

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

ORIVALDO TEIXEIRA DE MENEZES JÚNIOR

**Avaliação do controle do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) utilizando cultivo misto
entre fungos endofíticos amazônicos e antárticos**

ITACOATIARA

2021

ORIVALDO TEIXEIRA DE MENEZES JÚNIOR

Avaliação do controle do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) utilizando cultivo misto entre fungos endofíticos amazônicos e antárticos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre na área de Ciências e Tecnologia para Recursos Amazônicos

Orientadora: Camila Martins de Oliveira

ITACOATIARA

2021

Ficha Catalográfica

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

M543a Menezes Júnior , Orivaldo Teixeira de
Avaliação do controle do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) utilizando cultivo misto entre fungos endofíticos amazônicos e antárticos / Orivaldo Teixeira de Menezes Júnior . 2021
65 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Arboviroses. 2. Metabólitos secundários. 3. Cultivo axênico. 4. Co-cultivo. 5. Bioatividade larvicida. I. Oliveira, Camila Martins de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Orivaldo Teixeira de Menezes Júnior

**Avaliação do controle do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) utilizando cultivo misto
entre fungos endofíticos amazônicos e antárticos**

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 em 06 de dezembro de 2021.

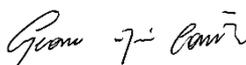
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Camila Martins de Oliveira
(Orientadora/Presidente da banca)



Prof. Dr. Flávio Nogueira da Costa



Prof. Dr. Geone Maia Corrêa

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo.

À toda minha família, em especial à minha mãe devido ao apoio incondicional em todos os momentos.

À Universidade Federal de Rondonópolis, especificamente ao Núcleo de Pesquisa do Cerrado pela disponibilidade de todos os meios necessários para a realização das pesquisas ali desenvolvidas e ao professor Dr. Helder Lopes Teles pelas orientações em sede da referida instituição.

À Universidade de Brasília, na pessoa da professora Dra. Laila Salmen Espindola, pelas pesquisas realizadas em sede do Laboratório de Farmacologia.

À professora Dra. Hosana Maria Deboni da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto por ter cedido as cepas fúngicas antárticas e ao seu aluno Gustavo Santos pelas dicas e esclarecimentos.

À professora Dra. Livia Soman de Medeiros da Universidade Federal de São Paulo pela obtenção dos espectros LC-MS das amostras fúngicas.

À professora Dra. Camila Martins pelas orientações e pelo constante apoio ao longo de toda essa trajetória. Em todo tempo esteve me auxiliando com sabedoria e discernimento.

À minha namorada Layane por acreditar e me apoiar em todos os momentos. Credito a ela o incentivo e encorajamento à inscrição no mestrado.

Aos amigos que conheci em Rondonópolis, Nathalia Porto e Marcelo Vieira, por sempre estarem presentes, proporcionando momentos de distração, lazer, alegria e principalmente pela ajuda em vários momentos.

Ao Thiago Gomes e à Maria Eduarda pelas colaborações em procedimentos laboratoriais.

A todos que direta e indiretamente contribuíram com esse trabalho.

Ao INCT (Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia) pela bolsa concedida e à Universidade Federal do Amazonas pela possibilidade de desenvolvimento desse trabalho.

“Devemos acreditar que somos dotados de alguma coisa e que essa coisa deve ser alcançada.”

Mari Curie

RESUMO

Aedes aegypti representa ameaça à saúde pública mundial por ser transmissor de arboviroses como febre amarela, chikungunya, zika e dengue. O combate a esse artrópode por meio de pesticidas sintéticos tem gerado resistência e, conseqüentemente, diminuição de eficiência, de modo a ser necessário novos meios de controle desse agente transmissor. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade larvicida contra larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti* dos extratos de 21 fungos endofíticos amazônicos dos gêneros *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Guignardia*, *Phomopsis* e *Xylaria* e dos fungos endofíticos antárticos *Arthrinium* sp. e *Epicoccum dendrobii* e, posteriormente, avaliar a influência da co-cultura entre fungos amazônicos e antárticos sobre a bioatividade. Os fungos foram cultivados em meio líquido inicialmente de forma isolada para a obtenção dos extratos, os quais foram submetidos aos bioensaios larvicidas. Posteriormente fez-se o cultivo misto dos fungos amazônicos *Colletotrichum siamense* (FFT03) e *Guignardia* sp. (FAT06) com os fungos antárticos *Arthrinium* sp. (ARTH) e *Epicoccum dendrobii* (DEND). Os resultados mostraram que os extratos dos fungos *Phomopsis* sp. (PH), *Phomopsis* sp. (CAT12), *Diaporthe* sp. (FFT15), *Guignardia* sp. (FAT06), *Colletotrichum siamense* (FFT03) foram ativos nos bioensaios larvicidas. Observou-se ainda que os extratos de FFT03 e FAT06 tiveram suas atividades diminuídas quando co-cultivados com os fungos antárticos. Provavelmente a interação fúngica no cultivo misto pode ter resultado no silenciamento de agrupamentos de genes biosintéticos ou em processo de biotransformação de metabólitos, entre os quais possivelmente estavam os com ação larvicida, o que refletiu nos resultados obtidos. Com a desreplicação dos extratos de FFT03 e FAT06 por rede molecular atribuiu-se similaridade estrutural dos metabólitos presentes nos extratos com compostos presentes no banco de dados da Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) que foram: citocalasina, cumarina, meroterpenoide e dicetopiperazina. Por fim, foi demonstrado o potencial larvicida de fungos endofíticos amazônicos, que podem ser meios alternativos de combate a *Ae. aegypti*.

Palavras-Chaves: Arboviroses; Metabólitos secundários; Cultivo axênico; Co-cultivo; Bioatividade larvicida.

ABSTRACT

Aedes aegypti represents a threat to public health worldwide as it transmits arboviruses such as yellow fever, chikungunya, Zika and dengue. The fight against this arthropod through synthetic pesticides has generated resistance and, consequently, reduced efficiency, so that new means of controlling this transmitting agent are needed. Therefore, this study aimed to evaluate a larvicidal activity against 3rd stage larvae of *Ae. aegypti* from extracts of 21 Amazonian endophytic fungi of the genera *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Guignardia*, *Phomopsis* and *Xylaria* and from the Antarctic endophytic fungi *Arthrimum* sp. and *Epicoccum dendrobii* and, later, to evaluate the influence of co-culture between Amazonian and Antarctic fungi on bioactivity. The fungi were cultivated in liquid boletus medium in isolation to obtain the extracts, which were informed to larvicidal bioassays. Subsequently, the mixed cultivation of the Amazon fungi *Colletotrichum siamense* (FFT03) and *Guignardia* sp. (FAT06) with the Antarctic fungi *Arthrimum* sp. (ARTH) and *Epicoccum dendrobii* (DEND). The harmful results that extracts from the fungi *Phomopsis* sp. (PH), *Phomopsis* sp. (CAT12), *Diaporthe* sp. (FFT15), *Guignardia* sp. (FAT06), *Colletotrichum siamense* (FFT03) forms active in larvicidal bioassays. It was also observed that the FFT03 and FAT06 extracts had their activities reduced when co-cultivated with Antarctic fungi. Probably, a fungal interaction in the mixed culture resulted in the silencing of biosynthetic gene clusters or in the biotransformation process of metabolites, among which were possibly those with larvicidal action, which reflected in the requested results. With the dereplication of FFT03 and FAT06 extracts by network, the structural similarity of the metabolites present in the extracts was attributed to compounds present in the Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) database, which were: cytochalasin, coumarin, meroterpenoid and diketopiperazine. Finally, the larvicidal potential of Amazonian endophytic fungi, which can be an alternative means of combating *Ae. aegypti*.

Keywords: Arboviruses; Secondary metabolites; Axenic cultivation; Co-cultivation; Larvicide bioactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ramo de <i>Passovia stelis</i> com folhas, flores e frutos.	7
Figura 2 - Alga marrom <i>Phaeurus antarcticus</i>	8
Figura 3 - Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> e as doenças transmitidas pelo mosquito.....	9
Figura 4 - Curva epidêmica dos casos prováveis de chikungunya no Brasil em 2019 e 2020.	11
Figura 5 - Curva epidêmica dos casos prováveis de zika no Brasil em 2019 e 2020.....	12
Figura 6 - Curva epidêmica dos casos prováveis de dengue no Brasil em 2019 e 2020.....	12
Figura 7 - Processo de criação de uma rede molecular.	19
Figura 8 - Representação esquemática dos cultivos fúngicos para obtenção dos extratos.....	28
Figura 9 - Fungos endofíticos amazônicos e antárticos cultivados em Placa de Petri.	31
Figura 10 - Resultados do bioensaio seletivo com extratos de fungos endofíticos contra larvas de 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i>	33
Figura 11 - Cromatogramas de CLUR dos extratos de EtOAc dos fungos endofíticos amazônicos ativos nos bioensaios larvicidas.....	36
Figura 12 - Cromatogramas de CLUR dos extratos de EtOAc dos fungos endofíticos <i>Epicoccum dendrobii</i> (DEND) e <i>Guignardia</i> sp. (FAT06), juntamente com o do co-cultivo de ambos.....	37
Figura 13 - Cromatogramas de CLUR dos extratos de EtOAc dos fungos endofíticos <i>Epicoccum dendrobii</i> (DEND) e <i>Colletotrichum siamense</i> (FFT03), juntamente com o do co-cultivo de ambos.....	39
Figura 14 - Rede molecular dos metabólitos do <i>Guignardia</i> sp. (FAT06) e <i>Colletotrichum siamense</i> (FFT03).....	40
Figura 15 - Representação da similaridade entre compostos da biblioteca do GNPS com os presentes nos extratos do <i>Guignardia</i> sp. (FAT06) e <i>Colletotrichum siamense</i> (FFT03).	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Fungos amazônicos e antárticos submetidos ao processo de co-cultivo.....	27
Quadro 2 - Fungos endofíticos selecionados da coleção.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massas dos extratos brutos obtidos nos cultivos axênicos e mistos.....	32
Tabela 2 – Doses letais (CL ₅₀) dos extratos dos fungos endofíticos contra larvas de 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i>	34
Tabela 3 - Massas dos extratos brutos obtidos nos cultivos mistos de fungos amazônicos e antárticos.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

AcOEt – Acetato de etila

C₆H₁₁FeNO₇ – Citrato amônio férrico

C₆H₈O₇ – Ácido cítrico

CaCl₂.2H₂O – Cloreto de cálcio diidratado

CH₂Cl₂ – Diclorometano

CH₂O₂ – Ácido fórmico

CHIKV – Vírus da chikungunya

CID – Dissociação induzida por colisão

CL₅₀ – Concentração de extrato letal à 50% da população larval exposta a um teste

CL-MS – Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas

CLUR-DAD – Cromatografia Líquida Ultra Rápida com detecção por arranjo de diodos

Co(NO₃)₂.6H₂O – Nitrato de cobalto hexahidratado

CuSO₄.5H₂O – Sulfato de cobre pentahidratado

DENV – Vírus da dengue

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ESI – Electrospray ionization

H₂O – Água

H₃BO₃ – Ácido bórico

K₂HPO₄ – Fosfato de potássio dibásico

KCl – Cloreto de potássio

MeOH – Metanol

MgCl₂.6H₂O – Cloreto de magnésio hexahidratado

MgSO₄.7H₂O – Sulfato de Magnésio heptaidratado

MnCl₂.4H₂O – Cloreto de manganês (II) tetrahidratado

Na₂CO₃ – Carbonato de sódio

Na₂MoO₄.2H₂O – Molibdato de sódio diidratado

NaCl – Cloreto de sódio

NaNO₃ – Nitrato de sódio

PDA – Agar batata dextrose

PDB – Caldo de batata dextrose

SPE - Extração em fase sólida

YFV – Vírus da febre amarela

ZIKV – Vírus da zika

ZnSO₄.7H₂O – Sulfato de zinco heptaidratado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 Hemiparasita <i>Passovia stelis</i>	6
2.2 Macroalga <i>Phaeurus antarcticus</i>	7
2.3 <i>Aedes aegypti</i> e a transmissão de arboviroses	9
2.4 Fungos endofíticos	13
2.5 Co-cultivo fúngico	15
2.6 Aplicação de Redes Moleculares (Molecular Networking) na desreplicação de produtos naturais.....	18
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Materiais e instrumentos	22
4.1.1 Especificações dos instrumentos, colunas e fases estacionárias.....	22
4.1.2 Especificações dos solventes	23
4.1.3 Especificações dos meios de cultura	23
4.2 Métodos	24
4.2.1 Espécies vegetais	24
4.2.2 Isolamento e identificação das cepas fúngicas	24
4.2.3 Reativação fúngica e obtenção dos extratos	25
4.2.4 Avaliação da atividade larvicida.....	26
4.2.5 Co-cultivo entre fungos amazônicos e antárticos e obtenção dos extratos.....	27
4.2.6 Avaliação química dos extratos	28
4.2.7 Análise por Rede Molecular (Molecular Networking).....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Reativação e obtenção dos extratos	30
5.2 Avaliação da atividade larvicida.....	32
5.3 Avaliação química dos extratos	36
5.3.1 Análise por Rede Molecular (Molecular Networking).....	39
6. CONCLUSÃO	44
7. REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

Os mosquitos constituem um grupo de artrópode que representa uma grande ameaça à saúde humana por serem os transmissores de várias doenças (NALINI *et al.*, 2017). Entre as espécies de mosquitos, *Aedes aegypti* se destaca como o principal agente envolvido na manutenção, replicação e transmissão da febre amarela, chikungunya, zika e dengue (PILZ-JUNIOR *et al.*, 2019).

O controle de *Ae. aegypti* tem um papel fundamental na prevenção e redução da transmissão dessas doenças e, para isso, estratégias têm sido implementadas como o uso de inseticidas sintéticos sobre os diferentes estágios do mosquito. No entanto, esses produtos geram resíduos tóxicos e não biodegradáveis, que podem contaminar o meio ambiente e provocar efeitos indesejáveis em organismos não-alvos (BARABADI *et al.*, 2019; ZOUBIRI; BAALIOUAMER, 2014). Além disso, o uso contínuo desses inseticidas tem ocasionado a disseminação de resistência nas populações do vetor, comprometendo sua eficiência (WANG, Z *et al.*, 2019). Há, portanto, a necessidade de desenvolver outros meios de combate a esse agente transmissor que sejam eficientes e que não ofereçam riscos ao ambiente e aos seres. Nesse sentido, os produtos naturais têm ganhado destaque, pois são fontes de compostos bioativos provenientes do metabolismo secundário de plantas, animais e microrganismos que possuem diversas atividades biológicas (SINHA *et al.*, 2019).

Entre os microrganismos, os fungos destacam-se pela capacidade de produzir uma variedade de metabólitos secundários com alta diversidade química e estima-se que apenas 5% das espécies foram descritas quanto ao potencial metabólico, demonstrando que ainda há bastante a ser explorado (BARBERO *et al.*, 2017; SEGARAN; SATHIAVELU, 2019). Em meio a essas espécies estão os endofíticos, assim chamados por habitarem simbioticamente os tecidos internos de plantas (LI *et al.*, 2018).

Sabe-se que maioria das plantas contém pelo menos um endofítico e há as que abrigam centenas de espécies (BARABAN *et al.*, 2013). As regiões tropicais se destacam pela vasta variedade vegetal, tal como a Floresta Amazônica, que possuem uma rica biodiversidade e, por isso, abrigam um grande número de microrganismos (SILVA *et al.*, 2018). Um exemplo é a planta hemiparasita *Passovia stelis* (L.) Kuijt (Lorantaceae), cujo gênero é de comum ocorrência na Região Norte do Brasil (ARRUDA *et al.*, 2012) e a partir da qual foram isolados fungos endofíticos dos gêneros *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Guignardia*, *Phomopsis*, *Pestalotiopsis* e *Xilaria*.

O ambiente marinho também é apontado como uma rica fonte de compostos bioativos (MACIEL *et al.*, 2018), com destaque para as macroalgas Phaeophyceae (algas marrons), que são numerosas em regiões polares, como a Antártica (TEIXEIRA *et al.*, 2019a). Entre as espécies endêmicas de macroalgas do continente antártico destacam-se aquelas do gênero *Phaeurus*, que é de comum ocorrência nesse região (PEREIRA *et al.*, 2016) e é hospedeiro de fungos endofíticos responsáveis pela produção de metabólitos secundários muitas vezes diferentes dos encontrados no ambiente terrestre (MACIEL *et al.*, 2018, TEIXEIRA *et al.*, 2019a).

Os fungos endofíticos são potenciais produtores de substâncias que podem ser utilizadas no combate a *Ae. aegypti*. A Região Amazônica possui um ambiente ideal para o desenvolvimento desses artrópodes, mas também contém uma diversidade de espécies endofíticas com capacidade que serem usadas em seu controle. O continente antártico, por sua vez, não possui um ambiente receptivo a esse vetor, mas também é visto como uma rica fonte de compostos novos que podem ser aplicados como agente pesticidas.

Portanto, no presente trabalho foram realizadas avaliações da atividade larvicida contra larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti*, dos extratos dos fungos endofíticos dos gêneros *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Guignardia*, *Phomopsis* e *Xylaria* isolados da planta *P. stelis* e dos fungos endofíticos *Arthrimum* sp. e *Epicoccum dendrobii* isolados da alga antártica *P. antarcticus*. Posteriormente, fez-se o co-cultivo entre fungos de origem amazônica e antártica, a fim de se avaliar a influência sobre a atividade larvicida dos extratos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hemiparasita *Passovia stelis*

Plantas hemiparasitas são organismos que se ligam a um hospedeiro através de uma estrutura chamada haustório por meio da qual adquirem água e nutrientes (YOSHIDA *et al.*, 2016). O haustório é especializado para fixação, invasão, conexão vascular e transferência de material entre o hospedeiro e o parasita (TRONCOSO *et al.*, 2010; YOSHIDA *et al.*, 2016). Elas são diversificadas, sendo estimado que existam aproximadamente 4.500 espécies (KOKLA; MELNYK, 2018).

A família Loranthaceae é distribuída em 77 gêneros e em cerca de 1.000 espécies, que são comumente chamadas de viscos (LIU *et al.*, 2018; SUAZA-GAVIRIA *et al.*, 2017). As suas folhas são curvas e na maioria das espécies têm arranjo oposto (NICKRENT *et al.*, 2010). No Brasil, a família Loranthaceae está distribuída por todos os biomas e é representada por 12 gêneros e 131 espécies (ARRUDA *et al.*, 2012; SCALON *et al.*, 2016). Os gêneros *Cladocolea*, *Gaiadendron*, *Peristethium*, *Oryctanthus*, *Struthanthus*, *Psittacanthus* e *Passovia* ocorrem na Região Norte do país, sendo os três últimos mais diversificados na flora brasileira do que em outros países sul-americanos (ARRUDA *et al.*, 2012).

As espécies *Psittacanthus acinarius* e *Passovia pedunculata* são utilizadas tradicionalmente no tratamento de câncer segundo Rieder e colaboradores (2015). A atividade anticancerígena dessas espécies é atribuída à lectinas e a polissacarídeos produzidos por elas e que podem atuar no fortalecimento da imunidade, retardamento da progressão de tumores e/ou na eliminação destes. A fisetina, outro princípio ativo presente em nesses vegetais, inibe a proliferação de células cancerígenas e induz a apoptose (RIEDER *et al.*, 2015).

A espécie *Passovia stelis* (**Figura 1**) é comumente encontrada na Região Amazônica e, até o momento, não há estudos a respeito de seu perfil químico ou que indiquem propriedades biológicas para fins terapêuticos. No entanto, com base no conhecimento tradicional, essa espécie é utilizada como agente adstringente, antidiarreico, antiasmático, antileucorreico, antidiabético, anti-hemorragico, hemostático, cicatrizante, broncodilatador, contra tosses e pneumonia (SILVA *et al.*, 2020). Além disso, a *Passovia stelis* é hospedeira de várias espécies fúngicas, conforme a pesquisa realizada por Silva e colaboradores (2020), na qual foram isolados 104 fungos endofíticos, dos quais 73 foram identificados como pertencentes aos gêneros *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Phomopsis* e *Xylaria*.

Figura 1 - Ramo de *Passovia stelis* com folhas, flores e frutos.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2021)

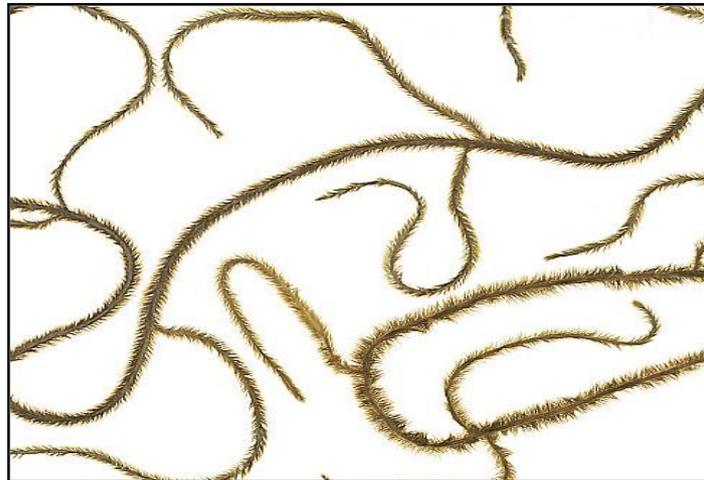
2.2 Macroalga *Phaeurus antarcticus*

As algas representam um grupo heterogêneo de organismos fotossintéticos compostos por microalgas (unicelulares) e macroalgas (multicelulares) (BIRIS-DORHOI *et al.*, 2020). A classe Phaeophyceae (macroalgas marrons) consiste em 13 ordens, no entanto apenas 3, nomeadas Laminariales, Fucales e Dictyiales, foram extensivamente investigadas quanto ao conteúdo fitoquímico (MEKINIC *et al.*, 2019; HAKIM; PATEL, 2020). Ao todo, as macroalgas marrons possuem cerca de 265 gêneros e 2.040 espécies, das quais 95% são organismos marinhos de ocorrência prevalente em águas de regiões temperadas e frias (MEKINIC *et al.*, 2019). Pelo conhecimento tradicional, elas são aplicadas no tratamento de tosse, asma, fadiga, hemorroidas, inflamações e prevenção de câncer (HAKIM; PATEL, 2020).

No continente Antártico, as macroalgas marrons são representadas principalmente por espécies da ordem Desmarestiales (TEIXEIRA *et al.*, 2019a). As macroalgas antárticas não são tão diversificadas quanto as de outras regiões, porém são caracterizadas pelo alto grau de endemismo e pela adaptação a condições extremas (GODINHO *et al.*, 2013). Pertencente à

ordem Demarestiales e à família Desmarestiaceae, a espécie *Phaeurus antarcticus* (**Figura 2**) é uma das principais representantes endêmicas da Antártica (PETERS *et al.*, 1997, TEIXEIRA *et al.*, 2019b). Ela ocorre em poças intertidais e em zonas subtidais a uma profundidade de 8 a 10 metros. O gênero é monotípico, cuja espécie é considerada a mais primitiva da família devido à forma simples do talo. *P. antarcticus* tem o eixo principal terete e um padrão de ramificação oposto com frondes que podem atingir até 1 metro de comprimento (CLAYTON; WIENCKE, 1990).

Figura 2 - Alga marrom *Phaeurus antarcticus*.



Fonte: Solvin Zankl (Nature Picture)

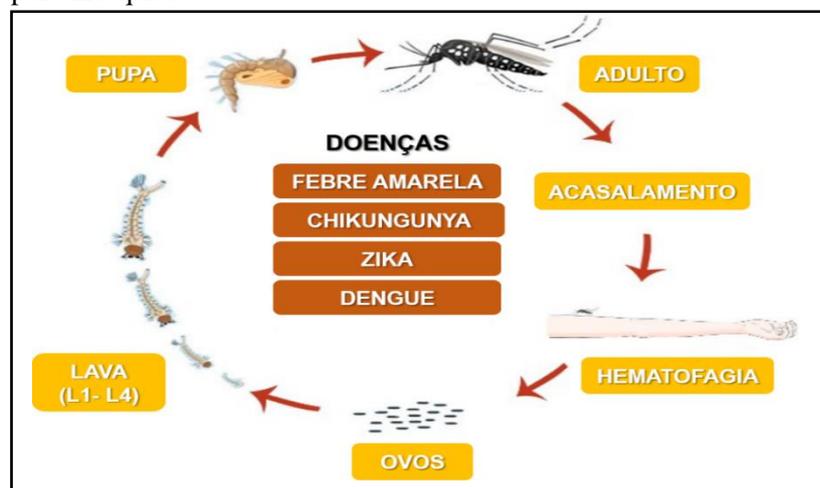
Uma investigação da composição metabólica de *P. antarcticus* revelou a presença do fucosterol, fitol, sitosterol, estigmasterol, entre outros metabólitos. O principal componente foi o fucosterol, que é descrito como um agente antidiabético. O segundo componente mais abundante foi o fitol, que possui ação antioxidante e anticolinesterásica. O sitosterol é relatado como anti-inflamatório, anti-helmíntico, analgésico, quimioprotetor e imunomodulador. O estigmasterol é indicado como agente anti-inflamatório e antiperoxidativo (TEIXEIRA *et al.*, 2019a). Existem poucos relatos sobre o perfil químico de macroalgas marinhas da Antártica, sendo o estudo de Teixeira e colaboradores (2019a), o primeiro que investigou a composição metabólica de *P. antarcticus*.

2.3 *Aedes aegypti* e a transmissão de arboviroses

Os mosquitos são responsáveis pela transmissão de diversas arboviroses e *Aedes aegypti* é uma das espécies de maior consequência para a saúde pública mundial, devido a ampla distribuição geográfica e ao fácil desenvolvimento em ambientes urbanos (SMITH *et al.*, 2019). As doenças transmitidas por *Ae. aegypti* representam um problema recorrente, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, que possuem condições ambientais ideais ao desenvolvimento desse artrópode (SHAW; CATTERUCCIA, 2019). No entanto, surtos graves vêm sendo registrados em áreas anteriormente não afetadas, devido à expansão do nicho ecológico do mosquito e consigo a febre amarela, chikungunya, zika e dengue, impulsionado pelo aquecimento global e por atividades humanas, como a urbanização (WILKE *et al.*, 2019).

Essas doenças têm como agentes etiológicos vírus de RNA de fita simples, sendo o da febre amarela (YFV), zika (ZIKV) e dengue (DENV) pertencentes ao gênero *Flavivírus* e o da chikungunya (CHIKV) um *Alfavírus*. Esses vírus, assim como *Ae. aegypti* são nativos da África, mais precisamente do Egito (SOUZA-NETO *et al.*, 2019) e ocorrem atualmente em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (CUNZE *et al.*, 2018; SILVÉRIO *et al.*, 2020). O mosquito apresenta metamorfose completa, passando pelos estágios imaturos de ovo, larva (4 estágios) e pupa até chegar à fase adulta, conforme representado na **Figura 3**. O ciclo de vida depende das condições ambientes como temperatura, disponibilidade de alimento e quantidade de larvas presentes no mesmo criadouro. Na ausência de água, os ovos permanecem viáveis por até 450 dias. Em condições favoráveis, há a eclosão dos ovos e em um período médio de 10 dias ocorre as transições entre os estágios imaturos para a fase adulta (SILVÉRIO *et al.*, 2020).

Figura 2 - Ciclo de vida de *Aedes aegypti* e as doenças transmitidas pelo mosquito.



Fonte: SILVÉRIO *et al.* 2020 (adaptado)

A transmissão dos vírus YFV, CHIKV, ZIKV e DENV acontece em ciclos silváticos e urbanos. Os primatas são os reservatórios silváticos e humanos que têm contato com florestas tropicais ou que vivem próximos a elas ficam susceptíveis a adquirir os vírus no ato da hematofagia realizada pelos mosquitos. Nas áreas urbanas o ciclo se dá através dos seres humanos infectados e os agentes transmissores, sendo *Ae. aegypti* o principal (FREITAS *et al.*, 2019). Essas doenças causam sintomas semelhantes, como febre alta e dor nas articulações, porém cada uma tem sua patologia única (SOUZA-NETO *et al.*, 2019).

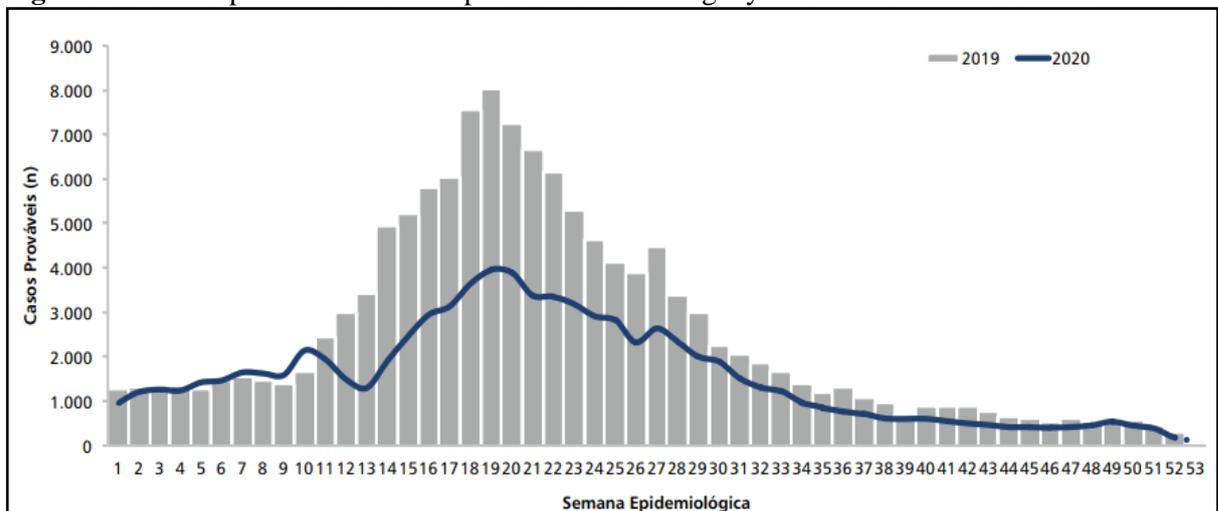
A febre amarela, em casos graves, apresenta sangramentos e insuficiência hepática levando a estados clínicos delicados (FREITAS *et al.*, 2019). A chikungunya é uma doença musculoesquelética que afeta principalmente as articulações periféricas (SILVA; DERMODY, 2017). Ela se apresenta em estágios agudo, que tem duração de uma semana aproximadamente, e crônico, que pode persistir por anos (GANESAN *et al.*, 2017). Zika é associado a doenças neurológicas graves, como a síndrome de Guillain-Barré, caracterizado por fraqueza muscular e danos no sistema nervoso periférico e a microcefalia, na qual ocorre a infecção do cérebro fetal, resultando no desenvolvimento não adequado e um crânio reduzido (DÉNES *et al.*, 2019). A Dengue possui cinco sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1 a DENV-5) (AMEMIYA *et al.*, 2019; MAZLAN *et al.*, 2019) e as infecções podem se apresentar em diferentes formas, as quais vão desde estados assintomáticos até hemorrágicos (dengue grave), em que há o aumento da permeabilidade vascular, resultando em choque e disfunção de órgãos (JAYATHILAKA *et al.*, 2018). Há também nos casos graves a ocorrência epistaxe, petéquia, extravasamento de plasma, trombocitopenia, sangramento gastrointestinal e hematúria, sendo os dois últimos os mais associados à morte (PINTO *et al.*, 2016).

A febre amarela é endêmica em 47 países, sendo 34 na África e 13 nas Américas Central e Sul (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019a). Apesar da disponibilidade de vacina eficiente, vem sendo registrado um aumento de casos da doença em países africanos e americanos (MIOT *et al.*, 2019). No Brasil, os maiores surtos ocorreram entre os anos de 2016 e 2018, quando cerca de 2,1 mil casos foram notificados e mais de 700 óbitos. No período de monitoramento entre julho de 2019 e o fevereiro de 2020, foram notificados 503 casos humanos suspeitos no Brasil, havendo 1 óbito no estado do Pará (BRASIL, 2020). Entre julho de 2020 e janeiro de 2021 foram notificados 125 casos humanos suspeitos e nenhuma morte registrada (BRASIL, 2021a).

A chikungunya ocorre em mais de 60 países da África, Ásia, Europa e América. Não existe medicamentos antivirais específicos para a doença e o tratamento é realizado com

antipiréticos e analgésicos para o alívio dos sintomas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020a). A doença apresenta baixa mortalidade (SUHRBIER, 2019), no entanto, a poliartralgia é observada em 30 a 40% dos indivíduos infectados, podendo persistir por anos e ser debilitante ao ponto de dificultar até as atividades diárias mais simples (CUNHA; TRINTA, 2017). No Brasil, em 2020 houve um decaimento dos casos de chikungunya em relação a 2019, conforme apresenta a **Figura 4**. Entre dezembro de 2019 e janeiro de 2021 foram notificados 82.419 casos prováveis de infecções pelo CHIKV no Brasil, com uma taxa de incidência de 39,2 casos por 100 mil habitantes. Neste período foram confirmados por critério laboratorial 30 óbitos e 23 casos permanecem em investigação (BRASIL, 2021b).

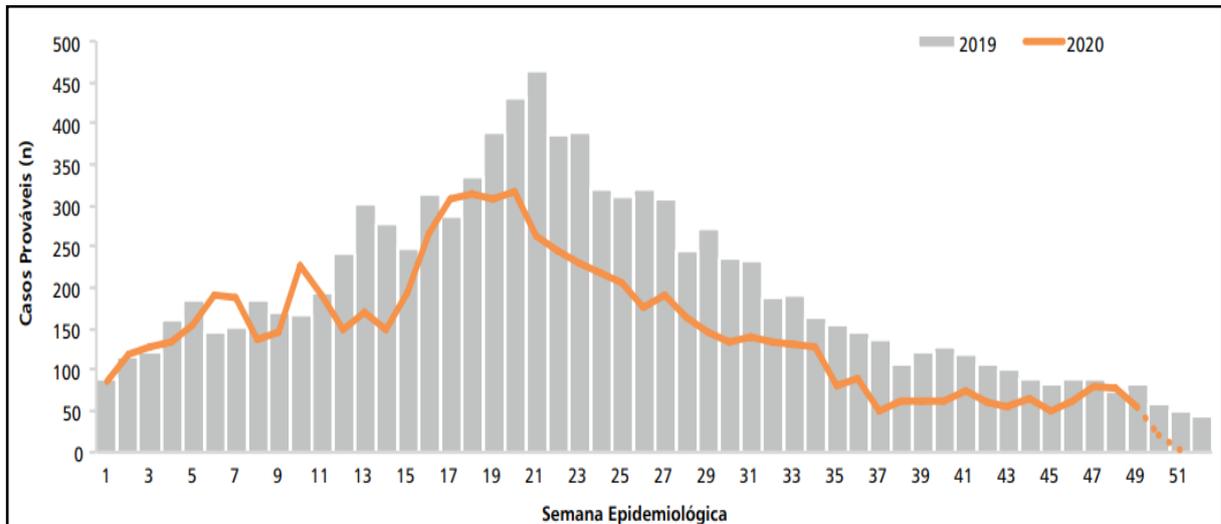
Figura 3 - Curva epidêmica dos casos prováveis de chikungunya no Brasil em 2019 e 2020.



Fonte: Sinan Online, 2020

O zika vírus foi declarado como uma emergência internacional de saúde em 2016, após a verificação de complicações na gravidez e malformações fetais associadas ao vírus. É estimado que de 5 a 15% dos nascidos de mulheres infectadas tenham evidências dessas complicações (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020b). Há o agravante da falta de vacina ou terapias específicas para a prevenção e tratamento (DÉNES *et al.*, 2019). Até julho de 2019 foram contabilizados 87 países e territórios em regiões africanas, americanas, do sudeste asiático e do Pacífico Oriental com registros de transmissão do ZIKV por meio de mosquitos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019b). No Brasil, entre dezembro de 2019 e janeiro de 2021, foram notificados 7.387 casos prováveis da doença, tendo uma taxa de incidência de 3,5 casos por 100 mil habitantes. Em 2020 houve uma diminuição do número de casos em relação ao ano anterior, conforme apresenta a **Figura 5** (BRASIL, 2021b).

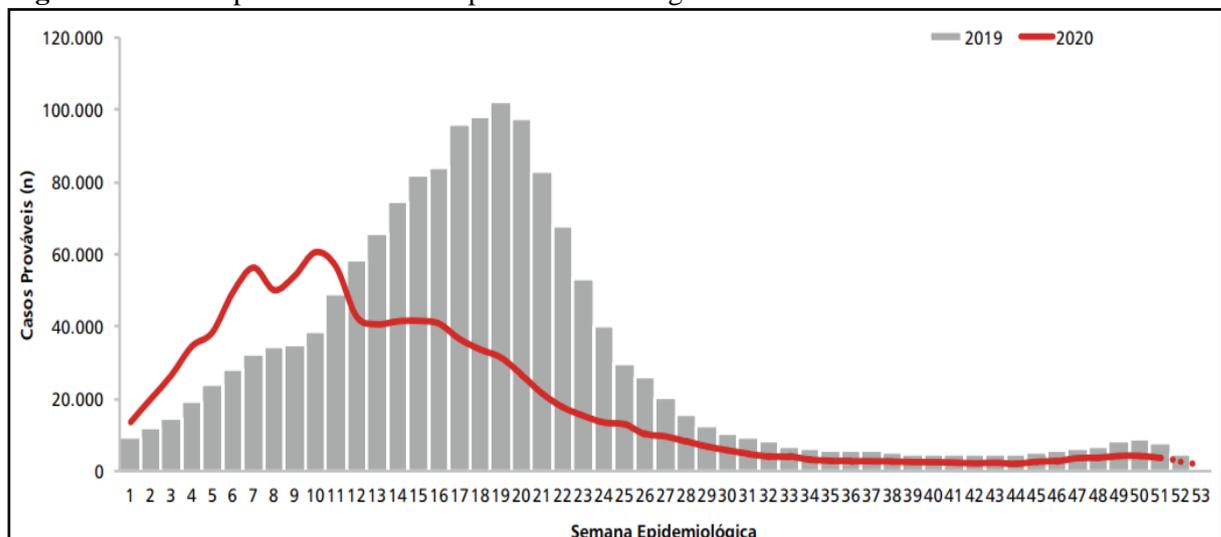
Figura 4 - Curva epidêmica dos casos prováveis de zika no Brasil em 2019 e 2020.



Fonte: Sinan Online, 2020

A dengue é a arbovirose mais grave transmitida pelo *Ae. aegypti* (FERREIRA-DE-LIMA *et al.*, 2020), visto que metade da população mundial está em risco de contrai-la, sendo estimado que haja em média 390 milhões de infecções por ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Ela é endêmica em mais de 100 países nos continentes africano, asiático e americano (ANG *et al.*, 2019). Na América, o Brasil é o país com mais registros, sendo considerado endêmico, com a circulação de quatro sorotipos (DENV-1 a DENV-4) (GARCIA *et al.*, 2018). Em 2019 houve um aumento de 599,5% no número de casos em comparação ao ano anterior no Brasil (BRASIL, 2019). Essa tendência crescente ainda continuou sendo registrada, pois no início de 2020 a curva epidêmica dos casos prováveis ultrapassou os números registrados no mesmo período em 2019 (**Figura 6**).

Figura 5 - Curva epidêmica dos casos prováveis de dengue no Brasil em 2019 e 2020.



Fonte: Sinan Online, 2020

A partir de fevereiro de 2020 foi observada uma diminuição dos casos prováveis e óbitos causados por dengue. Entre dezembro de 2019 e fevereiro de 2021 foram registrados 987.173 casos prováveis de dengue no Brasil, o que corresponde a uma taxa de incidência de 469,8 casos por 100 mil habitantes. Neste período foram confirmados 826 casos de dengue grave (DG) e 9.072 casos de dengue com sinais de alarme (DSA). Destes, houveram 554 óbitos, sendo 456 (82,3%) confirmados por critério laboratorial e 97 (17,6%) por critério clínico-epidemiológico. 122 óbitos permaneceram sob investigação (BRASIL, 2021b).

O número de casos das arboviroses transmitidas por *Ae. aegypti* caiu de 2019 para 2020 no Brasil. Essa queda pode estar relacionada a uma subnotificação devido a maior atenção e mobilização das equipes de vigilância epidemiológica para o enfrentamento da pandemia do Covid-19 e ao receio da população em procurar atendimento em uma unidade de saúde (BRASIL, 2021b). O fato é que a ocorrência dessas doenças tem aumentado em todo o mundo (SARMA *et al.*, 2019) e há vacina eficiente somente para o vírus da febre amarela, pois a aplicada contra o vírus da dengue apresenta uma eficiência de apenas 60% (PILZ-JUNIOR *et al.*, 2019).

Uma estratégia para a redução da ocorrência dessas doenças é o controle do vetor, através da eliminação de criadouros e principalmente por meio da aplicação de inseticidas (HELVECIO *et al.*, 2020). Os piretroides, carbamatos e organoclorados são as principais classes utilizadas em todo o mundo para o controle de mosquitos, os quais agem no sistema nervoso central (SILVA *et al.*, 2021). No entanto, o uso extensivo destes agentes químicos tem ocasionado o surgimento de resistência nas populações de *Ae. aegypti*, o que limita a atuação dos inseticidas sintéticos e impulsiona a busca por novos meios de controle (SARMA *et al.*, 2019; SMITH *et al.*, 2019). Nesse sentido os produtos naturais fúngicos têm ganhado destaque, sendo visto como meios alternativos aos inseticidas químicos.

2.4 Fungos endofíticos

O termo endofítico (do grego: endon-dentro; fito-planta) teve sua origem em 1866, quando o botânico alemão Anton de Bary o usou em referência a microrganismos presentes no interior de plantas (EL-HAWARY *et al.*, 2020). No conceito amplo, eles são descritos como aqueles que colonizam regiões intercelulares e/ou intracelulares de tecidos vegetais vivos e saudáveis, sem causar sintomas patogênicos aparentes (SOARES *et al.*, 2017). São biotróficos

facultativos e, portanto, podem completar seu ciclo de vida fora de seu hospedeiro (OMOARELOJIE; STADEN, 2020).

A associação de fungos endofíticos e hospedeiros é considerada um antagonismo equilibrado (ANCHEEVA *et al.*, 2020), que varia entre a virulência fúngica e a defesa vegetal, sendo que ambos se beneficiam dessa relação, pois o hospedeiro fornece proteção e nutrição aos endofíticos e estes, por sua vez, produzem substâncias que são importantes para o desenvolvimento, competitividade e defesa do vegetal (LI *et al.*, 2018; EL-HAWARY *et al.*, 2020). Devido a isso, esses microrganismos representam uma rica fonte de compostos bioativos que pertencem a várias classes químicas (ANCHEEVA *et al.*, 2020), como alcaloides, terpenoides, compostos fenólicos, esteroides, flavonoides e ácidos orgânicos, que apresentam atividades como antioxidante, antiviral, antidiabética, antibiótica, anticâncer e imunossupressora (LI *et al.*, 2018).

Notadamente, produtos naturais derivados de fungos endofíticos são capazes de apresentar várias ações bioativas e entre elas está a toxicidade para mosquitos (GOVINDARAJAN *et al.*, 2005). Isso os credenciam à aplicação na projeção de pesticidas com novos e mais específicos modos de ação, o que tende a dificultar a resistência por parte das populações de *Ae. aegypti*. Apesar do indiscutível potencial, a aplicação de metabólitos secundários fúngicos na projeção de produtos larvicidas comerciais ainda é limitada (MASI *et al.*, 2018).

A eficiência de compostos larvicidas derivados de fungos endofíticos contra o *Ae. aegypti* foi comprovada em pesquisas com extratos brutos de *Pestalotiopsis virgulata* (BÜCKER *et al.*, 2013), *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. (SATHIYANATHAN; UMARAJAN, 2019) e *Hyalodendriella* sp. (MAO *et al.*, 2020). Ragavendran e colaboradores (2019) destacam os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Podospora* e *Stoloniferum* como os que mais comumente apresentam atividade larvicida. Os fungos *Botryodiplodia theobromae*, *Berkleasmium* sp., *Cochliobolus spicifer*, *Pezicula livida*, *Phomopsis liquidambaris* também são citados no trabalho de Pinheiro e colaboradores (2020) como potenciais produtores de compostos larvicidas.

A maior diversidade de fungos endofíticos no ambiente terrestre está presente em florestas tropicais e subtropicais, pois esses ecossistemas são os mais ricos em espécies vegetais e é natural se esperar que áreas com alta endemicidade de plantas também possuam uma variedade de espécies endofíticas (BANERJEE, 2011; ORLANDELLI *et al.*, 2012). Nesses ambientes a corrida evolutiva pela sobrevivência é mais intensa e a competição é constante.

Essas condições estimulam a produção de uma infinidade de metabólitos secundários pelos fungos endofíticos e indica a alta probabilidade de serem fontes de novas estruturas moleculares biologicamente ativas (ROSA *et al.*, 2011).

Várias atividades como antimicrobiana, citotóxica, antioxidante, anti-inflamatória são relatadas para compostos bioativos obtidos de fungos endofíticos de comum ocorrência no ambiente amazônico, tais como dos gêneros *Colletotrichum* (FENG *et al.*, 2019, MUNASINGHE *et al.*, 2017), *Diaporphe* (LIU *et al.*, 2019; MEDEIROS *et al.*, 2018; SONG *et al.*, 2019; TANAPICHATSAKUL *et al.*, 2018) *Guignarida* (BIN *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2019; WANG, 2012), *Phomopsis* (CHAPLA *et al.*, 2014; JAYANTHI *et al.*, 2011; JOUDA *et al.*, 2016) e *Xilária* (ADNAN *et al.*, 2018; ELIAS *et al.*, 2018; PATJANA *et al.*, 2019).

A Antártica representa um ecossistema único cujas condições climáticas são extremamente estressantes e severas. As macroalgas marinhas endêmicas da Antártica abrigam um grande número de microrganismos (RAMOS *et al.*, 2018). As comunidades fúngicas endofíticas antárticas são capazes de sobreviver sob condições extremas que incluem baixas temperaturas, alta radiação, ciclos de congelamento e descongelamento, baixa concentração de nutrientes e estresse osmótico (GODINHO *et al.*, 2013). Os gêneros *Arthrinium* e *Epicoccum*, são de comum ocorrência no ambiente antártico e possuem grande potencial metabólico que ainda é subexplorado (TEIXEIRA *et al.*, 2019b). Devido as condições extremas, esses fungos desenvolvem respostas adaptativas por meio de alterações metabólicas resultando em compostos bioativos diferenciados (TORRES *et al.*, 2016), que apresentam atividades como antioxidante, fotoprotetora, antimicrobiana, citotóxica, anti-inflamatória e antiviral (TEIXEIRA *et al.*, 2019b).

2.5 Co-cultivo fúngico

Na natureza os microrganismos endofíticos coexistem em complexas comunidades multiespécies, que interagem umas com as outras (OPPONG-DANQUAH *et al.*, 2020). A variedade de cepas endofíticas nos tecidos de um hospedeiro pode ser da ordem de centenas, de modo a haver intensa competição por espaço e nutrientes (CHAGAS *et al.*, 2018). As interações microbianas nesse ambiente se baseiam na produção de compostos biologicamente ativos a partir do metabolismo secundário, que atuam como sinais químicos para a comunicação, mecanismos de defesa e competição por recursos (AKONE *et al.*, 2016).

Nos métodos de cultivo fúngico tradicionais ocorre o crescimento de uma única cepa em um meio de cultura rico em macro e micronutrientes, com temperatura e pH constantes e isolamento de qualquer outro microrganismo. Em meio a essas condições, muitos metabólitos secundários, que são envolvidos em interações, comunicações, formação de alianças ou conflitos intra e interespecies, não são produzidos em decorrência da falta de outros microrganismos no mesmo ambiente (NAI; MEYER, 2017). Portanto, apesar de ser possível se obter bons resultados do ponto de vista da produção metabólica, esses métodos laboratoriais contrastam bastante com o complexo ambiente natural em que os microrganismos originalmente vivem e coexistem (OKADA; SEYEASAYAMDOST, 2016).

A partir de investigações genômicas foi possível verificar que microrganismos possuem um grande número de genes biossintéticos que não são ativados em condições laboratoriais padrões de cultivo (CHAGAS *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2017). Desse modo, muitos “clusters” de genes responsáveis pela síntese de metabólitos secundários presentes no ambiente natural permanecem silenciosos, limitando de forma significativa a diversidade química dos compostos bioativos em condições de crescimento não natural (ZHANG *et al.*, 2017; PENG *et al.*, 2021). Esses estudos evidenciam que metabólitos secundários obtidos por meio de cultivos isolados (axênicos) são adquiridos de uma pequena fração de genes biossintéticos, sendo que meios estratégicos para a ativação de “clusters” de genes silenciosos (crípticos) podem ter impacto expressivo na obtenção de produtos naturais estruturalmente diversificados (OKADA; SEYEASAYAMDOST, 2016). Com esse intuito, foram desenvolvidos vários métodos a níveis de genoma, proteoma e metaboloma na tentativa de expandir a exploração do potencial biossintético microbiano (YU *et al.*, 2019).

Uma estratégia eficiente para a obtenção de compostos bioativos diversificados é a manipulação das condições de fermentação por meio da co-cultura, também concedida como cultivo misto (LI *et al.*, 2017). Nessa técnica, duas ou mais cepas diferentes são cultivadas juntas no mesmo ambiente, na tentativa de simular artificialmente as condições naturais de vida microbiana. A partir do estresse induzido, genes silenciosos podem ser transcritos, resultando na produção de compostos crípticos não detectados em culturas axênicas (TAN *et al.*, 2019). Essa estratégia é relativamente simples e eficiente, que não necessita de operações a nível genético (ZHANG *et al.*, 2017; PENG *et al.*, 2021). Por meio da co-cultura é possível obter novos metabólitos secundários e também aumentar os rendimentos de compostos previamente observados em culturas axênicas (AKONE *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017).

A indução de “clusters” de genes silenciosos por microrganismos coexistindo em um ambiente, pode resultar dos seguintes modos de interação: por meio de moléculas de difusão de uma cepa que atuam como precursores indutores de metabólitos secundários na(s) outra(s) cepa(s); como mecanismo de defesa química, que induz a produção de metabólitos para competição; através do contato célula-célula induzindo a ativação de agrupamentos de genes crípticos na(s) cepa(s) confrontada(s) (OKADA; SEYEASAYAMDOST, 2016; PENG *et al.*, 2021). É importante destacar que não é claro quais “clusters” de genes biosintéticos serão ativados em culturas mistas e, portanto, essas complexas interações além induzir a síntese de novos metabólitos ou aumentar os rendimentos de outros previamente sintetizados, podem também causar o efeito contrário, diminuindo a produção de metabólitos previamente observados em cultivos axênicos (PENG *et al.*, 2021).

Os efeitos indutivos da co-cultura foram descritos no estudo de Yu e colaboradores (2019), que realizaram o cultivo misto do fungo *Penicillium crustosum*, isolado do lodo do mar profundo da Antártica (WU *et al.*, 2012), com o *Xylaria* sp. isolado da raiz de *Sonneratia caseolaris* coletada em uma região de mangue no Hainan, China. Foi observado que o novo composto penixilarina A foi produzido a partir do co-cultivo, enquanto que outro composto chamado penixilarina C foi produzido por *Xylaria* sp. sozinho, porém em quantidades visivelmente aumentadas a partir do cultivo misto (YU *et al.*, 2019).

Li e colaboradores (2017) realizaram o cultivo misto entre os fungos endofíticos *Camporesia sambuci* e *Epicoccum sorghinum* isolados do fruto de *Rhodomyrtus tomentosa*, coletado na Ilha Grande no Havaí. O procedimento resultou na identificação do novo composto 11S-hidroxi-1-metoxifusaricida, que não foi produzido por nenhum dos fungos individualmente, sendo, portanto, resultante da co-cultura. A investigação de LC-MS indicou que 11S-hidroxi-1-metoxifusaricida possui similaridade estrutural com outro composto produzido por *E. sorghinum* sozinho. Devido a isso, os autores sugeriram que o composto deveria ser observado no cultivo axênico de *E. sorghinum*, porém não foi possível provavelmente devido ao baixo rendimento ou por gene silenciado. Foi notado ainda que vários compostos sintetizados por *C. sambuci* sozinho estavam ausentes na co-cultura, indicando que os genes responsáveis pela produção desses compostos foram silenciados no cultivo misto com *E. sorghinum* (LI *et al.*, 2017).

A ausência, na co-cultura, de metabólico que foram previamente observados em cultivos axênicos pode também ser consequência de biotransformação. Nesse processo ocorre modificações em um composto, causando-lhe diversificação estrutural, tendo como produto um

outro composto semelhante. A biotransformação dá-se por meio de catalisadores biológicos, que podem ser microrganismo(s) e/ou sua(s) enzima(s). Os microrganismos podem catalisar várias reações, a exemplo de hidroxilação, desidrogenação, metilação, resultando em modificações estruturais de um composto bioativo, mantendo a sua estrutura central de origem (SANTOS; SILVA, 2019; XIAO *et al.*, 2021).

No geral, destaca-se que a co-cultura fúngica é uma ferramenta promissora para o aumento da descoberta de novos compostos bioativos. A possibilidade de se obter estruturas químicas inéditas chama atenção, visto que a taxa de isolamento de moléculas conhecidas está aumentando gradualmente (CHEN *et al.*, 2020). Isso não significa que a exploração de produtos naturais está saturada, mas sim que são necessárias novas estratégias para estimular a produção metabólica e, nesse sentido, a cultura mista tem mostrado considerável desempenho. Nota-se que ainda não há estudos que relatem a obtenção de produtos naturais larvicidas a partir de cultivos mistos e isso desperta o interesse para a investigação desse potencial subexplorado, na expectativa de se obter compostos que possam ser aplicados no combate a *Ae. Aegypti*.

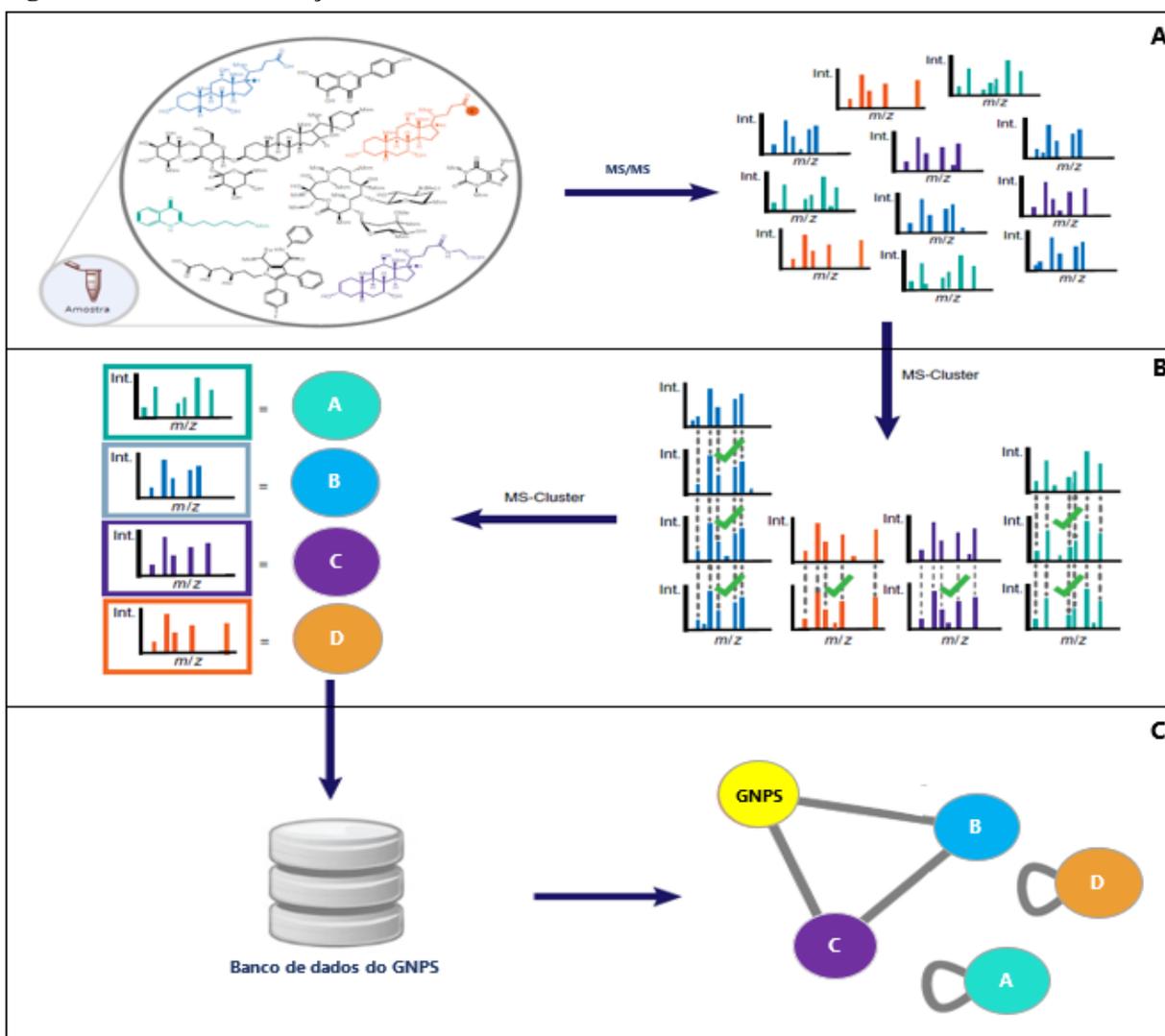
2.6 Aplicação de Redes Moleculares (Molecular Networking) na desrepliação de produtos naturais

Produtos naturais são rotineiramente analisados por Espectrometria de Massa (EM), que em um único processo pode gerar milhares de espectros MS/MS. A enorme quantidade de dados espectrais gerados torna a análise manual excessivamente complicada e até mesmo inviáveis (WANG *et al.*, 2016; BAI *et al.*, 2020). Com o intuito de contornar esse problema foi criada a plataforma “Global Natural Products Social Molecular Networking” (GNPS), que basicamente permite o armazenamento, disseminação, anotação e análise de dados de espectrais. Além dos dados depositados diretamente em sua biblioteca, o GNPS coleta outros disponíveis em distintos bancos, incluindo o MassBank, LDB Lichen Database, MIADB Spectral Library, Sumner Spectral Library e CASMI Spectral Library, o que contribui para sua robustez (WANG *et al.*, 2016).

A desrepliação utilizando o “molecular networking” (rede molecular) baseia-se na similaridade espectral entre os padrões de fragmentação MS/MS, até mesmo de íons precursores diferentes, mas estruturalmente relacionados. Para criar uma rede molecular, primeiramente os espectros referentes aos compostos de uma amostra (**Figura 7A**) são alinhados e os que têm a mesma relação massa-carga (m/z) do íon precursor e padrões de picos

semelhante são colapsados em um único nodo ou espectro de cosseno MS/MS, com base em um algoritmo de agrupamento MS-Cluster (**Figura 7B**) (WANG *et al.*, 2016). Cada nodo é submetido a consulta no banco de dados da biblioteca espectral do GNPS para atribuí-lo a uma molécula conhecida putativa. Essa atribuição é baseada na similaridade estrutural, visto que moléculas estruturalmente relacionadas produzem espectros MS/MS comparáveis devido a semelhanças em sua química de fase gasosa (**Figura 7C**) (ARON *et al.*, 2020).

Figura 6 - Processo de criação de uma rede molecular.



Legenda: Os nodos (círculos) verde, azul, roxo e alaranjado são referentes à espectros da amostra e o amarelo é referente à molécula do GNPS. (A) Primeiramente obtêm-se espectros MS/MS de todas as moléculas ionizadas da amostra. Em seguida, o MS-Cluster alinha cada espectro MS/MS em um conjunto de dados. (B) Os espectros de massa de compostos idênticos são colapsados usando MS-Cluster em um único nodo devido à similaridade de seu íon precursor e íons fragmento e realiza-se um alinhamento espectral. (C) Por fim, é feita pesquisas de similaridade com compostos presentes no banco de dados, usando a pontuação de cosseno, formando-se a rede molecular.

Fonte: ARON *et al.* 2020 (adaptado)

Para a atribuição de similaridade molecular, os nodos ou agrupamentos de cosseno MS/MS são simplificados como vetores em um espaço multidimensional, onde cada dimensão corresponde a um valor de m/z e sua respectiva intensidade. Os vetores são usados para calcular uma pontuação de cosseno entre cada par de nodos, o que permite a determinação do grau de similaridade espectral entre eles. O valor da pontuação varia de 0 a 1, sendo que 1 representa espectros totalmente idênticos. O resultado das comparações baseadas em vetores pode então ser visualizada como gráficos de similaridade espectral chamados redes espectrais ou redes moleculares, onde cada nodo representa um espectro de MS/MS de consenso e as bordas entre eles indicam o grau de similaridade entre espectros de consenso (QUINN *et al.*, 2016).

Dessa forma é possível se ter informações sobre a natureza química de prováveis compostos larvicidas presentes em extratos de fungos endofíticos e assim evidenciar a possibilidade de aplica-los no combate ao *Ae. Aegypti*. Isso é importante diante da necessidade de se reduzir o uso dos inseticidas sintéticos utilizados contra os mosquitos, pois esses produtos químicos têm causado efeitos indesejáveis no ambiente e a organismos não alvos (BARABADI *et al.*, 2019; ZOUBIRI; BAALIOUAMER, 2014) e estão apresentando queda de eficiência devido ao recorrente desenvolvimento de resistência por populações do *Ae. Aegypti*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar uma avaliação do potencial larvicida, contra *Aedes aegypti*, de metabólitos provenientes de fungos amazônicos e antárticos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade larvicida dos extratos brutos dos fungos de origem amazônica e antártica sobre larvas de 3º estágio de *Ae. Aegypti*.
- Avaliar o efeito da co-cultura entre fungos amazônicos e antárticos sobre a atividade larvicida previamente observada para os extratos dos cultivos axênicos.
- Realizar a desreplicação de compostos presentes em extratos ativos nos bioensaios larvicidas por meio de redes moleculares (molecular networking).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi um estudo experimental que envolveu bioensaios e procedimentos químicos instrumentais. Destaca-se que foi desenvolvido com apoio do consórcio de colaboração entre grupos do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biodiversidade e Produtos Naturais (INCT-BioNat). Os procedimentos descritos a seguir de reativação e cultivo fúngico foram realizados no Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e as análises dos perfis químicos dos extratos por Cromatografia Líquida de Ultra Rápida (CLUR) foram realizados no Laboratório Central de Análises, ambos do Núcleo de Pesquisa do Cerrado – NUPEC da Universidade Federal de Rondonópolis - UFR, Rondonópolis, Mato Grosso, Brasil. Os bioensaios com os extratos fúngicos foram realizados no Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília - UnB, Brasília, Brasil.

4.1 Materiais e instrumentos

4.1.1 Especificações dos instrumentos, colunas e fases estacionárias

A extração em fase sólida (SPE) ocorreu em cartucho Silicycle SPE-R33230B-06S empacotado com sílica de fase reversa (C18), acoplado a um filtro de membrana Millipore (0,22 μm).

A Cromatografia Líquida Ultra Rápida com detecção por arranjo de diodos (CLUR-DAD) foi realizada com o sistema analítico quaternário Prominence® da Shimadzu equipado com degaseificador DGU-20A, bomba LC-20AD, injetor automático SIL-20AC, forno de coluna CTO-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A e comunicadora CBM-20A. Para a aplicação e controle da corrida cromatográfica utilizou-se o software LabSolution LC da Shimadzu.

Utilizou-se uma coluna Thermo Scientific Accucore na análise dos extratos por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS). Os dados de espectrometria de massa foram adquiridos utilizando um espectrômetro de massa Thermo Scientific QExactiva® Hybrid Quadrupole-Orbitrap. Os dados foram processados com o software Xcalibur (versão 3.0.63) desenvolvido pela Thermo Fisher Scientific.

A esterilização dos meios de culturas e materiais para manipulação fúngica foi realizada em uma autoclave vertical da marca Phoenix.

Os processos de manipulação fúngica foram realizados em uma cabina de fluxo laminar da marca Filtracom.

Os extratos foram concentrados sob pressão reduzida em um evaporador rotativo - 802 da marca Fisatom.

4.1.2 Especificações dos solventes

As partições dos filtrados miceliais foram realizadas com Acetato de Etila (AcOEt) grau de pureza P. A. da marca Synth.

O preparo e análises dos perfis químicos dos extratos por Cromatografia Líquida Ultra Rápida foram realizados com acetonitrila (ACN) grau HPLC da marca Tedia e água ultrapura.

Na análise por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS) utilizou-se acetonitrila (ACN) e ácido fórmico (CH_2O_2) a 1% como eluentes, ambos da marca Tedia.

4.1.3 Especificações dos meios de cultura

Meios de cultura sólidos

PDA – Agar batata dextrose da marca Fluka Analytical: 39 g/L de água.

PDA marinho – Agar batata dextrose marinho da marca Difco: 55,1 g/L de água.

Meio de cultura líquido

PDB – Caldo de batata dextrose da marca Kasvi: 27 g/L de água.

Nos cultivos dos fungos amazônicos isolados e nos co-cultivos, o PDB foi diluído em água doce (água de poço destilada).

Nos cultivos isolados dos fungos antárticos o PDB foi diluído em água do mar artificial, previamente preparada com a seguinte composição: NaCl 12,5 g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,0 g/L, KCl 0,25 g/L, NaNO_3 150 g/L, K_2HPO_4 40 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 75 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 36 g/L, Na_2CO_3 20 g/L, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 6 g/L, $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{FeNO}_7$ 6 g/L, EDTA 1 g/L e 1 g/L da solução de micronutrientes

(H₃BO₃ 2,86 g/L, MnCl₂.4H₂O 1,81 g/L, ZnSO₄.7H₂O 0,222 g/L, Na₂MoO₄.2H₂O 0,39 g/L, CuSO₄.5H₂O 0,079 g/L, Co(NO₃)₂.6H₂O 0,049 g/L).

4.2 Métodos

4.2.1 Espécies vegetais

Amostras da planta hemiparasita *Passovia stelis* foram coletadas em março de 2017 no campus da Universidade Federal do Amazonas - UFAM (3°05'26.6"S e 59°57'52.6"W), Manaus, Amazonas, Brasil. A identificação da espécie foi realizada por análise das características macromorfológicas pela Prof^a. Dra. Welma Sousa Silva Carneiro do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia - ICET. Uma exsicata foi depositada no herbário da UFAM de Manaus sob o registro de nº 11.422.

Amostras da macroalga marrom *Phaeurus antarcticus* foram coletadas durante a expedição Operantar XXXIV em novembro/dezembro de 2015 no arquipélago das Ilhas Shetland do Sul na Península Antártica (62°35'×59°53'). A identificação vegetal foi realizada por meio de análises macromorfológicas e microscópicas pelo Dr. Cesar Bertaglia Pasqualetti do Instituto de Botânica – IBt, São Paulo, Brasil e pela Dra. Maria Beatriz Barbosa de Barros Barreto do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil. A exsicata foi depositada no herbário Maria Eneyda Kauffmann Fidalgo do Instituto de Botânica – IBt.

4.2.2 Isolamento e identificação das cepas fúngicas

Os fungos endofíticos de origem amazônica dos gêneros *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Guignardia*, *Phomopsis*, *Pestalotiopsis* e *Xylaria* foram isolados da planta hemiparasita *Passovia stelis* pela aluna Sara Simões da Silva do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia - ICET da Universidade Federal do Amazonas - UFAM de Itacoatiara, Amazonas, Brasil. O isolamento ocorreu a partir de folhas e caules aparentemente saudáveis da espécie vegetal, seguindo o método descrito por Oliveira e colaboradores (2011). A identificação das cepas fúngicas foi realizada pela Prof^a. Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza da Faculdade de Ciências Agrárias da UFAM de Manaus, por meio dos caracteres macromorfológicos das culturas.

Os fungos endofíticos de origem antártica *Arthrinium* sp. e *Epicoccum dendrobii* foram isolados da alga marrom *Phaeurus antarcticus* pelo doutorando Gustavo Souza dos Santos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, seguindo o método descrito por Teixeira e colaboradores (2019b). As cepas antárticas foram identificadas por meio de análises micro e macromorfológicas e por sequenciamento genético da região ITS (Internal Transcript Spacer) do DNA ribossômico. O processo de identificação fúngica foi realizado pela Dra. Maria Beatriz Barbosa de Barros Barreto.

4.2.3 Reativação fúngica e obtenção dos extratos

Os fungos endofíticos amazônicos foram reativados em placas de Petri contendo meio de cultura PDA. Selecionaram-se 30 cepas, sendo 5 *Colletotrichum* sp., 2 *Diaporthe* sp., 5 *Guignardia* sp., 10 *Phomopsis* sp. e 8 *Xylaria* sp. Destaca-se que a maioria dos fungos selecionados possuem identificação somente a nível de gênero e, portanto, havia a possibilidade de selecionar cepas de mesma espécie. Para evitar isso, quando se tratava de fungos de mesmo gênero, tinha-se o cuidado verificar imagens das cepas crescidas em placa e selecionar aquelas que possuíam diferenças de colorações ou de formas de crescimento dos micélios. Dessa forma selecionava-se as que possuem características físicas distintas e assim, pretendia-se evitar cultivar fungos de mesma espécie.

Os fungos endofíticos de origem antártica *Arthrinium* sp. e *Epicoccum dendrobii* foram reativados em placas de Petri com meio de cultura PDA marinho.

As placas com as cepas fúngicas inoculadas foram acondicionadas em estufa microbiológica, a uma temperatura média de 28 °C. Após crescimento micelial significativo, os fungos foram cultivados individualmente em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL do meio PDB e previamente autoclavados a 121 °C por 20 minutos. Os fungos amazônicos foram cultivados em meio PDB dissolvido em água doce (água de poço destilada) e os antárticos em meio PDB dissolvido em água do mar artificial. Utilizaram-se 5 erlenmeyer por fungo, sendo que em cada frasco foram adicionados 7 plugues de 7,70 mm de diâmetro dos endofíticos previamente crescidos em placa. Os cultivos ocorreram de forma estacionária, com agitação esporádica, a uma temperatura média de 28 °C, por 28 dias. Após esse período, as culturas foram filtradas e o caldo foi submetido a uma partição líquido-líquido com AcOEt (3

x 150 mL). A fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida para a obtenção dos extratos brutos, que foram submetidos aos ensaios larvicidas.

4.2.4 Avaliação da atividade larvicida

As larvas de *Aedes aegypti* foram obtidas da colônia de linhagem Rockefeller mantida no insetário ArboControl do Laboratório de Farmacologia da Universidade de Brasília, cuja manutenção obedece aos protocolos estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2013). Os testes larvicida ocorreram em duas modalidades, sendo o primeiro seletivo e o outro de dose. Com o seletivo pretendeu-se avaliar quais eram os extratos ativos e com o de dose determinar as suas respectivas concentrações letais (CL_{50}). Os bioensaios ocorreram sob a supervisão da professora Dra. Laila Salmen Espindola.

O bioensaio seletivo foi realizado em placas com 12 poços, cada um contendo 3 mL de água e 10 larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti*. A tragem larval foi feita visualmente, com base na integridade e homogeneidade de tamanho das larvas. Os extratos foram previamente solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), para uma concentração final de 250 µg/mL (massa de extrato/volume de DMSO). Já solubilizados, os extratos foram adicionados aos poços contendo as larvas. Preparou-se um controle negativo com o DMSO em uma concentração 5% e os ensaios procederam em quadruplicata. A temperatura ambiente estava controlada entre 25 °C e 28 °C, com fotoperíodo de 12 horas. A leitura de mortalidade foi feita em 24, 48 e 72 horas e as larvas que não reagiram ao estímulo mecânico (leve agitação na água) foram consideradas mortas. Foram considerados ativos os extratos que causaram mortalidade de no mínimo 80% da população larval expostas.

A partir do bioensaio seletivo foram selecionados os extratos ativos contra larvas de *Ae. aegypti* e estes foram direcionados ao bioensaio de dose. Este bioensaio foi realizado de forma similar ao anterior, isto é, em placas com 12 poços, sendo que cada poço continha 3 mL de água, 10 larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti* e extrato fungico. Diferentemente do seletivo, no bioensaio de dose os extratos foram aplicados em concentrações decrescentes, partindo de 250 µg/mL, a fim de se determinar a menor quantidade de amostra capaz de causar a morte de 50% da população larval exposta ao teste. Portanto, os extratos foram aplicados nas concentrações de 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25 e 12,5 µg/mL. Os valores de CL_{50} foram determinados pela aplicação da análise de Probit aos dados de mortalidade obtidos para as concentrações testadas.

4.2.5 Co-cultivo entre fungos amazônicos e antárticos e obtenção dos extratos

A partir dos bioensaios larvicidas foram selecionados os fungos amazônicos *Colletotrichum siamense* (FFT03) e *Guignardia* sp. (FAT06) para serem co-cultivados com os fungos antárticos *Arthrinium* sp. e *E. dendrobii*. Fizeram-se 4 cultivos mistos conforme apresentado no **Quadro 1**. A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 300 mL do meio PDB dissolvido em água, previamente autoclavados a 121 °C por 20 minutos. Utilizaram-se 5 elernmeyer por co-culitvo, cada um contendo 4 plugues de 7,70 mm do fungo amazônico e 4 plugues de 7,70 mm do fungo antártico. O cultivo ocorreu de forma estacionária durante 28 dias a uma temperatura média de 28 °C. Após os 28 dias as culturas foram filtradas e o caldo foi submetido a uma partição líquido-líquido com EtOAc (3x150 mL). Em seguida a fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida para a obtenção dos extratos brutos, que foram testados frente as larvas de *Ae. aegypti*.

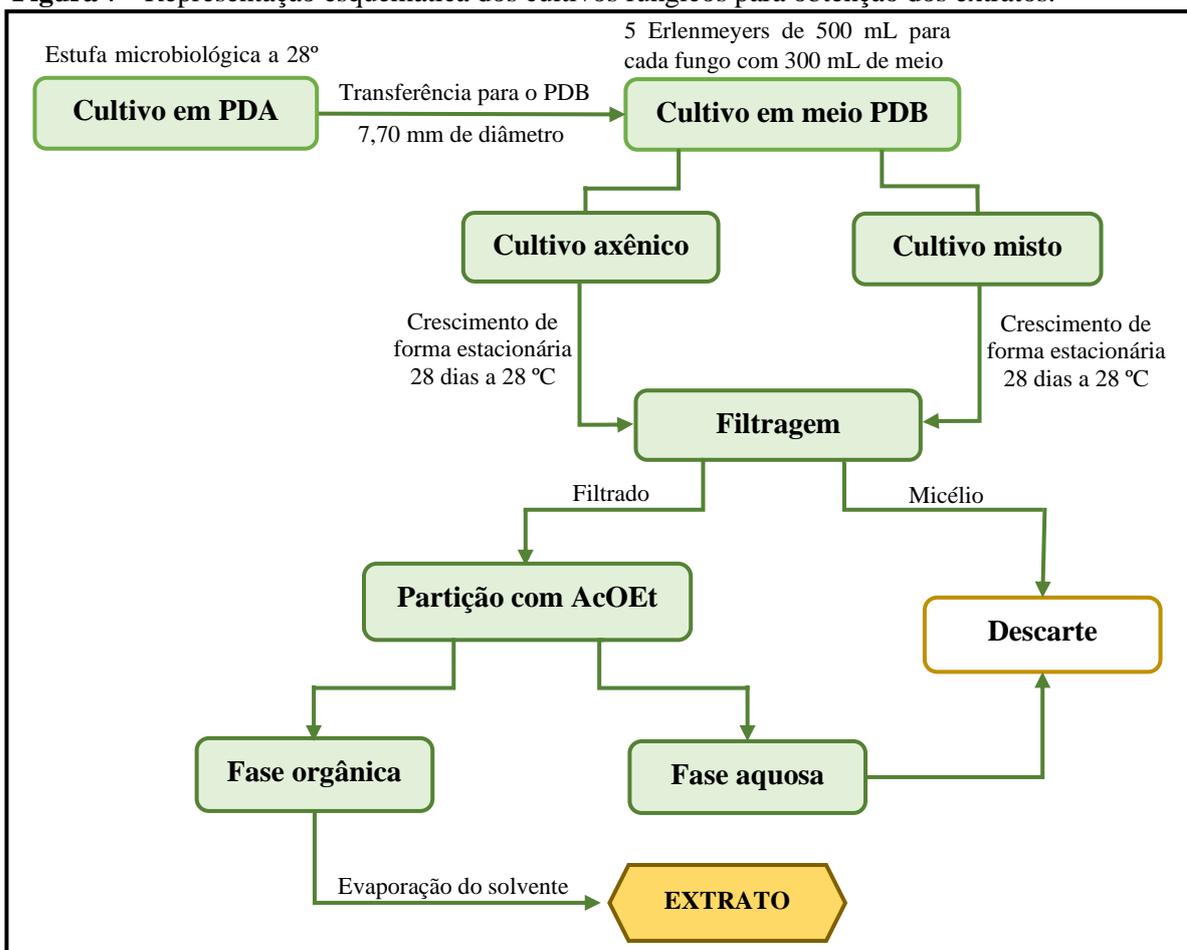
Quadro 1 - Fungos amazônicos e antárticos submetidos ao processo de co-cultivo.

Código	Identificação
FAT06 + ARTH	<i>Guignardia</i> sp. e <i>Arthrinium</i> sp.
FAT06 + DEND	<i>Guignardia</i> sp. e <i>Epicoccum dendrobii</i> .
FFT03 + ARTH	<i>Colletotrichum siamense</i> e <i>Arthrinium</i> sp.
FFT03 + DEND	<i>Colletotrichum siamense</i> e <i>Epicoccum dendrobii</i> .

Fonte: Quadro elaborado pelo autor (2021)

O processo de obtenção dos extratos foi realizado seguindo as mesmas condições de temperatura e tempo de fermentação para todos os fungos, conforme representado esquematicamente na **Figura 8**, a seguir.

Figura 7 - Representação esquemática dos cultivos fúngicos para obtenção dos extratos.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2021)

4.2.6 Avaliação química dos extratos

Os extratos, tanto dos cultivos axênicos quanto dos co-cultivos, foram submetidos à análise de perfil químico por CLUR-DAD para se fazer uma análise prévia dos perfis químicos e comparações entre si.

Todos os extratos foram submetidos a um pré-tratamento por Extração em Fase Sólida (SPE) para a eliminação de interferentes apolares. Os extratos foram previamente solubilizados em uma solução de ACN:H₂O 95:5 (V/V) a uma concentração de 10 mg/L. O cartucho empacotado com sílica de fase reversa (C18) foi inicialmente ativado com ACN e equilibrado com ACN:H₂O 95:5 (V/V). Após isso, 1 mL de cada extrato foi aplicado no cartucho e eluído com ACN:H₂O 95:5 (V/V) e em seguida passado pelo filtro de membrana Millipore®. Ao final do processo de pré-tratamento de cada extrato, fazia-se a limpeza do cartucho e do filtro com 3

mL de ACN seguido de 3 mL de CH₂Cl₂. Antes da eluição do próximo extrato, a fase estacionária era novamente ativada e equilibrada da mesma forma citada anteriormente.

A avaliação dos perfis químicos dos extratos foi realizada por Cromatografia Líquida Ultra Rápida e foi realizada com amostras dos extratos na concentração de 10 mg/L, que foram submetidas a um gradiente utilizando como eluente ACN:H₂O (5:95 → 100:0 V/V, 1,0 mL/min, $\lambda = 200-800$ nm).

4.2.7 Análise por Rede Molecular (Molecular Networking)

Os extratos dos dois fungos amazônicos utilizados na co-cultura, *Colletotrichum siamense* (FFT03) e *Guignardia* sp. (FAT06), foram direcionados a análise por meio de Rede Molecular. Para análise LC-MS os extratos foram diluídos em MeOH grau HPLC a uma concentração de 2,0 mg/mL. As amostras foram injetadas em uma coluna C18 (2,1 mm × 100 mm), tendo como eluente 0,1% de CH₂O₂ e ACN, com um gradiente de CH₂O₂:ACN (95:5 → 2/98, 0,2 mL/min) em 15 minutos. Os dados da espectrometria de massa foram adquiridos simultaneamente, com o espectrômetro operando no modo positivo com intervalo de m/z de 115-1500, voltagem capilar de 3,4 kV, temperatura capilar de entrada de 280 °C, com 5 μ L de amostra foram injetados. MS/MS foi realizado pela dissociação induzida por colisão (CID) com intervalo m/z de 100–800 e a energia de colisão variou de 10 a 50 V. As amostras foram ionizadas diretamente por eletrospray (ESI) com taxa de fluxo de 5,0 μ L min⁻¹.

Os arquivos dos espectros foram convertidos para o formato mzXML e foram carregados diretamente na página do Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS). A rede molecular foi criada usando o fluxo de trabalho online (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) no site do GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). Os espectros de MS/MS foram filtrados por janela, escolhendo apenas os 6 íons de fragmento superiores. Os espectros foram pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS e uma rede foi criada onde as bordas foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno acima de 0,7. O tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100, e as bordas de pontuação mais baixas foram removidas até que o tamanho da família molecular estivesse no limite estabelecido. Após a criação da rede molecular no GNPS, fez-se a sua exportação para o programa de Cytoscape versão 3.8.2 para realizar a sua visualização e manipulação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Reativação e obtenção dos extratos

Entre as cepas fúngicas selecionadas para serem cultivadas, nem todas cresceram em placa. Dos 30 fungos amazônicos escolhidos, 21 cresceram em placa, sendo 3 *Colletotrichum* sp., 2 *Diaporthe* sp., 4 *Guignardia* sp., 8 *Phomopsis* sp. e 4 *Xylaria* sp. Os dois fungos antárticos, *Arthrimum* sp. e *Epicoccum dendrobii*, também apresentaram crescimento em meio PDA. O **Quadro 2** apresenta a identificação dos 21 fungos amazônicos e dos 2 antárticos, juntamente com os seus códigos.

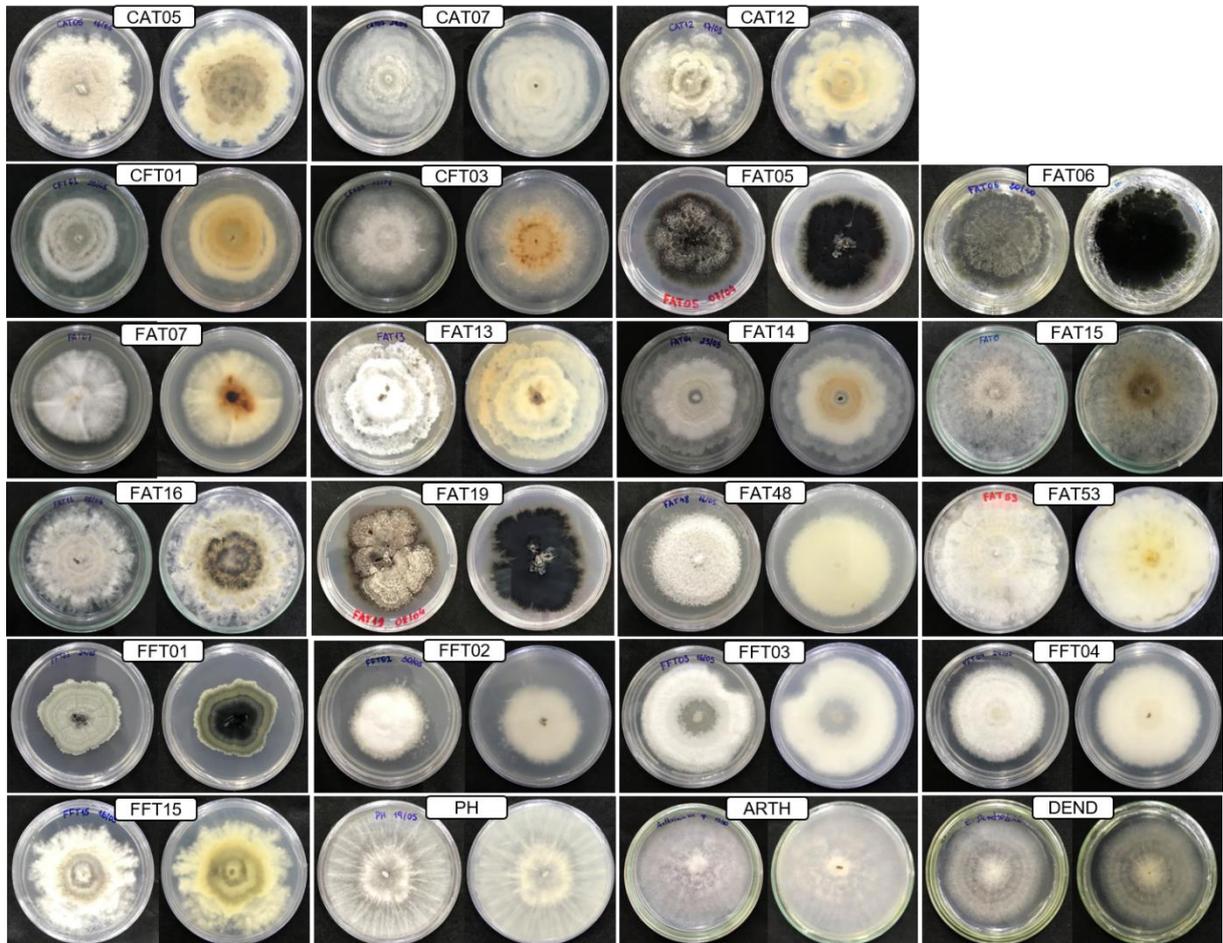
Quadro 2 - Fungos endofíticos selecionados da coleção.

Código	Identificação
FAT48	<i>Colletotrichum</i> sp.
FFT04	<i>Colletotrichum</i> sp.
FFT03	<i>Colletotrichum siamense</i>
FFT15	<i>Diaporthe</i> sp.
CAT05	<i>Diaporthe heveae</i>
FAT05	<i>Guignardia</i> sp.
FAT06	<i>Guignardia</i> sp.
FAT19	<i>Guignardia</i> sp.
FFT01	<i>Guignardia vaccinii</i>
CAT07	<i>Phomopsis</i> sp.
CAT12	<i>Phomopsis</i> sp.
CFT01	<i>Phomopsis</i> sp.
FAT13	<i>Phomopsis</i> sp.
FAT14	<i>Phomopsis</i> sp.
FAT15	<i>Phomopsis</i> sp.
FAT16	<i>Phomopsis</i> sp.
PH	<i>Phomopsis</i> sp.
CFT03	<i>Xylaria</i> sp.
FAT07	<i>Xylaria</i> sp.
FAT53	<i>Xylaria</i> sp.
FFT02	<i>Xylaria longipes</i>
ARTH	<i>Arthrimum</i> sp.
DEND	<i>Epicoccum dendrobii</i>

Fonte: Quadro elaborado pelo autor (2021)

A **Figura 9** apresenta os 21 fungos endofíticos amazônicos e os 2 antárticos crescidos em placas, nas quais é possível observar as características macromorfológicas tanto da face frontal como posterior.

Figura 8 - Fungos endofíticos amazônicos e antárticos cultivados em Placa de Petri.



Legenda: Gêneros: *Colletotrichum* (FAT48, FFT04, FFT03); *Diaporthe* (FFT15, CAT05); *Guignardia* (FAT05, FAT06, FAT19, FFT01); *Phomopsis* (CAT07, CAT12, CFT01, FAT13, FAT14, FAT15, FAT16, PH); *Xylaria* (CFT03, FAT07, FAT53, FFT02); *Arthrinium* (ARTH); *Epicoccum* (DEND).

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2021)

A partir dos cultivos axênicos em meio líquido foram obtidos os extratos brutos dos 23 fungos (21 amazônicos e 2 antárticos), cujas massas foram mensuradas e estão representadas na **Tabela 1**. Observa-se que se obteve maior quantidade de extrato a partir do cultivo do fungo antártico *Arthrinium* sp., que foi de 2117,10 mg. Por outro lado, o cultivo do fungo amazônico *Colletotrichum* sp. (FFT04) foi o que obteve menor quantidade de extrato, cuja massa foi de 19,50 mg.

Tabela 1 - Massas dos extratos brutos obtidos nos cultivos axênicos e mistos.

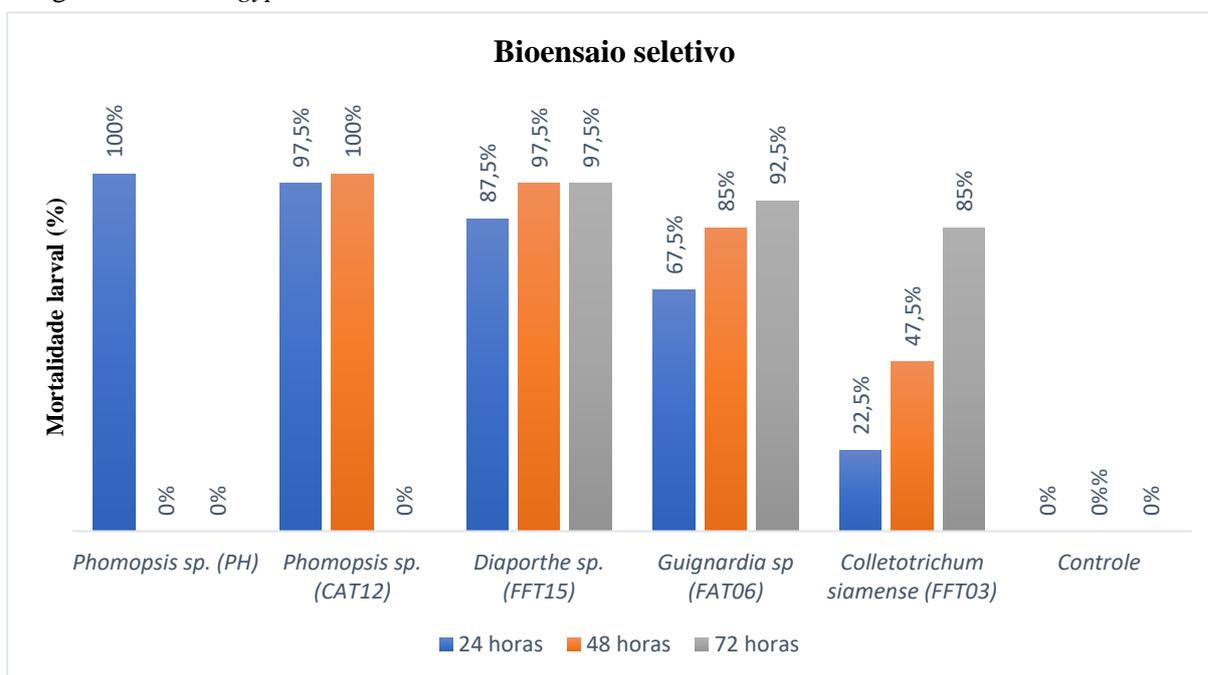
Código	Identificação	Massa obtida (mg)
FAT48	<i>Colletotrichum</i> sp.	65,10
FFT04	<i>Colletotrichum</i> sp.	19,50
FFT03	<i>C. siamense</i>	65,30
FFT15	<i>Diaporthe</i> sp.	60,60
CAT05	<i>D. heveae</i>	58,40
FAT05	<i>Guignardia</i>	40,80
FAT06	<i>Guignardia</i>	73,50
FAT19	<i>Guignardia</i>	61,30
FFT01	<i>G. vaccinii</i>	53,70
CAT07	<i>Phomopsis</i>	36,83
CAT12	<i>Phomopsis</i>	41,00
CFT01	<i>Phomopsis</i>	83,50
FAT13	<i>Phomopsis</i>	83,50
FAT14	<i>Phomopsis</i>	46,50
FAT15	<i>Phomopsis</i>	154,90
FAT16	<i>Phomopsis</i>	28,90
PH	<i>Phomopsis</i>	86,80
CFT03	<i>Xylaria</i>	58,60
FAT07	<i>Xylaria</i>	136,50
FAT53	<i>Xylaria</i>	93,80
FFT02	<i>X. longipes</i>	53,70
ARTH	<i>Arthrimum</i> sp.	2117,10
DEND	<i>E. dendrobii</i>	135,80

Fonte: Tabela elaborada pelo autor (2021)

5.2 Avaliação da atividade larvicida

Dentre os 23 extratos brutos testados, 5 apresentaram atividade larvicida contra larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* na concentração de 250 µg/mL. Destaca-se que todos os 5 extratos ativos foram obtidos de fungos endofíticos de origem amazônica sendo eles: *Phomopsis* sp. (PH), *Phomopsis* sp. (CAT12), *Diaporthe* sp. (FFT15), *Guignardia* sp. (FAT06) e *Colletotrichum siamense* (FFT03), conforme apresentado na **Figura 10**. Esses extratos foram considerados ativos por causarem a morte de mais de 80% das larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti* em até 72 horas, seguindo o protocolo preconizado pela Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Figura 9 - Resultados do bioensaio seletivo com extratos de fungos endofíticos contra larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2021)

Destaca-se o extrato do fungo *Phomopsis sp. (PH)*, que foi capaz de matar 100% das larvas em apenas 24 horas de tratamento. O extrato de *Phomopsis sp. (CAT12)* também apresentou uma atividade expressiva, com 97,5% de morte larval em 24 horas e 100% em 48 horas, assim como o de *Diaporthe sp. (FFT15)*, cuja mortalidade provocada foi de 87,5% nas primeiras 24 horas e 97,5% em 48 horas. Observou-se que o percentual de larvas mortas não aumentou após 72 horas de exposição ao extrato de *Diaporthe sp. (FFT15)*. O extrato do *Guignardia sp. (FAT06)* causou um percentual de mortalidade necessária para ser considerado ativo a partir de 48 horas, quando 85% das larvas foram mortas. Com o tratamento estendido para 72 horas, foi notado um aumento da atividade, com 92,5% das larvas mortas. O extrato de *Colletotrichum siamense (FFT03)* provocou morte larval abaixo de 80% nas primeiras 48 horas de tratamento, no entanto, foi observado um aumento da atividade com o tempo e, em 72 horas, foi capaz de matar 85% das larvas expostas, sendo, portanto, considerado ativo. No controle positivo (DMSO) não houve morte larval, indicando que as atividades larvicidas observadas foram de fato ocasionadas pelos extratos fúngicos aplicados.

Os extratos dos 2 fungos antárticos não apresentaram atividade larvicida, pois foi observado um percentual de apenas 5% de larvas mortas no tratamento com o extrato de *Arthrinium sp. (ARTH)* em 72 horas, enquanto, para o extrato de *Epicoccum dendrobii (DEND)*

não houve morte larval em todo o período de tratamento. Até o momento não há registros na literatura de atividade larvicida para espécies de fungos marinhos dos gêneros *Arthrinium* e *Epicoccum*.

As doses letais (CL₅₀) para larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti* dos extratos de acetato de etila dos fungos endofíticos ativos são apresentadas na **Tabela 2**. Observa-se que o extrato de *Phomopsis* sp. (PH) foi o que apresentou melhor resultado, com CL₅₀ de 31,12 µg/mL, seguindo dos extratos de *Diaporthe* sp. (FFT15) e *Phomopsis* sp. (CAT12), cujas CL₅₀ foram de 64,73 µg/mL e 132,80 µg/mL, respectivamente. Essas doses letais são correspondentes a um tratamento de 24 horas, no entanto, com a extensão do período para 48 e 72 horas, não houve alteração dos valores para nenhum dos extratos supracitados. Para o extrato *Guignardia* sp. (FAT06) foi observada uma diminuição considerável dos valores das doses letais com o tempo, sendo de 224,5 µg/mL em 24 horas, 129,3 µg/mL em 48 horas e 120,8 em 72 horas de tratamento. O extrato de *C. siamense* (FFT03) foi o que apresentou as maiores doses letais, sendo que em 24 e 48 horas de tratamento foram superiores à concentração máxima testada (250 µg/mL) e em 72 horas houve uma diminuição para 248 µg/mL.

Tabela 2 – Doses letais (CL₅₀) dos extratos dos fungos endofíticos contra larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*.

Fungo endofítico	CL ₅₀ (µg/mL)		
	24 horas	48 horas	72 horas
<i>Phomopsis</i> sp. (PH)	31,12	31,12	31,12
<i>Phomopsis</i> sp. (CAT12)	132,80	132,80	132,80
<i>Diaporthe</i> sp. (FFT15)	64,73	64,73	64,73
<i>Guignardia</i> sp. (FAT06)	224,5	129,3	120,8
<i>Colletotrichum siamense</i> (FFT03)	>250	>250	248

Fonte: Tabela elaborada pelo autor (2021)

Na literatura ainda não há estudos que indiquem a atividade larvicida contra larvas de *Ae. aegypti* de extratos de fungos endofíticos dos gêneros *Phomopsis*, *Diaporthe*, *Guignardia* e *Colletotrichum*. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram o potencial larvicida de metabólitos produzidos por esses fungos e sugerem a possibilidade da aplicação deles como um meio alternativo de combate a *Ae. aegypti*. Bucker e colaboradores (2013) realizaram uma avaliação, similar à aplicada neste trabalho, da atividade larvicida do extrato de acetato de etila do fungo endofítico *Pestalotiopsis virgulata* isolado da planta *Murraya paniculata*. Os resultados indicaram que o extrato foi ativo contra larvas de 3º estágio de *Ae. Aegypti*, apresentado uma CL₅₀ de 101,8 ppm (µg/mL) em 24 horas de tratamento.

Os extratos de *Guignardia* sp. (FAT06) e *C. siamense* (FFT03) foram os que apresentaram as menores porcentagem de mortalidade larval nos bioensaios seletivos. Por isso, esses 2 fungos amazônicos foram submetidos ao processo de cultivo misto com os 2 fungos antárticos *Arthrinium* sp. (ARTH) e *E. dendrobii* (DEND), cujas massas dos extratos estão representadas na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Massas dos extratos brutos obtidos nos cultivos mistos de fungos amazônicos e antárticos.

Código	Identificação	Massa obtida (mg)
FAT06 + ARTH	<i>Guignardia</i> sp. e <i>Arthrinium</i> sp.	143,70
FAT06 + DEND	<i>Guignardia</i> sp. e <i>E. dendrobii</i> .	187,80
FFT03 + ARTH	<i>C. siamense</i> e <i>Arthrinium</i> sp.	148,20
FFT03 + DEND	<i>C. siamense</i> e <i>E. dendrobii</i> .	116,40

Fonte: Tabela elaborada pelo autor (2021)

Pretendia-se a partir do estresse induzido no co-cultivo potencializar a atividade larvicida observada para os extratos dos cultivos axênicos dos fungos amazônicos com base nos seguintes fatores: a síntese de compostos larvicidas produzidos por FAT06 e FFT03 poderia ser aumentada; novos compostos com atividade larvicida poderiam ser sintetizados por meio da ativação de agrupamentos de genes silenciosos tanto nos fungos amazônicos, quanto nos antárticos. Entretanto, os extratos dos co-cultivos de *Guignardia* sp. e *Arthrinium* sp. (FAT06 + ARTH), *Guignardia* sp. e *E. dendrobii* (FAT06 + DEND), *C. siamense* e *Arthrinium* sp. (FFT03 + ARTH), *C. siamense* e *E. dendrobii* (FFT03 + DEND) foram inativos no bioensaio seletivo, pois causaram a morte de 12,5%, 0%, 5% e 6% das larvas de *Ae. Aegypti*, respectivamente, em 72 horas de tratamento.

Esses resultados sugerem que a síntese de compostos com ação larvicida presentes nos extratos isolados de *Guignardia* sp. (FAT06) e *C. siamense* (FFT03) pode ter sido regulada negativamente por meio da interação com os fungos *Arthrinium* sp. (ARTH) e *E. dendrobii* (DEND). Dessa forma, provavelmente a presença dos fungos antárticos teve efeito sobre a síntese metabólica dos fungos amazônicos, de forma a modificar seus metabolomas (VINALE *et al.*, 2017). Conforme citado por Peng e colaboradores 2021, não é simples saber quais “clusters” de genes biossintéticos serão expressos em culturas mistas. Portanto, os agrupamentos de genes responsáveis pela produção de compostos com a bioatividade de interesse nas culturas axênicas possivelmente foram silenciados no co-cultivo e a ausência desses metabólitos nos extratos refletiu na diminuição da atividade larvicida.

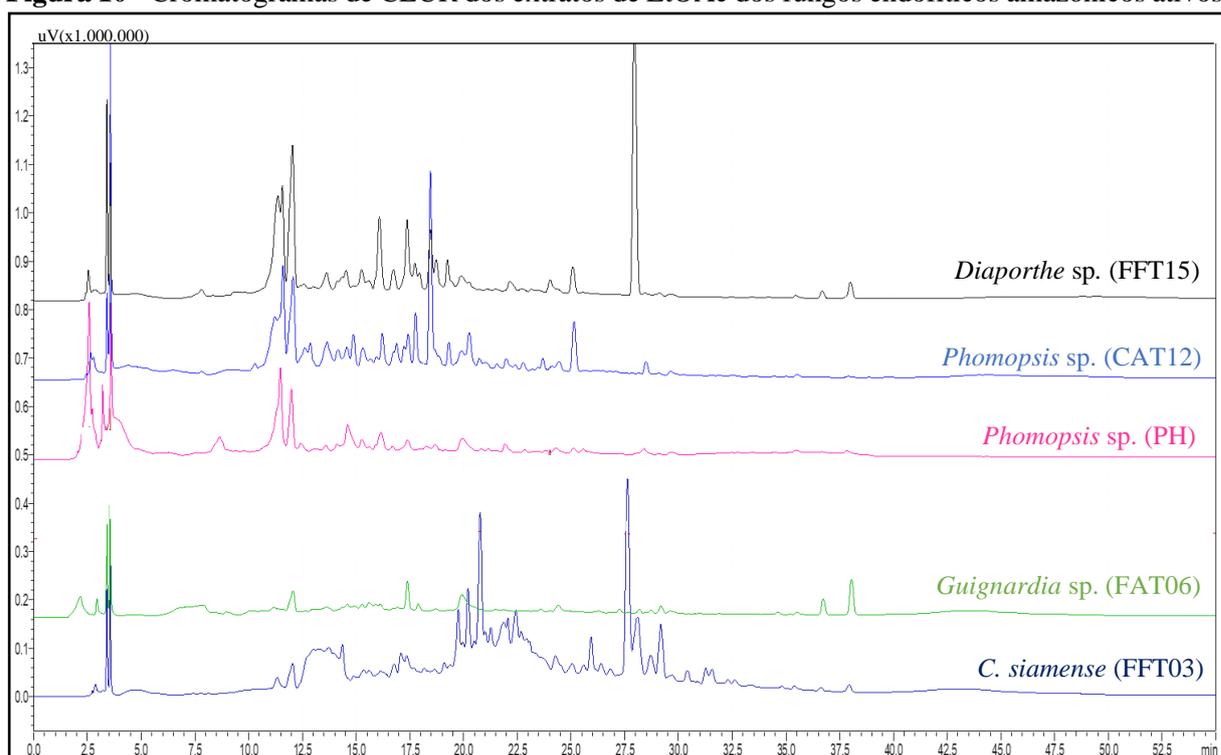
Além da hipótese de silenciamento de genes biossintéticos, a suposta ausência ou presença reduzida de compostos larvicidas na co-cultura pode também ser consequência de

biotransformação, conforme descrito por Xiao e colaboradores (2021). O processo pode ter ocorrido em decorrência da presença dos fungos antárticos, assim como de possíveis enzimas produzidas por eles, que atuando como catalizadores de reações, modificaram a estrutura de compostos larvicidas, tendo como resultado compostos inativos frente às larvas do mosquito.

5.3 Avaliação química dos extratos

Os cromatogramas dos extratos dos 5 fungos amazônicos ativos nos bioensaios larvicidas [*Phomopsis* sp. (PH), *Phomopsis* sp. (CAT12), *Diaporthe* sp. (FFT15), *Guignardia* sp. (FAT06) e *C. siamense* (FFT03)] estão representados na **Figura 11**. Eles apresentaram vários sinais relativos a compostos com polaridades variando de média a alta, sugerindo diversificação na produção metabólica.

Figura 10 - Cromatogramas de CLUR dos extratos de EtOAc dos fungos endofíticos amazônicos ativos.



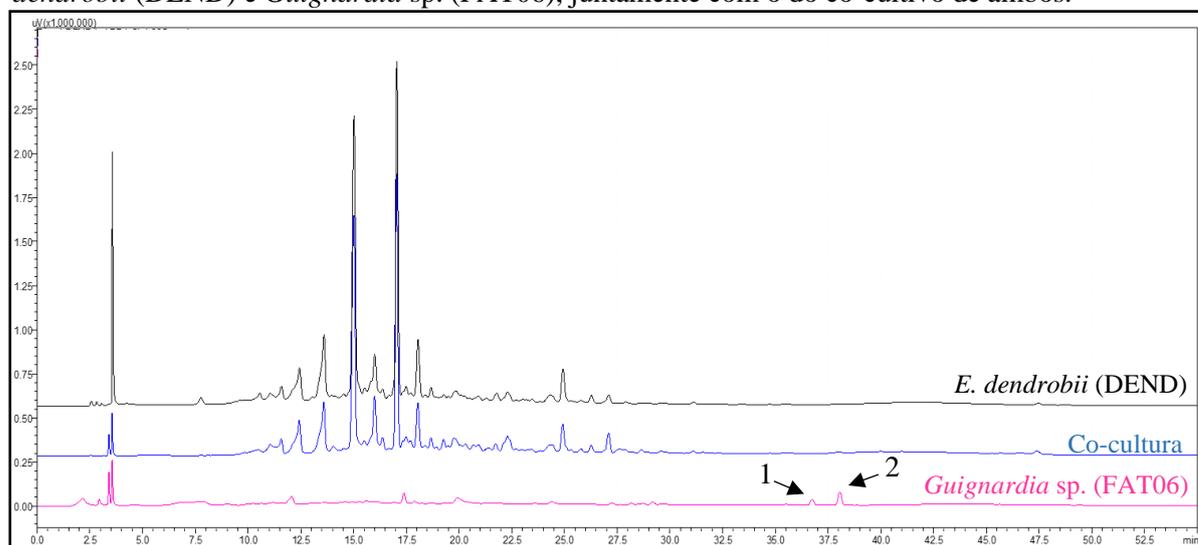
Concentração dos extratos: 10 mg/L. Gradiente: ACN:H₂O (5:95 → 100:0 V/V, 1,0 mL/min, $\lambda = 235$ nm).

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2021)

A **Figura 12** representa os cromatogramas das culturas axênicas de *Guignardia* sp. e *E. dendrobii* em comparação com o do co-cultivo de ambos (FAT06 + DEND). Nota-se que aparentemente no co-cultivo foram produzidos os mesmos metabólitos presentes no cultivo axênico do fungo antártico DEND, dada a similaridade dos perfis cromatográficos. Dessa

forma, compostos presentes no cultivo axênico do FAT06, tais como os relativos aos picos (1) em 36,734 min e (2) em 38,051 min provavelmente não foram sintetizados no co-cultivo com o fungo antártico.

Figura 11 - Cromatogramas de CLUR dos extratos de EtOAc dos fungos endofíticos *Epicoccum dendrobii* (DEND) e *Guignardia* sp. (FAT06), juntamente com o do co-cultivo de ambos.



Concentração dos extratos: 10 mg/L. Gradiente: ACN:H₂O (5:95 → 100:0 V/V, 1,0 mL/min, $\lambda = 235$ nm).

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2021)

Observa-se que, mesmo injetando os três extratos na mesma concentração (10 mg/L), sinais dos espectros do FAT06 são menos intensos em comparação com sinais dos espectros do DEND e da co-cultura, o que pode ter dificultado a visualização de correlações entre eles. Uma possível explicação é a provável baixa absorvidade molar de compostos presentes no extrato do FAT06, no comprimento de onda analisado (235 nm), tendo por consequência sinais reduzidos. De qualquer modo, o fato é que o extrato axênico do FAT06 foi ativo contra larvas de *Ae. aegypti*, enquanto o extrato do co-cultivo entre FAT06 e DEND foi inativo, o que sugere a ausência ou presença reduzida de compostos larvicidas neste.

Este resultado pode estar relacionado à redução do crescimento do fungo amazônico *Guignardia* sp. (FAT06) na presença do fungo antártico *E. dendrobii* (DEND). Esse efeito também foi observado no estudo de Miao e colaboradores (2006) quando realizaram o co-cultivo do fungo *Arthrinum saccharicola* com 14 espécies bacterianas, entre as quais 6 espécies inibiram o crescimento do *A. saccharicola* no meio de co-cultura. Resultado semelhante foi observado no estudo de Boruta e colaboradores (2019) para o fungo *Aspergillus terreus*, ao ser submetido ao co-cultivo com *Penicillium rubens*, *Chaetomium globosum* e *Mucor racemosus*.

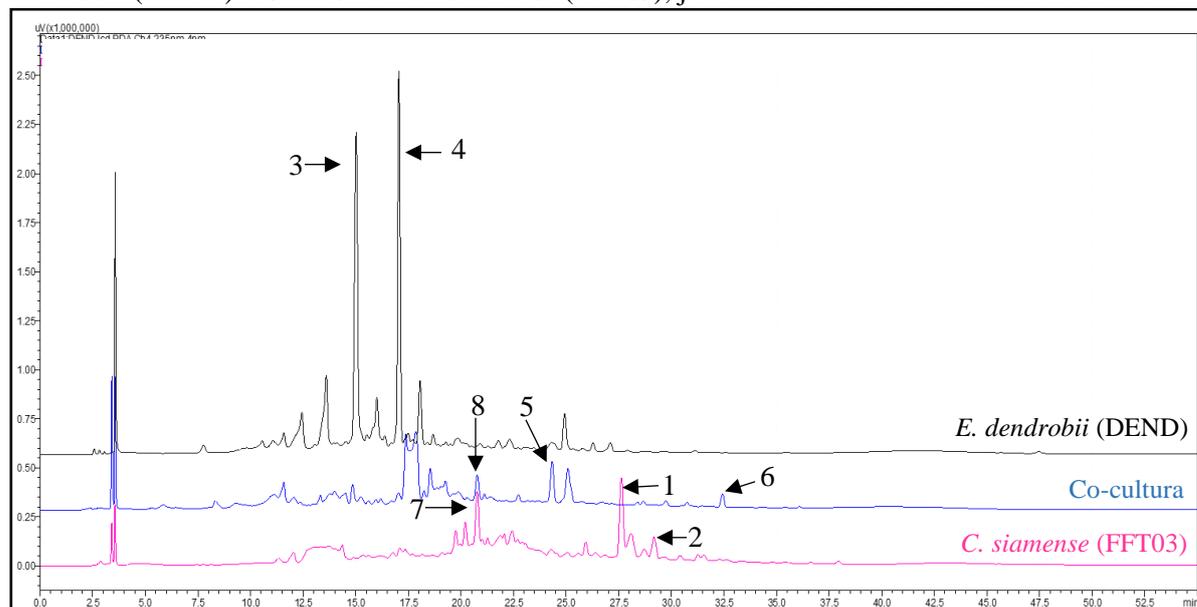
Os autores observaram que o crescimento de *A. terreus* foi inibido na co-cultura, o que levou a níveis baixos de metabólitos produzidos por este fungo.

Quando duas ou mais cepas coexistem em co-cultura há a competição por nutrientes e espaço necessários para a sobrevivência. Essa interação pode afetar o desenvolvimento e a evolução morfológica microbiana, o que reflete sobre a produção metabólica. Destaca-se que esses efeitos são dependentes das estratégias de co-cultivo e da escolha dos microrganismos a serem co-cultivados (BORUTA *et al.* 2019). Sugere-se, portanto, que no cultivo entre o *Guignardia* sp. (FAT06) e *E. dendrobii* (DEND) pode ter ocorrido um estresse competitivo que provavelmente induziu o fungo marinho a produzir compostos que tiveram interferência sobre o desenvolvimento do fungo amazônico, o que conseqüentemente influenciou a síntese do(s) composto(s) larvicida(s) pelo fungo amazônico.

Os cromatogramas dos extratos dos cultivos axênicos do *C. siamense* e *E. dendrobii*, juntamente com o do co-cultivo de ambos (FFT03 + DEND) estão representados na **Figura 13**. Os picos (1) em 27,627 min e (2) em 29,176 min do cultivo isolado do FFT03, assim como os picos (3) em 15,019 min e (4) em 17,052 min do cultivo isolado do DEND não foram observados no cromatograma do extrato do co-cultivo. Por outro lado, observou-se no co-cultivo alguns picos que não estavam presentes nos cromatogramas dos cultivos axênicos, como o (5) em 24,342 min e (6) em 31,893 min. O composto correspondente ao pico (7) em 20,771 min do cultivo isolado do FFT03 aparentemente também foi produzido no co-cultivo com o fungo antártico, estando relacionado ao pico (8) em 20,751 min.

Resultados similares foram observados nos estudos de Vinale e colaboradores (2017) para as culturas axênicas e mistas do *Trichoderma harzianum* e o endófito *Talaromyces pinophilus*. Os autores observaram que a interação entre esses fungos na co-cultura resultou na supressão de metabólitos inicialmente presentes nos cultivos isolados. Isso foi notado para o composto 3-O-metilfuniconá, que foi sintetizado no cultivo axênico de *T. pinophilus*, mas foi regulado negativamente na co-cultura com *T. harzianum*. Foi observado também a produção do ácido harziânico que estava ausente nos cultivos isolados, sendo, portanto, resultado da interação entre os fungos. Por fim, o ácido dimerúmico produzido por *T. harzianum* também estava presente na co-cultura, na qual houve regulação positiva da sua síntese.

Figura 12 - Cromatogramas de CLUR dos extratos de EtOAc dos fungos endofíticos *Epicoccum dendrobii* (DEND) e *Colletotrichum siamense* (FFT03), juntamente com o do co-cultivo de ambos.



Concentração dos extratos: 10 mg/L. Gradiente: ACN:H₂O (5:95 → 100:0 V/V, 1,0 mL/min, $\lambda = 235$ nm).

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2021)

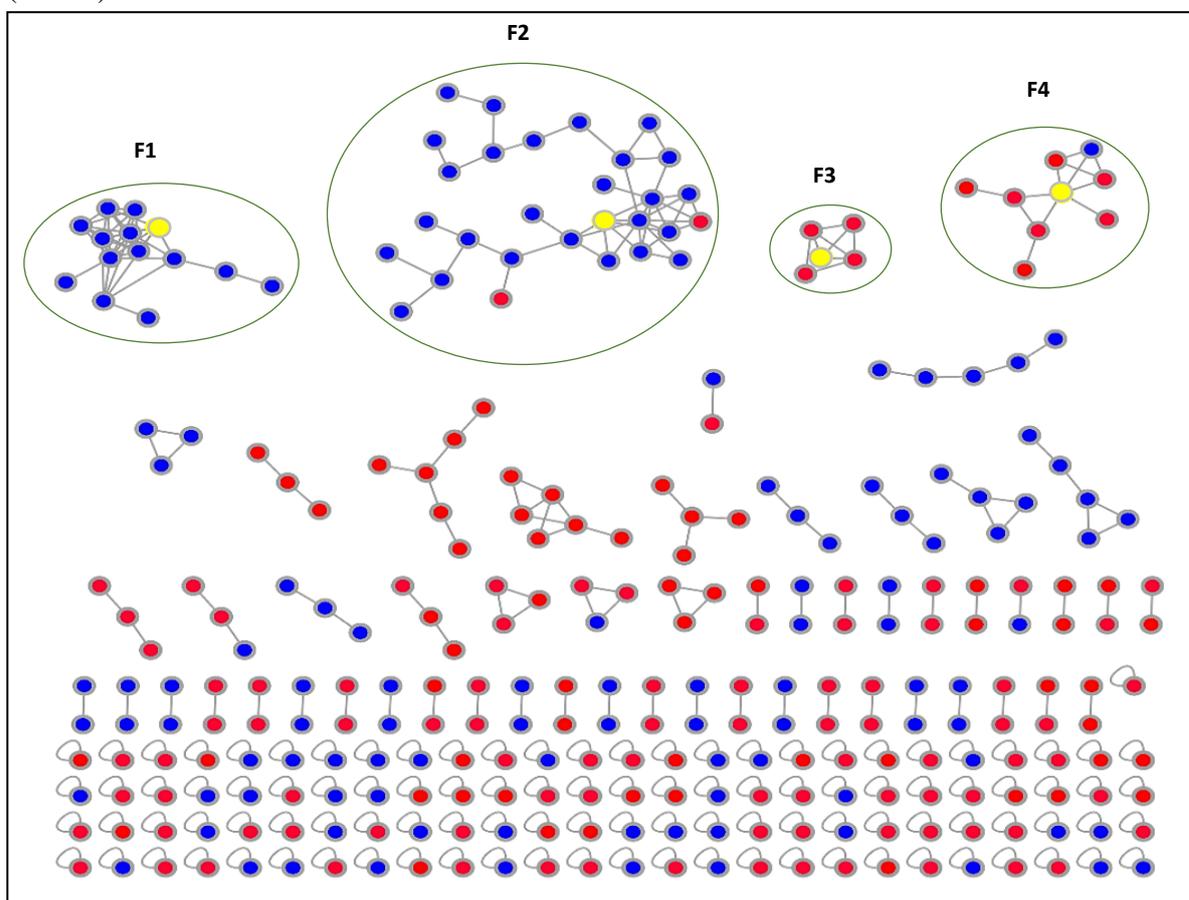
A regulação negativa da síntese de compostos larvicidas ou a biotransformação podem ser a(s) causa(s) da inatividade larvicida dos extratos provenientes das culturas mistas entre os fungos amazônicos e antárticos, conforme já citado. Uma evidência que reforça essas hipóteses são os picos presentes nos cromatogramas dos extratos axênicos dos fungos *Guignardia* sp. (FAT06) e *C. siamense* (FFT03) que estavam ausentes nos cromatogramas das co-culturas com *E. dendrobii* (DEND). Tais picos provavelmente são referentes a compostos responsáveis pela atividade larvicida e a provável ausência deles nos extratos da co-cultura refletiu as inatividades observadas. Destaca-se ainda que provavelmente o estresse induzido pode ter levado a ativação de genes críticos que foram responsáveis pela produção de novos metabólitos relacionados aos picos observados somente na co-cultura ou estes metabólitos podem ser resultantes de processos de biotransformação daqueles presentes nos cultivos axênicos.

5.3.1 Análise por Rede Molecular (Molecular Networking)

Os extratos axênicos dos fungos amazônicos *Guignardia* sp. (FAT06) e *C. siamense* (FFT03) foram ativos contra as larvas de *Ae. aegypti* e, por isso, foram submetidos a análise por rede molecular (molecular networking) para se ter informações a respeito da natureza química de prováveis compostos larvicidas.

A rede molecular referente aos extratos do FAT06 e FFT03 constituiu-se com 936 nodos, entre os quais foram estabelecidas 1419 conexões. A rede (**Figura 14**) foi reduzida, excluindo-se alguns nodos, com o intuito de melhorar a visualização das famílias moleculares de interesse. É possível visualizar agrupamentos de nodos, formando as famílias moleculares, bem como nodos isolados. As cores representam a origem dos dados: os nodos vermelhos são referentes aos extratos do FAT06, os azuis são referentes aos extratos do FFT03 e os amarelos são de padrões da biblioteca do GNPS.

Figura 13 - Rede molecular dos metabólitos do *Guignardia* sp. (FAT06) e *Colletotrichum siamense* (FFT03).



Legenda: Os nodos vermelhos são referentes ao FAT06, os azuis são referentes ao FFT03 e os com bordas amarelas são de padrões da biblioteca do GNPS. As famílias moleculares circuladas são: citocalasinas (F1), cumarinas (F2), meroterpenoides (F3), e dicetopiperazinas (F4).

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2021)

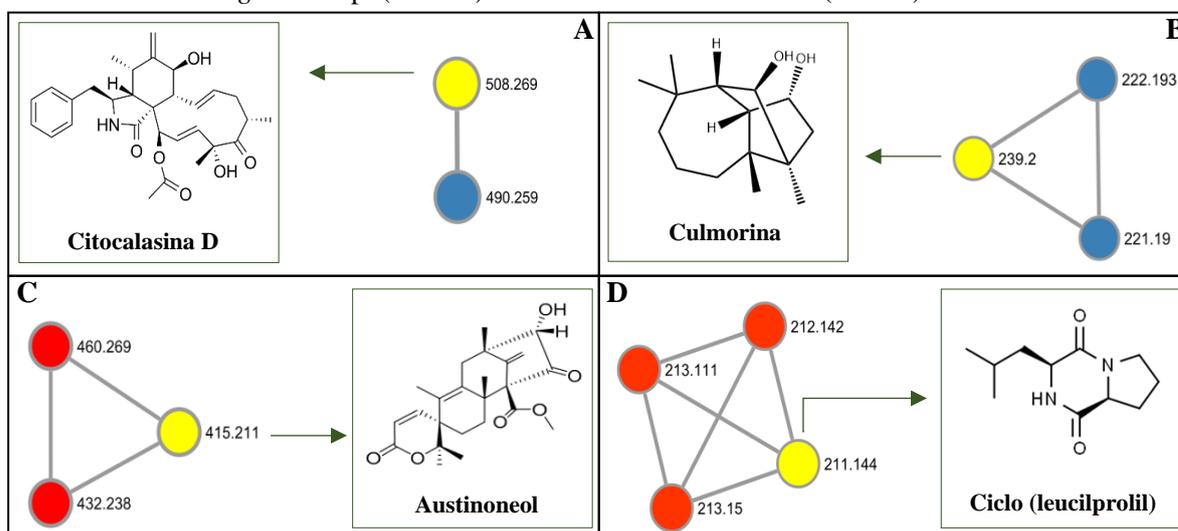
As famílias moleculares são agrupamentos de nodos com perfis espectrais similares. Sendo assim, análogos podem ser inferidos com base em semelhanças estruturais de compostos presentes em uma família. Observa-se que foram formadas várias famílias e aquelas anotadas com compostos químicos mais interessantes, no que se refere à bioatividade, foram destacadas

com círculos, sendo: citocalasina na família 1 (F1), composta por 14 nodos e 38 conexões; cumarina na família 2 (F2), composta por 29 nodos e 45 conexões; austinoneol (meroterpenóide) na família 3 (F30, com 5 nodos e 8 conexões; e ciclo (leucilprolil) (dicetopiperazina) na família 4 (F4), composta por 9 nodos e 12 conexões.

Observa-se que F1 é integralmente formada por compostos provenientes do FFT03. F2 é predominantemente representada por compostos oriundos do FFT03, tendo somente 2 nodos oriundos do FAT06. Os nodos constituintes da F3 são todos referente a compostos provenientes do FAT06 e os da F4 são predominantemente pertencentes a este extrato, sendo somente 1 oriundo do FAT03. Algumas famílias, assim como alguns nodos, não corresponderam a nenhum composto conhecido entre os vários presentes nos bancos de dados que compõem o GNPS, o que indica a possibilidade de serem compostos novos ou inéditos.

Para a análise individual das famílias destacadas na rede molecular, realizaram-se simplificações por meio da retirada de nodos, de modo a facilitar a visualização das correlações entre os nodos das moléculas putativas anotadas e aqueles correspondentes aos metabólitos dos extratos dos fungos amazônicos, conforme o representado na **Figura 15**.

Figura 14 - Representação da similaridade entre compostos da biblioteca do GNPS com os presentes nos extratos do *Guignardia* sp. (FAT06) e *Colletotrichum. siamense* (FFT03).



Legenda: Os nodos vermelhos são referentes ao FAT06, os azuis são referentes ao FFT03 e os amarelos são de padrões da biblioteca do GNPS. (A) Similaridade putativa entre citocalasina D (m/z 508,269) com composto presente no extrato do FFT03 de m/z 490,259. (B) Similaridade putativa entre culmorina (m/z 239,200) com 2 compostos presente no extrato do FFT03 (m/z 222,193; m/z 221,190). (C) Similaridade putativa entre austinoneol (m/z 415,211) com 2 compostos presente no extrato do FFT06 (m/z 460,269; m/z 432,238). (D) Similaridade putativa entre ciclo (leucilprolil) (m/z 211,144) com 3 metabólitos presente no extrato do FFT06 (m/z 212,142; m/z 213,111; m/z 213,150).

Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2021)

A citocalasina D (C₃₀H₃₇NO₆) m/z 508,269 [M+H]⁺, foi a molécula putativa anotada na F1 a partir da biblioteca do GNPS. Essa molécula apresentou similaridade, correspondente a um cosseno de 0,83, com o nodo de m/z 490,295 [M+H]⁺ relativo a molécula presente no extrato do FFT03 (**Figura 15A**). Compostos bioativos pertencentes ao grupo das citocalasinas são de comum ocorrência em extratos de origem microbiana. A atividade larvicida de citocalasinas contra *Ae. aegypti* já foi verificada em trabalhos como de Masi e colaboradores (2017), cujos resultados indicaram que a citocalasina A, isolada do fungo endofítico *Pyrenophora semeniperda*, ocasionou 100% de mortalidade das larvas de *Ae. aegypti* de 1º estágio na concentração de 250 ppm e 93,3% de mortalidade a 100 ppm.

Na F2 uma culmorina (C₁₅H₂₆O₂) de m/z 239,200 [M+H]⁺ foi a molécula putativa anotada a partir da biblioteca. Nesta família, nodos referente a metabólicos do FFT03, quais sejam, os de m/z 221,190 [M+H]⁺ e m/z 222,193 [M+H]⁺, apresentaram valores de cosseno que sugerem similaridade com a estrutura da culmorina anotada, os quais foram 0,81 e 0,83, respectivamente (**Figura 15B**). Culmorinas são dióis sesquiterpênicos tricíclicos que foram isolados pela primeira vez de *Fusarium culmorum*, do qual se originou o nome (McCORMICK *et. al.*, 2010). Culmorinas também são produzidas por outras espécies de *Fusarium* e já foram identificadas no ascomiceto marinho *Leptosphaeria oreamaris*. Em geral, as culmorinas são pouco investigadas (WEBER *et al.*, 2018) e não há na literatura trabalho a respeito da avaliação dessa classe química contra larvas de *Ae. Aegypti*.

A F3 teve o meroterpenóide austinoneol (C₂₄H₃₀O₆) de m/z 415,211 [M+H]⁺ como molécula putativa anotada. Dois nodos do FAT06, o m/z 432,238 [M+H]⁺ e o m/z 460,269 [M+H]⁺, supostamente possuem similaridade estrutural com austinoneol, com base nos cossenos apresentados, que foram 0,88 e 0,87, respectivamente (**Figura 15C**). A classe dos meroterpenóides apresenta potencial atividade contra larvas do *Ae. aegypti*, conforme descrito no trabalho de Geris e colaboradores (2008). Esses autores avaliaram a atividade larvicida de 7 meroterpenóides obtidos de cultivos de fungos *Penicillium* sp. Entre os compostos testados, foi verificado que a desidroaustina foi o composto mais ativo da série, com um valor de CL₅₀ de 2,9 ppm, em 24 horas de exposição larval.

Por fim, o ciclo (leucilprolil) (C₁₁H₁₈N₂O₂) de m/z 211,144 [M+H]⁺, foi a molécula putativa anotada na F4, a qual supostamente possui similaridade estrutural com 3 nodos referentes a metabólito do FAT06: m/z 212,142 [M+H]⁺, m/z 213,111 [M+H]⁺ e m/z 213,150 [M+H]⁺, cujos cossenos em relação ao ciclo (leucilprolil) foram 0,87, 0,88 e 0,86, respectivamente (**Figura 15D**). O ciclo (leucilprolil) é um dipeptídeo cíclico, que também são

conhecidos como dicetopiperazinas (SATHYA *et al.*, 2015). Até o momento não há na literatura relatos a respeito da avaliação da atividade larvicida do ciclo (leucilprolil), entretanto, Masi e colaboradores (2017) afirmam que determinados compostos pertencentes a classe das dicetopiperazinas são ativos contra larvas de *Ae. aegypti*.

6. CONCLUSÃO

O potencial larvicida contra larvas de 3º estágio de *Ae. Aegypti* dos fungos endofíticos amazônicos foi verificado a partir da presente investigação, entre os quais se destaca o PH (*Phomopsis* sp.) com os melhores resultados nos bioensaios. Esperava-se uma melhora da atividade larvicida dos fungos amazônicos FAT06 (*Guignardia* sp.) e FFT03 (*Colletotrichum siamense*) por meio do co-cultivo com os fungos antárticos, porém os resultados mostraram uma diminuição da atividade anteriormente vista para estes fungos amazônicos. A partir dos perfis cromatográficos dos extratos foi possível verificar que alguns picos presentes nos extratos dos cultivos axênicos dos fungos amazônicos não foram observados para os extratos dos co-cultivos. Provavelmente esses picos ausentes correspondiam a compostos ativos contra as larvas de *Ae. aegypti*, o que resultou na inatividade dos extratos. Sugere-se que a ausência desses compostos bioativos pode ter decorrido do silenciamento de genes biosintéticos e/ou de processos de biotransformação.

Com a desreplicação dos metabólitos presentes nos extratos dos fungos FAT06 (*Guignardia* sp.) e FFT03 (*Colletotrichum siamense*) por meio de rede molecular, atribuíram-se famílias a alguns compostos, cujos cossenos indicaram similaridade estrutural putativa com classes químicas como citocalasina, meroterpenóide e dicetopiperazina, que são notadamente ativas contra larvas de *Ae. aegypti*, conforme a literatura. Alguns nodos da rede molecular não apresentaram similaridade com compostos presentes no banco de dados do GNPS, sugerindo a possibilidade de se tratar de compostos inéditos, o que pode ser confirmado com investigações adicionais a respeito da natureza química desses metabólitos. Portanto, demonstrou-se o potencial larvicida dos fungos endofíticos amazônicos frente a larvas de *Ae. aegypti*, indicando-lhes como meios alternativos de combate a esse mosquito, o que se faz importante diante da recorrente diminuição de eficiência dos inseticidas sintéticos. Estudos posteriores podem avaliar outras estratégias de cultura e até mesmo realizar o co-cultivo entre os fungos amazônicos na tentativa de se chegar a novas conclusões a respeito do potencial larvicida desses microrganismos.

7. REFERÊNCIAS

- ADNAN, M.; PATEL, M.; REDDY, M.; *et al.* Formulation, evaluation and bioactive potential of *Xylaria primorskensis* terpenoid nanoparticles from its major compound xylaranic acid. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.
- AMEMIYA, T; GROMIHA, M.; HOMIMOTO, K.; *et al.* Drug repositioning for dengue haemorrhagic fever by integrating multiple omics analyses. **Scientific Reports**, v. 9, n. 523, p. 1–13, 2019.
- ANCHEEVA, E.; DALETO, G.; PROKSCH, P. Bioactive Secondary Metabolites from Endophytic Fungi. **Current Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 1836-1854, 2020.
- ANG, L. W.; THEIN, T.; NG, Y.; *et al.* A 15-year review of dengue hospitalizations in singapore: Reducing admissions without adverse consequences, 2003 to 2017. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, p. 1–13, 2019.
- AKONE, S. H.; MÁNDI, A.; KURTÁN, T.; *et al.* Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Chaetomium* sp. through fungal-bacterial co-culture and epigenetic modification. **Tetrahedron**, v.72, n. 13, p. 6340 – 6347, 2016.
- ARON, A.; GENTRY, E. C.; McPHAIL, K. L.; *et al.* Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. **Nature**, v. 15, p. 1954 - 1991, 2020.
- ARRUDA, R.; FADINI, R.; CARVALHO, L.; *et al.* Ecology of neotropical mistletoes : an important canopy-dwelling component of Brazilian ecosystems Taxonomic relationships , diversity and distribution of mistletoes in. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 264–274, 2012.
- BAI, Y.; JIA, Q.; SU, W.; *et al.* Integration of molecular networking and fingerprint analysis for studying constituents in *Microctis Folium*. **PLoS One**, v. 15, n. 7, 2020.
- BANERJEE, D. Endophytic fungal Diversity in tropical and subtropical plants. **Jornal of microbiology**, v. 6. n. 1, p. 54-62, 2011.
- BARABADI, H; ALIZADEH, Z.; RAHIMI, M. T.; *et al.* Nanobiotechnology as an emerging approach to combat malaria : A systematic review. **Nanomedicine**, v. 18, p. 221–233, 2019.
- BARABAN, E.; MORIN, J.; PHILLIPS, G.; *et al.* Xyolide, a bioactive nonenolide from an Amazonian endophytic fungus, *Xylaria feejeensis*. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 31, p. 4058–4060, 2013.
- BARBERO, M.; ARTUSO, E.; PRANDI, C.; *et al.* Fungal Anticancer Metabolites: Synthesis Towards Drug Discovery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 141–185, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico 01 - Situação epidemiológica da febre amarela no monitoramento 2019/2020. **Secretaria de vigilância em Saúde, Ministério da Saúde**, v. 51, n. 1, p. 1–19, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico 03 - Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, 2020. **Secretaria de vigilância em Saúde, Ministério da Saúde**, v. 52, n. 3, p. 1–31, 2021a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico 04 - Informe quinzenal sarampo – Brasil, semanas epidemiológicas 43 de 2020 a 1 de 2021. **Secretaria de vigilância em Saúde, Ministério da Saúde**, v. 52, p. 1–24, 2021b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico 22 - Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 34. **Secretaria de vigilância em Saúde, Ministério da Saúde**, v. 50, n. 22, p. 1–22, 2019.

BIN, G. YANPING, C.; HONG, Z.; *et al.* Isolation, characterization and anti-multiple drug resistant (MDR) bacterial activity of endophytic fungi isolated from the mangrove plant, *Aegiceras corniculatum*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 4, p. 593–599, 2014.

BIRIS-DORHOI, E. S.; MICHIU, D.; POP, C. R.; *et al.* Macroalgae - A Sustainable Source of Chemical Compounds with Biological Activities. **Nutrients**, v. 12, p. 1-23, 2020.

BORUTA, T.; MILCZAREK, I.; BIZUKOJC, M.; *et al.* Evaluating the outcomes of submerged co-cultivation: production of lovastatin and other secondary metabolites by *Aspergillus terreus* in fungal co-cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 5593–5605, 2019.

BÜCKER, A.; BÜCKER, N. C.; SOUZA, A. Q.; *et al.* Larvicidal effects of endophytic and basidiomycete fungus extracts on *Aedes* and *Anopheles larvae* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, p. 411–419, 2013.

CHAGAS, F. O.; DIAS, L.; PUPO, M. T. A Mixed Culture of Endophytic Fungi Increases Production of Antifungal Polyketides. **J. Chem. Ecol.**, v. 39, p. 1335–1342, 2013.

CHAGAS, F. O.; PUPO, M. T. Chemical interaction of endophytic fungi and actinobacteria from *Lychnophora ericoides* in co-cultures. **Microbiological Research**, p. 10 – 16, 2018.

CHAPLA, V. M.; ZERAIK, M. L.; XIMENES, V. F.; *et al.* Bioactive secondary metabolites from *Phomopsis* sp., an endophytic fungus from *Senna spectabilis*. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6597–6608, 2014.

CHEN, K.; CHEN, C.; GUO, J.; *et al.* Mangiterpenes A–C and 2',3'-seco-manginoid C, four sesquiterpene/monoterpene – shikimate–conjugated spirocyclic meroterpenoids from *Guignardia mangiferae*. **Phytochemistry**, v. 164, p. 236–242, 2019.

CHEN, J.; ZHANG, P.; YE, X.; *et al.* The Structural Diversity of Marine Microbial Secondary Metabolites Based on Co-Culture Strategy: 2009–2019. **Marine Drugs**, v. 18, p. 1 - 28, 2020.

- CLAYTON, M. N.; WIENCKE, C. The anatomy, life history and development of the Antarctic brown alga *Phaeurus antarcticus* (Desmarestiales, Phaeophyceae). **Phycologia**, v. 29, n. 3, p. 303-315, 1990.
- CUNHA, R. V.; TRINTA, K. S. Chikungunya virus: Clinical aspects and treatment. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 523–531, 2017.
- CUNZE, S.; KOCHMANN, J.; KOCH, L. K.; *et al.* Niche conservatism of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* - Two mosquito species with different invasion histories. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.
- DÉNES, A.; IBRAHIM, M. A.; OLUOCH, L.; *et al.* Impact of weather seasonality and sexual transmission on the spread of Zika fever. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.
- EL-HAWARY, S. S. MOAWAD, A. S.; BAHR, H. S.; *et al.* Natural product diversity from the endophytic fungi of the genus *Aspergillus*. **Royal Society of Chemistry**, v. 10, p. 22058–22079, 2020.
- ELIAS, L. M.; FORTKAMP, D.; SARTORI, S.; *et al.* The potential of compounds isolated from *Xylaria* spp. as antifungal agents against anthracnose. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 840–847, 2018.
- FENG, L.; WANG, J.; LIU, S.; *et al.* Colletopeptides A-D, Anti-inflammatory Cyclic Tridepsipeptides from the Plant Endophytic Fungus *Colletotrichum* sp. S8. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 6, p. 1434–1441, 2019.
- FERREIRA-DE-LIMA, V. H.; ANDRADE, P. S.; THOMAZELLI, L. M.; *et al.* Silent circulation of dengue virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) resulting from natural vertical transmission. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2020.
- FREITAS, C. S.; HIGA, L. M.; SACRAMENTO, C. Q.; *et al.* Yellow fever virus is susceptible to sofosbuvir both in vitro and in vivo. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, p. 1–22, 2019.
- GANESAN, V. K.; DUAN, B.; REID, S. P. Chikungunya Virus: Pathophysiology, Mechanism, and Modeling. **Viruses**, v. 9, n. 368, p. 1–14, 2017.
- GARCIA, G. A.; DAVID, M. R.; MARTINS, A. J.; *et al.* The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. 1–20, 2018.
- GERIS, R.; ROGRIGUES-FO, E.; SILVA, H.; *et al.* Larvicidal Effects of Fungal Meroterpenoids in the Control of *Aedes aegypti* L., the Main Vector of Dengue and Yellow Fever. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, p. 341-345, 2008.
- GODINHO, V. M.; FURBINO, L. E.; SANTIAGO, I. F.; *et al.* Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **International Society for Microbial Ecology**, v. 7, p. 1434–1451, 2013.

- GOVINDARAJAN, M.; JEBANESAN, A.; REETHA, D. Larvicidal effect of extracellular secondary metabolites of different fungi against the mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. **Tropical Biomedicine**, v. 22, n.1, p. 1 – 3, 2005.
- HAKIM, M. M.; PATEL, I. C. A review on phytoconstituents of marine brown algae. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 1-11, 2020.
- HELVECIO, E.; ROMAO, T. P.; DANILO DE CARVALHO-LEANDRO, D.; *et al.* Polymorphisms in *GSTE2* is associated with temephos resistance in *Aedes aegypti*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 165, p. 1-10, 2020.
- JAYANTHI, G.; KAMALRAJ, S.; KARTHIKEYAN, K.; *et al.* Antimicrobial and antioxidant activity of the endophytic fungus *Phomopsis* sp . GJJM07 isolated from *Mesua ferrea*. **International Journal of Current Science**, v. 1, p. 85–90, 2011.
- JAYATHILAKA, D.; GOMES, L.; JEEWANDARA, C.; *et al.* Role of NS1 antibodies in the pathogenesis of acute secondary dengue infection. **Nature Communications**, v. 9, n. 5242, p. 1–15, 2018.
- JOUDA, J.; TAMOKOU, J.; MBAZOA, C. D.; *et al.* Antibacterial and cytotoxic cytochalasins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. harbored in *Garcinia kola* (Heckel) nut. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2016.
- KOKLA, A.; MELNYK, C. W. Developing a thief: Haustoria formation in parasitic plants. **Developmental Biology**, v. 442, p. 53–59, 2018.
- LI, C.; SAROTTI, A. M.; YANG, B. *et al.* A New N-methoxypyridone from the Co-Cultivation of Hawaiian Endophytic Fungi *Camporesia sambuci* FT1061 and *Epicoccum sorghinum* FT1062. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1–8, 2017.
- LI, S.; ZHANG, X.; WANG, X. *et al.* Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 156, p. 316–343, 2018.
- LIU, B.; LE, C. T.; BARRET, R. L.; *et al.* Historical biogeography of Loranthaceae (Santalales): Diversification agrees with emergence of tropical forests and radiation of songbirds. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 124, p. 199–212, 2018.
- LIU, Y.; RUAN, Q.; JIANG, S.; *et al.* Cytochalasins and polyketides from the fungus *Diaporthe* sp. GZU-1021 and their anti-inflammatory activity. **Fitoterapia**, v. 137, n. May, p. 104187, 2019.
- MACIEL, O. M. C.; TAVARES, R. S. N.; CALUZ, D. R. E.; *et al.* Photoprotective potential of metabolites isolated from algae-associated fungi *Annulohypoxylon stygium*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, n. October 2017, p. 316–322, 2018.
- MAO, Z.; WANG W.; SU, R.; *et al.* Hyalodendrins A and B, New Decalin-Type Tetramic Acid Larvicides from the Endophytic Fungus *Hyalodendriella* sp. Ponipodef12. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 1–8, 2020.

MASI, M.; CIMMINO, A.; TABANCA, N. *et al.* A survey of bacterial, fungal and plant metabolites against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the vector of yellow and dengue fevers and Zika virus. **Open Chemistry**, v. 15, P. 156-166, 2017.

MAZLAN, N.; TAN, L.; KARIN, N. H.; *et al.* Talanta Acrylic-based genosensor utilizing metal salphen labeling approach for reflectometric dengue virus detection. **Talanta**, v. 198, p. 358–370, 2019.

McCORMICK, S. P.; ALEXANDER, N. J.; HARRIS, L. J. CLM1 of *Fusarium graminearum* Encodes a Longiborneol Synthase Required for Culmorin Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 136-141, 2010.

MEDEIROS, A.; SAVI, D.; MITRA, P.; *et al.* Bioprospecting of *Diaporthe terebinthifolii* LGMF907 for antimicrobial compounds. **Folia microbiol**, v. 4, n. 63, p. 449–505, 2018.

MEKINIC, I. G.; SKROZA, D.; SIMAT, V.; *et al.* Phenolic Content of Brown Algae (Pheophyceae) Species: Extraction, Identification, and Quantification. **Biomolecules**, v. 9, p. 1-25, 2019.

MIAO, L.; KWONG, T.; QIAN, P.; *et al.* Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrinium* c.f. *saccharicola*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 72, p.1063 – 1073, 2006.

MIOT, E. F.; AUBRY, F.; DABO, S.; *et al.* A peridomestic *Aedes malayensis* population in Singapore can transmit yellow fever virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 10, p. 1–11, 2019.

MUNASINGHE, M. V. K. KUMAR, N.; JAYASINGHE, L.; *et al.* Indole-3-Acetic Acid Production by *Colletotrichum siamense*, An Endophytic Fungus from *Piper nigrum* Leaves. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 7, n. 6, p. 475–479, 2017.

NAI, C.; MEYER, V. From axenic to mixed cultures: Technological advances accelerating a paradigm shift in microbiology. **Trends in Microbiology**, p. 1 – 17, 2017.

NALINI, M.; LENA, M.; SUMATHI, P.; *et al.* Effect of phyto-synthesized silver nanoparticles on developmental stages of malaria vector, *Anopheles stephensi* and dengue vector, *Aedes aegypti*. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, p. 212–218, 2017.

NICKRENT, D. L.; MALÉCOT, V.; VIDAL-RUSSELL, R.; *et al.* A revised classification of Santalales. **Taxon**, v. 59, n. 2, p. 538–558, 2010.

OLIVEIRA, C. M.; SILVA, G. H.; RAGASINI, L. O.; *et al.* Xylarenones C-E from an Endophytic Fungus Isolated from *Alibertia macrophylla*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 6, p. 1353–1357, 2011.

OMOARELOJIE, L. O.; STADEN, J. V. Plant-endophytic fungi interactions: A strigolactone perspective. **South African Journal of Botany**, p. 1-5, 2020.

OPPONG-DANQUAH, E.; BUDNICKA, P.; BLUMEL, M.; *et al.* Design of Fungal Co-

Cultivation Based on Comparative Metabolomics and Bioactivity for Discovery of Marine Fungal Agrochemicals. **Maine. Drugs**, v. 18, p. 1-19, 2020.

ORLANDELLI, R.C.; ALBERTO, R. N.; FILHO, C. J. R.; *et al.* Diversity of endophytic fungal Community associated with *Piper hispidum* (Piperaceae) leaves. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 2, p. 1575-1585, 2012.

OKADA, B. K.; SEYEASAYAMDOST, M. R. Antibiotic dialogues: induction of silent biosynthetic gene clusters by exogenous small molecules. **Microbiology Reviews**, v. 41, n. 1, p. 19 – 33, 2016.

QUINN, R. A.; NOTHIAS, L.; VINING, O.; *et al.* MolecularNetworking As a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strategy. **Trends Pharmacol Sci**, v. 38, n. 2, p. 143-154, 2016

PATJANA, T.; JANTAHARN, P.; KATRUN, P.; *et al.* Anti-inflammatory and cytotoxic agents from *Xylaria* sp. SWUF09-62 fungus. **Natural Product Research**, p. 1–10, 2019.

PEREIRA, C. M. P.; NUNES, C.; ZAMBOTTI-VILLELA, L. *et al.* Extraction of sterols in brown macroalgae from Antarctica and their identification by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 2, p. 751–757, 2016.

PETERS, A. F.; OPPEN, M.; WIENCKE, C.; *et al.* Phylogeny and historical ecology of the Desmarestiaceae (Phaeophyceae) support a southern hemisphere origin. **Journal Phycol**, v. 33, p. 294-309, 1997.

PENG, X.; WU, J.; SHAO, C.; *et al.* Co-culture: stimulate the metabolic potential and explore the molecular diversity of natural products from microorganisms. **Marine Life Science & Technology**, 2021.

PILZ-JUNIOR, H. L.; LEMOS, A. B.; ALMEIDA, K. N.; *et al.* Microbiota potentialized larvicidal action of imidazolium salts against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019.

PINHEIRO, J. B.; POLONIO, J. C.; ORLANDELLI, R. C.; *et al.* Larvicidal activity of endophytic fungi: a review. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 35761-35774, 2020.

PINTO, R. C. CASTRO, D. B.; ALBUQUERQUE, B. C.; *et al.* Mortality Predictors in Patients with Severe Dengue in the State of Amazonas , Brazil. **Plos one**, p. 1–10, 2016.

RIEDER, A.; SILVA, O. B.; RODRIGUES, L. C.; *et al.* Mistletoe in Tumour Therapy . Basic Research and Clinical Practice . 6th Mistletoe Symposium. **Phytomedicine journal**, v. 22, p. 2015, 2015.

ROSA, L. H.; VIEIRA, M. L.; COTA, B. B.; *et al.* Endophytic Fungi of Tropical Forests: A Promising Source of Bioactive Prototype Molecules for the Treatment of Neglected Diseases. **Drug Development – A Case Study Based Insight into Modern Strategies**, p. 469 – 486, 2011.

SANTOS, V. H. P.; SILVA, E. O. Endophytic fungi from the Brazilian flora and their employment in biotransformation reactions. **Química Nova**, v. 42, n. 7, p. 784-791, 2019

SATHYA, A.; VIJAYABHARATHI, R.; KUMARI, B. *et al.* Assessment of a diketopiperazine, cyclo(Trp-Phe) from *Streptomyces griseoplanus* SAI-25 against cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Appl Entomol Zool**, v. 51, n. 1, 2015.

SARMA, R.; ADHIKARI, K.; MAHANTA, S.; *et al.* Combinations of Plant Essential Oil Based Terpene Compounds as Larvicidal and Adulticidal Agent against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

SATHIYANATHAN, M.; UMARAJAN, K. M. Larvicidal activity of endophytic fungi isolated from selected medicinal plants on *Aedes aegypti*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 2, p. 247–253, 2019.

SCALON, M. C.; ROSSATTO, D. R.; DOMINGOS, F. M. C. B.; *et al.* Leaf morphophysiology of a Neotropical mistletoe is shaped by seasonal patterns of host leaf phenology. **Oecologia**, v. 180, n. 4, p. 1103–1112, 2016.

SEGARAN, G.; SATHIAVELU, M. Fungal endophytes: A potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 1–17, 2019.

SHAW, W. R.; CATTERUCCIA, F. Vector biology meets disease control: using basic research to fight vector-borne diseases. **Nature Microbiology**, v. 4, p. 20–34, 2019.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 737–749, 2017.

SILVA, M. V. S. G.; SILVA, S. A.; TEIXEIRA, T. L.; *et al.* Essential oil from leaves of *Eugenia calycina* Cambes: Natural larvicidal against *Aedes aegypti*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 3, p. 1202–1208, 2021.

SILVA, P.; SOUZA, M.; BIANCO, E.; *et al.* Antifungal polyketides and other compounds from Amazonian endophytic *talaromyces* fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 3, p. 622–630, 2018.

SILVA, S. S.; COSTA, M. B. S.; SOUZA, A. Q. L.; *et al.* Isolation and identification of endophytic fungi of *Passovia stelis* (Loranthaceae). **Brazilian Applied Science Review**, v. 4, n. 3, p. 1262-1270, 2020.

SILVÉRIO, M. R. S.; ESPINDOLA, L. S.; LOPES, N. P.; *et al.* Plant natural products for the control of *Aedes aegypti*: The main vector of important arboviruses. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 1–42, 2020.

SINHA, R.; SHARMA, B.; DANGI, A. K.; *et al.* Recent metabolomics and gene editing approaches for synthesis of microbial secondary metabolites for drug discovery and development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 166, p. 1–14,

2019.

SMITH, L. B. SEARS, C.; SUN, H.; *et al.* CYP-mediated resistance and cross-resistance to pyrethroids and organophosphates in *Aedes aegypti* in the presence and absence of kdr. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 160, n. July, p. 119–126, 2019.

SOARES, D. A.; ROSA, L. H.; SILVA, J. F. M.; *et al.* A review of bioactive compounds produced by endophytic fungi associated with medicinal plants. **Ciências Naturais**, v. 12, n. 3, p. 331-352, 2017.

SONG, X.; WANG, H.; REN, F.; *et al.* An endophytic diaporthae apiculatum produces monoterpenes with inhibitory activity against phytopathogenic fungi. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, 2019.

SOUZA-NETO, J. A. POWELL, J. R.; BONIZZONI, M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 67, n. September 2018, p. 191–209, 2019.

SUAZA-GAVIRIA, GONZÁLEZ, F.; PABÓN-MORA, N.; *et al.* Comparative inflorescence development in selected Andean Santalales. **American Journal of Botany**, v. 104, n. 1, p. 24–38, 2017.

SUHRBIER, A. Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 15, n. 10, p. 597–611, 2019.

RAGAVENDRAN, C. MANIGANDAN, V.; KAMARAJ, C.; *et al.* Larvicidal, Histopathological, Antibacterial Activity of Indigenous Fungus *Penicillium* sp. Against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae) and Its Acetylcholinesterase Inhibition and Toxicity Assessment of Zebrafish (*Danio rerio*). **Frontiers in Microbiology**, v. 10. p. 1 -17, 2019.

RAMOS, P.; RIVAS, N.; POLLMANN, S.; *et al.* Hormonal and physiological changes driven by fungal endophytes increase Antarctic plant performance under UV-B radiation. **Fungal Ecology**, v. 34, p. 76 – 82, 2018.

TANAPICHATSAKUL, C.; MONGGOOT, S.; GENTEKAKI, E.; *et al.* Antibacterial and Antioxidant Metabolites of *Diaporthe* spp. Isolated from Flowers of *Melodorum fruticosum*. **Current Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 476–483, 2018.

TAN, Z. Q.; LEOW, H. Y.; LEE, D. C. W.; *et al.* Co-Culture Systems for the Production of Secondary Metabolites: Current and Future Prospects. **The Open Biotechnology Journal**, v. 13, p. 18-26, 2019.

TEIXEIRA, T. R.; SANTOS, G. S.; ARMSTRONG, L.; *et al.* Antitumor Potential of Seaweed Derived-Endophytic Fungi. **Antibiotics**, v. 8, n. 205, p. 1–24, 2019b.

TEIXEIRA, T. R.; SANTOS, G. S.; TURATII, I. C.; *et al.* Characterization of the lipid profile of Antarctic brown seaweeds and their endophytic fungi by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). **Polar Biology**, v. 42, n. 8, p. 1431–1444, 2019a.

TORRES, S. CAJAS, D.; PALFNER, G.; *et al.* Steroidal composition and cytotoxic activity from fruiting body of *Cortinarius xiphidipus*. **Natural Product Research**, v. 31, n. 4, p. 473–476, 2016.

TRONCOSO, A. J.; CABEZAS, N.; FAÚNDEZ, E.; *et al.* Host-mediated volatile polymorphism in a parasitic plant influences its attractiveness to pollinators. **Oecologia**, v. 162, p. 413–425, 2010.

VINALE, F.; NICOLETTI, R.; BORRELLI, F.; *et al.* Co-Culture of Plant Beneficial Microbes as Source of Bioactive Metabolites. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1 – 12, 2017.

WANG, F. Bioactive metabolites from *Guignardia* sp., an endophytic fungus residing in *Undaria pinnatifida*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 1, p. 72–76, 2012.

WANG, M.; CARVER, J.; PHELAN, V.; SANCHEZ, L. M.; *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nat Biotechnol**, V 34, p. 828-837, 2016

WANG, Z.; PERUMALSAMY, H.; WANG, X.; *et al.* Toxicity and possible mechanisms of action of honokiol from *Magnolia denudata* seeds against four mosquito species. **Scientific Reports**, v. 9, n. 411, p. 1–19, 2019.

WEBER, J.; VACLAVIKOVA, M.; WIESENBERGER, G.; *et al.* Chemical synthesis of culmorin metabolites and their biologic role in culmorin and acetyl-culmorin treated wheat cells. **Org. Biomol. Chem.**, v. 16, p. 2043–2048, 2018.

WILKE, A. B. B.; CHASE, C.; VASQUEZ, C.; *et al.* Urbanization creates diverse aquatic habitats for immature mosquitoes in urban areas. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Chikungunya*. 2020a Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>>. Acesso em: 5 mar. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Dengue and severe dengue*. 2021. Disponível em:<<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>. Acesso em: 15 maio 2021

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for Efficacy Testing of Spatial Repellents. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Strengthening research in an epidemic: Zika in Latin America*. 2020b. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/detail/24-01-2020-strengthening-research-in-an-epidemic-zika-in-latin-america>>. Acesso em: 5 mar. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Yellow fever*. 2019a Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>>. Acesso em: 5 mar. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Zika epidemiology update*. 2019b. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/zika/zika-epidemiology-update-july-2019.pdf?ua=1>>. Acesso em: 5 mar. 2020.

XIAO, Y.; HAN, F.; LEE, I. Biotransformation of the Phenolic Constituents from Licorice and Cytotoxicity Evaluation of Their Metabolites. **Molecular Sciences**, v. 22, p. 2-16, 2021.

YOSHIDA, S. *et al.* The Haustorium, a Specialized Invasive Organ in Parasitic Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 67, p. 643–667, 2016.

YU, M.; LI, Y.; BANAKAR, S.; *et al.* New Metabolites from the Co-culture of Marine-Derived Actinomycete *Streptomyces rochei* MB037 and Fungus *Rhinochadiella similis* 35. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1 -11, 2019.

ZHANG, L.; NIAZ, S. I.; KHAN, D.; *et al.* Induction of Diverse Bioactive Secondary Metabolites from the Mangrove Endophytic Fungus *Trichoderma* sp. (Strain 307) by Co-Cultivation with *Acinetobacter johnsonii* (Strain B2). **Marine Drugs**, v. 15, n. 35, p. 1-14, 2017.

ZOUBIRI, S.; BAALIOUAMER, A. Potentiality of plants as source of insecticide principles. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, p. 925–938, 2014.