



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

**CAMILA PEREIRA DE ALMEIDA**

**15/0031823**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA E CITOTÓXICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS  
DE *Vellozia squamata* Pohl (VELLOZIACEAE)**

**Orientador: Profa. Dra. Lorena Carneiro  
Albernaz.**

**Co-orientador: Prof. Dr. Danilo Batista  
Pinho**

**BRASÍLIA – DF**

**2019**

**CAMILA PEREIRA DE ALMEIDA**

**15/0031823**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA E CITOTÓXICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS  
DE *Vellozia squamata* Pohl (VELLOZIACEAE)**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito à conclusão da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) e obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.**

**Orientador: Profa. Dra. Lorena Carneiro Albernaz.**

**Co-orientador: Prof. Dr. Danilo Batista Pinho**

**BRASÍLIA – DF**

**2019**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito à conclusão da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) e obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA E CITOTÓXICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Vellozia squamata* Pohl (VELLOZIACEAE)

CAMILA PEREIRA DE ALMEIDA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APROVADO em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ por:

---

Profa. Dra. Lorena Carneiro Albernaz (Presidente)

---

Prof. Dr. Danilo Batista Pinho (Vice-presidente)

---

MSc. Renata Garcia Dusi (Membro avaliador)

---

MSc. Rildo Alexandre Fernandes Silva (Membro avaliador)

**BRASÍLIA – DF**

**2019**

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus por todas as oportunidades que tive ao longo da vida. Agradeço a minha família e a família do meu namorado por todo apoio, incentivo e amparo para realização dessa graduação e desenvolvimento deste trabalho. Agradeço especialmente a minha mãe Marily Pereira da Silva por sempre acreditar no meu potencial e me apoiar nas minhas decisões. Agradeço meu pai Claudemir Gomes de Almeida por todo suporte.

Agradeço ao meu namorado Cristian Landri Cabral de Moraes, pelo companheirismo, por toda paciência e incentivo aos estudos. Agradeço também à minha tia Irani Pereira da Silva e aos meus sogros Tatiana Cabral de Moraes e Agostinho Matos de Moraes por todo apoio e amparo.

Agradeço aos meus amigos e colegas do curso de Farmácia da UnB pela amizade, companheirismo, pela paciência e pelas horas de conversa acompanhadas de café. Agradeço especialmente a Joyce Silva dos Santos, Nara Kanzaki, Francisco Danilo Melo de Souza, Camila de Moura Guimarães, Mariana de Fátima Ramos Marques, Juliana de Albuquerque Vaz, Isabella de Medeiros Garcia e Maria Luiza Mello Ross.

Agradeço aos colegas de laboratório que me ensinaram muito e me ajudaram em todas as etapas do trabalho. Agradeço a Profa. Zuleide Chaves pela primeira oportunidade no Departamento de Fitopatologia e à Dra. Débora Cervieri Guterres, por ter me iniciado nos primeiros aprendizados no laboratório, e também por sua amizade e incentivo. Agradeço aos MSc. Bianca Samay Bonfim, Samuel Galvão Elias e Rildo Alexandre Fernandes da Silva pela amizade, por todos os ensinamentos e disposição em ajudar. Agradeço ainda pela amizade do Dr. Justino Dias Neto e dos MSc. Bruno de Souza, Jennifer Decloquement, Aline Silva, Jefferson Bertin Vélez e Lincoln Bizerra. Agradeço especialmente às companheiras de Iniciação Científica Ana Clara Quintana e Fernanda Lara dos Santos que sempre me ouviram e me auxiliaram nos trabalhos do dia-a-dia. Agradeço imensamente à Thaís Isabela Carvalho dos Santos, que esteve à frente

da coleta e isolamento dos fungos endofíticos da *Vellozia squamata*. Agradeço ao Prof. Dr. Danilo Batista Pinho, por ter acreditado no meu potencial e ter me proporcionado tantas oportunidades de trabalho, aprendizado e desenvolvimento.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Farmacognosia, por toda a disposição em ensinar e ajudar nos trabalhos desenvolvidos. Agradeço especialmente à Laís da Silva Moraes, por todos os ensinamentos, ajuda e paciência e aos amigos Francisco Danilo Melo de Souza, Camila de Moura Guimarães e Mariana de Fátima Ramos Marques por todo auxílio e incentivo. Agradeço à Prof. Dra. Lorena Carneiro Albernaz, por ter aceitado a orientação desse trabalho e ajudado imensamente no desenvolvimento do mesmo. Agradeço a Geysa Stéfanne pelos ensaios de citotoxicidade e pelas explicações e ensinamentos. Agradeço a Laila Salmen Espindola pelo acolhimento e oportunidade de realizar os estudos no Laboratório de Farmacognosia.

Agradeço aos membros da banca Renata Garcia Dusi e Rildo Alexandre Fernandes da Silva pela disposição e gentileza de avaliar meu trabalho.

Agradeço a Universidade de Brasília por toda a formação e oportunidades de desenvolvimento profissional e a todos professores que contribuíram para que eu chegasse até aqui. Por fim, agradeço a Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de iniciação científica e oportunidade de realização deste trabalho.

## Resumo

O mosquito *Aedes aegypti* é o vetor de doenças importantes conhecidas como arboviroses (Dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela), sendo seu controle uma importante estratégia de combate a essas doenças. Devido a emergência da resistência do mosquito a diversos inseticidas químicos, o desenvolvimento de novos produtos eficazes e menos nocivos se faz necessário sendo, o *screening* de endófitos, um boa fonte potencial para descoberta de novas moléculas. Nesse trabalho, foi realizada a seleção de doze fungos endofíticos de *Vellozia squamata* Pohl (Velloziaceae), uma planta endêmica do Cerrado, para avaliação da atividade larvicida e citotóxica. Os isolados foram identificados como *Talaromyces amestolkiae*, *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium incarnatum-equiseti*, *Fusarium* sp., *Truncatella* sp., *Bipolaris* sp., *Alternaria* spp., *Pithomyces* sp. e *Arthrinium phaeospermum* a partir de análises moleculares da região do espaçador interno transcrito (ITS) do rDNA. Os extratos brutos em acetato de etila (AcOEt) obtidos foram testados em larvas L3 de *Ae. aegypti*. Entre os doze isolados, seis provocaram mortalidades superiores a 50% em 24 horas, sendo que o fungo *Talaromyces amestolkiae* provocou a morte de todas as larvas nesse período e por isso foi selecionado para a obtenção de extratos em uma curva de crescimento. Em 48 horas *Bipolaris* sp. causou a mortalidade de 95% das larvas testadas. O potencial citotóxico dos extratos foi avaliado para as linhagens de macrófagos J744, sendo que apenas *Bipolaris* sp. inibiu mais de 50% da proliferação celular nas concentrações de 25 e 50 µg/mL. Na concentração 100 µg/mL, seis extratos inibiram a proliferação celular em mais de 50% e *T. amestolkiae* apresentou relativa toxicidade. Ainda assim, este último foi selecionado para curva de crescimento porque os compostos relacionados com a citotoxicidade podem não estar relacionados com os que apresentam atividade larvicida. O extrato obtido a partir de culturas com 4 dias de crescimento foi o que proporcionou a maior mortalidade para larvas L3. Para melhor caracterização química dos extratos, análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) serão realizadas.

## Abstract

The *Aedes aegypti* mosquito is the vector of important diseases known as arboviruses (Dengue, Zika, Chikungunya and yellow fever), and its control is an important strategy to combat these diseases. Due to mosquito resistance to various insecticides, it is necessary to develop new products more effective and less harmful, being endophyte screening, a good potential source for discovering new molecules. In this work, twelve endophytic fungi of *Vellozia squamata* Pohl (Velloziaceae), an endemic plant of the Brazilian Cerrado, were selected to evaluate larvicidal and cytotoxic activities. The isolates were identified as *Talaromyces amestolkiae*, *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium incarnatum-equiseti*, *Fusarium* sp., *Truncatella* sp., *Bipolaris* sp., *Alternaria* spp., *Pithomyces* sp. *Arthrinium phaeospermum*, based on molecular analysis of the internal transcribed spacer (ITS) of rDNA. Crude extracts in ethyl acetate (AcOEt) were tested on L3 larvae of *Ae. aegypti*. Among the twelve selected, six cause mortality greater than 50% in 24 hours, and the fungus *Talaromyces amestolkiae* causes the death of all larvae during this period and was therefore selected for an extraction test on a growth curve. Within 48 hours *Bipolaris* sp. caused a mortality of 95% of the larvae tested. The cytotoxic potential of the extracts was evaluated for J744 macrophage lines, beings only *Bipolaris* sp. inhibited more than 50% of cell proliferation in the 25 and 50 µg/mL ranges. At 100 µg/mL, six extracts inhibited cell proliferation by more than 50% and *T. amestolkiae* showed relative toxicity. Still, the latter was selected for growth curve because cytotoxicity-related compounds may not be related to larvicidal activities. Activated extract from 4-day-old cultures provided the highest mortality for L3 larvae. For a better chemical characterization of the extracts, analysis by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) will be performed.

## Lista de Figuras

Figura 1 - Distribuição Geográfica prevista do <i>Ae. aegypti</i> .	12
Figura 2 - Ciclo de vida do <i>Ae. aegypti</i> .	13
Figura 3 - Árvore filogenética a partir de sequências da região ITS entre os isolados selecionados	30
Figura 4 - Atividade do extrato bruto Arbo3A049C (dose-resposta) para cálculo do EC <sub>50</sub> em larvas L3.	34

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Iniciadores (primers) utilizados nas reações de PCR.	26
Tabela 2 - Identificação dos fungos endofíticos e rendimento dos respectivos extratos brutos em acetato de etila (AcOEt).	29
Tabela 3 - Atividade larvicida em % de mortalidade e atividade citotóxica (% células viáveis) dos extratos brutos obtidos dos 12 isolados selecionados.	30
Tabela 4 - Avaliação da atividade larvicida expressa em (%) de mortalidade e rendimento de extração para obtenção de extratos com diferentes dias de cultivo.	35

## Lista de siglas e abreviaturas

**AcOEt** = Acetato de etila

**BDA** = Batata-dextrose-ágar

**CCUB** = Coleção de Culturas Universidade de Brasília

**CHIKV** = Vírus da chikungunya

**CL<sub>50</sub>** = Concentração letal 50%

**CLAE** = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**DENV** = Vírus da dengue

**DENV-1** = Vírus da dengue sorotipo 1  
**DENV-2** = Vírus da dengue sorotipo 2  
**DENV-3** = Vírus da dengue sorotipo 3  
**DENV-4** = Vírus da dengue sorotipo 4  
**DMEM** = *Dulbecco modification of Minimum Essential Media*  
**DMSO** = Dimetilsulfóxido  
**DNA** = Ácido Desoxirribonucléico  
**ITS** = *Internal transcribed spacer*  
**MTT** = {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}  
**NCBI** = *National Center for Biotechnology Information*  
**PCR** = Reação em cadeia da polimerase  
**PVP** = Polivinilpirrolidona  
**rDNA** = DNA ribossomal  
**RNA** = Ácido Ribonucléico  
**SDS** = Dodecil sulfato de sódio  
**YFV** = Vírus da febre amarela  
**YMG** = Extrato de levedura, extrato de malte e glicose  
**ZIKV** = Vírus da zika

## Sumário

1. Introdução	9
2. Referencial teórico	11
2.1. <i>Aedes aegypti</i>	11
2.2. Arboviroses	13
2.2.1. Dengue	14
2.2.2. Chikungunya	15
2.2.3. Zika	16
2.2.4. Febre amarela	17
2.3. Controle do vetor	19

2.4.	Cerrado	20
2.5.	Fungos endofíticos	20
2.6.	<i>Vellozia squamata</i> Pohl	21
3.	Objetivos	22
3.1.	Objetivos gerais	22
3.2.	Objetivos específicos	22
4.	Métodos	23
4.1.	Coleta, isolamento e identificação dos fungos endofíticos	23
4.1.1.	Coleta e processamento	23
4.1.2.	Isolamento e armazenamento dos isolados	23
4.1.3.	Extração de DNA	24
4.1.4.	Reação em cadeia da polimerase - PCR	24
4.1.5.	Análises Filogenéticas	25
4.2.	Produção dos extratos brutos	25
4.3.	Avaliação da atividade larvicida	26
4.4.	Curva de crescimento	26
4.5.	Análise e separação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	27
4.6.	Ensaio de citotoxicidade	27
5.	Resultados e Discussão	28
5.1.	Isolamento e identificação	28
5.2.	Atividade larvicida	30
5.3.	Atividade citotóxica	34
5.4.	Curva de crescimento	35
5.5.	Cromatogramas	36
6.	Conclusão	36
7.	Referências bibliográficas	37

## 1. Introdução

O mosquito *Aedes aegypti* (Culicidae: Diptera) é o vetor de doenças importantes conhecidas como arboviroses: Dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela. Originário da África subsaariana, foi introduzido pelos Espanhóis e Portugueses no Novo Mundo e atualmente está distribuído por todo globo, ocorrendo principalmente em áreas tropicais e subtropicais (KRAEMER *et al.*, 2015; POWELL; TABACHNICK, 2013; SCHMIDT *et al.*, 2018). Para reduzir e prevenir a transmissão dessas arboviroses, tem-se como principal

estratégia o controle do vetor (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009), que pode ser feito de forma física, química e/ou biológica (ARAÚJO *et al.*, 2015).

O controle químico é a principal estratégia adotada no combate do *Ae. aegypti*, todavia, devido a crescente resistência das populações desse mosquito a diversas classes de inseticidas, tem-se buscado novas alternativas capazes de combater esse vetor. Além disso, espera-se que essas novas estratégias sejam menos tóxicas e/ou causem menor dano ambiental (RUBIO *et al.*, 2019). Portanto, vem crescendo o interesse de se identificar novas substâncias de origens naturais para o controle do *Ae. aegypti* e consequentemente das transmissões das arboviroses relacionadas (RAGAVENDRAN, CHINNASAMY *et al.*, 2019).

Muitas substâncias com atividade inseticida já foram isoladas a partir de plantas (AHBIRAMI *et al.*, 2014; DE SANTOS *et al.*, 2012; INTIRACH *et al.*, 2019; KAJLA *et al.*, 2016) e a depender da quantidade necessária de tecido vegetal e abundância da espécie, a extração de substâncias pode levar a exploração indiscriminada de determinada espécie. Além disso, muitas plantas têm o ciclo de vida longo ou possuem grande variação na capacidade de produção da substância de interesse. Uma alternativa eficaz é a utilização dos fungos endofíticos, sendo que existem vários gêneros envolvidos na produção de metabólitos secundários como: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Podospora* e etc (MATASYOH *et al.*, 2011; PRADEEP *et al.*, 2015; RAGAVENDRAN, CHINNASAMY *et al.*, 2019), que além de possuir ciclo de vida curto, podem ser manipulados em laboratório.

Poucos estudos foram conduzidos a fim de investigar micro-organismos endofíticos, sendo que a maioria dos trabalhos abordaram organismos associados a plantas com propriedades medicinais (GAZIS; CHAVERRI, 2010). São ainda mais escassos os trabalhos que investigam endófitos no bioma Cerrado (NORILER *et al.*, 2018), um dos hotspots de biodiversidade mundial (MYERS *et al.*, 2000). O Cerrado é considerado um dos biomas mais diversos do mundo, possuindo cerca de 6000 espécies de plantas

vasculares (NORILER *et al.*, 2018), sendo que 44% dessas espécies são consideradas endêmicas (KLINK; MACHADO, 2005).

*Vellozia squamata* (Canela-de-ema) é uma planta endêmica de campos rupestres e Cerrado (ALVES, 1994). Possui flores vistosas e semelhantes ao lírio (DE MENEZES; DE MELLO-SILVA; MAYO, 1994). Apesar do fato de várias espécies de *Vellozia* se encontrarem em perigo de extinção, existem poucos trabalhos sobre a micobiota dessa espécie vegetal.

## 2. Referencial teórico

### 2.1. *Aedes aegypti*

Os mosquitos, reconhecidos organismos pertencentes à família Culicidae, ordem Diptera, ocupam diferentes habitats, variando desde regiões temperadas a tropicais. Várias espécies possuem importância médica que em sua maioria estão reunidas nos gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* (HARBACH, 2007). Mosquitos do gênero *Aedes* são vetores de várias arboviroses importantes, incluindo dengue, zika, chikungunya e febre amarela (SCHMIDT *et al.*, 2018).

A espécie *Aedes aegypti* foi introduzida no novo mundo por meio de navios negreiros que partiam do oeste da África, provenientes da Espanha e Portugal (POWELL; TABACHNICK, 2013), e hoje encontra-se amplamente distribuída por todo globo (SCHMIDT *et al.*, 2018). A subespécie silvestre denominada *Ae. aegypti formosus* (de coloração mais escura) possui hábitos ecológicos similares à espécie ancestral em contraposição ao hábito doméstico da subespécie *Ae. aegypti aegypti* (POWELL; TABACHNICK, 2013).

O *Ae. aegypti* ocorre principalmente em áreas tropicais e subtropicais (Figura 1), com predominância no norte do Brasil e sudeste da Ásia, incluindo toda a Índia. Possui ainda ampla distribuição na Austrália e baixa distribuição nas áreas temperadas da América do Norte e Europa, nesta última se restringindo a poucos pontos na Espanha e Grécia. Esse padrão de distribuição é explicado pela influência de fatores como temperatura e

urbanização (KRAEMER *et al.*, 2015), pois o *Ae. aegypti* é mais sensível à baixas temperaturas na natureza (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2019).

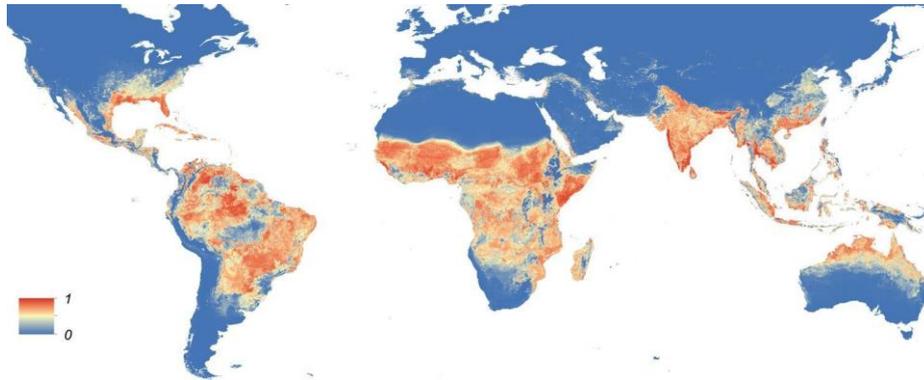


Figura 1 - Distribuição Geográfica prevista do *Ae. aegypti*. O mapa mostra a probabilidade de ocorrência (de 0 azul a 1 vermelho) em um espaço resolução de 25 km<sup>2</sup>. Fonte: KRAEMER *et al.*, 2015

Fêmeas de *Ae. aegypti* alimentam-se de sangue cujas proteínas são essenciais para a maturação dos ovos, e as mesmas podem se alimentar de mais de um hospedeiro humano por ciclo gonotrófico, o que aumentam as chances de transmissão de arboviroses. Seu hábito é diurno, e normalmente descansa em ambientes fechados, como dentro de casas, das quais, ambos fêmeas e machos, não se afastam (KRAEMER *et al.*, 2015; SCOTT; TAKKEN, 2012).

As fêmeas de *Ae. aegypti* depositam seus ovos em recipientes artificiais que contêm água e após algumas horas de submersão, os ovos eclodem. A larva que sai do ovo necessita permanecer na água para completar seu desenvolvimento e após 4 estádios, a larva se transforma em pupa que por fim se transforma no mosquito adulto (Figura 2).

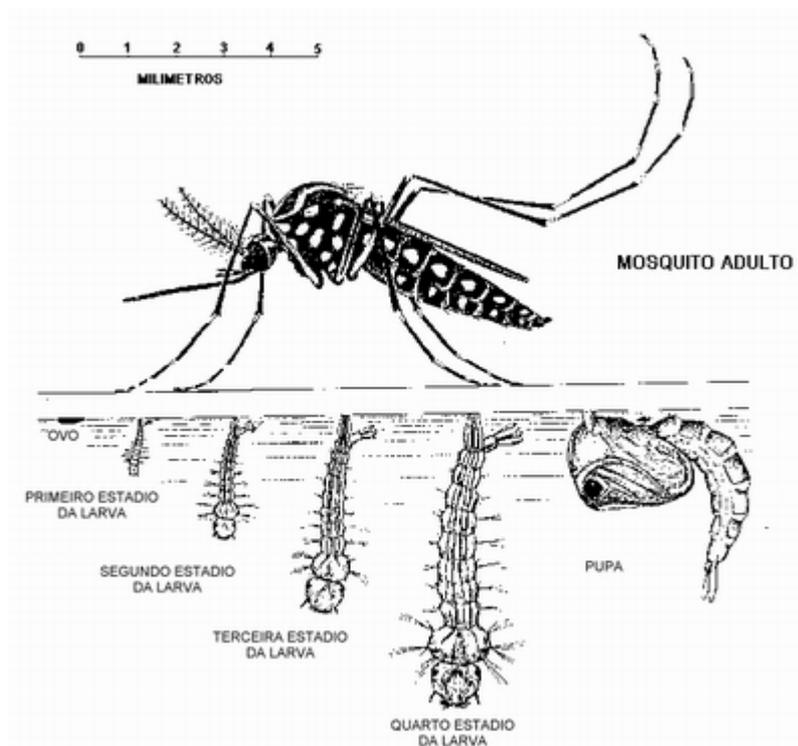


Figura 2 - Ciclo de vida do *Ae. aegypti*. Fonte: BRASIL, 2006.

## 2.2. Arboviroses

O termo arbovírus, do inglês *Arthropod-borne virus*, foi cunhado em 1942 para descrever um grupo de vírus que se multiplicam e são transmitidos à vertebrados por meio de um artrópode. Os arbovírus têm em comum a característica de ser naturalmente mantidos por meio da transmissão entre um hospedeiro vertebrado suscetível e um artrópode hematófago, ou ainda, por transmissão vertical das fêmeas para seus ovos (DARWISH; GORMAN; KALUNDA, 1985). Existem ainda relatos de transmissão de arboviroses entre humanos por meio da troca de fluidos corporais, porém esses casos são minoritários (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2019)

Apesar dos mosquitos serem os principais responsáveis pela transmissão da maioria das arboviroses clinicamente importantes, artrópodes pertencentes a outras taxa, como os carrapatos (especialmente os pertencentes à família Ixodidae) desempenham um papel importante na disseminação de vírus humanos (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2019). Os vírus se multiplicam e causam viremia nos vertebrados, e quando os mesmos infectam artrópodes, se multiplicam em seus tecidos e são

transmitidos por picadas, após um período de incubação intrínseco, para novos hospedeiros (DARWISH; GORMAN; KALUNDA, 1985).

### **2.2.1. Dengue**

O vírus da dengue (DENV) pertence ao gênero *Flavivirus*, família Flaviviridae, a qual abriga outros vírus de importância médica, como o vírus da febre amarela (YFV) e Zika vírus (ZKV) (ZANOTTO; LEITE, 2018). O DENV é um vírus envelopado, de cadeia simples de RNA, com polaridade positiva (+ ssRNA), que possui quatro sorotipos distintos (DENV-1 a 4), contudo antigenicamente relacionados (FARES *et al.*, 2015). Após um período de incubação de 4-10 dias, a infecção de qualquer sorotipo varia de assintomática, subclínica a sintomática (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009).

Após o período de incubação, os sintomas clínicos iniciam abruptamente, apresentando três fases: febril, crítica e de recuperação. Os pacientes apresentam tipicamente febre alta de forma repentina. Essa fase pode durar de 2-7 dias, e pode estar acompanhada de rubor facial, eritema cutâneo, dor no corpo generalizada, mialgia, artralgia e dor de cabeça, sendo náuseas e vômitos também sintomas comuns (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009).

Nas últimas três décadas a dengue foi a arbovirose que causou os maiores problemas de saúde pública no Brasil. A primeira epidemia foi relatada no país em 1845, no estado do Rio de Janeiro. Em seguida, outras epidemias foram registradas entre os anos 1851-1853 e 1916-1923, e por volta dos anos 1930 o *Ae. aegypti* foi considerado erradicado do país até sua reintrodução em 1976. Em 1981 houve uma nova epidemia, causada pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4, a primeira a ser relatada em termos clínicos e laboratoriais, porém a doença só ganhou atenção em 1986 e 1987 quando o DENV-1 foi introduzido no Rio de Janeiro, provocando um grande surto, o que aconteceu também na região nordeste do país (FARES *et al.*, 2015; ZANOTTO; LEITE, 2018).

Na atualidade, enfrentamos uma nova epidemia de dengue e segundo dados do Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (BRASIL, 2019), no período de 30/12/2018 a 24/08/2019, houveram 1.439.471 de casos prováveis de Dengue no Brasil,

o que corresponde a um aumento de 599,5% em comparação ao mesmo período do ano anterior. Foram confirmados 1.100 casos de dengue grave (DG), 15.179 casos de dengue com sinais de alarme (DSA) e 591 óbitos. Este aumento pode ser explicado pela correlação entre vários fatores, como condições climáticas favoráveis ao vetor (alto volume de chuvas e altas temperaturas), mudança do sorotipo predominante (DENV-2) e grande número de pessoas suscetíveis, já que houveram poucos casos de dengue nos últimos dois anos.

### **2.2.2. Chikungunya**

O vírus da Chikungunya (CHIKV) pertence ao gênero *Alphavirus*, a à família *Togaviridae*. Outras espécies dentro desse mesmo gênero são responsáveis por causar encefalite em humanos e em outros mamíferos, mas são também agentes de doenças que provocam febre, erupção cutânea e artralgia como a Chikungunya. Os *Alphavirus*, apesar de possuírem fita simples de RNA, com polaridade positiva (+ ssRNA), constituem um grupo completamente distinto dos *Flavivirus* em termos de arquitetura molecular (ZANOTTO; LEITE, 2018).

A infecção pelo vírus da Chikungunya (CHIKV) manifesta-se clinicamente com febre aguda, erupções cutâneas e artralgia e é frequentemente acompanhada de outros sintomas como dor de cabeça, inchaço das articulações e conjuntivite (NUNES *et al.*, 2015). Alguns pacientes infectados por CHIKV podem apresentar uma fase crônica da doença, caracterizada por artralgia, que pode durar alguns meses ou até mesmo anos após a infecção com o vírus (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2017). Essa consequência leva não somente a problemas de saúde pública, mas também a impactos econômicos, pois reduz a produtividade das pessoas infectadas (WEAVER, 2014). O CHIKV possui também relação com casos de Síndrome de Guillain-Barré (SOUZA *et al.*, 2019).

O CHIKV foi registrado pela primeira vez no Brasil em 2014, tendo casos autóctones confirmados no Oiapoque (Amapá) e em Feira de Santana (Bahia). O CHIKV responsável pelo caso no Oiapoque pertence ao genótipo Asiático e acredita-se que foi introduzido

nesta região a partir do Caribe, pois análises filogenéticas demonstram que o isolado brasileiro agrupou com isolados pertencentes ao surto que ocorreu nas Ilhas São Martinho e Ilhas Virgens Britânicas em 2013. Outros casos com o mesmo genótipo foram confirmados em Recife e Belém de pessoas que haviam viajado anteriormente para a República Dominicana e Guadalupe respectivamente (NUNES *et al.*, 2015).

Em 2014, quando a Chikungunya foi detectada pela primeira vez no Brasil, o Ministério da Saúde relatou 3.195 casos prováveis de infecção por CHIKV (BRASIL, 2016) e desde então o número de casos relatados só vem crescendo. Durante as primeiras 34 semanas de 2019 foram documentados cerca de 110 mil casos prováveis de Chikungunya no Brasil, um acréscimo de 44,2% de casos em relação ao mesmo período do ano anterior e houveram ainda 57 óbitos confirmados (BRASIL, 2019).

### **2.2.3. Zika**

Assim como o DENV, o Zika vírus (ZIKV) é um *Flavivirus*, pertencente à família Flaviviridae (ZANOTTO; LEITE, 2018), possuindo fita simples de RNA de polaridade positiva (+ssRNA), assim como o DENV e o YFV (FARES *et al.*, 2015). O vírus foi detectado pela primeira vez em 1947 em um macaco rhesus sentinela, na floresta Zika da Uganda, e em 1948 foi detectado em *Aedes africanus* proveniente do mesmo lugar, dando evidências de que se tratava de um arbovírus (EPELBOIN *et al.*, 2017).

Ao ZIKV foi dada pouca importância, visto que a infecção pelo mesmo, quando não assintomática, provoca sintomas leves e possui raros relatos de mortalidade. Entretanto, entre 2013 e 2014, quando o ZIKV ocasionou uma epidemia na Polinésia Francesa, surgiram os primeiros relatos da Síndrome de Guillain-Barré em pacientes que haviam sido infectados previamente por ZIKV (EPELBOIN *et al.*, 2017). Em 2015 a médica Adriana Melo alertou sobre a potencial associação entre desenvolvimento de microcefalia por bebês cujas mães foram infectadas com ZIKV durante o período gestacional e Celina Turchi foi responsável pela coordenação de trabalhos que evidenciaram tal relação (ZANOTTO; LEITE, 2018).

O ZIKV foi documentado pela primeira vez no Brasil em 2015, após confirmação de que pacientes provenientes do nordeste brasileiro com sinais clínicos semelhantes à Dengue não estavam infectados com DENV ou CHIKV. Os sintomas apresentados do que ficou conhecido como Doença Exantemática Aguda incluíam artralgia, edema de extremidades, febre leve, erupções cutâneas maculopapulares (frequentemente pruriginosas), dores de cabeça, dor retroorbital, conjuntivite não-purulenta, vertigens, mialgia e distúrbios digestivos. Em abril, alguns desses pacientes foram confirmados para infecção com ZIKV em Camaçari (Bahia) e em junho houve confirmação de casos de infecção por ZIKV em Natal (Rio Grande do Norte) (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; CARDOSO *et al.*, 2015; ZANLUCA *et al.*, 2015).

Apesar dos casos de Zika terem diminuído no ano de 2017 e continuar caindo em 2018, nas 33 primeiras semanas de 2019, foram relatados 9.813 casos prováveis de Zika no Brasil, em contrapartida, no mesmo período no ano anterior, foram registrados 6.669 casos, mostrando um aumento de 47,1% de um ano para outro. Ainda nesse período, houveram 447 casos confirmados em gestantes e 2 óbitos no estado da Paraíba (BRASIL, 2019). Esses números alertam para o fato de que a febre Zika e suas consequências estão longe de serem eliminadas.

#### **2.2.4. Febre amarela**

O vírus da Febre Amarela (YFV), também um *Flavivirus*, é o membro protótipo desse gênero e também da família Flaviviridae, e assim como os outros integrantes, possui genoma de RNA fita simples e de polaridade positiva (BARRETT; HIGGS, 2007). A infecção por YFV leva a quadros assintomáticos na maioria das vezes (POSSAS *et al.*, 2018). Porém, para pacientes sintomáticos, após o período de incubação que varia de 3-6 dias, pode surgir febre, dores musculares com dor lombar proeminente, dor de cabeça, perda de apetite, náusea ou vômito. Na maioria dos casos os sintomas desaparecem após 3 ou 4 dias.

Há indícios da existência da febre amarela na África subsaariana antes de 1400, porém no Novo Mundo, os relatos desta doença começaram a surgir após a chegada dos

européus. O primeiro surto confirmado nas Américas, foi em 1648, em Yucatan, embora haja suspeitas de ocorrência da doença no Haiti em 1495. Inúmeras epidemias de febre amarela foram relatadas entre os séculos 18 e 19 em diversos países da América, África e Europa (POWELL; TABACHNICK, 2013; VASCONCELOS, 2010).

Em 1900 foi provado que o agente etiológico da febre amarela poderia ser transmitido por mosquitos (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2019). E em 1927, o YFV foi isolado pela primeira vez na África Ocidental, fato este que culminou em grandes esforços no desenvolvimento de uma vacina. O desenvolvimento de duas vacinas vivas na década de 30 representou um marco no controle da doença, sendo que a proveniente da linhagem 17D é ainda utilizada em todo mundo (BARRETT; HIGGS, 2007). O início do programa de vacinação aliado a campanhas de erradicação do *Ae. aegypti*, levou à uma redução drástica nas epidemias de febre amarela, e os surtos existentes ficaram basicamente restritos a ambientes silvestres (VASCONCELOS, 2010).

Existem dois ciclos epidemiológicos distintos para a transmissão da febre amarela, que se trata do ciclo silvestre e ciclo urbano. No ciclo silvestre, os principais hospedeiros dos vírus são primatas não humanos e os vetores são mosquitos com hábitos estritamente silvestres como àqueles pertencentes aos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*. Nesse ciclo, o homem não imunizado é um hospedeiro acidental ao entrar em contato com regiões de florestas em zonas rurais e silvestres. No ciclo urbano, o homem é o único hospedeiro e os vetores são mosquitos urbanos, como o *Aedes aegypti* (BRASIL, 2017).

No Brasil, a febre amarela urbana foi relatada pela última vez em 1942, porém é uma preocupação para as autoridades de saúde, o potencial risco de reurbanização da transmissão, já que a doença apresenta grande potencial epidêmico e elevada letalidade (BRASIL, 2015). No final de 2016, foi observado uma reemergência do vírus no sudeste brasileiro, com ocorrência de surtos nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro. No período do surto, que se estendeu até julho de 2017, houveram 3.564 casos suspeitos de febre amarela, 777 casos confirmados, além de 261

óbitos (BRASIL, 2017). Esses dados demonstram que apesar da existência de um programa de vacinação nacional e gratuito, a baixa cobertura vacinal de muitos municípios, aliado à existência do ciclo silvestre no país, deixa um alerta para a reemergência da doença no cenário Brasileiro, com potencial risco de reurbanização da transmissão que pode levar a quadros epidêmicos catastróficos.

### **2.3. Controle do vetor**

A exceção da febre amarela, não existem vacinas efetivas ou terapias antivirais específicas contra as outras três arboviroses e apesar da vacina contra dengue, Dengvaxia® (Sanofi), estar registrada e disponível em muitos países, seu uso ainda não é disseminado (MOYES *et al.*, 2017). Portanto, para reduzir e prevenir a transmissão de Dengue, Chikungunya e Zika, tem-se como principal estratégia o controle do vetor *Aedes aegypti*, tanto na sua forma adulta, quanto na sua forma larval, e é feito em casas e arredores das mesmas, que em geral possuem locais que permitem a proliferação desses mosquitos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009).

A eliminação ou vedação de recipientes que acumulam água no ambiente doméstico e nas vizinhanças é considerada a maneira mais eficaz de evitar a proliferação do *Ae. aegypti* (MACORIS *et al.*, 2018). No entanto, o controle químico é a principal estratégia adotada no combate do mosquito *Ae. aegypti*, que tem como alvo tanto larvas, quanto adultos. Atualmente, os compostos químicos mais comumente empregados no controle de mosquitos incluem análogos do hormônio juvenil, piretróides, organoclorados e organofosforados (RUBIO *et al.*, 2019).

O uso de inseticidas no Brasil para o controle do *Ae. aegypti* começou em 1947, e o emprego do DDT trouxe perspectivas de eliminação do mosquito em escala continental. Em 1955 o *Ae. aegypti* foi considerado erradicado do país, porém, ao longo dos anos o programa de erradicação perdeu a efetividade, pois os mosquitos desenvolveram resistência ao DDT e aos organoclorados (ARAÚJO *et al.*, 2015). Atualmente, encontra-se também globalmente disseminada a resistência aos piretróides, inseticidas considerados seguros para o homem em relação a compostos de outras classes e por

isso amplamente utilizados por entidades públicas e em ambientes domésticos (MACORIS *et al.*, 2018).

Porém, devido ao crescente nível de resistência de populações de *Ae. aegypti* a diversas classes de inseticidas, tem-se buscado novas alternativas capazes de combater esse vetor e que sejam menos tóxicas e/ou causem menor dano ambiental. Uma alternativa é o controle biológico do mosquito utilizando por exemplo, a bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* (BTI), que quando ingerida pelas larvas do mosquito, libera endotoxinas letais (ARAÚJO *et al.*, 2015). Porém, a longevidade, custo e eficácia do tratamento é incomparável em relação aos inseticidas químicos (ACHEE *et al.*, 2019).

#### **2.4. Cerrado**

Localizado no centro do Planalto Central do Brasil, com uma típica vegetação xeromórfica, o Cerrado é o segundo maior Bioma brasileiro em território, que compreende uma área de aproximadamente 2 milhões de m<sup>2</sup>. Possui uma alta diversidade de plantas vasculares, estimadas em mais de 6.000 espécies, sendo 44% consideradas endêmicas (KLINK; MACHADO, 2005; NORILER *et al.*, 2018).

O Cerrado é um dos hotspots de biodiversidade mundiais devido ao seu alto número de espécies endêmicas (tanto de plantas, quanto de vertebrados) e considerável perda de habitat (MYERS *et al.*, 2000) Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA) o Cerrado é o que possui menos áreas sob proteção de todos hotspots, além de sofrer fortemente com a expansão da fronteira agrícola e ter suas espécies lenhosas utilizadas na indústria do carvão de forma extremamente “predatória”.

#### **2.5. Fungos endofíticos**

Os endófitos são organismos mutualistas que colonizam partes aéreas de plantas, durante todo ou parte do seu ciclo de vida, sem causar nenhum sintoma de doença (FELBER *et al.*, 2016; SUN; GUO, 2012). Fungos e bactérias são organismos mais comumente encontrados como endofíticos, sendo os fungos os mais frequentemente isolados (STROBEL *et al.*, 2004). É consenso que todas as plantas possuem mutualismo

com fungos endofíticos e/ou micorrizas, e estudos apontam que essa relação é responsável pela resistência da planta aos diversos tipos de estresse, como seca, metais, doenças, herbivoria, entre outros (RODRIGUEZ; REDMAN, 2008).

Os fungos constituem excelentes fontes de moléculas bioativas (MANDAVID *et al.*, 2015), e a descoberta de novos microrganismos são frequentemente associados a novos produtos naturais (STROBEL *et al.*, 2004). Até o momento, os endófitos têm sido mais amplamente estudados por sua capacidade de produzir antibacterianos, antivirais, anticancerígenos, antioxidantes, antidiabéticos, bem como compostos imunossupressores. Entretanto, existem trabalhos relatando outras atividades de moléculas provenientes de fungos endofíticos como citotoxicidade (UZMA *et al.*, 2018) e larvicida (RAGAVENDRAN, CHINNASAMY *et al.*, 2019)

Várias espécies fúngicas estão envolvidas com a produção de metabólitos secundários que possuem atividade larvicida, sendo *Aspergillus*, *Fusarium*, *Podospora*, *Penicillium*, *Mucor* e *Cladosporium* os principais gêneros relatados (MATASYOH *et al.*, 2011; PRADEEP *et al.*, 2015; RAGAVENDRAN, CHINNASAMY *et al.*, 2019).

## **2.6. *Vellozia squamata* Pohl**

*Vellozia squamata* Pohl (Canela-de-ema) é uma planta monocotiledônea pertencente à família Velloziaceae, que possui flores vistosas e semelhantes ao lírio (DE MENEZES; DE MELLO-SILVA; MAYO, 1994). A família possui distribuição neotropical e grande parte das espécies crescem em ambientes rochosos e são endêmicas de campos rupestres e Cerrado (ALVES, 1994).

As espécies pertencentes a essa família são caracterizadas pela presença de rosetas de folhas apicais e por caules finos, densamente cobertos por bainhas mortas e secas. As plantas são resistentes a queimadas, devido ao fato das bainhas serem densamente compactadas, permitindo que o oxigênio permaneça fora da estrutura (ALVES, 1994). Apesar do fato de várias espécies de *Vellozia* se encontrarem em perigo de extinção, além do perigo iminente que sofre o bioma do qual essas espécies são endêmicas,

existem poucos estudos sobre a micobiota associada a essa espécie vegetal, sendo a maioria sobre espécies epifíticas e fitopatogênicas (ARMANDO; CHAVES; DIANESE, 2014).

Ferreira e colaboradores (2017a) conduziram um trabalho de investigação de fungos endofíticos em *Vellozia gigantea* N.L.Menezes & Mello-Silva, onde foi relatada uma rica e diversa micobiota, incluindo espécies fúngicas raras e até mesmo não reportadas para esse tipo de associação. Em trabalho posterior foi realizado um *screening* dos extratos brutos desses isolados a partir de diclorometano para atividades antimicobacterianas e antimaláricas. Os autores encontraram cinco espécies produtoras de compostos relacionados com essa propriedade, demonstrando assim, que essa espécie vegetal pode abrigar potenciais fungos produtores de moléculas bioativas (Ferreira et al., 2017b). Para *V. squamata* espera-se encontrar ampla diversidade de espécies fúngicas produtoras de compostos bioativos em larvas de *Ae. aegypti*.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivos gerais**

Selecionar isolados fúngicos de *Vellozia squamata* para produção de extratos brutos com potencial mortalidade em larvas de *Ae. aegypti*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Preparar extratos brutos a partir do micélio de fungos endofíticos de *Vellozia squamata*;
- Realizar um *screening* de atividade larvicida a partir dos extratos obtidos;
- Verificar a citotoxicidade dos extratos.

## **4. Métodos**

### **4.1. Coleta, isolamento e identificação dos fungos endofíticos**

#### **4.1.1. Coleta e processamento**

As coletas foram realizadas no Jardim Botânico de Brasília (JBB), no período de julho de 2017 a novembro de 2018. Inicialmente, dez indivíduos pertencentes à espécie *Vellozia squamata* foram selecionados ao acaso em diferentes pontos. Essas plantas foram marcadas com uma placa de identificação e as coordenadas geográficas foram anotadas. Para o isolamento de espécies fúngicas endofíticas, um pequeno fragmento foi retirado do tecido interno do caule de cada planta e depositado diretamente em uma placa de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Simultaneamente, uma folha assintomática foi retirada de cada planta. As folhas foram acondicionadas em sacos de papel e encaminhadas para a Coleção Micológica da Universidade de Brasília. Esse procedimento foi realizado mensalmente entre julho de 2017 a janeiro de 2018. Em novembro de 2018 foi realizada uma coleta adicional.

#### **4.1.2. Isolamento e armazenamento dos isolados**

As folhas e fragmentos de caule coletados foram utilizadas para o isolamento indireto. Os fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> das folhas assintomáticas foram colocados em béquer contendo etanol 70% por 2 minutos, transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio 0,5% por 2 minutos e lavadas em água esterilizada três vezes consecutivas. Posteriormente, os fragmentos foram secos em papel filtro esterilizado e subsequentemente depositados em placa de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Os fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> do caule (felogênio) foram cortados com o auxílio de um estilete esterilizado e após remoção do tecido superficial, transferidos para placas de Petri contendo BDA. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por até 7 dias.

Para o armazenamento dos espécimes, culturas puras foram obtidas a partir da transferência de um pequeno fragmento obtido de uma única hifa para placa de Petri

contendo meio de cultura BDA, conhecido como isolamento monohifal (ALFENAS; MAFIA, 2007). As culturas foram mantidas a 25 °C por 7 dias para subsequente armazenamento em glicerol 10%, água destilada (Castellani) e óleo mineral na Coleção de Culturas da Universidade de Brasília (CCUB).

#### 4.1.3. Extração de DNA

Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo BDA por 7 dias em temperatura ambiente. Após o cultivo, aproximadamente 100 mg de micélio de cada isolado foi coletado e colocado em microtubos de 1,5 mL contendo 20 µL de tampão Tris-Acetato-EDTA (T.E.) pH 8,0, posteriormente foram adicionadas quatro esferas de aço (2,8 mm de diâmetro), 600 µL da solução de lise (Nuclei Lysis Solution) e 100 mg de polivinilpirrolidona (PVP). A extração do DNA genômico, foi feita utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, Wisconsin, USA) modificado de acordo com Pinho et al. (2012).

#### 4.1.4. Reação em cadeia da polimerase - PCR

A amplificação foi realizada usando um volume final de 12,5 µL, contendo 6,25 µL de MyTaq™ Mix (Bioline USA Inc., Taunton, England), 0,3 µL de cada iniciador, 4,65 µL de água e 1,0 µL de DNA genômico. Para a identificação, o DNA de todos os isolados foi amplificado e sequenciado com os iniciadores da região ITS do rDNA (Tabela 1).

Tabela 1 - Iniciadores (primers) utilizados nas reações de PCR.

Região gênica	Iniciador	Sequência	Sentido	Referência
ITS-1, 5.8S e ITS-2	LR5	5'-TCC TGA GGG AAA CTT CG-3'	Senso	(VILGALYS; HESTER, 1990)
	V9G	5'-TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA-3'	Antisenso	(HOOG; ENDE, 1998)

Os seguintes parâmetros foram utilizados na reação de PCR: uma desnaturação inicial a 95 °C por 1,5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 20

segundos, anelamento a 53 °C por 45 segundos, extensão a 72 °C por 45 segundos e uma extensão final por 5 minutos. Os amplicons foram confirmados pela presença de uma única banda em gel de agarose a 1% corado com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Inc., Fremont, California) e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta (UV). A purificação foi realizada utilizando ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Affymetrix Inc., Santa Clara, California), conforme as instruções do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram enviados para sequenciamento à Macrogen Inc., Coréia do Sul (<http://www.macrogen.com>).

#### **4.1.5. Análises Filogenéticas**

As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software DNA Dragon. Todas as posições ambíguas foram corrigidas mediante a comparação da fita senso e antisenso. Os isolados foram previamente identificados pela análise das sequências ITS1, 5.8S e ITS2 do rDNA em comparação com outros isolados disponíveis no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando a ferramenta BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool*). As sequências foram alinhadas utilizando o MUSCLE® por meio do software MEGA v. 7.

#### **4.2. Produção dos extratos brutos**

Para a produção dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados das folhas de *V. squamata* foi utilizado o protocolo de crescimento em meio de cultura líquido. Para cada fungo, fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> provenientes de colônias crescidas em BDA foram colocados em erlenmeyers de 1L contendo 500 mL de meio *Yeast-Malt-glucose* (YMG - extrato de levedura 4 g/L , extrato de malte 10 g/L e glicose 4 g/L). Os frascos foram incubados durante 10 dias em agitador orbital a 26 °C a 150 rpm. Após esse período foi adicionado 150 mL de acetato de etila (AcOEt), com posterior incubação por mais 24 horas nas mesmas condições. A separação da biomassa do fungo e da fase líquida foi feita por filtração à vácuo. A fase AcOEt foi separada da fase aquosa com o auxílio de um funil de

separação. A fase com solvente orgânico foi concentrada em um rotaevaporador e dessecada em câmara à vácuo até a obtenção do extrato bruto final.

#### **4.3. Avaliação da atividade larvicida**

Os testes larvicidas de triagem a partir dos extratos brutos foram realizados em *Ae. aegypti* (cepas Rockefeller), mantidos no insetário do Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília. Os extratos brutos foram diluídos a uma concentração de 15 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO), e foram pipetados para cada poço contendo água e larvas de modo que a concentração permanecesse a 250 µg/mL.

Os extratos brutos foram testados em placas de 12 poços, contendo 10 larvas de *Ae. aegypti* de 3º estágio em cada poço (segundo POP 0006) e 3 mL de água. Os ensaios foram realizados em triplicata em dois ensaios independentes. O CL<sub>50</sub> foi calculado para o extrato bruto que inibiu 100% das larvas em 24 horas. O DMSO foi usado como controle negativo (DMSO). A mortalidade das larvas foi quantificada em 24, 48 e 72 horas. A atividade larvicida foi determinada de acordo com a fórmula:

$$\text{Mortalidade (\%)} = \frac{X - Y}{X} \times 100$$

onde X = porcentagem de sobrevivência no controle negativo e Y = porcentagem de sobrevivência na amostra tratada (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005).

#### **4.4. Curva de crescimento**

Uma curva de crescimento fúngico foi realizada para a avaliação do dia que se obtém a melhor atividade larvicida do extrato mais ativo. Os extratos foram obtidos, seguindo a mesma metodologia descrita no item anterior, porém, o acetato de etila foi adicionado nos erlenmeyers nos seguintes dias: 2, 4, 7, 9, 11, 14 e 16 de incubação. No dia seguinte após a adição do solvente orgânico as soluções extrativas foram filtradas e concentradas.

#### **4.5. Análise e separação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A análise dos extratos foi feita em HPLC Breeze TM Waters. A análise cromatográfica foi realizada utilizando uma Coluna C18 (Luna ® , 150 x 4.6 mm; tamanho de partícula de 5 µm). O fluxo foi de 1 mL/min e o volume de injeção foi de 10 µL. A fase móvel usada foi água ultrapura (solvente A) e metanol (solvente B), ambos acrescidos de 0,1% de seu volume de ácido fórmico. O método de eluição usado foi gradiente, e iniciou-se com 5% de solvente B, aumentado para 100,0% de solvente B até 18 min, mantido nas mesmas condições por 5 min, então, o solvente B foi diminuído para 5% em 2 min; por fim, foram mantidas as mesmas condições por mais 3 min, totalizando o tempo de corrida de 28 min.

#### **4.6. Ensaio de citotoxicidade**

Os estudos de citotoxicidade foram realizados no Laboratório Interdisciplinar de Biociências (LabIBC) da Universidade de Brasília. Cada extrato foi testado em triplicata em macrófagos J774, que foram cultivados em meio DMEM (*Dulbecco modification of Minimum Essential Media*), suplementado com 10% de soro fetal bovino. As culturas foram mantidas em incubadora a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO<sup>2</sup> até atingirem confluência de 80-100%. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão por Azul de Tripán. A contagem de células foi feita utilizando um contador de células automatizado (Corning® Cell Counter) e a câmara de contagem Fuchs Rosenthal. A porcentagem de células viáveis foi calculada para a diluição e padronização do teste do MTT.

Para a avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos foi utilizado o teste do MTT. Para a realização do teste, foi utilizada uma placa de 96 poços, com 150.000 células viáveis por poço e meio de cultura DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino. A placa foi incubada a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO<sup>2</sup> durante 24 horas. Após esse período inicial de incubação, o meio de cultura foi trocado por um novo, porém

enriquecido com 5% de soro fetal bovino e com o volume ajustado para a aplicação dos extratos. Os extratos a serem testados foram diluídos em DMSO e foram testados em triplicata, em três concentrações: 25, 50 e 100 µg/mL; e prosseguiu-se a um período de incubação de 24 horas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após esse período de incubação, foi retirado o sobrenadante de cada poço e aplicou-se a solução de MTT a uma concentração de 5 mg/mL, previamente preparada. A placa foi novamente incubada nas condições citadas acima por 3h30min. Após o período de incubação, retirou-se a solução de MTT e foi adicionado 100 µL de SDS 10%, e as placas foram novamente incubadas durante 30 min. Após o término do período de incubação, as placas foram lidas em espectrofotômetro a 570 nm. Os resultados da triagem citotóxica são expressos pela porcentagem (%) de viabilidade observada para cada extrato nas culturas celulares.

## **5. Resultados e Discussão**

### **5.1. Isolamento e identificação**

No total 236 isolados foram obtidos por meio do isolamento indireto de fragmentos do caule e folhas de *Vellozia squamata*, sendo 82 espécimes (34,7%) obtidos a partir do caule e 154 (65,3%) proveniente das folhas.

Doze isolados foram escolhidos aleatoriamente para a avaliação da atividade larvicida em *Ae. aegypti*. A identificação dos fungos realizada a partir de sequências do rDNA, está contida na Tabela 2, assim como o rendimento dos extratos obtidos. Os gêneros encontrados foram *Talaromyces*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Truncatella*, *Bipolaris*, *Alternaria*, *Pithomyces* e *Arthrinium*. Destes, dois isolados pertencem ao gênero *Alternaria*. Para um isolado optou-se pela denominação da família, Amphisphaeriaceae, uma vez que não foi possível determinar o gênero com a sequência do rDNA. Este apresentou os mesmos valores de cobertura de alinhamento (Query coverage) e

porcentagem de identidade (Percent Identity) para os gêneros *Pestalotiopsis* e *Neopestalotiopsis* (100% em ambos).

Tabela 2 - Identificação dos fungos endofíticos e rendimento dos respectivos extratos brutos em acetato de etila (AcOEt).

<b>Código Arbo</b>	<b>Código CCUB</b>	<b>Qtde de extrato (g)</b>	<b>Qtde de biomassa (g)</b>	<b>Rendimento de extração (% p/p)</b>
Arbo18A007A	CCUB1563	0,0775	4,9279	1,57%
Arbo18A007B	CCUB566	0,0955	3,9782	2,40%
Arbo18A007C	CCUB564	0,5226	3,3952	1,55%
Arbo18A007D	CCUB560	0,1178	4,5431	2,59%
Arbo3A049A	CCUB547	0,0305	3,3587	0,91%
Arbo3A049B	CCUB745	0,0806	4,6905	1,72%
Arbo3A049C	CCUB554	0,0805	2,5235	3,19%
Arbo3A049D	CCUB559	0,0273	5,3365	0,51%
Arbo3A049E	CCUB550	0,1031	2,5480	4,05%
Arbo3A049F	CCUB553	0,1459	1,5259	9,56%
Arbo3A049G	CCUB557	0,0591	0,7694	7,68%
Arbo3A049H	CCUB734	0,0664	4,6930	1,41%

Todos os isolados escolhidos pertencem ao filo Ascomycota, e estão distribuídos em cinco ordens e oito famílias (Figura 3): Amphisphaeriales (Amphisphaeriaceae), Eurotiales (Aspergillaceae e Trichocomaceae), Hypocreales (Hypocreaceae e Nectriaceae), Pleosporales (Astrosphaeriellaceae e Pleosporaceae) e Xylariales

(Apiosporaceae). A ordem mais representativa foi Pleosporales com 4 (25%) espécimes. Os representantes dessa ordem ocorrem em diferentes habitats, podendo ser epífitas, endófitos ou parasitas (folhas ou caules), hiperparasitas de fungos ou insetos, liquenizados ou saprófitas de caules, folhas ou casca de plantas mortas (ZHANG *et al.*, 2012).

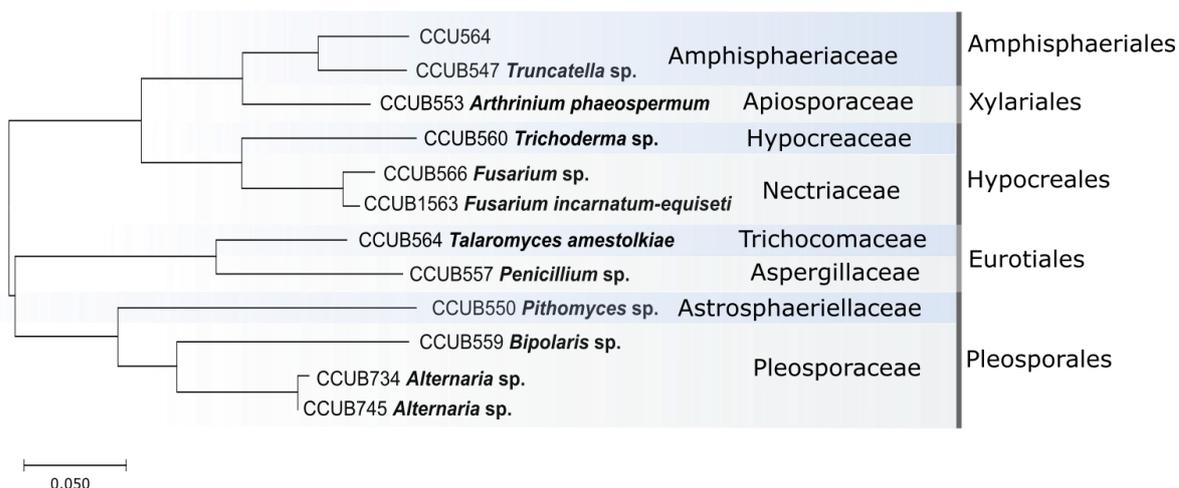


Figura 3 - Árvore filogenética por Máxima Verossimilhança a partir de sequências da região ITS entre os isolados selecionados para avaliação das atividades larvicidas e citotóxicas, com indicação do gênero, família e ordem (da esquerda para a direita).

## 5.2. Atividade larvicida

Uma triagem prévia com os 12 extratos brutos obtidos foi realizada em larvas L3 de *Ae. aegypti*. As leituras a 250 µg/mL em 24 e 48 horas, estão especificadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Atividade larvicida em % de mortalidade e atividade citotóxica (% células viáveis) dos extratos brutos obtidos dos 12 isolados selecionados.

Código	Mortalidad e (%) em 24h	Mortalidad e (%) em 48h	J774 25 µg/mL	J774 50 µg/mL	J774 100 µg/mL
Arbo18A007A	55,7%	70,0%	118±4	106±2	86±5
Arbo18A007B	54,3%	80,0%	104±13	90±5	68±4
Arbo18A007C	80,0%	84,3%	102±20	98±25	75±5

Arbo18A007D	82,9%	88,6%	107±9	94±8	57±16
Arbo3A049A	10,0%	16,7%	65±13	69±12	39±1
Arbo3A049B	1,7%	1,7%	137±10	127±31	60±16
Arbo3A049C	100,0%	100,0%	81±1	95±13	57±8
Arbo3A049D	46,7%	95,0%	16±2	8±1	7±2
Arbo3A049E	0,0%	0,0%	77±4	80±7	43±10
Arbo3A049F	0,0%	0,0%	85±6	79±5	47±18
Arbo3A049G	0,0%	0,0%	73±4	66±4	30±12
Arbo3A049H	0,0%	0,0%	80±5	62±3	37±18

Nas primeiras 24 horas cinco extratos possuem taxas de mortalidade superiores a 50%. Eles foram obtidos a partir da cultura de *Talaromyces* (100%), *Trichoderma* sp. (82,9%), *Amphisphaeriaceae* (80,0%), *Fusarium* sp. (54,3%). Em 48 horas, o extrato de *Bipolaris* sp. proporcionou mortalidade de 95%, enquanto os extratos de *Trichoderma* sp., *Amphisphaeriaceae*, *Fusarium* sp. atingiram taxas de mortalidades superiores de 88,6%, 84,3%, 70,0% e 80% respectivamente. Os demais extratos, referente aos isolados *Truncatella* sp., *Alternaria* sp., *Pithomyces* sp., *Arthrinium phaeospermum* e *Penicillium* sp. não possuem atividade larvicida significativa, com mortalidade abaixo de 50% em até 48 horas.

O extrato Arbo3A049C possui a melhor atividade larvicida dentre todos os extratos testados. Morino e colaboradores (1995) relataram atividade larvicida em *Culex pipiens* de um composto, com uma purina em sua porção. Ragavendran e colaboradores (2017) relataram que extratos obtidos de *Penicillium* spp. proporcionaram uma mortalidade significativa para larvas de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*. *Talaromyces* é um gênero teleomorfo historicamente associado com *Penicillium* sensu lato, e que hoje

acomoda espécies anteriormente classificadas como *Biverticillium*, um antigo subgênero de *Penicillium*. Ambos os gêneros possuem características distintas quanto aos compostos excretados para o meio exterior (extrólitos), sendo que para *Talaromyces* é descrito certos extrólitos que nunca foram encontrados em *Penicillium* sensu stricto (SAMSON; HOUBRAKEN, 2011). Apesar do histórico do gênero, o isolado identificado como *Penicillium* (Arbo3A049G) não possui atividade larvicida significativa.

*Trichoderma* e *Fusarium*, ambos pertencentes a ordem Hypocreales possuem atividade larvicida relatada para *Ae. aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Cx. quinquefasciatus* (GOVINDARAJAN; JEBANESAN; REETHA, 2005; PRADEEP *et al.*, 2015; SUNDARAVADIVELAN; PADMANABHAN, 2014). Os extratos Arbo18A007D, Arbo18A007A e Arbo18A007B, avaliados nesse estudo, apresentaram taxas de mortalidade acima de 50% em 24 horas e 70% em 48 horas. Esses dados estão de acordo com a literatura, e a atividade larvicida pode ser atribuída a presença de uma isoquinolina, como demonstrado anteriormente (PRADEEP *et al.*, 2015).

Os isolados pertencentes a família Amphisphaeriaceae (Amphisphaeriales), sendo um deles *Truncatella* sp., possuem respostas distintas quanto à atividade larvicida. O isolado não identificado a nível de gênero Arbo18A007C, possui boa taxa de mortalidade (80% em 24 horas) para larvas L3 de *Ae. aegypti*, enquanto Arbo3A049A não possui atividade larvicida relevante. A partir de *Seiridium cupressi*, um isolado pertencente a família Amphisphaeriaceae, Cimmino e colaboradores (2013) isolaram diferentes compostos com atividade larvicida. Bucker e colaboradores (2013) encontraram um isolado de *Pestalotiopsis*, com uma taxa de 81% de mortalidade para larvas, cujo extrato bruto foi testado a uma concentração de 250 µg/mL. Essas informações corroboram os dados obtidos nesse estudo para o isolado Arbo18A007C com identificação indeterminada.

Cimmino e colaboradores (2013) descreveram propriedades repelentes para *Ae. aegypti* a partir de uma molécula derivada de *Ascochyta agropyrina* var. *nana*, um membro da família Pleosporaceae (Pleosporales). Salunkhe e colaboradores (2011)

relataram atividade larvicida a partir de nanopartículas de prata produzidas a partir de *Cochliobolus lunatus*, também pertencente à mesma família. Não foram encontrados trabalhos que utilizaram o extrato AcOEt desses fungos para avaliação do efeito larvicida. Os membros da família Pleosporaceae, pertencentes ao gênero *Alternaria*, não possuem atividade larvicida significativa, enquanto que o isolado identificado como *Bipolaris*, demonstrou taxa de mortalidade significativa, principalmente após 48 horas, quando foi capaz de matar 95% das larvas. Esse isolado foi considerado citotóxico para macrófagos, entretanto, pode ser devido a um metabólito não relacionado com a atividade larvicida. *Pithomyces*, membro da família Astrosphaeriellaceae, ordem Pleosporales, possui baixa atividade larvicida e não foram encontrados relatos na literatura referente a esse gênero e a sua família para essa propriedade.

Fungos pertencentes ao gênero *Arthrinium* são saprófitas comumente encontrados em gramíneas e frequentemente descritos como endófitos. Esse fungo é de interesse farmacêutico, pois alguns metabólitos produzidos possuem toxicidade contra linhagens celulares de cânceres humanos, ou inibem patógenos humanos como fungos, leveduras e bactérias (CROUS; GROENEWALD, 2013). No entanto, o isolado (Arbo3A049F) encontrado em *V. squamata* não apresentou atividade larvicida significativa. Não foram encontrados relatos na literatura pesquisada de atividade larvicida para fungos pertencentes a essa família ou a essa ordem.

Para o extrato, Arbo3A049C foi calculado a  $CL_{50}$ . O extrato apresentou  $CL_{50}$  (Figura 4) de 109,8  $\mu\text{g/mL}$  em 24 horas e de 68,68  $\mu\text{g/mL}$  em 48 e 72 horas. Esse teste deverá ser repetido com concentrações entre 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$  para um melhor cálculo da atividade.

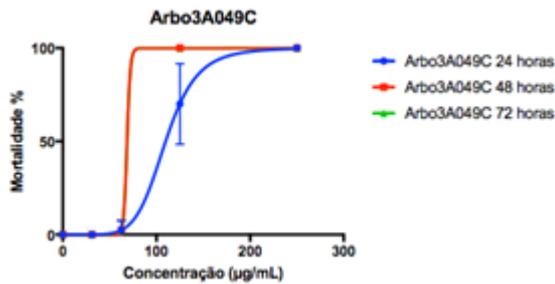


Figura 4 - Atividade do extrato bruto Arbo3A049C (dose-resposta) para cálculo do EC<sub>50</sub> em larvas L3.

### 5.3. Atividade citotóxica

A atividade citotóxica dos extratos brutos é detalhada na Tabela 3. Nas concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL, apenas *Bipolaris* sp. (Arbo3A049D) inibiu mais de 50% da proliferação celular de macrófagos J744. Na concentração de 100 µg/mL, seis extratos, 50% do total de extratos testados neste trabalho, apresentaram inibição da proliferação celular acima de 50%, sendo eles Arbo3A049A, Arbo3A049E, Arbo3A049F, Arbo3A049G e Arbo3A049H.

. Dentre os três extratos que apresentaram melhor atividade larvicida, Arbo18A007C, foi que apresentou maior viabilidade celular para as três concentrações testadas (102±20%, 98±25% e 75±5% respectivamente) enquanto que Arbo3A049C e Arbo18A007D apresentaram valores similares, sendo de 81±1%, 95±13% e 57±8% para o primeiro e de 107±9%, 94±8% e 57±16% para o segundo. Vários fungos endofíticos foram identificados e relatados para atividade citotóxica, interessante para triagem de novos compostos com atividade anticâncer (UZMA *et al.*, 2018).

O extrato bruto selecionado para a curva de crescimento possui relativa toxicidade a 100 µg/mL e EC<sub>50</sub> de 109,8 µg/mL em 24 horas e de 68,68 µg/mL em 48 e 72 horas. O extrato desse fungo possui potencial para o desenvolvimento um larvicida a partir do(s) metabólito(s) purificado(s), já que ao testar o extrato bruto, muitos outros compostos, que

não estão relacionados com a mortalidade em larvas, podem provocar toxicidade para células.

#### 5.4. Curva de crescimento

O isolado que apresentou a melhor atividade larvicida foi selecionado para se obter extratos em diferentes dias a partir de uma curva de crescimento. O extrato obtido do isolado Arbo3A049C, apresentou taxa de mortalidade de 100%, a uma concentração de 250 µg/mL. Portanto, esse extrato foi selecionado para determinação do período com maior taxa de mortalidade das larvas (Tabela 4).

Tabela 4 - Avaliação da atividade larvicida expressa em (%) de mortalidade e rendimento de extração para obtenção de extratos com diferentes períodos de cultivo.

<b>Dia de incubação (d)</b>	<b>Mortalidade (%) em 24h</b>	<b>Mortalidade (%) em 48h</b>	<b>Mortalidade (%) em 72h</b>	<b>Rendimento de extração (% p/p)</b>
2	0%	14%	14%	12%
4	100%	100%	100%	2%
7	4%	54%	54%	6%
9	24%	85%	85%	2%
11	45%	75%	75%	20%
14	0%	0%	0%	3%
16	0%	0%	0%	2%

Como observado na tabela acima, o extrato obtido no quarto dia de incubação, apresentou a melhor taxa de mortalidade, sendo capaz de matar 100% das larvas em apenas 24 horas. Os extratos obtidos nos dias 7, 9 e 11, só apresentaram atividade larvicida significativa a partir de 48 horas, enquanto os extratos obtidos nos dias 2, 14 e 16 não apresentaram mortalidade em larvas. Grijseels e colaboradores (2017)

constataram que metabólitos específicos são produzidos em fases distintas de crescimento, e portanto, o(s) composto(s) associado(s) com a atividade larvicida nos dias 4, 7, 9 e 11 podem ser distintos e agir por mecanismos de ação diferentes, tendo, provavelmente, sofrido degradação nos dias subsequentes.

A diferença nas taxas de mortalidades de larvas a partir dos extratos produzidos, também sofreu influência do meio de cultura utilizado para a incubação dos isolados, já que os fungos filamentosos ajustam seu metabolismo de acordo com as mudanças ambientais. Os parâmetros que podem influenciar na fisiologia e conseqüentemente na produção de metabólitos são: temperatura, luminosidade quantidade de nutrientes, pH, dentre outras (VRABL *et al.*, 2019). Portanto, mais meios de culturas e diferentes condições ambientais poderiam ser testadas para otimizar a produção de compostos com atividades larvicidas.

### **5.5. Cromatogramas**

Os extratos obtidos na curva de crescimento foram analisados por CLAE, porém os cromatogramas não apresentaram boa resolução. As análises dos extratos brutos da curva de crescimento serão repetidas. E maior quantidade de extrato será preparada para filtração no quarto dia de incubação, para a realização dos estudos químicos.

## **6. Conclusão**

Os extratos de fungos endofíticos de *V. squamata* foram promissores como larvicidas, demonstrando o potencial da utilização de extratos fúngicos para reduzir e/ou inibir a proliferação de insetos vetores. Além disso, novas moléculas desconhecidas pela comunidade científica podem ser descobertas.

O extrato bruto obtido a partir do cultivo de Arbo3A049C demonstrou mortalidade em larvas L3 de 100% em 24 horas e apesar de ser considerado relativamente citotóxico, foram obtidos extratos em uma curva de crescimento para a identificação do melhor dia

de produção de metabólitos com atividade larvicida. A toxicidade do extrato em macrófagos J744 pode envolver compostos não necessariamente relacionados com a propriedade inseticida, e para tanto é necessário o fracionamento e a purificação do mesmo para conclusões mais acertadas.

Os extratos da curva de crescimento foram também analisados por CLAE, porém, devido a baixa resolução dos cromatogramas outras análises serão realizadas, para o aprofundamento dos estudos químicos dos compostos em questão para conclusões mais acuradas.

## 7. Referências bibliográficas

ACHEE, N. L.; GRIECO, J. P.; VATANDOOST, H.; SEIXAS, G.; PINTO, J. CHING-NG, L.; MARTINS, A. J.; JUNTARAJUMNONG, W.; CORBEL, V.; GOUAGNA, C.; DAVID, J. P.; LOGAN, J. G.; ORSBORNE, J.; MAROIS, E.; DEVINE, G. J.; VONTAS, J. Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, [S.l.: s.n.], v. 13, n. 1, 2019.

AHBIRAMI, R.; ZUHARAH, W. F.; THIAGALETCHUMI, M.; SUBRAMANIAM; SUNDARASEKAR, J. Larvicidal efficacy of different plant parts of railway creeper, ipomoea cairica extract against dengue vector mosquitoes, aedes albopictus (Diptera: Culicidae) and aedes aegypti (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Science*, [S.l.:s.n.] v. 14, n. 180, 2014.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Métodos em fitopatologia. 2. ed. Viçosa: UFV, 2007. 516 p.

ALVES, R. J. V. Morphological age determination and longevity in some *Vellozia* populations in Brazil. *Folia Geobotanica*, [S.l.:s.n.], v. 29, n. 1, p. 55–59, 1994.

ARAÚJO, H. R. C.; CARVALHO, D. O.; IOSHINO, R. S.; COSTA-DA-SILVA, A. L.; CAPURRO, M. L. *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: Incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. *Insects*. [S.l.: s.n.]. v. 6, p. 576-594, 2015.

ARMANDO, E. A. S.; CHAVES, Z. M.; DIANESE, J. C. *Phaeostilbelloides* and *Velloziomyces* — new dematiaceous genera from the Brazilian Cerrado. *Mycotaxon*, [S.l.:s.n.], v. 130, p. 757-767, 2014.

BARRETT, A. D.T.; HIGGS, S. Yellow Fever: A Disease that Has Yet to be Conquered. *Annual Review of Entomology*, [S.l.: s.n.], v. 52, n. 1, p. 209–229, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Reemergência da Febre Amarela Silvestre no Brasil,

2014/2015: situação epidemiológica e a importância da vacinação preventiva e da vigilância intensificada no período sazonal. *Boletim epidemiológico*, Brasília, v.46, n.29, 2015. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/outubro/19/2015-032---FA-ok.pdf>>

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. *Boletim Epidemiológico*. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica (SE) 52 de 2015. *Ministério da Saúde*, v. 47, n. 3, p. 1–7, 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/15/svs2016-be003-dengue-se52.pdf>><<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/02/2014-039---Dengue-SE-47.pdf>><<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/19/2015-002---BE-at>>

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. *Boletim Epidemiológico - Emergência epidemiológica de febre amarela no Brasil, no período de dezembro de 2016 a julho de 2017*. v. 48, n. 28, p. 1–28, 2017. Disponível em: <[http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/06/2017\\_027.pdf](http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/06/2017_027.pdf)>

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. *Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 34. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Brasil.*, v. 50, n. 22, p. 1–11, 2019. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/11/BE-arbovirose-22.pdf>>

BÜCKER, A.; BÜCKER, N. C. F.; SOUZA, A. Q. L; GAMA, A. M.; RODRIGUES-FILHO, E.; COSTA, F. M.; NUNEZ, C. V.; SILVA, A. C. Larvicidal effects of endophytic and basidiomycete fungus extracts on *Aedes* and *Anopheles* larvae (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 46, n. 4, p. 411–419, 2013.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, [S.l.: s.n.]. v. 21, n. 10, p. 1885-1886, 2015.

CARDOSO, C. W.; PAPLOSKI, I. A. D.; KIKUTI, M.; RODRIGUES, M. S.; SILVA, M. M. O.; CAMPOS, G. S.; SARDI, S. I.; KITRON, U.; REIS, M. G.; RIBEIRO, G. S. Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* [S.l.: s.n.], v. 21, n. 12, p. 2274–2276, 2015.

CIMMINO, A.; ANDOLFI, A.; AVOLIO, F.; ALI, A.; TABANCA, N.; KHAN, I. A.; EVIDENTE, A. Cyclopaldic acid, seiridin, and sphaeropsidin A as fungal phytotoxins, and larvicidal and biting deterrents against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Structure-activity relationships. *Chemistry and Biodiversity*, v. 10, p. 1239-1251, 2013.

CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z. A phylogenetic re-evaluation of *Arthrinium*. *IMA Fungus*, v. 4, n. 1, p. 133–154, 2013.

DARWISH, M.; GORMAN, B.; KALUNDA, M. Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases. *World Health Organization - Technical Report Series*. [S.l.: s.n.], 1985

DE MENEZES, N. L.; DE MELLO-SILVA, R.; MAYO, S. J. A cladistic analysis of the Velloziaceae. *Kew Bulletin*, v. 49, 1994.

DE SANTOS, N. D. L., MOURA, K. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, G. K. N.; COELHO,

- L. C. B. B.; AMARAL, D. M.; NAVARRO, F.; PAIVA, M. G. Oviposition-Stimulant and Ovicidal Activities of *Moringa oleifera* Lectin on *Aedes aegypti*. *PLoS ONE*, v. 7, n. 9, e44840, 2012.
- EPELBOIN, Y.; TALAGA, S.; EPELBOIN, L.; DUSFOUR, I. Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 11, p. 1–22, 2017.
- FARES, R. C. G.; SOUZA, K. P. R.; AÑEZ, G.; RIOS, M. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. *BioMed Research International*, [S.l: s.n.], ID 32873, 2015.
- FELBER, A. C.; ORLANDELLI, R. C.; RHODEN, S. A.; GARCIA, A.; COSTA, A. T.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Bioprospecting foliar endophytic fungi of *Vitis labrusca* Linnaeus, Bordô and Concord cv. *Annals of Microbiology*, v. 66, n. 2, p. 765–775, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s13213-015-1162-6>>.
- FERREIRA, Mariana C. et al. Diversity of the endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic neotropical plant *Vellozia gigantea* from the endangered Brazilian rupestrian grasslands. *Biochemical systematics and ecology*, v. 71, p. 163-169, 2017a.
- FERREIRA, M. C.; CANTRELL, C. L.; WEDGE, D. E.; GONÇALVES, V. N.; JACOB, M. R.; KHAN, S.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Antimycobacterial and antimalarial activities of endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic neotropical plant *Vellozia gigantea* from Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 10, p. 692-697, 2017b.
- GAZIS, R.; CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal Ecology*, v. 3, p. 240-254, 2010.
- GOVINDARAJAN, M.; JEBANESAN, A.; REETHA, D. Larvicidal effect of extracellular secondary metabolites of different fungi against the mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. *Tropical biomedicine*, v. 22, n. 1, p. 1-3, 2005.
- GRIJSELS, S.; NIELSEN, J. C.; NIELSEN, J.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C.; NIELSEN, K. F.; FRANSEN, R. J. N.; WORKMAN, M. Physiological characterization of secondary metabolite producing *Penicillium* cell factories. *Fungal Biology and Biotechnology*, v. 4, n. 1, p. 1–12, 2017.
- HARBACH, R. E. The Culicidae (Diptera): A review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa*, v. 638, n. 1668, p. 591–638, 2007.
- HOOG, G. S.; ENDE, A. H. G. Gerrits. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. *Mycoses*, v. 41, n. 5-6, p. 183-189, 1998.
- HUANG, Y. J. S.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. L. Arbovirus-mosquito vector-host interactions and the impact on transmission and disease pathogenesis of arboviruses. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. 22, p. 1–14, 2019.
- INTIRACH, J.; JUNKUM, A.; LUMJUAN, N.; CHAITHONG, U.; SOMBOON, P.; JITPAKDI, A.; RIYONG, D.; CHAMPAKAEW, D.; MUANGMOON, R.; CHANSANG, A.; PITASAWAT, B. Biochemical effects of *Petroselinum crispum* (Umbelliferae) essential oil on the pyrethroid resistant strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Insects*, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2019.

KAJLA, M.; BHATTACHARYA, K.; GUPTA, K.; BANERJEE, U.; KAKANI, P.; GUPTA, L.; KUMAR, S. Identification of the Temperature Induced Larvicidal Efficacy of *Agave angustifolia* against *Aedes*, *Culex*, and *Anopheles* Larvae. *Frontiers in Public Health*, v. 3, n. 286, p. 1–11, 2016.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology*, v. 19, n. 3, p. 707–713, 2005.

KRAEMER, M. U.G; SINKA, M. E.; DUDA, K. A.; MYLNE, A. Q. N; SHEARER, F. M. BARKER, C. M.; MOORE, C. G.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E.; BORTEL, W. V.; HENDRICK, G.; SCHAFFNER, F.; ELYAZAR, I. R. F.; TENG, H. J.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; PIGOTT, D. M.; SCOTT, T. W.; SMITH, D. L.; WINT, G. R. W.; GOLDING, N.; HAY, S. I. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *eLife*, v. 4, 2015, p. 1–18, 2015.

MACORIS, M. L.; MARTINS, A. J.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; LIMA, J. B. P.; VALLE, D. Pyrethroid resistance persists after ten years without usage against *Aedes aegypti* in governmental campaigns: Lessons from São Paulo State, Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 3, p. 1–18, 2018.

MANDAVID, Hugues; RODRIGUES, A. M. S.; ESPINDOLA, L. S.; EPARVIER, V.; STIEN, D. Secondary Metabolites Isolated from the Amazonian Endophytic Fungus *Diaporthe* sp. SNB-GSS10. *Journal of Natural Products*, v. 78, n. 7, p. 1735–1739, 2015.

MATASYOH, J. C.; DITTRICH, B.; SCHUEFFLER, A.; LAATSCH, H. Larvicidal activity of metabolites from the endophytic *Podospora* sp. against the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Parasitology Research*, v. 108, n. 3, p. 561–566, 2011.

MORINO, T.; NISHIMOTO, M.; MASUDA, A.; FUJITA, S.; NISHIKIORI, T.; SAITO, S. NK374200, a novel insecticidal agent from *Taralomyces*, found by physico-chemical screening. *The Journal of Antibiotics*, v. 48, n. 12, p. 1509-1510, 1995.

MOYES, C. L.; VONTAS, J.; MARTINS, A. J.; NG, L. C; KOOU, S. Y.; DUSFOUR, I.; RAGHAVENDRA, K.; PINTO, J.; CORBEL, V.; DAVID, J. P.; WEETMAN, D. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 7, p. 1–20, 2017.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v. 403, n. 3, p. 853-858, 2000.

NORILER, S. A.; SAVI, D. C.; ALUIZO, R.; PALÁCIO-CORTES, A. M.; POSSIEDE, Y. M; GLIENKE, C.. Bioprospecting and structure of fungal endophyte communities found in the Brazilian biomes, pantanal, and Cerrado. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1–14, 2018.

NUNES, M. R. T.; FARIA, N. R.; VASCONCELOS, J. M.; GOLDING, N.; KRAEMER, M. U. G.; OLIVEIRA, L. F.; AZEVEDO, R. S. S.; SILVA, D. E. A.; SILVA, E. V. P.; SILVA, S. P.; CARVALHO, V. L.; COELHO, G. E.; CRUZ, A. C. R.; RODRIGUES, S. G.; VIANEZ JR, J. L. S. G; NUNES, B. T. D.; CARDOSO, J. F.; TESH, R. B.; HAY, S. I.; PYBUS, O. G.; VASCONCELOS, P. F. C. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine*, v. 13, n. 102, 2015.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS/PAHO). *Tool for the diagnosis and care of patients with suspected arboviral diseases*. [S.l: s.n.], 2017. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/33895>>.

PINHO, D. B.; FIRMINO, A. L.; FERREIRA-JUNIOR, W. G.; PEREIRA, O. L. An efficient protocol for DNA extraction from Meliolales and the description of *Meliola centellae* sp. nov. *Mycotaxon*, v. 122, n. 1, p. 333-345, 2012.

POSSAS, C.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; TAUILL, P. L.; PINHEIRO, F. P.; PISSINATTI, A.; CUNHA, R. V.; FREIRE, M.; MARTINS, R. M.; HOMMA, A. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 10, p. e180278, 2018.

POWELL, Jeffrey R.; TABACHNICK, Walter J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. August, p. 11–17, 2013.

PRADEEP, F. S.; PALANISWAMY, M.; RAVI, S.; THANGAMANI, A.; PRADEEP, B. V. Larvicidal activity of a novel isoquinoline type pigment from *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Process Biochemistry*, v. 50, p. 1479-1486, 2015.

RAGAVENDRAN, C.; MARIAPPAN, T.; NATARAJAN, D. Larvicidal, histopathological efficacy of *Penicillium daleae* against larvae of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* plus biotoxicity on *Artemia nauplii* a non-target aquatic organism. *Frontiers in Pharmacology*, v. 8, n. , p. 1–14, 2017.

RAGAVENDRAN, Chinnasamy *et al.* Larvicidal, histopathological, antibacterial activity of indigenous fungus *Penicillium* sp. Against *Aedes aegypti* L and *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae) and Its Acetylcholinesterase Inhibition and Toxicity Assessment of Zebrafish (*Danio re.* *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. MAR, p. 1–17, 2019.

RODRIGUEZ, Rusty; REDMAN, Regina. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: Plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, n. 5, p. 1109–1114, 2008.

RUBIO, Alejandra *et al.* Assessment of combined tools and strategies for *Aedes aegypti* control with low environmental impact. *Parasitology Research*, v. 118, n. 2, p. 411–420, 2019.

SALUNKHE, Rahul B. *et al.* Larvicidal potential of silver nanoparticles synthesized using fungus *Cochliobolus lunatus* against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) and *Anopheles stephensi* Liston (Diptera; Culicidae). *Parasitology Research*, v. 109, n. 3, p. 823–831, 2011.

SAMSON, Robert A; HOUBRAKEN, Jos. *Phylogenetic and taxonomic studies on the genera Penicillium and Talaromyces*. [S.l: s.n.], 2011. v. 70.

SCHMIDT, Chris A. *et al.* Effects of desiccation stress on adult female longevity in *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae): results of a systematic review and pooled survival analysis. *Parasites & vectors*, v. 11, n. 1, p. 267, 2018.

SCOTT, Thomas W.; TAKKEN, Willem. Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. *Trends in Parasitology*, v. 28, n. 3, p. 114–121, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.01.001>>.

SOUZA, Thiago Moreno L. *et al.* Emergence of the East-Central-South-African genotype of Chikungunya virus in Brazil and the city of Rio de Janeiro may have occurred years before surveillance detection. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2019.

- STROBEL, Gary *et al.* Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products*, v. 67, n. 2, p. 257–268, 2004.
- SUN, Xiang; GUO, Liang Dong. Endophytic fungal diversity: Review of traditional and molecular techniques. *Mycology*, v. 3, n. 1, p. 65–76, 2012.
- SUNDARAVADIVELAN, Chandran; PADMANABHAN, Madanagopal Nalini. Effect of mycosynthesized silver nanoparticles from filtrate of *Trichoderma harzianum* against larvae and pupa of dengue vector *Aedes aegypti* L. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, n. 6, p. 4624–4633, 2014.
- UZMA, Fazilath *et al.* Endophytic fungi-alternative sources of cytotoxic compounds: A review. *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, n. APR, p. 1–37, 2018.
- VASCONCELOS, Pedro Fernando da Costa. Febre amarela no Brasil: Reflexões e hipóteses sobre a emergência em áreas previamente livres. *Revista de Saude Publica*, v. 44, n. 6, p. 1144–1149, 2010.
- VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 1990.
- VRABL, Pamela *et al.* Fungal Growth in Batch Culture – What We Could Benefit If We Start Looking Closer. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. October, p. 1–11, 2019.
- WEAVER, Scott C. Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 6, p. 6–9, 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control : new edition. *World Health Organization.*, 2009. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/44188>>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. *World Health Organization*, p. 1–41, 2005. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO\\_CDS\\_WHOPES\\_GCDPP\\_2005.13.pdf?ua=1](http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf?ua=1)>.
- ZANLUCA, Camila *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.
- ZANOTTO, Paolo Marinho de Andrade; LEITE, Luciana Cezar de Cerqueira. The Challenges Imposed by Dengue, Zika, and Chikungunya to Brazil. *Frontiers in immunology*, v. 9, n. August, p. 1964, 2018.
- ZHANG, Ying *et al.* Pleosporales. *Fungal Diversity*, v. 53, p. 1–221, 2012.