC Evolutionary Biology. DOI: 10.1186/1471-2148-7-122.
- SANTACRUZ L, THOMAS OP, DUQUE C, PUYANA M, TELLO E. 2019. Comparative analyses of metabolomic fingerprints and cytotoxic activities of soft corals from the Colombian Caribbean. Marine Drugs. DOI: 10.3390/md17010037.
- SANTOS GG, NASCIMENTO E, PINHEIRO U. 2018. Halichondriidae Gray, 1867 from the Northeastern Brazil with description of a new species. Zootaxa 4379:556–566.
- SARMA NS; KRISHNA MSR; RAO SR. 2005. Sterol ring system oxidation pattern in marine sponges. Marine Drugs 3:84–111.
- SCHMIDT O. 1862. Die Spongien des adriatischen Meeres. (Wilhelm Engelmann: Leipzig): I-VIII, 1–88.
- SCHMIDT O. 1866. Vorläufiger Bericht über die Untersuchung der Bowerbank'schen Spongien. Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften in Wien. 53:147–151.
- SCHMIDT O. 1868. Die Spongien der Küste von Algier. Mit Nachträgen zu den Spongien des Adriatischen Meeres (Drittes Supplement). (Wilhelm Engelmann: Leipzig): I-IV, 1–44.
- SCHMIDT O. 1870. Grundzüge einer Spongien-Fauna des atlantischen Gebietes. (Wilhelm Engelmann: Leipzig): III-IV, 1–88
- SCHMIDT O. 1880. Zusatz zu obiger Abhandlung (von Keller). Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik. 18:280–282.
- SCHUSTER A, ERPENBECK D, PISERA A, HOOPER J, BRYCE M *et al.* 2015. Deceptive desmas: Molecular phylogenetics suggests a new classification and uncovers convergent evolution of Lithistid demosponges. Plos One. DOI: 10.1371/journal.pone.0116038.
- SEEHAUSEN O; BUTLIN RK; KELER I, WAGNER CE, BOUGHMAN JW *et al.* 2014. Genomics and the origin of species. Nature Reviews Genetics 15:176–192.

- SHAFFER MR, DAVY SM, BELL JJ. 2019. Hidden diversity in the genus *Tethya*: comparing molecular and morphological techniques for species identification. *Heredity* 122:354–369. DOI: 10.1038/s41437-018-0134-6.
- SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, BALIGA NS, WANG JT *et al.* 2003. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research* 13:2498–2504.
- SHEN YC, LIN TT, SHEU JH, DUH CY. 1999. Structures and cytotoxicity relationship of isoaptamine and aptamine derivatives. *Journal of Natural Products* 62:1264–1267.
- SHIN BA, KIM YR, LEE IS, SUNG CK, HONG J *et al.* 1999. Lyso-PAF analogues and lysophosphatidylcholines from the marine sponge *Spirastrella abata* as inhibitors of cholesterol biosynthesis. *Journal of Natural Products* 62:1554–1557.
- SHIN J, SEO Y, JEONG TS, KIM BM, KWON B-M. 1995. Suberitenones A and B: Sesterterpenoids of an unprecedented skeletal class from the Antarctic sponge *Suberites* sp. *The Journal of Organic Chemistry* 60: 7582–7588.
- SICA D, DE SIMONE F, RAMUNDO E, ZOLLO F. 1978. Sterols from some sponges. *Biochemical Systematics and Ecology* 6:77–79.
- SILVA AC, KRATZ JM, FARIAS FM, HENRIQUES AT, DOS SANTOS J *et al.* 2006. In vitro antiviral activity of marine sponges collected off Brazilian coast. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29:135–140.
- SILVA AG, FORTUNATO HFM, LÔBO-HAJDU G, FLEURY BG. 2017. Response of native marine sponges to invasive *Tubastraea* corals: a case study. *Marine Biology* 164:78–88.
- SIMION P, PHILIPPE H, BAURAIN D, JAGER M, RICHTER DJ *et al.* 2017. A large and consistent phylogenomic dataset supports sponges as the sister group to all other animals. *Current Biology* 27:958–967.
- SIPKEMA D, FRANSSSEN MCR, OSINGA R, TRAMPER J, WIJFFELS RH. 2005. Marine sponges as pharmacy. *Marine Biotechnology* 7:142–162.
- SMITH CA, O'MAILLE G, WANT EJ, QIN C, TRAUGER SA *et al.* 2005. METLIN: A metabolite mass spectral database. *Therapeutic Drug Monitoring* 27:747–751.
- SMITH CA, WANT EJ, O'MAILLE G, ABAGYAN R, SIUZDAK G. 2006. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry* 78:779–787.
- SOARES MO, PAIVA CC, FREITAS JEP, LOTUFO TMC. 2011. Gestão de unidades de conservação marinhas: o caso do Parque Estadual Marinho da Pedra da Risca do Meio, NE – Brasil. *Journal of Integrated Coastal Zone Management* 11:257–268.

- SOGABE S, HATLEBERG WL, KOCOT KM, SAY TE, STOUPIN D, ROPER KE, FERNANDEZ-VALVERDE SL, DEGNAN SM, DEGNAN BM. 2019. Pluripotency and the origin of animal multicellularity. *Nature* 570:519–522.
- SOLÉ-CAVA AM, THORPE JP. 1986. Genetic differentiation between morphotypes of the marine sponge *Suberites ficus* (Demospongiae: Hadromerida). *Marine Biology* 93:247–253.
- SOLÉ-CAVA AM, KELECOM A, KANNENGIESSER GJ. 1981. Study of some sponges (Porifera, Demospongiae) from the infralitoral of Guarapari, Espírito Santo, Brazil. *Iheringia* 60:125–150.
- SOLLAS WJ. 1885. A classification of the sponges. *Annals and Magazine of Natural History*. 5:395.
- SPALDING MD, FOX HE, ALLEN GR, DAVIDSON N, FERDAÑA ZA *et al.* 2007. Marine ecoregions of the World: A bioregionalization of coastal and shelf areas. *BioScience* 57:573–583.
- STAMATAKIS A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22:2688–2690. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl446.
- STEPHENS J. 1915. Sponges of the coast of Ireland. I The triaxonia and part of the tetraoxonida. *Fisheries, Ireland Scientific Investigations* 1914:1-43.
- TACHIBANA K; SCHEUER PJ, TSUKITANI Y, KIKUCHI H, VAN ENGEL D *et al.* 1981. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *Journal of the American Chemical Society* 103:2468–2472.
- TAVARÉ S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences, in some mathematical questions in Biology. IN: Miura RM (Ed.) *DNA Sequence Analysis*. Providence, R.I. American Mathematical Society. p. 57–86.
- TERNON E, PERINO E, MANCONI R, PRONZATO R, THOMAS O. 2017. How environmental factors affect the production of guanidine alkaloids by the mediterranean sponge *Crambe crambe*. *Marine Drugs*. DOI: 10.3390/md15060181.
- TERNON E, ZARATE L, CHENESSEAU S, CROUÉ J, DUMOLLARD R *et al.* 2016. Spherulization as a process for the exudation of chemical cues by the encrusting sponge *C. crambe*. *Scientific Reports* 6:29474. DOI: 10.1038/srep29474.
- TERUYA T, NAKAGAWA S, KOYAMA T, ARIMOTO H, KITA HM, UEMURA D. 2003. Nakiterpiosin, a novel cytotoxic C-nor-D-homosteroid from the Okinawan sponge *Terpios hoshinota*. *Tetrahedron Letters* 44: 5171–5173.
- TERUYA T, NAKAGAWA S, KOYAMA T, KITA HM, UEMURA D. 2004. Nakiterpiosin and nakiterpiosinone, novel cytotoxic C-nor-D-homosteroids from the Okinawan sponge *Terpios hoshinota*. *Tetrahedron* 60:6989–6993.

- TERUYA T, NAKAGAWA S, KOYAMA T, SUENAGA K, UEMURA D. 2002. Terpiodiene: A novel tricyclic alcohol from the Okinawan sponge *Terpios hoshinota*. *Chemistry Letters* 1:38–39.
- TESHIMA S, KANAZAWA A, HYODO S. 1980. 3 β -hidroximetil-24-methyl-A-nor-5- α -colestanol from the sponge. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* 46:1517–1520.
- THACKER RW, STARNES S. 2003. Host specificity of the symbiotic cyanobacterium *Oscillatoria spongeliae* in marine sponges, *Dysidea* spp. *Marine Biology* 142:643–648.
- THACKER RW, BECERRO MA, LUMBANG WA, PAUL VJ. 1998. Allelopathic interactions between sponges on a tropical reef. *Ecology* 79:1740–1750.
- THACKER RW, HILL AL, HILL MS, REDMOND NE, COLLINS AG *et al.* 2013. Nearly complete 28S rRNA gene sequences confirm new hypotheses of sponge evolution. *Integrative and Comparative Biology* 53:373–387.
- THOMAS PA. 1985. Demospongiae of the Gulf of Mannar and Palk Bay. In: James PSBR (Ed.). *Recent Advances in Marine Biology*. Today Tomorrow's Printers and Publishers, New Delhi. 205–365.
- THOMAS TRA, KAVLEKAR DP, LOKABHARATHI PA. 2010. Marine drugs from sponge-microbe association - A review. *Marine Drugs* 8:1417–1468.
- TOPSENT E. 1892. Contribution à l'étude des spongiaires de l'Atlantique Nord (Golfe de Gascogne, Terre-Neuve, Açores). Résultats des campagnes scientifiques accomplies par le Prince Albert I. Monaco 2:1–165.
- TOPSENT E. 1898. Eponges nouvelles des Açores. (Première serie). *Mémoires de la Société zoologique de France* 11:225–255.
- TOPSENT E. 1900. Étude monographique des spongiaires de France. III. Monaxonida (Hadromerina). *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*. 3:1–331.
- TOPSENT E. 1928. Spongiaires de l'Atlantique et de la Méditerranée provenant des croisières du Prince Albert I^{er} de Monaco. Résultats des campagnes scientifiques accomplies par le Prince Albert I. Monaco 74:1–376.
- TOPSENT E. 1934. Eponges observées dans les parages de Monaco. (Première partie). *Bulletin de l'Institut océanographique*, Monaco 650:1–42.
- TOPSENT E. 1938. Commentaires sur quelques genres d'Eponges marines. *Bulletin de l'Institut océanographique*, Monaco 744:1–23.
- TURON X, BECERRO MA, URIZ MJ. 1996. Seasonal patterns of toxicity in benthic invertebrates: The encrusting sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida). *Oikos* 75:33–40.
- TURON X, MARTI R, URIZ MJ. 2009. Chemical bioactivity of sponges along an environmental gradient in a Mediterranean cave. *Scientia Marina* 73:387–397.

- UTKINA NK, DENISENKO VA, PUSHILIN MA et al., 2009. Aaptanone, a novel zwitterionic metabolite of the aaptamine class with an oxygenated 1,6-naphthyridine core from the vietnamese marine sponge *Aptos aptos*. *Tetrahedron Letters* 50:2580–2585. DOI: 10.1002/chin.200935193
- VACELET J, BOURY-ESNAULT N. 1995. Carnivorous sponges. *Nature* 373:333–335.
- VALDERRAMA D, ZEA S. 2013. Lista anotada de esponjas (Porifera) de los arrecifes más meridionales del Mar Caribe (Noroccidente del Golfo de Urabá), con la descripción de nuevos registros para el Caribe Colombiano. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 37:353–378.
- VAN DER KLOET FM, BOBELDIJK I, VERHEIJ ER, JELLEMA RH. 2009. Analytical error reduction using single point calibration for accurate and precise metabolomic phenotyping. *Journal of Proteome Research* 11:5132–5141. DOI: 10.1021/pr900499r.
- VAN SOEST RWM. 2017. Sponges of the Guyana shelf. *Zootaxa* 4217:1–225.
- VAN SOEST RWM. 1991. Demosponge higher taxa classification re-examined. In: Reitner J, Keupp H (Eds.) *Fossil and recent sponges*. Heidelberg: Springer Verlag, Berlin. p. 54–71.
- VAN SOEST RWM. 2002a. Family Stylocordylidae Topsent, 1892. In: Hooper JNA, Van Soest RWM (Eds.) *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*. ©Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. p. 224–226.
- VAN SOEST RWM. 2002b. Family Suberitidae Schmidt, 1870. In: Hooper JNA, Van Soest RWM (Eds.) *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*. ©Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. p. 227–244.
- VAN SOEST RWM, BRAEKMAN JC. 1999. Chemosystematics of Porifera: a review. *Memoirs of the Queensland Museum* 44:569–589.
- VAN SOEST RWM, ZEA S. 1986. A new sublithistid sponge *Monanthus ciocalyptoides* n. sp. (Porifera, Halichondrida), from the West Indian region. *Bulletin Zoologisch Museum Universiteit van Amsterdam* 10:201–205.
- VAN SOEST RWM, DÍAZ MC, POMPONI AS. 1990. Phylogenetic classification of the Halichondrids (Porifera, Demospongiae). *Beaufortia* 40:15–62.
- VAN SOEST RWM, BRAEKMAN JC, FAULKNER JD, HAJDU E, HARPER MK, VACELET J. 1996. The genus *Batzella*: a chemosystematic problem. *Bulletin de L'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique* 66:89–101.
- VAN SOEST RWM, BOURY-ESNAULT N, VACELET J, DOHRMANN M, ERPENBECK D. et al. 2012. Global diversity of sponges (Porifera). *Plos One* 7:e35105.
- VAN SOEST RWM, BOURY-ESNAULT N, HOOPER JNA, RÜTZLER K, DE VOOGD NJ et al. 2019. World Porifera database. Última data de acesso em 19-06-2019. <http://www.marinespecies.org/porifera>.

- VARGAS S, ERPENBECK D, GÖCKE C, HALL KA, HOOPER JNA, JANUSSEN D, WÖRHEIDE G. 2012. Molecular phylogeny of *Abyssocladia* (Cladorhizidae: Poecilosclerida) and *Phelloderma* (Phellodermidae: Poecilosclerida) suggests a diversification of chelae microscleres in cladorhizid sponges. *Zoologica Scripta* 42:106–116.
- VARGAS S, KELLY M, SCHNABEL K, MILLS S, BOWDEN D, WÖRHEIDE G. 2015. Diversity in a cold hot-spot: DNA-barcoding reveals patterns of evolution among Antarctic Demosponges (Class Demospongiae, Phylum Porifera). *Plos One* 10:e0127573. DOI:10.1371/journal.pone.0127573
- VELENOSI TJ, THOMSON KAB, TONIAL NC, RAOPETERS AAE, MIO MA *et al.* 2019. Untargeted metabolomics reveals N, N, N-trimethyl-L-alanyl-L-proline betaine (TMAP) as a novel biomarker of kidney function. *Scientific Reports*. DOI: 10.1038/s41598-019-42992-3.
- VENTURA M. 2014. Plasticidade fenotípica de *Callyspongia* sp. (Duchassaing & Michelotti, 1864) (Porifera, Demospongiae) da costa de Salvador, Bahia. Monografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
- VILLAS-BÔAS SG; GOMBERT AK. 2006. Análise do metaboloma: Uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento* 36:58–69.
- VITE-GARCÍA N, ARJONA O, MORALES-BOJORQUEZ E, MASCARO M, SIMOES N, PALACIOS E. 2014. Assessment of lipid classes and fatty acid levels in wild newborn seahorses (*Hippocampus erectus*) (Perry 1810): implications for survival and growth in aquarium culture. *Marine and Freshwater Behavior and Physiology* 47:401–413.
- VOIGT O, WÜLFING E, WÖRHEIDE G. 2012. Molecular phylogenetic evaluation of classification and scenarios of character evolution in calcareous sponges (Porifera, Class Calcarea). *Plos One* 7:1–16.
- VOULTSIADOU E, DAILIANIS T, ANTONIADOU C, VAFIDIS D, DOUNAS C, CHINTIROGLOU CC. 2011. Aegean bath sponges: Historical data and current status. *Reviews in Fisheries Science* 19:34–51.
- VOULTSIADOU-KOUKOURA E, VAN SOEST RMW. 1993. Suberitidae (Demospongiae, Hadromerida) from the North Aegean Sea. *Beaufortia* 43:176–186.
- WANG M, CARVER JJ, PHELAN VV, SANCHEZ LM, GARG N *et al.* 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social molecular networking. *Nature Biotechnology* 34:828–837.
- WANG X, LAVROV D. 2007. Mitochondrial genome of the homoscleromorph *Oscarella carmela* (Porifera, Demospongiae) reveals unexpected complexity in the common ancestor of sponges and other animals. *Molecular Biology and Evolution* 24:363–373.
- WANG X, SCHLOSSMACHER U, SCHRÖDER HC, MÜLLER WEG. 2013. Biologically induced transition of bio-silica sol to mesoscopic gelatinous flocs: a biomimetic approach to a controlled fabrication of bio-silica structures. *Soft Matter* 9:654–664.

WAPSTRA M, VAN SOEST RMW. 1987. Sexual reproduction, larval morphology and behaviour in demosponges from the southwest of the Netherlands. In: Vacelet J, Boury-Esnault N (Eds.) *Taxonomy of Porifera from the North East Atlantic and Mediterranean Sea*. Springer-Verlag, Berlin. p. 281-307.

WATROUS J, ROACH P, ALEXANDROV T, HEATH BS, YANG JY *et al.* 2012. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proceeding of the National Academy of Science* 109:E1743–E1752. DOI: 10.1073/pnas.1203689109.

WEGERSKI CJ, SONNENSCHNEIN RN, CABRIALES F, VALERIOTE FA, MATAINAHOT, CREWS P. 2006. Stereochemical challenges in characterizing nitrogenous spiro-axane sesquiterpenes from the Indo-Pacific sponges *Amorphinopsis* and *Axinyssa*. *Tetrahedron* 62:10393–10399. DOI: 10.1016/j.tet.2006.08.070.

WILKINSON CR. 1978. Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Marine Biology* 49:161–167.

WILM A, MAINZ I, STEGER G. 2006. An enhanced RNA alignment benchmark for sequence alignment programs. *Algorithms for Molecular Biology* 1:19.

WÖRHEIDE G, DOHRMANN M, ERPENBECK D, LARROUX C, MALDONADO *et al.* 2012. Deep phylogeny and evolution of sponges (Phylum Porifera). *Advances in Marine Biology* 61:1–78.

WÖRHEIDE G. 2006. Low variation in partial cytochrome oxidase subunit I (COI) mitochondrial sequences in the coralline demosponge *Astrosclera willeyana* across the Indo-Pacific. *Marine Biology* 148:907–912.

WULFF J. 2006a. Resistance vs recovery: morphological strategies of coral reef sponges. *Functional Ecology* 20:699–708.

WULFF J. 2006b. Ecological interactions of marine sponges. *Canadian Journal of Zoology* 84:144–166.

WULFF J. 2006c. Sponge systematics by starfish: predators distinguish cryptic sympatric species of Caribbean fire sponges, *Tedania ignis* and *Tedania klausii* n. sp. (Demospongiae, Poecilosclerida). *Biological Bulletin* 211:83–94.

WULFF J. 2012. Ecological interactions and the distribution, abundance, and diversity of sponges. *Advances in Marine Biology* 61:273–344.

WULFF J. 2013. Recovery of sponges after extreme mortality events: morphological and taxonomic patterns in regeneration vs recruitment. *Integrative and Comparative Biology* 53:1–12.

XIA J, PSUCHOGIOS N, YOUNG N, WISHART DS. 2009. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Research*. DOI: 10.1093/nar/gkp356.

XIA J, SINELNIKOV IV, HAN B, WISHART DS. 2015. MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Research* 43:251–257.

- XUE L, ZHANG W. 2009. Growth and survival of early juveniles of the marine sponge *Hymeniacidon perlevis* (Demospongiae) under controlled conditions. *Marine Biotechnology* 11:640–649.
- YAMAMOTO H, SCHOONJANS K, AUWERX J. 2007. Sirtuin functions in health and disease. *Molecular Endocrinology* 8:1745-1755.
- YANG CY, TSENG CH, HSU JH, CHEN HJ, CHEN CC, TANG SL. 2011. Differential metabolisms in an encrusting sponge (*Terpios hoshinota*) by comparative transcriptomics approaches, Workshop of Marine evolutionary genomics and genetics, Academia Sinica, Taiwan.
- YU HB, YANG F, SUN F, LI J, JIAO WH *et al.* 2014. Aaptamine derivatives with antifungal and anti-HIV-1 activities from the South China Sea sponge *Aaptos aaptos*. *Marine Drugs* 12:6003–6013.
- ZEI S, HENKEL TP, PAWLIK JR. 2014. The Sponge Guide: a picture guide to Caribbean sponges. 3rd Edition. Available online: www.spongeguide.org. Última data de acesso: 19-06-2019.
- ZHANG F, BLASIAK LC, KAROLIN JO, POWELL RJ, GEDDES CD, HILL RT. 2015a. Phosphorus sequestration in the form of polyphosphate by microbial symbionts in marine sponges. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:4381–4386.
- ZHANG H, CONTE MM, CAPON RJ. 2010. Franklinolides A–C from an Australian marine sponge complex: Phosphodiesterases strongly enhance polyketide cytotoxicity. *Angewandte Chemie International Edition* 49:9904–9906.
- ZHANG W, YUAN Y, YANG S, HUANG J, HUANG L. 2015b. ITS2 secondary structure improves discrimination between medicinal “Mu Tong” species when using DNA barcoding. *Plos One* 10:e0131185. DOI:10.1371/journal.pone.0131185.
- ZIMMERMAN GA, PRESCOTT SM, MCINTYRE TM. 1992. Platelet-activating factor: a fluid-phase and cell mediator of inflammation. In: Gallin JI, Goldstein IM (Eds.) *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. Raven Press, New York. p. 1-28.

APÊNDICE A – Lista dos 180 espécimes de Suberitida e grupos externos trabalhados com sucesso morfológico e molecular. Todos os espécimes tiveram a morfologia avaliada

Voucher	Espécie	Localidade	Metabolômica	Genética				
				28S	ITS2	16S	COX1	COX2
MNRJ 7676	<i>Aaptos</i> sp. 1	Atol das Rocas, RN		X	X			
MNRJ 7687	<i>Aaptos</i> sp. 1	Atol das Rocas, RN		X	X			
MNRJ 7692a	<i>Aaptos</i> sp. 1	Atol das Rocas, RN		X				
MNRJ 7692b	<i>Aaptos</i> sp. 1	Atol das Rocas, RN		X	X		X	
MNRJ 21677	<i>Aaptos</i> sp. 1	Grotte Chauve-Souris, Martinica		X				
MNRJ 8324	<i>Aaptos</i> sp. 2	BTS, Bahia		X	X			
MNRJ 8340	<i>Aaptos</i> sp. 2	BTS, Bahia		X	X			
MNRJ 8343	<i>Aaptos</i> sp. 2	BTS, Bahia		X	X		X	
MNRJ 21663	<i>Aaptos</i> sp. 2	BTS, Bahia						
MNRJ 7500	<i>Aaptos</i> sp. 3	Ilhas Cagarras, RJ		X	X			
MNRJ 20814	<i>Amorphinopsis atlantica</i>	BIG, RJ						
MNRJ 21586	<i>Amorphinopsis atlantica</i>	BIG, RJ						
MNRJ 21745	<i>Amorphinopsis atlantica</i>	BIG, RJ	X	X	X	X		
MNRJ 21931	<i>Amorphinopsis atlantica</i>	BIG, RJ		X				
MNRJ 21939	<i>Amorphinopsis atlantica</i>	BIG, RJ						
MNRJ 21942	<i>Amorphinopsis atlantica</i>	BIG, RJ						
MNRJ 21944	<i>Amorphinopsis atlantica</i>	BIG, RJ		X			X	
MNRJ 21617	<i>Amorphinopsis atlantica</i>	BIG, RJ		X	X		X	
UFPE 1974	<i>Amorphinopsis atlantica</i>	Mamanguape, PB					X	
UFPE 1143	<i>Amorphinopsis atlantica</i>	Paripe, PE		X				
MNRJ 363	<i>Amorphinopsis atlantica</i>	SP		X	X			
MNRJ 12704	<i>Amorphinopsis atlantica</i>	Ilhas Cagarras, RJ			X		X	
MNRJ 6777	<i>Amorphinopsis</i> sp.	Trinidad, Caribe		X	X		X	
MNRJ 269	<i>Halichondria cebimarensis</i>	São Sebastião, SP		X	X			
MNRJ 4716	<i>Halichondria marianae</i>	Ponta Verde, AL		X	X			
MNRJ 2079	<i>Halichondria marianae</i>	Praia da Ferradura, RJ						
MNRJ 21342	<i>Halichondria marianae</i>	Praia de Araçagi, MA						
MNRJ 21345	<i>Halichondria marianae</i>	Praia de Araçagi, MA		X	X	X		
MNRJ 21439	<i>Halichondria marianae</i>	Praia de Araçagi, MA						
MNRJ 21400	<i>Halichondria marianae</i>	Praia de Panaquatira, MA						
MNRJ 21363	<i>Halichondria marianae</i>	Praia do Meio, MA		X	X	X		
MNRJ 21706	<i>Halichondria marianae</i>	Praia dos Dois Coqueiros, CE		X	X		X	
MNRJ 9422	<i>Halichondria marianae</i>	Bocas del Toro, Panamá			X		X	
UFPE 1590	<i>Halichondria marianae</i>	Cabo Branco, PB			X			
UFPE 1861	<i>Halichondria marianae</i>	Carapibus, PB			X		X	
MNRJ 21396	<i>Halichondria melanadocia</i>	Praia de Panaquatira, MA		X		X		X

(continuação)

Voucher	Espécie	Localidade	Metabolômica	Genética				
				28S	ITS2	16S	COX1	COX2
MNRJ 2587	<i>Halichondria melanadocia</i>	BTS, BA		X	X		X	
MNRJ 21803	<i>Halichondria melanadocia</i>	Port Louis, Guadalupe		X	X		X	
MNRJ 1092	<i>Halichondria melanadocia</i>	Twin Cays, Belize		X	X			
MNRJ 1096	<i>Halichondria melanadocia</i>	Twin Cays, Belize		X	X			
MNRJ 1520	<i>Halichondria melanodocia</i>	Tamandaré, PE						
MNRJ 1536	<i>Halichondria melanodocia</i>	Tamandaré, PE			X			
MNRJ 21652	<i>Halichondria melanodocia</i>	Porto da Barra, BA	X					
MNRJ 21659	<i>Halichondria melanodocia</i>	Porto da Barra, BA	X		X			
MNRJ 21339	<i>Halichondria</i> sp. 1	Praia de Araçagi, MA		X	X	X		
MNRJ 21754	<i>Halichondria</i> sp. 2	BIG, RJ			X			
MNRJ 21600	<i>Halichondria</i> sp. 2	Ilha Grande, RJ						
MNRJ 21603	<i>Halichondria</i> sp. 2	Ilha Grande, RJ						
MNRJ 21616	<i>Halichondria</i> sp. 2	Ilha Grande, RJ						
MNRJ 15744	<i>Halichondria</i> sp. 3	Bocas del Toro, Panamá						
MNRJ 21678	<i>Halichondria</i> sp. 3	Grotte Chauve- Souris, Martinica		X	X			
MNRJ 21799	<i>Halichondria</i> sp. 3	Itaipú, RJ		X	X		X	
MNRJ 62	<i>Halichondria</i> sp. 4	Sudeste, Brasil						
MNRJ 21602	<i>Halichondria</i> sp. 4	Ilha Grande, RJ		X	X			
MNRJ 21596	<i>Halichondria</i> sp. nov.	Ilha Grande, RJ		X	X		X	
MNRJ 521	<i>Halichondria tenebrica</i>	SP			X		X	
MNRJ 21672	<i>Hymeniacidon caerulea</i>	Anse d'Arlet, Martinica	X	X	X			
MNRJ 18768	<i>Hymeniacidon caerulea</i>	Foz do Rio Amazonas, MA		X	X			
MNRJ 21681	<i>Hymeniacidon caerulea</i>	Anse d'Arlet, Martinica		X		X		
MNRJ 21801	<i>Hymeniacidon caerulea</i>	Anse d'Arlet, Martinica		X	X		X	
MNRJ 21804	<i>Hymeniacidon caerulea</i>	Anse d'Arlet, Martinica		X	X			
MNRJ 21817	<i>Hymeniacidon caerulea</i>	Cayo Arcas, México		X	X		X	
MNRJ 21805	<i>Hymeniacidon caerulea</i>	Diamant, Martinica		X	X	X		X
MNRJ 21679c	<i>Hymeniacidon caerulea</i>	Grotte Chauve- Souris, Martinica		X	X			
MNRJ 21679e	<i>Hymeniacidon caerulea</i>	Grotte Chauve- Souris, Martinica		X	X			
MNRJ 21679f	<i>Hymeniacidon caerulea</i>	Grotte Chauve- Souris, Martinica	X	X	X	X	X	X
MNRJ 21679g	<i>Hymeniacidon caerulea</i>	Grotte Chauve- Souris, Martinica	X	X	X	X		X
MNRJ 21598	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Ilha Grande, RJ		X	X			
MNRJ 21770	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X					
MNRJ 21771	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X	X	X		X	

(continuação)

Voucher	Espécie	Localidade	Metabolômica	Genética				
				28S	ITS2	16S	COX1	COX2
MNRJ 21772	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X					
MNRJ 21773	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X					
MNRJ 21774	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X					
MNRJ 21775	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X					
MNRJ 21776	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X					
MNRJ 21777	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X					
MNRJ 21778	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X					
MNRJ 21779	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X					
MNRJ 21780	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X					
MNRJ 21781	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X					
MNRJ 21782	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X					
MNRJ 21783	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X		X		X	
MNRJ 21784	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X					
MNRJ 21785	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X					
MNRJ 21786	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X					
MNRJ 21787	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X					
MNRJ 21788	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X					
MNRJ 21789	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ	X					
MNRJ 21800	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Itaipú, RJ			X		X	
MNRJ 21346	<i>Hymeniacidon</i> sp. nov.	Praia de Araçagi, MA		X	X			
MNRJ 21360	<i>Hymeniacidon</i> sp. nov.	Praia de Panaquatira, MA		X	X		X	
MNRJ 21390	<i>Hymeniacidon</i> sp. nov.	Praia de Panaquatira, MA		X	X		X	X
MNRJ 19469	<i>Rhaphidostyla</i> sp. nov.	BIG, RJ	X	X	X	X		
UERJ 190	<i>Rhaphidostyla</i> sp. nov.	BIG, RJ			X			
UERJ 215	<i>Rhaphidostyla</i> sp. nov.	BIG, RJ						
UERJ 393	<i>Rhaphidostyla</i> sp. nov.	BIG, RJ						
MNRJ 2543	<i>Rhaphidostyla</i> sp. nov.	BTS, BA			X			
UERJ 65	<i>Rhaphidostyla</i> sp. nov.	BTS, BA	X					
MNRJ 15061	<i>Suberites aurantiacus</i>	Baía de Santa Martha, Curaçao		X				
UERJ 261	<i>Suberites aurantiacus</i>	BIG, RJ						
MNRJ 21584	<i>Suberites aurantiacus</i>	BIG, RJ						
MNRJ 21585	<i>Suberites aurantiacus</i>	BIG, RJ						
MNRJ 21758	<i>Suberites aurantiacus</i>	BIG, RJ		X	X			
MNRJ 21818	<i>Suberites aurantiacus</i>	Chelem, México		X				
MNRJ 21819	<i>Suberites aurantiacus</i>	Chelem, México						
MNRJ 21820	<i>Suberites aurantiacus</i>	Chelem, México		X	X			
MNRJ 21821	<i>Suberites aurantiacus</i>	Chelem, México		X				
MNRJ 21822	<i>Suberites aurantiacus</i>	Chelem, México		X	X		X	
MNRJ 21601	<i>Suberites aurantiacus</i>	Ilha Grande, RJ		X	X			
MNRJ 20788	<i>Suberites aurantiacus</i>	Paraná						
MNRJ 21405	<i>Suberites aurantiacus</i>	Praia do Francês, AL		X	X		X	

(continuação)

Voucher	Espécie	Localidade	Metabolômica	Genética				
				28S	ITS2	16S	COX1	COX2
MNRJ 21405	<i>Suberites aurantiacus</i>	Praia de Araçagi, MA		X	X			
MNRJ 21430	<i>Suberites aurantiacus</i>	Praia de Araçagi, MA		X	X	X		
MNRJ 21397	<i>Suberites aurantiacus</i>	Praia de Panaquatira, MA		X		X	X	
MNRJ 21402	<i>Suberites aurantiacus</i>	Praia de Panaquatira, MA						
MNRJ 16247	<i>Suberites aurantiacus</i>	Arquipélago de Currais, PR			X			
MNRJ 21340	<i>Suberites aurantiacus</i>	Praia de Araçagi, MA		X	X			
MNRJ 21665	<i>Suberites aurantiacus</i>	BTS, BA						
MNRJ 21668	<i>Suberites aurantiacus</i>	BTS, BA						
MNRJ 21808	<i>Suberites aurantiacus</i>	Port Louis, Guadalupe		X	X			
MNRJ 21343	<i>Suberites</i> sp. nov.	Praia de Araçagi, MA						
MNRJ 21500	<i>Suberites</i> sp.1	Praia do Meio, MA		X	X	X	X	
MNRJ 3882	<i>Suberites</i> sp.2	Ilhas Cagaras, RJ						
MNRJ 8641	<i>Suberites</i> sp.3	Abrolhos, BA		X	X			
MNRJ 4057	<i>Terpios belindae</i>	Arraial do Cabo, RJ			X			
MNRJ 15781	<i>Terpios belindae</i>	Bocas del Toro, Panama		X				
MNRJ 8370	<i>Terpios belindae</i>	BTS, BA		X	X		X	
MNRJ 6726	<i>Terpios belindae</i>	Abrolhos, BA						
MNRJ 18940	<i>Terpios fugax</i>	Praia dos Dois Coqueiros, CE		X	X	X		
MNRJ 20065	<i>Terpios fugax</i>	Praia dos Dois Coqueiros, CE						
MNRJ 20078	<i>Terpios fugax</i>	Praia dos Dois Coqueiros, CE		X	X			
MNRJ 21700	<i>Terpios fugax</i>	Praia dos Dois Coqueiros, CE		X	X			
MNRJ 21701	<i>Terpios fugax</i>	Praia dos Dois Coqueiros, CE						
MNRJ 21708	<i>Terpios fugax</i>	Praia dos Dois Coqueiros, CE						
MNRJ 21679a	<i>Terpios fugax</i>	Grotte Chauve-Souris, Martinica						
MNRJ 21798	<i>Terpios fugax</i>	Itaipú, RJ			X			
MNRJ 21696	<i>Terpios fugax</i>	Paracuru, CE	X	X	X			
MNRJ 21937	<i>Terpios fugax</i>	BIG, RJ		X	X	X		
MNRJ 21940	<i>Terpios fugax</i>	BIG, RJ						
MNRJ 21946	<i>Terpios fugax</i>	BIG, RJ		X	X			
LGMAR1469	<i>Terpios fugax</i>	Porto da Barra, BA		X	X			
MNRJ 21630	<i>Terpios fugax</i>	Porto da Barra, BA						
MNRJ 21631	<i>Terpios fugax</i>	Porto da Barra, BA	X	X	X			
MNRJ 21632	<i>Terpios fugax</i>	Porto da Barra, BA		X	X			
MNRJ 21633	<i>Terpios fugax</i>	Porto da Barra, BA						
MNRJ 21638	<i>Terpios fugax</i>	Porto da Barra, BA		X		X		
MNRJ 21639	<i>Terpios fugax</i>	BTS, BA	X	X	X			

(conclusão)

Voucher	Espécie	Localidade	Metabolômica	Genética				
				28S	ITS2	16S	COX1	COX2
MNRJ 2536	<i>Terpios fugax</i>	BTS, BA	X	X	X	X		
MNRJ 21814	<i>Terpios gelatinosus</i>	Mônaco, França			X		X	
MNRJ 21815	<i>Terpios gelatinosus</i>	Mônaco, França		X	X			
MNRJ 21813	cf. <i>Terpios</i>	Mônaco, França						
MNRJ 1094	<i>Terpios manglaris</i>	Twin Cays, Belize		X	X			
MNRJ 308	<i>Terpios manglaris</i>	Sudeste, Brasil			X			
MNRJ 21684a	<i>Topsentia</i> cf. <i>bahamensis</i>	Grotte Chauve-Souris, Martinica		X				
MNRJ 21684c	<i>Topsentia</i> cf. <i>bahamensis</i>	Grotte Chauve-Souris, Martinica		X				
MNRJ 21816	<i>Topsentia</i> cf. <i>bahamensis</i>	Cayo Arcas, México						
MNRJ 21802	<i>Topsentia</i> cf. <i>bahamensis</i>	San Martin		X	X	X		
MNRJ 8345	<i>Topsentia ophiraphidites</i>	Bahia					X	
MNRJ 21684	<i>Topsentia ophiraphidites</i>	Grotte Chauve-Souris, Martinica	X	X	X			
MNRJ 21684b	<i>Topsentia ophiraphidites</i>	Grotte Chauve-Souris, Martinica	X					X
MNRJ 21684d	<i>Topsentia ophiraphidites</i>	Grotte Chauve-Souris, Martinica						X
MNRJ 21730	<i>Topsentia</i> sp. nov.	Fernando de Noronha	X					
MNRJ 20224	<i>Topsentia</i> sp. nov.	Pedra da Risca do Meio, CE	X					
MNRJ 21733	<i>Topsentia</i> sp. nov.	Fernando de Noronha	X	X				
MNRJ 21736	<i>Topsentia</i> sp. nov.	Fernando de Noronha	X	X		X		
MNRJ 21734	<i>Topsentia</i> sp. nov.	Fernando de Noronha	X					
MNRJ 21729	<i>Topsentia</i> sp. nov.	Fernando de Noronha	X					
MNRJ 21731	<i>Topsentia</i> sp. nov.	Fernando de Noronha	X	X	X			
MNRJ 21714	<i>Topsentia</i> sp. nov.	BTS, BA	X					
MNRJ 21728	<i>Topsentia</i> sp. nov.	Fernando de Noronha	X	X				
MNRJ 21670	aff. <i>Topsentia</i>	BTS, BA	X	X		X		
MNRJ 21673	cf. <i>Topsentia</i>	Anse d'Arlet, Martinica		X				
MNRJ 21710	<i>Dragmacidon reticulatum</i>	Pedra da Risca do Meio, CE	X					
MNRJ 21711	<i>Dragmacidon reticulatum</i>	Pedra da Risca do Meio, CE	X					
MNRJ 21712	<i>Geodia corticostylifera</i>	Pedra da Risca do Meio, CE	X					
MNRJ 21713	<i>Geodia corticostylifera</i>	Pedra da Risca do Meio, CE	X					
MNRJ 21651	<i>Geodia</i> sp.	BTS, Bahia	X	X		X		
MNRJ 21675	<i>Neopetrosia carbonaria</i>	Grande Anse	X	X	X	X	X	
MNRJ 21682	<i>Neopetrosia carbonaria</i>	Grande Anse	X	X		X		
MNRJ 21685	<i>Neopetrosia carbonaria</i>	Grande Anse	X	X		X		
TOTAL: 180 UTOs: 36			45	94	88	24	32	7

APÊNDICE B – Lista comparativa de amostras trabalhadas para a realização das reconstruções filogenéticas com os marcadores 28S, ITS2, COX1 e 16S

Ordem	Espécie	Voucher	28S	COX1	16S	ITS2
Agelasida	<i>Acanthostylotella cornuta</i>	NCI055	KC869600			
Agelasida	<i>Agelas axifera</i>	NTM2728		DQ069298		
Agelasida	<i>Agelas conifera</i>	P36	KC869634			
Agelasida	<i>Agelas oroides</i>	Po.25569	KX688750			
Agelasida	<i>Agelas schmidt</i>			NC_010213		
Agelasida	<i>Agelas</i> sp.	UCMPWC1026	AY561929			
Agelasida	<i>Astrosclera willeyana</i>	NCI159	KC869525			
Agelasida	<i>Astrosclera willeyana</i>	OLS	JQ362353			
Agelasida	<i>Astrosclera willeyana</i>	UCMPWC1070		AY561969		
Agelasida	<i>Ceratoporella nicholsoni</i>	INV-POR829		DQ075775		
Agelasida	<i>Prosuberites laughlini</i>	UCMPWC524	AY626320			
Agelasida	<i>Prosuberites laughlini</i>	UCMPWC875		AY561960		
Agelasida	<i>Prosuberites laughlini</i>		AY561927			
Agelasida	<i>Prosuberites longispinus</i>	Mc7173	HQ379245 .320.387			
Agelasida	<i>Prosuberites</i> sp.	G306290	AY626319			
Agelasida	<i>Stromatospongia vermicola</i>	ICN-MHN-PO-0216		DQ075754		
Agelasida	<i>Axinella corrugata</i>				NC_006894	
Agelasida	<i>Agelas schmidt</i>				NC_010213	
Axinellida	<i>Acanthella acuta</i>	Mc7160		HQ379408		
Axinellida	<i>Acanthella cavernosa</i>	NCI074	KC869573			
Axinellida	<i>Acantheurypon pilosella</i>	D27-217		JF440337		
Axinellida	<i>Axechina raspailioides</i>	G300288		JQ034544		
Axinellida	<i>Axechina raspailioides</i>	NCI090	KC869448			
Axinellida	<i>Axinella corrugata</i>	P61	KC869523			
Axinellida	<i>Axinella corrugata</i>			NC_006894		
Axinellida	<i>Axinella</i> sp.	G315196	AY561925			
Axinellida	<i>Ceratopsion axiferum</i>	NCI092	KC869596			
Axinellida	<i>Cymbastela concentrica</i>	G306736		JQ034534		
Axinellida	<i>Cymbastela coralliophila</i>	G307149		JQ034536		
Axinellida	<i>Cymbastela vespertina</i>	G300002		JQ034539		
Axinellida	<i>Didiscus</i> sp.	UCMPWC1040	AY561948	AY561972		
Axinellida	<i>Didiscus</i> sp.	UCMPWC1040				
Axinellida	<i>Dragmacidon lunaecharta</i>	MCZDNA106232		JX999077		
Axinellida	<i>Echinodictyum cancellatum</i>	G300863		JQ034555		
Axinellida	<i>Ectyoplasia ferox</i>	P13	KC869540			
Axinellida	<i>Ectyoplasia ferox</i>			NC_010210		
Axinellida	<i>Ectyoplasia tabula</i>	NCI395	KC869472			
Axinellida	<i>Endectyon delaubenfelsi</i>	Mc4527		HQ379412		
Axinellida	<i>Eurypon</i> cf. <i>clavatum</i>			AJ843893		
Axinellida	<i>Eurypon hispidum</i>	NCI040	KC869614			
Axinellida	<i>Halicnemia</i> sp.			HQ379423		
Axinellida	<i>Heteroxya</i> sp.			KF017197		
Axinellida	<i>Hymenaphia verticillata</i>	Mc5018		HQ379414		
Axinellida	<i>Myrmekioderma gyroderma</i>	B109		EF519652		
Axinellida	<i>Paratimea constellata</i>	Mc4323		HQ379419		
Axinellida	<i>Phakellia ventilabrum</i>	Mc4248		HQ379409		
Axinellida	<i>Pseudaxinella reticulata</i>			AJ843894		
Axinellida	<i>Ptilocaulis walpersi</i>			NC_010209		

(continuação)

Ordem	Espécie	Voucher	28S	COX1	16S	ITS2
Axinellida	<i>Raspaciona aculeata</i>	Mc7159		HQ379415		
Axinellida	<i>Raspailia hispida</i>	Mc3597		HQ379416		
Axinellida	<i>Raspailia phakellopsis</i>	NCI442	KC869585			
Axinellida	<i>Raspailia vestigifera</i>	NCI431	KC869583			
Axinellida	<i>Reniochalina stalagmitis</i>	NCI287	KC869582			
Axinellida	<i>Stelligera rigida</i>	Mc4357		HQ379420		
Axinellida	<i>Thrinacophora cervicornis</i>	G300850		JQ034585		
Axinellida	<i>Thrinacophora cervicornis</i>	NCI418	KC869456			
Axinellida	<i>Thrinacophora cervicornis</i>	NCI435	KC869630			
Axinellida	<i>Triaktrion flabelliforme</i>	NCI383	KC869511			
Axinellida	<i>Ptilocaulis walpersi</i>				NC_010209	
Axinellida	<i>Ectyoplasia ferox</i>				NC_010210	
Biemnida	<i>Biemna fistulosa</i>	TAU25197		AM076982		
Biemnida	<i>Biemna</i> sp.	P60	KC869481			
Biemnida	<i>Neofibularia hartmani</i>	NCI421	KC869639			
Biemnida	<i>Neofibularia hartmani</i>	QMG324632		JF773145		
Biemnida	<i>Rhabderemia sorokinae</i>	G312904		HE611607		
Biemnida	<i>Sigmaxinella hipposiderus</i>	QMG323175		JF773147		
Biemnida	<i>Sigmaxinella</i> sp.	NCI333	KC869491			
Bubarida	<i>Desmanthus incrustans</i>	QMG303437		KJ494345		
Bubarida	<i>Dictyonella incisa</i>			KF017196		
Bubarida	<i>Petromica pacifica</i>	G321706		LN624193		
Bubarida	<i>Petromica</i> sp.	ZMAPOR12543		LN624195		
Bubarida	<i>Tethyspira spinosa</i>	Mc4641		HQ379418		
Clionaida	<i>Cervicornia cuspidifera</i>	NCI082	KC869474			
Clionaida	<i>Cliona celata</i>	Mc4038		HM999040		
Clionaida	<i>Cliona delitrix</i>	SI06x122	KC869510			
Clionaida	<i>Cliona viridis</i>	MCZDNA105701		JX999076		
Clionaida	<i>Diplastrella megastellata</i>	UCMPWC997	AY561893			
Clionaida	<i>Pione vastifica</i>	STAVFP7		EF519666		
Clionaida	<i>Placospongia intermedia</i>	MCZDNA106621		JX999089		
Clionaida	<i>Placospongia</i> sp.	P20	KC869625			
Clionaida	<i>Placospongia</i> sp.	UCMPWC865	AY626299			
Clionaida	<i>Spheciospongia solida</i>	SPO2		KY565307		
Clionaida	<i>Spirastrella hartmani</i>	P21	KC869504			
Desmacellida	<i>Desmacella</i> cf. <i>annexa</i>	Mc4240a	HQ379225 93.361			
Desmacellida	<i>Desmacella</i> cf. <i>annexa</i>	Mc4240		KC876697		
Merliida	<i>Hamacantha falcula</i>	ZMBN103477		LN870512		
Poecilosclerida	<i>Acanthancora</i> sp.	NCI410	KC869649			
Poecilosclerida	<i>Antho</i> sp.	NCI322	KC869629			
Poecilosclerida	<i>Asbestopluma pennatula</i>	ZMBN103467		LN870475		
Poecilosclerida	<i>Chondrocladia fatimae</i>	BPCP.3729		LN870480		
Poecilosclerida	<i>Cladorhiza abyssicola</i>	ZMAPOR19500		LN870497		
Poecilosclerida	<i>Clathria eccentrica</i>	NCI387	KC869597			
Poecilosclerida	<i>Clathria reinwardti</i>	G306423		HE611598		
Poecilosclerida	<i>Clathria reinwardti</i>	NCI453	KC869449			
Poecilosclerida	<i>Crambe crambe</i>	MCZDNA105712		JX999091		
Poecilosclerida	<i>Crambe crambe</i>	UCMPWC933	AY561883			
Poecilosclerida	<i>Crella elegans</i>			NC_027520		
Poecilosclerida	<i>Crella incrustans</i>	NCI025	KC869608			

(continuação)

Ordem	Espécie	Voucher	28S	COX1	16S	ITS2
Poecilosclerida	<i>Desmapsamma anchorata</i>	UCMPWC1660		HE591461		
Poecilosclerida	<i>Desmoxya pelagiae</i>	Mc7764		KC876696		
Poecilosclerida	<i>Diacarnus spinipoculum</i>	G305467		AY561975		
Poecilosclerida	<i>Echinochalina</i> sp.	NCI468	KC869603			
Poecilosclerida	<i>Echinoclathria dichotoma</i>	NCI444	KC869501			
Poecilosclerida	<i>Forcepia</i> sp.	NCI034	KC869627			
Poecilosclerida	<i>Guitarra antarctica</i>	ECOQUIM.786 e		LN870510		
Poecilosclerida	<i>Guitarra fimbriata</i>	NCI405	KC869537			
Poecilosclerida	<i>Inflatella</i> sp.	NCI385	KC869468			
Poecilosclerida	<i>Iotrochota birotulata</i>			NC_010207		
Poecilosclerida	<i>Isodictya compressa</i>	NCI437	KC869546			
Poecilosclerida	<i>Isodictya frondosa</i>	NCI381	KC869563			
Poecilosclerida	<i>Isodictya frondosa</i>	NCI461	KC869477			
Poecilosclerida	<i>Isodictya grandis</i>	NCI439	KC869522			
Poecilosclerida	<i>Latrunculia lunaviridis</i>	NCI417	KC869489			
Poecilosclerida	<i>Lissodendoryx arenaria</i>	NCI321	KC869561			
Poecilosclerida	<i>Lissodendoryx fibrosa</i>	NCI401	KC869529			
Poecilosclerida	<i>Lissodendoryx fibrosa</i>	NCI409	KC869479			
Poecilosclerida	<i>Lissodendoryx sigmata</i>	NCI429	KC869509			
Poecilosclerida	<i>Lissodendoryx</i> sp.	NCI407	KC869506			
Poecilosclerida	<i>Microciona prolifera</i>			DQ087475		
Poecilosclerida	<i>Monanchora arbuscula</i>	SI06x202	KC869447			
Poecilosclerida	<i>Monanchora clathrata</i>	G301219		HE611612		
Poecilosclerida	<i>Monanchora unguiculata</i>	NCI446	KC869564			
Poecilosclerida	<i>Mycale fibrexilis</i>		AY026376			
Poecilosclerida	<i>Iotrochota birotulata</i>	P01	KC869556			
Poecilosclerida	<i>Mycale macilenta</i>	NCI346	KC869541			
Poecilosclerida	<i>Mycale mirabilis</i>	G300561		HE611589		
Poecilosclerida	<i>Mycale mirabilis</i>	NCI445	KC869613			
Poecilosclerida	<i>Mycale setosa</i>	NCI408	KC869624			
Poecilosclerida	<i>Negombata magnifica</i>			NC_010171		
Poecilosclerida	<i>Neopodospongia</i> cf. <i>normani</i>	D31-217		JF440339		
Poecilosclerida	<i>Ophlitaspongia papilla</i>	OP-1		KF225483		
Poecilosclerida	<i>Paracornulum dubium</i>	G300541		HE611605		
Poecilosclerida	<i>Phelloderma oxychaetoides</i>	SMFDEU 11726		HE611626		
Poecilosclerida	<i>Phorbas fictitoides</i>	G307601		HE611617		
Poecilosclerida	<i>Plocamionida microcionides</i>	P32MIN H8a		FR687220		
Poecilosclerida	<i>Sceptrella biannulata</i>			KF017195		
Poecilosclerida	<i>Strongylacidon bermudae</i>			AJ843889		
Poecilosclerida	<i>Tedania ignis</i>			DQ133896		
Poecilosclerida	<i>Tedania strongylostyla</i>	NCI397	KC869515			
Poecilosclerida	<i>Tedania tubulifera</i>	NCI345	KC869548			
Poecilosclerida	<i>Tsitsikamma favus</i>			JF930154		
Poecilosclerida	<i>Tsitsikamma pedunculata</i>	NCI384	KC869512			
Poecilosclerida	<i>Zyzzya fuliginosa</i>	NCI441	KC869478			
Poecilosclerida	<i>Crella elegans</i>				NC_027520	
Poecilosclerida	<i>Negombata magnifica</i>				NC_010171	
Poecilosclerida	<i>Iotrochota birotulata</i>				NC_010207	
Polymastiida	<i>Polymastia littoralis</i>			NC_023834		
Polymastiida	<i>Polymastia pachymastia</i>	UCMPWC932	AY561924			
Polymastiida	<i>Quasillina brevis</i>	ZMBN98084		HG423718		

(continuação)

Ordem	Espécie	Voucher	28S	COX1	16S	ITS2
Polymastiida	<i>Radiella hemisphaerica</i>	ZMBN98043		HG423719		
Polymastiida	<i>Spinularia spinularia</i>	ZMBN98037		HG423727		
Polymastiida	<i>Tentorium semisuberites</i>	POR20536		HQ379426		
Polymastiida	<i>Weberella bursa</i>	ZMBN98051		HG423733		
Polymastiida	<i>Polymastia littoralis</i>				NC_023834	
Scopalinida	<i>Scopalina lophyropoda</i>			AM498641		
Scopalinida	<i>Scopalina ruetzleri</i>	P118	KC869553			
Scopalinida	<i>Stylissa carteri</i>	USNM.IZ.1526 907		MK833941		
Scopalinida	<i>Stylissa flabelliformis</i>	POR17668		AY625671		
Scopalinida	<i>Stylissa massa</i>	G307272		JQ034583		
Scopalinida	<i>Stylissa massa</i>	POR17670		AY625672		
Scopalinida	<i>Svenzea zeai</i>	B28		EF519682		
Scopalinida	<i>Svenzea zeai</i>	P56	KC869635			
Sphaerocladina	<i>Vetulina indica</i>	WAMZ35842		LN624211		
Spongillida	<i>Ephydatia muelleri</i>			NC_010202		
Spongillida	<i>Ephydatia muelleri</i>				NC_010202	
Suberitida	<i>Aaptos aaptos</i>	G320130	AY626314			
Suberitida	<i>Aaptos aaptos</i>	NCI313	KC869496			
Suberitida	<i>Aaptos cf. lithophaga</i>	POR8789	AY626312. 561909			
Suberitida	<i>Aaptos papillata</i>	M24A		KY492600		
Suberitida	<i>Aaptos papillata</i>	M25A		KY492599		
Suberitida	<i>Aaptos sp.</i>	G313447	AY626313			
Suberitida	<i>Aaptos sp.</i>	WAMZ3165	AY561908			
Suberitida	<i>Aaptos sp.</i>	WAMZ3615	AY626311. AY561908			
Suberitida	<i>Aaptos suberitoides</i>	POR17498	AY319308	AY625653		
Suberitida	<i>Amorphinopsis excavans</i>	NCI061	KC869473			
Suberitida	<i>Amorphinopsis excavans</i>	POR14627	AY319313	AF437297		
Suberitida	<i>Amorphinopsis siamensis</i>	POR17672	AY618705	AY625655		
Suberitida	<i>Amorphinopsis sp.</i>	RUA-2017	MF685333			
Suberitida	<i>Caulospongia biflabellata</i>	WAMZ16503	AY626318. 41			
Suberitida	<i>Caulospongia reticulata</i>		AY561914			
Suberitida	<i>Ciocalypta penicillus</i>	Mc5051	HQ379240. 315.381			
Suberitida	<i>Ciocalypta penicillus</i>	POR14111	AY618710			
Suberitida	<i>Ciocalypta penicillus</i>			AF437302		
Suberitida	<i>Ciocalypta sp.</i>	G301298		JQ034562		
Suberitida	<i>Ciocalypta sp.</i>	Po.25633			KX688741	
Suberitida	<i>Ciocalypta sp.</i>	STAIVFP2		EF519604		
Suberitida	<i>Ciocalypta tyleri</i>	POR11683	AY618711			
Suberitida	<i>Halichondria attenuata</i>	Mc4732	HQ393900			
Suberitida	<i>Halichondria bowerbanki</i>	GW30169	MH157903			
Suberitida	<i>Halichondria bowerbanki</i>	Mc4003	HQ379241. 316.382			
Suberitida	<i>Halichondria bowerbanki</i>	POR10898	AY618714			
Suberitida	<i>Halichondria bowerbanki</i>	POR17674	AY618713			
Suberitida	<i>Halichondria bowerbanki</i>	POR17683		AF437299		
Suberitida	<i>Halichondria bowerbanki</i>	SB16A		KY492588		

(continuação)

Ordem	Espécie	Voucher	28S	COX1	16S	ITS2
Suberitida	<i>Halichondria magniconulosa</i>	B11		EF519615		
Suberitida	<i>Halichondria magniconulosa</i>	S11		EF519616		
Suberitida	<i>Halichondria melanadocia</i>	P48	KC869508			
Suberitida	<i>Halichondria melanodocia</i>	K33		EF519617		
Suberitida	<i>Halichondria melanodocia</i>	STAI4P4		EF519618		
Suberitida	<i>Halichondria okadai</i>	040313-14		KJ546365		KJ801656
Suberitida	<i>Halichondria okadai</i>	Haloka1		EF217340		EF217370
Suberitida	<i>Halichondria okadai</i>	Haloka2		EF217341		EF217371
Suberitida	<i>Halichondria okadai</i>	Haloka3				EF217372
Suberitida	<i>Halichondria okadai</i>	n.a.	AB511881			AB511881
Suberitida	<i>Halichondria okadai</i>			NC_037391		
Suberitida	<i>Halichondria panicea</i>	B32B		KY492592		
Suberitida	<i>Halichondria panicea</i>	M24E		KY492591		
Suberitida	<i>Halichondria panicea</i>	M31G		KY492590		
Suberitida	<i>Halichondria panicea</i>	Mc4070	HQ379242 .317.383	KC869423		
Suberitida	<i>Halichondria panicea</i>	MF42B		KY492589		
Suberitida	<i>Halichondria panicea</i>	PG:BU18	LC436876			
Suberitida	<i>Halichondria panicea</i>	POR14125	AY319315	AF437294		
Suberitida	<i>Halichondria panicea</i>		AF062607			AF062607
Suberitida	<i>Halichondria panicea</i>			NC_040168		
Suberitida	<i>Halichondria</i> sp.	DISL2002-*26				JF824782
Suberitida	<i>Halichondria</i> sp.	DISL2002-*49				JF824781
Suberitida	<i>Halichondria</i> sp.	G322642		SBD813		
Suberitida	<i>Halichondria</i> sp.	Halsp-1		EF217336		EF217365
Suberitida	<i>Halichondria</i> sp.	Halsp-2		EF217337		EF217366
Suberitida	<i>Halichondria</i> sp.	Halsp-3		EF217338		EF217367
Suberitida	<i>Halichondria</i> sp.	Halsp-4				EF217368
Suberitida	<i>Halichondria</i> sp.	Halsp-5		EF217339		EF217369
Suberitida	<i>Halichondria</i> sp.	PG-BU1				LC436859
Suberitida	<i>Halichondria</i> sp.	PG-BU10				LC436868
Suberitida	<i>Halichondria</i> sp.	PG-BU7				LC436865
Suberitida	<i>Halichondria</i> sp.	PG-BU8				LC436866
Suberitida	Halichondriidae	UCMPWC1015	AY561933	AY561985		
Suberitida	Halichondriidae	UCMPWC1017	AY561934			
Suberitida	Halichondriidae	UCMPWC1033	AY561935			
Suberitida	Halichondriidae	UCMPWC1063	AY561926			
Suberitida	<i>Homaxinella</i> sp.	NIWA28971		LN850197		
Suberitida	<i>Homaxinella</i> sp.	NIWA28975		LN850190		
Suberitida	<i>Homaxinella</i> sp.	NIWA35450		LN850191		
Suberitida	<i>Homaxinella</i> sp.	NIWA37362		LN850192		
Suberitida	<i>Homaxinella</i> sp.	NIWA37480		LN850193		
Suberitida	<i>Homaxinella</i> sp.	NIWA37655		LN850194		
Suberitida	<i>Homaxinella subdola</i>	Mc5438	HQ379244 .318.385			
Suberitida	<i>Hymeniacidon chloris</i>	SPO22		KY565323		KY565289
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	A				AB250768
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	B				AB250769
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	C				AB250770
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	D				AB250771
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	E				AB250772

(continuação)

Ordem	Espécie	Voucher	28S	COX1	16S	ITS2
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	F				AB250773
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	G				AB250774
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	H				AB250775
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	Hymf1				AB373172
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	Hymf10				AB373181
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	Hymf11				AB373182
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	Hymf12				AB373183
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	Hymf13				AB373184
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	Hymf14				AB373185
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	Hymf15				AB373186
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	Hymf2				AB373173
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	Hymf3				AB373174
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	Hymf4				AB373175
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	Hymf5				AB373176
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	Hymf6				AB373177
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	Hymf7				AB373178
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	Hymf8				AB373179
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	Hymf9				AB373180
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	Hymfla1		EF217333		EF217362
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	Hymfla2		EF217334		EF217363
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	Hymfla3		EF217335		EF217364
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	I				AB250776
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	J				AB250777
Suberitida	<i>Hymeniacidon flavia</i>	K				AB250778
Suberitida	<i>Hymeniacidon gracilis</i>	SPO26		KY565326		KY565291
Suberitida	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	190513-06	KJ620391			KJ782600
Suberitida	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	D03-10				JF824792
Suberitida	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	D03-12				JF824793
Suberitida	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	D03-13				JF824794
Suberitida	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	D03-4				JF824789
Suberitida	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	D03-6				JF824790
Suberitida	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	D03-7				JF824791
Suberitida	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	DISL2002-*17				JF824788
Suberitida	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	DISL2002-*2				JF824787
Suberitida	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	HyH				AB373170
Suberitida	<i>Hymeniacidon heliophila</i>					KT880468
Suberitida	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	NCI083	KC869620			
Suberitida	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	NCI217	KC884838			
Suberitida	<i>Hymeniacidon heliophila</i>	STAIVFP6		EF519629		
Suberitida	<i>Hymeniacidon heliophila</i>					AB250764
Suberitida	<i>Hymeniacidon heliophila</i>					AB860124
Suberitida	<i>Hymeniacidon kitchingi</i>	Mc3332	HQ379243. KC869434. HQ379384			
Suberitida	<i>Hymeniacidon perlevis</i>	HM-2		KF225482		
Suberitida	<i>Hymeniacidon perlevis</i>	HYM13B		JX477026		
Suberitida	<i>Hymeniacidon perlevis</i>	HYM19A		JX477041		
Suberitida	<i>Hymeniacidon perlevis</i>	HYM3A		JX477015		
Suberitida	<i>Hymeniacidon perlevis</i>	HYM5A		JX477016		
Suberitida	<i>Hymeniacidon perlevis</i>	HYM7A		JX477017		
Suberitida	<i>Hymeniacidon perlevis</i>	HYM9A		JX477018		

(continuação)

Ordem	Espécie	Voucher	28S	COX1	16S	ITS2
Suberitida	<i>Hymeniacidon perlevis</i>	HyP				AB373171
Suberitida	<i>Hymeniacidon perlevis</i>	POR14140	AY319317			
Suberitida	<i>Hymeniacidon perlevis</i>	POR17676	AY618715			
Suberitida	<i>Hymeniacidon perlevis</i>	SB22A		KY492553		
Suberitida	<i>Hymeniacidon perlevis</i>					AB250766
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	5FingF				JQ658459
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	5Fing-NE				JQ658471
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	5Fing-NS				JQ658460
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	Azvdo1				JQ658458
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	Azvdo2				JQ658457
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	Bsex-94		KP136744		
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	HBI-N				JQ658456
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	HBI-Nb				JQ658467
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	HBI-S				JQ658464
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	HBI-SDr				JQ658466
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	Head				JQ658451
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	Hyms1				AB373166
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	Hyms2				AB373167
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	Hyms3				AB373168
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	Hyms4				AB373169
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	Hymsin1		EF217329		EF217355
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	Hymsin2				EF217356
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	Hymsin3				EF217357
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	Hymsin4				EF217358
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	Hymsin5				EF217359
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	Hymsin6				EF217360
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	Hymsin7		EF217332		EF217361
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	Kirby1				JQ658450
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	Kirby2				JQ658472
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	SML-EB				JQ658455
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	SML-lw				JQ658468
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	SML-N				JQ658461
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	SML-NW				JQ658463
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	SML-S				JQ658462
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	SML-TS				JQ658465
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	Tomales				JQ658473
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	WalkB-lw				JQ658469
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	WalkB-N				JQ658452
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	WalkB-NE				JQ658454
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	WalkB-S				JQ658453
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>	WalkB-shr				JQ658470
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>					AB250765
Suberitida	<i>Hymeniacidon sinapium</i>			NC_022450		
Suberitida	<i>Hymeniacidon</i> sp.	G303294		JQ034565		
Suberitida	<i>Hymeniacidon</i> sp.	oki022				AB250767
Suberitida	<i>Plicatellopsis Antarctica</i>	NIWA29084		LN850221		
Suberitida	<i>Plicatellopsis fragilis</i>	NIWA38173		LN850217		
Suberitida	<i>Protosuberites denhartogi</i>	GW30163	MH157909			
Suberitida	<i>Protosuberites denhartogi</i>	MC3715	KX601207			
Suberitida	<i>Protosuberites denhartogi</i>	MC4908	KX601208			
Suberitida	<i>Protosuberites denhartogi</i>	MC5215	KX601210			

(continuação)

Ordem	Espécie	Voucher	28S	COX1	16S	ITS2
Suberitida	<i>Protosuberites denhartogi</i>	MC5288	KX601211			
Suberitida	<i>Protosuberites denhartogi</i>	MC5556	KX601209			
Suberitida	<i>Protosuberites denhartogi</i>		AY561916			
Suberitida	<i>Protosuberites ectyoninus</i>	UBAPOR01	KX601205			
Suberitida	<i>Protosuberites incrustans</i>	ZMAPOR20543	KX601206			
Suberitida	<i>Protosuberites mereui</i>	PROTOBM03	KX601212			
Suberitida	<i>Protosuberites</i> sp.	POR14649	AY561915	AY561979		
Suberitida	<i>Pseudosuberites hyalinus</i>	NIWA28894		LN850222		
Suberitida	<i>Pseudosuberites nudus</i>	NIWA28874		LN850223		
Suberitida	<i>Pseudosuberites nudus</i>	NIWA29152		LN850224		
Suberitida	<i>Pseudosuberites</i> sp.	POR06588	AY561919			
Suberitida	<i>Pseudosuberites</i> sp.	UCMPWC1069	AY561917			AY561917
Suberitida	<i>Pseudosuberites</i> sp.	UCMPWC956	AY626317. AY561913			
Suberitida	<i>Pseudosuberites sulphureus</i>	Mc3359	HQ379246. 321.388			
Suberitida	<i>Rhizaxinella</i> sp.	G319653	AY561910	AY561983		AY561910
Suberitida	<i>Rhizaxinella</i> sp.			KJ546357		
Suberitida	<i>Spongosorites genitrix</i>		X57260			
Suberitida	<i>Stylocordyla chupachups</i>	NIWA28902		LN850241		
Suberitida	<i>Stylocordyla chupachups</i>	NIWA28936		LN850242		
Suberitida	<i>Stylocordyla chupachups</i>	NIWA29186		LN850243		
Suberitida	<i>Stylocordyla chupachups</i>	NIWA37228D		LN850189		
Suberitida	<i>Suberites aurantiacus</i>	P35	KC869577			
Suberitida	<i>Suberites aurantiacus</i>	STAIIFP3		EF519676		
Suberitida	<i>Suberites aurantiacus</i>	STAIIFP8		EF519677		
Suberitida	<i>Suberites aurantiacus</i>	STAIIFP2		EF519678		
Suberitida	<i>Suberites aurantiacus</i>	STAIIFP3		EF519679		
Suberitida	<i>Suberites aurantiacus</i>	STAIIFP4		EF519680		
Suberitida	<i>Suberites aurantiacus</i>	STAIIFP4B		EF519681		
Suberitida	<i>Suberites</i> cf. <i>caminatus</i>	NIWA52801		LN850254		
Suberitida	<i>Suberites diversicolor</i>	C1		KF568960		
Suberitida	<i>Suberites diversicolor</i>	C2		KF568961		
Suberitida	<i>Suberites diversicolor</i>	C3		KF568962		
Suberitida	<i>Suberites diversicolor</i>	C4		KF568963		
Suberitida	<i>Suberites diversicolor</i>	SPO46				KY565305
Suberitida	<i>Suberites diversicolor</i>		KF568965			
Suberitida	<i>Suberites domuncula</i>	MCZDNA105717		JX999078		
Suberitida	<i>Suberites domuncula</i>		AJ620113			
Suberitida	<i>Suberites domuncula</i>			NC_010496		
Suberitida	<i>Suberites ffcus</i>	Mc4322	HQ379247. 322.389	HQ379429		
Suberitida	<i>Suberites ffcus</i>		AY026381			
Suberitida	<i>Suberites ffcus</i>					AJ627184
Suberitida	<i>Suberites ffcus</i>			AJ843891		
Suberitida	<i>Suberites massa</i>	Mc4528	HQ379406. 324.390			
Suberitida	<i>Suberites massa</i>	POR14128	AY618723			
Suberitida	<i>Suberites pagurorum</i>	Mc4043	HQ379248. 323			
Suberitida	<i>Suberites pagurorum</i>			KC869422		

(continuação)

Ordem	Espécie	Voucher	28S	COX1	16S	ITS2
Suberitida	<i>Suberites</i> sp.	G300336		SBD677		
Suberitida	<i>Suberites</i> sp.	G300851		SBD613		
Suberitida	<i>Suberites</i> sp.	NCI291	KC869467			
Suberitida	<i>Suberites</i> sp.	NCI451	KC869500			
Suberitida	<i>Suberites</i> sp.	UCMPWC859	AY626315. AY561912			
Suberitida	<i>Suberites</i> sp.	UCMPWC859		AY561966		
Suberitida	<i>Suberites</i> sp.	UCMPWC859		AY561966		
Suberitida	<i>Suberites suberia</i>	POR14124	AY618724			
Suberitida	<i>Suberites suberia</i>	POR9726	AY319309	AF437295		
Suberitida	<i>Suberites topsenti</i>	NIWA28884		LN850246		
Suberitida	<i>Suberites virgultosa</i>	POR12969	AY618725			
Suberitida	<i>Terpios aploos</i>	NCI326	KC869465			
Suberitida	<i>Terpios aurantiaca</i>	POR10080	AY626316. AY561911			
Suberitida	<i>Terpios</i> cf. <i>australiensis</i>		AY561918			
Suberitida	<i>Terpios gelatinosus</i>	Mc3315	HQ379250. 325.391			
Suberitida	<i>Terpios gelatinosus</i>	Po.25564	KX688722			
Suberitida	<i>Terpios hoshinota</i>	RMNHPOR8732	KP764919			
Suberitida	<i>Vosmaeria crustácea</i>	APPor260sp1	EF646848			
Suberitida	<i>Vosmaeria crustácea</i>	APPor260sp2	EF646849			
Suberitida	<i>Vosmaeria crustácea</i>	APPor260sp3	EF646850			
Suberitida	<i>Vosmaeria crustácea</i>	APPor260sp4	EF646851			
Suberitida	<i>Vosmaeria crustácea</i>	APPor260sp5	EF646852			
Suberitida	<i>Vosmaeria crustácea</i>	APPor339sp1	EF646846			
Suberitida	<i>Vosmaeria crustácea</i>	APPor339sp2	EF646847			
Suberitida	<i>Vosmaeria reticulosa</i>	HL2354	EF646845			
Suberitida	<i>Suberites domuncula</i>				NC_010496	
Suberitida	<i>Hymeniacion sinapium</i>				NC_022450	
Suberitida	<i>Halichondria okadai</i>				NC_037391	
Tethyida	<i>Adreus fascicularis</i>	Mc4559		HQ379428		
Tethyida	<i>Axos cliftoni</i>	G300111	AY626308	AY561974		
Tethyida	Hemiasterellidae	NCI052	KC869615			
Tethyida	<i>Tectitethya keyensis</i>	NCI360	KC869616			
Tethyida	<i>Tectitethya keyensis</i>	SI06x144	KC869588			
Tethyida	<i>Tethya actínia</i>			NC_006991		
Tethyida	<i>Tethya seychellensis</i>	P09	KC869475			
Tethyida	<i>Tethya</i> sp.	SI06x109	KC869527			
Tethyida	<i>Tethya</i> sp.	UCMPWC957	AY626300			
Tethyida	<i>Timea</i> sp.	G313459	AY626303			
Tethyida	<i>Timea unistellata</i>			KC869427		
Tethyida	<i>Xenospongia patelliformis</i>	NCI335	KC869650			
Tethyida	<i>Tethya actínia</i>				NC_006991	
Tetractinellida	<i>Disyringa dissimilis</i>	NCI091	KC869622			
Tetractinellida	<i>Pachastrella</i> sp.	JR15	KC869483			
Tetractinellida	<i>Penares</i> cf. <i>alata</i>	NCI181	KC869466			
Tetractinellida	<i>Penares nux</i>	NCI450	KC869460			
Tetractinellida	<i>Stelletta fibrosa</i>	P24	KC869612			
Tetractinellida	<i>Tethyopsis mortenseni</i>	NCI168	KC869618			
Tetractinellida	<i>Geodia neptuni</i>				NC_006990	

(conclusão)

Ordem	Espécie	Voucher	28S	COX1	16S	ITS2
Trachycladida	<i>Trachycladus laevispirulifer</i>	WAMZ1186	AY626305			
Trachycladida	<i>Trachycladus</i> sp.	NCI325	KC869579			
Trachycladida	<i>Trachycladus stylifer</i>	NCI301	KC869453			
"Topsentiida"	<i>Axinyssa ambrosia</i>	POR14311	AY618707	AY625658		
"Topsentiida"	<i>Axinyssa cavernosa</i>	NCI452	KC869544			
"Topsentiida"	<i>Axinyssa</i> sp.	AXT.1		KX894481		
"Topsentiida"	<i>Axinyssa</i> sp.	AXT.2		KX894482		
"Topsentiida"	<i>Axinyssa</i> sp.	AXT.3		KX894483		
"Topsentiida"	<i>Axinyssa</i> sp.	AXT.4		KX894484		
"Topsentiida"	<i>Axinyssa</i> sp.	POR14501	AY618709	AY625659		
"Topsentiida"	<i>Ciocalypta carballoi</i>	Po.25633		KX866757		
"Topsentiida"	<i>Ciocalypta carballoi</i>	Po5633		KX866757		
"Topsentiida"	<i>Ciocalypta colorata</i>	SMF11646		SBD1779		
"Topsentiida"	<i>Topsentia halichondroides</i>	POR8450	AY618727	AY625676		
"Topsentiida"	<i>Topsentia ophiraphidites</i>	POR14312		AY625677		
"Topsentiida"	<i>Topsentia ophiraphidites</i>			NC_010204		
"Topsentiida"	<i>Topsentia</i> sp.	NCI053	KC869551			
"Topsentiida"	<i>Topsentia</i> sp.	P126	KC884837			
"Topsentiida"	<i>Topsentia ophiraphidites</i>				NC_010204	
	aff. <i>Protosuberites</i> sp.	040313-20		KJ620398		
	aff. <i>Protosuberites</i> sp.	190513-06		KJ620404		
	aff. <i>Protosuberites</i> sp.	Po.25768	KX688745			
17	459		178	195	16	105

>MN RJ19469 *Rhaphidostyla* sp. nov. MFE = -95.10 kcal/mol

[illegible]

.....(((((((.....(((((((((.....)))))))))..))))).-((((((-((((.....))))..))))).-.....(((((-(((.....))))..))))).-.....((((((-(((.....))))..))))).-.....)))))))).

>MNRJ21814 *Terpios gelatinosus* MFE = -84.70 kcal/mol

ACGUCUGUCUGAGAGUUUUCUUUACUGUGUACUCGUCCGACGAGUAUGUUUUGAGGUGUUGUC
CGAGCACUGGCGCGCGGCAUCCCUUGAAGUGACNCGUCUCUCUUGCCUCUGGGAGCGAGCAC
ACGGAUGCUGUGCGCGCUGCCGUUGGUACCUUGAGGCGGCAGUCGUGACCUGUCGUCAAUAAC
CUGAACCUAGAUAGGCGA

.....(((((((.....((((((....))))))..((((....((((((....)))..))))))..(((.....(((.....))))..))))).
 ..))))...)))))..)).(((.....))).....)))))))).))))).

>MNRJ15710 *Hymeniacidon caerulea* MFE = -88.30 kcal/mol

ACGUCUGUCUGAGAUUUGUUUUAACUCUGUGCCACACCCUGUGACAGGGUCGUGCACGAUGUG
AGGUGUUGUCUGACUGUGAGUGGGCCGACAUCCCUUGAAGCGAUGCAUCCCCUCCUGUCACUG
CAGGAGCGAGCACACCGAUGUUGUGCCACGCCACUGCGACGGCCUGGAACGGUGCGUGUGACCC
UUCUACGAACU**GAACCU**CAGAU**CAGGCGA**

$(((((.....(((((..(.(.....)))))....((((...(((...(.....))))).))),...)),...),...,)...),...))))).$

>MNRJ18436 *Hymeniacidon perlevis* MFE = -82.10 kcal/mol

ACGUCUGUCGAGAGUUUCUUAUCUGUACCGCCAGCUCGCGUGUCGCGUACGGUGUGAGG
AGUUGUCUCCGACGCGCUCUCGUUUCUGACAUCUUUGAAGUGAGGCGUCCCUCCUGACUGCA
GGAGCAAGCACACCCGUGCUGUGCGUGUUCUUGCGGCCGACGGGGACGGUGUGCGUGACCUGUC
ACUUCACAGAAUA**GAACCUACAGAUACGGCGA**

[illegible]

>MNRJ6777 *Amorfinopsis atlântica* MFE = -82.60 kcal/mol

ACUCUCUGUCUGAGAGUUU GCUUUACUGUGUACUCCACUGAGGCGUACGGUGUGAGGUGUUGU
UUGUGGGGAGUCUCUCCCAUGACAUCUUUGAAGUGAUGCACACCUCCCGAUUGCAGGAGCAAGC
ACACCGAUGCUGUGAGUGCUGCUGUGGUCGAUUGGUGGUUAUAUAUGUGACCUGUCACUCUCAU
GAAUU **GAAACCUCAGAUCAGGCGA**

~~CHOCOLATE~~

(((((.....(((((.....)))))))))..((((.....))))))....(((.....(((((.....)))))))).
.....((((.....))))).)

>MNRJ21803 *Halichondria melanodocia* MFE = -84.90 kcal/mol

ACGUCUGUCGAGAGUUU GUUUUACUGUGUACUCCCAUCGAGGUGAGGUGUACGAUGUGAGGA
GUUGUCUGUGGGUUUCUACCCGACAUCCCUUGAAGUGAUGCAUCCCCUCCGUUGUAGGAGC
AAACACACCGACGCUGAGUGAGCCUCUGCAAUCGAUUGGGGAUGGGUUGUGUGACCUGUCACU
UUACGAACUGAACCUCAGAUCAGGCGA

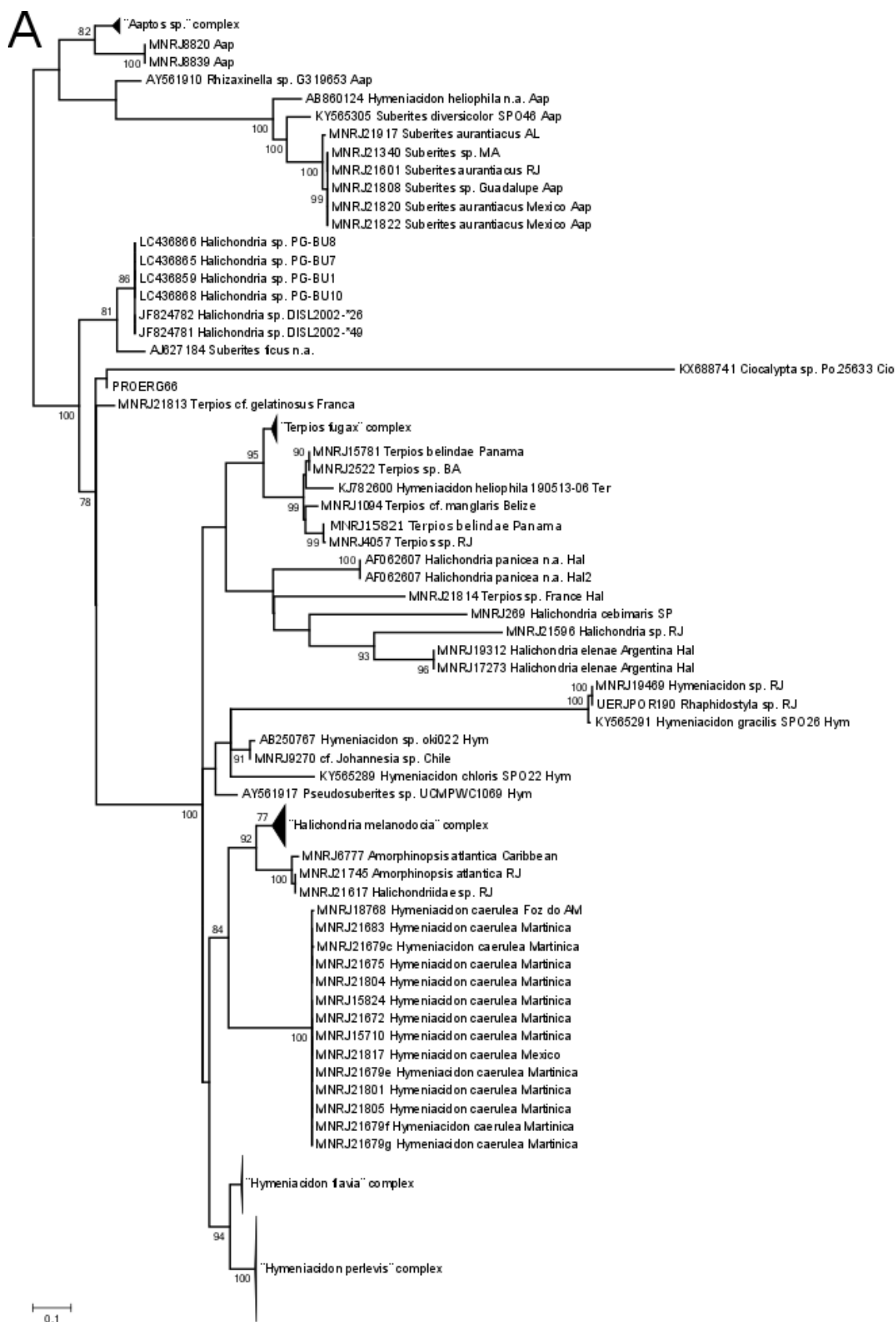
~~(.....(((.....((.....(.....))))))....((((..(((.....)))...))))).(((.....(((.....))))))....((((..(((.....)))...))))).~~

>MNRJ9270 cf. *Johannesia* MFE = -60.70 kcal/mol

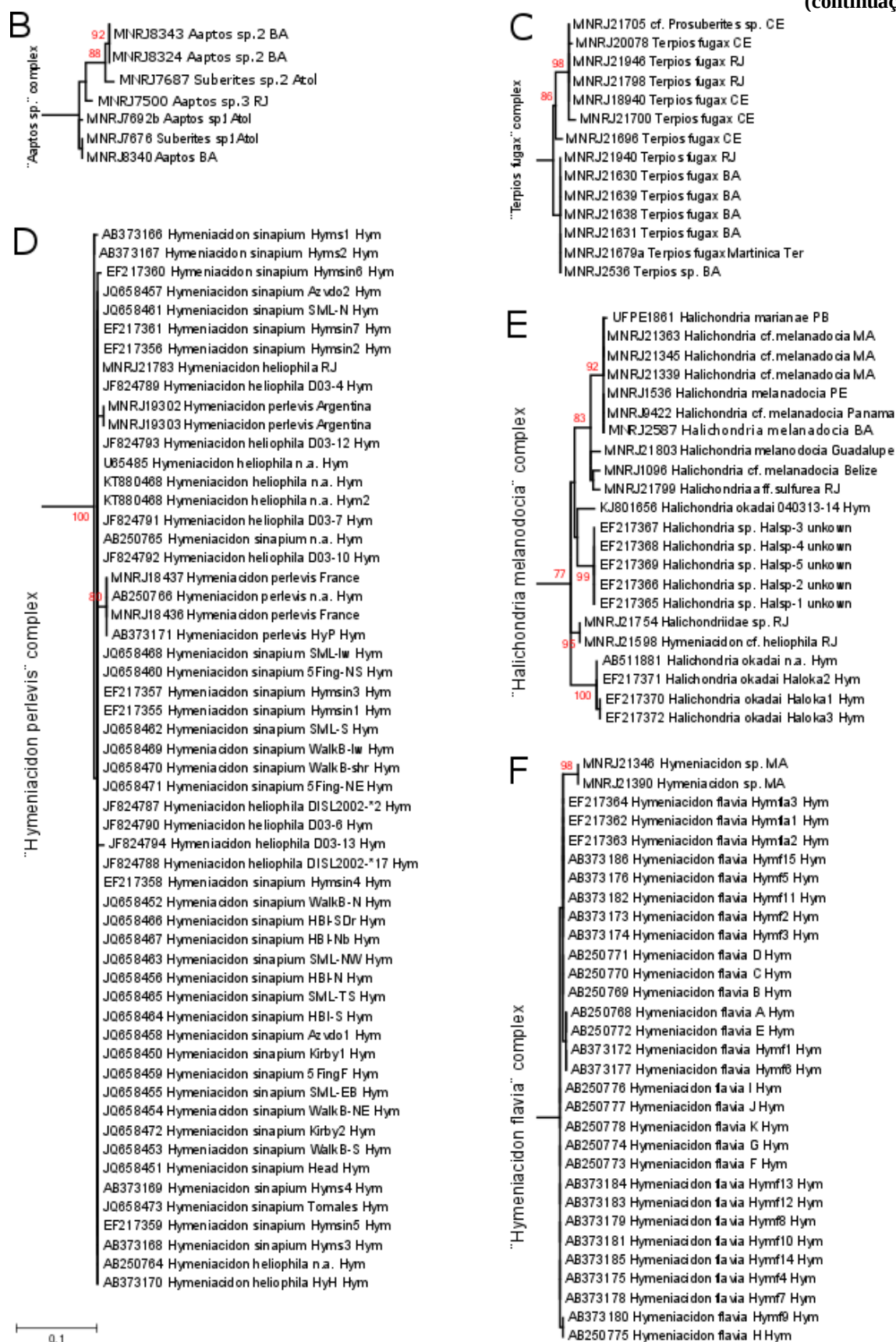
ACGUCUGUCUGAGAGUUUGCUUUACUGUGUACCGCCGGGAGGCCGGUUGCGUACGGUGUGAGG
UGUUGUCUCUGGGCUCGAGUCGUCCUGGACAUCCCUUGAAGUGAUGCGUCCCUCCCGACUUGCG
GGAGCAAGCACACCGAUGUCGUGCACUGCUUCCGCUUGCGCACUGGGACGGCACGUGUUGACCU
GUCGCUCUCACGAACUGAACCUCAGAUCAAGGCGA

.....(((((((.....))))))..))))).
).....).....)

APÊNDICE D – Relação filogenética completa das suberitidas (A). Detalhamento dos complexos de espécies (B-F) referentes aos triângulos observados na porção mais distal dos ramos em (A)



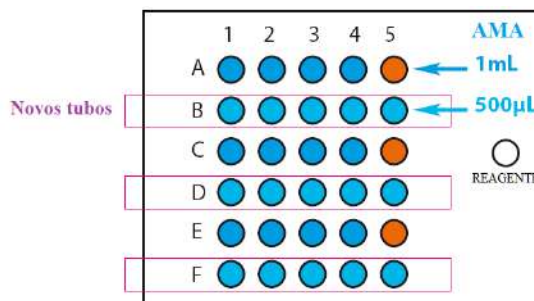
(continuação)



ANEXO A – Teste de bioatividade Microtox® com a bactéria *Aliivibrio fischeri*

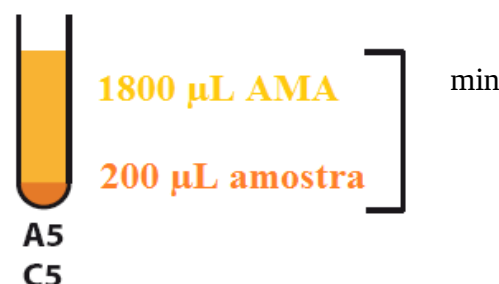
Coloque 1 mL de solução de reconstituição no frasco da bactéria e insira em REAGENTE. Esperar 15 min.

1. Coloque os tubos nas linhas B-D-F
2. Adicione 500 µL AMA + 10 µL reagente.



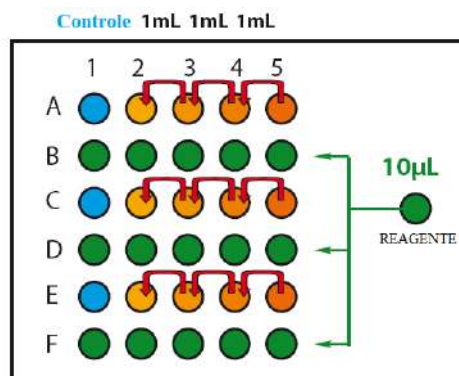
Dissolva as amostras com 2 mg/mL em água do mar artificial (AMA) com máximo de 2% de acetona.

3. Homogeneizar e colocar no ultrassom por 3
4. Adicionar 1 mL AMA + 1 mL amostra (apenas 3 amostras são realizadas por vez)
5. A5- C5 - E5 são para começar o teste



Preparação da amostra e reagente

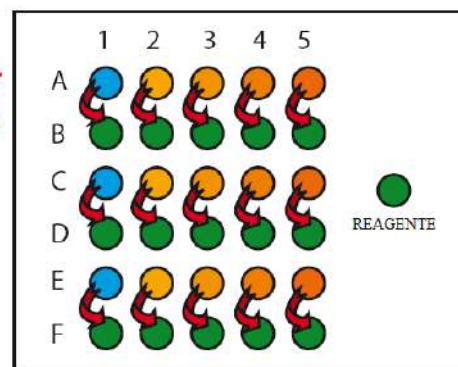
6. Passe 1 mL da solução em A5- C5 - E5 os frascos ao lado. Pare na coluna 2, pois a coluna 1 é o controle.
7. Coloque 10 µL de reagente em B-D-F e espere 15 min.
8. Fazer a leitura do teste - I₀: linhas B-D-
 - Siga o passo-a-passo do *software*.



Teste de toxicidade entre reagente e amostra.

9. Transfira 500 µL das amostras diluídas para os frascos só com reagente.
 - Siga o passo-a-passo do *software*.
10. Fazer a leitura do teste - I_t: linhas B-D-F.
 - Siga o passo-a-passo do *software*.
11. Tire foto dos gráficos e resultados que aparecem e salve no computador.

Transferir
500µL



Reinicie o *software* e comece a fazer novas amostras, pois as bactérias só podem ser utilizadas durante 3 h. Dependendo da agilidade, 3 a 5 sets de 3 amostras podem ser realizados com a mesma cepa bacteriana.

ANEXO B – Protocolo de extração de DNA com tampão de lise contendo Hidrocloreto de Guanidina (GuHCl) (Lôbo-Hajdu *et al.*, 1999)

1. Cortar um pedaço de esponja de aproximadamente 50 mm³, livre de epibiontes e transferir para um microtubo limpo de 1,5 mL;
2. Adicionar 500 a 700 mL de tampão TE (100 mL de solução de Tris-HCl - 1M, pH: 8,0 / 20 mL de EDTA - 0,5 M, pH: 8,0) neste tubo e incubar a amostra por 20-30 min para reidratá-la;
3. Centrifugar a 6000 RPM por 1 min, em temperatura ambiente;
4. Retirar o sobrenadante e deixar apenas o tecido da esponja no microtubo;
5. Adicionar 600 a 700 µL de GuHCl [4 M; Tris-HCl 50 mM; pH 8,0; EDTA 0,05 M; N' lauryl sarcosine 0,5%] e macerar a esponja com pistilo até que o tecido de desfaca completamente (caso não consiga desfazer o tecido, pode-se deixar o tecido em banho-maria a 36° C até que o tecido fique mais fácil de ser macerado);
6. Após a maceração, mantenha a solução incubada em banho-maria, 56° C por, no mínimo, 1 h (nesta fase haverá a lise das células liberando o DNA);
7. Adicionar o mesmo volume (600 a 700 µL) de clorofórmio (proporção 1:1) e misturar por inversão (nesta etapa ocorre a retirada de lipídeos e proteínas que se particionam nos solventes orgânicos, após a lise das membranas e da desnaturação das proteínas por ação do detergente, alto sal e da alta temperatura do processo de homogeneização);
8. Misturar por inversão e centrifugar a 6000 RPM por 3 min na temperatura ambiente;
9. Passar o sobrenadante (550 µL) para um microtubo de 1,5 mL limpo;
10. Adicionar igual volume de clorofórmio, misturar por inversão e centrifugar a 6000 RPM por 3 min, na temperatura ambiente;
11. Passar o sobrenadante (500 µL) para um microtubo de 1,5 mL limpo (se ainda houver detergente, repita o processo, retirando 50 µL, a cada limpeza);
12. Adicionar igual volume de isopropanol ao sobrenadante (proporção 1:1) previamente adicionado ao novo microtubo e levar ao freezer -20° C, por no mínimo 30 min (normalmente deixa-se *overnight*, assim o isopropanol age retirando a água de solvatação do DNA e, adicionada à baixa temperatura, aumenta a precipitação do DNA);
13. Centrifugar a 12000 RPM por 20 min em centrífuga refrigerada a 4° C;
14. Retirar todo o sobrenadante por inversão, secando o precipitado colocando o tubo de ponta-cabeça sobre uma folha de papel toalha;

15. Lavar o microtubo com 1 mL de etanol 70% gelado, agitando o tubo suavemente para ressuspender o precipitado, mas com cuidado para evitar a reidratação do DNA);
16. Centrifugar a 10000 RPM por 5 min em microcentrífuga refrigerada;
17. Remover o solvente e lavar novamente com 1 mL de etanol 70% gelado;
18. Centrifugar a 10000 RPM por 5 min em microcentrífuga refrigerada;
19. Remover todo o solvente e deixar o *pellet* secar, em estufa (cobrir os tubos com papel para que não haja contaminação na amostra);
20. Ressuspender o *pellet* em 50-100 μ L de solução de RNase, dependendo do tamanho do *pellet* (amostras antigas 20 μ g/mL e amostras novas 200 μ g/mL; 2 μ L RNase para 1 mL de água Miliq);
21. Incubar em banho-maria 36° C por 30 min;
22. Realizar a quantificação do DNA em Nanodrop e gel de agarose 0,8%.

Protocolo de extração de DNA com tampão de lise contendo Brometo de Cetil-Trimetil Amônio (CTAB) sensu de Paula (2016)

1. Cortar um pedaço de esponja de aproximadamente 50 mm³, livre de epibiontes e transferir para um microtubo limpo de 1,5 mL;
2. Adicionar 500 a 700 mL de tampão TE (100 mL de solução de Tris-HCl - 1M, pH: 8,0 / 20 mL de EDTA - 0,5 M, pH: 8,0) neste tubo e incubar a amostra por 20-30 min para reidratá-la;
3. Centrifugar a 6000 RPM por 1 min, em temperatura ambiente;
4. Retirar o sobrenadante e deixar apenas o tecido da esponja no microtubo;
5. Adicionar 500 μ L de tampão CTAB [2%; NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM; pH 8.0; SDS 0,5%] e macerar a esponja com pistilo até que o tecido de desfaça completamente (caso não consiga desfazer o tecido, pode-se deixar o tecido em banho-maria a 36° C até que o tecido fique mais fácil de ser macerado);
6. Misturar 200 μ L de CTAB, 2 μ L de proteinase K (10 μ g/ μ L) e 1 μ L de β -mercaptoetanol e adicionar aos microtubos;
7. Incubar o material em banho-maria, 56° C por, no mínimo, 1 h (nesta fase haverá a lise das células liberando o DNA);
8. Centrifugar a 6000 RPM por 1 min, em temperatura ambiente (separar e remover debris);
9. Transferir 600 μ L do solvente para um microtubo limpo;
10. Adicionar o mesmo volume (600 μ L, mantendo a proporção 1:1) de clorofórmio ao microtubo contendo a solução de lise e esponja (nesta etapa ocorre a retirada de lipídeos e

proteínas que se particionam nos solventes orgânicos, após a lise das membranas e da desnaturação das proteínas por ação do detergente, alto sal e da alta temperatura do processo de homogeneização);

11. Misturar por inversão e centrifugar a 6000 RPM por 3 min na temperatura ambiente;
12. Passar o sobrenadante (550 μ L) para um microtubo de 1,5 mL limpo;
13. Adicionar igual volume de clorofórmio, misturar por inversão e centrifugar a 6000 RPM por 3 min na temperatura ambiente;
14. Passar o sobrenadante (500 μ L) para um microtubo de 1,5 mL limpo (se ainda houver detergente, repita o processo, retirando 50 μ L, a cada limpeza);
15. Adicionar igual volume de isopropanol ao sobrenadante previamente adicionado e levar freezer -20° C, por no mínimo 30 min (normalmente deixa-se *overnight*, assim o isopropanol age retirando a água de solvatação do DNA, e adicionada à baixa temperatura aumenta a precipitação do DNA);
16. Centrifugar a 12000 RPM por 20 min em centrífuga refrigerada a 4° C;
17. Retirar todo o sobrenadante por inversão;
18. Lavar o microtubo com 1 mL de etanol 70% gelado, agitando o tubo suavemente (evitar a reidratação do DNA);
19. Centrifugar a 10000 RPM por 5 min em microcentrífuga refrigerada;
20. Remover o solvente e lavar novamente com 1 mL de etanol 70% gelado;
21. Centrifugar a 10000 RPM por 5 min em microcentrífuga refrigerada;
22. Remover todo o solvente e deixar o pellet secar, em estufa (cobrir os tubos com papel para que não haja contaminação na amostra);
23. Ressuspender o *pellet* em 50-100 μ L de solução de RNase, dependendo do tamanho do *pellet* (amostras antigas 20 μ g/mL e amostras novas 200 μ g/mL; 2 μ L RNase para 1 mL de água Miliq);
24. Incubar em banho-maria 36° C por 30 min;
25. Realizar a quantificação do DNA em Nanodrop e gel de agarose 0,8%.

ANEXO C – Preparação do gel de agarose com tampão de corrida Tris-acetato-EDTA (TAE) para visualização do DNA extraído e do produto de PCR

A preparação dos géis utilizados em ambas as etapas (Extração de DNA 0,8% e produto de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR, em inglês) 1,5%) seguem o mesmo protocolo, alterando apenas a concentração da agarose, a partir de uma mistura de tampão TAE, H₂O destilada e agarose (Na purificada GE Healthcare).

Tampão estoque: TAE 50X (Volume: 1 L - 242 g de Tris base, 57,1 mL Ácido Acético Glacial, 100 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0, H₂O destilada 1000 mL). Autoclavar.

Tampão de corrida: TAE 1X (Tris 40 mM, Ácido Acético 20 mM, EDTA 1mM) diluir a solução estoque 50X em água Milli-Q.

1. Montar a cuba de eletroforese em superfície horizontal sem desnível, certificando-se de que todas as partes estejam limpas;
2. Derreter o gel preparado com 10 µL de brometo de etídio (EtBr, 10 mg/mL) no micro-ondas (20 em 20 seg para não ferver);
3. Verter o gel dissolvido na bandeja e furar o gel com os pentes (o tamanho da bandeja depende do número de amostras analisadas);
4. Após a gelificação, verter o tampão de eletroforese na cuba e retirar o pente do gel;
5. Para extração de DNA, adiciona-se 2 µL de solução de DNA de bacteriófago λ10 e λ50 ng/µL como padrões de comparação nos dois primeiros poços;
6. Para produto de PCR adiciona-se no primeiro poço 2 µL de marcadores tipo “*ladder*” 100 bp para amplificações de produto de PCR (0,1 µg/µL);
7. Preparar as amostras de extração de DNA com uma mistura de 5 µL de amostra e 2 µL de tampão de carregamento de amostra ou *loading-buffer* (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol e 0,25% xilenocianol) e adicioná-las após os bacteriófagos. O glicerol aumenta a densidade do tampão e dois solventes de coloração azul correm com tamanhos diferentes de fragmento para poder observar a corrida do DNA, além de facilitar a visualização devido a cor;
7. Adiciona-se 3 µL de produto de PCR após o *ladder* e por fim adiciona-se os controles positivo (amostra que já funcionou em uma reação anterior) e negativo (solução de PCR sem DNA);

8. Fechar a cuba e conectar os fios na cuba e na fonte de energia, verificando estar corretamente colocados do (-) para o (+), uma vez que os ácidos nucleicos tem natureza negativa devido aos íons fosfato);
9. A voltagem de 90 V foi utilizada independentemente do tamanho do gel, sendo o tempo de corrida variável;
10. Ao final da corrida do DNA e do produto de PCR, desligar a fonte;
11. O gel deve ser colocado em transiluminador com tampa protetora;
12. Fotografias do gel foram feitas e o mesmo foi devolvido para o frasco para reutilização (caso o gel ainda possa ser reutilizado);
13. Lavar todo o material utilizado e guardar em seus devidos lugares.