



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

Laís Karla do Nascimento Andrade

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIOXIDANTE DE
EXTRATOS DE FUNGOS ISOLADOS DE ESPONJAS MARINHAS**

Vitória de Santo Antão

2017

Laís Karla do Nascimento Andrade

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIOXIDANTE DE
EXTRATOS DE FUNGOS ISOLADOS DE ESPONJAS MARINHAS**

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: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dra. Idjane Santana de Oliveira

Vitória de Santo Antão

2017

Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB-4/2018

A553a Andrade, Laís Karla do Nascimento
Avaliação in vitro da atividade citotóxica e antioxidante de extratos de fungos isolados de esponjas marinhas / Laís Karla do Nascimento Andrade. - Vitória de Santo Antão, 2018.
64 folhas.; Il.: color.

Orientadora: Idjane Santana de Oliveira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2018.
Inclui referências e anexos.

1. Fungos. 2. Micro-organismos marinhos. 3. Biotecnologia. I. Oliveira, Idjane Santana de (Orientadora). II. Título.

579.5 CDD (23.ed)

BIBCAV/UFPE-049/2018

Laís Karla do Nascimento Andrade

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIOXIDANTE DE
EXTRATOS DE FUNGOS ISOLADOS DE ESPONJAS MARINHAS**

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: Biotecnologia.

Aprovada em: 17/02/2017.

Orientadora: **Dr.^a Idjane Santana de Oliveira**
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Lidiane Roberta Cruz da Silva
Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE

Dr. Emerson Peter da Silva Falcão
Núcleo de Nutrição– CAV/UFPE

Dr. Cristiano Aparecido Chagas
Núcleo de Biologia – CAV/UFPE

*À minha mãe Marluce do
Nascimento Andrade e ao meu pai Luiz
Ernestino de Andrade (in memoriam),
por todo amor, dedicação e exemplo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por sua fidelidade e inspiração, a Ele seja a glória, a majestade e o louvor.

À minha família pelas orações, força e incentivo, em especial à minha mãe Marluce do Nascimento Andrade, por seu esforço diário, por seu exemplo e por acreditar sempre no meu potencial.

Ao meu noivo Joctã Lins, por me fazer acreditar que tudo iria dar certo e por todas as orações e incentivo.

À minha orientadora, Prof. Dra. Idjane Santana de Oliveira que, nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

À Prof. Dra. Noêmia Pereira pelo apoio e pela disponibilização do Laboratório NanoBioCel para realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão pelo apoio e contribuição nos experimentos e também por viabilizar algumas etapas importantes.

À Dra. Roberta Cruz pela identificação das espécies fúngicas e por suas colaborações em relação à escrita deste trabalho.

À Dra. Flávia Paiva Coutinho do LABIO - CETENE pela parceria na identificação de algumas espécies de fungos.

Ao prof. Dr. Carlos Perez, ao Prof. Dr. Ulisses Pinheiro e ao Dr. George J. G. Santos do Laboratório de Porífera (LABPOR - UFPE) pela identificação das espécies de esponjas marinhas.

Aos membros da banca, pelos conselhos relacionados ao desenvolvimento deste estudo.

A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória (CAV), pela força e incentivo.

À Cleciana Maristela de Souza, pela amizade, parceria e companheirismo de sempre, da infância pra vida!

À Katharine Angélica por sua amizade e pela ajuda na identificação dos fungos em nível de gênero.

A todos os amigos e companheiros do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do CAV, em especial ao “Grupo Fungos do Mar”, nas pessoas de Sílvia Francisco, Gilvânia Luana e Kelly Nascimento. Também àqueles que já saíram, mas

que merecem ser especialmente lembrados, Raíza Vasconcelos, Andressa Laís, Sarana Pereira, Laureana Sobral e Diego Reis.

Ao meu amigo de graduação Msc. David Henrique por sua amizade e pela ajuda na realização da coleta em Porto de Galinhas.

Às amigas e companheiras, mestrandas Gerliny Oliveira, doutoranda Maria Aparecida Lira e doutoranda Marllyn Marques pelo apoio e ajuda nos experimentos.

À doutoranda Tamiris Rocha, por sua amizade, parceria e ajuda na realização dos testes.

À Prefeitura de Ipojuca, pela liberação da documentação para realização da coleta.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

Enfim, a todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização deste sonho.

Muito obrigada!

Laís Andrade

“Até aqui nos ajudou o Senhor”.
(1Samuel 7:12b)

RESUMO

Os micro-organismos marinhos se tornaram uma importante fonte de compostos biologicamente ativos, sendo os fungos de grande interesse biotecnológico nos processos fermentativos que envolvem a produção de metabólitos secundários de relevância para a humanidade. Sendo assim, o estudo teve como finalidade isolar os fungos que vivem associados a esponjas marinhas na praia de Porto de Galinhas, PE, Brasil, e testar seu potencial citotóxico e antioxidante. Foram utilizados quatro meios de cultura para o isolamento dos fungos (TUBAKI, Extrato de Malte-ágar, Batata-dextrose-ágar e Ágar Sabouraud). Após isolamento e purificação, os fungos foram cultivados em meio líquido para obtenção do extrato bruto micelial, extraído com o solvente metanol. As esponjas coletadas foram: *Chondrosia* sp. 1, *Chondrosia* sp. 2, *Cliona varians*, *Tedania ignis*, *Haliclona implexiformis*, *Cinachyrella apion*, *Chondrosia collectrix* e *Cladocroce caelum*. Foram obtidos 46 isolados de fungos em seis gêneros, sendo: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Eupenicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Acremonium* sp. e *Syncephalastrum* sp. Dois extratos brutos desses fungos apresentaram atividade citotóxica para a linhagem de célula normal testada (macrófagos murinos J774), com porcentagens de inibição de 85 e 72%, respectivamente. Dez extratos metanólicos apresentaram atividade antioxidante significativa, sendo que dois extratos da espécie *Aspergillus japonicus*, EP3.6 e EP4.6, apresentaram os melhores valores de eliminação de radicais DPPH de 76,03 e 60,33%, respectivamente. Os mesmos extratos apresentaram compostos fenólicos em suas estruturas moleculares, evidenciando assim seu potencial antioxidante, porém baixo poder de redução do íon férrico. Esses resultados são promissores para aplicação dos metabólitos brutos de extratos miceliais dos fungos isolados de esponjas como drogas naturais.

Palavras-Chave: *Aspergillus*. DPPH. Fungos marinhos. Radicais livres. Macrófagos.

ABSTRACT

Marine microorganisms have become an important source of biologically active compounds, being very interesting fungi in biotechnological fermentation processes that involve the production of secondary metabolites of relevance to humanity. Thus, the study is aim to isolate the fungi that live associated with sea sponges on the beach of Porto de Galinhas and test its cytotoxic and anti-oxidant potential. We used various culture media for the isolation of fungi (TUBAKI, malt Extract agar dextrose potato agar and Sabouraud Ágar). After isolation and purification, fungi were grown in liquid medium for obtaining the crude extract mycelial, extracted with solvent methanol. 46 fungi were isolated from marine sponges and are distributed among the genera *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Eupenicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Acremonium* sp. and *Syncephalastrum* sp. The sponges were collected: *Chondrosia* sp. 1, *Chondrosia* sp. 2, *Cliona varians*, *Tedania ignis*, *Haliclona implexiformis*, *Cinachyrella apion*, *Chondrosia collectrix* e *Cladocroce caelum*. Two crude extracts of these fungi showed cytotoxic activity to the normal cell line tested (J774 murine macrophages), with percentages of inhibition of 85 and 72%, respectively. Ten methanolics extracts showed significant antioxidant activity, and two extracts of the species *Aspergillus japonicus*, EP 3.6 and EP 4.6 showed the best values of DPPH radical inhibition of 76.03 and 60.33%, respectively. The same extracts showed phenolic compounds in their molecular structures, so its antioxidant potential, but low power reduction of ferric ion. These results are promising for application of crude extracts metabolites of fungi isolated from sponge as natural drugs.

Keywords: *Aspergillus*. DPPH. Marine fungi. Free radicals. Macrophages.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Compostos bioativos isolados de fungos marinhos: (1) Sicaína; (2) Asperazina; (3) Sansalvamida; (4) Pandagolídeo A; (5) Pandagolídeo B.	21
Figura 1.2	Classificação das esponjas – Demospongiae: (A) <i>Oscarella</i> sp. e (D) <i>Haliclona</i> sp; Calcarea: (B) <i>Clathrina aurea</i> e (E) <i>Paraleucilla magna</i> ; Hexactinellida: (C) Esqueleto de <i>Dactylocaulis pumiceus</i> e (F) <i>Hyalonema</i> sp. (TURQUE et al., 2007).	22
Figura 1.3	Compostos bioativos isolados de fungos em associação com esponjas marinhas: (6) Gimnastatina A; (7) Gimnastatina B; (8) Gimnastatina C; (9) Acremostictina.	24
Figura 2.1	Percentual das linhagens de fungos isolados nos meios de cultura. Legenda: TUB: Meio Tubaki; MEA: Meio Ágar Extrato de Malte; BDA: Meio Ágar Batata-Dextrose; AS: Meio Ágar Sabouraud.	37
Figura 2.2	Ocorrência, em porcentagem, de gêneros fúngicos isolados de esponjas marinhas coletadas na praia de Porto de Galinhas - PE.	39
Figura 2.3	Diversidade de espécies fúngicas isoladas de esponjas da praia de Porto de Galinhas – PE. A. <i>Eupenicillium</i> sp; B. <i>Aspergillus flavus</i> ; C. <i>Aspergillus japonicus</i> ; D. <i>Trichoderma virens</i> ; E. <i>Aspergillus parasiticus</i> (Fonte: autor).	40
Figura 2.4	Atividade antioxidante pelo sequestro de radical livre DPPH dos extratos brutos EP3.6 e EP4.6 em comparação com o controle.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Fungos isolados de esponjas marinhas coletadas da Praia de Porto de Galinhas-PE, Brasil.	36
Tabela 1.2	Percentual de inibição celular dos extratos brutos dos fungos isolados de esponjas frente a linhagem de macrófagos J774, em diferentes concentrações dos extratos.	40
Tabela 1.3	Percentual de inibição de radicais DPPH dos extratos fúngicos.	42
Tabela 1.4	Atividade antioxidante dos extratos fúngicos.	44

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
AS	Ágar Sabouraud
ATCC	American Type Culture Collection
BDA	Batata Dextrose Ágar
BHT	Hidroxitolueno butilado
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil1-picrilhidrazil
EAG	Equivalente do Ácido Gálico
FRAP	Atividade Redutora do Íon Férrico
IC ₅₀	Concentração inibitória a 50%
MEA	Extrato de Malte Ágar
MeOH	Metanol
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MTCC	Microbial Type Culture Collection
MTT	Brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
SAS	Statistical Analysis System
SEM	Erro-padrão da média
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SRL	Sequestro de Radicais Livres
TPC	Composição Fenólica Total
TPTZ	2,4,6-Tris (2-piridil) -s-triazina
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 O AMBIENTE MARINHO E SUA MICROBIOTA	17
3.2 FUNGOS MARINHOS E SEUS METABÓLITOS	18
3.3 FUNGOS MARINHOS ASSOCIADOS A ESPONJAS	21
3.4 POTENCIAL CITOTÓXICO DE PRODUTOS NATURAIS MARINHOS	24
3.5 RADICAIS LIVRES E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE FUNGOS MARINHOS	26
4 ARTIGO	29
5 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	54
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA	61
ANEXO B - Autorização do SISBIO	63
ANEXO C - AUTORIZAÇÃO DA SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE DE IPOJUCA	64

1 INTRODUÇÃO

Os mares e oceanos compõem cerca de 70% da superfície da Terra e possuem ampla diversidade de flora e fauna naturais. Esses oceanos e mares são considerados como uma rica fonte, ainda inexplorada, de alimentos e medicamentos em potencial que são benéficos para a humanidade. Existe um cenário de interesse em produtos marinhos para composição de novas substâncias bioativas promissoras para o desenvolvimento de drogas ou ferramentas farmacológicas (BHAT; SRIDHAR, 2009). 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 et al., 2011). Estudos envolvendo a biossíntese desses compostos 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; JENSEN; FENICAL, 2002; PROKSCH et al., 2003).

O desenvolvimento de pesquisas utilizando micro-organismos marinhos como fonte para obtenção de moléculas bioativas tornou-se importante pela grande diversidade de espécies que podem ser isoladas. Também pela variedade e ineditismo das moléculas obtidas; pela possibilidade do cultivo *in vitro* visando à produção em escala industrial com custos mais reduzidos do que na síntese química ou realização de repetidas coletas como necessário para plantas e animais (LIRA, 2007). Algumas substâncias isoladas de micro-organismos são metabólitos secundários de linhagens de fungos isolados a partir de amostras de oceanos, invertebrados marinhos, algas, estuários e de habitats de transição marinho-terrestre, como manguezais, inclusive com registros de novos compostos (OVERY et al., 2014).

Em meados dos anos 90, estimou-se a diversidade de fungos marinhos em cerca de 1.500 espécies, e até 2011, estimativas delinearam o possível número de fungos marinhos com mais de 10.000 espécies descritas (JONES, 2011). No entanto, isto pode ser apenas uma estimativa, visto que inclui muitas espécies ubíquas, ou seja, que são facultativas e não obrigatórias de ambiente marinho (JONES et al., 2009).

Os fungos filamentosos são capazes de produzir metabólitos com as mais variadas aplicações industriais e biotecnológicas, que são utilizadas para produção de fármacos (antibióticos, anti-inflamatórios, drogas anticâncer), alimentos, vitaminas, ácidos orgânicos e enzimas, entre outras aplicações (MAYER et al., 2013). O papel dos produtos naturais na descoberta de novas drogas é fundamental, especificamente para o desenvolvimento de agentes quimioterápicos. A contribuição de fontes naturais não é limitada apenas à aplicação direta de metabólitos secundários não modificados, mas também se estende aos seus derivados, tais como análogos semissintéticos e estruturas sintéticas inspiradas em produtos naturais (GOMES et al., 2015).

No Brasil, a pesquisa com produtos naturais marinhos iniciou-se na década de 60 no Rio de Janeiro. No entanto, frente aos 7.500 km de litoral brasileiro, ainda são poucas as informações documentadas na literatura a respeito de substâncias isoladas e a atividade biológica de extratos obtidos de organismos marinhos. Este dado é indicativo do grande potencial para pesquisas nesta área no Brasil (PINTO et al., 2002), especialmente na região Nordeste, área ainda não investigada para pesquisa de organismos marinhos e seus fungos associados. Consta, na literatura, apenas um estudo realizado por Costa et al. (2004) sobre cnidários no estado da Paraíba, no qual foram analisados organismos simbiotes do coral *Siderastrea stellata*, coletado nos recifes costeiros da praia de Cabo Branco - PB. Foi registrada a presença de diatomáceas, cianobactérias, protozoários, vermes e microcrustáceos associados ao coral, porém não estudaram os fungos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade citotóxica e antioxidante *in vitro* de extratos metabólicos de fungos isolados de esponjas marinhas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar os fungos associados a esponjas marinhas coletadas na praia de Porto de Galinhas, município de Ipojuca, Pernambuco, Brasil;
- Analisar diferentes meios de culturas na recuperação dos isolados fúngicos;
- Identificar as linhagens de fungos marinhos isolados de esponja;
- Avaliar a atividade citotóxica e antioxidante *in vitro* dos extratos metabólicos brutos dos fungos marinhos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O AMBIENTE MARINHO E SUA MICROBIOTA

As profundezas oceânicas são uma vasta e pouco explorada fonte de moléculas exclusivas em sua diversidade estrutural e biológica, com menos de 2% de produtos naturais marinhos relatados na literatura (CHRISTOPHER et al., 2010; SKROPETA; WEI, 2014). A vida nas águas profundas exige que os seus habitantes adaptem a sua maquinaria bioquímica para lidar com condições extremas, que implicam exposição a altas pressões hidrostáticas, temperaturas variáveis e baixas concentrações de oxigênio e luz. Os organismos extremófilos têm grande potencial para induzir vias metabólicas primárias e secundárias a originar metabólitos com estruturas exclusivas (NIU et al., 2015).

A abundância microbiana é tipicamente estimada em torno de 10^6 por mililitro de água do mar e 10^9 por mililitro em sedimentos no fundo oceânico (FENICAL; JENSEN, 2006) e toda essa diversidade indica uma fonte de recursos genéticos e biológicos que podem ser explorados para a descoberta de novos compostos com aplicação biotecnológica.

Os micro-organismos marinhos tornaram-se uma importante fonte de compostos biologicamente ativos (DAVIES-COLEMAN; BEUKES, 2004; IMHOFF, 2005; KELECOM, 2002). Mais especificamente, os fungos de origem marinha demonstram potencial, como sugerido pela diversidade de metabólitos secundários produzidos e relatados na literatura (BUGNI; IRELAND, 2004; CRUZ et al., 2006).

A maioria dos compostos biologicamente ativos provenientes de fungos derivados de ambientes marinhos foram encontrados em fungos associados a algas e esponjas, e em menor grau a tunicados, moluscos e outros. O estudo dessas relações pode nos ajudar a compreender o ecossistema marinho e nos levar à descoberta de novos métodos de coleta e isolamento de espécies quimicamente inexploradas (BUGNI; IRELAND, 2004; DAS et al., 2006).

Blunt et al. (2012) afirmam que do ano de 2010 para 2011 houve um aumento de 15% no número de compostos isolados de micro-organismos do ambiente marinho. Sendo que, no ano de 2011 foram relatados 1.152 novos compostos. Segundo os autores, este aumento no número de publicações vem ocorrendo nos

últimos anos, devido ao grande interesse por fungos e bactérias do ambiente marinho (BLUNT et al., 2012).

König et al. (1996) relataram a ocorrência de representantes dos gêneros *Gymnascella*, *Trichoderma*, *Phoma*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Cochliobolus* e *Curvularia* associados a invertebrados marinhos como esponjas e cnidários sendo estes também de ocorrência em ambientes terrestres. Muitos destes fungos, entretanto, se desenvolvem melhor em água do mar e parecem ter se adaptado ao ambiente marinho.

Swathi et al. (2014) avaliaram a distribuição de fungos marinhos da costa de Andhra Pradesh (Índia) e os principais gêneros encontrados foram *Aspergillus*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Microascus*, sendo este último incomum dentre os isolados.

A grande quantidade de micro-organismos encontrados nos oceanos e, principalmente, a complexidade de moléculas isoladas a partir deles, é alvo de interesse dos pesquisadores para o desenvolvimento de novos fármacos (FENICAL, 1997). Porém, no Brasil, a investigação de micro-organismos marinhos da costa brasileira ainda é escassa. Os fungos filamentosos encontrados com maior incidência nestes estudos são representantes dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Cladosporium* e *Acremonium* (BERLINCK et al., 2004; MENEZES et al., 2010).

3.2 FUNGOS MARINHOS E SEUS METABÓLITOS

Os fungos são considerados elementos-chave em ambientes terrestres (WANG; QIU, 2006) e realizam funções vitais nos ciclos de nutrientes, atuando como decompositores, parasitas e simbiontes (WEBSTER; WEBER, 2007). Estes organismos representam uma significativa proporção da diversidade microbiana na Terra (HIBBETT et al., 2007). No entanto, grande parte da nossa compreensão atual da complexidade ecológica e evolução de fungos é derivada do estudo de fungos cultivados isolados, na maior parte, dos ambientes terrestres (HAWKSWORTH, 2001). Talvez ainda mais importante, a estimativa incide apenas sobre fungos em um conjunto limitado de habitats; portanto, não leva em conta a diversidade e abundância de fungos que não estão associados a ambientes de planta e do solo, porém encontram-se associados a animais, ao sedimento, em água doce, ou em ecossistemas marinhos (RICHARDS et al., 2012).

O ecossistema marinho é extremamente complexo e contém um amplo espectro de diversidade de fungos. Embora uma variedade de novos gêneros de fungos oriundos do ambiente marinho tenha sido identificada e avaliada (ABDEL-WAHAB et al., 2010), vários destes gêneros também são encontrados no ambiente terrestre, por exemplo, *Aspergillus sp.*, *Cephalosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* (PARK et al., 2014).

Os fungos marinhos podem ser prospectados de vários locais, tais como sedimentos, esponjas, microalgas, peixes, nas profundezas oceânicas e em raízes e caules do mangue (JONES, 2011). O isolamento de um fungo a partir de um organismo marinho não indica se ele é um micro-organismo obrigatório ou facultativo de ambiente marinho. Segundo Kohlmeyer e Kohlmeyer (1979), fungos marinhos obrigatórios são aqueles que crescem e esporulam exclusivamente em ambiente marinho ou estuários, enquanto que facultativos são aqueles que derivam de águas e ambientes terrestres e, que são capazes de crescer e, possivelmente, esporularem em meio marinho.

A maioria dos fungos filamentosos habita em ambientes altamente competitivos e, com isso, tem desenvolvido vias metabólicas específicas para produzir moléculas bioativas de baixo peso molecular que são tradicionalmente denominadas de metabólitos secundários ou produtos naturais (BILLS; STADLER, 2014). A produção desses metabólitos, unicamente por fungos marinhos, é mais provável devido à adaptação a um conjunto distinto de pressões ambientais (BADHURY et al., 2006). Pouco se conhece sobre as funções que esses 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 micro-organismos produzem compostos únicos (PROKSCH et al., 2008).

Metabólitos secundários são um grupo diverso de compostos orgânicos, mas a maioria deles não parece participar diretamente do crescimento normal, desenvolvimento ou reprodução de um organismo (FRAENKEL, 1959). Esses metabólitos têm um enorme impacto na sociedade e são explorados por suas propriedades antibióticas e farmacêuticas, tais como anticancerígena, antitumoral, imunoestimulantes e antioxidantes (FOX; HOWLETT, 2008).

No que se refere à química de micro-organismos, o descobrimento da penicilina, isolada do fungo *Penicillium 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 (TAKAHASHI; LUCAS, 2008). Desde então, os fungos terrestres têm sido fonte de classes de metabólitos secundários, sendo superados somente pelos Actinomicetos. Entretanto, as pesquisas quanto ao potencial dos fungos de origem marinha têm se expandido, pois acredita-se que representam uma fonte alternativa para o isolamento de novos metabólitos ativos (EFFENDI, 2004).

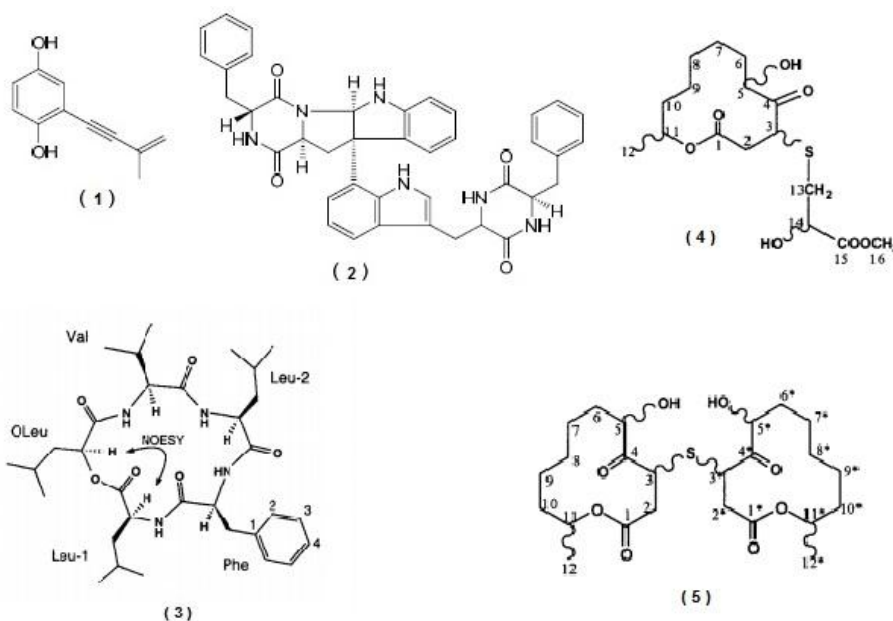
O primeiro relato que descreveu um novo metabólito isolado de um fungo do ambiente marinho foi publicado por Kupka et al. (1981). O basidiomiceto marinho coletado na Colômbia foi identificado como *Halocyphina villosa* e a substância isolada foi a sicaína (**1**) (Figura 1), que possui atividade antibiótica. A partir de então a descoberta de novos compostos isolados de micro-organismos marinhos tem resultado, em grande parte, em compostos com atividades antitumorais e antimicrobianas. No entanto, outras atividades foram descritas para produtos naturais isolados de fungos do ambiente marinho, como antiviral e anti-inflamatória (NUMATA et al., 1997).

A asperazina (**2**) (Figura 1) isolada do fungo *Aspergillus niger*, obtido da esponja *Hyrrios proteus* coletada no Caribe, mostrou seletividade citotóxica contra células de leucemia (VAROGLU; CREWS, 2000).

A sansalvamida (**3**) (Figura 1) é um agente citotóxico que foi isolado do extrato micelial de um fungo marinho do gênero *Fusarium* obtido a partir da superfície da erva marinha *Halodule wrightii* coletada nas Bahamas, que apresentou atividade contra células de câncer de cólon e de melanoma (BELOFSKY et al., 1999).

Dois novos pandangolídeos (**4**) e (**5**) (Figura 1), obtidos do fungo *Cladosporium herbarum* isolado da esponja marinha *Callyspongia aerizusa*, apresentaram atividade antibiótica contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (JALDUKO et al., 2001).

Figura 1.1- Compostos bioativos isolados de fungos marinhos.



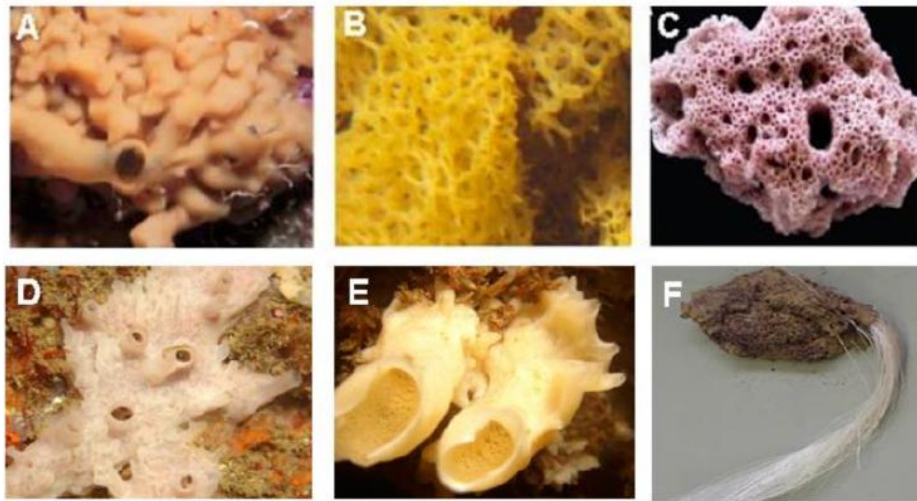
(1) Sicaína; (2) Asperazina; (3) Sansalvamida; (4) Pandagolídeo A; (5) Pandagolídeo B.
 Fonte:

3.3 FUNGOS MARINHOS ASSOCIADOS A ESPONJAS

Esponjas (filo Porifera) são animais bentônicos sésseis e estão entre os mais antigos animais metazoários (LI, 2009). Existem cerca de 15.000 espécies de esponjas descritas, mas a sua verdadeira diversidade é provavelmente maior, sendo a fauna dos poríferos da costa atlântica da América do Sul a menos conhecida do mundo (BELARBI et al., 2003).

A existência das esponjas marinhas remonta ao período Pré-Cambriano, há cerca de 500 milhões de anos, sendo possivelmente, os animais pluricelulares mais primitivos, representados em três classes: Demospongiae, Calcarea e Hexactinellida (Figura 2), sendo a maioria pertencente ao primeiro grupo (HOOPER; VAN SOEST, 2002). A reprodução essencialmente assexuada, a respiração por difusão, colorações, formas e tamanhos bem diversificados, podem ser assinalados como algumas das principais características das esponjas marinhas (BERGQUIST, 1978).

Figura 1.2 - Classificação das esponjas – Demospongiae



(A) *Oscarella* sp. e (D) *Haliclona* sp; Calcareia: (B) *Clathrina aurea* e (E) *Paraleucilla magna*; Hexactinellida: (C) Esqueleto de *Dactylocaulis pumiceus* e (F) *Hyalonema* sp.
Fonte: Turque et al., 2007.

Estes organismos possuem uma estrutura com uma única camada de células flageladas (coanócitos) que promovem a circulação de água através de um sistema de canais que é fundamental para sua fisiologia, pois é através dele que são feitas todas as trocas de materiais entre as esponjas e o ambiente (nutrição, respiração, excreção e reprodução) (BRUSCA; BRUSCA, 2007; MURICY; HADJU, 2006). Pela presença deste sistema aquífero, as esponjas constituem um habitat ideal para micro-organismos simbiotes, como bactérias, fungos, cianobactérias e microalgas que, em alguns casos, podem contribuir com 40% do seu volume corporal (KOOPMANS et al., 2009; LI, 2009).

As esponjas marinhas têm chamado atenção de pesquisadores pelo fato de serem filogeneticamente muito próximas a uma ampla variedade de micro-organismos e também por consistir em uma rica fonte de metabólitos secundários biologicamente ativos, bem como enzimas com potencial biotecnológico (TAYLOR et al., 2007). A produção de metabólitos secundários pela esponja geralmente ocorre pela necessidade de competição por espaço com outros organismos, proteção contra peixes, predadores e micro-organismos patogênicos, proteção contra radiação ultravioleta, entre outros (PAUL; PUGLISI, 2004; PAUL et al., 2006).

Pesquisas têm demonstrado que grande parte das esponjas marinhas abriga uma riqueza de fungos, muitas vezes com representantes do ambiente terrestre como *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma* e *Trichoderma*.

Devido à sua acumulação dentro do animal, um grande número de espécies de fungos pode ser isolado de esponjas, o que aumenta a probabilidade de encontrar representantes de táxons menos comuns, ou novos para a ciência (HÖLLER et al., 2000; INDRIANI, 2007; PAZ et al., 2010). Esses micro-organismos presentes como simbioses nas esponjas marinhas podem, muitas vezes, contribuir na defesa química, na estrutura mecânica, como fonte de alimento e fixação de nitrogênio (TAYLOR et al., 2007; TURQUE et al., 2008; WANG, 2006).

Segundo estimativas de Bugni e Ireland (2004), fungos isolados de esponjas detêm 33% do total de metabólitos marinhos descobertos, seguidos pelos fungos oriundos de algas marinhas com 24%. O estudo de fungos associados a esponjas tem ganhado impulso, em parte, devido a um aumento na procura de novos produtos naturais de fontes microbianas marinhas (BUGNI; IRELAND, 2004; MORRISON-GARDINER, 2002).

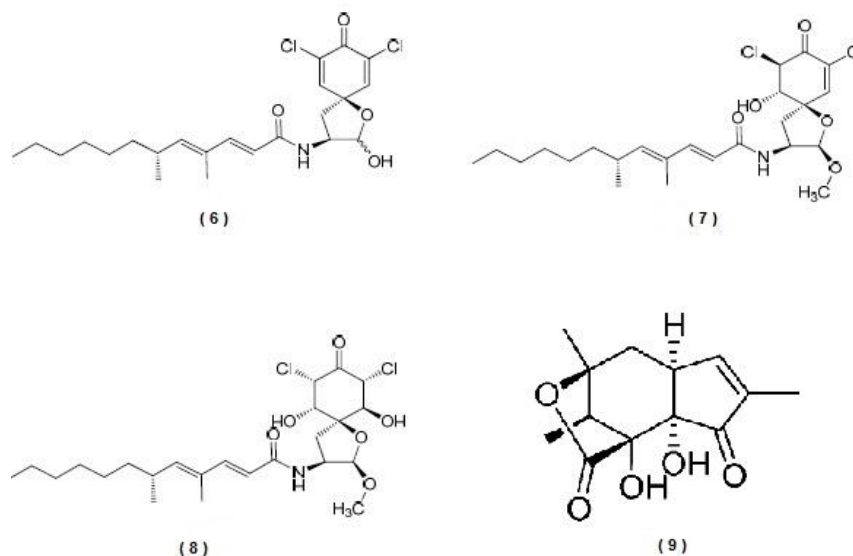
No estudo de Menezes et al. (2010), foram coletadas seis espécies de esponjas (*Amphimedon viridis*, *Axinella corrugata*, *Dragmacidon reticulata*, *Geodia corticostylifera*, *Mycale laxissima* e *Mycale angulosa*) da costa norte de São Paulo e os fungos associados foram isolados. O número de isolados fúngicos obtido foi bastante semelhante entre os invertebrados marinhos amostrados, sendo 67 de *D. reticulata*, 65 de *A. viridis* e 61 de *M. laxissima*.

Paz et al. (2010) isolaram fungos da esponja *Psammocini* sp. do mar Mediterrâneo e obtiveram 85 táxons, dentre os quais os principais gêneros encontrados foram *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*.

As gimnastatinas A (6), B (7) e C (8) (Figura 3), isoladas de *Gymnasella dankaliensis* extraído da esponja *Halichondria japonica*, foram os primeiros compostos com atividade citotóxica isolados de fungo em associação com uma esponja (NUMATA et al., 1997).

A acremostriatina (9) (Figura 3), isolada do fungo *Acremonium strictum* obtido de uma esponja não identificada, exibiu atividade antioxidante moderada em ensaio de eliminação de radicais DPPH e inibiu a morte induzida por peróxido de hidrogênio em células de queratinócitos humanos HaCaT (JULIANTI et al., 2011).

Figura 1.3 - Compostos bioativos isolados de fungos em associação com esponjas marinhas.



(6) Gimnastatina A; (7) Gimnastatina B; (8) Gimnastatina C; (9) Acremostriictina.

3.4 POTENCIAL CITOTÓXICO DE PRODUTOS NATURAIS MARINHOS

O papel dos produtos naturais na descoberta de novas moléculas é fundamental, especificamente para o desenvolvimento de agentes quimioterápicos. A contribuição de fontes naturais não é limitada apenas à aplicação direta de metabólitos secundários não modificados, mas também se estende aos seus derivados, tais como análogos semissintéticos e estruturas sintéticas inspiradas em produtos naturais (GOMES et al., 2015).

Newman e Giddings (2014) analisaram as fontes de 191 agentes quimioterápicos que foram comercializados desde o final de 1930 até o fim de 2012, as quais indicam que 89 destes agentes podem ser atribuídos a produtos naturais ou suas formas modificadas e 39 correspondem a compostos sintéticos com origem natural, dando um total de apenas 63 agentes anticâncer (33%) que são classificados como verdadeiramente sintéticos em sua origem.

De acordo com Gomes et al. (2015), na última década, revisões de literatura abrangeram a potencial atividade anticancerígena de metabólitos derivados de fungos marinhos. No entanto, estas revisões têm utilizado o termo "citotoxicidade" como sinônimo de "agente anticâncer", o que não é verdadeiro. De fato, um

composto citotóxico é, por definição, um composto tóxico. Para tornar-se um potencial agente anticâncer, um composto citotóxico deve, pelo menos, exhibir: (i) seletividade entre células normais e cancerígenas; (ii) atividade contra células cancerígenas multirresistentes; e (iii) preferencialmente, um mecanismo de morte celular não-apoptótico, visto que atualmente é bem conhecida que uma alta proporção de células cancerígenas que resistem à quimioterapia são, de fato, resistentes à apoptose, contra as quais drogas pro-apoptóticas têm sua eficácia limitada (GOMES et al., 2015).

Com o aumento da incidência de câncer no mundo, a busca de novos agentes eficazes tem aumentado. As pesquisas iniciam-se com ensaios de triagem *in vitro*, permitindo avaliar a atividade citotóxica dos compostos. Portanto, a citotoxicidade é o termo utilizado para expressar a toxicidade de um composto para células em cultura, o que não prediz nenhum efeito seletivo entre células tumorais e normais (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991). A toxicidade foi definida por Nardone (1977) como sendo o conjunto de alterações da homeostase celular, que leva a uma série de modificações, que interferem na capacidade adaptativa das células, bem como na sua sobrevivência, reprodução e realização de suas funções metabólicas. A intensidade da lesão celular depende de vários fatores, tais como a concentração do material testado, o tempo de exposição, o tipo de célula, a capacidade do composto em penetrar na célula, entre outros (HU; HSIUNG, 1989).

A utilização dos testes de citotoxicidade *in vitro* representa uma ferramenta útil e promissora nas primeiras etapas de seleção de compostos antitumorais (LEÓN et al., 2006), e tais testes são necessários para definir a citotoxicidade basal, ou seja, a habilidade intrínseca de um composto em causar alterações e morte celular, como consequência de dano das funções celulares básicas (EISENBRAND et al., 2002). Quando testados *in vitro*, um composto que mata as células tumorais não é um potencial agente anticâncer, é apenas um composto tóxico. Para se tornar um potencial agente anticancerígeno, um composto citotóxico deve matar mais células tumorais do que células normais. Assim, uma vez que um composto exhibe atividade citotóxica *in vitro* contra células tumorais, este deve ser testado o mais rápido possível sobre as células normais para determinar o seu nível de seletividade entre células normais e tumorais. Portanto, se o composto de interesse exhibe os mesmos níveis de toxicidade em células normais e tumorais, não pode ser rotulado como um

potencial agente anticâncer, este é apenas um agente tóxico não seletivo (KORNIENKO et al., 2013).

Estudos relatam atividade citotóxica de metabólitos isolados de fungos marinhos para diversas linhagens de células tumorais humanas, como por exemplo, as leptosinas que foram isoladas de *Leptosphaeria sp.* a partir da alga marrom *Sargassum tortile* contra linhagem de célula tumoral linfocítica murina P388 (TAKAHASHI et al., 1994; YAMADA et al., 2004). A deoxyapoaranotina, em conjunto com acetylaranotina e acetylapoaranotina, isoladas de *Aspergillus versicolor* a partir do sedimento marinho apresentou atividade citotóxica contra linhagem de célula tumoral de cólon HCT116 (CHOI et al., 2011). A gliotoxina isolada de *Aspergillus sp.* YL-06 obtido a partir de alga marinha marrom apresentou citotoxicidade contra linhagens de células de carcinoma cervical humano HeLa e de condrossarcoma SW1353 (NGUYEN et al., 2014). A substância 6-O-metil-7-cloroaveratina isolada de *Aspergillus sp.* apresentou atividade citotóxica contra as linhagens de células tumorais de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), glioblastoma humano (SF-268) e carcinoma de pulmão humano (NCI-H460) (HUANG et al., 2012).

3.5 RADICAIS LIVRES E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE FUNGOS MARINHOS

O termo radical livre é frequentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula, contendo um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos. Isto determina uma alta capacidade de reagir com qualquer composto situado próximo a sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora de elétrons (BARREIROS et al., 2006). Em nosso organismo, a formação de radicais livres ocorre em vários processos metabólicos gerados no citosol, nas mitocôndrias ou na membrana, exercendo um papel importante no funcionamento do corpo humano (CONNER; GRISHAM, 1996).

O metabolismo energético que engloba as reações de transferência de elétrons para a síntese de ATP constitui uma importante fonte de radicais livres. Estes radicais participam de uma imensa variedade de processos dentro dos organismos vivos, como fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e formação de substâncias com atividade antimicrobiana como ácido hipocloroso (MELLO FILHO et al., 1983; AUGUSTO, 2006). Por outro lado, a produção excessiva dos radicais livres pode causar danos a biomoléculas

importantes como lipídios, proteínas e DNA, e também na estrutura de biomembranas, células, tecidos e órgãos, contribuindo para a patogenia de várias doenças, tais como câncer, problemas cardíacos, doença de Alzheimer (CAYUELA, 1995).

Os antioxidantes, produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta, podem prevenir os danos causados por estes radicais livres. De acordo com Halliwell e Gutteridge (1986), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente sua oxidação. Desta forma, os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo a sua ação sobre os lipídios, as proteínas, os ácidos graxos poli-insaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular (HALLIWELL, 1995).

Em relação à atividade antioxidante, alguns estudos foram relatados com fungos marinhos tais como o estudo realizado por Abdel-Lateff et al. (2002) que verificaram que derivados de hidroquinona, produzida pelo fungo marinho *Acremonium sp.*, isolado de alga marinha coletada no mar Mediterrâneo (Espanha), possuem atividade antioxidante.

Sun et al. (2004), mostraram que o exopolissacarídeo (EPS2) produzido pelo fungo marinho *Keissleriella sp.*, obtido a partir de sedimento marinho na China, possui atividade antioxidante contra o radical superóxido e experimentos realizados em células de rato indicaram que este composto combate a formação do peróxido de hidrogênio, evitando a peroxidação lipídica (SUN et al., 2005). Yang et al. (2005) constataram que um polissacarídeo (YCP), produzido pelo fungo marinho *Phoma herbarum*, não mostrou atividade antioxidante *in vitro*. No entanto, os dois derivados químicos sulfatados (YCP-S1 e YCP-S2), inibiram a formação do radical hidroxil e do radical superóxido. Sun et al. (2009) observaram que o fungo marinho *Penicillium sp.* produz três tipos de polissacarídeos (PS1-1, PS1-2 e PS2-1) que exibiram fortes propriedades antioxidantes, especialmente a capacidade de eliminação de radical superóxido e radical hidroxil. Ainda, Sun et al. (2011) isolaram polissacarídeos extracelulares do fungo *Epicoccum nigrum* associado a esponjas marinhas coletadas em Hainan (China) e também obtiveram bons resultados nos testes de capacidade antioxidante.

No estudo realizado por Li et al. (2014), foram isolados oito compostos a partir do fungo marinho *Aspergillus wentii* EN-48, endofítico de alga marrom. Dentre eles, sete apresentaram atividade antioxidante, sendo dois deles considerados compostos nunca descritos anteriormente. Wu et al. (2016) isolaram compostos fenólicos a partir de *Aspergillus wentii* (A-21-2-7) extraído de sedimento do fundo do mar do Sul da China dentre os quais seis foram novos produtos naturais e a grande maioria destes compostos fenólicos indicaram atividade antioxidante, inclusive maior do que o controle utilizado (Trolox). Tan et al. (2016) também isolaram novos compostos a partir do fungo marinho *Ascomycota* sp. AK2YWS-L derivado do mangue da China, onde todos eles exibiram efeitos antioxidantes significativos, dos quais um demonstrou atividade mais potente do que o ácido ascórbico na eliminação de radical DPPH.

Portanto, observa-se que os fungos marinhos ainda foram pouco estudados do ponto de vista do seu potencial farmacológico em comparação aos fungos terrestres. No entanto, no ambiente marinho é frequente a simbiose e/ou competição microbiana, o que resulta na seleção de micro-organismos que produzem compostos químicos para defesa e competição (FENICAL, 1997). Em razão disso, alguns pesquisadores enfatizam a importância de pesquisas em micologia marinha como uma fonte para a descoberta de novos produtos naturais biologicamente ativos (FENICAL, 1997; HÖLLER et al., 2000; FAULKNER, 2002; KELECOM, 2002).

4 ARTIGO

ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIOXIDANTE DE FUNGOS ISOLADOS DE ESPONJAS MARINHAS DA PRAIA DE PORTO DE GALINHAS, PERNAMBUCO, BRASIL

LAÍS K. DO N. ANDRADE¹, CLECIANA M. DE SOUZA¹, TAMIRIS A. ROCHA²,
LIDIANE R. C. DA SILVA³ e IDJANE S. DE OLIVEIRA¹

¹ Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, 55608-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brasil

² Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50670-901 Recife, PE, Brasil

³ Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE – Avenida Bom Pastor, s/n - Boa Vista, 55292-270, Garanhuns, PE, Brasil

4.1 RESUMO

Os micro-organismos marinhos tornaram-se uma importante fonte de compostos biologicamente ativos, sendo os fungos de grande interesse biotecnológico nos processos fermentativos que envolvem a produção de metabólitos secundários de relevância para a humanidade. Sendo assim, o estudo teve como finalidade isolar os fungos associados a esponjas marinhas da praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil e testar seu potencial citotóxico e antioxidante. Para o isolamento dos fungos foram utilizados diversos meios de cultura (TUBAKI, Extrato de Malte-ágar, Batata-dextrose-ágar e Ágar Sabouraud). Após isolamento e purificação, os fungos foram cultivados em meio líquido para obtenção do extrato bruto micelial, extraído com o solvente metanol. As esponjas utilizadas durante o trabalho foram identificadas como *Chondrosia sp. 1*, *Chondrosia sp. 2*, *Cliona varians*, *Tedania ignis*, *Haliclona implexiformis*, *Cinachyrella apion*, *Chondrosia collectrix* e *Cladocroce caelum*. Foram obtidos 46 isolados de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Trichoderma*, *Acremonium* e *Syncephalastrum*. Dois extratos brutos desses fungos apresentaram atividade citotóxica para a linhagem celular normal testada (macrófagos murinos J774), com porcentagens de inibição de 85 e 72%, respectivamente. Dez extratos metanólicos apresentaram atividade antioxidante significativa, sendo que dois extratos da espécie *Aspergillus japonicus*, EP3.6 e EP4.6, apresentaram os melhores valores de inibição de radicais DPPH de 76,03 e 60,33%, respectivamente. Os mesmos

extratos apresentaram compostos fenólicos em suas estruturas moleculares, evidenciando assim seu potencial antioxidante, porém baixo poder de redução do íon férrico. Esses resultados são promissores para aplicação dos metabólitos brutos de extratos miceliais dos fungos isolados de esponja como drogas naturais.

Palavras-Chave: *Aspergillus*, DPPH, fungos marinhos, radicais livres, macrófagos.

Cytotoxic and Anti-oxidant Activity of Marine Fungi Isolated from Sponges in the Beach of Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil

4.2 ABSTRACT

Marine microorganisms have become an important source of biologically active compounds, being very interesting fungi in biotechnological fermentation processes that involve the production of secondary metabolites of relevance to humanity. Thus, the study is intended to isolate the fungi associated with sea sponges on the beach of Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil and test your cytotoxic and anti-oxidant potential. For the isolation of fungi were used various culture media (TUBAKI, malt Extract agar dextrose potato agar and Sabouraud Agar). After isolation and purification, fungi were grown in liquid medium for obtaining the crude extract Mycelial, extracted with solvent methanol. 46 were obtained isolates of fungi belonging to the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Trichoderma*, *Acremonium* and *Syncephalastrum*. The sponges used during the study were identified as *Chondrosia* sp. 1, *Chondrosia* sp. 2, *Cliona varians*, *Tedania ignis*, *Haliclona implexiformis*, *Cinachyrella apion*, *Chondrosia collectrix* and *Cladocroce caelum*. Two crude extracts of these fungi showed cytotoxic activity to the normal cell line tested (murinos J774 macrophages), with percentages of inhibition of 85 and 72%, respectively. Ten metanólicos extracts showed significant antioxidant activity, and two extracts of the species *Aspergillus japonicus*, EP3.6 and EP4.6, showed the best values of DPPH radical inhibition of 76.03 and 60.33%, respectively. The same extracts showed phenolic compounds in their molecular structures, showing how your antioxidant potential, but low power reduction of ferric ion. These results are promising for application of crude extracts miceliais metabolites of fungi isolated from sponge as natural drugs.

Keywords: *Aspergillus*, DPPH, marine fungi, free radicals, macrophages.

4.3 INTRODUÇÃO

Esponjas marinhas (Porifera) são organismos significativos tanto de ambientes costeiros como de mar profundo (Bergquist 1978; Hentschel et al. 2003) e são reconhecidos por abrigar uma grande diversidade de micro-organismos. Estes micro-organismos associados estão envolvidos em uma variedade de funções ecológicas, incluindo a produção de metabólitos secundários, que podem contribuir para o seu próprio sucesso ecológico e de seu anfitrião (Höller et al. 2000).

Os fungos são capazes de produzir metabólitos com as mais variadas aplicações industriais e biotecnológicas utilizados para produção de fármacos (antibióticos, anti-inflamatórios, drogas anticâncer), alimentos, vitaminas, ácidos orgânicos e enzimas, entre outras aplicações (Mayer et al. 2013). Muitos desses fungos que foram isolados de habitats marinhos também estão presentes no ambiente terrestre, tais como *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* (Höller et al. 2000, Wang et al. 2008, Jones et al. 2009).

Fungos marinhos associados a esponjas são os mais estudados para o isolamento de compostos inéditos com atividades biológicas (Taylor et al. 2004). Menezes et al. (2010) relataram a ocorrência de representantes dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Alternaria* e *Phoma* associados a invertebrados marinhos, dentre os quais as esponjas *Amphimedon viridis*, *Axinella corrugata*, *Dragmacidon reticulata*, *Geodia corticostylifera*, *Mycale laxissima* e *Mycale angulosa* da costa norte de São Paulo (Brasil).

As gimnastatinas foram os primeiros compostos com atividade citotóxica isolados do fungo *Gymnasella dankaliensis* em associação com uma esponja identificada como *Halichondria japonica* (Numata et al. 1997). Anomalina A e norlichexantona foram isoladas a partir de extrato do fungo *Arthrinium sp.*, que foi isolado da esponja marinha *Geodia cydonium* do mar Adriático e exibiram forte atividade citotóxica contra um painel de linhagens de células humanas e murinas (Ebada et al. 2011). A acremostictina, isolada do fungo *Acremonium strictum* obtido de uma esponja não identificada, exibiu atividade antioxidante moderada em ensaio de eliminação de radicais DPPH e inibiu a morte induzida por peróxido de hidrogênio em células de queratinócitos humanos HaCaT (Julianti et al. 2011). Sun et al. (2011)

isolaram polissacarídeos extracelulares de *Epicoccum nigrum* JJY-40 associado a esponjas marinhas coletadas em Hainan (China) com atividade antioxidante.

Apesar da existência de alguns relatos na literatura estudando fungos marinhos e suas atividades biológicas, ainda não foi descrita e explorada a microbiota que coloniza invertebrados marinhos no litoral do Nordeste brasileiro e seu potencial biotecnológico. Partindo desse pressuposto, este estudo teve como objetivo isolar, identificar e testar o potencial citotóxico e antioxidante de fungos associados a esponjas marinhas da praia de Porto de Galinhas (Pernambuco, Brasil).

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

COLETA, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE FUNGOS ASSOCIADOS A ESPONJAS MARINHAS

A coleta foi realizada na Praia de Porto de Galinhas (8°30'15.0"S 35°00'04.0"W), que fica localizada no município de Ipojuca (Pernambuco, Brasil), após autorização do SISBIO nº 50226-1 (Anexo 2) e da Secretaria de Meio Ambiente de Ipojuca (Anexo 3), conforme norma técnica 154/2007 do Ministério de Meio Ambiente (MMA). Foram realizadas duas coletas, durante a maré baixa, considerando duas épocas do ano, período seco e período chuvoso, com índice de pluviosidade de 0,0 mm e 30,0 mm, respectivamente.

As amostras de esponjas foram coletadas com o auxílio de pinças e espátula, armazenadas em recipientes esterilizados, refrigeradas imediatamente após a coleta, e em seguida, encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Centro Acadêmico de Vitória (CAV) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

As esponjas foram cortadas em pequenos fragmentos (aproximadamente 1,0 cm de diâmetro), com o auxílio de bisturi. Os fragmentos foram previamente lavados com água do mar esterilizada, com o intuito de eliminar os micro-organismos presentes em seu exterior. Em seguida, cinco fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo os meios de cultura Tubaki, Ágar Extrato de Malte (MEA), Batata-dextrose-ágar (BDA) e Ágar Sabouraud (AS), todos preparados com água do mar natural esterilizada e o antibiótico Cloranfenicol (300 mgL⁻¹), visando à inibição do crescimento bacteriano. As placas foram mantidas à temperatura ambiente

durante 20 dias e o crescimento dos fungos filamentosos foi diariamente acompanhado.

PRESERVAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS

Após crescimento em meio sólido e purificação das colônias, os fungos foram preservados em óleo mineral e pelo método de Castellani (1967) em água destilada, conforme protocolos descritos por Sola et al. (2012).

A identificação dos fungos em nível de gênero e espécie foi realizada através da observação de características macroscópicas e microscópicas, utilizando-se literatura específica (Pitt 1991, Peterson 2000, Klich 2002, Domsch et al. 2007).

OBTENÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS DOS FUNGOS MARINHOS

Discos superficiais do micélio de cada isolado, medindo 8 mm, foram retirados e imersos em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL do caldo Sabouraud (SAB). O cultivo foi realizado em duplicata. Os frascos foram mantidos durante 20 dias, em temperatura ambiente, sem agitação. Após o período de incubação, cada inóculo contendo meio de cultura e micélio foi filtrado em papel de filtro esterilizado Whatman nº 1 a fim de separar a massa micelial do líquido metabólico. Após a filtração, foi obtida uma fração líquida (caldo metabólico), que foi reservada para estudos posteriores, mantida sob refrigeração, e uma fração sólida (micélio). O micélio foi lavado, seco e triturado em almofariz e extraído com 10 mL de metanol (MeOH), em seguida foi mantido em repouso e refrigerado por 24h. Após esse período, o material foi filtrado e o solvente foi eliminado utilizando o rotaevaporador e mantido em dessecador até peso constante.

TESTE DE ATIVIDADE CITOTÓXICA

A linhagem de células normais utilizada foi J774 (macrófagos murinos) em fase exponencial de crescimento. Para manutenção das células e realização dos ensaios *in vitro*, foi utilizado o meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 µL/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina (200µM).

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada através do método MTT que consiste em uma dosagem colorimétrica baseada na conversão do [brometo de 3-

(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (Mosmann 1983, Alley et al. 1988) de cor amarela em formazan insolúvel, de cor púrpura, que precipita devido à ação da enzima succinil-desidrogenase presente somente nas mitocôndrias de células metabolicamente ativas.

As células foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^6 células/mL e incubadas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂, durante 24h. Em seguida, os extratos foram dissolvidos em concentração estoque de 10 mg/mL de DMSO (0,5%) e adicionados aos poços na concentração seriada (6,25 – 100,0 µg/mL). O DMSO (100%) foi utilizado como controle positivo do experimento e, o meio DMEM, controle negativo. Após 48h de reincubação, foram adicionados em cada poço 25 µL de MTT (5 mg/mL) e após 3h de incubação, o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foram adicionados a cada poço para a dissolução dos cristais de formazan. A absorbância dos compostos foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 590 nm.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Sequestro de radicais livres (SRL) pelo método do DPPH

A atividade sequestradora de radical livre do extrato foi medida em termos de doação de hidrogênio usando o radical estável 2,2-difenil1-picrilhidrazil (DPPH) (Blois 1958).

Foram misturados 250 µL da solução de DPPH (1 mM) em 40 µL de diferentes concentrações do extrato (31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg/mL). Após 25 minutos foi medida a absorbância em 517 nm. Trolox (análogo da vitamina E, solúvel em água), BHT e o Ácido Gálico foram usados como compostos de referência e o controle foi o DPPH adicionado a 40 µL de metanol (solvente utilizado para diluir as amostras). A eliminação de radicais de DPPH foi calculada pela fórmula:

$$\text{Inibição [DPPH] (\%)} = \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs controle})}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Onde: Abs = Absorbância.

Método de Redução do Íon Férrico (FRAP)

O ensaio de FRAP foi feito segundo Benzie e Strain (1996) com algumas modificações. A solução estoque foi preparada com 300 mM de tampão acetato (3,1 g CH_3COONa e 16 mL CH_3COOH) em pH 3,6, 10 mM de TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazine) solubilizado em 40 mM de HCl e 20 mM de solução de FeCl_3 . A solução foi preparada misturando 25 mL do tampão acetato, 2,5 mL de TPTZ e 2,5 mL de FeCl_3 . Foram adicionados 20 μL dos extratos brutos na concentração de 1 mg/mL na placa com 180 μL do reagente de FRAP e deixadas em repouso por 40 minutos em estufa incubadora a 37 °C no escuro. Posteriormente as amostras foram lidas a 593 nm. Foi feita uma curva padrão com FeSO_4 (0 - 1000 $\mu\text{g/mL}$) ($Y = 0,0003x - 0,0694$, $R^2 = 0,9916$). Os resultados são expressos em $\mu\text{g FeSO}_4/\text{mg}$ de extrato e comparados com o Trolox nas mesmas condições das amostras.

Dosagem de fenóis totais

O conteúdo fenólico total foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, segundo Li et al. (2008), com algumas modificações. Diferentes concentrações de ácido gálico foram dissolvidas em metanol. Para cada amostra foram adicionados 1 mL da solução de Folin diluída de 1:10 (v/v) e 20 μL das amostras diluídas a 1 mg/mL em metanol. Após 3 minutos no escuro, 0,8 mL de carbonato de sódio a 7,5% foi adicionado, deixando por mais 120 minutos no escuro a temperatura ambiente. Após esse período, as absorbâncias das amostras foram lidas a 765 nm contra um branco (reagentes adicionados ao metanol). Uma curva de calibração foi preparada através da representação gráfica da absorbância em função da concentração e foi encontrada a equação linear ($Y = 0.0121x + 0.032$, $R^2 = 0.9967$). A concentração de fenol total na amostra foi determinada a partir da curva de calibração. O teor total de fenol no extrato foi expresso em termos de Equivalente de Ácido Gálico ($\mu\text{g EAG}/\text{mg}$ de extrato).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi feita pela análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5% e aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do software SAS (Statistical Analysis System) 9.1 e pelo programa GraphPad Prism 5.0.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS FÚNGICAS E OBTENÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS

Foram coletadas nove amostras de esponjas nas duas coletas realizadas, que foram identificadas conforme apresentado na Tabela 1. Ao todo, foram isoladas e purificadas 46 linhagens de fungos a partir dos meios de cultura utilizados, sendo o meio MEA o que melhor favoreceu o crescimento e isolamento de linhagens, obtendo 36,9% do total de fungos isolados (Figura 1). No estudo de Menezes et al. (2010) que isolaram fungos associados a organismos marinhos testando diferentes meios de cultura, observaram resultados semelhantes, sendo MEA o que apresentou melhor recuperação das cepas fúngicas, resultando em 37% das linhagens isoladas, seguido do meio Tubaki (15%).

Tabela 1.1: Fungos isolados de esponjas marinhas coletadas da Praia de Porto de Galinhas-PE, Brasil.

Esponja	Quantidade de espécies isoladas	Fungos identificados
<i>Chondrosia</i> sp. 1	3	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen <i>Penicillium melinii</i> Thom <i>Aspergillus japonicus</i> Saito
<i>Chondrosia</i> sp. 2	3	<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare <i>Penicillium citrinum</i> Thom <i>Penicillium citrinum</i> Thom
<i>Cliona varians</i> Duchassaing & Michelotti, 1864)	5	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen <i>Aspergillus carbonarius</i> (Bainier) Thom <i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx <i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen <i>Aspergillus parasiticus</i> Speare
<i>Tedania ignis</i> Duchassaing & Michelotti, 1864	3	<i>Aspergillus flavus</i> Link <i>Penicillium fellutanum</i> Biourge <i>Trichoderma virens</i> (Miller; Giddens; Foster) Arx
<i>Haliclona implexiformis</i> Hechtel, 1965	3	<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare <i>Aspergillus parasiticus</i> Speare <i>Penicillium fellutanum</i> Biourge
<i>Cinachyrella apion</i> Uliczka, 1929	6	<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx <i>Aspergillus parasiticus</i> Speare <i>Penicillium citrinum</i> Thom <i>Aspergillus flavus</i> Link <i>Aspergillus niger</i> Tieghem <i>Aspergillus flavus</i> Link

<i>Chondrosia collectrix</i> Schmidt, 1870	10	<i>Aspergillus japonicus</i> Saito <i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen <i>Penicillium citrinum</i> Thom <i>Penicillium fellutanum</i> Biourge <i>Penicillium waksmanii</i> K. M. Zalesky <i>Aspergillus japonicus</i> Saito <i>Penicillium citrinum</i> Thom <i>Aspergillus parasiticus</i> Speare <i>Aspergillus parasiticus</i> Speare <i>Aspergillus japonicus</i> Saito
<i>Cladocroce caelum</i> Santos, Da Silva, Alliz & Pinheiro, 2014	7	<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare <i>Penicillium waksmanii</i> Zalesky <i>Aspergillus parasiticus</i> Speare <i>Penicillium fellutanum</i> Biourge <i>Aspergillus parasiticus</i> Speare <i>Aspergillus japonicus</i> Saito <i>Aspergillus flavus</i> Link
<i>Tedania ignis</i> Duchassaing & Michelotti, 1864	6	<i>Eupenicillium</i> sp. <i>Syncephalastrum racemosum</i> Cohn. ex J.Schröt. <i>Aspergillus parasiticus</i> Speare <i>Acremonium</i> sp. <i>Aspergillus japonicus</i> Saito <i>Penicillium citrinum</i> Thom

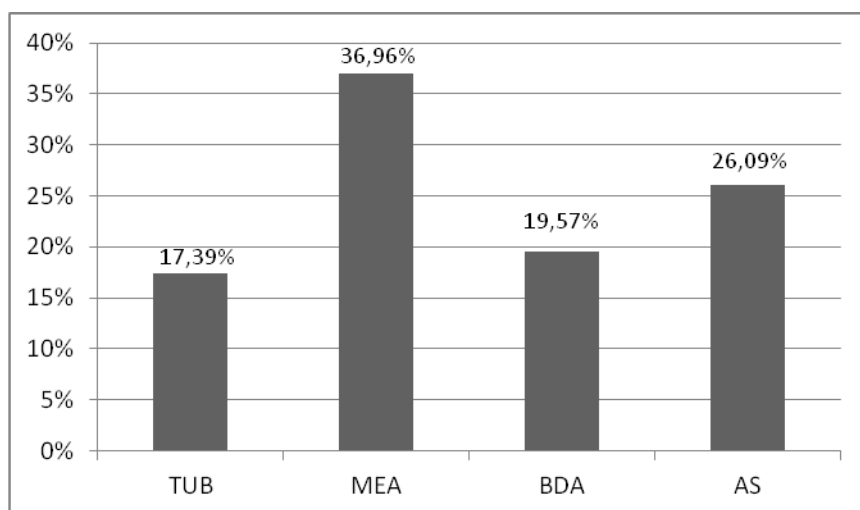


Figura 2.1: Percentual das linhagens de fungos isoladas nos meios de cultura. Legenda: TUB: Meio Tubaki; MEA: Meio Ágar Extrato de Malte; BDA: Meio Ágar Batata-Dextrose; AS: Meio Ágar Sabouraud.

A quantidade de fungos isolados em uma única espécie de esponja e no total geral de fungos recuperados, considerando todas as espécies de esponjas, foi baixo, sendo três (6,5%) de *Chondrosia* sp. 1, três (6,5%) de *Chondrosia* sp. 2, cinco (10,9%) de *Cliona varians*, nove (19,7%) de *Tedania ignis*, três (6,5%) de *Haliclona*

implexiformis, seis (13%) de *Cinachyrella apion*, dez (21,7%) de *Chondrosia collectrix* e sete (15,2%) de *Cladocroce caelum*. Analisando-se o total de fungos (46), o número encontrado foi baixo, quando comparado aos estudos de Wang et al. (2008), no qual foram isolados 55 fungos da esponja *Suberites zeteki* e 65 isolados da esponja *Gelliodes fibrosa*, ambas coletadas no Hawaii. Ainda, Menezes et al. (2010) isolaram 256 amostras de fungos a partir de seis esponjas e duas ascídias coletadas no litoral de São Paulo e Vita-Marques et al. (2008) isolaram 57 fungos de amostras marinhas, sendo 28 deles isolados de sedimentos, 21 de algas, 1 da esponja *Tedania ignis* e 3 da anêmona-do-mar *Anemonia sargassensis*. O baixo número de recuperação dos fungos nas esponjas da praia de Porto de Galinha – PE pode ser explicado devido ao fato da área ser bastante explorada pelo turismo, levando os organismos, de certa forma, a sofrer ação antrópica bastante intensa, o que altera tanto os fatores abióticos como os bióticos, diminuindo a abundância e diversidade.

Das espécies de esponjas coletadas, a que apresentou maior diversidade de fungos foi a *Tedania ignis*, da qual foram isolados seis gêneros distintos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Trichoderma*, *Acremonium* e *Syncephalastrum*). Segundo Scopel (2012), para avaliação da diversidade de fungos associados a organismos marinhos devem ser considerados fatores associados aos microambientes onde as esponjas estão localizadas, tais fatores são: baixa poluição, proximidade da costa, presença de correntes marinhas e variações da temperatura da água. Esses fatores, associados ou não, podem ser determinantes para o número de espécies de micro-organismos isolados.

Somente no ano de 2008, segundo revisão de Blunt et al. (2010), entre os 231 micro-organismos isolados de ambiente marinho, 33 pertenciam ao gênero *Penicillium* e 56 ao gênero *Aspergillus* evidenciando sua fácil adaptação à vida marinha. Amagata et al. (1998) isolaram *Trichoderma harzianum* OUPS-N115 associado a esponja *Haliclona okadai* coletada na Baía Tanabe (Japão). Outros relatos indicam a presença de espécies de *Penicillium* associados a esponjas *Haliclona angulata* e *Axinella verrucosa* (Jadulco et al. 2004, Wei et al. 2009).

Menezes et al. (2010) apresentaram resultados de diversidade microbiana das esponjas *Mycale laxissima*, *Amphimedon viridis* e *Dragmacidon reticulata* provenientes da costa litorânea de São Paulo. Nesse estudo, foi possível a identificação de 144 espécies distintas de 256 isolados de fungos marinhos, sendo

que os fungos filamentosos distribuíram-se entre 24 diferentes gêneros pertencentes a Ascomicetos, Zigomicetos, Basidiomicetos, muitos deles nunca relatados (*Pestalotiopsis*, *Xylaria*, *Botrysphaeria* e *Cunninghamella*). Ainda no estudo de Paz et al. (2010), foram isolados 85 táxons de fungos da esponja marinha *Psammocinia* sp. do mar Mediterrâneo, dentre os quais os principais gêneros encontrados foram *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*, correspondendo a 50 táxons do total isolados.

Associados às esponjas marinhas coletadas na Praia de Porto de Galinhas - PE, os principais gêneros fúngicos encontrados foram *Aspergillus* (60,8%) e *Penicillium* (28,2%), além de *Eupenicillium* (4,3%), *Trichoderma* (2,1%), *Acremonium* (2,1%) e *Syncephalastrum* (2,1%), como mostra o gráfico na Figura 2. A predominância dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* se mostra promissora, devido à adaptação metabólica dos fungos ao meio marinho, o que explicaria o fato de que aproximadamente 30% dos fungos marinhos que apresentaram novos compostos pertencem aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, representantes abundantes no meio terrestre (Jensen e Fenical 2002). Dos extratos metabólitos que foram testados, os que se apresentaram potencialmente ativos foram pertencentes aos gêneros supracitados, corroborando o potencial biológico deste gênero.

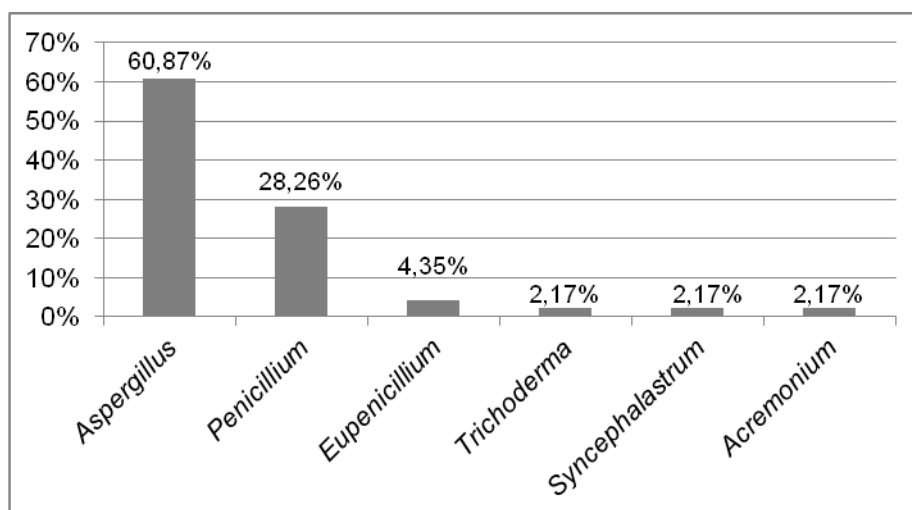


Figura 2.2: Ocorrência, em porcentagem, de gêneros fúngicos isolados de esponjas marinhas coletadas na praia de Porto de Galinhas - PE.

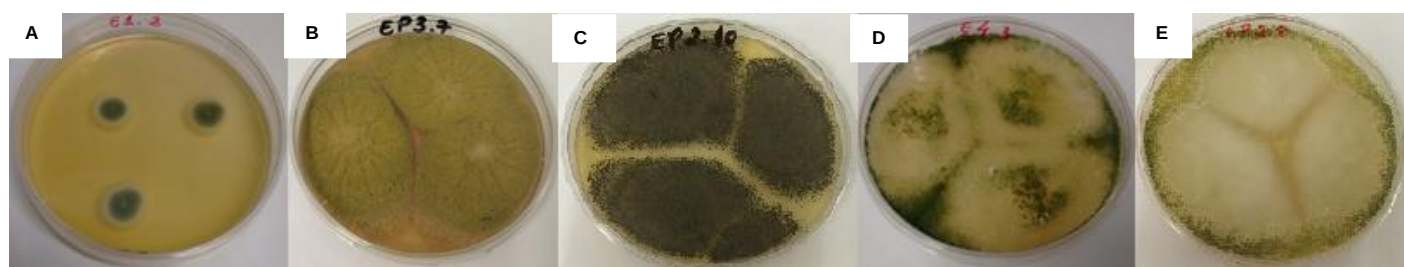


Figura 2.3: Diversidade de espécies fúngicas isoladas de esponjas da praia de Porto de Galinhas – PE. A. *Penicillium melinii*; B. *Aspergillus flavus*; C. *Aspergillus japonicus*; D. *Trichoderma virens*; E. *Aspergillus parasiticus*. (Fonte: autor).

TESTE DE CITOTOXICIDADE

Foram testados cinco extratos de fungos isolados de esponjas, dentre os quais, dois apresentaram potencial citotóxico para a linhagem de macrófagos testada (J774), *Aspergillus parasiticus* 3.3 e *Penicillium fellutanum* 3.4, nas concentrações mais elevadas (50 e 100 µg/mL), conforme observado na Tabela 2. Os demais extratos testados não apresentaram atividade citotóxica, sendo um importante resultado a não toxicidade em linhagem de células normais, visto que tais extratos podem apresentar certa seletividade entre células normais e tumorais.

Tabela 1.2: Percentual de inibição celular dos extratos brutos dos fungos isolados de esponjas frente à linhagem de macrófagos J774, em diferentes concentrações dos extratos.

Extratos fúngicos	% Inibição ± SEM				
	6,25µg/mL	12,5µg/mL	25,0µg/mL	50,0µg/mL	100,0µg/mL
<i>A. parasiticus</i> 3.3	-	8,49 ± 6,77	49,05 ± 1,42	85,80 ± 0,49	85,85 ± 1,07
<i>P. fellutanum</i> 3.4	14,60 ± 2,21	3,46 ± 10,02	46,48 ± 2,21	70,94 ± 2,61	72,01 ± 5,04
<i>A. fumigatus</i> 1.1	21,75 ± 1,66	9,02 ± 4,95	4,96 ± 2,03	14,35 ± 10,52	24,28 ± 4,10
<i>A. japonicus</i> 3.6	-	-	1,22 ± 4,33	-	-
<i>P. citrinum</i> 2.3	-	10,66 ± 4,16	1,91 ± 4,31	-	34,74 ± 10,44

Legenda: SEM = erro-padrão da média; (-): Não apresentou inibição.

A redução da função mitocondrial, a membrana com perda da permeabilidade, as mudanças na morfologia e replicação celular são o que permeiam, *a priori*, os testes de citotoxicidade. As células respondem por meio de diferentes mecanismos bioquímicos à presença de compostos, sendo a perda da função mitocondrial uma das respostas mais comuns e que é utilizada como sinal precoce de citotoxicidade (Melo et al. 2000). Toxicidade é o fator que limita a liberação e consumo de fármacos; portanto, a análise de toxicidade em células normais associada à atividade biológica de compostos é fundamental para determinar sua aplicação, estabelecendo-se o índice terapêutico (Freshney 2000).

No estudo de Ünyayar et al. (2006), no qual foi avaliado a atividade citotóxica de extratos dos fungos *Corolus versicolor* e *Funalia trogii* ATCC 200800 frente a linhagens de células tumorais (Hela) e células normais (fibroblastos) utilizando o ensaio MTT, observaram citotoxicidade em ambas as linhagens testadas. Na concentração de 10 µL/mL, o extrato de *F. trogii* e de *C. versicolor* inibiu a proliferação das células tumorais HeLa em 71,5% e 45%, respectivamente. A toxicidade foi menor nos fibroblastos normais, e os extratos de *F. trogii* e de *C. versicolor* reduziram a proliferação celular em 51,3% e 38,7%, respectivamente. No presente estudo, os extratos metabólicos testados exibiram forte toxicidade contra a linhagem de macrófagos, com porcentagens de inibição variando entre 85,8 e 24,2%, na maior concentração utilizada (100µL/mL).

Em estudo realizado por You et al. (2010), o novo composto trichoderone foi isolado do fungo marinho *Trichoderma sp.* extraído a partir do sedimento do fundo do mar do Sul da China, e que exibiu potente citotoxicidade contra um painel de seis linhagens de células tumorais. Porém não mostrou muita citotoxicidade contra a linhagem de célula normal de fibroblastos de pulmão humano HLF, certificando assim sua seletividade para células tumorais.

Tarman et al. (2011), em seu estudo com fungos marinhos de diversos substratos coletados na costa da Indonésia, obtiveram extratos brutos de *Xylaria psidii* (KT30) e KT31 (*Mycelium sterillum*) fortemente ativos em ensaios de citotoxicidade contra a linhagem de células de carcinoma de bexiga humana 5637 (ATCC HTB-9).

No entanto, os valores encontrados em nosso estudo (85,8 e 72%) representam, em todos os casos, uma alta toxicidade comparável a muitos outros extratos brutos fúngicos. Porém, levando em consideração a complexa composição

dos extratos brutos obtidos, mais investigações para revelar os compostos responsáveis são necessárias para identificar seu princípio tóxico e, posteriormente, testar a seletividade dessas substâncias isoladas em células cancerígenas.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Dos 25 isolados testados quanto ao seu potencial antioxidante, 10 extratos fúngicos apresentaram porcentagens de inibição de radicais DPPH acima de 30% na concentração de 1000 µg/mL (Tabela 3). Porém, dois extratos obtiveram resultados relevantes no sequestro de radicais DPPH, ambos identificados por *Aspergillus japonicus*, sendo que o extrato micelial *A. japonicus* 3.6 (76,03%) foi significativamente mais potente do que o *A. japonicus* 4.6 (60,33%), como demonstra o gráfico na figura 4. Todos demonstraram valores inferiores aos dos controles positivos utilizados, o Trolox, o BHT e o Ácido Gálico, com valores de $96,81 \pm 0,52$, $93,13 \pm 0,58$ e $95,53 \pm 0,09$ na maior concentração, respectivamente.

Tabela 1.3: Percentual de inibição de radicais DPPH dos extratos fúngicos.

% Inibição $\pm$ SEM						
Extratos fúngicos	31,25µg/mL	62,5µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
1 <i>A. japonicus</i> 3.6	17,52 $\pm$ 1,05	11,28 $\pm$ 0,61	18,23 $\pm$ 0,46	29,71 $\pm$ 0,83	48,44 $\pm$ 0,23	76,03 $\pm$ 1,30
2 <i>A. japonicus</i> 4.6	15,92 $\pm$ 0,86	18,31 $\pm$ 0,79	20,69 $\pm$ 0,41	30,90 $\pm$ 0,49	28,37 $\pm$ 1,96	60,33 $\pm$ 1,41
3 <i>A. japonicus</i> 2.6	20,65 $\pm$ 1,32	23,37 $\pm$ 0,51	33,47 $\pm$ 1,90	33,89 $\pm$ 0,74	39,83 $\pm$ 1,03	44,89 $\pm$ 0,52
4 <i>A. parasiticus</i> 2.9	3,46 $\pm$ 0,14	15,83 $\pm$ 0,31	17,31 $\pm$ 0,56	9,03 $\pm$ 2,93	20,98 $\pm$ 0,75	41,55 $\pm$ 0,58
5 <i>A. japonicus</i> 2.1	5,64 $\pm$ 1,42	10,51 $\pm$ 1,39	11,42 $\pm$ 2,69	18,00 $\pm$ 2,69	26,48 $\pm$ 6,49	35,40 $\pm$ 1,33
6 <i>T. virens</i> 4.3	4,53 $\pm$ 2,09	7,10 $\pm$ 3,40	13,09 $\pm$ 1,37	19,89 $\pm$ 0,09	24,67 $\pm$ 2,79	34,69 $\pm$ 1,13
7 <i>A. fumigatus</i> 1.1	12,25 $\pm$ 0,79	2,31 $\pm$ 0,57	26,52 $\pm$ 0,14	27,93 $\pm$ 0,62	29,02 $\pm$ 0,36	33,49 $\pm$ 0,41
8 <i>A. parasiticus</i> 3.3	22,05 $\pm$ 2,35	23,41 $\pm$ 0,30	23,97 $\pm$ 0,53	23,26 $\pm$ 0,84	25,18 $\pm$ 1,40	32,38 $\pm$ 0,63
9 <i>A. flavus</i> 1.6	3,80 $\pm$ 0,57	4,40 $\pm$ 0,55	2,84 $\pm$ 0,08	12,68 $\pm$ 0,56	19,14 $\pm$ 0,70	31,27 $\pm$ 1,65
10 <i>P. citrinum</i> 2.3	23,77 $\pm$ 0,61	23,77 $\pm$ 0,35	24,67 $\pm$ 1,11	25,93 $\pm$ 0,23	33,69 $\pm$ 1,31	30,36 $\pm$ 4,45

SEM: erro-padrão da média; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

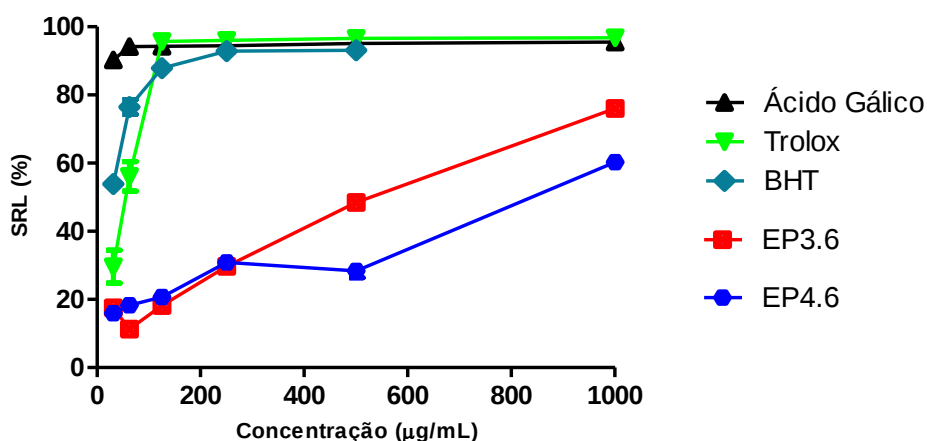


Figura 2.4: Atividade antioxidante pelo sequestro de radical livre DPPH dos extratos brutos *A. japonicus* 3.6 e *A. japonicus* 4.6 em comparação com o controle.

O modelo de sequestro de radical livre DPPH é um método amplamente utilizado para avaliar as atividades de eliminação de radicais livres de materiais (Naik et al. 2003). O DPPH é um radical livre relativamente estável que mostra absorvância máxima a 517 nm em metanol. Quando o DPPH encontra a substância doadora de prótons, tais como antioxidantes, o radical funciona como eliminador e a absorvância é reduzida (Wu et al. 2003). Os radicais DPPH reagem com agentes redutores adequados, os elétrons tornam-se emparelhados e a solução perde cor esteticamente dependendo do número de elétrons capturados (Blois 1958). A partir dos resultados encontrados, pode ser postulado que os extratos brutos fúngicos reduziram o radical à hidrazina-correspondente, quando reagem com os doadores de hidrogênio nos princípios antioxidantes (Sanchez-Moreno 2002).

Malpure et al. (2006), em seu estudo com o extrato de caldo filtrado do fungo *Aspergillus candidus* MTCC 2202, obtiveram atividade antioxidante positiva, em diferentes testes, inclusive o teste DPPH, com o valor de $IC_{50} = 430,36 \mu\text{g/mL}$, bem próximo do extrato EP3.6, que apresentou $IC_{50} = 463,5 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 4).

Em outro estudo, Sun et al. (2009) isolaram três polissacarídeos do fungo marinho *Penicillium sp.* F23-2 que apresentaram porcentagens de eliminação de radicais DPPH entre 44,2 e 70,9%, sendo valores equivalentes aos extratos metabólitos testados nesse estudo, os quais apresentaram porcentagens de eliminação de radicais DPPH variando de 30,3 a 76,0%, na maior concentração utilizada (Tabela 3).

Sun et al. (2011) também isolaram polissacarídeos extracelulares (ENP1 e ENP2) produzidos pelo fungo *Epicoccum nigrum* JJY-40 associado a esponjas marinhas coletadas em Hainan (China). Os autores testaram suas atividades antioxidantes e obtiveram como resultados nos testes DPPH valores de 70,33 e 81,21% de eliminação de radicais DPPH para ENP1 e ENP2, respectivamente. Estes valores se aproximam das porcentagens encontradas neste estudo (76 e 60,3% nas maiores concentrações), visto que foram utilizados extratos brutos e não compostos isolados.

Em outro estudo (Li et al. 2014), onde foram isolados oito compostos a partir de extrato do fungo *Aspergillus wentii* EN-48 associado à alga marinha marrom, sete compostos apresentaram atividade antioxidante, sendo dois deles considerados compostos nunca descritos anteriormente. Ainda Tan et al. (2016) isolaram nove novos compostos a partir do fungo marinho *Ascomycota* sp. AK2YWS-L isolado a partir de mangue na China, onde todos eles exibiram efeitos antioxidantes significativos, dos quais um demonstrou atividade mais potente do que o ácido ascórbico na eliminação de radical DPPH, como valor de $IC_{50} = 18.1 \mu M$.

Os resultados observados para o Método de Redução do Íon Férrico (FRAP) e para verificação da composição fenólica estão expressos na Tabela 4. O poder de redução do íon férrico mostrou-se baixo, sendo o extrato *A. parasiticus* 3.3 o mais ativo, com uma média de $7,80 \pm 0,55$, bem inferior ao Trolox que apresentou uma média de $24,70 \pm 0,41$. O ensaio FRAP mede o poder redutor das amostras através da doação direta de elétrons e a redução de Tripiridiltriazina [Fe^{3+} -TPTZ] à tripiridiltriazina ferrosa [Fe^{2+} -TPTZ] (Fernández-Moriano et al. 2016). Trata-se de um método rápido e bastante simples de executar, sua reação é reproduzível e linearmente relacionada com a concentração molar do(s) antioxidante(s) presente(s). Este método foi inicialmente desenvolvido para o ensaio de antioxidantes plasmáticos, mas pode ser usado para medir a capacidade antioxidante de uma vasta gama de amostras biológicas e compostos puros (Mzid et al. 2017).

Tabela 1.4: Atividade antioxidante dos extratos fúngicos comparados ao controle.

Extratos fúngicos	DPPH ($IC_{50} \mu g/mL$)	FRAP $\mu g FeSO_4/mg$ de extrato	Dosagem de Fenóis Totais (μg EAG/mg amostra)
<i>A. japonicus</i> 3.6	463,5	$4,29 \pm 0,35$	$46,67 \pm 2,50$
<i>A. japonicus</i> 4.6	940,8	$2,51 \pm 0,20$	$30,91 \pm 1,41$

<i>A. japonicus</i> 2.6	-	5,10 ± 0,38	23,99 ± 3,18
<i>A. japonicus</i> 2.1	2624	5,29 ± 0,11	20,50 ± 1,81
<i>A. parasiticus</i> 2.9	1358	4,53 ± 0,25	25,95 ± 0,94
<i>T. virens</i> 4.3	2504	6,45 ± 0,09	25,54 ± 3,41
<i>A. parasiticus</i> 3.3	959950	7,80 ± 0,55	57,77 ± 9,98
<i>A. flavus</i> 1.6	2338	3,89 ± 0,16	-
BHT	26,24	-	-
Trolox	50,01	24,70 ± 0,41	-

Legenda: Os resultados são apresentados como Média ± DP; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; FRAP: Poder de redução do íon férrico; -: Não foram testados.

A dosagem de fenóis totais variou entre 20,50 e 57,77 µg EAG/mg, e pôde mostrar que o conteúdo de compostos fenólicos nos extratos correlaciona-se com sua atividade anti-radicaís. Alto teor de compostos fenólicos foi encontrado em extratos de *Aspergillus candidus* (34,56 e 20,89), em estudo feito por Malpure et al. (2006), estando de acordo com o presente trabalho. Comparando os resultados de eliminação de radicais DPPH com o conteúdo fenólico total de vários extratos, pode ser observada uma boa correlação entre eles, confirmando que compostos fenólicos podem contribuir para a atividade de eliminação de radical dos extratos.

Compostos fenólicos possuem um alto nível de atividade antioxidante, pois agem como doadores de H⁺ e supressores de radicais O₂, com isso têm uma elevada capacidade redox (Rice-Evans et al. 1995). A composição fenólica dos extratos testados pode explicar o significativo efeito antioxidante observado. Compostos químicos contendo grupos hidroxílicos presentes nos fenóis ou até mesmo os ácidos carboxílicos têm a capacidade de trocar hidrogênios e, portanto, podem capturar radicais livres. Da mesma forma os grupos aminos podem doar seus elétrons livres para íons reativos, tornando-os estáveis (Paudel et al. 2011).

Wu et al. (2016) isolaram 22 compostos fenólicos a partir de *Aspergillus wentii* (A-21-2-7) extraído de sedimento do fundo do mar do Sul da China, dos quais seis (Aspergilol A-F) foram novos produtos naturais e a grande maioria dos compostos fenólicos indicaram atividades antioxidantes, inclusive maiores do que o controle utilizado (Trolox). Nos estudos de Arora e Chandra (2010), onde analisaram o potencial antioxidante dos extratos de *Aspergillus sp.* extraídos do solo da Índia (*Aspergillus* PR78 e *Aspergillus* PR66), puderam observar que ambos possuíam alta composição fenólica total (TPC) e um bom efeito de eliminação sobre os radicais DPPH, porém *Aspergillus* PR78 (82,77%) foi significativamente mais forte do que

Aspergillus PR66 (68,26%). O TPC de *Aspergillus* PR78 (16,74 mg/mL) também foi superior ao de *Aspergillus* PR66 (13,05 mg/mL), corroborando a hipótese positivamente correlacionada com o seu potencial antioxidante.

Dos extratos fúngicos testados, vale destacar a importância do extrato EP3.6 (*Aspergillus japonicus* Saito) para estudos posteriores mais aprofundados no que diz respeito à composição química, o qual não apresentou citotoxicidade em macrófagos, porém se mostrou bastante ativo na inibição de radicais DPPH, exibindo uma porcentagem significativa (76%), reforçando o potencial dos fungos marinhos na biossíntese de compostos que possam auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos. Em conjunto, os resultados obtidos mostram que os fungos que vivem associados a esponjas representam uma importante área a ser explorada em relação ao potencial biológico de produtos naturais.

4.6 REFERÊNCIAS

- ALLEY C, SCUDIERO MC, MONKS DD, HURSEY PA, FINE DL, ABBOTT BJ, MAYO JG AND SHOEMAKER MR. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, *Cancer Res.* 48: 589–601.
- AMAGATA T, USAMI Y, MINOURA K, ITO T AND NUMATA A. 1998. Cytotoxic substances produced by a fungal strain from a sponge: physico-chemical properties and structures. *The Journal of Antibiotics* 51(1): 33-40.
- ARORA DS AND CHANDRA P. 2010. Assay of Antioxidant Potential of Two *Aspergillus* Isolates by Different Methods under Various Physio-Chemical Conditions. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 765-777.
- BENZIE IF AND STRAIN JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 239(1): 70-6.
- BERGQUIST PR. 1978. *Sponges*. University of California Press: Berkeley, pp 181–185.
- BLOIS MS. 1958. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.

BLUNT JB, COPP B, MUNRO PT AND PRINSEP MR. 2010. Marine natural products. *Natural Products Reports* 27: 165-237.

CASTELLANI A. 1967. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches. *Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 70: 181-184.

DOMSCH KH, GAMS W AND TRAUTE-HEIDI A. 2007. *Compendium of soil fungi*. 2nd ed. –IHW-Verlag, Eching. 672 p.

EBADA SS, SCHULZ B, WRAY V, TOTZKE F, KUBBUTAT MHG, MULLER WEG, HAMACHER A, KASSACK MU, LIN W AND PROKSCH P. 2011. Arthrinins A–D: Novel diterpenoids and further constituents from the sponge derived fungus *Arthrinium sp.* *Bioorg. Med. Chem.* 19: 4644–4651.

FERNÁNDEZ-MORIANO C, GONZÁLEZ-BURGOS E, DIVAKAR PK, CRESPO A AND GÓMEZ-SERRANILLOS MP. 2016. Evaluation of the Antioxidant Capacities and Cytotoxic Effects of Ten *Parmeliaceae* Lichen Species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 1: 1-11.

FRESHNEY RI. 2000. *Culture of animals cell: a manual of basic technique*. 4th edn. John Wiley-Liss: New York, pp. 1050.

HENTSCHEL U, FIESELER L, WEHRL M, GERNERT C, STEINERT M, HACKER J AND HORN M. 2003. Microbial diversity of marine sponges. In: MÜLLER WEG (Ed.), *Molecular marine biology of sponges*, Heidelberg: Springer-Verlag, p. 60–88.

HÖLLER H, WRIGHT AD, MATTHHEE GF, KONIG G, DRAEGER MS, AUST HJ AND SCHULZ B. 2000. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycol Res* 104: 1354–1365.

JADULCO R, EDRADA RA, EBEL R, BERG A, SCHAUMANN K, WRAY V, STEUBE K AND PROKSCH P. 2004. New communesin derivatives from the fungus *Penicillium sp.* derived from the Mediterranean sponge *Axinella verrucosa*. *Journal of Natural Products* 67(1): 78-81.

- JENSEN PR AND FENICAL W. 2002. Secondary metabolites from marine fungi. In: HYDE, K. D. Fungi in marine environments. Fungal Diversity Research Series 7: 293-315.
- JONES EBG, SAKAYAROJ J, SUETRONG S, SOMRITHI POL S AND PANG KL. 2009. Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota. Fungal Divers 35: 1–187.
- JULIANTI E, OH H, JANG KH, LEE JK, LEE SK, OH DC, OH KB AND SHIN J. 2011. Acremostictin, a Highly Oxygenated Metabolite from the Marine Fungus *Acremonium strictum*. J. Nat. Prod. 74: 2592–2594.
- KLICH MA. 2002. Identification of Common *Aspergillus* species. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelauteurs. 116 p.
- LI HB, WONG CC, CHENG KW AND CHEN F. 2008. Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in metanol extracts from medicinal plants. LWT 41: 385–390.
- LI X, LI XM, XU GM, LI CS AND WANG BG. 2014. Antioxidant metabolites from marine alga-derived fungus *Aspergillus wentii* EN-48. Phytochemistry Letters 7: 120–123.
- MALPURE PP, SHAH AS AND JUVEKAR AR. 2006. Antioxidant and anti-inflammatory activity of extract obtained from *Aspergillus candidus* MTCC 2202 broth filtrate. Indian J Exp Biol 44: 468-473.
- MAYER AMS, RODRÍGUEZ AD, TAGLIALATELA-SCAFATI O AND FUSETANI N. 2013. Marine Pharmacology in 2009–2011: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms of Action. Marine Drugs 11: 2510-2573.
- MELO PS, MARIA SS, HUAN M AND DURÁN N. 2000. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Animal* 36: 539.
- MENEZES CBA, BONUGLI-SANTOS RC, MIQUELETTTO PB, PASSARINI MRZ, SILVA CHD, JUSTO MR, LEAL RR, FANTINATTI-GARBOGGINI F, OLIVEIRA VM,

BERLINCK RGS AND SETTE LD. 2010. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiological Research* 165(6): 466-482.

MOSMANN T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65(1-2): 55-63.

MZID M, KHEDIR SB, SALEM MB, REGAIEG W AND REBAI T. 2017. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol and aqueous extracts from *Urtica urens*. *Pharmaceutical Biology* 55(1): 775–781.

NAIK GH, PRIYADARSINI KI, SATAV JG, BANAVALIKAR MM, SOHONI DP AND BIYANI MK. 2003. Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in *Ayurvedic* medicine. *Phytochemistry* 63: 97–104.

NUMATA A, AMAGATA T, MINOURA K AND ITO T. 1997. Gymnastatins, novel cytotoxic metabolites produced by a fungal strain from a sponge. *Tetrahedron Letters* 38: 5675-5678.

PAUDEL B, BHATTARAI HD, KOH HY, LEE SG, HAN SJ, LEE HK, OH H, SHIN HW AND YIM JH. 2011. Ramalin, a novel nontoxic antioxidant compound from the Antarctic lichen *Ramalina terebrata*. *Phytomedicine* 18: 1285– 1290.

PAZ Z, KOMON-ZELAZOWSKA M, DRUZHININA IS, AVESKAMP MM, SHNAIDERMAN A, ALUMA Y, CARMELI S, ILAN M AND YARDEN O. 2010. Diversity and potential antifungal properties of fungi associated with a Mediterranean sponge. *Fungal Diversity* 42: 17–26.

PETERSON SW. 2000. Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. In: SAMSON RA AND PITT JI (Ed.), *Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification*, Amsterdam: Harwood Academic, p. 323-355.

PITT JI. 1991. Chemotaxonomy of *Penicillium* and related teleomorphs. *Jpn J Med Mycol* 32(2): 31-38.

RICE-EVANS CA, MILLER NJ, BOLWELL PG, BRAMLEY PM AND PRIDHAM JB. 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 22: 375-383.

SANCHEZ-MORENO C. 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Tech Int* 8: 122.

SCOPEL M. 2012. Isolamento, investigação química e avaliação do potencial antibiótico, antibiofilme e anti-*Trichomonas vaginalis* de fungos associados a organismos marinhos da Costa Sul do Brasil. (TESE) PPGCF/UFRGS: Porto Alegre, 215p.

SOLA MC, OLIVEIRA AP, FEISTEL JC AND REZENDE CSM. 2012. Manutenção de microrganismos: Conservação e Viabilidade. *Enciclopédia Biosfera* 8(14): 1398.

SUN HH, MAO WJ, CHEN Y, GUO SD, LI HY, QI XH, CHEN YL AND XU J. 2009. Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium* sp. F23-2. *Carbohydrate Polymers* 78: 117–124.

SUN HH, MAO WJ, JIAO JY, LI HY, CHEN Y, QI XH, CHEN YL, XU J, ZHAO CQ, HOU YJ AND YANG YP. 2011. Structural Characterization of Extracellular Polysaccharides Produced by the Marine Fungus *Epicoccum nigrum* JJY-40 and Their Antioxidant Activities. *Mar Biotechnol* 13: 1048–1055.

TAN C, LIU Z, CHEN S, HUANG X, CUI H, LONG Y, LU Y AND SHE Z. 2016. Antioxidative Polyketones from the Mangrove-Derived Fungus *Ascomycota* sp. SK2YWS-L. *Scientific Reports* 6: 36609.

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

TAYLOR MW, RADAX R, STEGER D AND WAGNER M. 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology and biotechnological potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71: 295-347.

ÜNYAYAR A, DEMIRBILEK M, TURKOGLU M, CELIK A, MASMANCI MA, ERKURT EA, ÜNYAYAR S, CEKIC Ö ANDTACAG H. 2006. Evaluation of Cytotoxic and Mutagenic Effects of *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii* Extracts on Mammalian Cells. Drug and Chemical Toxicology 29: 69-83.

VITA-MARQUES AM, LIRA SP AND BERLINCK RGS. 2008. A Multi-screening Approach for MFrine-derived fungal Metabolites and the Isolation of Cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. Quim. Nova 31(5): 1099-1103.

WANG G, LI Q AND ZHU P. 2008. Phylogenetic diversity of culturable fungi associated with the Hawaiian sponges *Suberites zeteki* and *Gelliodes fibrosa*. Antonie van Leeuwenhoek 93: 163–174.

WEI R, LI F, SONG R AND QIN S. 2009. Comparison of two marine sponge-associated *Penicillium* strains DQ25 and SC10: differences in secondary metabolites and their bioactivities. Annals of Microbiology 59(3): 579-585.

WU HC, CHENG HM AND SCHIAU CY. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Res Int 36: 949.

WU Z, WANG Y, LIU D, PROKSCH P, YU S AND LIN W. 2016. Antioxidative phenolic compounds from a marine-derived fungus *Aspergillus versicolor*. Tetrahedron 72: 50-57.

YOU J, DAI H, CHEN Z, LIU G, HE Z, SONG F, YANG X, FU H, ZHANG L AND CHEN X. 2010. Trichoderone, a novel cytotoxic cyclopentenone and cholesta-7, 22-diene-3 β , 5 α , 6 β -triol, with new activities from the marine-derived fungus *Trichoderma* sp. J Ind Microbiol Biotechnol 37(3): 245-252.

5 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Foram isoladas e purificadas 46 linhagens de fungos a partir de nove amostras diferentes de esponjas coletadas na praia de Porto de Galinhas (Pernambuco, Brasil). Deste total, foram obtidos 28 isolados do gênero *Aspergillus* e 13 do gênero *Penicillium*, representantes abundantes do ambiente terrestre, pertencentes ao filo Ascomycota. Em um estudo realizado por Menezes et al. (2010), também foi reportado uma grande diversidade de fungos pertencentes a este filo associada à diferentes amostras de invertebrados marinhos. De acordo com Prasannarai e Sridhar (2001), a predominância desses fungos em ambientes aquáticos pode estar associada ao fácil cultivo e recuperação e à presença de esporos com apêndices, os quais facilitam a flutuabilidade na água e aderência ao substrato.

Os extratos metabólicos produzidos pelos fungos *Aspergillus parasiticus* e *Penicillium fellutanum*, isolados da esponja *Cladocroce caelum*, apresentaram atividade citotóxica frente à linhagem de células macrófagos murinos J774, com percentual de inibição de crescimento celular nas concentrações mais elevadas de 85 e 72%, respectivamente.

Os extratos metabólicos pertencentes ao fungo *Aspergillus japonicus* isolado da esponja *Cladocroce caelum* e ao *A. japonicus* isolado da esponja *Tedania ignis* apresentaram potente atividade sequestradora de radicais DPPH, como também uma elevada composição fenólica, estreitando a relação entre compostos fenólicos e atividade antioxidante.

É presumível imaginar que, por sua extensão, a costa brasileira abrigue um número muito grande de espécies vivas, muitas destas ainda sem identificação, e por consequência, necessitam de investigação química e biológica, isso porque, é sabido que diversas substâncias provenientes de organismos do meio marinho apresentam atividade frente a sistemas biológicos, e algumas destas já se tornaram modelos para fármacos atualmente comercializados. Neste sentido, é possível concluir que o presente estudo contribui consideravelmente com o avanço do conhecimento de fungos que vivem associados a esponjas marinhas e sua possível aplicação biotecnológica. E, principalmente, por se destacar pelo ineditismo desse estudo no litoral do Nordeste brasileiro, visto que esta região ocupa a maior costa

litorânea do país, no entanto nenhuma publicação na literatura foi relatada com fungos marinhos no Nordeste.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-LATTEF, A. et al. New antioxidant hydroquinone derivatives from the algicilous marine fungus *Acremonium* sp. **Journal Natural Product**, Cincinnati, v. 65, p. 1605-1611, 2002.
- ABDEL-WAHAB, M. A. et al. Phylogenetic evaluation of anamorphic species of *Cirrenalia* and *Cumulospora* with the description of eight new genera and four new species. **Mycol. Prog.**, Germany, v. 9, p. 537–558, 2010.
- AMAGATA, T. et al. Cytotoxic substances produced by a fungal strain from a sponge: physico-chemical properties and structures. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 51, p. 33-40, 1998.
- AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de Textos, 2006. 115 p.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 113- 123, 2006.
- BELARBI, E. H.; GOMEZ, A. C.; CHISTI, Y. Producing drugs from marine sponges. **Biotechnology Advances**, New York, v. 21, p. 585–598, 2003.
- BELOFSKY, G.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Sansalvamide: A New Cytotoxic Cyclic Depsipeptide Produced by a Marine Fungus of the Genus *Fusarium*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 40, p. 2913-2916, 1999.
- BERGQUIST, P. R. **Sponges**. Los Angeles: University of Califórnia, 1978. 268 p.
- BERLINCK, R. G. S. et al. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 67, n. 3, p. 510- 522, 2004.
- BHADURY, P.; MOHAMMAD, B. T.; WRIGHT, P. C. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. **J Ind Microbiol Biotchnol**, Berlim, v. 33, p. 325-337, 2006.
- BHAT, R.; SRIDHAR, K. R. Marine Fungi and Novel Metabolites. In: SRIDHAR, K. R. (Ed.). **Fronties in Fungal Ecology, Diversity and Metabolites**. New Delhi: International Publishing House, 2009. p. 51-70.
- BILLS, G. F.; STADLER, M. Editorial comment: Discovery, distribution and biosynthesis of fungal secondary metabolites. **Micology**, Abingdon, v. 5, n. 3, p. 33-101, 2014.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, London, v. 29, p. 144–222, 2012.
- BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. Filo Porifera: As esponjas. In: _____. **Invertebrados**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 185-216, 2007.

- BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Product Reports**, London, v. 21, p. 143-163, 2004.
- CAYUELA, M. M. Oxygen free radicals and human disease. **Biochimie**, Paris, v. 77, p. 147-161, 1995.
- CHOI, E. J. et al. Apoptosis-inducing effect of diketopiperazine disulfides produced by *Aspergillus* sp. KMD901 isolated from marine sediment on HCT116 colon cancer cell lines. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 110, p. 304–313, 2011.
- CHRISTOPHER, C. et al. Deep sea hydrothermal vents: Potential hot spots for natural products discovery? **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v. 73, p. 489–499, 2010.
- CONNER, E. M.; GRISHAM, M. B. Inflammation, free radicals and antioxidants. **Nutrition**, Burbank, v. 12, n. 4, p. 274-277, 1996.
- COSTA, C. F. et al. Microsymbionts of *Siderastrea Stellata* (Cnidaria, Scleractinia) in Coastal Reefs of Cabo Branco, State of Paraíba, Northeastern Brazil. **Tropical Oceanography**, Recife, v. 32, n. 2, p. 171-179, 2004.
- CRUZ, L. J. et al. IB-01212, a new cytotoxic cyclodepsipeptide isolated from the marine fungus *Clonostachys* sp. ESNA-A009. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 71, n. 9, p. 3335-3338, 2006.
- DAS, S.; LYLA, P. S.; KHAN, A. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. **Current Science**, Bangalore, 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**, Washington, v. 67, p. 4531-4537, 2001.
- DAVIES-COLEMAN, M. T.; BEUKES, D. R. Ten years of marine natural product research at Rhodes university. **South African Journal of Science**, Johannesburg, v. 100, p. 539-544, 2004.
- 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**, New Delhi, v. 2, n. 1, p. 59-64, 2011.
- EFFENDI, H. **Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites of sponge-derived fungi collected from the Mediterranean sea (Italy) and Bali sea (Indonesia)**. 2004. 223p. Dissertação (Mestrado) – Gedrukt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf, 2004.
- EISENBRAND G. et al. Methods of *in vitro* toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, p. 193-236, 2002.
- FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, London, v. 19, p. 1-48, 2002.

FENICAL, W. New pharmaceuticals from marine organisms. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 15, p. 339-341, 1997.

FENICAL, W.; JENSEN, P. R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 2, p. 666-673, 2006.

FRAENKEL, G. S. The raison d'être of secondary plant substances; these odd chemicals arose as a means of protecting plants from insects and now guide insects to food. **Science**, Washington, v. 129, p. 1466–1470, 1959.

FOX, E. M.; HOWLETT, J. B. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. **Curr. Opin. Microbiol.**, London, v. 11, p. 1-7, 2008.

GOMES, N. G. M. et al. Can Some Marine-Derived Fungal Metabolites Become Actual Anticancer Agents? **Mar. Drugs**, Basel, v. 13, p. 3950-3991, 2015.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 49, n. 10, p. 1341-1348, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 246, p. 501-514, 1986.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycol. Res.**, Cambridge, v. 105, p. 1422–32, 2001.

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycol. Res.**, Cambridge, v. 111, p. 509–547, 2007.

HÖLLER, U. et al. Fungi from marine sponges: Diversity, biological activity and secondary metabolites. **Mycol. Res.**, Cambridge, v. 104, p. 1354–1365, 2000.

HOOPER, N. J. A.; VAN SOEST, R. W. M. **Systema Porifera**: A guide to the classification of sponges. New York: Kluwer academic, 2002

HU, M. J.; HSINUNG, G. D. Evaluation of new antiviral agents: *In vitro* perspectives. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 11, n. 5-6, p. 217-232, 1989.

HUANG, H. et al. Halogenated anthraquinones from the marine-derived fungus *Aspergillus* sp. **Journal of Natural Products**, Colombus, v. 75, p. 1346-1352, 2012.

HUANG, W. Y. et al. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. **Fungal Divers.**, Hong Kong, v. 33, p. 61–75, 2008.

IMHOFF, J. F. New natural products from marine microorganisms. In: VILLWOCK, A. **IFM-Geomar Report 2002-2004**: From the Seafloor to the Atmosphere. Kiel, GER: KIFM-GEOMAR, 2005. p. 44-46.

INDRIANI, I.D. **Biodiversity of Marine-Derived Fungi and Identification of their Metabolites**. 2007. 354p. Tese (Pós-Doutorado) – Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine, University Düsseldorf, Düsseldorf, GER, 2007.

- JALDUCCO, R. et al. New Macrolides and Furan Carboxylic Acid Derivative from the Sponge-Derived Fungus *Cladosporium herbarum*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v. 64, p. 527-530, 2001.
- JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Secondary metabolites from marine fungi. In: HYDE, K. D. **Fungi in marine environments**. Fungal Diversity Research Series, s. l., v. 7, p. 293-315, 2002.
- JONES, E. B. Are there more marine fungi to be described? **Bot. Mar.**, Berlin, v. 54, p. 343-354, 2011.
- JONES, E. B. G. et al. Classification of marine ascomycota, anamorphic taxa and basidiomycota. **Fungal Divers.**, Hong Kong, v. 35, p. 1-187, 2009.
- JULIANTI, E. et al. Acremostictin, a Highly Oxygenated Metabolite from the Marine Fungus *Acremonium strictum*. **J. Nat. Prod.**, Gorakhpur, v. 74, p. 2592-2594, 2011.
- KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, Rio de Janeiro, v. 74, n. 1, p. 151-170, 2002.
- KOHLMEYER, J.; KOHLMEYER, E. **Marine Mycology. The Higher Fungi**. Nova Iorque: Academic Press., 1979.
- KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D. Marine natural products research: current directions and future potential. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 62, p. 193-211, 1996.
- KOOPMANS., M.; MARTENS, D.; WIJFFELS, R. H. Towards Commercial Productions of Sponge Medicines. **Marine Drugs**, Basel, v. 7, p. 787-802, 2009.
- KORNIENKO, A. et al. Therapeutic agents triggering nonapoptotic cancer cell death. **J. Med. Chem.**, Easton, v. 56, p. 4823-4839, 2013.
- KUMAR, D. S. S.; HYDE, K. D. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Divers.**, Hong Kong, v. 7, p. 69-90, 2004.
- KUPKA, J. et al. Antibiotics from basidiomycetes. XI. The biological activity of sicayne, isolated from the marine fungus *Halocyphina villosa* J. & E. Kohlmeyer. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 34, p. 298-304, 1981.
- LEÓN, C. J. et al. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad *in vitro*. **Biomédica**, Bogotá, v. 26, p. 161-168, 2006.
- LI, X. et al. Antioxidant metabolites from marine alga-derived fungus *Aspergillus wentii* EN-48. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v. 7, p. 120-123, 2014.
- LI, Z. Advances in marine microbial symbionts in the china sea and related pharmaceutical metabolites. **Marine Drugs**, Basel, v. 7, p. 113-129, 2009.
- LIRA, S. P. **Metabólitos Secundários Biologicamente Ativos Isolados de Esponjas Marinhas e do fungo *Beauveria felina* de Origem Marinha**. 151p. 2007.

Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

MAYER, A. M. S. et al. Marine Pharmacology in 2009–2011: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms of Action. **Marine Drugs**, Basel, v. 11, p. 2510-2573, 2013.

MELLO-FILHO, A. C.; HOFFMANN, M. E.; MENEHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemistry Journal**, Tokyo, v. 218, p. 273-275, 1983.

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**, Jena, v. 165, n. 6, p. 466-482, 2010.

MORRISON-GARDINER, S. Dominant fungi from Australian reefs. **Fungal Divers.**, Hong Kong, v. 9, p. 105–121, 2002.

MURICY, G.; HADJU, E. **Porífera Brasilis: Guia de Identificação das Esponjas mais comuns do Sudeste do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2006.

NARDONE, R. M. Growth, nutrition and metabolism of cells in culture. In: ROTBBLAT, G. H.; CRISTOFALO, V. J. (Ed.). **Toxicity testing in vitro**. New York: Academic, 1977. p. 471-495.

NEWMAN, D. J.; GIDDINGS, L. A. Natural products as leads to antitumor drugs. **Phytochem. Rev.**, Dordrecht, v. 13, p. 123–137, 2014.

NGUYEN, V. T. et al. Gliotoxin isolated from marine fungus *Aspergillus sp.* induces apoptosis of human cervical cancer and chondrosarcoma cells. **Mar. Drugs**, Basel, v. 12, p. 69–87, 2014.

NIU, S. et al. New Polyphenols from a Deep Sea *Spiromastix sp.* Fungus, and Their Antibacterial Activities. **Marine Drugs**, Basel, v. 13, p. 2526-2540, 2015.

NUMATA, A. et al. Gymnastatins, novel cytotoxic metabolites produced by a fungal strain from a sponge. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 38, p. 5675-5678, 1997.

OVERY, D. P. et al. An assessment of natural product discovery from marine (*sensu strictu*) and marine-derived fungi. **Micology**, Abingdon, v. 5, n. 3, p. 145-167, 2014.

PARK, M. S. et al. Marine-derived *Penicillium* in Korea: Diversity, enzyme activity, and antifungal properties. **Antonie Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 106, p. 331–345, 2014.

PAUL, V. J.; PUGLISI, M. P. Chemical mediation of interactions among marine organisms. **Natural Product Reports**, London, v. 21, p. 189-209, 2004.

PAUL, V. J.; PUGLISI, M. P.; RITSON-WILLIAMS, R. Marine chemical ecology. **Natural Product Report**, London, v. 23, p. 153-180, 2006.

- PAZ, Z. et al. Diversity and potential antifungal properties of fungi associated with a Mediterranean sponge. **Fung. Divers.**, Kunming, v. 42, p. 17–26, 2010.
- PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 46-61, 2002.
- PRASANNARAI, K.; SRIDHAR, K. R. Diversity and abundance of higher marine fungi on woody substrates along the west coast of India. **Current Science**, Bangalore, v. 81, n. 3, p. 304-311, 2001.
- PROKSCH, P. et al. Sponge-associated fungi and their bioactive compounds: the *Suberites* case. **Botanica Marina**, Berlin, v. 51, n. 3, p. 209-218, 2008.
- PROKSCH, P.; EDRADA, R.; EBEL, R. Drugs from the Sea - opportunities and obstacles. **Marine Drugs**, Basel, v. 1, p. 5-17, 2003.
- RICHARDS, T. A. et al. Marine Fungi: Their Ecology and Molecular Diversity. **Annu. Rev. Marine. Sci.**, Palo Alto, v. 4, p. 495-522, 2012.
- SKROPETA, D.; WEI, L. Recent advances in deep sea natural products. **Nat. Prod. Rep.**, London, v. 31, p. 999–1025, 2014.
- SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. **Methods in Plant Biochemistry**. San Diego: Academic Press., 1991. p. 71-134.
- SUN, C. et al. Protection of PC12 cells from hydrogen peroxide-induced injury by EPS2, an exopolysaccharide from a marine filamentous fungus *Keissleriella sp.* YS 4108. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 115, p. 137-144, 2005.
- SUN, C. et al. Free radical scavenging and antioxidant activities of EPS2, an exopolysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Keissleriella sp.* YS 4108. **Life Sciences**, Oxford, v. 75, p. 1063-1073, 2004.
- SUN, H. H. et al. Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium sp.* F23-2. **Carbohydrate Polymers**, s. l, v. 78, p. 117–124, 2009.
- SUN, H. H. et al. Structural Characterization of Extracellular Polysaccharides Produced by the Marine Fungus *Epicoccum nigrum* JJY-40 and Their Antioxidant Activities. **Mar Biotechnol**, New York, v. 13, p. 1048–1055, 2011.
- SWATHI, J. et al. Identification and assessment of frequency distribution in fungi isolated from coastal Andhra Pradesh. **Malaysian Journal of Microbiology**, Minden, v. 10, n. 3, p. 215-218, 2014.
- TAKAHASHI, C. et al. Leptosins, antitumour metabolites of a fungus isolated from a marine alga. **J. Chem. Soc. Perkin Trans.**, London, v. 1, p. 1859–1864, 1994.
- TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

TAN, C. et al. Antioxidative Polyketones from the Mangrove-Derived Fungus *Ascomycota* sp. SK2YWS-L. **Scientific Reports**, s. l., v. 6, p. 36609, 2016.

TAYLOR, M. W. et al. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology and biotechnological potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 71, p. 295-347, 2007.

TURQUE, A. S. et al. Bacterial communities of the marine sponges *Hymeniacidon heliophila* and *Polymastia janeirensis* and their environment in Rio de Janeiro, Brazil. **Marine Biology**, Oslo, v. 155, p. 135–146, 2008.

TURQUE, A. S. et al. Microrganismos associados a poríferos: potencial biotecnológico da microbiota associada às esponjas marinhas. **Biociencia**, Brasília, v. 10, n. 37, p. 64-69, 2007.

VAROGLU, M.; CREWS, P. Biosynthetically diverse compounds from a saltwater culture of sponge-derived *Aspergillus niger*. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 63, p. 41-43, 2000.

WANG, B; QIU, Y. L. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 16, p. 299–363, 2006.

WANG, G. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Houndmills, v. 33, p. 545-551, 2006.

WEBSTER, J.; WEBER, W. S. **Introduction to Fungi**. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, 2007.

WU, Z. et al. Antioxidative phenolic compounds from a marine-derived fungus *Aspergillus versicolor*. **Tetrahedron**, Oxford, v. 72, p. 50-57, 2016.

YAMADA, T. et al. Leptosins O-S, cytotoxic metabolites from a strain of *Leptosphaeria* sp. isolated from a marine alga. **Heterocycles**, Amsterdam, v. 63, p. 641–653, 2004.

YANG, X. B. et al. Sulfation of a polysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108 alters its antioxidant properties *in vitro*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1725, p. 120-127, 2005.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA

Manuscrito a ser submetido à Revista:



ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS

ISSN 0001-3765 (versão impressa)

ISSN 1678-2690 (versão online)

Qualis: B2 (Biodiversidade)

Normas Editoriais:

- Papers devem ser escritos em inglês;
- Sempre que possível os artigos devem subdividir-se nas seguintes partes: 1. Primeira página; 2. Resumo (200 palavras ou menos, sem abreviaturas); 3. Introdução; 4. Materiais e métodos; 5. Resultados; 6. Discussão; 7. Agradecimentos, se for o caso; 8. Referências;
- Sempre que for caso disso, a seção de materiais e métodos deve indicar o Comitê de ética que avaliou os procedimentos para estudos humanos ou as normas seguidas para a manutenção e tratamentos experimentais de animais;
- Tabelas e ilustrações: Serão aceitos apenas ilustrações de alta qualidade. Todas as ilustrações serão consideradas figuras, incluindo desenhos, gráficos, mapas, fotografias, bem como tabelas com mais de 12 colunas ou mais de 24 linhas (máximo de 5 figuras gratuitamente). Sua colocação provisória no texto deve ser indicada;
- As referências devem ser citadas no texto, como, por exemplo, 'Smith 2004', 'Smith e Wesson 2005' ou, para três ou mais autores, 'Smith et al 2006'. Dois ou mais documentos do mesmo autor (es) no mesmo ano devem ser distinguidos por letras, por exemplo, 'Smith 2004a', 'Smith 2004b' etc.
- As referências devem ser listadas de acordo com a ordem alfabética do primeiro autor, sempre em XY de sobrenome a ordem em que X e Y são as iniciais. Se

houver mais de dez autores, use et al, após o primeiro autor. As referências devem conter o título do artigo. Nomes dos periódicos devem ser abreviados.

ANEXO B - Autorização do SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 80226-1	Data da Emissão: 19/08/2015 08:27	Data para Revalidação*: 17/09/2016
* De acordo com o art. 26 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Ceciana Maristela de Souza	CPF: 090.673.074-58
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE METABOLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS ISOLADOS DE ESPÔNGAS E CORAIS.	
Nome da Instituição: UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	CNPJ: 34.134.488/0001-08

☒ coleta de espécimes preservados separados	☐ coleta manual - captação manual
---	--

Destino do material biológico coletado

☒ Nome final destino	Final destino
☐ para - preservação em coleção de referência	

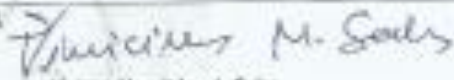
Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 23221341



Página 2/4

ANEXO C - AUTORIZAÇÃO DA SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE DE IPOJUCA

 PREFEITURA DO IPOJUCA SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE E CONTROLE URBANO	
 PREFEITURA DO IPOJUCA SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE E CONTROLE URBANO	
10 - OBSERVAÇÕES 1. A referida Autorização fundamenta-se no projeto apresentado nesta Secretaria, não implicando por parte da Secretaria de Meio Ambiente e Controle Urbano no reconhecimento da veracidade das informações fornecidas; 2. A concessão da presente Autorização não impedirá que esta Secretaria venha a exigir a adoção de medidas corretivas, desde que necessárias, de acordo com a Legislação Ambiental vigente; 3. O não atendimento às exigências contidas nesta Autorização, nos prazos determinados, implicará a perda da presente Autorização; 4. A requerente é responsável civil, penal e administrativamente pelos danos causados à vida, à saúde, ao Meio Ambiente e pelo uso inadequado que vier a fazer parte da presente Autorização; 5. Mediante decisão motivada, a Secretaria de Meio Ambiente e Controle Urbano poderá modificar as condicionantes, bem como suspender ou cancelar esta Autorização caso ocorra: 5.1. Violação ou inadequação de quaisquer condicionantes ou normas legais; 5.2. Omissão ou falta descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição da Autorização; 5.3. Superveniência de graves riscos ambientais e de saúde; 5.4. A não entrega dos relatórios nos prazos estabelecidos acima; 6. A ocorrência de situações descritas nos itens acima, sujeita os responsáveis, incluindo toda a equipe técnica, à aplicação de sanções previstas na Legislação pertinente.	
11 - DATA 22/01/2014	12 - DIRETOR DE CONTROLE AMBIENTAL  Vinícius Magalhães de Sales Diretor de Controle Ambiental Matrícula 099.454
13 - SECRETÁRIO DE MEIO AMBIENTE E CONTROLE URBANO  Eliodoro José de Lima Siqueira Secretário de Meio Ambiente e Controle Urbano	Pág. 2/2