



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE -  
PPGSHMA**

**Cleciana Maristela de Souza**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LÍQUIDOS METABÓLICOS  
E EXTRATOS MICELIAIS DE FUNGOS MARINHOS ISOLADOS DE CORAIS**

Vitória de Santo Antão

2017

**Cleciana Maristela de Souza**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LÍQUIDOS METABÓLICOS  
E EXTRATOS MICELIAIS DE FUNGOS MARINHOS ISOLADOS DE CORAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Saúde Humana e Meio Ambiente.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Idjane Santana de Oliveira

Vitória de Santo Antão

2017

Catálogo na fonte  
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV.  
Bibliotecária Ana Lígia F. dos Santos, CRB4-2005

S719a Souza, Cleciana Maristela de  
Avaliação da atividade antimicrobiana de líquidos metabólicos e extratos miceliais de fungos marinhos isolados de corais. / Cleciana Maristela de Souza. Vitória de Santo Antão, 2017.  
54 folhas: fig.; tab.

Orientadora: Idjane Santana de Oliveira  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CAV, Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2017.

1. Antozoários. 2. Antibacterianos. 3. Fungos. I. Oliveira, Idjane Santana de (Orientadora). II. Título.

593.6 CDD (23.ed.)

**BIBCAV/UFPE-178/2017**

**Cleciana Maristela de Souza**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LÍQUIDOS METABÓLICOS  
E EXTRATOS MICELIAIS DE FUNGOS MARINHOS ISOLADOS DE CORAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.  
Área de concentração: Saúde Humana e Meio Ambiente.

Aprovada em: 22/02/2017.

---

Orientadora: **Dr.<sup>a</sup> Idjane Santana de Oliveira**  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Dr. Gustavo Rubens de Castro Torres**  
CETENE/UFPE

---

**Dr.<sup>a</sup> Lidiane Roberta Cruz da Silva**  
Departamento de Micologia - UFPE

---

**Dr. René Duarte Martins**  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

À Deus razão de tudo em minha vida, por me permitir mais esta conquista.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela oportunidade concedida, capacidade confiada e imenso amor.

À todos os familiares e amigos que contribuíram de alguma forma, em especial a minha Mãe Cleonice Antonia por todo cuidado e paciência, e a meus irmãos que sempre marcam minha vida com suas peculiaridades.

À minha orientadora Dra. Idjane Santana de Oliveira por acreditar em minha capacidade, pelo apoio e compreensão.

À amiga Laís Andrade por todo companheirismo em muitas das etapas do desenvolvimento do trabalho.

À amiga Katharine Wanderley por todas as contribuições.

À Professora Dra. Lidiane Roberta Cruz da Silva por todas as contribuições científicas e conselhos para a vida.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente pela disponibilidade dispensada.

À Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória – UFPE-CAV.

À CAPES pela bolsa de mestrado Concedida.

À todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

“Depois que descobri em mim mesma como se pensa, nunca mais pude acreditar no pensamento dos outros”.

(Clarice Lispector).

# AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LÍQUIDOS METABÓLICOS E EXTRATOS MICELIAIS DE FUNGOS MARINHOS ISOLADOS DE CORAIS

## RESUMO

Fungos filamentosos produzem uma ampla diversidade de metabólitos secundários que tem significativo impacto na sociedade. Alguns metabólitos são explorados pela sua atividade como antibióticos e outros estão envolvidos em doenças, na interação dos fungos com os mais variados substratos. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi isolar e identificar fungos filamentosos associados a corais, bem como testar a atividade antimicrobiana dos respectivos extratos metabólicos. Foram coletados fragmentos de sete espécies de Coral a saber: *Favia gravida*, *Palythoa caribaeorum*, *Protopalythoa variabilis*, *Zoanthus sociatus*, *Millepora alcicornis*, *Siderastrea siderea* e *Carijoa riisei* na Praia de Porto de Galinhas-PE. Após isolamento em quatro meios de cultura, Ágar Sabouraud, Extrato de Malte, Tubaki e Batata Dextrose Ágar, foram obtidos e preservados 64 isolados fúngicos, sendo os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* os mais frequentes nas amostras de corais isoladas tanto em período de verão quanto inverno. Após isolamento os fungos foram cultivados em meio Líquido Sabouraud, Batata Dextrose ou Extrato de Malte para avaliar a atividade antimicrobiana. Foram obtidos 384 amostras de metabólicos brutos (líquido e extrato micelial) após cultivo dos fungos. Sendo o líquido metabólico obtido apenas pela filtração do meio de cultivo após 20 dias de incubação e o Extrato micelial após maceração do micélio em diferentes solventes orgânicos de polaridades distintas. Os melhores resultados de atividade antibacteriana foram dos líquidos metabólicos dos isolados COP6.2 e CO6.3 identificados como *Aspergillus aculeatus* e *Aspergillus fumigatus*, respectivamente. A amostra do fungo CO6.3 apresentou atividade antibacteriana na menor concentração mínima inibitória (125 ul ml<sup>-1</sup>) de líquido metabólico contra *Shiegella flexneri*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Kocuria rhizophila* e frente a bactéria *Streptococcus pyogenes* o resultado foi ainda melhor chegando a menor concentração de 62,5 ul ml<sup>-1</sup>. Podendo ser considerado um resultado relevante, considerando a dificuldade em se encontrar na natureza antimicrobiana para bactérias Gram negativas.

**Palavras-Chave:** Fungo marinho. Bactéria. Antibacteriano.

# EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF METABOLIC LIQUIDS AND MICELIAIS EXTRACTS OF MARINE FUNGI ISOLATED FROM CORALS

## ABSTRACT

Filamentous fungi produce a wide diversity of secondary metabolites that have significant impact on society. Some metabolites are operated by your activity as antibiotics and others are involved in diseases, fungal interaction with a wide range of substrates. In this context, the objective of this study was to isolate and identify filamentous fungi associated with corals, as well as test the antimicrobial activity of their metabolic extracts. Were collected fragments of seven Coral species: *Favia gravida*, *caribaeorum*, *Protopalythoa Palythoa Zoanthus sociatus*, *variabilis*, *Millepora alcornis*, *sidereal* and *Siderastrea Carijoa riisei* in Porto de Galinhas-PE. After isolation in four culture media, Sabouraud Agar, malt extract, Potato Dextrose Agar and Tubaki, were obtained and preserved 64 fungal isolates, being the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* the most frequent in the isolated coral samples both in summer as winter. After isolation fungi were grown on Sabouraud liquid medium, potato Dextrose or malt Extract to evaluate antimicrobial activity. 384 metabolic samples were obtained gross (liquid and Mycelial extract) after cultivation of fungi. Being the metabolic liquid obtained by filtration of the medium after 20 days of incubation and the Mycelial Extract after maceration of the mycelium in different organic solvents of different polarities. The best results of antibacterial activity of metabolic isolates were liquid COP6.2 and CO6.3 identified as *Aspergillus aculeatus* and *Aspergillus fumigatus*, respectively. The sample of the fungus CO6.3 presented antibacterial activity in smaller minimum inhibitory concentration (125  $\mu$ l ml<sup>-1</sup>) of liquid metabolic against *Enterobacter cloacae*, *Shiegella flexneri*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Kocuria rhizophila* and front the bacterium *Streptococcus pyogenes* the result was even better getting the lowest concentration of 62.5  $\mu$ l ml<sup>-1</sup>. And may be considered a relevant result, considering the difficulty find antimicrobial in nature for Gram-negative bacteria.

**Keywords:** Marine fungus. Bacteria. Antibacterial.

## **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1.1      Diversidade de Corais coletados na Praia de Porto de Galinhas.
- Figura 1.2      Distribuição de Gêneros Fúngicos isolados de Cnidários coletados em Porto de Galinhas.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.1      Diversidade de Gêneros fúngicos encontrados por espécie de Coral.
- Tabela 1.2      Número de isolamento de fungos filamentosos associados as respectivas espécies de corais em quatro meios de cultura em duas coletas em Porto de Galinhas – PE.
- Tabela 1.3      Extratos Metabólicos com atividade Antimicrobiana, bactéria utilizada e Concentração Mínima de Atividade.
- Tabela 1.4      Líquidos Metabólicos com atividade Antimicrobiana, bactéria utilizada e Concentração Mínima de Atividade.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS	Ágar Sabouraud
ATCC	American Type Culture Collection. Aflatoxinas
BD	Batata Dextrose Líquido
BDA	Batata Dextrose Ágar
CAV	Centro Acadêmico de Vitória
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
ME	Extrato de Malte Líquido
MEA	Extrato de Malte Ágar
MH	Mueller Hinton
MHA	Mueller Hinton Ágar
mL	Mililitro
MRSA	Staphylococcus aureus resistente à meticilina
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
ORSA	Staphylococcus aureus resistente à Oxacilina
SAB	Sabouraud Líquido
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Meio TUBAKI
TCC	Cloreto de 2,3,5-trifeniltretazólio
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
YES	Sacarose extrato de levedura
µg.mL <sup>-1</sup>	Micrograma por mililitro.

## LISTA DE SIMBOLOS

t	intervalo de tempo
h	horas
%	porcentagem
$\mu\text{L}$	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
<b>4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS BRUTOS DE FUNGOS ISOLADOS DE CORAIS COLETADOS DA PRAIA DE PORTO DE GALINHAS, PE, BRASIL</b> .....	<b>25</b>
<b>5 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>43</b>
<b>ANEXO A Normas da Revista</b> .....	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas marinhos representam mais de 95% da biosfera e comportam uma ampla variedade de organismos que produzem substâncias bioativas potentes, únicas e diversificadas, as quais são resultantes de suas adaptações às complexas condições impostas pelo meio (SCHWARTSMANN et al., 2001). Essas substâncias têm sido alvo de investigações devido ao grande potencial de aplicação industrial, como fármacos, cosméticos, suplementos nutricionais, sondas moleculares, produtos químicos finos e agroquímicos (DEVI; RAJENDRAN; SUNDARAM, 2011).

Estudos envolvendo a biossíntese dessas substâncias têm mostrado que muitas das moléculas bioativas inicialmente encontradas em plantas e animais marinhos são de fato produzidas ou metabolizadas por seus micro-organismos associados (DAVIDSON et al., 2001; TARMAN et al., 2011; SANTOS, 2015). Desta forma, é uma área interessante a pesquisa com micro-organismos associados a corais, esponjas entre outros animais marinhos.

Corais são invertebrados marinhos e sésseis. Estruturalmente são organismos muito simples, apresentando uma simetria radiada, com tecidos especializados, embora não possuam sistemas e órgãos (RUPPERT; BARNES, 1996). A disposição espacial de microrganismos em cada parte do hospedeiro favorece a ocorrência de interações intercelulares e interespecífica criando assim complexas comunidades altamente diferenciadas e especializadas (ROHWER et al., 2002). Essa diversidade de superfícies habitáveis permite também, que os micro-organismos associados desenvolvam respostas adaptativas específicas, como a produção de toxinas, moléculas sinalizadoras e outros metabolitos secundários, que são utilizados como estratégias de defesa para prevenir a colonização ou crescimento de potenciais competidores (EGAN et al., 2008).

A vida no mar exige adaptações em seus habitantes para adequar a sua maquinaria bioquímica a fim de lidar com condições extremas, que impliquem exposição a altas pressões hidrostática, alta salinidade, temperaturas variáveis, baixa de oxigênio e luz. Assim, os organismos podem ter o potencial para induzir

vias metabólicas primárias e secundárias para dar origem a metabolitos estruturalmente únicos e potencialmente ativos (NIU S. et al., 2015).

A diversidade microbiana pode ter um papel importante na manutenção da qualidade dos ecossistemas e pode ser utilizada como indicadora de qualidade (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; NUNES, 2006). No entanto, a variedade destes micro-organismos é tão vasta quanto desconhecida, pois o estudo da abundância microbiana apresenta muitos obstáculos, como as dimensões microscópicas, descrições taxonômicas incompletas e inexistência de meios de isolamento e cultivo apropriados para a vasta maioria dos micro-organismos (HUNTER-CEVERA, 1998). Através de ferramentas biotecnológicas, essa diversidade microbiana pode ser acessada como uma importante fonte para a descoberta de novas drogas, agentes terapêuticos e moléculas bioativas, com aplicação nas áreas médicas, industriais e ambientais (EGAN et al., 2008).

O desenvolvimento de pesquisas utilizando micro-organismos marinhos tornou-se importante pela grande diversidade de espécies que podem ser isoladas. Também pela possível variedade e ineditismo das moléculas obtidas, pela possibilidade de cultivo *in vitro* visando à produção em escala industrial com custo mais reduzido do que na síntese química e ainda por evitar a realização de repetidas coletas, como necessário para plantas e animais (LIRA, 2007).

Os fungos são os principais decompositores da cadeia alimentar e em ambientes marinhos são colonizadores de substratos lenhosos e herbáceos que incluem madeira submersa, manguezais, areia, plantas, sedimentos, algas, invertebrados, estuário, plâncton e até resíduos plásticos (ZETTLER et al., 2013).

Vários são os substratos utilizados para a obtenção de fungos e montagem da coleção para estudos de compostos bioativos. Gomes (2007) estudou os fungos filamentosos isolados de sedimento do manguezal de Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil, e encontrou uma grande diversidade de fungos filamentosos associados ao substrato estudado.

Em outra pesquisa foram encontrados fungos em troncos submersos no mar e troncos nas águas do Ártico, o que apoia a ideia demonstrada sobre o potencial para isolamento de linhagens fúngicas marinhas eficazes para os mais diversos substratos (RÄMÄ et al., 2014). Nas últimas duas décadas, fungos filamentosos

marinhos tem sido reconhecidos como uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos e incomuns (BLUNT et al., 2014).

Os fungos estão entre os organismos eucariontes mais importantes na produção de compostos bioativos. Apesar disso, apenas 7% de aproximadamente 1,5 milhões de espécies são conhecidas, e desses, apenas uma pequena parcela já foi investigada como fonte de novos metabólitos secundários (SURYANARAYANAN et al., 2009). Os fungos marinhos são recursos promissores de produtos naturais, seu potencial ainda não foi totalmente investigado. Existem possivelmente inúmeros fungos marinhos contendo novas estruturas notáveis, bem como compostos bioativos (LIBERR et al. 1995; EBEL, 2010). Tarman et al. (2011) descreveram o isolamento e a elucidação da estrutura de um novo produto natural a partir de um fungo marinho isolado de uma alga vermelha e sua atividade antimicrobiana frente a bactérias patogênicas a humanos e a peixes.

Pelo método de cultivo de micro-organismos os compostos podem ser produzidos em quantidade necessária para o desenvolvimento de química medicinal e ensaios clínicos. Entre as cepas de fungos marinhos cultiváveis mais investigados, os fungos do gênero *Aspergillus* são a fonte mais prolífica de metabólitos secundários bioativos, incluindo esteróis (LIU et al., 2014). Diante da permanente busca de novos produtos naturais com atividade antibacteriana produzida pelos fungos derivados de ambiente marinho houve o recente isolamento de novos compostos bioativos a partir do extrato bruto do fungo *Aspergillus similanensis* associados esponja marinha (PROMPANYA et al., 2014).

Levando-se em consideração o fato de que a conservação e a utilização sustentável da diversidade biológica requer um conhecimento abrangente sobre a riqueza de espécies, abundância e distribuição, e que pouco se sabe sobre a diversidade biológica e funcional das comunidades microbianas marinhas, especialmente de corais, estudos envolvendo o isolamento, triagem e preservação de fungos derivados do mar podem levar à descoberta de novas moléculas ativas e/ou enzimas extracelulares de aplicação em diversos setores de importância sócio-econômica.

Diante do exposto temos que Metabólitos secundários de fungos extraídos a partir de organismos marinhos possuem capacidade de gerar compostos bioativos em benefício da saúde humana.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a atividade antimicrobiana de extratos metabólicos de fungos isolados de corais na Praia de Porto de Galinhas - PE.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

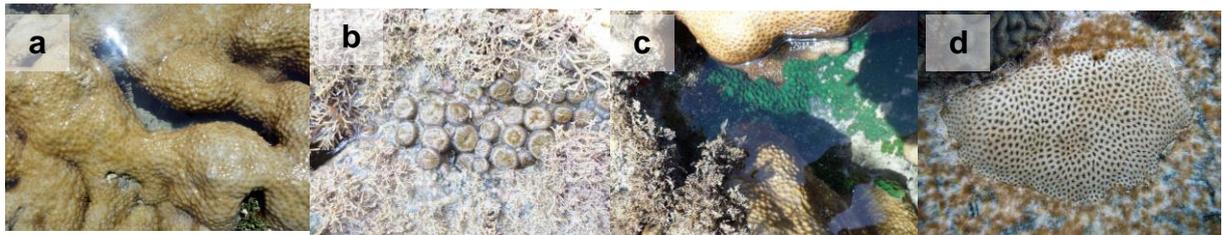
- Isolar, identificar e preservar fungos filamentosos obtidos a partir de fragmentos de corais.
- Comparar a aparição dos fungos quanto a sazonalidade.
- Estimular a produção de líquido e extrato metabólicos pelos fungos.
- Testar o potencial antimicrobiano dos líquidos metabólicos e extratos de micélio fúngico frente a bactérias patogênicas ao homem.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### O ambiente Recifal e Os Cnidários

Os recifes de corais são um dos ecossistemas mais espetaculares e complexos do mundo e são caracterizados pela mais alta densidade de animais de todos os ambientes do planeta, além de apresentarem diversidade comparável àquela encontrada em florestas tropicais (SPALDING; RAVILIOUS; GREEN, 2001) (Figura 1.1).

Figura 1.1 – Diversidade de Corais coletadas na Praia de Porto de Galinhas. a) *Palythoa caribaeorum* b) *Protopalythoa variabilis* c) *Zoanthus sociatus* d) *Siderastrea sidérea*.



Fonte: Fotos da autora.

O filo Cnidaria é um conjunto de organismos bastante diverso que inclui as águas-vivas, anêmonas-do mar, corais, hidrozoários, gorgônias, entre outros, compreendendo cerca de 11.000 espécies existentes separadas em quatro classes: Hydrozoa, Anthozoa, Scyphozoa e Cubozoa (BRUSCA; BRUSCA, 2007). Os cnidários bentônicos são de considerável importância ecológica nos ambientes recifais por apresentarem associações com uma variedade de invertebrados. Além disso, os ambientes de substratos consolidados construídos por esses animais provêm maior estabilidade e proteção para muitos indivíduos sésseis (BAYER, 1961).

A simbiose em corais é caracterizada por uma associação fechada e dinâmica entre o animal (hospedeiro) e uma diversidade de micro-organismos associados (simbiontes) incluindo, protozoários, fungos, arqueas, bactérias e vírus (WEGLEY et al., 2007; LINS-DE BARROS et al., 2010; RYPIEN; WARD; AZAM, 2010).

As relações íntimas entre simbiontes e hospedeiros sugere uma evolução paralela de cnidários e simbiontes (FURLA; ALLEMAND; SHICK, 2005) e o

conhecimento dos micro-organismos associados aos corais é crítico para o entendimento sobre a evolução, distribuição no presente e o futuro destino de recifes de coral e dos ecossistemas que os suportam (MUSCATINE; PORTER, 1977).

Blunt et al. em trabalhos de revisão entre 2000 e 2012, observaram que os organismos marinhos com maior número de estudos são as esponjas, seguidas das algas, em menor número os cnidários e dos micro-organismos simbiotes ou associados, observando-se para estes últimos, um crescente número de substâncias isoladas.

As ameaças aos recifes de coral em todo o mundo dão caráter de urgência às pesquisas nos referidos ambientes e o conhecimento da comunidade microbiana associada a corais e como tais associações mudam ao longo do tempo é uma das principais ferramentas para o conhecimento da saúde dos recifes (BOURNE; MUNN, 2005). O monitoramento da comunidade de simbiotes ao redor do mundo é essencial para o conhecimento da resposta a longo prazo dos recifes de coral frente às mudanças climáticas (YELLOWLEES; REES; LEGGAT, 2008).

### **Fungos Associados a Organismos Marinhos**

Estima-se que o Reino Fungi apresente, aproximadamente, 1,5 milhões de espécies, com representantes habitando praticamente todos os ecossistemas existentes no planeta (HAWKSWORTH, 2001). Algumas espécies são importantes patógenos de plantas, de animais e do homem, outros são capazes de estabelecer uma relação mutualística com seu hospedeiro, quer seja planta, alga, cianobactéria ou animal (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; MUELLER; BILLS; FOSTER, 2004).

Os fungos são seres eucariotos, podendo ser haplóides, diplóides ou poliplóides; possuem parede rígida quitinosa constituída de polímeros de amino-açúcares. São heterotróficos, desprovidos de clorofila e incapazes de produzir energia por meio da luz e do gás carbônico. Os fungos são altamente eficientes na degradação de ampla variedade de substratos (MINAMI, 2003). Os microrganismos marinhos se tornaram importante fonte de compostos biologicamente ativos, mais especificamente, os fungos pela diversidade de metabólitos secundários produzidos, e relatados na literatura (BUGNI; IRELAND, 2004; CRUZ et al. 2006; GESNER et al. 2005; SHIGEMORI et al. 2004).

O interesse em micologia marinha surgiu após estudos publicados em 1944, onde os autores demonstraram a existência de microrganismos marinhos que cresciam e reproduziam-se em pedaços de madeira submersos após determinados períodos de tempo (DAMARE, 2006). Na mesma década Proksch et al. (2008) isolaram o fungo marinho *Cephalosporium acremonium* de amostras de água do mar da região da Sardenha (Itália), fonte da cefalosporina C, precursora de modernos compostos antibióticos que são indispensáveis para o tratamento de numerosas infecções bacterianas

Os fungos filamentosos derivados de ambiente marinho, têm sido foco de interesse e estudos devido principalmente, ao fato de pouco se conhecer sobre a biodiversidade e recursos genéticos dos micro-organismos que habitam o referido ecossistema. Acredita-se que as características físico-químicas únicas do ambiente marinho propiciaram aos fungos adaptações fisiológicas especiais, as quais podem ser exploradas do ponto de vista biotecnológico (HYDE et al., 2000).

A pesquisa de fungos derivados do ambiente marinho já levou a descoberta de mais de 272 novos compostos, incluindo muitos com estrutura única (IRELAND, 2004). Esses fungos são geralmente denominados fungos derivados do ambiente marinho. Isto se explica pelo fato de que o ambiente marinho compreende fungos obrigatoriamente marinhos e também espécies facultativas. Fungos marinhos crescem e esporulam exclusivamente no habitat natural, enquanto os facultativos habitam ambientes terrestres ou de água doce, mas também consegue se desenvolver no ambiente marinho (DAS; LAYA; KHAN, 2006; BUNGUI; IRELAND, 2004).

A adaptação metabólica dos fungos ao meio marinho explicaria o fato de que, aproximadamente, 30% dos fungos marinhos que produziram novos compostos pertencem aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, representantes abundantes no meio terrestre (JENSEN; FENICAL, 2002). Somente no ano de 2008, segundo revisão de Blunt et al. (2010), entre os 231 microrganismos marinhos e fitoplâncton isolados, 33 pertenciam ao gênero *Penicillium* e 56 ao gênero *Aspergillus* evidenciando a fácil adaptação a vida marinha.

Essa diversidade dos gêneros fúngicos e o número de isolados por amostra variam consideravelmente de acordo com a localidade. Fungos marinhos dos gêneros *Acremonium*, *Arthrium*, *Coniothyrium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phoma*, *Trichoderma*, e *Verticillium* foram isolados nas regiões temperada, subtropical e

tropical, com diferentes prevalências de gênero por região. Adicionalmente certos fungos predominam dependendo do organismo em estudo, e a prevalência de gênero pode variar no mesmo organismo coletado em uma mesma região (HÖLLER et al., 2000).

O papel dos fungos associados ao coral tem sido descrito quase sempre como relações de parasitismo ou mutualismo, o contexto pode ser determinante em tal relação. Colocação filogenética e dados ambientais fornecem relativamente um pequeno *insight* sobre essas questões. Porque o estado trófico, funcionalidade e morfologia variam de acordo com as espécies relacionadas. Muitos dos fungos detectados no estudo de Amend et al. (2012) pertencem a clados de parasitas, incluindo fungos patogênicos de plantas e dermatófitos, tais como *Malassezia*, mas a relação Coral-fungo pode não necessariamente indicar parasitismo. Ainda Sobre o estudo de Amend estudos de taxonomia funcional e de transcriptoma indicam que fungos associados a Coral representam uma diversificada comunidade metabolicamente ativa. Porém pouco se sabe de fato como se dá estas relações e espera-se que, com trabalhos futuros possam-se desvendar a funcional relação nutritiva entre estes organismos.

### **Metabólitos Secundários de Fúngicos Marinhos**

No que se refere à química de microrganismos, o descobrimento da penicilina, isolada dos fungos *Penicillium notatum* e *P. chrysogenum*, em 1929 foi o passo inicial para o início das pesquisas de metabólitos ativos, porém o real interesse nesta substância como potencial antibiótico deu-se somente na década de 40, quando reduziu em 10 vezes o número de mortalidade no período entre a Primeira e a Segunda Guerra Mundial (BUGNI e IRELAND, 2004; BUTLER, 2004; TAKAHASHI e LUCAS, 2008). Desde então, os fungos terrestres têm sido fonte de classes de metabólitos como cefalosporinas, ciclosporinas, griseofulvinas (PIETRA, 1997), sendo superados somente pelos Actinomicetos.

A partir do metabolismo fúngico, pode-se dispor de diversos compostos naturais que apresentam atividades biológicas. O metabolismo dos fungos pode ser dividido em duas partes: primário, o qual fornece energia e precursores químicos às células, que são essenciais para o crescimento e reprodução dos organismos; e o secundário que não aparenta ter função óbvia no crescimento celular (BRAKHAGE et al., 2010).

Entre os fungos microscópicos, certos gêneros como *Aspergillus* e *Penicillium* (conhecidos por sua ubiquidade e caracterizados geralmente pela formação abundante de esporos) têm sido utilizados para a busca de compostos bioativos, sendo que de aproximadamente 6.500 metabólitos bioativos de fungos microscópicos, mais de 30% foram obtidos destes dois gêneros (TAKAHASHI; LUCAS, 2008; SURYANARAYANAN et al., 2009).

Dentro deste contexto, a prospecção química de metabólitos fúngicos apresenta-se como uma perspectiva de suma importância, pois sabe-se que microrganismos podem ser cultivados em larga escala em fermentadores, produzindo uma série de moléculas bioativas que podem atuar no combate a patógenos. Ademais, há possibilidade de que novos compostos de valor econômico sejam descobertos, como novos antibióticos, antifúngicos, agentes terapêuticos, produtos químicos, enzimas, entre outros (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

A produção de metabólitos secundários por fungos em geral envolve enzimas que não são usadas no crescimento e frequentemente começa quando o crescimento cessa, na fase estacionária da curva de crescimento fúngico. O período no qual existe a produção dos metabólitos secundários é denominado idiófase, que ocorre em seguida do período de crescimento, denominado trofófase (BENTLEY; BENNETT, 1988). Pouco é conhecido sobre as funções que os metabólitos podem desempenhar para os organismos dos quais se originaram. Frequentemente existe uma correlação próxima entre a produção de metabólitos secundários e diferenciação na cultura líquida, ou seja, somente em simbiose estes microrganismos produzem compostos diferenciados (GLOER, 2007; PROKSCH et al., 2008).

Considerando o grande número de substâncias isoladas dos fungos marinhos, sabe-se que cerca de 70-80% apresentam atividades biológicas (FAULKNER, 2001; FAULKNER, 2002), principalmente, atividade antibiótica e antitumoral (PIETRA, 1997; BUGNI; IRELAND, 2004; MAYER; HAMANN, 2005, BHADURY et al., 2006; BLUNT et al., 2007). Também são relatadas as atividades de inibição do ciclo celular, inibição da fosfatase/quinase, antiviral, antioxidante, antiinflamatória e antiprotozoária (KELECOM, 2002; BLUNT et al., 2004; BUGNI; IRELAND, 2004; MAYER e HAMANN, 2005; BLUNT et al., 2006, 2007, 2011).

Wang et al. (2011) isolaram do coral *Echinogorgia rebekka* no sul da China, 18 isolados diferentes de fungos filamentosos. Entre eles fungos dos gêneros

*Aspergillus*, *Penicillium*, *Nigrospora* e *Alternaria*. Esses isolados foram submetidos a testes de produção de antimicrobianos, sendo constatado que *Penicillium* e *Cladosporium* inibiram o crescimento de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus tetragenus*, demonstrando que o ambiente marinho pode ser importante fonte de novos compostos bioativos, especialmente antibióticos.

### **Antibióticos e Atividade Antimicrobiana de Fungos Marinhos**

Antibióticos são definidos como compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de microrganismos. Quando causam a morte das bactérias são chamados bactericidas e, quando promovem a inibição do crescimento microbiano, bacteriostáticos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Os antibióticos são os metabólitos secundários mais conhecidos, classe de compostos que forma um grupo heterogêneo de moléculas biologicamente ativas com diferentes estruturas e modos de ação, que atuam sobre DNA, RNA, síntese de proteínas, na função da membrana plasmática, no transporte de elétrons, esporulação, germinação e muitos outros alvos (DEMAIN, 2000).

A questão da emergência das infecções e da resistência bacteriana está relacionada a mudanças de origem comportamental, tecnológica, econômica e ambiental que permeiam as sociedades modernas. Por exemplo, as mudanças de estilos de vida, o desenvolvimento de testes diagnósticos mais precisos, o aumento exponencial da população, associado ao aumento da prevalência de indivíduos imunodeprimidos e de sua sobrevivência, a elevação do consumo indiscriminado de agentes antimicrobianos, as limitações de medicamentos antimicrobianos e a utilização destas substâncias nos alimentos são alvos apontados como fatores associados ao aparecimento de resistência antimicrobiana, permitindo a subsequente seleção de espécies resistentes e tornando-se responsáveis por esse sério problema de saúde pública mundial. (MCPHEE; PAPADAKIS; RABOW, 2011; AGUIAR et al., 2012). O uso indiscriminado de antibióticos é citado como um dos principais fatores do surgimento de bactérias resistentes aos fármacos presentes no mercado, por isso, se faz indispensável à busca por substâncias naturais com atividades antimicrobianas (CARVALLO et al., 2002; SADER et al., 2001).

Novas abordagens para o desenvolvimento de novos antibióticos tem sido realizadas, como ferramentas de química combinatória. Porém apenas poucos novos antibióticos tem sido produzidos pelas indústrias farmacêuticas atualmente.

Portanto, a busca por novos antibióticos continua a fim de combater patógenos emergentes, bactérias, fungos resistentes e micro-organismos previamente suscetíveis que desenvolveram resistência, para melhorar as propriedades farmacológicas e para descobrir compostos mais seguros, potentes e de amplo espectro (CORTEZ LOPES, 2011).

Segundo a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas, cerca de 2 milhões de infecções resistentes à drogas são relatadas a cada ano, ocasionando aumento de custos para o sistema de saúde (34 bilhões de dólares por ano) (MAHAJAN; BALACHANDRAN, 2012). O estudo da resistência bacteriana geralmente é baseado em microrganismos de importância epidemiológica, tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e fungos leveduriformes, responsáveis por diferentes processos infecciosos. Por exemplo, *S. aureus* resistente à meticilina (também conhecido como MRSA - Methicillin-resistant *S. aureus*) é uma bactéria muito propagada em ambientes hospitalares que se tornou resistente a vários antibióticos. De acordo com o centro para Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC), infecções causadas por *Staphylococcus* ocasiona mais óbito nos EUA do que a AIDS (MAHAJAN; BALACHANDRAN, 2012).

Resistência bacteriana é um dos maiores desafios de saúde pública global desde o uso da penicilina nos anos 40, obrigando as indústrias farmacêuticas a desenvolverem novas estratégias de combate a infecções bacterianas emergentes. Muitas bactérias apresentam, de forma intrínseca, resistência a mais de uma classe de agentes antimicrobianos. Alguns dos mecanismos que as bactérias possuem para driblar e resistir ao ataque dos antibióticos são: (a) aquisição de genes codificadores de enzimas que podem degradar ou modificar quimicamente o antibiótico levando a inativação, (b) bombas de efluxo fazendo com que ocorra expulsão do antibiótico pela célula antes que atinja o alvo e (c) mudança de permeabilidade da membrana pela aquisição de genes ou mutações que limitam o acesso do agente ao alvo via 'downregulation' dos genes de porinas (TENOVER, 2006; SALMOND; WELCH, 2008). Desta forma, a exploração de novas fontes para o isolamento de compostos e moléculas que sejam capazes de reverter algumas destas situações são necessárias.

Em estudo Vita-Marques et al. (2008) testaram a atividade antimicrobiana de fungos isolados na costa de São Paulo. Entre os 57 isolados de fungos avaliados,

somente um apresentou fraca atividade para *Pseudomonas aeruginosa* e três apresentaram boa inibição da levedura *Candida albicans*.

Em recente revisão sobre fungos isolados de diversos substratos de origem marinha Jim et al. (2016) encontraram resultados relevantes no que diz respeito a atividade antibacteriana de fungos marinhos. A partir do Coral *Dichotella gemmacea* foi isolado o fungo *Aspergillus versicolor*, e a partir deste foram isolados dois derivados de nucleosídeos que apresentaram atividade antimicrobiana frente *Staphylococcus epidermidis* com valor de MIC de 12,5 ul ml<sup>-1</sup>. Ao observar estudos relacionados a plantas de mangue o estudo mais relevante sobre o assunto se refere a um fungo endofítico da planta *Avicennia marina*, a partir desta foram isolados cinco novos compostos, destes, três apresentaram atividade contra *S.aureus*, com valores de MIC de 32.0, 0.25 e 8.0 µg/mL. Nos estudos relacionados a fungos obtidos de Algas o mais relevante se tratou do fungo *Aspergillus ustus* isolado de uma alga verde, um dos compostos isolados do fungo apresentou atividade contra *S. aureus* e *E. coli*. Em se tratando dos estudos sobre a água do mar o resultado que mereceu destaque está relacionado ao fungo *Trichoderma sp.* isolado do mar da Groelândia, os compostos isolados a partir de seus metabólitos apresentaram ação inibitória contra a bactéria *S. epidermidis* com resultado de MIC de 24 ul ml<sup>-1</sup>.

Diante das informações expostas, justifica-se pesquisar sobre a microbiota de corais, especialmente fungos cultiváveis com aplicação biológica para atividade antimicrobiana. Principalmente no que se refere ao litoral do Nordeste, que mesmo sendo tão vasto existem escassos estudos sobre o tema na região.

## 4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS BRUTOS DE FUNGOS ISOLADOS DE CORAIS DA PRAIA DE PORTO DE GALINHAS, PE, BRASIL

### 4.1 RESUMO

Fungos filamentosos produzem metabólitos explorados pela atividade como antibióticos, a partir de diferentes substratos em ambiente marinho. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi isolar e identificar fungos filamentosos associados a Corais da praia de Porto de Galinhas-PE, BR; bem como testar a atividade antimicrobiana destes fungos frente a bactérias patogênicas ao homem. Foram coletados as seguintes espécies de coral para estudo: *Favia gravida*, *Palythoa caribaeorum*, *Protopalythoa variabilis*, *Zoanthus sociatus*, *Millepora alcicornis*, *Siderastrea siderea* e *Carijoa riisei*. Os fragmentos coletados foram plaqueados em placas de Petri, à medida que se expressavam eram realizados repiques. Após isolamento foram obtidos 63 isolados fúngicos, pertencendo aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Talaromyces* e *Syncephalastrum*. Foram obtidos 384 amostras de metabólicos brutos (líquido e extrato micelial) após cultivo dos fungos em meio líquido Sabouraud e Batata Dextrose para avaliar a atividade antimicrobiana. Os melhores resultados de atividade antibacteriana foram dos líquidos metabólicos das espécies *Aspergillus aculeatus* (COP6.2) e *Aspergillus fumigatus* (CO6.3). A amostra do fungo CO6.3 apresentou atividade antibacteriana na menor concentração mínima inibitória ( $125 \text{ ul ml}^{-1}$ ) de líquido metabólico contra *Shiegella flexneri*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Kocuria rhizophila* e *Streptococcus pyogenes*. Um resultado relevante, considerando a dificuldade em se encontrar na natureza antimicrobianos para bactérias Gram negativas.

**Palavras Chave:** MIC, bactéria, fungo marinho, extrato micelial

## Antimicrobial activity of crude extracts of fungi isolated from corals of Porto de Galinhas, PE, Brazil

### 4.2 ABSTRACT

Filamentous fungi produce metabolites operated by activity as antibiotics, from different substrates in the marine environment. In this context, the objective of this study was to isolate and identify filamentous fungi associated with Corals of Porto de Galinhas-PE, BR; as well as test the antimicrobial activity of these fungi pathogenic to bactérias front man. Were collected the following coral species to study: *Favia gravida*, *Palythoa caribaeorum*, *Protopalythoa variabilis*, *Zoanthus sociatus*, *Millepora alcicornis*, *Siderastrea siderea* and *Carijoa riisei*. The fragments were plaqueados in Petri dishes, as they expressed were carried out raises. After isolation 64 fungal isolates were obtained, belonging to the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Talaromyces* and *Syncephalastrum*. 384 metabolic samples were obtained gross (liquid and Mycelial extract) after cultivation of fungi in Sabouraud liquid medium and Potato Dextrose to evaluate antimicrobial activity. The best results of antibacterial activity were metabolic fluids of *Aspergillus aculeatus* (COP6.2) and *Aspergillus fumigatus* (CO6.3). The sample of the fungus CO6.3 presented antibacterial activity in smaller minimum inhibitory concentration (125 ul/ml-1) of liquid metabolic against *Enterobacter cloacae*, *Shiegella flexneri*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Kocuria rhizophila* and *Streptococcus pyogenes*. A relevant result, considering the difficulty find antimicrobial in nature for Gram-negative bacteria.

**Keywords:** MIC, bacteria, marine fungi, extract mycelia.

### 4.3 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas marinhos representam mais de 95% da biosfera e comportam uma ampla variedade de organismos que produzem substâncias bioativas potentes, únicas e diversificadas, as quais são resultantes das adaptações às complexas condições impostas pelo meio (SCHWARTSMANN et al., 2001). Tais substâncias têm sido alvo de investigações devido ao grande potencial de aplicação industrial, como fármacos, cosméticos, suplementos nutricionais, sondas moleculares, produtos químicos finos e agroquímicos (DEVI; RAJENDRAN; SUNDARAM, 2011).

Estudos envolvendo a biossíntese dos referidos compostos têm mostrado que muitas das moléculas bioativas inicialmente encontradas em plantas e animais marinhos são de fato produzidas ou metabolizadas por micro-organismos associados (DAVIDSON et al., 2001; TARMAN et al., 2011; SANTOS, 2015). Segundo Rohwer et al., (2002) a disposição espacial dos micro-organismos em cada parte do hospedeiro favorece a ocorrência de interações intercelulares e interespecífica criando assim complexas comunidades altamente diferenciadas e especializadas. Tal diversidade de superfícies habitáveis permite também, que os micro-organismos associados desenvolvam respostas adaptativas específicas. Dentre estas respostas, destacam-se a produção de toxinas, moléculas sinalizadoras e outros metabolitos secundários, que são utilizados como estratégias de defesa para prevenir a colonização ou crescimento de potenciais competidores (EGAN et al., 2008).

A diversidade microbiana pode ter um papel importante na manutenção da qualidade dos ecossistemas e pode ser utilizada como indicadora dessa qualidade (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; NUNES, 2006). No entanto, a variedade destes micro-organismos é tão vasta quanto desconhecida, pois o estudo da abundância microbiana apresenta muitos obstáculos, como as dimensões microscópicas, descrições taxonômicas incompletas e inexistência de meios de isolamento e cultivo apropriados para a vasta maioria dos micro-organismos marinhos (HUNTER-CEVERA, 1998).

O desenvolvimento de pesquisas utilizando micro-organismos, como os fungos marinhos tornou-se importante pela ampla diversidade de espécies que podem ser isoladas, bem como pela variedade de metabólitos que podem ser produzidos por estes micro-organismos (LIRA, 2007). Dentre estes metabólitos, destacam-se os que apresentam atividade antimicrobiana (PROMPANYA et al., 2014).

A conservação e a utilização sustentável da diversidade biológica requer conhecimento abrangente sobre a riqueza de espécies, abundância e distribuição, e que pouco se sabe sobre a diversidade biológica e funcional das comunidades marinhas microbianas. Estudos envolvendo o isolamento, triagem e preservação de fungos derivados do mar podem levar à descoberta de novas moléculas ativas e/ou enzimas extracelulares de

aplicação em diversos setores de importância sócio-econômica. Diante do exposto o presente estudo teve por objetivos avaliar a atividade antimicrobiana de extratos metabólicos de fungos isolados de corais coletados na Praia de Porto de Galinhas, PE, Brasil.

#### 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

##### *Coleta dos corais*

Foram realizadas duas coletas durante a maré baixa na região rochosa do mesolitoral ao longo da barreira de corais da Praia de Porto de Galinhas – PE (8°33'33"S e 34°59'00"W). A primeira, foi realizada em janeiro de 2016, durante o período seco, com pluviosidade média de 0,0 mm. A segunda, foi realizada em maio de 2016, durante período chuvoso, com pluviosidade média de 30,0mm. As coletas foram autorizadas pelo SISBIO (ICMBio nº 03/2014), através da liberação Número: 50226-1, bem como da Secretaria de Meio Ambiente da Cidade de Ipojuca, conforme norma técnica 154/2007 do MMA.

As amostras de corais foram coletadas com auxílio de martelo e formão, no caso dos corais duros e de bisturi, no caso dos corais moles, ao serem coletados eram acondicionados em sacos plásticos estéreis com água do mar e mantidos em recipiente térmico. Até serem processadas, no processamento foram lavadas com água do mar previamente esterilizada com intuito de eliminar os micro-organismos presentes no exterior dos corais e realizado o plaqueamento direto em placa de Petri e amostras foram separadas para identificação por especialista da área.

##### *Isolamento e purificação dos fungos filamentosos*

Para o isolamento dos fungos filamentosos foram utilizados os meios de cultura: Extrato de Malte ágar (MEA), Meio TUBAKI (TB), Ágar Sabouraud (AS) e Batata Dextrose Ágar (BDA). Todos os meios de cultivo utilizados foram preparados com água do mar natural esterilizada e o antibiótico Cloranfenicol (300 mg L<sup>-1</sup>) a fim de inibir o crescimento de bactérias. Foi realizado o plaqueamento direto dos fragmentos de coral, sendo estes fragmentos de 1 a 1,5 cm, para a fragmentação dos corais moles foi utilizado bisturi estéril, para os corais duros martelo e formão previamente esterilizados. As placas foram mantidas em temperatura ambiente e acompanhados por 20 dias, ao longo dos quais os fungos que se expressaram foram repicados, isolados e purificados por fragmentação de micélio nos respectivos meios de cultura sólidos onde foram originalmente obtidos.

A fim de purificar os isolados de fungos filamentosos, fragmentos de colônias de fungos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo. Após confirmação da pureza, as culturas de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* foram

mantidas em Ágar Extrato de Malte (MEA) e os demais gêneros em Batata Dextrose Ágar (BDA) a 25 ° C ( $\pm 2$  °C).

#### *Identificação das espécies através da taxonomia clássica*

Para a identificação através de taxonomia clássica de todas as amostras de fungos foram observadas características macroscópicas (coloração, aspecto e diâmetro das colônias) e microscópicas (microestruturas somáticas e reprodutivas). A identificação foi realizada através de literatura específica, como: Klick & Pitt (1988); Klich (2002), Pitt (1991), Raper & Thom (1949), Samson et al., (2004), Ellis (1971), Ellis (1976), Carmichael et al., (1980), Sutton (1980), Domsch et al., (1993), Klich (2002), Hesseltine & Fennel (1995), Benny (1982), Schipper (1978), Schipper (1984), Schipper (1990), Domsch (1993), dentre outros.

#### *Preservação dos fungos filamentosos marinhos*

Um representante de cada espécie identificada foram preservados em água destilada esterilizada, através do método Castellani (1967), bem como em óleo mineral esterilizado, para estudos posteriores, conforme protocolos descritos por Sola et al., (2012).

#### *Produção de extratos metabólicos*

Para a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* cada isolado foi inoculado em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo meio de cultura líquido, idêntico ao que foi isolado. Em cada Erlenmeyer, contendo 50 mL do meio de cultura líquido (Sabouraud, Batata Dextrose, Extrato de Malte ou TUBAKI), foram inoculados três discos de micélios com aproximadamente 3 mm de diâmetro. Os frascos foram incubados de forma estática, durante 20 dias, a temperatura ambiente e luminosidade não controladas. Após este período, o líquido metabólico foi separado da massa micelial através de filtração, utilizando papel de filtro estéril. A partir da massa micelial foram obtidos extratos orgânicos por sistema de esgotamento a frio, de acordo com metodologia descrita por Ribeiro et al. (2006).

#### *Análise da atividade antimicrobiana de extratos metabólicos*

As bactérias patogênicas ao homem testadas frente aos extratos e líquidos metabólicos foram obtidas da coleção de cultura do Departamento de Antibióticos da UFPE: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Acinetobacter baumani* (ATCC 19606), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, e Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Staphylococcus aureus* ORSA (Resistente à Oxacilina), *Kocurie rhizophila* (ATCC 9341), *Streptococcus pyogenes*.

O teste de atividade antimicrobiana foi conduzido segundo procedimento da norma técnica da ANVISA M7-A6 Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), em triplicata.

Para o teste, foram distribuídos 100 µL do meio caldo Mueller-Hinton (MH) HIMEDIA® em todos os poços da placa de 96 poços, em seguida, foram adicionados 100 µL de cada metabólito na 1ª fileira da placa (sentido horizontal). Posteriormente, realizou-se diluição seriada dos metabólitos até os poços da fileira G. Foi utilizada uma suspensão bacteriana correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland com solução salina 0,85 %, correspondente a uma concentração de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Esta solução foi diluída 1:90 a fim de obter a suspensão padrão. Depois, foram distribuídos 20 µL da suspensão bacteriana em cada poço na placa, exceto os poços controle. A placa foi vedada e incubada na estufa a 37 °C por 18-24 h. Para leitura dos testes foi observada a menor concentração dos metabólitos que teve ação de inibir o crescimento bacteriano, após revelação com corante vital.

Após a incubação de crescimento, adicionou-se 20 µL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (1% v/v) em água destilada, a cada poço das placas, que foram levadas para incubação de revelação durante 02 horas em temperatura ambiente. Nos poços onde as amostras não apresentam ação antimicrobiana, ocorre a formação da coloração vermelha. Essa coloração se deve à reação do TTC com os íons hidrogênio formados durante a respiração celular, e que origina uma substância vermelha e insolúvel, conhecida como formazan, indicando a presença de células bacterianas viáveis no meio (JOHNSON et al., 1985; RAHMAN et al., 2004).

A concentração inibitória mínima (CIM) corresponde à menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano nos poços via leitura a olho nu (CLSI, 2012), ao passo que a concentração bactericida mínima (CBM) é a menor concentração em que o composto apresenta ação bactericida (BARON e FINEGOLD, 1990). O uso do TTC dispensa a necessidade de inoculação do conteúdo dos poços onde foi obtida a CIM, uma vez que este demonstra de forma satisfatória em que poços ainda estão presentes células viáveis, e, portanto tanto a CIM como a CBM foram determinadas mediante uso do referido corante vital.

Como no presente trabalho os líquidos metabólicos foram testados em seu estado bruto, sem a separação dos compostos específicos, a atividade antimicrobiana foi avaliada no tocante às concentrações inibitórias determinadas para o método, sendo reduzida à metade a medida que se realiza cada diluição: 1000; 500; 250; 125; 62,50; 31,25; 15,63µL/mL. Os líquidos metabólitos utilizados no estudo foram testados após filtração. Por

se tratar de extratos brutos a atividade apresentada se dá em concentrações elevadas devido a presença de diversos componentes nos líquidos metabólicos fúngicos.

#### 4.5 RESULTADOS

Foram coletadas e identificadas sete espécies de corais na Praia de Porto de Galinhas- PE, como ilustrado na tabela 1.1, a saber: *Favia gravida* (Verrill, 1868), *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860), *Protopalythoa variabilis* (Duerden, 1898), *Zoanthus sociatus* (Ellis, 1768), *Millepora alcicornis* (Linnaeus, 1758), *Siderastrea siderea* (Ellis & Solander 1786) e *Carijoa riisei* (Duchassaing & Michelotti, 1860).

Ao todo, foram obtidos 62 isolados de fungos, distribuídos em seis gêneros, sendo: *Alternaria* (1), *Aspergillus* (32), *Penicillium* (18), *Talaromyces* (2), *Trichoderma* (7) e *Syncephalastrum* (2). Como ilustrado na Figura 1.2.

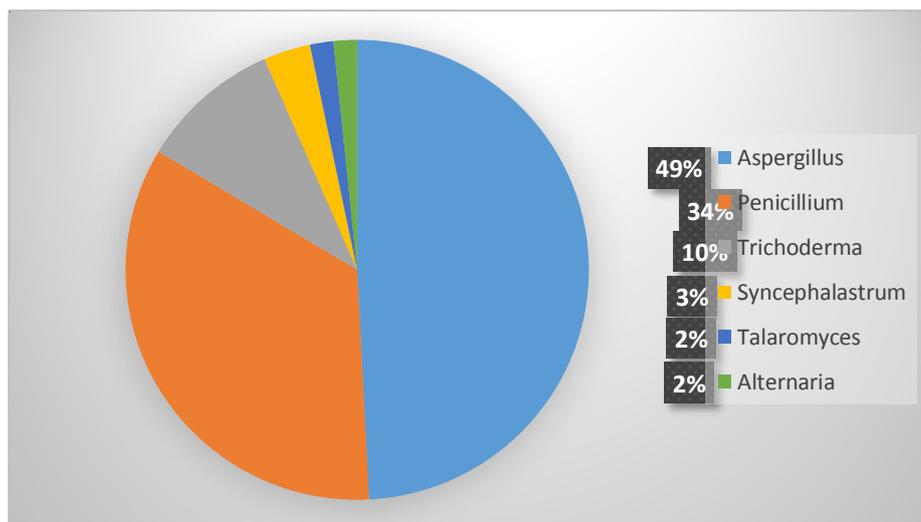


Figura 1.2 – Distribuição de Gêneros fúngicos isolados de Cnidários coletados na Praia de Porto de Galinhas

Quanto à sazonalidade, no período seco foram obtidos 31 isolados e no chuvoso 32. As espécies de corais que apresentaram maior número de isolados de fungos foram, *P. caribaeorum* (21) e *P. variabilis* (20) (Tabela 1).

Os gêneros mais representativos foram *Aspergillus* e *Penicillium*, com 32 e 18 espécies, respectivamente.

Quanto aos meios de cultura utilizados para o isolamento dos fungos, os meios MEA Tubaki e BDA, apresentaram maior número de isolados, sendo: 20, 18 e 16, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 1.1 – Diversidade de Gêneros fúngicos encontrados por espécie de Coral coletado

<b>Espécie de Coral</b>	<b>Gêneros Isolados</b>
<i>Favia gravida</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Palythoa caribaeorum</i>	<i>Aspergillus, Penicillium</i>
<i>Protopalythoa variabilis</i>	<i>Aspergillus, Penicillium, Trichoderma, Talaromyces, Alternaria</i>
<i>Zoanthus sociatus</i>	<i>Aspergillus, Penicillium, Trichoderma, Syncephalastrum</i>
<i>Millepora alcicornis</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Siderastrea siderea</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Carijoa riisei</i>	<i>Aspergillus, Penicillium</i>

Foi observado crescimento fúngico em todos os fragmentos de corais cultivados nos 4 meios de cultura utilizados. Entretanto, os meios de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), Ágar Extrato de Malte (MEA) e Tubaki, apresentaram maior recuperação de fungos (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 – Número de isolados de fungos filamentosos associados as respectivas espécies de corais em quatro meios de cultura em duas coletas em Porto de Galinhas – PE

<b>Espécies de corais</b>	<b>Meio de Cultura</b>			
	<b>BDA</b>	<b>MEA</b>	<b>TUB</b>	<b>AS</b>
<i>F. grávida</i>	1	0	1	0
<i>P. caribaeorum</i>	7	5	4	5
<i>P. variabilis</i>	4	9	7	0
<i>Z. sociatus</i>	2	5	0	2
<i>M. alcicornis</i>	2	1	0	2
<i>S. siderea</i>	0	0	3	0
<i>C. riisei</i>	0	0	3	0

Legenda - BDA- Batata Dextrose Ágar; MEA- Extrato de Malte; TUB- TUBAKI; AS- Ágar Sabouraud.

Foram testados 252 amostras de metabólitos brutos produzidos por fungos filamentosos isolados de diversas espécies de corais, sendo 63 do líquido metabólico obtido

por filtração da cultura líquida micelial em diferentes meios de cultivo e 189 extratos orgânicos de micélios fúngicos, obtidos utilizando-se três solventes de polaridades diferentes. Todo experimento foi realizado em triplicata. Dentre os testes realizados três extratos orgânicos e 25 líquidos metabólicos apresentaram atividade antimicrobiana.

Os fungos dos quais os extratos orgânicos apresentaram atividade antimicrobiana foram COP4.1 identificado como *Trichoderma koningii*, CO3.2 *Aspergillus carbonarius* CO2.2. Ambos apresentaram atividade com a fração Etérea do extrato orgânico. Sendo o isolado COP4.1 (*Trichoderma koningii*) o que apresentou atividade para maior diversidade de bactérias testadas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. CO3.2 (*Aspergillus carbonarius*) apresentou atividade apenas para a bactéria *S. aureus*. Enquanto o isolado CO2.2 *Penicillium sp.* Apresentou atividade apenas para *S. aureus*. Como pode ser observado na Tabela 1.3.

Tabela 1.3 – Extratos metabólicos que apresentaram atividade Antimicrobiana, bactéria utilizada e concentração mínima de atividade em µL.

Fungo	Ec	Ab	Sf	St	Ecl	Sm	Kp	Pa	Sa	ORSA	Kr	Sp
COP4.1 ÉTER ( <i>T. koningii</i> )	1000	-	-	-	-	-	-	1000	1000	-	-	1000
CO2.2 ÉTER ( <i>Penicillium sp.</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	-	-	-
CO3.2 ÉTER ( <i>A. carbonarius</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	-	-	-

Legenda: Ec - *Escherichia coli* (ATCC 25922), Ab - *Acinetobacter baumani* (ATCC 19606), Sf - *Shigella flexneri* (ATCC 12022), St - *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), Ecl - *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), Sm - *Serratia marcescens*, Kp - *Klebsiella pneumoniae*, Pa - *Pseudomonas aeruginosa*, As - *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e ORSA - *Staphylococcus aureus*, Kr - *Kocurie rhizophila* (ATCC 9341), Sp - *Streptococcus pyogenes*.

- Não apresentou atividade antimicrobiana.

Os líquidos metabólicos dos isolados COP6.2 e CO6.3 identificados como *Aspergillus aculleatus* obtido através do Coral *Zooanthus sociatus*, e *Aspergillus fumigatus* de *Siderastrea siderea* respectivamente. Apresentaram atividade contra todas as bactérias testadas: *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumani*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, ORSA - *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacilina,

*Kocurie rhizophila*, e *Streptococcus pyogenes* em variadas concentrações como mostrado na tabela 1.4.

Tabela 1.4 – Concentração mínima inibitória dos Líquidos metabólitos e Fungos que apresentaram atividade antimicrobiana.

Fungo	Ec	Ab	Sf	St	Ecl	Sm	Kp	Pa	Sa	ORSA	Kr	Sp
<i>A.aculleatus</i> (COP6.2)	500	500	500	500	500	500	500	500	250	500	500	500
<i>A. fumigatus</i> (CO6.3)	500	500	125	250	125	125	125	125	500	250	125	62,5
<i>Syncephalastrum sp</i> (COP11.6)	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	-	-	-
<i>P. citrinum</i> (COP10.7)	1000	-	-	-	-	-	-	-	1000	-	-	-
<i>A. carbonarius</i> (CO3.2)	1000	-	-	-	-	-	-	-	500	-	-	-
<i>P. citrinum</i> (CO8.2)	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	-	-	-
<i>P. paxilli</i> (CO2.5)	1000	-	-	-	-	-	1000	-	1000	-	-	-
<i>Syncephalastrum sp.</i> (COP9.1)	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. waksmanii</i> (COP11.2)	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. citrinum</i> (COP5.2)	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. parasiticus</i> (CO8.1)	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. viride</i> (COP9.3)	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus sp.</i> (COP7.1)	1000	-	-	-	-	-	-	-	125	-	-	-
<i>Penicillium sp.</i> (CO7.4)	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. citrinum</i> (CO3.6)	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. flavus</i> (CO3.1)	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. flavus</i> (CO2.4)	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. Parasiticus</i> (COP11.3)	1000	-	-	-	-	-	-	-	500	-	-	-
<i>A. Parasiticus</i> (COP2.1)	-	-	-	-	-	-	-	-	250	-	-	-
<i>P. citrinum</i> (COP5.1)	-	-	-	-	-	-	-	-	250	-	-	-
<i>Aspergillus sp.</i> (COP7.2)	1000	-	-	-	-	-	-	-	1000	-	-	-
<i>A. viridinutans</i> (COP10.1)	1000	-	-	-	-	-	-	-	1000	-	-	-
<i>P. citrinum</i> (COP1.1)	-	-	-	-	-	-	-	-	500	-	-	-
<i>Penicillium sp.</i> (COP9.4)	-	-	-	-	-	-	-	-	500	-	-	-

Legenda: Ec - *Escherichia coli* (ATCC 25922), Ab - *Acinetobacter baumani* (ATCC 19606), Sf - *Shigella flexneri* (ATCC 12022), St - *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), Ecl - *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), Sm - *Serratia marcescens*, Kp - *Klebsiella pneumoniae*, Pa - *Pseudomonas aeruginosa*, As - *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e ORSA - *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacilina, Kr - *Kocurie rhizophila* (ATCC 9341), Sp - *Streptococcus pyogenes*.

- Não apresentou atividade antimicrobiana.

#### 4.6 DISCUSSÃO

Com relação a recuperação dos fungos nos diferentes meios de cultura utilizados resultado semelhante foi encontrado por Menezes et al. (2010) ao estudar a diversidade de fungos associados a algas, ascídias e esponjas encontrando no meio de cultura MEA, melhores resultados quanto à recuperação de fungos filamentosos.

O aparecimento de fungos em todos os fragmentos coletados corrobora com o relato de Jones (2000) de que condições determinantes para a presença de fungos no ambiente marinho são relatadas indicando que os fatores que influenciam o crescimento de fungos no mar ou associados a organismos marinhos são: a disponibilidade de substrato para colonização, distribuição geográfica e temperatura, salinidade, competição por inibição, microhabitat, nutrientes orgânicos dissolvidos, concentração de hidrogênio, efeitos osmóticos, disponibilidade de oxigênio, poluentes, abundância de propágulos na água, habilidade de aderir em um substrato, pressão hidrostática, especificidade do substrato e luminosidade. Todos esses fatores associados contribuíram para a distribuição dos fungos nos substratos coletados.

Após identificação morfológica dos isolados, os gêneros encontrados nos corais foram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Syncephalastrum*, *Alternaria* e *Talaromyces*. A prevalência do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* corrobora os achados relacionados a microbiota fúngica a partir de organismos marinhos como: fitoplâncton, algas, esponjas, Cnidários, Briozoários, moluscos, tunicados, equinodermes e manguezais como afirma Blunt et al.(2010) que em revisão sobre o assunto observou a prevalência destes dois gêneros evidenciando a grande capacidade adaptativa destes a vida marinha.

A prevalência do gênero *Aspergillus* se mostra promissora no tocante a possibilidade metabólicos ativos com atividade antimicrobiana, confirmado pelo trabalho de Xu et al. (2015) que em estudos relatou ser *Aspergillus* um dos gêneros de fungos marinhos dominante cujas estirpes produziram muitos dos novos compostos antibacterianos e antifúngicos descobertos, mais do que qualquer outro gênero encontrado.

A baixa frequência de fungos com atividade antimicrobiana significativa pode ser explicada pelo fato de Metabólitos Secundários apresentam algumas características como: distribuição taxonômica restrita - nem todas as linhagens de uma mesma espécie são capazes de produzir determinado metabólito-; não são essenciais para o crescimento e reprodução do organismo; condições de cultivo, especialmente a composição do meio, controlam a formação destes metabólitos; são produzidos como um grupo de estruturas intimamente relacionadas; podem ser superproduzidos e são codificados por conjuntos de genes dispensáveis (KELLER et al., 2005; MARTÍN et al., 2005; YU & KELLER, 2005; NIGAM, 2009).

A atividade antimicrobiana apresentada para as bactérias *E. coli*, *S. flexneri*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* Gram negativas é de suma importância pois estas apresentam maior resistência a medicamentos devido a estrutura da parede celular que é composta por uma camada de peptidoglicano e três outros componentes que a envolvem externamente, lipoproteína, membrana externa e lipopolissacarídeo, sendo a membrana externa rica em lipídios, torna-se impermeável a substâncias hidrofílicas e o único meio de entrada são as proteínas transmembrânicas, as porinas que controlam o que passa para dentro e fora da célula com base no tamanho molecular (VIGNOLI; SEIJA, 2007).

Nos testes de atividade antimicrobiana frente à linhagem de *S. aureus*, Gram-positiva, não-resistente, os líquidos metabólicos apresentaram melhores atividades inibitórias, atingindo menores concentrações. O resultado era esperado uma vez que segundo Guimarães, Momesso e Pupo (2010), bactérias Gram-negativas são mais resistentes à ação de antibióticos, em decorrência da natureza complexa da parede celular das mesmas, que não permite que os antibióticos transpassem efetivamente a barreira lipídica da camada externa dessas bactérias. Além disso, as bactérias Gram-negativas apresentaram maior sensibilidade, indicando que os extratos brutos possuem ação seletiva frente à constituição química da parede celular bacteriana. Sugerindo que talvez essa ação positiva se deva a polaridade do extrato (RIBEIRO 2015).

Considerando estudos com fungos isolados de organismos marinhos coletados no litoral Norte do Estado de São Paulo, cita-se Vita-Marques et al. (2008) que avaliaram, entre outras, atividade antibacteriana frente à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, e à levedura *Candida albicans* ATCC 10231. Entre os 57 isolados de fungos avaliados, somente um apresentou fraca atividade para *P. aeruginosa* e três apresentaram boa inibição da levedura. O que vem de encontro aos resultados obtidos com o presente trabalho, onde ao se considerar extratos brutos espera-se menores atividades biológicas devido a composição diversa dos extratos.

Diante dos resultados apresentados pôde-se perceber que os extratos orgânicos apresentaram menor atividade antimicrobiana, apenas no estado mais concentrado, e frente a uma pequena diversidade de bactérias, isso pode ser explicado pela necessidade que o fungo apresenta na natureza de lançar os metabólitos para meio externo a fim de melhor interagir com o ambiente ao seu redor. Ao lançar os metabólitos no meio externo as interações necessárias ocorrem de forma mais eficaz e com resposta mais rápida. Isso justifica o melhor desempenho dos líquidos metabólicos que conseguiu em um dos casos o valor de MIC de 62,5 µl ml<sup>-1</sup>. Confirmando que, mesmo o líquido apresentando em sua composição, além dos metabólitos secretados pelo fungo, os compostos do meio de cultura

utilizado, ainda assim a capacidade de inibir o crescimento das bactérias patogênicas ao homem ficou evidente nos testes, mostrando que a investigação dos compostos presentes no complexo pode gerar resultados ainda mais promissores.

#### 4.7 CONCLUSÕES

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho evidencia o potencial de fungos associados a organismos marinhos para a obtenção de produtos bioativos e abre perspectivas para a continuidade da pesquisa, uma vez que a resistência aos antibióticos continua a crescer em hospitais e na comunidade, envolvendo patógenos gram-positivos e gram-negativos; indicando ser esta área de grande relevância para a busca de novos fármacos. Uma vez que mesmo estudando os extratos brutos foram encontrados resultados positivos de ação antimicrobiana pelos fungos *A. aculleatus* e *A. fumigatus* frente a uma gama considerável de bactérias patogênicas dentre elas algumas Gram negativas. O fungo identificado como CO6.3 - *Aspergillus fumigatus*, apresentou atividade bastante significativa. Atingindo MIC de 62,5 µL frente a bactéria *Streptococcus pyogenes*, revelando que metabólitos de fungos do ambiente marinho apresentam potencial ação antimicrobiana, e abre perspectiva para estudos com relação aos compostos presentes nos extratos brutos utilizados no presente estudo, podendo revelar um potencial ainda maior das moléculas que constituem o extrato.

Diante dos resultados encontrados percebe-se a necessidade da intensificação dos estudos sobre a diversidade de fungos associados a Corais e de seus potenciais antimicrobianos, para que haja o entendimento do papel e das interações de fungos filamentosos na microbiota dos corais.

#### 4.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARON, E. J.; FINEGOLD, S. M. Bailey e Scott's - Diagnostic Microbiology, The C.V. Mosby Co: St. Louis, 1990.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; HU, W-P.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 27, p. 165-237, 2010.

CASTELLANI, A., J. Trop. Med. Hyg., v.70, p.181-184, 1967.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, Ninth Edition (M07-A9), 2012.

DAVIDSON, S. K.; ALLEN, S. W.; LIM, G. E.; ANDERSON, C. M.; HAYGOOD, M. G. Evidence for the biosynthesis of bryostations by the bacterial symbiont "Candidatus Endobugula sertula" of the bryozoan Bugula neritina. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4531-4537, 2001.

DEVI, N. K. A.; RAJENDRAN, R.; SUNDARAM, S. K. Isolation and characterization of bioactive compounds from marine bacteria. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 2, n. 1, p. 59-64, 2011.

EGAN, S.; THOMAS, T.; KJELLEBERG, S. Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. **Curr Opin Microbiol**, v.11, n.3, Jun, p.219-25. 2008.

GOMES, D. N. F.; **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, 94p. 2007.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n.3, p. 667-679, 2010.

HUNTER-CEVERA, J. C. The Value of Microbial Diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v.1, n.3, p.278-285. 1998.

JOHNSON, T. L.; FORBES, B. A.; O'CONNOR-SCARLET, M.; MACHINSKI, A.; McCLATCHEY, K. D. Rapid method of MIC determinations utilizing tetrazolium reduction. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 83, n. 3, p. 374-378, 1985.

JONES, E. B. G. Marine fungi: some factors influencing biodiversity. **Fungal Diversity**, v. 4, p. 53-73, 2000.

KELLER, N.P.; TURNER, G.; BENNETT, J. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics, **Nature Reviews Microbiology**, 3: 937-47, 2005.

LIRA, S. P. **Metabólitos Secundários Biologicamente Ativos isolados de Esponjas Marinhas e do fungo Beauveria felina de Origem marinha.** Tese (Pós-Graduação em Ciências e Química Analítica) São carlos: Universidade de São Paulo, 151 p. 2007.

MARTÍN, J.F.; CASQUEIRO, J.; LIRAS, P. Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication, **Current Opinion in Microbiology**, 8:282–293, 2005.

MENEZES, C. B. A.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; MIQUELETTO, P. B.; PASSARINI, M. R. Z.; SILVA, C. H. D.; JUSTO, M. R.; LEAL, R. R.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; BERLINCK, R. G. S.; SETTE, L. D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 466-482, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia E Bioquímica Do Solo*: Lavras: UFLA, p.729, 2. ed. tual. e ampl. ed. Lavras, 2006.

NIGAM, P.S. Production of bioactive secondary metabolites. In: Nigam, P.S.; Pandey, A. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization*, **Springer Science+ Business Media**, 2009.

NUNES, G. L. **Diversidade E Estrutura De Comunidades De Bacteria E Archaea Em Solo De Mangue Contaminado Com Hidrocarbonetos Do Petróleo.** (Dissertação), ESALQ/USP, Piracicaba, p.84. 2006.

PROMPANYA, C.; DETHOUP, T.; BESSA, L.J.; PINTO, M.M.M.; GALES, L.; COSTA, P.M.; SILVA, A.M.S.; KIJJOA, A. New isocoumarin derivatives and meroterpenoids from the marine sponge-associated fungus *Aspergillus similanensis* sp. nov. KUFA 0013. **Marine Drugs**, 12, 5160–5173. 2014.

RAHMAN, M.; KUHN, I.; RAHMAN, M.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; MOLBY, R. Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2398-2403, 2004.

RIBEIRO, S.F.L. **Bioprospecção da atividade antimicrobiana de extratos brutos de fungos endofíticos isolados da espécie *Oryctanthus alveolatus* (Kunth) Kuijt.** 60 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, 2015.

RIBEIRO, S.M.; PEREIRA E.C.; GUSMÃO N.B; FALCÃO E.P.; SILVA N.H. Produção de metabólitos bioativos pelo líquen *Cladonia substellata* Vainio. **Acta botanica brasílica** 20(2): 265-272. 2006.

ROHWER, F. et al. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. **Marine Ecology Progress Series**, v.243, November 13, 2002, p.1-10. 2002.

SANTOS, J. A., **Potencial biotecnológico de fungos marinhos e antárticos da Central de recursos microbianos da UNESP (CRM-UNESP)**. 90p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho. Instituto de Biociência. Rio Claro. 2015.

SCHWARTSMANN, G.; ROCHA, A. B.; BERLINK, R. G. S.; JIMENO, J. Marine organisms as a source of new anticancer agents. **The Lancet Oncology**, v. 2, p. 221-225, 2001.

SOLA, M. C.; OLIVEIRA, A. P.; FEISTEL, J. C.; REZENDE, C. S. M. Manutenção de Microrganismos: Conservação e Viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.14, p. 1398-1418, 2012.

TARMAN K., LINDEQUIST U., WENDE K., PORZEL A., ARNOLD N. AND LUDGER A. WESSJOHANN.; Isolation of a New Natural Product and Cytotoxic and Antimicrobial Activities of Extracts from Fungi of Indonesian Marine Habitats. **Marine Drugs**., v.9, p.294-306; 2011.

VIGNOLI, R; SEIJA, V. Principales mecanismos de resistencia antibiotica. **In: Temas De Bacteriología Y Virología Médica**, cap. 35, p. 649-662, 2007.

VITA-MARQUES, A. M.; LIRA, S. P.; BERLINCK, R. G. S.; SELEGHIM, M. H. R.; SPONCHIADO, S. R. P.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; BARATA, M.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; DE SOUZA, A. O.; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; SILVA, M.; PIMENTA, E. F.; THIEMANN, O.; PASSARINI, M. R. Z.; SETTE, L. D. A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1099-1103, 2008.

XU, L.; WEI M.; CAO C.; WANG J.; SHAN W.; WANG Q. Antibacterial and Antifungal Compounds from Marine Fungi. **Marine Drugs**, v.13, p. 3479-3513, 2015.

YU, J.H. & KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**. V. 43, p. 437-58, 2005.

## 5 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

A descoberta de novos compostos ativos contra infecções microbianas é uma necessidade devido ao alto número de casos de resistência às terapias antimicrobianas existentes em ambiente clínico. Mesmo com intensas pesquisas na busca de novos antibióticos, além de novas substâncias, também novos alvos terapêuticos são foco de muitos grupos de pesquisa, na investigação de alternativas para combater mecanismos de virulência e resistência dos microrganismos patogênicos.

Estudando os fungos filamentosos isolados de sedimento do manguezal de Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil, Gomes (2007) encontrou a predominância de anamorfos 44 espécies. *Penicillium* foi o gênero com maior número de espécies (21), seguido de *Aspergillus* (11), *Trichoderma* (5), *Fusarium* e *Phoma* (2), *Cladosporium*, *Microsphaeropsis* e *Stilbella* (1 espécie). Na presente pesquisa os generos *Aspergillus* e *Penicillium* também foram dominantes com 49% e 34% dos isolados respectivamente.

A quantidade de fungos isolados foi abaixo do esperado quando comparado aos estudos de Menezes et al. (2010) que isolaram 256 fungos de 3 esponjas e uma ascídia coletadas no litoral de São Paulo. Porém, deve ser considerado que a investigação da diversidade de fungos associados e/ou simbiotes de organismos marinhos da costa Pernambucana ainda é inexplorada e o microambiente em que estes se encontram (baixa poluição, proximidade da costa, presença de correntes marinhas e variações da temperatura da água) pode ser um fator determinante para o número de espécies isoladas. E se levando em consideração ao substrato em estudo há escassos relatos sobre sua microbiota associada.

A investigação de compostos bioativos utilizando método de rastreamento como ponto de partida representou uma ferramenta útil para obter-se um panorama geral das propriedades antibiótica dos metabólitos presentes nos filtrados e extratos dos fungos associados a corais marinhos da Praia de Porto de Galinhas. Para o rastreamento da atividade antibacteriana foram utilizadas 384 amostras (192 extratos orgânicos de micélios e 192 filtrados) e identificadas 1 amostra com inibição

de crescimento superior a 50% e outra com capacidade inibitória ainda menor (12,5%).

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho evidencia o potencial de fungos associados a organismos marinhos para a obtenção de produtos bioativos e abre perspectivas para a continuidade da pesquisa de metabólitos bioativos, uma vez que a resistência aos antibióticos continua a crescer em hospitais e na comunidade, envolvendo patógenos gram-positivos e gram-negativos, bem como parasitos; indicando ser esta área de grande relevância para a busca de novos fármacos.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, J. S. et al. Antimicrobial, Antiproliferative and Proapoptotic Activities of Extract, Fractions and Isolated Compounds from the Stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 4, p. 4124-4140, 2012.

ALEXOPOULOS, C.J; MIMS, C.W; BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.

AMEND, A. S., BARSHIS, D. J., OLIVER, T. A. Coral-associated marine fungi form novel lineages and heterogeneous assemblages. **International Society for Microbial Ecology** v.12 p.1751-7362, 2012.

BAYER, F.M. **The Shallow-Water Octocorallia of the West Indian Region: A Manual for Marine Biologists**. The Hague: Martinus Nejhoff, 400p. 1961.

BENTLEY, R.; BENNETT, J. W. Biosynthesis of secondary metabolites. In: BERRY, D. R. **Physiology of industrial fungi**. Oxford: Blackwell scientific publications, 1988. p 161 – 183.

BHADURY, P.; MOHAMMAD, B. T.; WRIGHT, P. C. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 33, p. 325–337, 2006.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 26–78, 2007.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 165–237, 2010.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 96-275, 2011.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 29, p. 144- 222, 2012.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 21, p. 1–49, 2004.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 23, p. 26–78, 2006.

BLUNT, J.W. et al. Marine natural products. **Natural Product Report.**, 31, 160–258. 2014.

BOURNE, D. G.; MUNN, C. B. Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. **Environmental Microbiology**, n. 8, p.1162–1174, ago. 2005.

BRAKHAGE, A.A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters, **Fungal Genetics and Biology**,v.48, n.1: p.15-22. jan. 2011. DOI:10.1016/j.fgb.2010.04.004, 2010.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrados**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

BUTLER, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

CARVALLO, J. D, et al. Mechanisms of beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence of Opr -Mover producing strains in a French multicentre study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.50, p.1039-1043, 2002.

CORTEZ LOPES, F. **Produção e Análise de Metabólitos Secundários de Fungos Filamentosos**. 130 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

CRUZ, L. J.; INSUA, M. M.; BAZ, J. P.; TRUJILLO, M.; RODRIGUEZ-MIAS, R. A.; OLIVEIRA, E.; GIRALT, E.; ALBERICIO, F.; CAÑEDO, L. M. IB-01212, a new cytotoxic cyclodepsipeptide isolated from the marine fungus *Clonostachys* sp. ESNA-A009. **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 9, p. 3335-3338, 2006.

DAMARE, S. R. **Deep-Sea Fungi: Occurrence and Adaptations**. Tese. Índia: Goa University, 2006.

DAS, S.; LYLA, P. S.; KHAN, A. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. **Current Science**, v. 90, n. 10, p. 1325-1335, 2006.

DAVIDSON, S. K. et al. Evidence for the biosynthesis of bryostations by the bacterial symbiont "*Candidatus Endobugula sertula*" of the bryozoan *Bugula neritina*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4531-4537, 2001.

DEMAIN, A.L. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v.18: 499–514, 2000.

DEVI, N. K. A.; RAJENDRAN, R.; SUNDARAM, S. K. Isolation and characterization of bioactive compounds from marine bacteria. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 2, n. 1, p. 59-64, 2011.

EBEL, R. **Natural product diversity from marine fungi**. In **Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology**. Elsevier: Oxford, UK: Elsevier, 2010. V. 2, p. 223–262.

EGAN, S.; THOMAS, T.; KJELLEBERG, S. Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. **Curr Opin Microbiol**, v.11, n.3, Jun, p.219-25. 2008.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 1–49, 2001.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 19, p. 1–48, 2002.

FURLA, P.; ALLEMAND, D.; SHICK, J. M. et al. The Symbiotic Anthozoan: A Physiological Chimera between Alga and Animal. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, n. 4, p. 595-604, ago. 2005.

GESNER, S. et al. Pandangolide 1a, a metabolite of the sponge-associated fungus *Cladosporium* sp., and the absolute stereochemistry of Pandangolide 1 and iso-Cladospolide B. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 9, p. 1350-1353, 2005.

GLOER, J. B. Applications of Fungal Ecology in the Search for New Bioactive Natural Products. In: KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I. S. (eds.). **The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships**. 2 ed. Nova Iorque: Springer-Verlag, 2007. Cap. 15, p. 257-286. 2007.

GOMES, D. N. F.; **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, 94p. 2007.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n.3, p. 667-679, 2010.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.

HÖLLER, U. et al. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 104, p. 1354-1365, 2000.

HUNTER-CEVERA, J. C. The Value of Microbial Diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v.1, n.3, p.278-285. 1998.

HYDE, K.D.; SARMA, V.V.; JONES, E.B.G. Morphology and taxonomy of higher marine fungi. **Marine Mycology: A Practical Approach**, v.1, p.172-204, 2000.

IRELAND, C. M.; BUGNI, T. S. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 21, p. 143–163, 2004.

JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Secondary metabolites from marine fungi. In: HYDE, K. D. Fungi in marine environments. **Fungal Diversity Research Series**, v. 7, p. 293-315, 2002.

JIN, L. et al. Potential Pharmacological Resources: Natural Bioactive Compounds from Marine-Derived Fungi. **Marine Drugs**, v. 14, n. 76, 2016.

KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, p. 151-170, 2002.

LIBERR, K.; LINDEQUIST, U. Marine Fungi—a prolific resource of biologically active natural products? **Pharmazie**, v.50, p.583–588. 1995.

LINS-DE-BARROS et al. Archaea, Bactéria, and Algal Plastids Associated with the Reef-Building Corals *Siderastrea stellata* and *Mussismilia hispida* from Búzios, South Atlantic Ocean, Brazil. **Microbial Ecology**, n. 59, v. 3, p.523–532, dez. 2010.

LIRA, S. P. **Metabólitos Secundários Biologicamente Ativos isolados de Esponjas Marinhas e do fungo *Beauveria felina* de Origem marinha**. Tese (Pós-Graduação em Ciências e Química Analítica). São carlos: Universidade de São Paulo, 151 p. 2007.

LIU, X.H. et al. Ergosteroid derivatives from an algicolous strain of *Aspergillus ustus*. **Natural Products**, v. 28, p. 1182–1186, 2014.

MAHAJAN, G. B.; BALACHANDRAN, L. Antibacterial agents from actinomycetes - A review. **Frontiers in Bioscience E4**, n.1, p. 240-253, 2012.

MAYER, A. M. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2001–2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C: Toxicology e Pharmacology, v. 140, n. 3-4, p. 265-286, 2005.

MCPHEE, S. J. et al. **Current Medical Diagnosis & Treatment**. 15<sup>a</sup>. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2011.

MENEZES, C. B. A. et al. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 466-482, 2010.

MINAMI, P.S. Micologia: métodos laboratoriais de diagnóstico de micoses. Barueri: Manole, p.199, 2003.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do Solo**. 2. ed. e ampl. Lavras: UFLA, 2006.

MUSCATINE, L.; PORTER, J. W. Reef corals: Mutualistic symbioses adapted to nutrient poor environments. **BioScience**, n. 27, v. 7, p. 454–460, jul. 1977.

NIU, S.; LIU D.; PROKSCH, P.; SHAO, Z.; Wenhan LIN, W. New Polyphenols from a Deep Sea Spiromastix sp. Fungus, and Their Antibacterial Activities. **Marine Drugs**, v. 13, p. 2526-2540, 2015.

NUNES, G. L. **Diversidade E Estrutura De Comunidades De Bacteria E Archaea Em Solo De Mangue Contaminado Com Hidrocarbonetos Do Petróleo**. (Dissertação), Universidade de São Paulo, ESALQ/USP, Piracicaba, 2006.

PIETRA, F. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 14, p. 453 – 464, 1997.

PROKSCH, P. et al. Sponge-associated fungi and their bioactive compounds: the Suberites case. **Botanica Marina**, v. 51, n. 3, p. 209-218, 2008.

PROMPANYA, C. et al. New isocoumarin derivatives and meroterpenoids from the marine sponge-associated fungus *Aspergillus similanensis* sp. nov. KUFA 0013. **Marine Drugs**, v. 12, p. 5160–5173, 2014.

RÄMÄ T. et al. Fungi ahoy! Diversity on marine woodensubstrata in the high north. **Fungal Ecology**. v.8:p. 46–58, 2014.doi:10.1016/j.funeco.2013.12.002.

ROHWER, F. et al. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. **Marine Ecology Progress Series**, v.243, p. 1-10, Nov. 2002.

RUPPERT, E. ; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**. 6<sup>a</sup> ed.. São Paulo: Roca, 1996.

RYPIEN, K. L.; WARD, J. R.; AZAM, F. Antagonistic interactions among coral-associated bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 28-39, jan. 2010.

SADER H.S. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.5, p.200-214, 2001.

SALMOND, G. P.; WELCH, M. Antibiotic resistance: adaptive evolution. **Lancet**, v. 372, p. S97–S103, 2008.

SANTOS, J. A., **Potencial biotecnológico de fungos marinhos e antárticos da Central de recursos microbianos da UNESP (CRM-UNESP)**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho. Instituto de Biociência. Rio Claro.,2015.

SCHWARTSMANN, G. et al. Marine organisms as a source of new anticancer agents. **The Lancet Oncology**, v. 2, p. 221-225, 2001.

SHIGEMORI, H.; KASAI, Y.; KOMATSU, K.; TSUDA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Sporiolides A and B, new cytotoxic twelve-membered macrolides from a marine-derived fungus *Cladosporium* species. **Marine Drugs**, v. 2, p. 164-169, 2004.

SPALDING, D.; RAVILIOUS, C. GREEN, E. P. **World Atlas of Coral Reefs**. 1ed. London: University of California Press, 432p. 2001.

STONE, J.K, POLISHOOK, J.D.; WHITE, J. F. J. Endophytic Fungi. In: MUELLER, G.M; BILLS, G.F; FOSTER, M.S. **Biodiversity of Fungi**: Inventory and monitoring methods. London: Elsevier Academic Press, 2004.

SURYANARAYANAN, T.S. et al. Fungal endophytes and bioprospecting, **Fungal Biology Reviews**, 23: 9-19, 2009.

TAKAHASHI, J. A; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v.31, n. 7, 1807-1813, 2008.

TARMAN, K. et al. Isolation of a New Natural Product and Cytotoxic and Antimicrobial Activities of Extracts from Fungi of Indonesian Marine Habitats. **Marine Drugs**., v.9, p.294-306; 2011.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v.119, p. S3-S10, 2006.

VITA-MARQUES, A. M. et al. A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1099-1103, 2008.

WANG, Y.N. et al. Diversity and Antibacterial Activities of Fungi Derived from the Gorgonian *Echinogorgia rebekka* from the South China Sea. **Marine Drugs**. v. 9, p. 1379-1390, 2011.

WEGLEY, L.; EDWARDS, R.; RODRIGUEZ-BRITO, B.; LIU, H.; ROHWER, FOREST. Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 2707-19, nov. 2007.

YELLOWLEES, D.; REES, T. A. V.; LEGGAT, W. Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. **Plant, Cell & Environment**, v. 31, n. 5, p. 679-94, maio 2008.

ZETTLER E.R., MINCER T.J., AMARAL-ZETTLER L.A. Life in the 'plastisphere': microbial communities on plastic marine debris. **Environ Sci Technol**. v.47:p.7137–7146, 2013.

## ANEXO A - Normas da revista (International Journal of Aquatic Biology)

O manuscrito enviado deve ter as seguintes seções:

### 1. página de título

A página de título deverá incluir:

Título do manuscrito, os nomes dos autores, endereço (s) do autor (es), número de telefone e endereço de e-mail do autor.

Execução de título

Revisores sugeridos

### 2. Resumo

150-400 palavras. Por favor, não coloque P-valor, abreviaturas ou qualquer referência.

Um resumo persa, incluindo título, nome dos autores, endereço dos autores, resumo e palavras-chave deve ser preparada no final do manuscrito. Se os autores não são capazes de fornecer um resumo persa, a equipe editorial fornecerá para eles.

### 3. palavras-chave

### 4. o manuscrito

Manuscritos devem ser submetidos em MS-Word (de preferência no formato. docx) com a fonte Times New Roman (tamanho 12 pt).

O manuscrito deve ter: introdução, materiais e métodos, resultados, discussão, confirmação (se houver).

Os nomes científicos devem ser em itálico. Páginas devem ser numeradas. Todas as linhas devem ser numeradas automaticamente usando o MS-Word.

### 5. referências

Citação no texto

Exemplos: (Dumont, 1998). Dumont (1998). Smith e Johnson (2011). (Smith e Johnson, 2011). Para 3 ou mais de 3 autores: (Anan et al., 2002), Anan et al (2002). Autores separados em usando um parêntese; (Kajiwara et al., 2003; Weißflog et al., 1999; Korshenko e Gul, 2005). Todas as referências citadas no texto devem ser citadas nesta seção. Nomes de diário devem ser expandidos. Por favor, não coloque abreviações. Por exemplo, expanda J. Fish. Biol de diário de peixe biologia fornecer Digital Object Identifier (doi) para artigos sempre que disponível.

Revistas: Agusa T. T. Kunito, S. Tanabe, M. Pourkazemi, D.G. Aubrey (2004).

Concentrações de oligoelementos no músculo de esturjão no mar Cáspio. Boletim de poluição marinha, 49: 789-800.

Livro: Townsend, C.R., M. Begon, Harper, J.L. (2003). Fundamentos da ecologia, 2.

Publicação da ciência de Blackwell. 530 p. Cooke G.D., Welch E.B., S.A. Peterson, Nichols

S.A. (2005). Restauração e gerenciamento de lagos e reservatórios. CRC Press. Flórida, 591 p.

Seção de livros: Coutteau P. (1996). Microalgas. Em: P. Lavens, Sorgeloos P. (Ed.). Manual sobre a produção e utilização de alimento vivo para a aquicultura, FAO pescas papel técnico. N.º 361. Roma, FAO. PP: 7-47.

Papel da conferência: C. Cellario, George S. (1990). Segunda geração de *Paracentrotus lividus* criados em laboratório: qualidade testada de ovo. Em: C.d. Ridder, P. Dubois, M.C. Lahaye, M. Jangoux (Ed.). Pesquisa de equinodermos: processo da segunda Conferência Europeia sobre equinodermos. Bruxelas, Bélgica, Balkema, Rotterdam. PP: 65-70.

Tese: M. Clarke (2002). O efeito da salinidade na distribuição, reprodução e alimentação da starfish *Coscinasterias muricata* (Echinodermata: Asteroidea) em uma comunidade intertidal rochosa de um fiorde de Nova Zelândia. M.SC. tese, departamento de Ciências do mar, Universidade de Otago. 84 p.

Página da Web: Wray, G.A. (1994). Echinodermata. Disponível em: [www.tolweb.org](http://www.tolweb.org). Recuperado 19/03/2004.

## 6. tabelas

Tabelas devem ser numeradas e citadas no texto, por exemplo: tabela 1. Todas as tabelas devem ter uma legenda acima da tabela, terminando com ".". Todas as tabelas devem ser inseridas no final no texto principal. Os autores podem indicar o local de inserção de tabelas no texto, colocando o número da tabela no suporte, por exemplo [tabela 1].

Tabelas devem ser auto-explicativas, conter dados sintetizados e não exceder o tamanho A4. Dados apresentados em gráficos não devem ser repetidos em tabelas e vice-versa.

## 7. gráficos e ilustração

Todos os gráficos e ilustrações devem ter uma legenda abaixo da tabela, terminando com "."

Gráficos e ilustrações devem ser citadas no texto, por exemplo: (Fig. 1).

A fonte de gráficos ou qualquer texto nas ilustrações deve ser Times New Roman. Tamanho do texto em gráficos e ilustrações deve ser 10 pt.

Manuscritos submetidos devem ter gráficos e ilustrações shoud ser inserido no final do texto depois de tabelas. Gráficos e ilustrações podem ser apresentadas separadamente. Se ilustrações vão ser apresentados separadamente, prepará-los com o seguinte formato (com uma resolução não inferior a 300 dpi) e determinar suas localizações no jornal:

Para gráficos vetoriais, EPS

Para meios-tons, formato TIFF.

A resolução das fotografias deve ser 300 dpi no tamanho de impressão (extensão original: jpg ou tif).

Retratos da arte de linha (extensão. tif) devem ser feitos eletronicamente (não verificado) e sua resolução deve ser 600 dpi no tamanho de impressão.

Os autores podem indicar o local de inserção de figuras no texto, colocando o número de figuras no suporte, por exemplo [Figura 1].

Ilustrações de cor serão publicadas gratuitamente apenas na versão eletrônica da revista (arquivos pdf).

#### 8. Copie direito

Com submeter um artigo para o IJAB, aceita para transferir automaticamente a cópia do mesmo para o IJAB. Submeter um artigo para o IJAB significa que todos os autores viram o jornal e de acordo com a forma final do livro enviado e suas posições na lista do autor.

Nenhuma parte do livro enviado deve ser publicado antes.

#### 9. sugestão de potenciais revisores

Os autores são incentivados a sugerir cinco revisores potenciais para seu papel.

#### 10. notas técnicas / curto-comunicação

Comunicação de notas técnicas de curta tem diretrizes semelhantes para artigos originais (acima mencionadas diretrizes de autor), mas seu número de página deve ser limitado a 3-4 com um resultados mesclados e discussão.

#### Lista de verificação de preparação de apresentação

Como parte do processo de submissão, autores são obrigados a marcar cumprimento do sua apresentação todos os itens a seguintes, e submissões podem ser devolvidas aos autores que não aderir a estas orientações.

Confirmar que o conteúdo do manuscrito foi submetido exclusivamente para esta revista e, não publicados, na imprensa, ou apresentados em outros lugares (ou uma explicação foi fornecida em comentários ao Editor).

Confirme se o arquivo de apresentação é no formato de arquivo de documento do Microsoft Word.

Confirme que o texto segue os requisitos de estilísticos e bibliográficos descritos nas orientações para o autor.

Confirme que os dados de contato de pelo menos três revisores potenciais (nome, filiação e endereço de e-mail) estavam preparados.

Confirme que todas as pesquisas satisfazem as diretrizes éticas, incluindo a adesão aos requisitos legais do país de estudo.

Confirme que todos os autores leu e aprovou a versão final apresentada.

#### Aviso de Copyright

Autores que publicam com este diário de acordo com os seguintes termos:

-----

Sociedade iraniana de Ictiologia é os detentores de direitos autorais dos artigos publicados.

O IJAb vai licenciar esses artigos sob uma Creative Commons Attribution License que permite que outras pessoas para compartilhar o trabalho com um reconhecimento de trabalho autoria e publicação inicial nesta revista.

Os autores têm permissão para postar seu trabalho on-line (por exemplo, em repositórios institucionais ou em seu site), pois pode levar a intercâmbios produtivos, bem como anterior e maior citação do trabalho publicado (ver o efeito de acesso aberto).

#### Declaração de privacidade

Os nomes e endereços de e-mail inseridos neste site diário serão usados exclusivamente para os fins declarados do presente Jornal e não estarão disponíveis para qualquer outra finalidade, ou a qualquer outra parte.