

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA – ICET  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
PARA RECURSOS AMAZÔNICOS

QUIMIODIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS  
ASSOCIADO A ESTRESSE OXIDATIVO EM LARVAS DE *Aedes*  
*aegypti*

MARIA BEATRIZ SILVA COSTA

ITACOATIARA-AM

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA – ICET  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
PARA RECURSOS AMAZÔNICOS

MARIA BEATRIZ SILVA COSTA

QUIMIODIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS  
ASSOCIADO A ESTRESSE OXIDATIVO EM LARVAS DE *Aedes*  
*aegypti*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos - PPGCTRA, como requisito para o título de mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Camila Martins de Oliveira

ITACOATIARA-AM

2020

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C837q Costa, Maria Beatriz Silva  
Quimiodiversidade de fungos endofíticos associado a estresse oxidativo em larvas de *Aedes aegypti* / Maria Beatriz Silva Costa. 2020  
68 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Camila Martins de Oliveira  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Citotoxicidade. 2. Dengue. 3. Tbars. 4. Carbonila. 5. Xanthomonas. I. Oliveira, Camila Martins de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título


Maria Beatriz Silva Costa

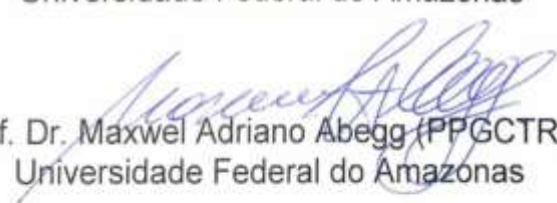
Quimiodiversidade de fungos endofíticos associado a estresse oxidativo em larvas de *Aedes aegypti*.

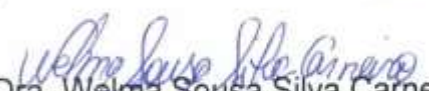
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Recursos Amazônicos.

Aprovado(a) em 02 de março de 2020.

BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dra. Camila Martins de Oliveira (PPGCTRA/UFMT)  
(Presidente)  
Universidade Federal do Amazonas

  
Prof. Dr. Maxwell Adriano Abegg (PPGCTRA)  
Universidade Federal do Amazonas

  
Prof. Dra. Welma Sousa Silva Carneiro (ICET)  
Universidade Federal do Amazonas

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação a Deus, aos meus pai e irmão que de muitas formas me incentivaram e ajudaram para que fosse possível a concretização deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada, sem Ele eu não teria conseguido.

Aos meus pais Joaquina Silva Costa e Exedito Gregório da Costa, pelo amor incondicional e pela paciência. Por terem feito o possível e o impossível para me oferecerem a oportunidade de estudar, acreditando e respeitando minhas decisões e nunca deixando que as dificuldades acabassem com os meus sonhos, serei imensamente grata.

Ao meu irmão Adriano Silva Costa, que também me ajudou intensamente nessa caminhada acadêmica, confiando e me ajudando para que eu superasse as dificuldades e alcançasse meus objetivos.

Ao meu amigo e namorado Ítalo Silva, por compreender a importância dessa conquista e aceitar a minha ausência quando necessário, me dando força sempre para superar os medos e anseios da universidade e da vida.

À minha grande mestre e orientadora Prof. Dra. Camila Martins de Oliveira, pela oportunidade de aprendizado e incentivo, como também por toda sua paciência, sabedoria e discernimento para dirigir com coerência este trabalho. Por ela guardo admiração e respeito tanto pela profissional quanto pela pessoa ética que é.

À Universidade Federal do Amazonas, especialmente ao campus Itacoatiara por ter me concedido a oportunidade de cursar a graduação e o mestrado. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, docentes, discentes, parcerias universitárias INPA, UFAM (Manaus) e UNESP (IBILCE), corpo técnico que contribuíram para o desenvolvimento direto e indiretamente na execução deste projeto, em especial ao Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei, Prof. Dr. Emerson Silva Lima e Prof. Dr. Luis Octavio Regasini

A FAPEAM por ter me concedido bolsa durante esse período para o desenvolvimento e realização deste projeto.

Aos amigos Vanessa Hentges, Sabrina Hentges, Luane Seixas, Viviane Farias, Bruna Viegas, João Ferreira Reis Neto, Thaís Lima Soriano e Dona Siumara de Oliveira Lima, pelas ótimas histórias vividas e o companheirismo, vocês contribuíram muito para essa caminhada.

À todos os familiares, tios, tias e primos que torceram e acreditaram na conclusão deste curso, fico muito grata.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos a mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

## RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor do vírus da dengue, dengue hemorrágica, chikungunya e do zika vírus, que vem causando um grave problema de saúde pública mundial. Atualmente, o controle do *Ae. aegypti* se realiza com larvicidas sintéticos, no entanto, os mosquitos têm se tornado altamente resistentes a eles e isto faz com que sua erradicação seja mais difícil. O surgimento de mosquitos resistentes a inseticidas reforça o interesse da busca de novos produtos eficazes contra esses mosquitos adultos e no seu estado larval. Dessa forma, o objetivo deste projeto foi avaliar a quimiodiversidade encontrada nos fungos endofíticos isolados de *Passovia stelis* quanto ao seu potencial larvicida e de compreender os possíveis mecanismos entomotóxicos induzidos. Assim, para alcançar os objetivos delineados, 104 fungos endofíticos isolados em estudos anteriores passaram por reativação, onde apenas 6 apresentaram viabilidade. Cada um dos seis fungos foi cultivado em meio líquido de batata-dextrose, após o crescimento micelar, o caldo foi separado e particionado com acetato de etila, fornecendo os extratos brutos após a evaporação do solvente. Os extratos brutos obtidos (Ph, FAT07, FAT46, FAT49, FAT50 e CAT20) foram submetidos à testes preliminares em células de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5) para análise de citotoxicidade pelo método do Alamar Blue e determinação de níveis de espécies reativas de oxigênio usando método da diclorofluoresceína. Os extratos que foram citotóxicos e apresentaram produção de espécies reativas de oxigênio foram submetidos ao teste de potencial larvicida frente as larvas de *Ae. aegypti* (ensaio bioseletivo e de dose). As larvas que morreram quando expostas ao extrato analisado foram submetidas a quantificação do dano oxidativo causado a proteínas e lipídios por meio do ensaio de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico e quantificação de teor de carbonila, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos as amostras Ph, CAT 20, FAT 49, FAT 46 e FAT 50 não apresentaram citotoxicidade, enquanto a amostra FAT 07 foi citotóxica. Todos os extratos testados frente as células MRC-5 são produtores de espécies reativas de oxigênio. O extrato FAT07 apresentou atividade larvicida com CL<sub>50</sub> igual a 264,456 ppm e CL<sub>90</sub> igual a 364,307 ppm, sendo considerado ativo. Suplementarmente, supõe-se que as larvas ao serem submetidas ao extrato FAT07 morrem por dano oxidativo a proteínas e lipídios. O extrato FAT07 foi fracionado, e três substâncias foram isoladas, estando em processo de identificação por Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas. Adicionalmente, foi realizado ensaio biológico para atividade antibacteriana contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

**Palavras-chave:** Citotoxicidade, Dengue; TBARS; Carbonila; Xanthomonas.

## ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is the main vector of the dengue virus, hemorrhagic dengue, chikungunya and the zika virus, which has been causing a serious public health problem worldwide. Currently, control of *Ae. aegypti* is carried out with synthetic larvicides, however, mosquitoes have become highly resistant to them and this makes their eradication more difficult. The emergence of insecticide-resistant mosquitoes reinforces the interest in the search for new products effective against these adult mosquitoes and in their larval state. Thus, the objective of this project was to evaluate the chemiodiversity found in the endophytic fungi isolated from *Passovia stelis* regarding their larvicidal potential and to understand the possible entomotoxic mechanisms induced. Thus, to achieve the objectives outlined, 104 endophytic fungi isolated in previous studies underwent reactivation, where only 6 showed viability. Each of the six fungi were grown in potato dextrose liquid medium, after the micellar growth, the broth was separated and partitioned with ethyl acetate, providing the crude extracts after evaporation of the solvent. The crude extracts obtained (Ph, FAT07, FAT46, FAT49, FAT50 and CAT20) were subjected to preliminary tests on human lung fibroblast cells (MRC-5) for analysis of cytotoxicity by the Alamar Blue method and determination of reactive species levels of oxygen using the dichlorofluorescein method. The extracts that were cytotoxic and showed production of reactive oxygen species were submitted to the larvicidal potential test against the *Ae. Aegypti* larvae (bioselective and dose assay). Larvae that died when exposed to the analyzed extract were subjected to quantification of the oxidative damage caused to proteins and lipids by testing reactive substances of thiobarbituric acid and quantification of carbonyl content, respectively. According to the results obtained, the Ph, CAT 20, FAT 49, FAT 46 and FAT 50 samples did not show cytotoxicity, while the FAT 07 sample was cytotoxic. All extracts tested against MRC-5 cells are producers of reactive oxygen species. The extract FAT07 showed larvicidal activity with  $CL_{50}$  equal to 264,456 ppm and  $CL_{90}$  equal to 364,307 ppm, being considered active. Additionally, it is assumed that the larvae, when submitted to the FAT07 extract, die from oxidative damage to proteins and lipids. The FAT07 extract was fractionated, and three substances were isolated, being in the process of identification by Nuclear Magnetic Resonance and Mass Spectrometry. Additionally, a bio-clock assay for antibacterial activity against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

**Keywords:** Cytotoxicity; Dengue ; TBARS; Carbonyl; Xanthomonas.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Processo de produção de EROs na mitocôndria via cadeia transportadora de elétrons .....	25
Figura 2- Folhas e caule de <i>Passovia stelis</i> .....	27
Figura 3 - Processo de obtenção do extrato bruto .....	28
Figura 4- Foto ilustrativa obtida da ATCC de linhagens celulares de fibroblastos de pulmão humano (MRC5).....	29
Figura 5-Fungos reativados. A) FAT07; B) CAT20; C) FAT46; D) FAT49; E) FAT50; F) Ph.....	37
Figura 6- Gráfico de barras referente ao percentual de viabilidade celular dos extratos Ph (fungo do gênero <i>Phomopsis</i> sp.), CAT20 (fungo sem identificação isolado do caule de <i>P. stelis</i> ), FAT49(fungo do gênero <i>Colletotrichum</i> sp. isolado das folhas de <i>P. stelis</i> ), FAT46(fungo do gênero <i>Colletotrichum</i> sp. isolado das folhas de <i>P. stelis</i> ), FAT50(fungo sem identificação isolado das folhas de <i>P. stelis</i> ) e FAT07 (fungo do gênero <i>Xylaria</i> sp. isolado das folhas de <i>P. stelis</i> ), em fibroblastos de pulmão humano, linhagem MRC-5, após 24 ,48 e 72 h de exposição. Os dados estão representados como CI50 ( $p < 0,05$ ) ....	38
Figura 7- Gráfico de barras referente ao percentual de produção de EROS pelos extratos Ph (fungo do gênero <i>Phomopsis</i> sp.), CAT20 (fungo sem identificação isolado do caule de <i>P. stelis</i> ), FAT49(fungo do gênero <i>Colletotrichum</i> sp. isolado das folhas de <i>P. stelis</i> ), FAT46(fungo do gênero <i>Colletotrichum</i> sp. isolado das folhas de <i>P. stelis</i> ), FAT50(fungo sem identificação isolado das folhas de <i>P. stelis</i> ) e FAT07 (fungo do gênero <i>Xylaria</i> sp. isolado das folhas de <i>P. stelis</i> ), em fibroblastos de pulmão humano, linhagem MRC-5.....	40
Figura 8- Gráfico de barras referente à curva de concentração de produção de EROS do extrato FAT07 (fungo do gênero <i>Xylaria</i> sp. isolado das folhas de <i>P. stelis</i> ) frente a fibroblastos de pulmão humano, linhagem MRC-5.....	41
Figura 9- Gráfico de barras referente ao resultado da peroxidação lipídica das larvas submetidas a dose letal 50 (DL50), dose letal 90 (DL90) e larvas submetidas somente ao DMSO 1% (controle). Os dados foram expressos em níveis de MDA nas amostras.....	45
Figura 10- Gráfico de barras referente ao resultado da peroxidação protéica das larvas submetidas a dose letal 50 (DL50), dose letal 90 (DL90) e larvas submetidas somente ao DMSO 1% (controle). Os dados foram expressos em nM de carbonila/mg de proteína. 46	46
Figura 11- Antibióticos avaliados contra <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> e seus valores de concentração inibitória mínima (CIM). .....	48
Figura 12- Demonstrativo de separação de substâncias presente no extrato bruto FAT07 e da purificação das frações 18-20 e frações 21-27.....	49
Figura 13- Frações obtidas a partir da purificação de 1g de extrato bruto FAT07 por Coluna Cromatográfica de Sílica .....	50
Figura 14- Espectro de RMN de <sup>1</sup> H fração F-03(DMSO-d6) em 600 MHz.....	51
Figura 15-Espectro de RMN de <sup>1</sup> H fração F-07(DMSO-d6) em 600 MHz.....	52
Figura 16- Espectro de RMN de <sup>1</sup> H fração F-05(CDCl3) em 600 MHz .....	53
Figura 17- Espectro de RMN DEPT-135 fração F-03(DMSO-d6) em 600 MHz .....	54
Figura 18- Espectro de RMN DEPT-135 fração F-05(CDCl3) em 600 MHz.....	54

<b>Figura 19- Espectro de RMN DEPT-135 fração F-07(DMSO-d6) em 600 MHz .....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 20-Espectro de massas fração F-03 .....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 21-Espectro de massas fração F-05 .....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 22-Espectro de massas fração F-07 .....</b>	<b>58</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Resultados dos bioensaios seletivos com extratos FAT07 e FAT46 contra <i>Ae. aegypti</i> .....	41
Tabela 2- Resultados dos bioensaios de dose com extratos FAT07 contra larvas de <i>Ae. aegypti</i> submetidas a diferentes concentrações .....	42
Tabela 3- Valores de CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> do extrato FAT07 contra larvas de <i>Ae.aegypti</i> após 72 h de aplicação .....	43
Tabela 4- Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM) ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .....	47
Tabela 5-Massas das frações puras obtidas pelo fracionamento do extrato fúngico.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$  – microgramas

$\mu\text{L}$  – microlitros

$\mu\text{M}$  – micromolar

AAPH – 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride

AcOEt- Acetato de etila

ATCC- American Type Culture Collection ®

CAT20- fungo isolado do caule de *Passovia stelis* sem gênero identificado tratado com ampicilina e tetraciclina.

$\text{CDCl}_3$ - Clorofórmio deuterado

CI50- Concentração inibitória de 50%

CIM<sub>50</sub>- Concentração Inibitória Mínima de 50%

CIM<sub>90</sub>- Concentração Inibitória Mínima de 90%

CL<sub>50</sub>- Concentração letal responsável em 50% de mortalidade.

CL<sub>90</sub> – Concentração letal responsável em 90% de mortalidade

DCFH-DA - diacetato de 2'-7'-diclorohidrofluoresceína

DMEN - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO- Dimetilsulfóxido

DMSO-d<sub>6</sub> – Dimetilsulfóxido deuterado

DNPH- 2,4-dinitrofenil-hidrazina

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

EUA- Estados Unidos da América

FAT07 – fungo isolado da folha de *Passovia stelis* do gênero *Xylaria* sp. tratado com ampicilina e tetraciclina.

FAT46- fungo isolado da folha de *Passovia stelis* do gênero *Colletotrichum* sp. tratado com ampicilina e tetraciclina.

FAT49- fungo isolado da folha de *Passovia stelis* do gênero *Colletotrichum* sp. tratado com ampicilina e tetraciclina.

FAT50 – fungo isolado da folha de *Passovia stelis* sem gênero identificado. tratado com ampicilina e tetraciclina.

HCl- Ácido clorídrico

MBC- Concentração Bactericida Mínima

MDA – Malondialdeído (1,1,3,3-tetrahidroxipropano)

MRC-5 – Linhagens de células de fibroblastos de pulmão humano

OMS- Organização Mundial de Saúde

PBS – Solução Salina Tamponada

PDA- Potato Dextrose Ágar (Meio de cultura sólido)

PDB- Potato Dextrose Broth (Meio de cultura líquido)

Ph – fungo isolado do gênero *Phomopsis* sp.

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

SE – Semana Epidemiológica

TBA - Ácido Tiobarbitúrico

TCA- Ácido Tricloroacético

UV- Ultravioleta Visível

Xcc – *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

## LISTA DE REAGENTES

AAPH- Sigma Aldrich

Acetato de Etila – Synth

Bovin Serum Albumin- Sigma Aldrich

Carbonato de sódio anidro – VETEC

DMSO- Merck

Doxorrubicina – Sigma Aldrich

Etanol - Synth

Folin Ciocalteu's Phenol 2N – Sigma Aldrich

Guanidine Hidrocloride- Sigma Aldrich

Sephadex – Sigma Aldrich

Sulfato de cobre – Reagen

Tartarato de potássio- VETEC

TBA- Sigma Aldrich

TCA- Sigma Aldrich

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 <i>Aedes aegypti</i> .....	18
2.2 Família Loranthaceae e <i>Passovia stelis</i> .....	20
2.3 Fungos endofíticos.....	21
2.4 Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos .....	22
2.5 Estresse oxidativo .....	24
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo Geral .....	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
4. METODOLOGIA.....	27
4.1 Obtenção e Identificação da Cepa. ....	27
4.2 Obtenção dos extratos brutos .....	27
4.3 Ensaio <i>in vitro</i> com células MRC-5 .....	28
4.3.1 Citotoxicidade - Método Alamar blue .....	29
4.3.2 Determinação de níveis de EROS usando DCFH-DA (2',7'- diclorohidrofluoresceínadiacetato). .....	30
4.4 Ensaio Larvicida .....	30
4.4.1 Bioensaio seletivo .....	31
4.4.2 Bioensaio de dose .....	31
4.4.3 Análise estatística .....	31
4.5 Quantificação de dano oxidativo em larvas de <i>Ae. aegypti</i> .....	32
4.5.1 Homogeneização de larvas.....	32
4.5.2 Dano oxidativo a lipídios .....	32
4.5.3 Dano oxidativo a proteínas.....	33
4.6 Atividade Biológica para <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .....	34
4.6.1 Cultivo Bacteriano .....	34
4.6.2 Ensaio de susceptibilidade .....	34
4.7 Fracionamento do extrato bruto.....	35
4.8 Análises por Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1 Obtenção, identificação da cepa e preparo de extrato bruto .....	36
5.2 Teste <i>in vitro</i> em células: citotoxicidade e EROS .....	37
5.3 Teste larvicida: bioensaio seletivo e de dose.....	41

5.4	Dano oxidativo em larvas de <i>Ae. aegypti</i> submetidas ao extrato FAT07 nas concentrações letais de 50% e 90% . . . . .	44
5.5	Atividade Biológica para <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> . . . . .	47
5.6	Fracionamento do extrato bruto . . . . .	49
5.7	Perfil Químico das Frações obtidas por RMN e Massas . . . . .	50
6.	CONCLUSÃO . . . . .	59
	REFERÊNCIAS . . . . .	60



## 1. INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos são aqueles microrganismos que colonizam o interior dos tecidos vegetais (MISHRA et al., 2014; SUDHA et al., 2016) e produzem uma vasta quantidade de metabólitos secundários com novas estruturas, além de possuírem atividades biológicas interessantes. Conseqüentemente, tem havido um crescente interesse nos endófitos associados às plantas e associados ao mar (esponjas e algas), principalmente para as indústrias farmacêuticas, químicas e agrícolas (SHOBA; SASIKUMAR; SATHIAVELU, 2018).

As doenças transmitidas por insetos são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (LANDAZABALA et al., 2018), estando a dengue, Chikungunya e Zika presentes na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças do Ministério da Saúde (BRASIL, 2019).

Dado que vacinas eficazes ou tratamentos medicamentosos para estas doenças ainda estão por serem desenvolvidos, o controle é limitado ao manejo da população de mosquitos que, atualmente concentra-se em eliminar o vetor *Ae. aegypti* usando inseticidas sintéticos (organofosforados, carbamatos ou piretróides). Contudo, o uso contínuo e inadequado desses pesticidas resultou em resistência generalizada a inseticidas e poluição ambiental (LANDAZABALA et al., 2018).

Sabendo que os índices de morte causadas pelo vetor *Ae. aegypti*, transmissor da dengue, dengue hemorrágica, zika e chikungunya, vem aumentando consideravelmente na região Norte do Brasil (BRASIL, 2017). E que o eixo dos programas de controle do vetor dessas doenças vem apresentando baixa eficácia e altos custos, além de insuficientes para interromper o processo de transmissão das doenças (TAUIL, 2002; PENNA, 2003; BARRETO; TEIXEIRA, 2008), se faz necessário, encontrar substâncias naturais com potencial larvicida para o controle de larvas de *Ae. aegypti* (BRASIL, 2017).

Dessa forma, os fungos endofíticos tem uma vantagem pelo fato de que teoricamente agridem menos o meio ambiente, como também ampliam as alternativas de larvicidas de origem natural, minimizando o desenvolvimento de resistência por parte dos mosquitos. Já que, no momento, os inseticidas microbianos estão sendo uma alternativa em relação aos inseticidas químicos, devido à sua toxicidade seletiva e pronta remoção no ecossistema. Diferentemente do processo de produção de inseticidas sintéticos, a fabricação de produtos microbianos é considerada mais segura e menos poluente (TANVIR; SAJID, 2014).

Logo, este trabalho teve como objetivo avaliar a quimiodiversidade encontrada nos extratos brutos de fungos endofíticos isolados de *Passovia stelis*, quanto ao seu potencial

larvicida e avaliar os possíveis mecanismos oxidativos induzidos por estas substâncias em larvas de terceiro ínstar de *Ae. Aegypti*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Aedes aegypti*

O mosquito *Ae. aegypti* é o principal vetor do vírus da dengue, chikungunya e zika (BRASIL, 2017; BOGA et al., 2019), que são doenças consideradas um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. As maiores incidências dessas doenças são em regiões tropicais do Brasil (COSTA; CALADO, 2016).

A dengue é transmitida pela circulação simultânea dos quatro sorotipos virais: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 (OMS, 2014). É uma doença que afeta todos os níveis sociais, no entanto, o impacto pode ser maior nas populações mais pobres que vivem em áreas com abastecimento de água inadequado, infraestrutura precária e onde as condições de saúde são mais favoráveis para a multiplicação do vetor (BRASIL, 2017). Os sintomas comuns da doença são febre, cefaléia, náuseas, vômitos, diarreia, fraqueza, e persistem em média por 14 dias (TEIXEIRA et al., 2010).

Chikungunya é causada pelo vírus CHIKV, pertencente ao gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae* (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). São conhecidas quatro linhagens do vírus CHIKV: Oeste Africano, Leste Centro-Sul Africano, Asiático e Oceano Índico (WEAVER, 2014; AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2015). A doença é caracterizada por fortes dores articulares e febre, podendo tornar-se crônica, com persistências dos sintomas por anos. Algumas manifestações atípicas são consideradas graves, dentre elas estão as manifestações neurológicas, cardiovasculares, renais, oculares e dermatológicas (BRASIL, 2019).

A zika é transmitida pelo vírus ZIKV, pertencente ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*. A apresentação clínica é inespecífica e pode ser diagnosticada incorretamente como outras doenças infecciosas, principalmente aquelas causadas por outros arbovírus, como dengue e chikungunya (MUSSO; GUBLER, 2016). No Brasil, o ZIKV foi detectado pela primeira vez em maio de 2015 (TRIGUEIRO et al., 2019), e levantou grande preocupação pública devido à associação com microcefalia e síndrome de Guillain-Barré (MAO et al., 2017). Uma vez que, mais de quatro mil casos de suspeita de microcefalia foram relatados até fevereiro de 2016, embora esses casos possam ter sido diagnosticados incorretamente em algumas ocorrências (VICTORA et al., 2016; SONG et al., 2017).

Em 2019, até a SE 12 (30/12/2018 a 23/03/2019), foram registrados 273.193 casos prováveis de Dengue no país, com uma incidência de 131,0 casos/100 mil hab.. No mesmo período de 2018, foram registrados 71.525 casos prováveis de Dengue. A região Sudeste foi a que apresentou o maior número de casos prováveis de Dengue (179.714 casos; 65,7%) em relação ao total do país, seguida das regiões Centro-Oeste (48.048 casos; 17,6%), Nordeste (20.543 casos; 7,5%) Norte (16.630 casos, 6,1%) e Sul (8.258 casos; 3,0%). Foram registrados também 15.352 casos prováveis de Chikungunya no país, com uma incidência de 7,4 casos/100 mil hab. Em 2018, até a SE 12, foram registrados 26.840 casos prováveis. Ainda em 2019, foram registrados 2.344 casos prováveis de Zika no país, com incidência de 1,1 caso/100 mil hab. Em 2018, no mesmo período, foram registrados 2.493 casos prováveis. E a região Norte apresentou o maior número de casos prováveis de Zika (919 casos; 39,2%) em relação ao total do país (BRASIL, 2019).

Os componentes do controle integrado de vetores definidos pela OMS (ROSE, 2001) incluem vigilância, manejo ambiental, controle biológico, controle químico com uso de inseticidas e repelentes, armadilhas e manejo da resistência a inseticidas.

O controle biológico de mosquitos inclui o uso de vários predadores, invertebrados aquáticos, patógenos fúngicos e bacterianos, parasitas nematódeos, além de peixes que se alimentam de larvas (BRAGA; VALLE, 2007).

O controle químico é realizado atualmente por larvicidas organofosforados (Bti® e Pyriproxifen ®), que foram os primeiros a substituir os organoclorados, e os piretroides (Cipermetrina®, e Deltametrina®), que têm sido usados como alternativa para substituição dos organofosforados (Malationa ® e Themephós ®), por sua alta eficiência contra mosquitos adultos, sendo necessárias menores quantidades de produto ativo. No entanto, causam altos impactos ambientais e são produtos de alto custo financeiro (ZARA et al., 2016).

De tal modo, a resistência dos mosquitos de *Ae. aegypti* tem sido um importante desafio, visto que faz com que sua erradicação seja mais difícil, e embora já existam larvicidas químicos para controle deste mosquito, os extratos de fungos tem uma vantagem frente aos compostos sintéticos, pois os larvicidas de origem química podem causar intoxicação se manipulados incorretamente, além de serem pouco seletivos, causando danos ao meio ambiente e tornando as larvas cada vez mais resistentes (OMS, 2014). Os larvicidas e inseticidas provenientes de extratos fúngicos, tem sua ação por vários mecanismos de ação, o que reduz o risco de resistência por parte dos mosquitos (AURY et al., 2013; MARQUES; KAPLAN, 2015).

Dessa forma, a busca por novos produtos larvicidas usando metabólitos secundários de origem biológica eficazes contra esses mosquitos adultos, bem como no seu estado larval são de extrema relevância, já que estas doenças são responsáveis por elevados índices de mortalidade no Brasil e no mundo (BASTOS et al., 2016; ROUNDY et al., 2017).

## 2.2 Família Loranthaceae e *Passovia stelis*

*Passovia stelis* é uma planta da família Loranthaceae e no Brasil, esta família está distribuída por todos os biomas sendo representada por 12 gêneros e 131 espécies (ARRUDA et al., 2012; SCALON et al., 2016).

As espécies pertencentes à família Loranthaceae apresentam características hemiparasitas, ou seja, utilizam os recursos do seu hospedeiro, mas ainda assim, realizam fotossíntese e produzem seus próprios compostos orgânicos (ARRUDA et al., 2012).

Os gêneros *Passovia*, *Psittacanthus* e *Struthanthus* são mais diversificados na flora brasileira quando comparados aos de outros países da América do Sul. Quanto à disposição geográfica no Brasil, alguns gêneros são tipicamente tropicais e generalizados, tais como *Passovia*, *Psittacanthus* e *Struthanthus*, enquanto outros têm distribuições restritas, por exemplo, *Cladocolea*, *Gaiadendron*, *Peristethium*, *Phthirusa*, *Oryctanthus*, *Oryctina* e *Pusillanthus*. Esses gêneros são encontrados principalmente na Amazônia e florestas do Atlântico, mas *Pusillanthus* e *Oryctina* também habitam Caatinga (ARRUDA et al., 2012).

A *P. stelis*, assim como todas as espécies da família Loranthaceae, recebem o nome popular de “erva-de-passarinho” devido ao expressivo número de espécies, cuja dispersão é feita por aves, havendo uma estreita relação entre o grupo de plantas e as aves (VASCONCELOS; MELO, 2015). As aves são atraídas pelas pseudobagas sulcosas da *P. stelis*, que são avidamente ingeridas (CONCEIÇÃO et al., 2010). A semente, após passar pelo trato digestório das aves, é eliminada com as fezes e ao cair sobre a casca de alguma árvore, geralmente, germina. A erva-de-passarinho se fixa nos galhos e troncos da planta hospedeira, se desenvolvendo vigorosamente e ocupando partes localizadas ou quase a totalidade da copa (CAIRES et al., 2009).

*P. stelis* é utilizada na medicina popular como adstringente para as moléstias uterinas, anti-diarréica, abortiva, hemostática, antiasmática, antileucorréica, contra a bronquite, afecções das vias respiratórias, tosses, pneumonia, antidiabética, anti-hemorragica e cicatrizante (PAES et al., 2010).

### 2.3 Fungos endofíticos

Fungos endofíticos são microrganismos que habitam a parte interna da planta, sendo encontrados em folhas, ramos e raízes, podendo ocupar espaços inter e intracelulares. Em geral, os endófitos adentram as plantas por meio de lesões naturais e artificiais, e provavelmente estão presentes em todas as plantas, sendo que uma planta pode conter centenas deles. As lesões naturais podem ser causadas por insetos ou crescimento das raízes ao penetrar o solo. Já as lesões artificiais podem se dar por meio de práticas agrícolas (CALDERANI; ORLANDELLI; PAMPHILE, 2016).

A relação de um endófito com o hospedeiro pode variar de um hospedeiro para outro e as interações entre eles ainda não são bem compreendidas (ALY et al., 2011; JALGAONWALA et al., 2011). Esta associação sugere que esses organismos evoluíram com seus hospedeiros, apresentando uma íntima relação simbiótica, onde os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta, como o aumento da tolerância a estresses bióticos (insetos, herbívoros, nematoides parasitas e microrganismos fitopatogênicos) e abióticos (pH, temperatura, estresse hídrico, ventos fortes e salinidade)(ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Em contrapartida, a planta garante ao endófito os nutrientes necessários à sua sobrevivência, abrigo e transferência às próximas gerações (SPECIAN et al., 2014; MURALI et al., 2017).

No entanto, a associação do fungo e seu hospedeiro não é somente como uma relação simbiótica, mas também antagônica, Kusari e colaboradores (2012) relataram sobre a complexa interação química entre microrganismos e seus hospedeiros, destacando que existem inúmeras barreiras químicas e físicas que devem ser superadas para estabelecer com sucesso uma associação.

A hipótese do antagonismo é estabelecida quando os mecanismos de defesa da planta contra-atacam os fatores de virulência fúngica, e o fungo morre. Como também quando a planta sucumbe à virulência do fungo, ocasionando doença à planta (KUSARI et al., 2012).

Sabendo que os microrganismos são facilmente cultiváveis em tanques de fermentação, estes se tornam fontes facilmente renováveis e reprodutíveis quando comparados com outras fontes naturais, como plantas e animais, e representam uma rica fonte de novos produtos naturais (SOARES; PIMENTA, 2015).

Os fungos endofíticos apresentam várias vantagens para a produção de compostos biotivos, como a possibilidade de reprodução e produtividade segura, já que o microrganismo cultivado em tanques de fermentação se torna uma fonte potencialmente inesgotável. Ainda

tendo a possibilidade de preservação dos fungos (Castellani, *slants* e tubos criogênicos), não sendo necessária uma nova coleta a cada cultivo, sendo necessário somente a reativação dos microrganismos (SOARES; PIMENTA, 2015).

O aumento na produção é relativamente fácil, sendo que mudanças nas condições de cultura podem ser exploradas, a fim de se otimizar as várias vias biossintéticas que podem levar à produção de compostos ainda mais eficazes. Além disso, microrganismos respondem favoravelmente a técnicas rotineiras de cultura, enquanto culturas de tecidos ou o crescimento das plantas requerem técnicas especializadas ou meses de crescimento antes da coleta (SPECIAN et al., 2014).

A maioria dos fungos tem vias bioquímicas peculiares, resultando em metabólitos característicos ou específicos de uma determinada espécie, embora as produções destes metabólitos dependam de vários fatores a habilidade dos fungos endofíticos em produzir o mesmo metabólito bioativo que sua planta hospedeira pode reduzir a coleta de plantas raras, de crescimento reduzido e ameaçadas de extinção, preservando-se, assim, a biodiversidade (PAMPHILE et al., 2017).

Essa capacidade de produzir substâncias químicas caracterizadas originalmente da planta hospedeira, pode estar relacionada a uma recombinação genética do endófito com a planta, que pode ter ocorrido durante o processo de evolução (KELLER et al., 2005). Em algum momento durante essa evolução, pode ter ocorrido uma transferência horizontal de genes, o que permitiu que o receptor executasse as mesmas reações biossintéticas do doador. Além disso, questiona-se sobre os fitoquímicos bioativos das plantas serem produzidos exclusivamente por estas, sugerindo que as propriedades terapêuticas de uma planta medicinal possam ser resultado da relação mutualística com o microrganismo, sendo uma consequência da biossíntese concomitante da planta e do fungo (SPECIAN et al., 2014).

#### **2.4 Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos**

Os metabólitos secundários geralmente são compostos produzidos pelos organismos em resposta a estímulos externos, tais como infecção externa ou alterações nutricionais. Os fungos endofíticos também são conhecidos por sintetizar em abundância os metabólitos secundários, chegando a uma produção de até 73% superior à de outras classes de microrganismos (ALVIN; MILLER; NEILAN, 2014).

Os principais metabólitos secundários encontrados em endófitos são alcalóides, esteróides, terpenos, isocumarinas, quinonas, fenilpropanóides, ligninas, fenóis e ácidos fenólicos, metabólitos alifáticos, lactonas, citocatalasinas, flavonóides, peptídeos e xantonas,

que possuem as mais diversas atividades biológicas, incluindo inseticida e larvicida (PAMPHILE et al., 2017).

Mishra et al. (2014) afirma que os produtos naturais produzidos por fungos endofíticos são numerosos, e ensaios *in vitro* têm sido utilizados como uma importante ferramenta na busca por produtos naturais bioativos, promovendo respostas à busca de atividades biológicas em extratos, como avaliação antioxidante, antiinflamatória e citotóxica (YAMAGUCHI et al., 2017).

Specian e colaboradores (2014) também confirmaram que os metabólitos secundários têm sido isolados e caracterizados principalmente para fins industriais a partir do cultivo *in vitro* de fungos filamentosos, além de a indústria farmacêutica está sendo abastecida por uma variedade de fármacos de origem microbiana.

Vários estudos recentes demonstraram a eficácia de metabólitos oriundos de fungos endofíticos no controle do mosquito *Ae. aegypti*. Um destes estudos é a avaliação do efeito sinérgico do extrato do fungo *Fusarium oxysporum* em combinação com Temephos® contra *Ae. aegypti*, onde obteve-se que essa combinação sinérgica é altamente eficaz para controlar os estádios jovens do mosquito e estudos histológicos mostraram vacuolização no epitélio, bem como nos tecidos adiposo e muscular do intestino médio larval (VIVEKANANDHAN et al., 2017).

Landazabala et al. (2018) afirmou que a mortalidade de mosquitos *Ae. aegypti* também pode ser atribuída à presença de alcaloides, pois quando submetidas a extratos contendo alcaloides, as larvas sofreram estresse oxidativo e alterações na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.

O extrato bruto do fungo endofítico *Cochliobolus spicifer* isolado da tamareira *Phoenix dactylifera* apresentou-se como um forte candidato a larvicida natural, sendo seguro e estável no controle de mosquitos *Aedes caspius* e *Culex pipiens*. Uma vez que as larvas de terceiro estágio quando tratadas com este extrato também sofreram destruição e desorganização celular, espaçamento celular e vacuolização em pequenas regiões do intestino epitelial (ABUTAHA et al., 2015).

No estudo de Bücken et al. (2013), extratos etanólicos do fungo endofítico *Pestalotiopsis virgulata*, isolado de *Gustavia elíptica* cf., apresentaram efetiva atividade larvicida contra as larvas de *Ae. aegypti*.

Bernardi-Wenzel et al. (2013); Mao et al.(2014); Mascarin et al. (2018) também ressaltam o potencial larvicida de fungos endofíticos contra mosquitos do gênero *Aedes*. No estudo de Bernardi-Wenzel e colaboradores (2013), extratos de endófitos isolados da soja

(*Glycine max* L.) se mostraram eficientes contra larvas de *Ae. aegypti*; Mao et al. (2014), encontraram espirobisnaftalenos produzidas pelo fungo endofítico *Berkleasmiium* sp. que se mostraram um importante larvicida contra larvas de *Aedes albopictus*. Adicionalmente, Mascarin e coautores (2018) ressaltam o potencial larvicida do fungo endofítico *Metarhizium* spp. contra larvas e mosquitos de *A. aegypti*.

## 2.5 Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROS) incluem radicais livres, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radicais hidroxila ( $\cdot OH$ ), vários peróxidos ( $ROOR'$ ), hidroperóxidos (ROOH) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). As células são equipadas com um extenso sistema de defesa antioxidante para combater as EROS, seja diretamente por interceptação ou indiretamente através da reversão do dano oxidativo. Quando ocorre uma condição de desequilíbrio entre o quantidade de EROS e a atividade ineficiente do sistema de proteção antioxidante de um organismo, resulta no estresse oxidativo (ERUSLANOV; KUSMARTSEV, 2010 ; SANTOS et al., 2018).

De acordo com Ray et al. (2016), os microrganismos endofíticos são capazes de liberar gradualmente pequenas quantidades de EROS em seu hospedeiro, resultando em uma aclimatação das células hospedeiras às EROS por meio de aumento de enzimas relacionadas e vias antioxidantes. Dessa forma, acredita-se que os fungos endofíticos podem produzir EROS em insetos também, causando dano celular.

Embora insetos produzam em pequena quantidade espécies reativas de oxigênio como defesa contra patógenos, invasores e parasitas, as EROS também podem causar estresses oxidativos no próprio inseto quando produzidas em excesso. Isso ocorre porque as EROS são radicais que podem causar toxicidade celular, quando as enzimas antioxidantes são produzidas em menor quantidade que as EROS (AHMED, 2012).

As mitocôndrias são as principais fontes de EROS e o principal alvo de ataque de EROS, o que pode levar a um estresse oxidativo mais grave. Por sua vez, o estresse oxidativo destrói as mitocôndrias e libera mais EROS (ZHANG et al., 2019).

O processo de produção de EROS na mitocôndria pode ser ilustrado na Figura 1, onde o  $O_2$  sofre redução tetravalente (1), com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. A enzima catalisadora dessa reação é a citocromo oxidase. Na parte terminal da cadeia transportadora de elétrons, a referida enzima oxida quatro moléculas de citocromo removendo um elétron de cada uma delas. Esses elétrons são adicionados ao  $O_2$  para formar água e liberar

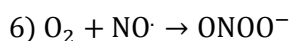
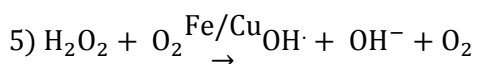
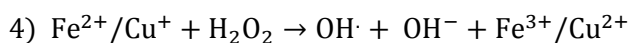
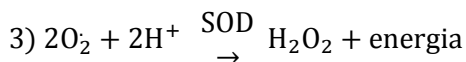
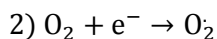
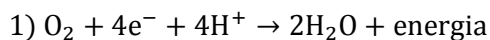


energia. A ação da citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria (BARBOSA et al., 2010).

No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente (2), dando origem aos radicais livres. Por meio de um processo chamado dismutação, radical  $O_2\cdot$  ao receber os íons  $H^+$ , gera peróxido de hidrogênio (3). Quando o peróxido reage com íons ferro ou cobre é gerado o radical hidroxila (4). Os referidos íons ( $Cu^+ /Fe^{2+}$ ) podem também catalisar a reação entre peróxido e radical superóxido, gerando da mesma forma  $OH\cdot$  (5). Outro processo de formação de EROs nas mitocôndrias é quando o superóxido reage com óxido nítrico, formando radical peroxinitrito(6).

O  $H_2O_2$ , apesar de não ser um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, é uma espécie com alto potencial reativo por participar da reação de geração de  $OH\cdot$ . Diferente dos radicais livres, o  $H_2O_2$  tem vida longa e é capaz de atravessar as membranas celulares apresentando-se potencialmente tóxico para as células (BARBOSA et al., 2010).

Figura 1- Processo de produção de EROs na mitocôndria via cadeia transportadora de elétrons



Fonte: Barbosa et al. (2010).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Buscar substâncias larvicidas através do estudo da quimiodiversidade produzida por fungos endofíticos.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Cultivar os fungos endofíticos para obtenção do extrato bruto;
- Testar os extratos obtidos para atividade larvicida por meio de bioensaio seletivo e de dose;
- Avaliar dano oxidativo a proteínas e lipídios em larvas mortas;
- Fracionar e purificar os extratos ativos;
- Identificar as substâncias obtidas utilizando técnicas de espectroscopia;
- Testar as substâncias obtidas nos ensaios biológicos.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção e Identificação da Cepa.

Os fungos endofíticos foram isolados das folhas e dos caules de planta *Passovia stelis* (FIGURA 2) pela aluna Sarah Simões da Silva em seu Trabalho de Conclusão de Curso, intitulado “Isolamento e identificação de fungos endofíticos das folhas e caule da espécie vegetal *Passovia stelis* (Loranthaceae)”.

A identificação dos fungos foi realizada pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Antônia Queiroz Lima de Souza do Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia – LABMICRA do Centro de Apoio Multidisciplinar – CAM – Central Analítica/UFAM por morfologia.

Neste trabalho foram utilizados 104 fungos isolados das folhas e caule de *Passovia stelis*, os quais passaram por processo de reativação e apenas seis apresentaram-se viáveis para o cultivo. Desses seis foram viáveis os fungos FAT07, FAT46, FAT49, FAT50 e Ph oriundos das folhas e o fungo CAT20, oriundo do caule.

Figura 2- Folhas e caule de *Passovia stelis*



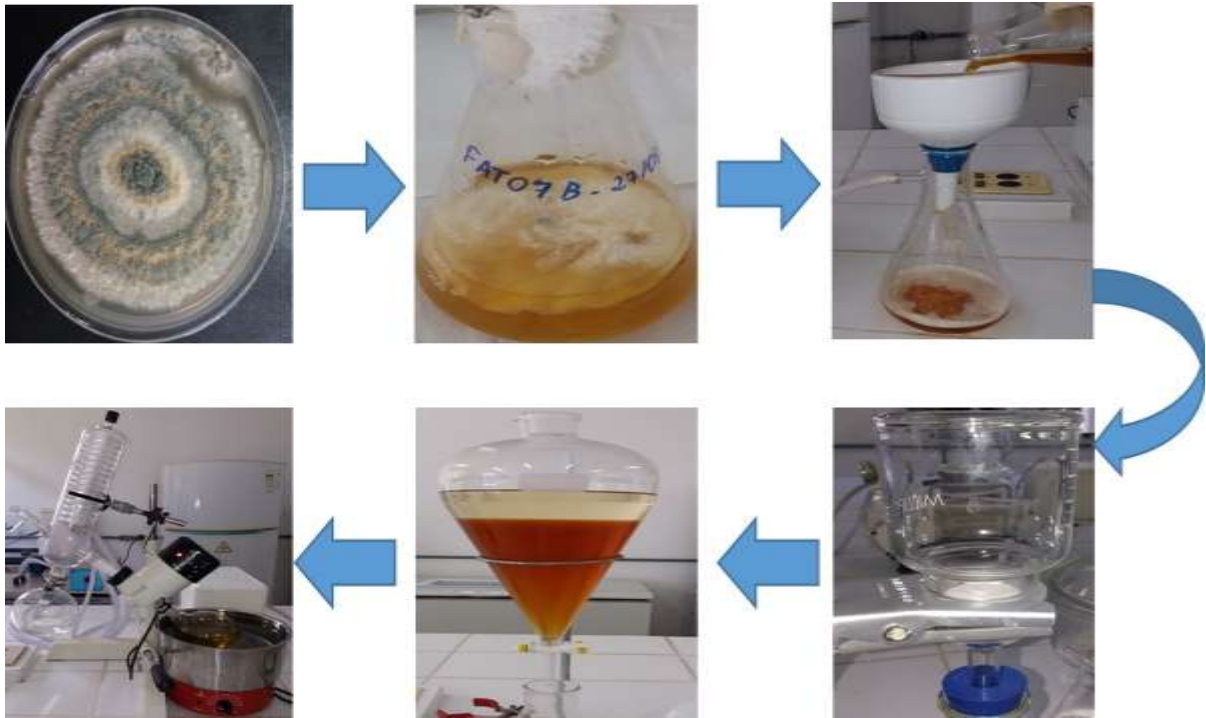
Fonte: SILVA, Sarah Simões (2017).

### 4.2 Obtenção dos extratos brutos

Inicialmente foi realizada a inoculação de cada fungo selecionado para placa de petri com meio PDA (Potato Dextrose Agar). Posteriormente, cada fungo foi repicado e transferido para outra placa. Após crescimento micelial, cada fungo foi repicado em 5 fragmentos com dimensão de aproximadamente 1cm x 1cm e transferidos para Erlenmeyers contendo 300 mL de meio de cultivo líquido PDB (Potato Dextrose Broth) e mantido à temperatura controlada a 28°C por 28 dias, totalizando 35 Erlenmeyers para cada fungo selecionado. Somente o fungo FAT46 foi fermentado em apenas 21 dias, visto que cresceu rapidamente, apresentando grande quantidade de micélio. Ao término da fermentação, o meio foi filtrado 2 vezes em funil de

Büchner e papel filtro para remoção do micélio visível. Para remover possíveis micélios remanescentes, o caldo foi filtrado no filtro milipore® e submetido a partição líquido/líquido com acetato de etila, que foi evaporado em evaporador rotatório (marca Fisatam), fornecendo os extratos brutos (FIGURA 3).

Figura 3 - Processo de obtenção do extrato bruto



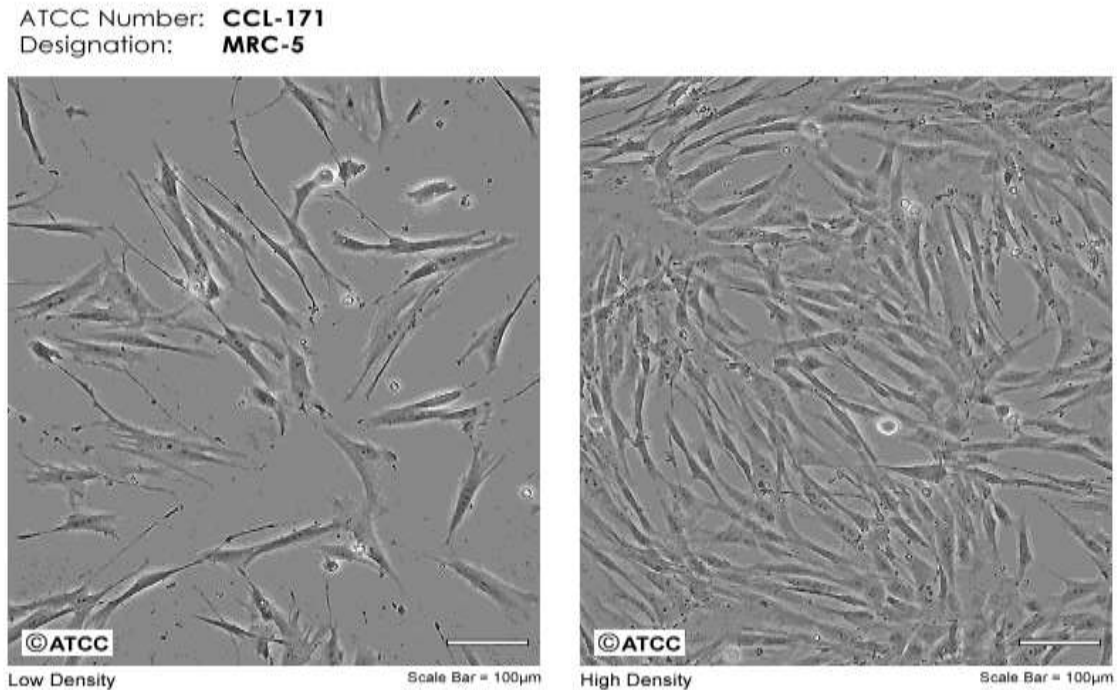
Fonte: O autor (2018).

Os seis extratos brutos obtidos foram submetidos a ensaios preliminares *in vitro* com células de pulmão humano linhagem MRC-5 para avaliar a citotoxicidade e a produção de EROS de cada extrato, assim fornecendo uma varredura dos extratos com maior dano à célula para prosseguir para o teste larvicida.

#### 4.3 Ensaios *in vitro* com células MRC-5

Nos experimentos *in vitro* com células MRC-5 foram utilizadas células de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5) (FIGURA 4) adquiridos a partir da American Type Culture Collection®, EUA – ATCC. Estas células foram mantidas em estufa bacteriológica à 37° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em DMEM - MRC5, suplementados com 10% soro fetal bovino - SFB (GIBCONN by life tecnologia), acrescentado de 50 U.mL<sup>-1</sup> de penicilina e 50 U.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina (GIBCONN by life tecnologia) sendo cultivadas no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM sob a supervisão do Prof<sup>o</sup> Dr Emerson Silva Lima e da doutoranda Márcia de Jesus Amazonas da Silva.

Figura 4- Foto ilustrativa obtida da ATCC de linhagens celulares de fibroblastos de pulmão humano (MRC5)



Fonte: American Type Culture Collection ® (2019).

#### 4.3.1 Citotoxicidade - Método Alamar blue

O teste do Alamar Blue foi realizado conforme metodologia descrita por Ahmed e colaboradores (1994) com o intuito de analisar a viabilidade celular das células da linhagem MRC-5 na presença de concentração única de  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  das substâncias testadas. As células foram cultivadas em garrafa de cultura com meio DMEM alta glicose completo, e para o teste transferidas para placas de 96 poços em concentração celular de  $0,5 \times 10^4$  células/poço (TPP, Suíça). A placa foi então mantida em cultura nos tempos de 24, 48 e 72h em incubadora de  $\text{CO}_2$  (Modelo 4111 – Thermo Scientific – SOTELAB) a  $37^\circ\text{C}$  com atmosfera de 5 % de  $\text{CO}_2$ . Após decorrido os tempos supramencionados, foram adicionadas as amostras (extratos FAT07, FAT46, FAT49, FAT50, CAT20 e Ph) na concentração única de  $50\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  e a placa permaneceu em cultura por 24 h nas mesmas condições. O grupo controle negativo recebeu no poço somente meio de cultura, e como controle positivo de fármaco padrão de morte foi utilizado Doxorrubicina na concentração de  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Decorrido os tempos de 24, 48 e 72h de tratamento, foi acrescentado  $10 \mu\text{L}$  da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque 0,4% -1:20 em meio de cultura sem soro fetal bovino) em cada poço da placa. Após 3 h de metabolização de exposição ao Alamar Blue, retirando da estufa 30 min antes do término, a fluorescência foi medida usando-se um leitor de microplaca Elisa (DTX-800 Beckman

Coulter). Os dados foram analisados em relação ao controle utilizando o Programa de estatística GraphPad Prisma versão 5.0. O cálculo foi realizado conforme fórmula abaixo.

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{F_t \times 100}{\Delta F_b}$$

Onde:

$F_t$  = (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina)

$\Delta F_b$  = (fluorescência da célula + meio + resazurina)

Os resultados de porcentagem de viabilidade celular acima de 90% foram considerados aceitáveis para substâncias não citotóxicas.

Os valores de CI50 (concentração inibitória de 50% das células) foram calculados em programa de estatística GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Após realizar o teste de citotoxicidade pelo método Alamar Blue foi realizado também o teste de produção de EROS dos 6 extratos brutos produzidos, a fim de avaliar se o mecanismo de morte dessas células quando submetidas aos extratos, foram por dano oxidativo.

4.3.2 Determinação de níveis de EROS usando DCFH-DA (2',7'-diclorohidrofluoresceínadiacetato).

A determinação de níveis de EROS pela DCFH-DA para os 6 extratos (FAT07, FAT46, FAT49, FAT50, CAT20 e Ph) foi realizada conforme metodologia descrita por Eruslanov e Kusmartsev (2010). As células MRC-5 ( $7 \times 10^4$  cel/poço) placa 24 poços foram tratadas com o extrato ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  –  $100 \mu\text{L}$ ) + AAPH ( $17 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), peróxido de hidrogênio ( $17 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e paclitaxel® ( $256 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) durante 3 h. Em seguida, as células foram recolhidas, lavadas com solução salina e resuspensas em tubos falcon 5 mL com PBS contendo  $5 \mu\text{M}$  de DCFH-DA nos tempos de 30 min, 1 h e 3 h. Finalmente, as células foram lavadas com soro fisiológico, transferida para uma placa fotossensível e a fluorescência celular foi determinada a 570 nm pelo leitor de microplaca Elisa (DX800 multimode detector - Beckman Coulter).

Após os testes de citotoxicidade e EROS com os 6 extratos brutos, foram selecionados apenas os extratos com maior redução de viabilidade celular e maior produção de EROS para realizar o teste larvicida.

#### 4.4 Ensaio Larvicida

Os testes larvicidas foram realizados no Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) sob a supervisão do Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei empregando-se larvas de *Ae. aegypti*.

A atividade larvicida foi avaliada por meio de bioensaios por duas modalidades sequenciais: seletivo, cujo objetivo é detectar se o extrato possui atividade sendo um teste qualitativo e de dose para determinar a  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  sendo um teste quantitativo. Os bioensaios descritos são adaptações dos bioensaios descritos por Dulmage et al. (1990) e pela OMS (2005; 2014) no Guia para Testes Larvicidas de Laboratório e Campo.

#### 4.4.1 Bioensaio seletivo

Para cada bioensaio com os extratos fúngicos, foram utilizados cinco copos descartáveis com capacidade de 50 mL que continham 9,800  $\mu$ L de água. Foram introduzidas em cada copo, 10 larvas de 3º ínstar do vetor oriundas do insetário mantido pelo Laboratório de Malária e Dengue/INPA. Em seguida, foram pipetados separadamente em cada copo 100  $\mu$ L de cada extrato nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 ppm dos extratos diluídos em DMSO e mais 100  $\mu$ L do alimento larval triturado (ração de camundongo e ração peixe que foram previamente homogeneizados em água). Cada bioensaio foi realizado em triplicata contendo três réplicas e um controle negativo contendo: contendo água + 1 mL de DMSO + larvas + ração ( $n = 180$  larvas para cada bioensaio,  $n_{total} = 540$  larvas). As leituras dos bioensaios foram feitas em 24,48 h e 72 h a partir do contato das concentrações com as larvas. Foram consideradas mortas as larvas que não responderam a estímulos artificiais. Após os bioensaios seletivos, foi realizado o bioensaio de dose com o extrato que apresentou atividade larvicida.

#### 4.4.2 Bioensaio de dose

Os bioensaios de dose-resposta também seguiram as adaptações do protocolo da OMS (2005). As cinco concentrações que foram utilizadas neste estudo foram desenvolvidas a partir da menor concentração que causou pelo menos 50% de mortalidade das larvas nos bioensaios seletivos. Os volumes da água de poço dentro dos copos (200 mL) foram ajustados para 100 mL.

O bioensaio larvicida com o extrato FAT07 foi realizado em quintuplicada contendo cinco réplicas e controle ( $n_{total} = 1750$  larvas terceiro ínstar) que foram realizados sempre em dias diferentes, alternando entre manhã e tarde ocorrendo assim, o delineamento experimental totalmente casualizado.

#### 4.4.3 Análise estatística

Para determinação dos valores de  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  foi utilizado o Probit Polo-PC versão 1.0, LeOra Software.

Após realizar o teste estatístico de significância (teste T) e teste paramétrico (Chi-square) e saber as concentrações letais do extrato responsável em causar 50% e 90% de mortalidade em larvas de *Ae. aegypti*, as larvas foram submetidas a estas concentrações novamente, a fim de avaliar a veracidade das doses letais fornecidas pelo programa. Posteriormente, foram coletadas e realizados os testes de dano oxidativo à proteínas e lipídios.

#### 4.5 Quantificação de dano oxidativo em larvas de *Ae. aegypti*

O teste para dano oxidativo a lipídios e proteínas foi realizado com as larvas submetidas ao teste larvicida nas concentrações letais de 50 e 90% do extrato FAT07. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Atividade Biológica (BIOPHAR) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM sob a supervisão do Profº Dr Emerson Silva Lima e o doutorando Leonard Domingo Rosales.

A metodologia utilizada para a realização deste ensaio, foi desenvolvida a partir de (LOWRY, 1951; OHKAWA et al., 1979; LEVINE et al., 1990; SOFIC et al., 2006; SOUZA, 2012).

Os testes estatísticos foram realizados no programa GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). E todos os experimentos foram realizados em triplicata.

##### 4.5.1 Homogeneização de larvas

As larvas de *Ae. aegypti* submetidas ao teste larvicida nas doses letais 50% e 90% foram maceradas a frio em cadinho e pistilo com tampão fosfato- pH 7.3, 75 mM (para cada 1g de larvas – 10 mL de tampão fosfato). O homogenato foi centrifugado a 15,000 rpm por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação do dano oxidativo a proteínas e lipídios (SOFIC et al., 2006).

##### 4.5.2 Dano oxidativo a lipídios

O dano oxidativo lipídico foi mensurado usando uma adaptação da técnica descrita originalmente por Ohkawa et al. (1979), onde o Malondialdeído (MDA), um dialdeído formado como produto secundário da oxidação de lipídios, encontrado nas amostras pode ser medido através da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), para estimar a intensidade da peroxidação lipídica através da formação de um cromógeno de cor rosa, pois em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), o MDA reage eficientemente com o TBA para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível (LIMA et al., 2001). Para que esta análise fosse possível, primeiramente, adicionou-se ao tubo de ensaio 1,5 mL de um complexo



de reação composto de TBA 0,1%, ácido clorídrico 0,25N e TCA a 10 %, 200  $\mu$ L de homogenato de larvas nas concentrações letais de 50 e 90% e em seguida agitados em vórtex. Logo após a agitação, a amostra foi tampada com bolas de gude para impedir a evaporação dos reagentes e incubada a 100°C por 45 min (SOUZA, 2012). Ao final da incubação, a amostra foi centrifugada a 3500 rpm por 20 min a 4°C e, em seguida, procedeu-se a leitura do sobrenadante em absorbância de 535 nm em espectrofotômetro (T70 UV/VIS PG Instruments Ltda). Os níveis de MDA total da amostra foram calculados através da razão entre a absorbância da amostra e uma solução padrão de MDA (1,1,3,3-tetrahidroxipropano), multiplicada pela concentração da solução padrão (curva de concentração). Os resultados foram expressos em  $\mu$  mol/L.

O cálculo foi realizado conforme fórmula abaixo e esses valores aplicados no programa GraphPad Prisma versão 6.0.

$$\text{Nível de MDA total na amostra} = 221,14 \times \text{Abs da amostra} - 0,5128$$

#### 4.5.3 Dano oxidativo a proteínas

O teste de dano oxidativo de proteínas foi realizado de acordo com uma adaptação na metodologia descrita por inicialmente por Levine et al. (1990) e Lowry (1951), onde o dano oxidativo a proteínas foi medido por quantificação dos grupos carbonilo com base na reação com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) preparado em HCl 2,5 M (LEVINE et al., 1990). Para o controle, 1 mL de HCl 2,5 M foi adicionado a 250  $\mu$ L do homogenato de larvas nas concentrações letais de 50 e 90%. Para o teste, adicionou-se 1mL de DNPH a 250  $\mu$ L do homogenato. Os tubos foram incubados por 1 h protegidos da luz à temperatura ambiente, em seguida foram agitados intermitentemente por 15 min. Adicionou-se 1,25 mL de TCA 20% (peso/volume) e submeteu-se a banho de gelo por 10 min. Os tubos foram centrifugados a 3500 rpm por 20 min até obter um pellet. O sobrenadante foi descartado e submetido a uma segunda lavagem com TCA 10% como descrito acima. Finalmente o precipitado foi lavado 3 vezes com 1 mL de etanol:acetato de etila (1:1, v/v) a fim de remover o DNPH e lipídios remanescentes. O pellet de proteína final foi dissolvido em 500  $\mu$ L de hidrocloreto de guanidina 6M e incubado a 37°C por 10 min. Os materiais insolúveis foram removidos por centrifugação, o sobrenadante foi lido em espectrofotômetro (T70 UV/VIS PG Instruments Ltda) a 370 nm e os resultados foram expressos como nmol de teor carbonila, usando o coeficiente de absorção (370 nm) de 22,000  $M^{-1}cm^{-1}$ . O teor de proteína foi determinado pelo método de Lowry usando BSA como padrão (LOWRY, 1951).

O cálculo foi realizado conforme fórmula abaixo e esses valores aplicados no programa GraphPad Prisma versão 6.0.

$$\text{Teor de carbonila (M)} = \text{Abs da amostra} \times 22,000 \text{ M}$$

$$\text{Dosagem de proteína (mg)} = 0,0144 \times \text{Abs da amostra} + 0,178$$

$$\frac{\text{Teor de carbonila (nmol)}}{\text{mg proteína}}$$

#### 4.6 Atividade Biológica para *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Devido a uma parceria formada, foi realizado adicionalmente o ensaio para atividade contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc), bactéria causadora do cancro cítrico em plantas. Os ensaios foram realizados no Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Unesp- Campus Rio Claro, sob a orientação do Prof. Dr. Henrique Ferreira.

##### 4.6.1 Cultivo Bacteriano

Para o ensaio de susceptibilidade (item 4.6.2) foram empregadas a cepa 306 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SILVA et al., 2002; SCHAAD et al., 2006). As células bacterianas foram cultivadas a 30 °C, 200 rpm em meio ágar NYG (peptona 5 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 3 g.L<sup>-1</sup> e glicerol 20 g.L<sup>-1</sup>).

##### 4.6.2 Ensaio de susceptibilidade

A potência antibacteriana do extrato bruto FAT07 foi avaliada pelo ensaio de microdiluição em caldo com revelação fluorimétrica com resazurina, *Resazurin Microtiter Assay* (REMA) (SILVA et al., 2002). Uma solução estoque (10 mg.mL<sup>-1</sup>) do extrato liofilizado foi preparado em 100 % de DMSO. Diluições seriadas da solução estoque foram adicionadas em placa de 96 poços contendo meio NYG, conduzindo a concentrações finais de 100, 50, 25, 12,5, 6,2, 3,1 e 1,6 µM. O inóculo foi preparado pela dispersão das células bacterianas 1 x 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Uma alíquota de 10 µL da suspensão celular foi distribuída nos poços, conduzindo a um inóculo final de 1 x 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. O meio de cultivo contendo as células bacterianas em NYG foi utilizado como controle negativo. Canamicina (15,6 µg. mL<sup>-1</sup>) e DMSO (1%) foram utilizados como controles positivo e veículo, respectivamente. As placas de 96 poços foram incubadas a 30 °C por 4 h. Após esse período, uma alíquota de 15 µL de uma solução 0,01 de resazurina foi adicionada em cada poço, sendo a mistura reacional incubada a 30 °C por 2 h.

Células viáveis são capazes de reduzir a resazurina (cor azul) a resorufina (cor rósea), produto que foi medido por fluorescência com excitação e emissão a 530 e 590 nm, respectivamente. Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato e canamicina foram determinados como a concentração capaz de reduzir em 90% a viabilidade celular (CIM<sub>90</sub>) e a concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular (CIM<sub>50</sub>), sendo expressos em  $\mu\text{M}$ .

Para investigar a atividade bactericida do extrato, uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de suspensão celular de cada poço, após revelação com resazurina, foi adicionada em uma placa de meio ágar NYG e incubadas por 48 h. Após incubação, o crescimento de colônias foi observado, determinando a Concentração Bactericida Mínima (CBM), expressa em  $\mu\text{M}$  (SILVA et al., 2013).

#### **4.7 Fracionamento do extrato bruto**

O isolamento e purificação das substâncias presentes no extrato FAT07 foram realizados no Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (UNESP- Campus São José do Rio Preto), sob a orientação do Prof. Dr. Luis Octavio Regasini.

O fracionamento do extrato FAT07 foi realizado utilizando 920 mg de extrato bruto, diluído em pequena quantidade de DMSO, que foi separado por método cromatográfico de exclusão molecular (LH-20, Sephadex®- Sigma-Aldrich), em coluna cromatográfica com 155 cm de altura de Sephadex® e volume morto de 1,095 L de etanol como fase móvel.

Também foi realizada a separação de 1 g de extrato bruto (FAT07) por cromatografia em fase normal (gel de sílica), em coluna contendo 18 cm de gel de sílica e volume morto calculado em 353, 25 mL. Para ser aplicado na coluna, o extrato foi solubilizado em Acetato de Etila e misturado junto a Celite 545 P.A (Synth®). O extrato bruto foi fracionado por gradiente de polaridade utilizando dois solventes: hexano e acetato de etila, na proporção 5:5; 3:7; 2:8.

Para verificar o perfil de cada fração obtida foram realizadas análises em CCD utilizando os solventes hexano/acetato de etila na proporção 5:5, de acordo com o teste de fase. Utilizou-se placas comerciais de sílica gel 60 em fase normal (marca Macherey-Nagel: DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV<sub>254</sub>) e as revelações foram obtidas por irradiação ultravioleta (254 e 365 nm) e revelador anisaldeído sulfúrico. Os perfis semelhantes visualizados com os reveladores tiveram suas frações reunidas. As frações puras foram submetidas a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas.

#### **4.8 Análises por Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas**

As análises por Ressonância Magnética Nuclear foram realizadas no Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular – Unesp, campus São José do Rio Preto, pelo técnico

Fábio Rogério de Moraes. As frações puras (F-03, F-05 e F-07) (20 mg de cada amostra foram diluídas em 500 µL de solvente deuterado (DMSO-d<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub> e DMSO-d<sub>6</sub>, respectivamente) em tubos de RMN de 5 mm) e foram analisadas em RMN da marca Bruker Bruker Avance III 14,095 T (600 MHz), incluindo RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C, *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* (DEPT 135°), *Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy* (1H–<sup>13</sup>C HSQC), *Heteronuclear Multiple Bond Coherence* (1H–<sup>13</sup>C HMBC), *Correlation Spectroscopy* (1H–1H COSY) e Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY). Nesses experimentos não foi utilizado TMS, portanto os picos de referência eram dos próprios solventes empregados nas análises. O software TopSpin 4.0.8 (Bruker ®) foi utilizado para a aquisição dos dados e no processamento dos dados espectrométricos.

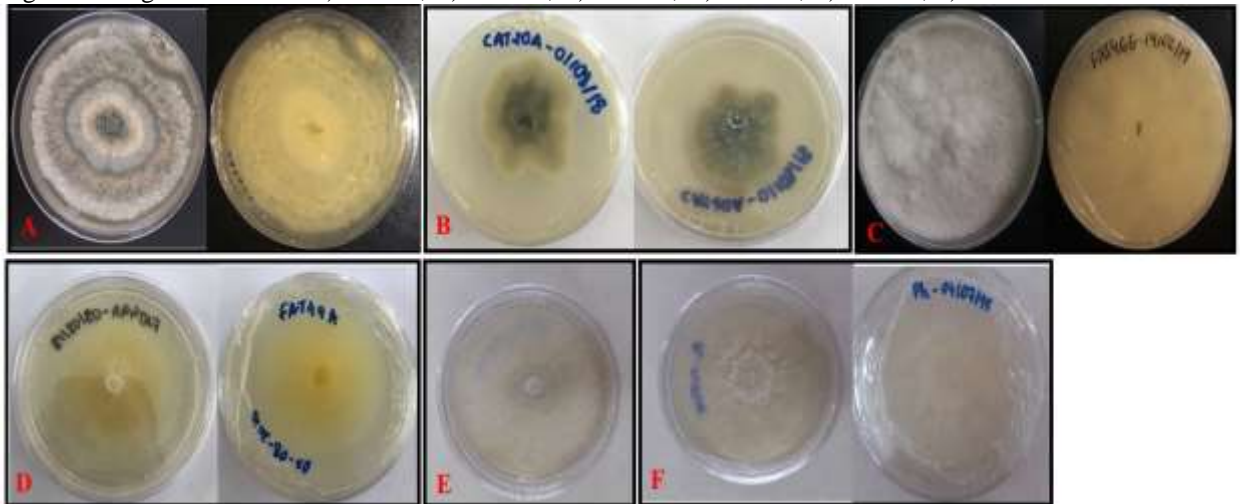
A espectrometria de massas das frações puras (1,0 mg) foi realizada no Instituto de Química- Unesp Araraquara-SP pelo químico João Luiz Bronzel Junior. O equipamento utilizado foi um Espectrômetro de Massas de alta resolução Bruker Maxis Impact. A faixa de aquisição foi de *m/z* 50-1500. O software Data Analysis Schorcut 4.2 (Bruker Baltonik®) foi utilizado para a aquisição dos dados e no processamento dos dados espectrométricos. As condições de análise foram: End Plate: -500 Volts; Capilaridade: 4500 Volts; Temp. do Gás: 180 °C; Fluxo de Gás: 4 L.min<sup>-1</sup>; Pressão de Gás Neb: 0,3 Bar; Gás: N.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção, identificação da cepa e preparo de extrato bruto

Os 104 fungos endofíticos isolados e preservados da planta *Passovia stelis* pela aluna Sarah Simões da Silva passaram por processo de reativação, onde todos foram inoculados em meio PDA para verificar o crescimento. Destes, apenas seis fungos cresceram no meio selecionado e foram utilizados para a obtenção dos extratos, dentre eles: FAT07 (pertencente ao gênero *Xylaria* sp.), CAT20(S/I), FAT46(*Colletotrichum* sp.), FAT49(*Colletotrichum* sp), FAT50(S/I) e Ph(*Phomopsis* sp.), respectivamente representados nas Figura 5.

Figura 5-Fungos reativados. A) FAT07; B) CAT20; C) FAT46; D) FAT49; E) FAT50; F) Ph



Fonte: O autor (2019).

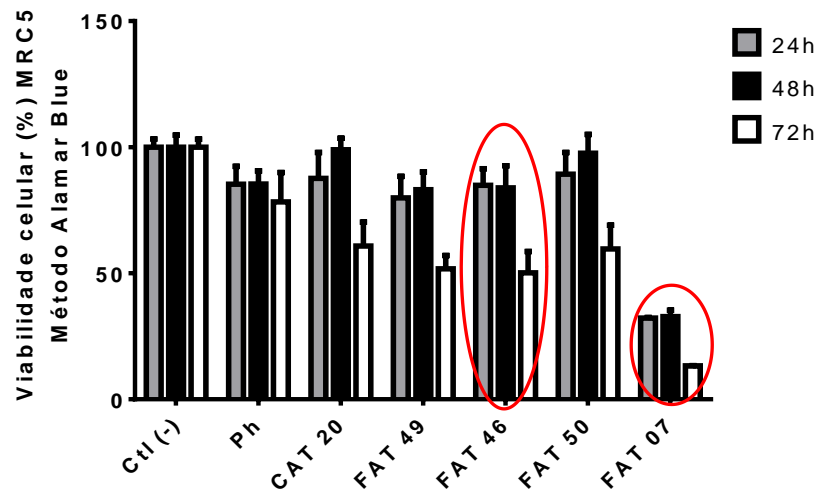
O rendimento dos extratos foram: FAT07(2600 mg), CAT20(390,2 mg), FAT46(1500 mg), FAT49(326,4 mg), FAT50(489 mg) e Ph(470 mg).

## 5.2 Teste *in vitro* em células: citotoxicidade e EROS

O método adotado para avaliar a citotoxicidade foi do Alamar Blue, que é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Em células com proliferação o Alamar Blue é reduzido. A forma oxidada é azul e não-fluorescente (indicando célula não viável) e a forma reduzida é rósea e fluorescente (indicando célula viável).

Os extratos Ph, CAT 20, FAT 49, FAT 46, FAT 50 não apresentaram citotoxicidade na concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , após 24 e 48h, assim, não foram capazes de inibir 50% das células. O extrato FAT 07 foi citotóxico em concentração inferior a  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (FIGURA 6) e foi capaz de inibir mais de 50% das células, quando comparado ao fármaco padrão de morte celular Doxorrubicina®, testado na concentração de  $0.20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Figura 6- Gráfico de barras referente ao percentual de viabilidade celular dos extratos Ph (fungo do gênero *Phomopsis* sp.), CAT20 (fungo sem identificação isolado do caule de *P. stelis*), FAT49 (fungo do gênero *Colletotrichum* sp. isolado das folhas de *P. stelis*), FAT46 (fungo do gênero *Colletotrichum* sp. isolado das folhas de *P. stelis*), FAT50 (fungo sem identificação isolado das folhas de *P. stelis*) e FAT07 (fungo do gênero *Xylaria* sp. isolado das folhas de *P. stelis*), em fibroblastos de pulmão humano, linhagem MRC-5, após 24, 48 e 72 h de exposição. Os dados estão representados como CI50 ( $p < 0,05$ )



Fonte: GraphPad Prisma versão 5.0.

Dos seis extratos fúngicos usados para estes testes, apenas um (FAT07) exibiu valores menores de viabilidade celular concomitante com produção de espécies reativas de oxigênio, como pode ser observado na Figura 6 e Figura 7, sendo este selecionado e testado frente as larvas de *Ae. aegypti*. No entanto, para se tirar a dúvida se a citotoxicidade interferia na atividade larvicida, o extrato FAT46 também foi selecionado para teste larvicida. Dessa forma, os extratos selecionados no teste *in vitro* foram FAT07 e FAT46. O extrato FAT07 foi selecionado pelo fato de que as células MRC-5 quando submetidas a este extrato apresentaram menor viabilidade celular (32%) após os períodos de exposição de 72h, comparando com os valores de viabilidade dos demais extratos testados (FIGURA 6). O extrato FAT46 foi escolhido para servir de comparativo para o extrato FAT07 e confirmar se o teste de viabilidade celular influenciaria na atividade larvicida do extrato.

A hipótese adotada para selecionar o extrato foi a de que extratos que apresentam citotoxicidade frente às células normais (MRC-5) juntamente com a produção de EROS, apresentariam melhor atividade larvicida, pois se causam danos às células provavelmente também causariam danos às larvas. Isso foi confirmado no caso do extrato FAT46 (FIGURA 6), onde a viabilidade celular apresentada por este extrato foi acima de 80%, e nos testes frente as larvas de *Ae. aegypti* não apresentou atividade. O extrato FAT07, que havia apresentado

menor viabilidade celular, ou seja, maior citotoxicidade à célula MRC-5 apresentou uma atividade larvicida satisfatória.

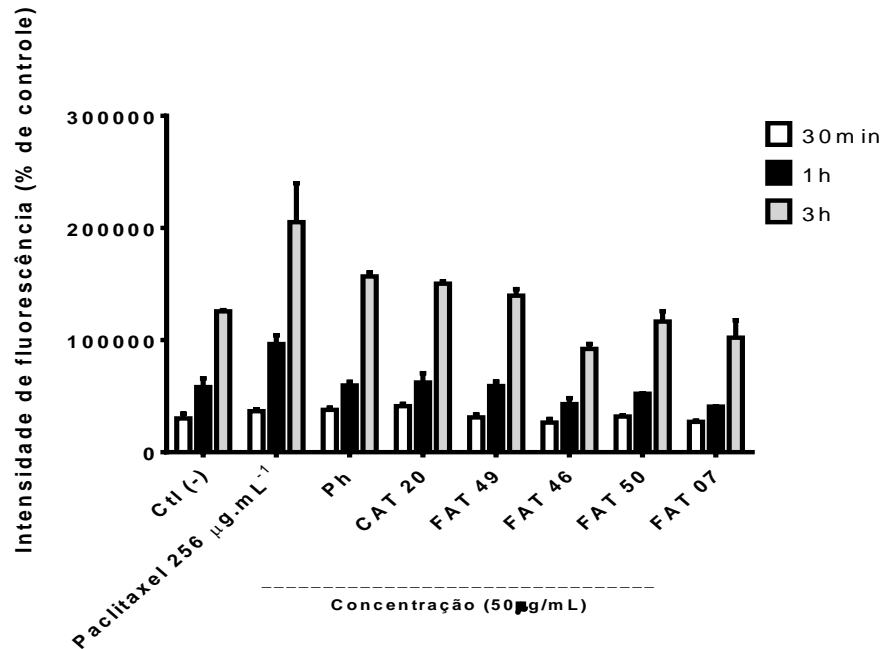
Abordagens semelhantes foram adotadas em estudos anteriores, com uma prévia avaliação de citotoxicidade *in vitro*, a fim de selecionar extratos com melhor atividade contra o parasita *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* (LIMA et al. , 2015). O que pode corroborar a estratégia utilizada nesse trabalho, visto que, também foram utilizados testes de citotoxicidade e produção de EROS *in vitro* a fim de selecionar extratos para o teste biológico.

A partir dos resultados obtidos de EROS (FIGURA 7), constatou-se que todos os extratos testados produzem espécies reativas de oxigênio com bom percentual comparado ao Paclitaxel® (fármaco padrão gerador de dano oxidativo). Observou-se que nos primeiros 30 min de exposição os extratos tiveram o mesmo resultado médio de produção de EROS que o Paclitaxel®  $256 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , enquanto que nos tempos de 1h e 3 h de exposição houve uma maior produção de EROS pelo Paclitaxel® do que nos demais extratos, possivelmente devido a este fármaco ser uma substância isolada, enquanto que os extratos ainda se encontram em sua forma bruta.

Observou-se ainda que nos tempos iniciais (30 min e 1h), houve uma menor produção de EROS tanto pelos extratos como pelo fármaco padrão, e no tempo de 3h teve um aumento significativo de produção de EROS. Isso pode ter acontecido pelo fato de que as enzimas antioxidantes são produzidas nos tempos iniciais pós-exposição a agentes oxidantes, mas com o passar do tempo, uma vez que não são mais produzidas estas enzimas, ocorre uma diminuição de sua atividade, aumentando os níveis de EROS (ALMEIDA, 2016).

Sabendo que o Paclitaxel ®, fármaco usado como padrão de morte celular por dano oxidativo, que possui o nome comercial de Taxol®, foi obtido inicialmente da planta medicinal *Taxus brevifolia*. O primeiro fungo descoberto como produtor desse composto foi *Taxomyces andreanae*, um endófito isolado da *Taxus brevifolia*, atualmente já foram descobertas novas espécies sintetizadoras dessa substância (CALDERANI; ORLANDELLI; PAMPHILE, 2016). Dessa forma, evidencia-se a atividade de fungos endofíticos na produção de espécies reativas de oxigênio.

Figura 7- Gráfico de barras referente ao percentual de produção de EROS pelos extratos Ph (fungo do gênero *Phomopsis* sp.), CAT20 (fungo sem identificação isolado do caule de *P. stelis*), FAT49 (fungo do gênero *Colletotrichum* sp. isolado das folhas de *P. stelis*), FAT46 (fungo do gênero *Colletotrichum* sp. isolado das folhas de *P. stelis*), FAT50 (fungo sem identificação isolado das folhas de *P. stelis*) e FAT07 (fungo do gênero *Xylaria* sp. isolado das folhas de *P. stelis*), em fibroblastos de pulmão humano, linhagem MRC-5.



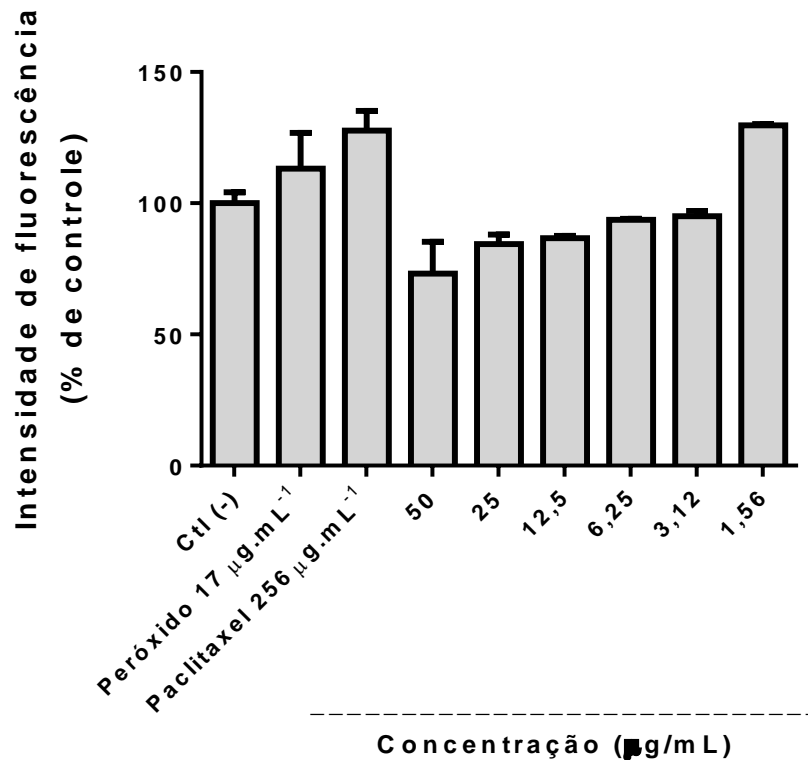
Fonte: GraphPad Prisma versão 5.0

Há muitos métodos para mensurar a produção de radicais livres nas células. As técnicas mais utilizadas são as de sondas fluorescentes e quimiluminescentes permeáveis às células, como por exemplo o diacetato de 2'-7'-diclorohidrofluoresceína (DCFH-DA) que é capaz de medir diretamente o estado redox de uma célula. Essa técnica tem diversas vantagens em relação a outras técnicas desenvolvidas, pois possui baixa complexidade, é extremamente sensível a alterações no estado redox de uma célula, possui baixo custo e pode ser usada para acompanhar as mudanças no EROS ao longo do tempo (ERUSLANOV; KUSMARTSEV,2010), por esse motivo foi escolhida esta técnica para mensurar a produção de radicais livres dos extratos brutos.

Como o extrato FAT07 foi citotóxico com concentração inferior a 50 µg.mL<sup>-1</sup> e também apresentou menor produção de EROS que os demais extratos, resolveu-se realizar a curva de concentração deste extrato para avaliar a produção de EROS nas demais concentrações (FIGURA 8). Analisando o gráfico, observou-se que o extrato apresentou uma melhor produção de EROS na concentração de 1,56 µg.mL<sup>-1</sup> do que nas outras concentrações. Na concentração de 1,56 µg.mL<sup>-1</sup> a produção de EROS não teve diferença significativa a 95% de confiança quando comparada ao Paclitaxel® e ao Peróxido de hidrogênio (p<0,0001), apresentando um valor igual a 129%, enquanto o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi igual 113% e o Paclitaxel® 127%.



Figura 8- Gráfico de barras referente à curva de concentração de produção de EROS do extrato FAT07 (fungo do gênero *Xylaria* sp. isolado das folhas de *P. stelis*) frente a fibroblastos de pulmão humano, linhagem MRC-5



Fonte: GraphPad Prisma versão 5.0.

### 5.3 Teste larvicida: bioensaio seletivo e de dose

Os resultados dos bioensaios seletivos com os extratos FAT 46 e FAT 07 frente a larvas de *Ae. aegypti* estão representados na Tabela 1. Dos 2 extratos testados seletivamente para detectar a citotoxicidade considerando mortalidade acima de 50%, somente o FAT07 mostrou atividade larvicida. Os resultados mostram 100% de mortalidade para o extrato FAT07 após 48 h de aplicação na concentração de 500 ppm.

Tabela 1-Resultados dos bioensaios seletivos com extratos FAT07 e FAT46 contra *Ae. aegypti*

Extratos	Concentração (ppm)	<i>Aedes aegypti</i> Mortalidade(%)		
		24 h	48h	72h
FAT 07	500	77	23	0
	250	3	10	23
	125	0	0	0
	62,5	0	0	0
	31,25	0	0	0
FAT46	500	13	20	6
	250	3	0	0
	125	3	3	3
	62,5	0	0	0
	31,25	0	0	0
Controle	DMSO	0	0	0

Fonte: O autor (2019).

Nota: Nos testes foram utilizadas 10 larvas por copo em triplicata; Controles: DMSO a 1 %.

No teste larvicida de dose para o extrato FAT07 frente as larvas de *Ae. aegypti* foi detectado atividade larvicida em 24 h de exposição nas concentrações 400, 375, 350 e 325 ppm (TABELA 2). Após 48 h de exposição apresentou também mortalidade satisfatória (superior a 50%) na concentração de 300 ppm, sendo que na concentração de 275 ppm a mortalidade foi inferior a 50%, não apresentando mortalidade considerável (TABELA 2). Em 72 h de exposição a concentração de 275 ppm também apresentou uma mortalidade satisfatória com percentual superior a 50% (TABELA 2). O grupo controle não apresentou mortalidade em todos os tempos de exposição (24 h, 48 h e 72h).

Tabela 2- Resultados dos bioensaios de dose com extratos FAT07 contra larvas de *Ae. aegypti* submetidas a diferentes concentrações

Extratos	Concentração (ppm)	N (amostral)	<i>Aedes aegypti</i> Mortalidade(%)		
			24h	48h	72h
FAT 07	400	100	91	5	0
	375	100	80	9	2
	350	100	69	17	0
	325	100	61	13	3
	300	100	49	25	2
	275	100	35	13	7
Controle	DMSO	100	0	0	0

Fonte: O autor (2019).

Nota: Os testes foram realizados em quintuplicata com 10 larvas por copo; Controles: DMSO a 1 %.

Considerando os valores de mortalidade nos intervalos de leitura de 24, 48 e 72 h, o tempo em que ocorreu maior mortalidade para o extrato FAT07, foi em 24 h nas concentrações de 325, 350, 375 e 400 ppm, apresentando percentuais de mortalidade respectivamente de 61%, 69%, 80% e 91% (TABELA 2), demonstrando assim atividade larvicida contra as larvas de *Ae. aegypti*.

Por conseguinte, ao realizar a análise de Probit no programa POLO PC® (LeOra Software Berkeley, CA), pode-se determinar o valor da CL<sub>50</sub> para o extrato FAT 07 igual a 264,456 ppm e o valor da CL<sub>90</sub> igual a 364,307 ppm, com um nível de significância de 95%. Estes resultados podem ser observados na Tabela 3.

O teste paramétrico ( $\chi^2$ ) demonstrou que não existe diferença significativa entre as duas doses (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>), pois as duas concentrações causam mortalidade nas larvas, ou seja, como esperado, na concentração referente a CL<sub>50</sub> causará 50% de mortalidade das larvas e na concentração referente a CL<sub>90</sub> causará 90% de mortalidade nas larvas.

Tabela 3- Valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> do extrato FAT07 contra larvas de *Ae. aegypti* após 72 h de aplicação

Extratos	Concentração (ppm) <sup>a</sup>	Mortalidade (%) ± SD <sup>b</sup>	CL <sub>50</sub> (ppm) (LCL-LCU) <sup>c</sup>	CL <sub>90</sub> (ppm) (LCL-LCU) <sup>d</sup>	Equação de regressão	χ <sup>2</sup> e
FAT07	400	96,7 ± 0,0				3,263 ns <sup>f</sup>
	375	93,3 ± 1,7				
	350	82,2 ± 2,3	264,456	364,307	y =	
	325	77,8 ± 2,3	(245,835-	(350,9-	-17.315+9.212x	
	300	76,7 ± 2,6	277,284)	384,617)		
	275	53,3 ± 4,6				
	0	0,0 ± 0,0				

Fonte: O autor (2019).

Nota: Não foi observado mortalidade no controle negativo (DMSO).

<sup>a</sup> Concentração em ppm.

<sup>b</sup> SD = Desvio padrão

<sup>c</sup> CL<sub>50</sub> = Concentração letal que mata 50% das larvas.

<sup>d</sup> CL<sub>90</sub> = Concentração letal que mata 90% das larvas.

LCL = limite inferior com 95% de confiança.

LCU = limite superior com 95% de confiança.

<sup>e</sup> χ<sup>2</sup> = Chi-square.

<sup>f</sup> n.s = não significativo (α = 0.05) (Significa que os dados se ajustam ao programa, não sendo necessário ajustes).

Diante desses resultados corrobora-se que o extrato FAT07 oriundo do fungo endofítico *Xylaria* sp. pode ser uma fonte alternativa de controle larvicida contra *Ae. aegypti*, visto que, a partir de estudos anteriores, os fungos endofíticos apresentam-se como potenciais produtores de produtos químicos bioativos (ZHAO et al., 2011), em especial o gênero *Xylaria*, que abrange várias espécies de fungos presentes nas plantas.

As espécies endofíticas de *Xylaria* produzem uma grande variedade de metabolitos com diferentes estruturas químicas, como citocalasinas, terpenóides, alcaloides, cumarinas e benzoquinonas; com várias atividades biológicas como fitotóxica, antifúngicos, antimaláricos e antibacterianos, entre outros (SANCHEZ-ORTIZ et al., 2016).

Um exemplo recente de extratos com atividade larvicida oriundos de fungo endofítico foi o isolamento de dibenzo- $\alpha$ -pironas do extrato de *Hyalodendriella* sp. Ponipodef12, um fungo endofítico de *Populus deltoides*, as quais foram testadas quanto à sua atividade larvicida contra larvas de quarto instar de *Ae. aegypti* e os compostos mostraram atividade com valores de CL<sub>50</sub> = 156,89  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (MAO et al., 2017). Além do isolamento de espirobisnftalenos do

fungo endofítico *Berkleasium* sp. Dzf12, que mostrou atividade larvicida contra o *Aedes albopictus* (MAO et al., 2014).

Bücker et al. (2013) ao realizar bioensaios *in vitro* para averiguar a atividade larvicida de extratos brutos do fungo endofítico *Pestalotiopsis virgulata* contra *Ae. aegypti* detectou uma melhor atividade larvicida dos extratos produzidos a base de acetato de etila, apresentando uma  $CL_{50} = 101,8$  ppm.

Outro relato recente é que os fungos endofíticos *Phomopsis liquidambaris* estirpe SA1 (SAAgNPs) que também mostrou uma inibição de 100% do crescimento larval contra larvas de segundo e quarto instar de *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* na concentração de 10 ppm (SEETHARAMAN et al., 2018).

Abutaha et al. (2015) avaliou extratos brutos do fúngico endofítico *Cochliobolus spicifer* isolado da tamareira (*P. dactilifera*), contra larvas de *Aedes caspius* Pallas e larvas de *Culex pipiens* Linnaeus, e através de testes histológicos, detectou mudanças no sistema digestivo das larvas de terceiro instar após ser submetidas aos extratos. Os dados mostraram também que *C. spicifer* interferiu no ciclo de desenvolvimento da larva, e teve seu efeito tóxico mais forte (com 100% de mortalidade) em concentrações de 300 ppm. E ao tratar as larvas de terceiro instar de *Ae. caspius* e *Culex Pipiens* com a substância isolada desse extrato, mostrou destruição celular e desorganização, espaçamento celular e vacuolização do epitélio células em pequenas regiões do intestino médio.

Diante desse estudo, se consolida a hipótese de que o extrato FAT07 é uma boa alternativa para o controle larvicida de *Ae. aegypti*, já que o extrato causou mortalidade de 90% das larvas nas concentrações entre 350,9 ppm e 384,617 ppm (TABELA 3), e mortalidade de 50% em concentrações entre 245,835 e 277,284 ppm, o que segundo as considerações de Bücker et al. (2013), extratos que apresentaram  $CL_{50}$  menor que 500 ppm em cada ensaio são considerados com atividade larvicida satisfatórias. E ao se isolar as substâncias presentes neste extrato, supõe-se que a dose necessária para o mesmo percentual de mortalidade das larvas será reduzida.

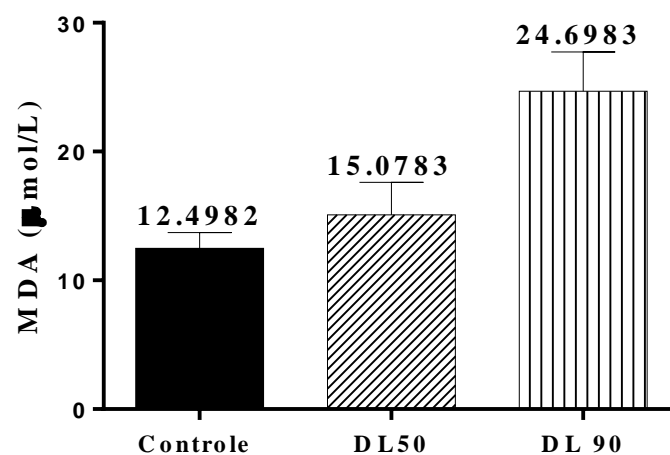
#### **5.4 Dano oxidativo em larvas de *Ae. aegypti* submetidas ao extrato FAT07 nas concentrações letais de 50% e 90%.**

Os resultados das análises de peroxidação lipídica são mostrados na Figura 9, em que apresentam elevados níveis de MDA nas larvas submetidas a  $CL_{90}$  em comparação com o controle (larvas maceradas não submetidas ao extrato), e esses valores podem estar ligados a efeitos citotóxicos do extrato como pela formação de radicais livres e espécies reativas de

oxigênio durante sua biotransformação, causando dano a membranas biológicas (MOROA et al., 2012), o que pode ser corroborado com os testes de citotoxicidade dos extratos em células MRC-5, onde o extrato FAT07 (o qual as larvas foram submetidas) apresentou citotoxicidade às células e menor viabilidade celular (FIGURA6), como também apresentou produção de espécies reativas de oxigênio (FIGURA 7). Na Figura 9, observa-se ainda que as larvas que correspondem ao controle, embora não terem sido submetidas ao extrato causador de dano oxidativo nas larvas, apresentaram níveis de MDA, e isto pode ser pelo fato de que as larvas foram maceradas vivas e passaram por um estresse até a morte, sendo que, todo processo de morte acarreta em um dano.

Esses resultados passaram por análise estatística, em que os níveis de MDA foi significativo ( $p < 0,0001$ ) na CL<sub>90</sub> (concentração letal responsável em matar 90% das larvas) em comparação com controle (larvas maceradas não submetidas ao extrato) com níveis de MDA quase duas vezes mais alto (24,7  $\mu\text{mol/L}$ ) em relação ao controle (12,5  $\mu\text{mol/L}$ ), enquanto que larvas submetidas a CL<sub>50</sub> (larvas submetidas a concentração letal responsável em matar 50% das larvas), não tiveram diferença significativa quando relacionadas ao controle, com um limite de confiança de 95%.

Figura 9- Gráfico de barras referente ao resultado da peroxidação lipídica das larvas submetidas a dose letal 50 (DL50), dose letal 90 (DL90) e larvas submetidas somente ao DMSO 1% (controle). Os dados foram expressos em níveis de MDA nas amostras



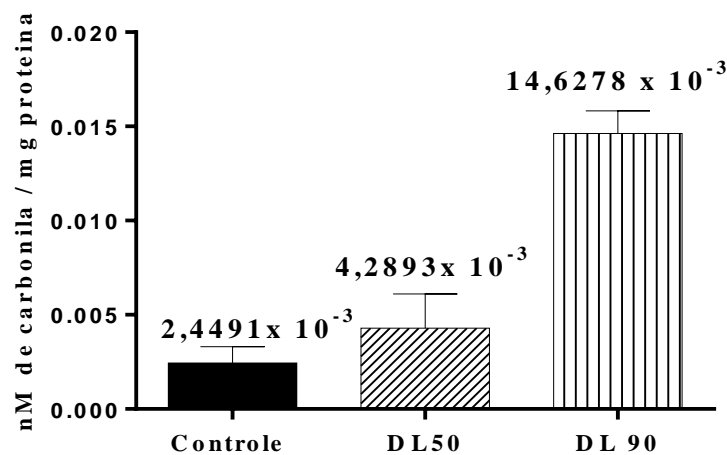
Fonte: GraphPad Prisma versão 5.0

A peroxidação lipídica constitui uma reação em cadeia dos ácidos gordos polinsaturados das membranas celulares, gerando radicais livres que alteram a permeabilidade, fluidez e integridade das mesmas. Apesar da geração de radicais livres constituir um processo contínuo e fisiológico, a produção excessiva pode conduzir a lesões oxidativas (BARBOSA et al., 2010).

Em relação à oxidação de proteínas (FIGURA 10), o teor de carbonila das larvas submetidas a CL<sub>90</sub> foi de  $14,6278 \times 10^{-3}$  nmol carbonila/ mg proteína, já das larvas submetidas a CL<sub>50</sub> foi de  $4,2893 \times 10^{-3}$  nmol carbonila/ mg proteína, enquanto que as larvas não submetidas ao extrato foi de  $2,4491 \times 10^{-3}$  nmol carbonila/ mg proteína. Estes dados indicam que houve dano nas proteínas das larvas submetidas a CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> do que as larvas não submetidas a nenhum extrato, sendo que o maior dano (produção de carbonila) foi em larvas submetidas a CL<sub>90</sub>(364,307 ppm), uma vez que, quando as proteínas passam por processo oxidativo, ocorre a formação de derivados de proteínas ou fragmentos de peptídeos contendo grupos carbonila (STADMAN; LEVINE, 2003), que indicam o dano celular (YOVANA, 2012).

Os resultados para dano oxidativo em proteínas também passaram por análise estatística, em os níveis de carbonila, assim como o dano lipídico, foram significativos ( $p < 0,0001$ ) nas larvas submetidas a CL<sub>90</sub> ( $14,6278 \times 10^{-3}$  nmol carbonila/ mg proteína) quando comparados ao controle ( $2,4491 \times 10^{-3}$  nmol carbonila/ mg proteína), e as larvas submetidas a CL<sub>50</sub> ( $4,2893 \times 10^{-3}$  nmol carbonila/ mg proteína) também apresentaram diferença significativa quando comparada ao controle ( $p < 0,0018$ ), com um limite de confiança de 95% (FIGURA 10).

Figura 10- Gráfico de barras referente ao resultado da peroxidação protéica das larvas submetidas a dose letal 50 (DL50), dose letal 90 (DL90) e larvas submetidas somente ao DMSO 1% (controle). Os dados foram expressos em nM de carbonila/mg de proteína.



Fonte: GraphPad Prisma versão 5.0.

Considerando que a presença de grupos carbonila nas proteínas reflete dano celular, o método usado para quantificar os grupos carbonila nas larvas de *Ae. aegypti* indica que houve uma reação direta das proteínas com as EROS (STADMAN; LEVINE, 2003).

Os resultados obtidos de dano a lipídios e proteínas das larvas quando submetidas a extrato de fungo endofítico, apesar de ainda não ter sido relatado na literatura, podem ser corroborados com o estudo de Ahmed(2012), que focou principalmente na peroxidação lipídica e oxidação protéica, como importantes biomarcadores de colapso celular após infecção por

microrganismo em larvas e mosquitos adultos de *Aedes caspius*. Neste estudo, larvas e mosquitos adultos de *Aedes caspius* infectados com Btk (*Bacillus thuringiensis kurstaki*) acarretaram na elevação de EROS, resultando em estresse oxidativo. E ainda segundo Ahmed (2012), esse estresse oxidativo juntamente com a citotoxicidade, levaram ao dano na membrana lipídica, disfunção mitocondrial, além de morte celular.

No estudo de Zhang et al. (2019), foi mostrado que uma substância com atividade larvicida ( $\alpha$ -terthienil) na concentração de  $0,27 \text{ mg.L}^{-1}$ , induziu um aumento nos níveis de EROS mitocondriais das larvas de *Ae. aegypti*. Este aumento de EROS levou a uma disfunção mitocondrial, danos a organelas e promoveu aceleração de morte celular das larvas submetidas a  $\alpha$ -terthienil.

Diante dos resultados e comparações com os estudos anteriores, supõe-se que as larvas ao serem submetidas ao extrato FAT07, morrem por peroxidação lipídica e oxidação a proteínas, com danos possíveis também à membrana celular, mitocôndrias e organelas. Todavia, para se afirmar com certeza que houveram danos nessas áreas será necessário realizar microscopia eletrônica.

### 5.5 Atividade Biológica para *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

O teste biológico com o extrato bruto FAT07 contra Xcc mostrou atividade de Concentração Inibitória Mínima de 50% (CIM<sub>50</sub>) de  $21,22 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ , Concentração Inibitória Mínima de 90% (CIM<sub>90</sub>) de  $9,58 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  e Concentração Bactericida Mínima (MBC) de 100%. Dados disponíveis na Tabela 4.

Tabela 4- Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM) ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Substância	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	MBC
Extrato FAT07	21,22	9,58	100
Controle positivo (Canamicina)	32	15,6	100

Fonte: O autor (2020).

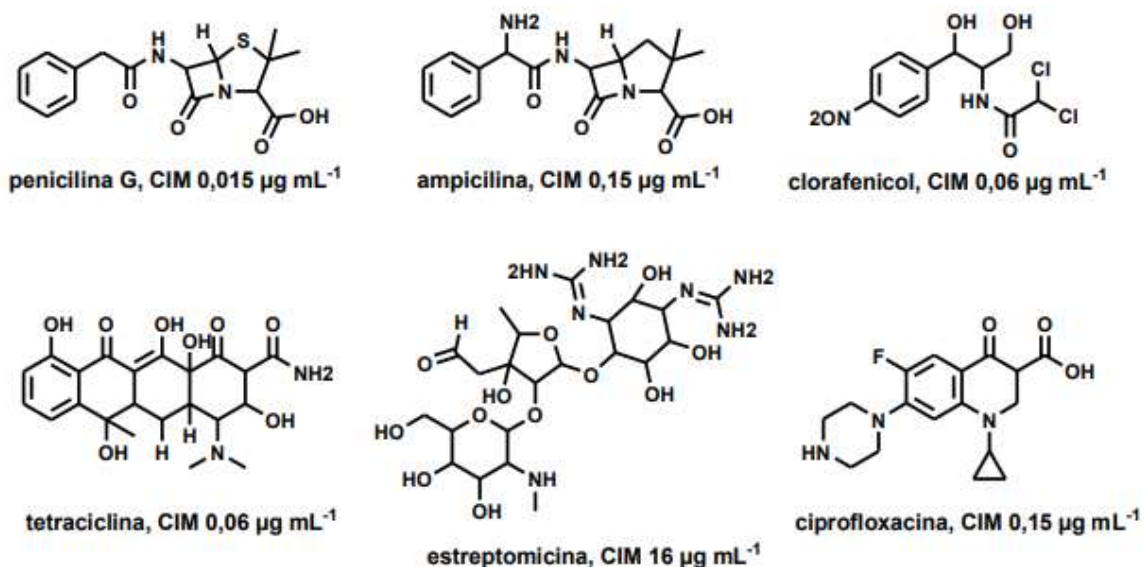
A atividade bactericida contra Xcc do fungo endofítico *Xylaria* sp. é algo novo, pois até o momento não houve relatos na literatura sobre a atividade bactericida de fungos do gênero *Xylaria* sp. contra essa bactéria. No entanto, os resultados de atividade bactericida do extrato, oriundo de fungos do gênero *Xylaria* sp. podem ser corroborados, pois já foram relatadas atividades antibacterianas contra uma bactéria gram-positiva, *Bacillus subtilis* (UPMC 1175) e duas bactérias gram-negativas, *Escherichia coli* (ATCC E266) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), com a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) variando de  $0,5$  a  $2 \text{ mg. mL}^{-1}$  (HAMZAH et al., 2018).

A bactéria Xcc corresponde a uma bactéria gram-negativa, responsável em causar doenças em várias espécies vegetais economicamente importantes como: arroz, frutas cítricas, mandioca, tomate, feijão, maracujá, cana-de-açúcar, banana (MARIN et al., 2019). A doença causa feridas amarronzadas acastanhadas, frequentemente cercadas por uma auréola amarela devido a uma redução geral da pigmentação em todas as partes da planta, incluindo as folhas e os frutos. Dessa forma, os frutos infectados perdem tanto a qualidade, devido à extensão das lesões, quanto a produtividade, devido à queda prematura dos frutos (CABREJOS et al., 2019).

Atualmente o controle dessa bactéria ocorre pelo uso de espécies ou variedades menos suscetíveis, eliminação de plantas afetadas ou adição de componentes químicos à base de cobre (hidróxido de cobre ou oxiclreto de cobre) (MARIN et al., 2019). No entanto, já foram relatadas casos de resistência bacteriana (BEHLAU et al., 2013; RICHARD et al., 2017) devido a exposição repetida e prolongada ao cobre. Além disso, altos níveis de cobre no solo podem reduzir a fertilidade e causar estresse em plantas (NAZARÉ, 2019).

Os antibióticos penicilina G, ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, estreptomicina e ciprofloxacina (FIGURA 11) foram avaliados contra Xcc, obtendo-se valores de concentração inibitória mínima (CIM) na faixa de 0,0015 a 16  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo a penicilina G a mais potente (GHOLAMI et al., 2018; NAZARÉ, 2019).

Figura 11- Antibióticos avaliados contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e seus valores de concentração inibitória mínima (CIM).



Fonte: Nazaré (2019).

Comparando o resultado de atividade inibitória do extrato de *Xylaria* sp. com a atividade inibitória do oxiclreto de cobre, na concentração de 35  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , obtido no estudo de Cavalca (2018), cujas concentrações inibitórias para 90% e 50% da população bacteriana foram



respectivamente de  $40\mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $30\mu\text{g.mL}^{-1}$  (CAVALCA, 2018), corrobora-se que o extrato possui atividade visivelmente maior que o do oxiclreto de cobre, uma vez que as concentrações inibitórias para 90% e 50% de Xcc foram respectivamente de  $9,58\mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $21,22\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Apresentando também poder antibacteriano maior, quando comparado ao do antibiótico estreptomicina utilizado para controle de Xcc (FIGURA14), que apresentou valor de CIM de  $16\mu\text{g.mL}^{-1}$  (GHOLAMI et al., 2018; NAZARÉ, 2019). Ao fazer a comparação do extrato FAT07 com o controle positivo (FIGURA 11) também pode-se confirmar que o extrato possuía uma atividade considerável.

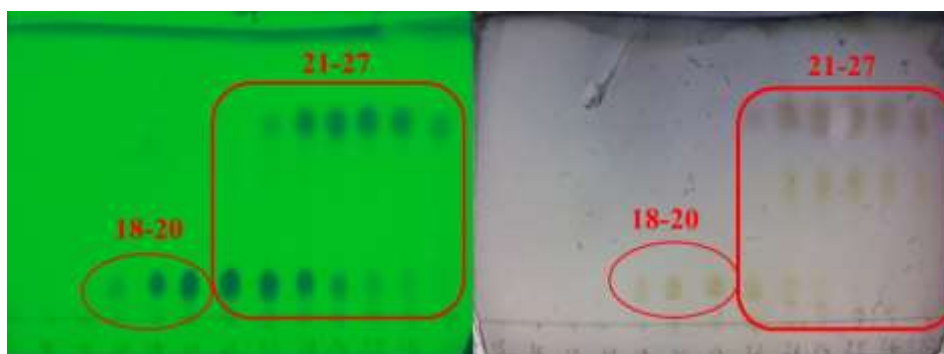
Para testar se o extrato tinha atividade bacteriostática ou bactericida, tentou-se propagar as células no ágar NYG após os tratamentos. Como resultado, não foi possível detectar o crescimento celular após o tratamento com o extrato nas concentrações contidas da Tabela 4, nas quais o REMA indicou 100% de inibição; portanto, conclui-se que o extrato do fungo *Xylaria* sp. eliminou a viabilidade bacteriana.

Dessa forma, a atividade obtida é de extrema relevância, já que as alternativas utilizadas atualmente estão sendo ineficientes para combater bactérias Xcc (MARIN et al., 2019). Assim, bactericidas de origem fúngica podem ser considerados uma alternativa promissora, e possuem muitas vantagens em termos de sustentabilidade, modo de ação e toxicidade em comparação com pesticidas químicos, uma vez que, se decompõem mais rapidamente no ambiente e geralmente são menos tóxicos (TANVIR; SAJID, 2014).

## 5.6 Fracionamento do extrato bruto

No processo de fracionamento por coluna Sephadex foram obtidas 31 frações de 25 mL (Fr-01 a Fr-31), das quais somente a fração 18-20 (F-01) se mostrou pura (FIGURA 12).

Figura 12- Demonstrativo de separação de substâncias presente no extrato bruto FAT07 e da purificação das frações 18-20 e frações 21-27



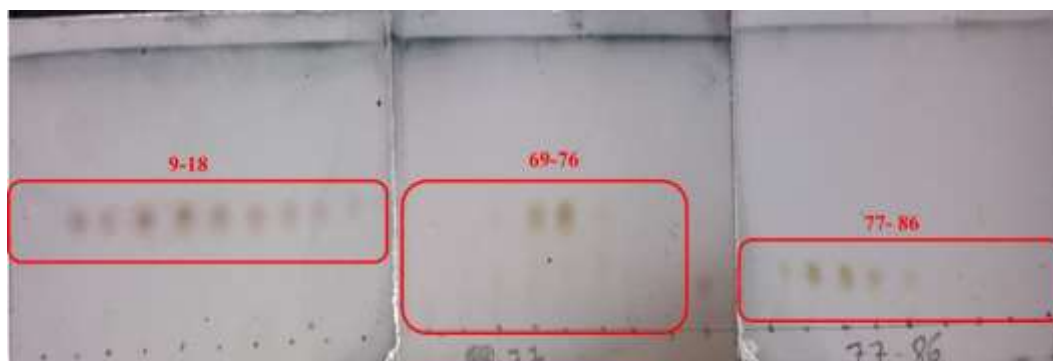
Fonte: O autor (2019).

No processo de fracionamento por coluna de sílica foram obtidas 86 frações de 25 mL, das quais foi possível obter três frações puras (Massas obtidas na TABELA 5): frações 9-18 (F-

03), 69-76 (F-05) e 77-86 (F-07), que foram submetidas a RMN e espectrometria de massas para identificação (FIGURA 13).

Devido ao fato das frações F-01 e F-07 terem apresentado perfil semelhante quando realizado a CCD (FIGURA 12 e FIGURA 13), foi realizado a análise de RMN apenas da fração F-07.

Figura 13- Frações obtidas a partir da purificação de 1g de extrato bruto FAT07 por Coluna Cromatográfica de Sílica



Fonte: O autor (2019).

Tabela 5-Massas das frações puras obtidas pelo fracionamento do extrato fúngico

Frações	Massas obtidas
F-01	212 mg
F-03	270 mg
F-05	212 mg
F-07	374 mg

Fonte: O autor (2020)

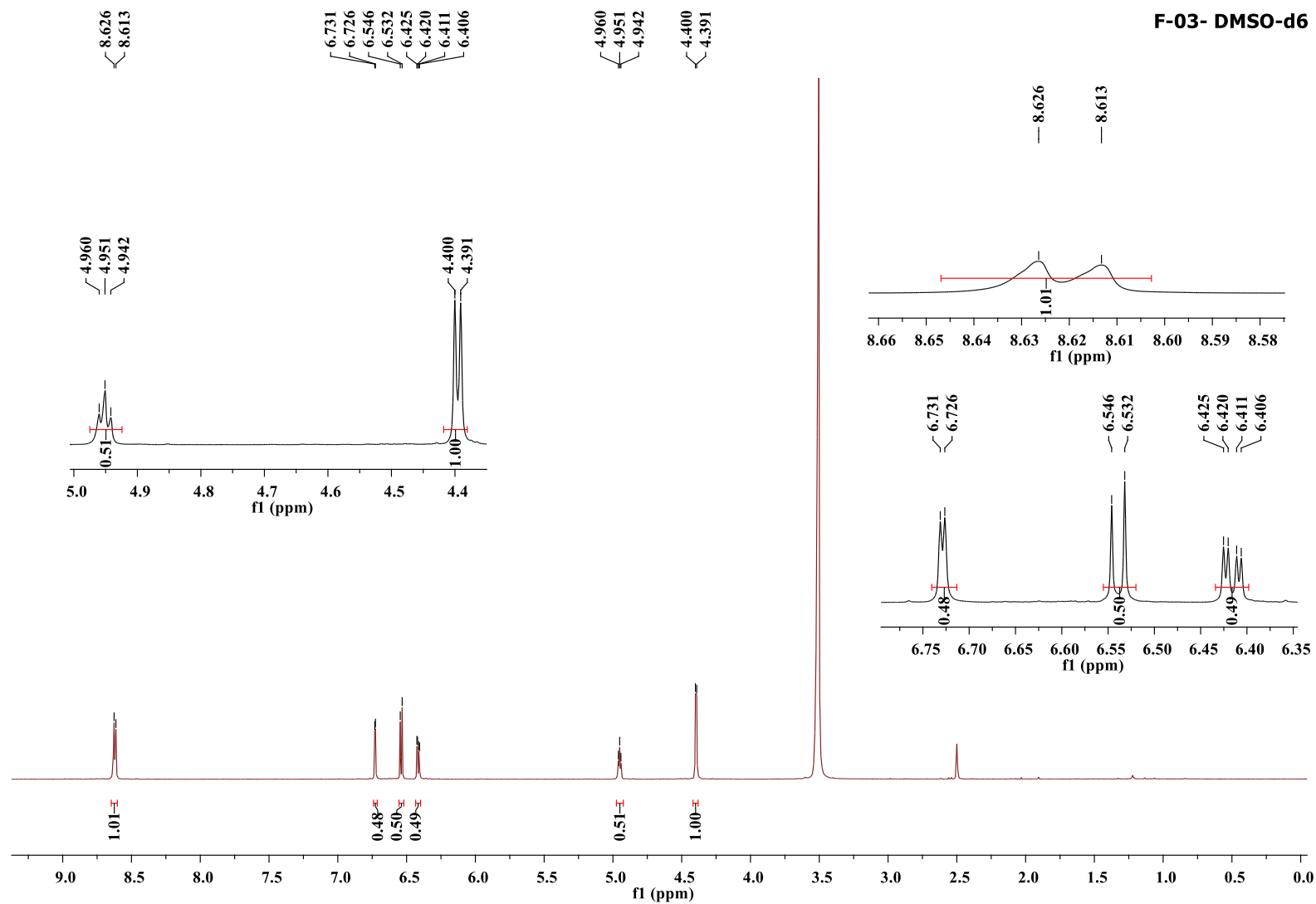
As substâncias puras isoladas (TABELA 5) do extrato bruto não foram submetidas novamente a teste larvicida devido ao baixo rendimento após o fracionamento.

### 5.7 Perfil Químico das Frações obtidas por RMN e Massas

Analisando os espectros de RMN  $^1\text{H}$  das frações F-03 (FIGURA 14) e F-07 (FIGURA 15), observa-se picos na região de  $\delta_{\text{H}}$  2,5 ppm que é característico do solvente utilizado para solubilizar as amostras F-03 e F-07 (DMSO- $d_6$ ), como também um singlete alto e agudo na região de  $\delta_{\text{H}}$  3,5 ppm, que é proveniente da água presente nesse solvente.

Ao analisar o espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração F-05 (FIGURA 16), observa-se a presença de diversos sinais na região de  $\delta_{\text{H}}$  4- 5,0 ppm, sendo um deles um singlete largo, característico de hidrogênio do grupo amino (FIGURA 16). Além de dupletos e duplos dupletos na região de  $\delta_{\text{H}}$  4,0-7,0 ppm que são característicos de hidrogênios de anéis aromáticos, pois são mais desblindado devido aos efeitos anisotrópicos e de indução (PAVIA et al.,2009). Na fração F-05 (FIGURA 16) o singlete em 7.26 ppm, é característico de clorofórmio não-deuterado residual presente no  $\text{CDCl}_3$  utilizado no preparo da amostra para análise.

Figura 14- Espectro de RMN de 1H fração F-03(DMSO-d6) em 600 MHz



Fonte: MestRENOVA versão 6.0 ®

Figura 15-Espectro de RMN de 1H fração F-07(DMSO-d6) em 600 MHz

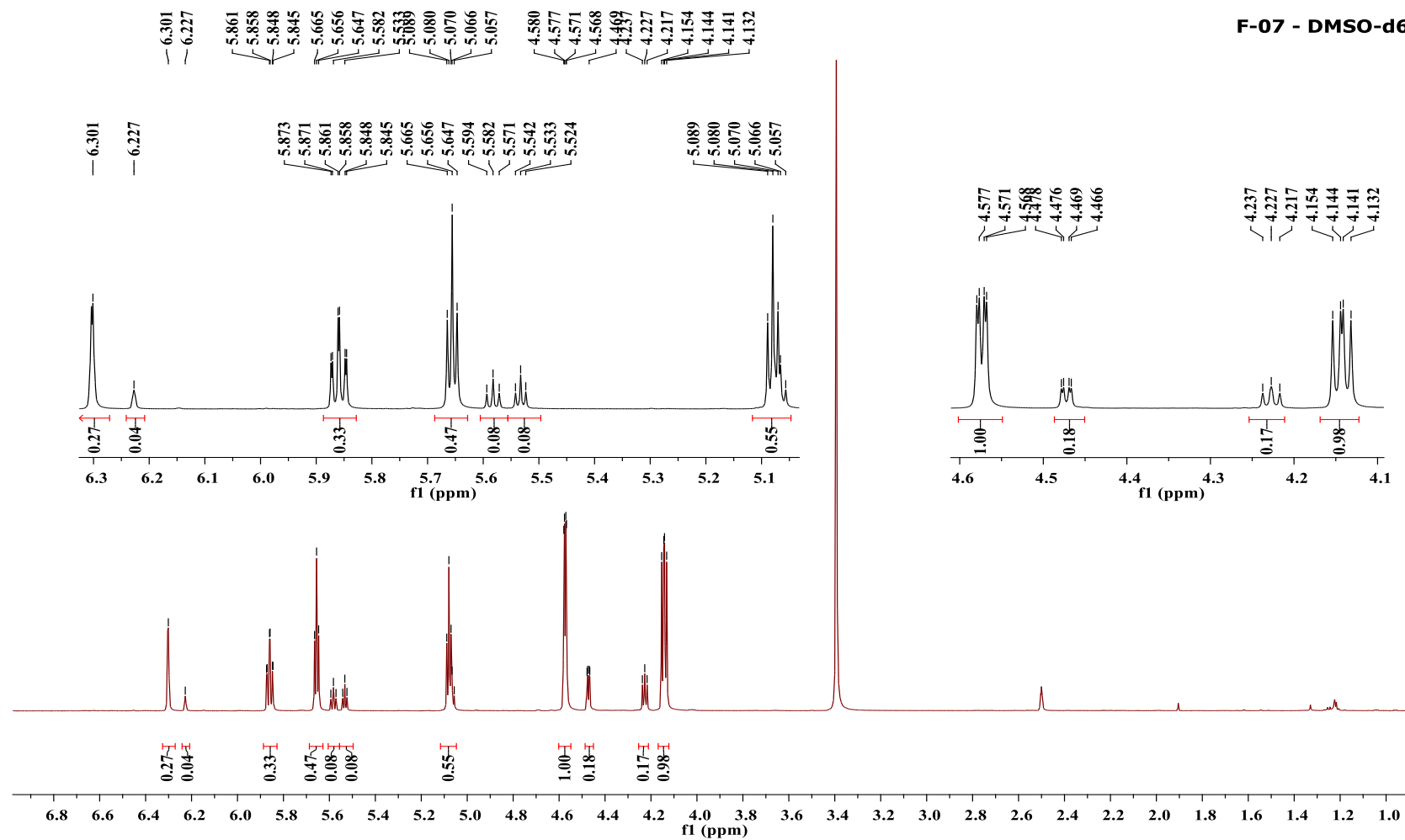
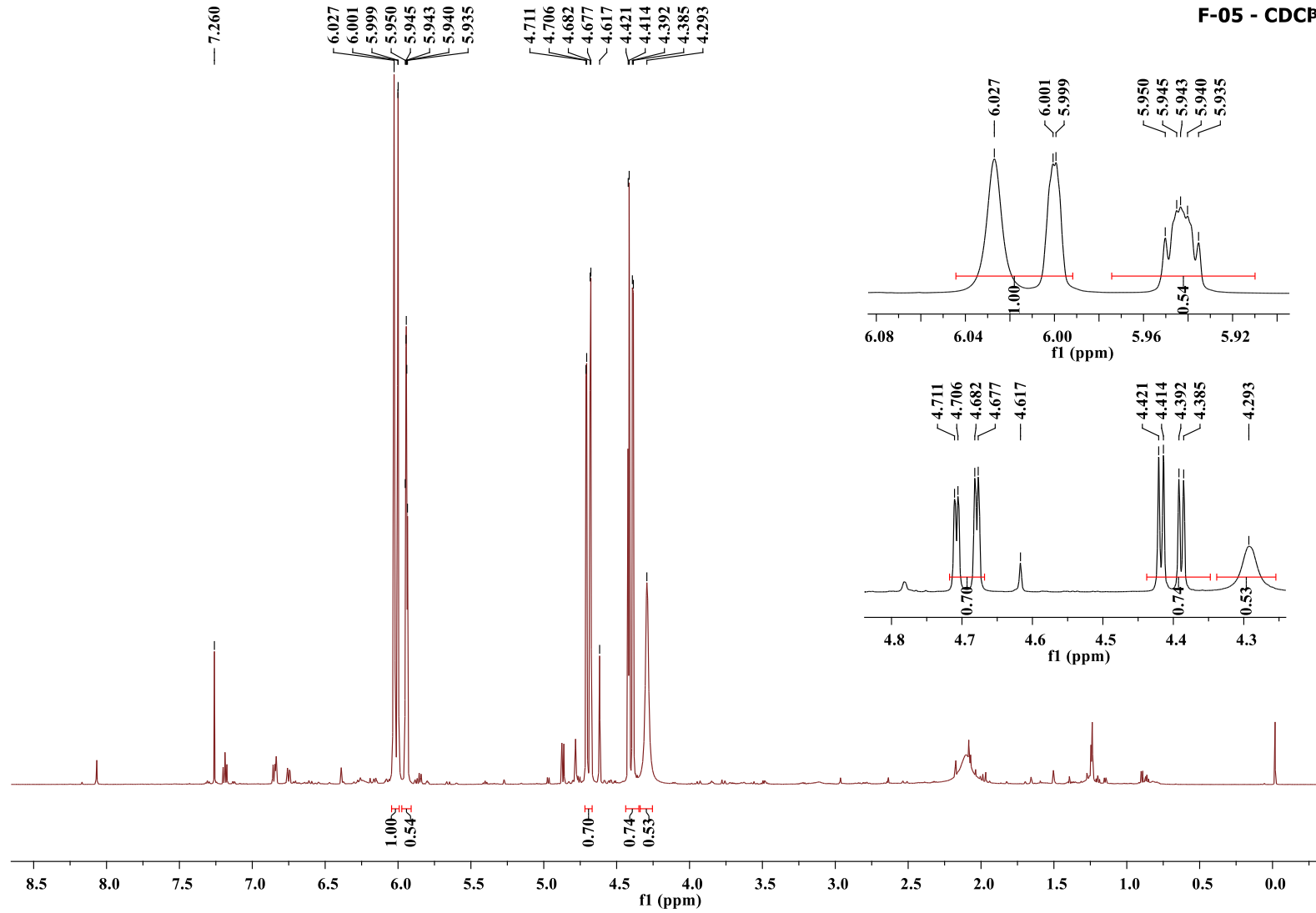


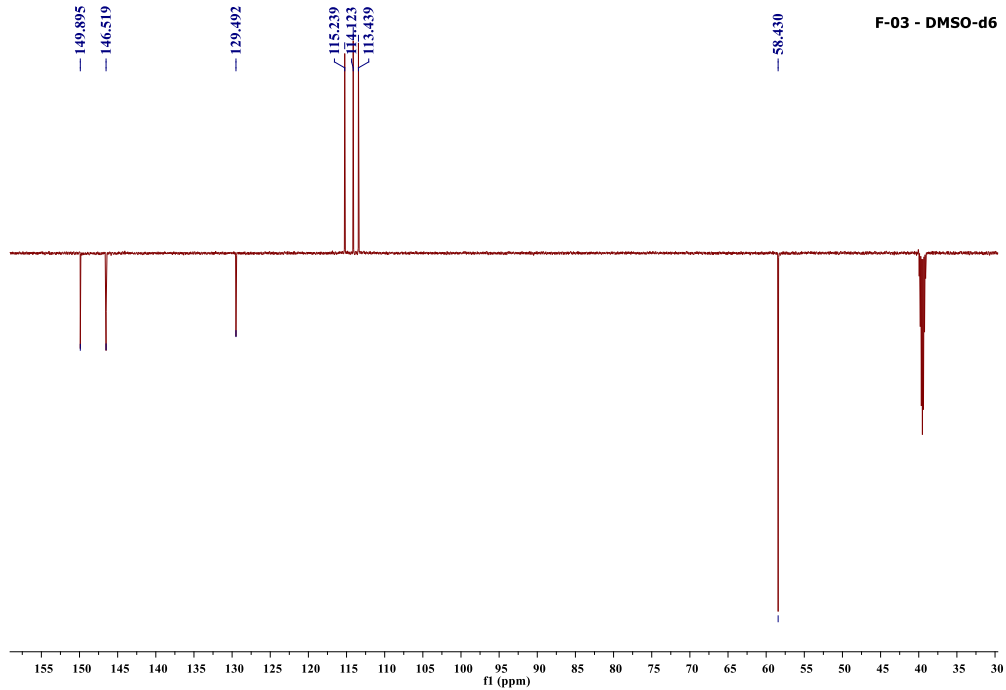
Figura 16- Espectro de RMN de 1H fração F-05(CDC13) em 600 MHz



Fonte: MestRENOVA versão 6.0 ®.

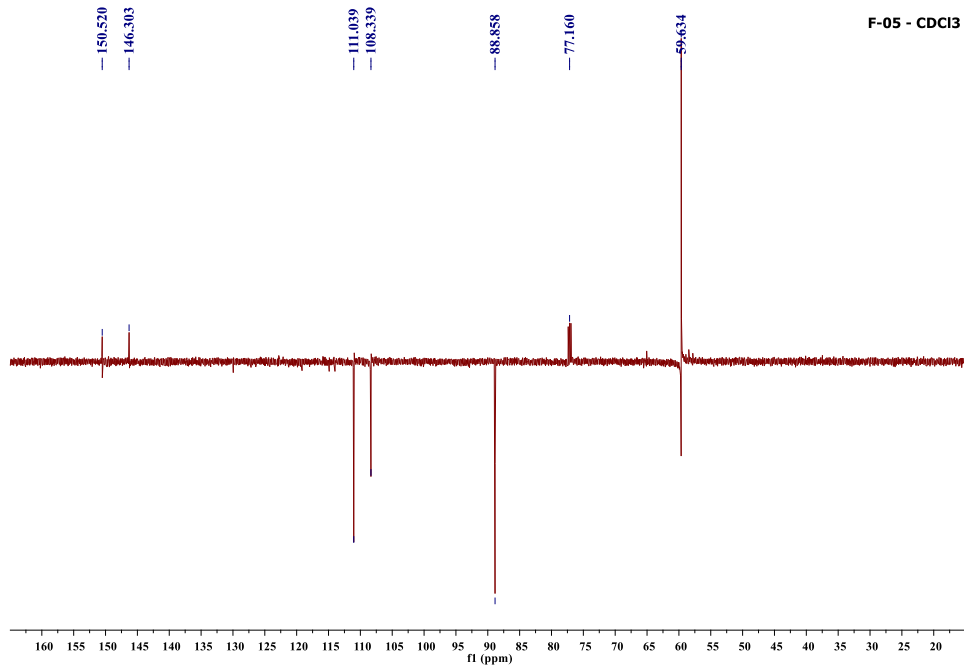
Ao analisar o espectro DEPT-135 da fração F-03 (FIGURA 17), F-05 (FIGURA 18) e F-07 (FIGURA 19), observa-se a presença de picos positivos, que são característicos de grupos metila ( $\text{CH}_3$ ) e metina ( $\text{CH}$ ), e picos negativos que são característicos de grupos metileno ( $\text{CH}_2$ ) (PAVIA et al.,2009).

Figura 17- Espectro de RMN DEPT-135 fração F-03(DMSO-d6) em 600 MHz



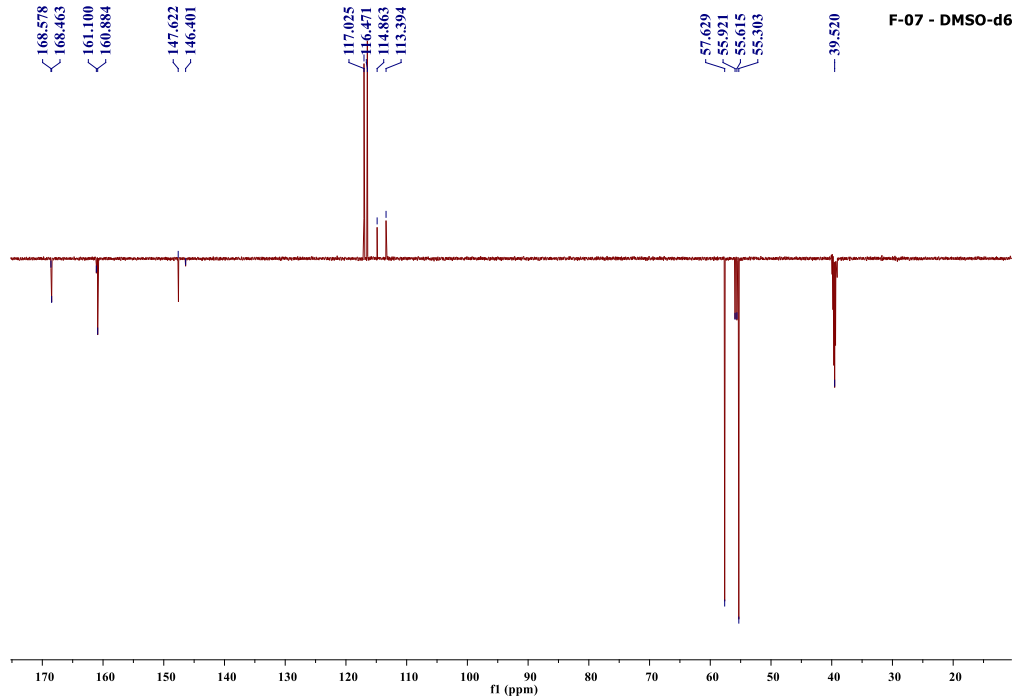
Fonte: MestRENOVA versão 6.0 ®.

Figura 18- Espectro de RMN DEPT-135 fração F-05(CDC13) em 600 MHz



Fonte: MestRENOVA versão 6.0 ®.

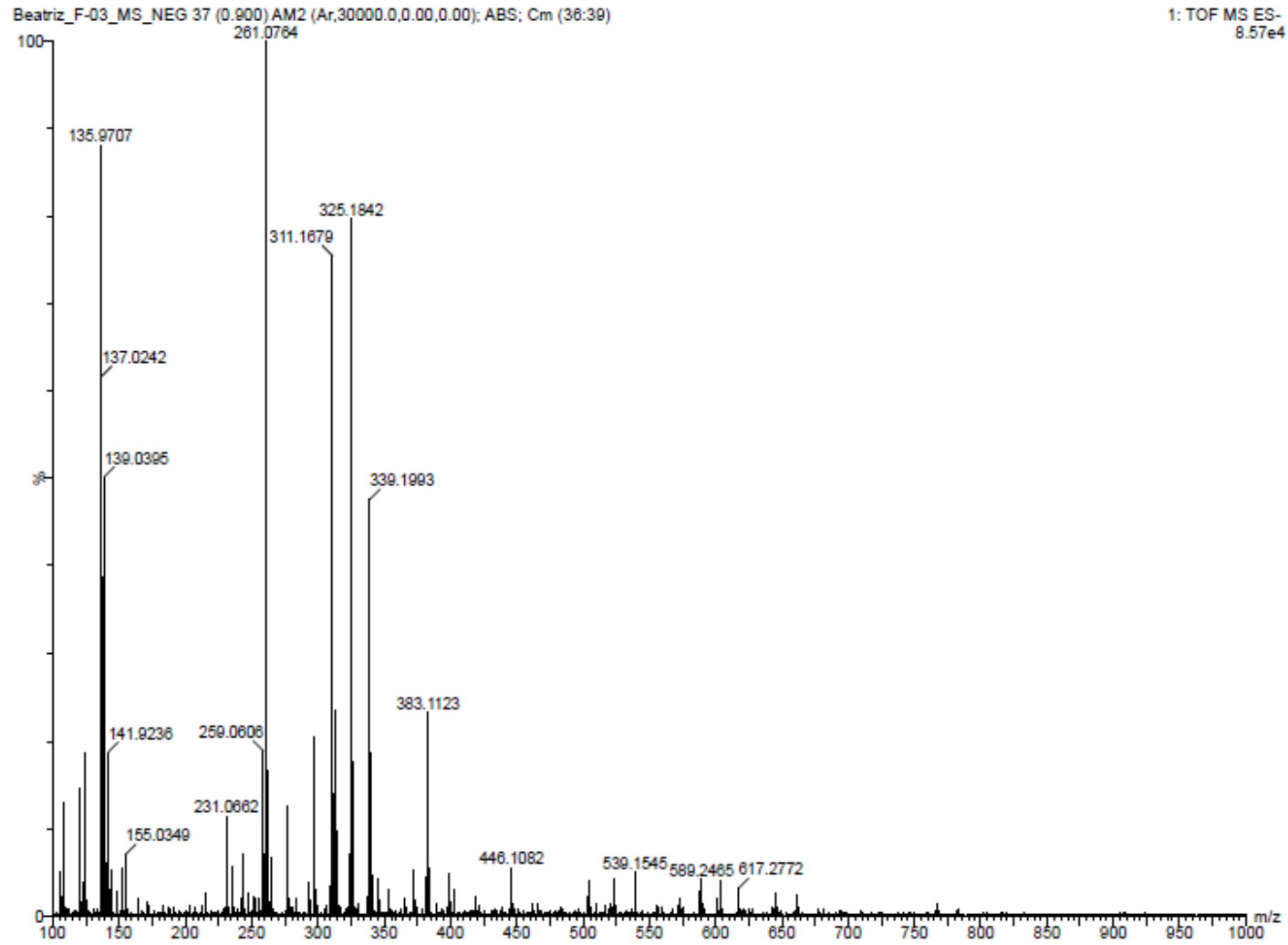
Figura 19- Espectro de RMN DEPT-135 fração F-07(DMSO-d6) em 600 MHz



Fonte: MestRENOVA versão 6.0 ®.

Os espectros de massas obtidos das frações F-03, F-05 e F-07 encontram-se representados respectivamente nas Figuras 20, 21 e 22 e os seus dados estão sendo analisados a fim de identificar e caracterizar as substâncias isoladas.

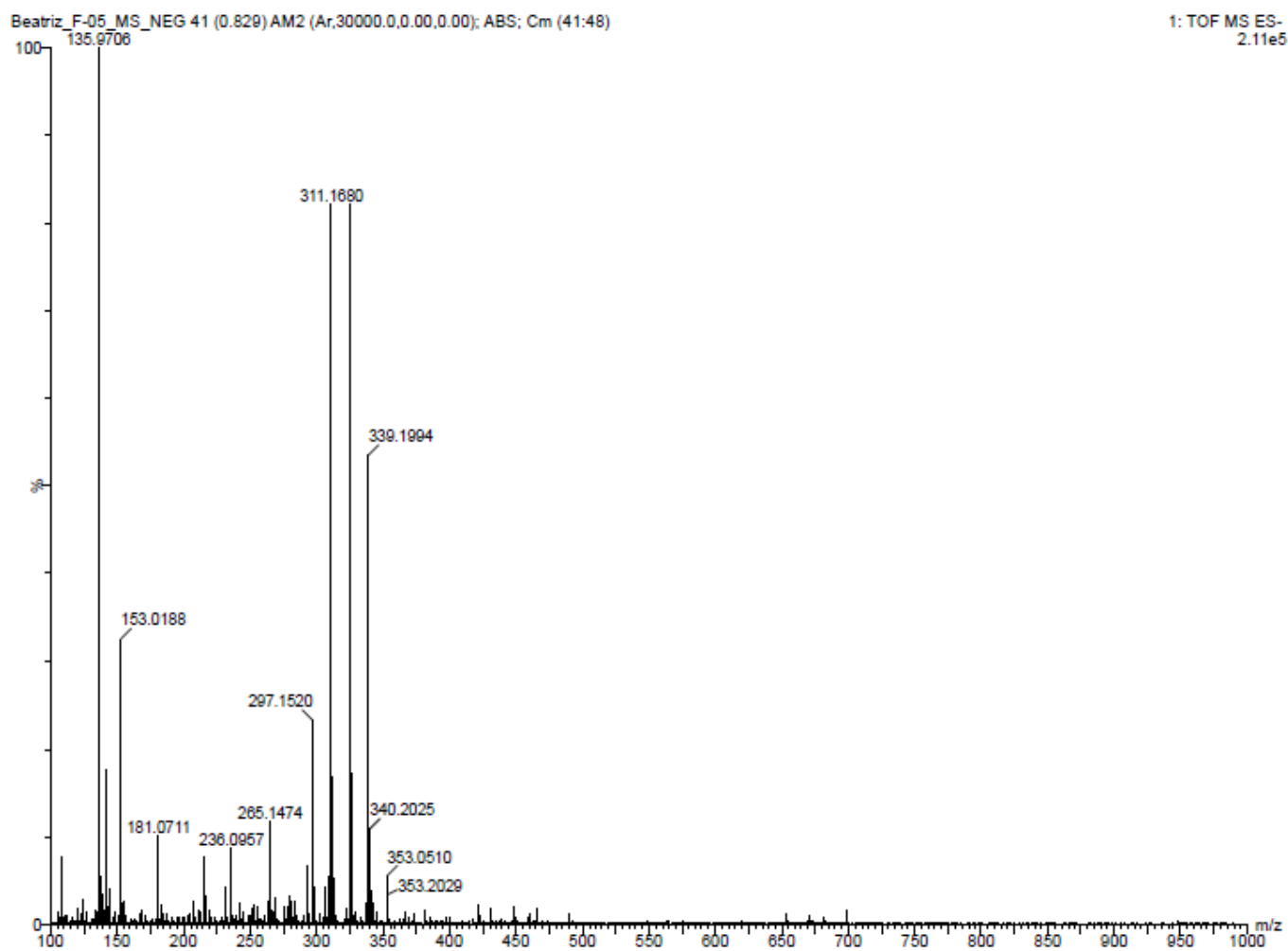
Figura 20-Espectro de massas fração F-03



Fonte: Data Analysis Schorcut versão 4.2 - Bruker Baltonik®

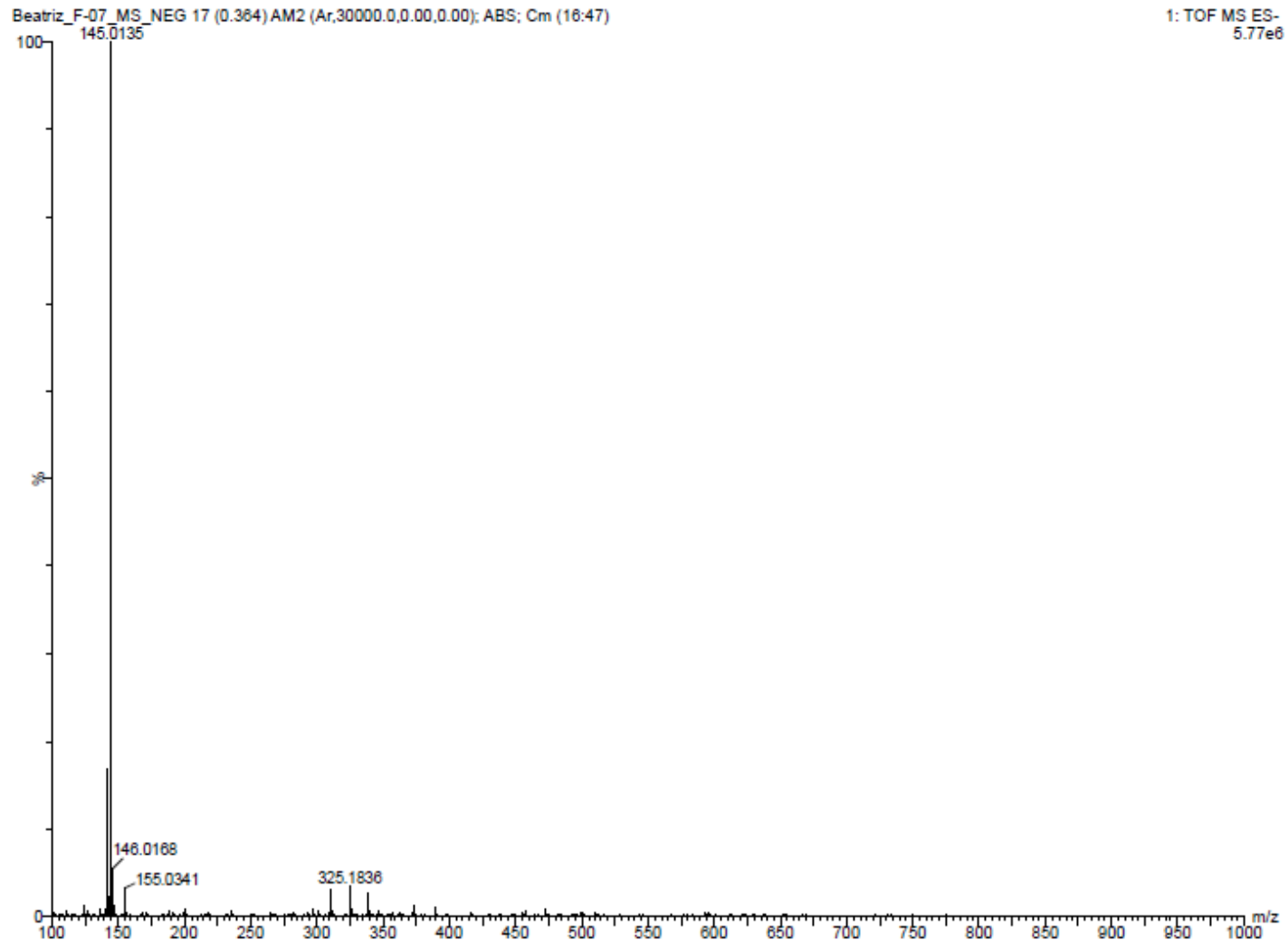


Figura 21-Espectro de massas fração F-05



Fonte: Data Analysis Schorcut versão 4.2 - Bruker Baltonik®

Figura 22-Espectro de massas fração F-07



Fonte: Data Analysis Schorcut versão 4.2 - Bruker Baltonik®

## 6. CONCLUSÃO

Conclui-se que dos extratos testados frente as larvas de *Ae. Aegypti*, somente o extrato FAT07 apresentou atividade larvicida com  $CL_{50}$  igual a 264,456 ppm e  $CL_{90}$  igual a 364,307 ppm. Resultado promissor, quando comparado aos resultados de outros extratos citados na literatura, e ao larvicida sintético temephos®, já que produtos oriundos de fontes biológicas são mais vantajosos em comparação com produtos químicos em termos de sustentabilidade, modo de ação e toxicidade.

Os testes preliminares *in vitro* com os seis extratos para avaliar a citotoxicidade e produção de EROS foram adequados, pois com essa triagem, foram selecionados apenas dois extratos FAT07 e FAT46. Além disso, supõe-se que o mecanismo de morte das larvas ao serem submetidas ao extrato FAT07 ocorreram por dano oxidativo a proteínas e lipídios. Vale ressaltar, que o dano oxidativo submetido por fungos endofíticos em larvas de *Ae. aegypti*, ainda não foi relatado na literatura, tendo apenas dados com plantas, algas e bactérias.

Quanto à metodologia utilizada para mensurar o dano oxidativo em larvas, foi necessária uma adaptação na metodologia original, já que a mesma não se adequou as análises propostas, requerendo uma exaustiva sequência de procedimentos para extrair as proteínas e lipídios das larvas, definindo concentrações e tempos de centrifugação do homogenato, sendo necessário várias repetições dos testes até que a metodologia estivesse padronizada e pronta para ser utilizada.

Ao realizar o teste biológico contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* constatou-se que o extrato tem atividade promissora frente a bactéria com  $CIM_{90}$  igual a 9,58  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $CIM_{50}$  igual a 21,22  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo considerado um dado relevante para estudos posteriores.

Conclui-se também, que a partir das análises químicas foi possível o isolamento de 3 substâncias puras e, com base na análise preliminar dos espectros de RMN- $^1\text{H}$ , DEPT-135 e espectros de massas, corrobora-se que as frações do extrato do fungo endofítico *Xylaria* sp. apresentam uma quimiodiversidade evidenciada e que podem ser substâncias diferentes uma das outras. No entanto, isso só poderá ser afirmado quando a caracterização dessas substâncias for completa.

## REFERÊNCIAS

- ABUTAHA, Nael et al. **Larvicidal activity of endophytic fungal extract of *Cochliobolus spicifer* (Pleosporales: Pleosporaceae) on *Aedes caspius* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae)**. Appl Entomol Zool, 2015. Disponível em: <50:405–414 DOI 10.1007/s13355-015-0347-6>. Acesso em: 28 abr. 2018.
- AHMED, Ashraf M. **Lipid Peroxidation and Oxidative Protein Products as Biomarkers of Oxidative Stress in the Autogenous Mosquito, *Aedes caspius*, Upon Infection with the Mosquitocidal Bacterium, *Bacillus thuringiensis* Kurstaki**. Pakistan J. Zool., vol. 44 (2), pp. 525-536, 2012. Disponível em: < <https://www.semanticscholar.org/paper/Lipid-Peroxidation-and-Oxidative-Protein-Products-Ahmed/2ca0d333d17b9e2b0f96f0447adb4178597649d1>>. Acesso em: 10 abr. 2019.
- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. **A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay**. Journal of Immunological Methods, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175994903964>>. Acesso em: 21 ago. 2019.
- ALMEIDA, Leticia Trindade. **Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes em células HepG2 infectadas pelo Caraparú vírus (Bunyaviridae)**. Dissertação. 55f. Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. 2016. Disponível em: <[https://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/6401/1/DISSERTA%20C3%87%20C3%83O\\_Avalia%20C3%A7%20C3%A3oEstresseOxidativo%20%282%29.pdf](https://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/6401/1/DISSERTA%20C3%87%20C3%83O_Avalia%20C3%A7%20C3%A3oEstresseOxidativo%20%282%29.pdf)> Acesso em: 14 jul 2019.
- ALVIN, A.; MILLER, K. I.; NEILAN, B. A. **Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds**. Microbiological Research 169, p. 483–495, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24582778> >. Acesso em: 10 jan 2019.
- ALY, A.H. et al. **Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises**. Applied Microbiology and Biotechnology, v.90, n.6, p.1829-1845, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21523479>>. Acesso em: 21 jun 2019.
- ARRUDA R. et al.. **Ecology of neotropical mistletoes: an important canopy-dwelling component of Brazilian ecosystems**. Acta Botânica Brasílica, 26 (2) : 264-274, 2012. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-33062012000200003](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062012000200003)>. Acesso em: 08 abr 2017.
- ATCC- **American Type Culture Collection®**, EUA . Disponível em: <<https://www.atcc.org/~media/85B67BB0373F47849F7862C77E43537D.ashx>> Acesso em: 13 jul 2019.
- AURY, Cárdenas Riviera et al. **Aproximación al estudio del daño oxidativo causado por larvicidas naturales y temefos sobre proteomas de larvas del mosquito *A. aegypti***. Ciencia y Salud Virtual, Cartagena, vol. 5, n. 1, p. 95-102, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.22519/21455333.342>>. Acesso em: 26 abr. 2018.

- AZEVEDO, RSS; OLIVEIRA, CS; VASCONCELOS, PFC. **Risco do chikungunya para o Brasil.** Rev Saúde Pública [Internet]. 2015
- BARBOSA, K B F et al. **Oxidative stress: concept, implications and modulating factors.** Rev. Nutr., Campinas, 23(4):629-643, jul./ago., 2010. Disponível em:<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-52732010000400013](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732010000400013)> . Acesso em: 10 out 2018.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. **Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa.** Estudos Avançados, v. 22, n. 64, p. 53–72, 2008.
- BASTOS, C. M. et al. **O uso de larvicidas em água potável é seguro?** Rev Bras Med Fam Comunidade, vol. 11, n. 38, p. 1-5, 2016. Disponível em:<[http://dx.doi.org/10.5712/rbmfc11\(38\)1300](http://dx.doi.org/10.5712/rbmfc11(38)1300)>. Acesso em: 28 abr. 2018.
- BEHLAU, F. et al. **Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated xanthomonads.** *Phytopathology*, v. 103, n. 5, p. 409– 418, 2013.
- BERNARDI-WENZEL, J. *et al.*. **Atividade larvicida fungos endofíticos isolados de soja contra larvas de *A. aegypti*.** 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Paraná, 2013. Disponível em:< <https://www.sbmicrobiologia.org.br/cd27cbm/resumos/R1865-1.html>>. Acesso em: 15 abr. 2018.
- BOGA, J. A.; ALVAREZ-ARGUELLES, M. E.; ROJO-ALBA, S.; RODRÍGUEZ, M.; DE OÑA, M.; MELÓN, S.. **Simultaneous detection of Dengue virus, Chikungunya virus, Zika virus, Yellow fever virus and West Nile virus.** *Journal of Virological Methods*, 2019. . doi:10.1016/j.jviromet.2019.03.014
- BRAGA, I. A.; VALLE, D.. **Aedes Aegypti: Insecticides, Mechanisms of Action and Resistance** *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, 16(4):279-293, out-dez, 2007. Disponível em:< [https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/18453/2/denise\\_vale\\_etal\\_IOC\\_2007.pdf](https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/18453/2/denise_vale_etal_IOC_2007.pdf)>. Acesso em: 01 fev. 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais.** *Bol Epidemiol* [Internet]. 2019 set [data da citação]; 50(n.esp.):1-154. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico.** Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 48, n.29, 2017. Disponível em:< <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/15/2017-028-Monitoramento-dos-casos-de-Dengue--febre-de-Chikungunya-e-febre-pelo-virus-Zika-ate-a-Semana-Epidemiologica-35.pdf>>. Acesso em: 14 abr. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico.** Secretaria de Vigilância em Saúde . Volume 50, Nº 13, Abr. 2019. ISSN 9352-7864. Disponível em : < <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/abril/30/2019-013-Monitoramento-dos-casos-de-arboviroses-urbanas-transmitidas-pelo-Aedes-publicacao.pdf>> Acesso em: 13 jul 2019.

BÜCKER *et al.*. **Larvicidal effects of endophytic and basidiomycete fungus extracts on *Aedes* and *Anopheles* larvae (Diptera, Culicidae).** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Manaus vol. 46, n. 4, p. 411-419, 2013. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0063-2013>> Acesso em: 16 abr. 2018.

CABREJOS, D. A. L., ALEXANDRINO, A. V., PEREIRA, C. M., MENDONÇA, D. C., PEREIRA, H. D., NOVO-MANSUR, M. T. M., ... GOTO, L. S. (2019). **Structural characterization of a pathogenicity-related superoxide dismutase codified by a probably essential gene in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.** PLOS ONE, 14(1), e0209988. doi:10.1371/journal.pone.0209988

CAIRES C. S. et al. **Frugivoria de larvas de *Neosilba* McAlpine (Diptera, Lonchaeidae) sobre *Psittacanthus plagiophyllus* Eichler (Santalales, Loranthaceae) no sudoeste de Mato Grosso do Sul, Brasil.** Revista Brasileira de Entomologia, Mato Grosso do Sul, 53 (2): 272-277, 2009. Disponível em:<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0085-56262009000200009](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0085-56262009000200009)>. Acesso em: 08 abr 2017

CALDERANI, F. A.; ORLANDELLI, R. C.; PAMPHILE, J. A. **Compostos bioativos com propriedades antitumorais produzidos por fungos endofíticos: a Review.** Revista Uningá, vol. 25, n. 2, p. 79-86, mar. 2016. Disponível em: <<http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1756> >. Acesso em: 28 jan. 2018.

CAVALCA, Lúcia Bonci. **Efeito bactericida do galato de hexila sobre *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e seu potencial no controle do cancro cítrico.** /Lúcia Bonci Cavalca. - Rio Claro, 2018; 66 f. : il.

CONCEIÇÃO, G. M. et al.2010 . **Erva-de-Passarinho: substratos vegetais, uso e aplicações na medicina popular.** *Scientia Plena*, Maranhão, 064501. Disponível em:<<https://www.scientiaplena.org.br/sp/article/view/24>>. Acesso em: 08 abr 2017.

COSTA, Isabelle Matos Pinheiro; CALADO, Daniela Cristina. **Incidência dos casos de Dengue (2007-2013) e distribuição sazonal de culicídeos (2012-2013) em Barreiras, Bahia.** Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília , v. 25, n. 4, p. 735-744, 2016 . Disponível em <[http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1679-49742016000400735&lng=pt&nrm=iso](http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742016000400735&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em 15 abr. 2018.

DULMAGE, H.T et al. . **Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*.** Genebra, UNDP, p. 58, 1990. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/61645?locale=ar>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

ERUSLANOV, Evgeniy; KUSMARTSEV, Sergei. **Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry .** Article in Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2010 . DOI: 10.1007/978-1-60761-411-1\_4 · Source: PubMed. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20072909> >. Acesso em: 10 jan 2019.

ESPOSITO, E., AZEVEDO, J.L. **Fungos uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia.** 2a. ed., EDUCS: Caxias do Sul, 638p, 2010.

GHOLAMI, D. et al. **Comparison of antibiotics and bacteriocins antibacterial activity on *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. Iranian Journal of Fisheries Sciences, v. 17, n. 1, p. 162-178, 2018.

HAMZAH, T.; LEE, S.; HIDAYAT, A.; TERHEM, R.; FARIDAH-HANUM, I.; MOHAMED, R.. **Diversity and Characterization of Endophytic Fungi Isolated From the Tropical Mangrove Species, *Rhizophora mucronata*, and Identification of Potential Antagonists Against the Soil-Borne Fungus, *Fusarium solani***. Front. Microbiol. 9:1707, 2018. Disponível em:<doi: 10.3389/fmicb.2018.01707>. Acesso em: 20 jan. 2020.

JALGAONWALA, R.B. et al. **A review: Natural products from plant associated endophytic fungi**. International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research, v.1, n.2, p.21-32, 2011. Disponível em:<[https://www.researchgate.net/publication/258884981\\_A\\_review\\_Natural\\_products\\_from\\_plant\\_associated\\_endophytic\\_fungi](https://www.researchgate.net/publication/258884981_A_review_Natural_products_from_plant_associated_endophytic_fungi)>. Acesso em: 20 ago 2018.

KELLER, N.P. et al. **Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics**. Nature Reviews Microbiology, v.3, n.12, p.937- 947, 2005. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16322742>>. Acesso em: 15 set 2018.

KUSARI, S. et al. **Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites**. Chemistry & Biology, v.19, n.7, p.792-798, 2012. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22840767>>. Acesso em: 21 ago 2019.

LANDAZABALA, Mayra A. Borrero et al. **Alterations of mitochondrial electron transport chain and oxidative stress induced by alkaloid-like  $\alpha$ -aminonitriles on *A. aegypti* larvae**. Pesticide Biochemistry and Physiology, vol.144, p. 64–70, 2018. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.11.006>>. Acesso em: 20 abr. 2018.

LEVINE, R. L. et al. **Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins**. Methods in Enzymology, vol. 186, p. 464–478, 1990. Disponível em:<[http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H)> Acesso em: 14 abr. 2018.

LIMA et al. ***In vitro* and *in vivo* anti-malarial activity of plants from the Brazilian Amazon**. Malar Journal, 2015. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26682750>>. Acesso em: 21 ago 2019.

LIMA, Émerson; SALES, Dulcineia; ABDALLA, Parra; ABDALLA, Dulcineia. **Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas**. Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas, vol. 37, 2001.

LOWRY, OH Roseberg NJ, Farr AL, Randell RJ. **Protein measurement with Folin phenol reagent**. *J Biol Chem*, 193:265-75, 1951. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>>. Acesso em: 21 ago 2019.

MAO, Ziling et al. **Dibenzo- $\alpha$ -pyrones: a new class of larvicidal metabolites against *A. aegypti* from the endophytic fungus *Hyalodendriella* sp. Ponipodef12**. Pest Manag Sci 2017. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27862895>>. Acesso em: 21 ago 2019.

MAO, Ziling et al. **Natural dibenzo- $\alpha$ -pyrones and their bioactivities.** *Molecules* 19:5088–5108, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24759070>>. Acesso em: 10 jun 2019.

MARIN, V. R.; FERRAREZI, J. H.; VIEIRA, G.; SASS, D. C.. **Recent advances in the biocontrol of *Xanthomonas* spp.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(5), 2019. Disponível em: < doi:10.1007/s11274-019-2646-5>. Acesso em: 10 dez. 2019.

MARQUES, A.M., KAPLAN, M.A.C.. **Active metabolites of the genus *Piper* against *A. aegypti*: natural alternative sources for Dengue vector control.** *Univ. Sci*, vol. 20, p. 61–82, 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-74832015000100005](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832015000100005)>. Acesso em: 10 abr. 2018.

MASCARIN, Gabriel Moura et al. **Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil.** *Journal of Invertebrate Pathology*, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.001>>. Acesso em: 01 maio 2018.

MISHRA, Y. et al. **Understanding the Biodiversity and Biological Applications of Endophytic Fungi: A Review.** *J. Microbial. Biochem. Technol.*, Rajastão, vol. 8, n. 4, 2014. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/open-access/understanding-the-biodiversity-and-biological-applications-of-endophytic-fungi-a-review-1948-5948.S8-004.php?aid=31222>>. Acesso em: 23 mar. 2018.

MOROA, Angela M. et al. **Evaluation of genotoxicity and oxidative damage in painters exposed to low levels of toluene.** *Mutation Research* 746, 42– 48, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22405974> >. Acesso em: 21 ago 2019.

MURALI, M. et al. **Molecular profiling and bioactive potential of an endophytic fungus *Aspergillus sulphureus* isolated from *Sida acuta*: a medicinal plant.** *Pharmaceutical Biology*, VOL. 55, NO. 1, 1623–1630, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2017.1315435>>. Acesso em: 20 fev 2018.

MUSSO, D.; GUBLER, DJ. **Vírus zika.** *Clin Microbiol Rev.* 2016 Jul; 29 (3): 487-524. doi: 10.1128 / CMR.00072-15.

NAZARÉ, Ana Carolina. **Preparação e avaliação de diidroxibenzoatos de alquila contra *xanthomonas citri* subsp. *citri* e no controle do cancro cítrico.** São José do Rio Preto, 2019. 185 p. : il, tabs.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. **Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction.** *Analytical Biochemistry*, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36810>>. Acesso em: 10 fev 2019.

OMS– Organização Mundial de Saúde. **Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides.** 2005. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69101/WHO\\_CDS\\_WHOPES\\_GCDPP\\_2005.13.pdf;jsessionid=F69E5CC3C2073863A15E728DD3AC413E?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69101/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf;jsessionid=F69E5CC3C2073863A15E728DD3AC413E?sequence=1)> . Acesso em: 12 abr. 2018.



OMS- Organização Mundial de Saúde. **Pesticide Evaluation Schemme – WHOPES**. 2014. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/30/Instrucoes-para-uso-de-pyriproxifen-maio-2014.pdf>>. Acesso em: 14 abr. 2018.

PAES L. S. et al. **Levantamento da microbiota fúngica endofítica de *Phthirusa pyrifolia* Kunth com caracterização anatômica dos tecidos colonizados**. *Revista Igapó*, 2010. Disponível em: <<http://200.129.168.183/ojs/index.php/igapo/article/view/224>>. Acesso em: 11 maio 2018.

PAMPHILE, J. A. et al. **Biotechnological applications of secondary metabolites extracted from endophytic fungi: the case of *Colletotrichum* sp.** *Revista Uningá*, Vol.53, n.1, pp.113-119, Jul - Set 2017. Disponível em: <[https://www.mastereditora.com.br/periodico/20170707\\_204627.pdf](https://www.mastereditora.com.br/periodico/20170707_204627.pdf)>. Acesso em: 10 mar. 2018.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; ENGEL, R. G. **Química orgânica experimental: técnicas de escala pequena**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

PENNA, M. L. **A challenge for the public health system in Brazil: Dengue control**. *Cadernos de Saúde Publica*: 52. 305-309, 2003.

RAY, Shatrupa et al.. **Biochemical and histochemical analyses revealing endophytic *Alcaligenes faecalis* mediated suppression of oxidative stress in *Abelmoschus esculentus* challenged with *Sclerotium rolfsii***. *Plant Physiology and Biochemistry* 109, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27816824>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

RICHARD, D. et al. **Complete Genome Sequences of Six Copper-Resistant *Xanthomonas citri* pv. *citri* Strains Causing Asiatic Citrus Canker, Obtained Using Long-Read Technology**. *Genome Announcements*, v. 5, n. 12, p. e00010-17, 2017.

ROSE, RI. **Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management**. *Emerging Infectious Diseases* 2001;7(1):17-23. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2631680/>>. Acesso em: 01 fev. 2020.

ROUNDY, Christopher M. et al.. **Variation in *A. aegypti* Mosquito Competence for Zika Virus Transmission**. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 23, n.4, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3201/eid2304.161484>>. Acesso em: 10 maio 2018.

SANCHEZ-ORTIZ, B.L.; Sanchez-Fernandez, R.E.; Duarte, G.; Lappe-Oliveras, P.; MACAS-RUBALCAVA, M.L.. **Antifungal, anti-oomycete and phytotoxic effects of volatile organic compounds from the endophytic fungus *Xylaria* sp. strain PB3f3 isolated from *Haematoxylon brasiletto***. *Journal of Applied Microbiology* 120, 1313--1325 © 2016 The Society for Applied Microbiology, 2016. doi:10.1111/jam.13101

SANTOS, Jéssica Maurino; ALFREDO, Tamaeh Monteiro; Antunes, Katia Ávila et al. **Decreases Oxidative Stress in Blood Cells and Prevents Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity**. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2018/2935051>>. Acesso em: 21 ago 2019.

SCALON, M. C; CATTERUCCIA, F. **Leaf morphophysiology of a Neotropical mistletoe is shaped by seasonal patterns of host leaf phenology**. *Oecologia*, v. 180, n. 4, p. 1103–

1112, 2016. *Nature Microbiology*, v. 4, p. 20–34, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26686200>>. Acesso em: 21 ago 2019.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P.E.; STROMBERG, V.K.; VIDAVER, A.K.. 2005. **Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex smith 1901) dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov.** *Syst. Appl. Microbiol.* 28:494–518. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3536167/>>. Acesso em: 16 jan. 2020.

SCHWARTZ O; ALBERT, ML. **Biology and pathogenesis of chikungunya virus.** *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010 Jul [cited 2019 Jun 17];8(7):491-500

SEETHARAMAN, Prabu Kumar et al. **Antimicrobial and larvicidal activity of eco-friendly silver nanoparticles synthesized from endophytic fungi *Phomopsis liquidambaris*.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 16 (2018) 22–30. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.006>>. Acesso em: 08 abr. 2018.

SHOBA S, SASIKUMAR K, SATHIAVELU M. **Isolation of isosativenetriol from endophytic fungus *Cochliobolus* spp. of *Aerva lanata*.** *Bangladesh J Pharmacol*, 13: 57-58, 2018. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/323391458\\_Isolation\\_of\\_isosativenetriol\\_from\\_endophytic\\_fungus\\_Cochliobolus\\_spp\\_of\\_Aerva\\_lanata](https://www.researchgate.net/publication/323391458_Isolation_of_isosativenetriol_from_endophytic_fungus_Cochliobolus_spp_of_Aerva_lanata)>. Acesso em: 21 ago 2019.

SILVA, A.C. et al.. **Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities.** *NATURE* 417, 459–463, 2002.

SILVA, I.C; REGASINI, L.O.; PETRÔNIO, M.S. ; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; BELASQUE-JÚNIOR, J.; SACRAMENTO, L.V.S.; FERREIRA, H.. **Antibacterial Activity of Alkyl Gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.** *J Bacteriol.* 2013 Jan; 195(1): 85–94. doi: 10.1128/JB.01442-12. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3536167/>>. Acesso em: 16 jan. 2020.

SILVA, Sarah Simões. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos das folhas e caule da espécie vegetal *Passovia stelis* (Loranthaceae).** 38 f. Universidade Federal do Amazonas. 2017. Disponível em: < [https://tede.ufam.edu.br/simple-search?location=%2F&query=Sarah+Sim%C3%B5es+da+silva&rpp=10&sort\\_by=score&order=desc](https://tede.ufam.edu.br/simple-search?location=%2F&query=Sarah+Sim%C3%B5es+da+silva&rpp=10&sort_by=score&order=desc)>. Acesso em: 21 ago 2019.

SOARES, D. A.; PIMENTA, R. S. **Avaliação da atividade antimicrobiana de pigmentos extracelulares produzidos por fungos endofíticos.** *Journal of Bioenergy and Food Science*, Macapá, vol. 2, n. 4, p. 152-155, 2015. Disponível em: < <http://periodicos.ifap.edu.br/index.php/JBFS/article/view/59/74>>. Acesso em: 15 mar. 2018.

SOFIC, E. et al. **Antioxidant capacity in postmortem brain tissues of Parkinson's and Alzheimer's diseases.** *J Neural Transm*, 39-43, Springer-Verlag, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17447414>>. Acesso em: 21 ago 2019.

SONG, B.-H.; YUN, S.-I.; WOOLLEY, M.; LEE, Y.-M. (2017). **Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation.** *Journal of Neuroimmunology*, 2017, 308, 50-64. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165572816304830>>. Acesso em: 15 fev. 2020.

SOUZA, Giselle Katiane Bonfim Bacelar de. **Perfil do estresse oxidativo na lesão renal de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.** 2012. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012. Disponível em: <<https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/5978>> Acesso em: 12 jul 2019.

SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; FELBER, A. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. **Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos.** *UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde* 16 (4): 345-351, 2014.

STADMAN, E. R., LEVINE, R. L. **Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins.** *Amino Acids*, 25, 207-218, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14661084>> Acesso em: 12 jul 2019.

SUDHA, V.; GOVINDARAJ, R.; BASKAR, K.; AL-DHABI, N. A.; DURAI PANDIYAN, V. **Biological properties of Endophytic Fungi.** *Braz. Arch. Biol. Technol.*, vol. 59: e16150436, Jan/Dez 2016. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-89132016000100413](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132016000100413)> Acesso em: 12 jul 2019.

TANVIR, R.; SAJID, I.; HASNAIN, S. (2014). **Larvicidal potential of Asteraceae family endophytic actinomycetes against Culex quinquefasciatus mosquito larvae.** *Natural Product Research*, 2014. 28(22), 2048–2052. doi:10.1080/14786419.2014.919579 . disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2014.919579>>

TAUIL, P. L. **Critical aspects of dengue control in Brazil.** *Caderno de Saúde Pública*, v. 18, n. 3, p. 867–871, 2002.

TEIXEIRA, Luciana de Almeida Silva et al. **Persistence of dengue symptoms in patients in Uberaba, Minas Gerais State, Brazil.** *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 26, n. 3, p. 624-630, Mar. 2010. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X2010000300019&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2010000300019&lng=en&nrm=iso)>. access on 07 Nov. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2010000300019>.

TRIGUEIRO, Silvana Aranha; NEVES, Bárbara Freitas; AGUIAR, Michelle Salles Barros de; ARAUJO, Juliana Sousa Soares de. **Correlation between cephalic circumference at birth and ocular alterations in patients with microcephaly potentially associated with Zika Virus infection.** *Rev. Assoc. Med. Bras.* [online]. 2019, vol.65, n.6 [cited 2019-11-08], pp.909-913. Available from: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302019000600909&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302019000600909&lng=en&nrm=iso)>. Epub July 22, 2019. ISSN 0104-4230. <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.65.6.909>.

VASCONCELOS G. C. L.; MELO J. I. M.. **Flora of the state of Paraíba, Brazil: Loranthaceae Juss. *Acta Scientiarum***. Biological Sciences, Maringá, 37 (2): 239-250, 2015. Disponível em:< <http://www.redalyc.org/html/1871/187141162014/>>. Acesso em: 08 abr 2017.

VICTORA, C.G., SCHULER-FACCINI, L., MATIJASEVICH, A., RIBEIRO, E., PESSOA, A., BARROS, F.C., 2016. **Microcephaly in Brazil: how to interpret reported numbers?** Lancet 387, 621–624.

VIVEKANANDHAN, Perumal et al. **Efeito sinérgico do extrato do fungo entomopatogênico *Fusarium oxysporum* em combinação com temephos contra três principais vetores de mosquito**. Patógenos e saúde global, vol. 111, ed. 8, 2017. Disponível em:<<https://doi.org/10.1080/20477724.2018.1438228>>. Acesso em: 28 abr. 2018.

WEAVER, SC. **Arrival of Chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health**. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(6):e2921. DOI:10.1371/journal.pntd.0002921

YAMAGUCHI et al. **HPLC-DAD Profile of phenolic compounds, cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of the amazon fruit *Caryocar villosum***. Quim. Nova, vol. 40, n. 5, p. 483-490, 2017. Disponível em:<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422017000500483](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422017000500483)>. Acesso em: 20 fev. 2018.

YOVANA, Mery .**Oxidação de lipídios e proteínas no café cru durante o armazenamento e sua relação com a perda da qualidade da bebida**. Campinas,SP: [s.n.], 2012. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/255260>>. Acesso em: 21 ago. 2019.

ZARA, Ana Laura de Sene Amâncio et al. ***A. aegypti* control strategies: a review**. Epidemiol. Serv. Saúde, vol. 25, n.2, Brasília, 2016. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742016000200017>>. Acesso em 20 abr. 2018.

ZHANG, Jie et al. **Cell death induced by  $\alpha$ -terthienyl via reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the midgut of *A. aegypti* larvae**. Free Radical Biology and Medicine 137 , 2019. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.021>>. Acesso em: 21 ago.2019.

ZHAO, J; SHAN ,T; ,MOU ,Y ; ZHOU, L, **Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi**. Mini-Rev Med Chem 11:159–168, 2011. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21222580>>. Acesso em: 21 ago.2019.