



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE**



**DIVERSIDADE FÚNGICA CULTIVÁVEL DO HABITAT AQUÁTICO
DE *Anopheles darlingi* ROOT, 1926 E SEU POTENCIAL LARVICIDA E
ANTIPLASMODIAL**

MARTA RODRIGUES DE OLIVEIRA

MANAUS - AM

2021

MARTA RODRIGUES DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE FÚNGICA CULTIVÁVEL DO HABITAT
AQUÁTICO DE *Anopheles darlingi* ROOT, 1926 E SEU POTENCIAL
LARVICIDA E ANTIPLASMODIAL**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza (FCA/UFAM).

Co-Orientadores: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza (DQ/UFAM)

Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei (INPA, *in memoriam*).

MANAUS - AM

08/2021

Ficha Catalográfica

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

Oliveira, Marta Rodrigues de

O48d Diversidade fúngica cultivável do habitat aquático de *Anopheles darlingi* Root, 1926 e seu potencial larvicida e antiplasmodial / Marta Rodrigues de Oliveira. 2021

171 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Antonia Queiroz Lima de Souza

Coorientador: Afonso Duarte Leão de Souza

Coorientador: Wanderli Pedro Tadei

Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Anopheles darlingi*. 2. *Aedes aegypti*. 3. Controle biológico. 4. Diversidade fúngica. 5. Metabólito bioativos. I. Souza, Antonia Queiroz Lima de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

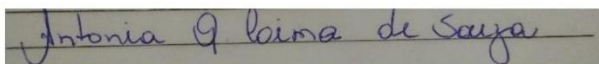
MARTA RODRIGUES DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE FÚNGICA CULTIVÁVEL DO HABITAT AQUÁTICO DE
Anopheles darlingi ROOT, 1926 E SEU POTENCIAL LARVICIDA E
ANTIPLASMODIAL**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Conservação.

Orientador (a): **Profa. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza** - **FCA/UFAM**

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza
Presidente (UFAM)



Profa. Dra. Patricia Melchionna Albuquerque
Membro Titular Interno (UEA)



Profa. Dra. Cintia Mara Costa de Oliveira
Membro Titular Interno (UFAM)



Profa. Dra. Beatriz Ronchi Teles
Membro Titular Externo (INPA)



Felipe Arley Costa Pessoa
Inst. Leônidas e Maria Deane/FIOCRUZ
Pesquisador
Sisape 1557609

Prof. Dr. Felipe Arley Costa Pessoa
Membro Titular Externo (FIOCRUZ)

*A minha amada avô **Maria Brito de Oliveira** (in memorian).*

Dedico

*Aos meus pais **Raiél Brito de Oliveira** e **Rosa Maria Rodrigues de Oliveira**, pelo amor incondicional, por sempre me apoiarem a continuar e lutar pelas realizações dos meus sonhos. Eu os respeito e os amo muito!*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que sempre foi meu socorro e abrigo nos momentos difíceis, que iluminou todos os meus passos nessa trajetória, fazendo esse momento possível.

Aos meus pais Rosa Maria e Raiel de Oliveira, que me apoiaram de maneira incondicional, que sempre fizeram o possível e até o que parecia impossível pelos filhos, cujo amor esgotam minhas palavras de gratidão. Aos meus amados irmãos Reigison, Raniele e Raniel de Oliveira, em especial a Rayhele que foi a minha companheira em Manaus e me aguentou nos meus momentos de pura ansiedade. Aos meus maiores presentes, meus sobrinhos, Emanuel Ryan e Rebeca de Oliveira. As minhas queridas cunhadas Bruna Libório e Cristiane Saldanha. A minha tia Rozane Brito pelo constante apoio. A todos os membros desta Grande e amada Família, que apesar dos momentos difíceis, a união e o amor nos fizeram permanecer firmes.

Ao meu namorado, Daniel Dias Dornelas do Carmo, pelo constante apoio, companheirismo, incentivo e motivação em todos os momentos.

A Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza, minha orientadora, que sempre me ajudou nas horas que mais precisei, pela amizade, cuidado e pelas lágrimas compartilhadas. Muito obrigada por todo ensinamento e contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Dr. Afonso Duarte Leão de Souza, meu co-orientador, por todo apoio, amizade, ajuda constante e pela grande paciência em me ensinar o desafiador mundo da química de produtos naturais.

Ao Dr. Wanderli Pedro Tadei, meu querido amigo e co-orientador que infelizmente nos deixou nesse último ano, minha eterna admiração e gratidão por tudo. Foi uma grande honra poder ter convivido com você ao longo desses anos, por tanto aprendizado, pelos momentos compartilhados e pela forma leve e carinhosa que fui abraçada em seu grupo de pesquisa.

Aos meus amigos de jornada, Fabyanne Guimarães, Leissandra Castelo, Ruth Praia, Erlanilson Torres e entre tantos outros, pelo apoio, cumplicidade, companheirismo ao longo desses anos.

A Todos os amigos e companheiros dos laboratórios LabMicrA/UFAM e Malária e Dengue/INPA, por tornarem o ambiente de trabalho tão amável e pelos diversos momentos que compartilhamos, em especial ao André Higa, Kamila Rangel, Ketlen Ohsen, Francisca, Debora Moura, Elias, Francinaldo e Rafael.

Ao Dr. Gilvan Silva, pelo constante apoio e colaborações, por abrir as portas do seu laboratório na EMBRAPA. Ao Jeferson Cruz por toda ajuda nas análises moleculares e ao Thiago Souza pela ajuda em todas as horas e pelas análises filogenéticas.

Aos meus mais que colaboradores Ricardo Katak pela ajuda e parceria em todos os momentos, principalmente nos ensaios larvicidas, Sarah Raquel pelos ensaios antimicrobianos e Adriano Nobre pela ajuda nas análises dos dados de biodiversidade.

Ao Dr. Adrian Pohlit, pela a realização dos ensaios antimaláricos, as minhas queridas colaboradoras Laís Garcia, Jaqueline Siqueira e a Marlene Camargo.

Ao Dr. Emerson Lima e a Bárbara Janaína pela realização dos ensaios citotóxicos.

A Dra. Patrícia Orlandi e a Ivanildes Bastos pela realização dos ensaios citotóxicos com os extratos miceliais.

A Dra. Rosemary Roque, por tudo, por estar sempre disposta a ajudar e contribuir com todos do laboratório de Malária e Dengue.

Ao Dr. Osvaldo Marinotti pelas excelentes contribuições na redação dos manuscritos.

A todos os professores, técnicos e alunos dos laboratórios da Central Analítica.

A todos os professores, colaboradores, secretárias e aos coordenadores (Dra. Patrícia Albuquerque e Dr. Héctor Koolen) do PPGBionorte.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Beatriz Ronchi Teles, Dra. Cíntia Mara Oliveira, Dr, Felipe Arley Pessoa e Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque, pela disposição em ajudar a engrandecer o trabalho com valiosas correções e sugestões.

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001, por ter financiado parcialmente este trabalho por meio do projeto Pró-Amazônia: Biodiversidade e Sustentabilidade (processo número 23038.009442 / 2013-12).

Aqui deixo meus agradecimentos a todos os envolvidos, direta ou indiretamente, na realização desse trabalho. Peço perdão a todos que por acaso não tiveram os seus nomes citados, porém são merecedores da minha profunda gratidão.

“Faça o que pode, com o que tem, onde estiver”

Franklin Roosevelt

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta”

Carl Sagan

RESUMO

Os mosquitos *Anopheles darlingi* Root, 1926 e *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762, são insetos de grande importância para a saúde pública, pois são vetores de diversos agentes etiológicos de doenças humanas, como malária, dengue, chikungunya, febre amarela urbana e Zika. O controle destes vetores é a ferramenta mais eficiente para conter a transmissão destes patógenos. Alguns fungos e seus metabólitos são eficazes no controle de vetores de doenças tropicais, em diferentes estágios de desenvolvimento. A interação entre fungos e formas imaturas, em seus criadouros, é um fator relevante para se conhecer e estabelecer estratégias objetivando controlar a transmissão destas doenças. Desta forma, este trabalho teve como objetivo principal investigar a diversidade fúngica cultivável obtida de ambientes aquáticos de larvas de *Anopheles darlingi* e de seus metabólitos para uso no controle do *Ae. aegypti*, do *Plasmodium falciparum* e de *Candida*. Este trabalho foi dividido em cinco capítulos. No capítulo I abordamos o estudo da diversidade e a riqueza fúngica dos criadouros das larvas de *An. darlingi*. Foram isoladas 206 linhagens fúngicas agrupadas e classificadas em 30 morfotipos. Os morfotipos identificados pertenciam a três filos, cinco classes, dez ordens, 25 famílias e 26 gêneros de fungos. No capítulo II foi realizada a identificação de espécies fúngicas isoladas de ambientes aquáticos na região Amazônica. Foram investigados 55 isolados fúngicos, e a partir das análises filogenéticas das sequências obtidas pelo sequenciamento da região ITS 1 e 2, 28 fungos foram identificados até o nível de espécie, 21 como possíveis espécies novas, cinco foram identificados como sp., e um isolado foi identificado somente até o nível de família. O capítulo III apresenta o estudo de linhagens fúngicas dos metabólitos com atividade larvicida contra *Ae. aegypti*. Foram estudados 72 extratos brutos de 36 fungos, 15 extratos fúngicos do meio líquido de cultivo apresentaram atividade larvicida igual ou superior a 50% e, destes, oito conseguiram matar mais de 90% das larvas em até 72 h, demonstrando alto potencial larvicida. No capítulo IV está a seleção de 20 extratos em estudo bio guiado pela atividade antiplasmodial *in vitro* dos extratos bioativos, frações e substância de fungo *Diaporthe sp.* – 1242. Este estudo, permitiu o isolamento e a identificação de uma classe e uma substância com alta atividade antiplasmodial contra a cepa multirresistente de *P. falciparum* K1 (CI50 de 0.0179 µg/mL). No capítulo V foi avaliada a atividade antimicrobiana e citotóxica de metabólitos extraídos de micélios dos fungos anteriormente isolados. Os extratos testados apresentaram potencial antimicrobiano, sendo cinco extratos ativos contra cepas de *Candida* e dos extratos ativos, dois foram potencialmente citotóxicos. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho confirmam que os ambientes aquáticos de larvas de *An. darlingi* apresentam uma alta diversidade microbiana, sendo esse ambiente um bom candidato para a descoberta de novas espécies fúngicas. Os metabólitos dos fungos isolados apresentam atividades larvicidas frente ao *Ae. aegypti* atividade antiplasmodial frente ao *P. falciparum* e antifúngica contra cepas de *Candida*.

Palavras-chave: *Anopheles darlingi*; *Aedes aegypti*; Controle biológico; Diversidade fúngica; Metabólito bioativos.

ABSTRACT

The mosquitoes *Anopheles darlingi* Root, 1926 and *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762, are insects of great importance to public health because they are vectors of several etiological agents of human diseases, such as malaria, dengue, chikungunya, urban yellow fever, and Zika. The control of these vectors is the most efficient tool to contain the transmission of these pathogens. Some fungi and their metabolites are effective in controlling tropical disease vectors at different stages of development. The interaction between fungi and immature forms, in their breeding sites, is a relevant factor to know and establish strategies to control the transmission of these diseases. Thus, the main objective of this work was to investigate the cultivable fungal diversity obtained from aquatic environments of *Anopheles darlingi* larvae and its metabolites for use in the control of *Ae. aegypti*, *Plasmodium falciparum* and *Candida*. This work was divided into five chapters. In the chapter, I addressed the study of the diversity and fungal richness of the breeding sites of *An. darlingi* larvae. A total of 206 fungal strains were isolated and grouped and classified into 30 morphotypes. The identified morphotypes belonged to three phyla, five classes, ten orders, 25 families, and 26 genera of fungi. In chapter II the identification of fungal species isolated from aquatic environments in the Amazon region was carried out. A total of 55 fungal isolates were investigated, and from the phylogenetic analyses of the sequences obtained by sequencing the ITS 1 and 2 regions, 28 fungi were identified to the species level, 21 as possible new species, five were identified as sp., and one isolate was identified only to the family level. Chapter III presents the study of fungal strains of the metabolites with larvicidal activity against *Ae. aegypti*. A total of 72 crude extracts of 36 fungi were studied, 15 fungal extracts of the liquid culture medium showed larvicidal activity equal to or greater than 50% and, of these, eight were able to kill more than 90% of the larvae in up to 72 h, demonstrating high larvicidal potential. In chapter, IV is the selection of 20 extracts in a bioguided study for the in vitro antiplasmodial activity of bioactive extracts, fractions, and substances from the fungus *Diaporther* sp. - 1242. This study allowed the isolation and identification of one class and one substance with high antiplasmodial activity against the multidrug resistant strain of *P. falciparum* K1 (CI₅₀ of 0.0179 µg/mL). In chapter V the antimicrobial and cytotoxic activity of metabolites extracted from mycelia of the previously isolated fungi was evaluated. The tested extracts showed antimicrobial potential, being five extracts active against *Candida* strains and of the active extracts, two were potentially cytotoxic. Therefore, the results obtained in this work confirm that the aquatic environments of *An. darlingi* larvae present a high microbial diversity, being this environment a good candidate for the discovery of new fungal species. The metabolites of the isolated fungi show larvicidal activity against *Ae. aegypti*, antiplasmodial activity against *P. falciparum*, and antifungal activity against *Candida* strains.

Keywords: *Anopheles darlingi*; *Aedes aegypti*; Biological control; Fungal diversity; Bioactive metabolite.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Mapa global da distribuição prevista de <i>Ae. aegypti</i>	26
Figura 2: Ciclo biológico do <i>Aedes aegypti</i>	28
Figura 3: Risco global previsto de dengue..	29
Figura 4: Distribuição global da transmissão da malária.	31
Figura 5: Distribuição das principais espécies de anofelinos vetores de malária no continente americano.....	33
Figura 6: Áreas de transmissão da Malária no Brasil, no ano de 2020.	34
Figura 7: Ciclo de vida do <i>Anopheles darlingi</i>	35
Figura 8: Ciclo de vida dos parasitas da malária..	37

CAPÍTULO I

Fig. 1: Composition of the fungal communities at the class level at the different collection sites.....	58
Fig. 2: Composition of fungal communities at the order level at the different collection sites.	58
Fig. 3: Composition of fungal communities at the gender level at different collection sites..	59
Fig. 4: Distribution of fungi isolated from <i>An. darlingi</i> larvae breeding sites, in the different culture media AVA, ISP2, PDA + L, and SDAY.....	59
Fig. 5: Venn diagram showing the number of fungal taxa shared or exclusive between the collection sites C1, C2, S1 and S2.....	60
Fig. 6: Non-metric multidimensional scaling (nMDS) using the Bray-Curtis distance to show the similarities between the collection sites in relation to the distribution of fungal isolates.	60
Supplementary Fig. 1: Places of sampling of surface water from the larval habitats of <i>Anopheles darlingi</i>	61
Supplementary Fig. 2: Dendrogram of fungi isolated from the aquatic freshwater habitat of <i>An. darlingi</i> at different collection sites C1, C2, S1 and S2, according to the Jaccard similarity.....	62

Supplementary Fig. 3: The fungal richness accumulation curve obtained at the collection sites shows that the number of observed taxa is very close to the estimated number, however, the non-asymptote curve, suggesting that richness would continue to increase with greater sampling effort.....68

CAPÍTULO II

Figure 1: Aspectos morfológicos e identificação taxonômica de diferentes isolados fúngicos obtidos de ambientes aquáticos da Amazônia..	74
Figure 2: Gêneros de fungos identificados a partir das linhagens isoladas de ambientes aquáticos de Coari e São Gabriel da Cachoeira.....	78
Figura 3: Árvore filogenética de sequências de fungos da ordem Eurotiales isolados de ambiente aquáticos da Amazônia e seus parentes mais próximos.	79
Figura 4: Árvore filogenética de sequências de fungos da ordem Diaporthales isolados de ambiente aquáticos da Amazônia e seus parentes mais próximos.	80
Figura 5: Árvore filogenética de sequências de fungos das ordens Polyporales e Russulales isolados de ambiente aquáticos da Amazônia e seus parentes mais próximos.	82
Figura 6: Árvore filogenética de sequências de fungos da ordem Pleosporales isolados de ambiente aquáticos da Amazônia e seus parentes mais próximos.	83
Figura 7: Árvore filogenética de sequências de fungos do gênero <i>Epicoccum</i> da ordem Pleosporales isolados de ambiente aquáticos da Amazônia e seus parentes mais próximos.	84
Figura 8: Árvore filogenética de sequências de fungos da ordem Hypocreales isolados de ambiente aquáticos da Amazônia e seus parentes mais próximo..	86
Figura 9: Árvore filogenética de sequências de fungos das ordens Xylariales, Cladosporiales e Mucorales isolados de ambiente aquáticos da Amazônia e seus parentes mais próximo.....	88
Figura 10: Árvore filogenética de sequências de fungos da ordem Venturiales isolados de ambiente aquáticos da Amazônia e seus parentes mais próximo.....	89

CAPÍTULO III

Figure 1: Percentage of mortality of 3 rd instar <i>Aedes aegypti</i> larvae exposed to liquid medium extracts obtained from strains of fungi isolated from aquatic environments of the Amazon.....	119
--	-----

CAPÍTULO IV

Figure 1: Árvore filogenética do fungo <i>Diaporthe ueckerae</i> 1242, isolado do habitat aquático de larvas de <i>An. darlingi</i>	133
Figure 2: Estrutura química da Citocalasina H.....	135
Material Suplementar Figura 1: Espectro de RMN de ^1H (500/125 MHz) do composto 4 (citocalasina H) em CDCl_3	142
Material Suplementar Figura 2: Espectro de RMN de ^{13}C (500/125 MHz) do composto 4 (citocalasina H) em CDCl_3	142
Material Suplementar Figura 3: Espectro de RMN de ^{13}C (500/125 MHz) do composto 4 (citocalasina H) em CDCl_3	143
Material Suplementar Figura 4: Espectro de HSQC (500/125 MHz) do composto 4 (citocalasina H) em CDCl_3	143
Material Suplementar Figura 5: Espectro de HMBC (500/125 MHz) do composto 4 (citocalasina H) em CDCl_3	144
Material Suplementar Figura 6: Espectro de HMBC (500/125 MHz) do composto 4 (citocalasina H) em CDCl_3	144

CAPÍTULO V

Figure 1: Cytotoxicity of mycelial extracts of fungi isolated from aquatic environments in the State of Amazonas in VERO cells (ATCC® CCL-81TM).	154
--	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1: Location and characteristics of the sites for collecting water samples from breeding sites in <i>An. darlingi</i>	56
Table 2: Identification of taxa and distribution at the collection sites of fungi isolated from the waters of <i>An. darlingi</i> larvae breeding sites in the Brazilian Amazon... ..	57
Supplementary Table 1: Data from fungi isolated from breeding sites of <i>An. darlingi</i> larvae at the sampling sites in the municipalities of Coari (C1 and C2) and São Gabriel da Cachoeira (S1 and S2).	62
Supplementary Table 2: Isolated fungi from larvae breeding sites of <i>An. darlingi</i> in the municipalities of Coari and São Gabriel da Cachoeira included in each step of this work.	67
Supplementary Table 3: Diversity estimates found at different collection sites.	67

CAPÍTULO II

Table 1: Identificação taxonômica de fungos isolados de ambientes aquáticos de Coari e São Gabriel da Cachoeira.....	76
--	----

CAPÍTULO III

Table 1: Crude extracts of 36 fungi isolated from aquatic environments in the Amazonian municipalities of Coari and São Gabriel da Cachoeira and used in larvicidal tests against <i>Aedes aegypti</i>	120
Table 2: Lethal larvicidal concentration values of liquid culture medium extracts obtained from fungal strains isolated from water samples against 3 rd instar <i>Aedes aegypti</i> larvae....	121
Supporting Information Table 1 : Larvicidal activity of extracts obtained from the liquid culture medium and from the mycelium of fungi isolated from aquatic environments in the Amazonian municipalities of Coari and São Gabriel da Cachoeira against 3 rd instar larvae of <i>Aedes aegypti</i>	122

CAPÍTULO IV

Table 1: Inibição do crescimento <i>in vitro</i> da cepa K1 de <i>P. falciparum</i> frente aos extratos de fungos isolados do habitat aquático de larvas de <i>An. darlingi</i> do estado do Amazonas.....	131
Table 2: Concentração inibitória 50% (IC ₅₀) <i>in vitro</i> frente à cepa K1 de <i>P. falciparum</i> dos extratos dos fungos isolados do habitat aquático de larvas de <i>An. darlingi</i> do estado do Amazonas....	132
Table 3: Concentração inibitória 50% (IC ₅₀) <i>in vitro</i> das amostras frente à cepa K1 de <i>P. falciparum</i>	134
Material Suplementar Table 1: Dados de RMN 1D e 2D do composto 4 (citocalasina H), 500/125 MHz; ppm; CDCl ₃ ...	145

CAPÍTULO V

Table 1: Antimicrobial activity of mycelial fungal extracts isolated from aquatic environments in the State of Amazonas.	152
Table 2: Identification of the minimum inhibitory concentration (MIC) of mycelial extracts of fungi isolated from aquatic environments in the State of Amazonas, against <i>Candida albicans</i> and <i>C. tropicalis</i>	152

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

1D - unidimensional

2D - bidimensional

AcOEt – Acetato de Etila

CC₅₀ - Concentrações Cítotoxicas 50%

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CEUA - Comitê de Ética de Uso Animal

CG-MS - Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa

CI₅₀ - Concentração Inibitória 50%

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CL-EM - Cromatografia Líquida Acoplada á Espectrometria de Massas

COSY - Correlação homonuclear (1H1H)

DMSO - Dimetilssulfóxido

DTNB - 5',5'-ditiobis- (2-ácido nitrobenzóico)

EM - Espectrometria De Massas

ESI-EM - Espectrometria de Massas por Ionização de Electrospray

HMBC - Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HSQC - Correlação Heteronuclear De Quantum-Simples

IC - Intervalo de Confiança

IR - Índice de Retenção

IS - Índice de Seletividade

ITS - Internal Transcribed Spacer

LaBMicrA - Laboratório de Bioensaios e Microorganismos da Amazônia

LC₅₀ - Lethal Concentration 50%

LC₉₀ - Lethal Concentration 90%

MeOH – Metanol

MID - Dosagem Inibitória Mínima

NCBI - National Center Biotechnology Information

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pH - Potencial Hidrogeniônico

rDNA - DNA ribossomal

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

SD - Standard Deviation

SisGen - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos

Tradicionais Associados

SPE - Extração em Fase Sólida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1. MICROORGANISMOS DE AMBIENTES AQUÁTICOS	20
3.2. POTENCIAL QUÍMICO E METABÓLICO DA DIVERSIDADE FÚNGICA. 21	
3.3. FUNGOS ASSOCIADOS AOS MOSQUITOS	23
3.4. MOSQUITOS E IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA.....	25
3.4.1. <i>Aedes aegypti</i> como transmissor de patógenos	26
3.4.2. <i>Anopheles darlingi</i> como transmissor da malária	30
3.4.2.1. Ciclo de Vida do Parasita da Malária.....	36
4. APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS	38
5. CAPÍTULO I- Fungi associated with <i>Anopheles darlingi</i> Root, 1926, larval breeding sites in the Brazilian Amazon.....	39
6. CAPÍTULO II- Diversidade de fungos cultiváveis em habitats aquáticos de criadouros de <i>Anopheles darlingi</i> na Amazônia.....	69
7. CAPÍTULO III- Extracts of Amazonian fungi with larvicidal activities against <i>Aedes aegypti</i>	96
8. CAPÍTULO IV- Estudos bioguiados dos metabólitos fúngicos de habitats aquáticos da Amazônia frente a cepa de <i>Plasmodium falciparum</i> – K1	124
9. CAPÍTULO V- Antimicrobial and cytotoxic activity of fungal mycelial extracts from aquatic environments in the Amazon	146
10. CONCLUSÃO	159
11. REFERÊNCIAS	160

1. INTRODUÇÃO

Os mosquitos pertencentes à família Culicidae não causam apenas um incômodo, são o grupo de insetos mais importantes clinicamente, devido à ampla gama de doenças que transmitem ao homem e à magnitude de problemas de saúde que essas doenças causam, em todo o mundo.

Destes, destacam-se o *Anopheles darlingi* Root, 1926 e *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762, por terem um importante papel como vetores na transmissão da malária, febre amarela urbana, dengue, chikungunya e Zika. As medidas de controle dessas doenças permanecem com o foco voltado aos vetores que, a cada década, apresentam modificações dos padrões comportamentais, bem como na susceptibilidade aos inseticidas convencionais usados pelos programas de controle nos Sistemas de Saúde. Como alternativas surgem os métodos de controle biológico, como uso de predadores naturais, métodos genéticos e microrganismos, tais como bactérias e fungos para combater os mosquitos vetores de doenças.

Os microrganismos vêm se destacando por apresentarem excelentes resultados de controle populacional a estes grupos de insetos. Além disso, são de fácil obtenção e de baixo custo econômico, quando comparados aos inseticidas sintéticos. O uso de fungos no controle dos vetores é uma atividade promissora, sendo aplicado em diferentes estágios do desenvolvimento.

Os fungos constituem uma importante fonte de metabólitos, com inúmeras aplicações biotecnológicas, devido ao seu grande potencial químico e genético, em produzir diferentes classes de moléculas bioativas, na maioria das vezes desconhecidas. Especialmente os fungos presentes em ambientes aquáticos que são considerados uma fonte prolífera de novos compostos biologicamente ativos.

A urgente necessidade de controlar doenças emergentes e reemergentes exige a busca constante por novas fontes de compostos bioativos. A resistência dos insetos vetores aos inseticidas sintéticos e dos microrganismos patogênicos as drogas atuais, coloca em risco a eficácia da prevenção e do tratamento de um grande número de infecções causadas por vírus, bactérias, fungos e parasitas.

Apesar dos constantes esforços pelos diversos programas nacionais e internacionais para o controle dessas doenças, elas continuam afetando milhares de pessoas anualmente. Dessa forma, se busca implementar medidas que visem explorar a viabilidade desses metabólitos fúngicos, como agentes de controle de última geração,

contra doenças infecciosas, tais como a malária, dengue e candidíase. No entanto, pouco se conhece sobre a diversidade de fungos e seu potencial metabólico, para o controle dessas doenças que afetam o homem.

Portanto, pesquisas que buscam conhecer a diversidade fúngica de ambientes aquáticos e o seu potencial metabólico, são de grande relevância para implementação de políticas públicas, com estratégias mais eficazes para o controle doenças infecciosas. Desta forma, considerando que a Amazônia possui uma das maiores biodiversidades do planeta e que ao longo da região Amazônica, as larvas de *An. darlingi* compartilham em seus ambientes aquáticos uma rica e inexplorada diversidade microbiana. Este trabalho, busca contribuir com dados relevantes sobre a riqueza e a diversidade fúngica presente no habitat aquático das larvas do *An. darlingi* e o potencial metabólico desses fungos para o controle de doenças tropicais infecciosas no Estado do Amazonas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Investigar a diversidade de fungos cultiváveis obtidos de criadouros naturais de larvas de *Anopheles darlingi* e de seus metabólitos para o controle larval do *Aedes aegypti*, frente ao *Plasmodium falciparum* e atividade antimicrobiana e citotóxica.

2.2. Objetivos Específicos:

- Investigar a diversidade e riqueza de fungos das águas dos criadouros naturais de larvas de *An. darlingi*, em duas cidades endêmicas para malária no estado do Amazonas;
- Avaliar atividade larvicida dos extratos dos fungos isolados em larvas de *Ae. aegypti*;
- Avaliar os extratos fungicos ativos contra as larvas do *Ae. aegypti* frente ao *Plasmodium falciparum*;
- Realizar estudo bioguiado pela atividade antiplasmodial *in vitro* do(s) extrato(s), frações e substância(s) dos fungos isolados do habitat aquático de larvas de *An. darlingi*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e citotóxica dos extratos miceliais de fungos isolados do habitat aquático de larvas de *An. darlingi* na região Amazônica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. MICRORGANISMOS DE AMBIENTES AQUÁTICOS

Os fungos apresentam grande diversidade. Compreendem um dos maiores grupos de organismos do planeta em número de espécies e são amplamente distribuídos em diferentes ambientes, estando presentes no meio aquático (água doce e marinha) e terrestre (solo e matéria orgânica em decomposição) (SILVEIRA, 2012). A diversidade total de fungos é estimada em uma faixa de 2.2 a 3.8 milhões espécies (HAWKSWORTH et al., 2017), com aproximadamente 100.000 descritas (LI et al., 2016). Participam praticamente de quase todas as modificações físicas ou químicas na natureza, pois são decompositores importantes nos ecossistemas e associados essencialmente a muitos organismos (LOGUERCIOLEITE, 2004; BLACKWELL, 2011; FLOUDAS et al., 2015). Além disso, fungos podem ser predadores, endófitos, simbiontes ou patógenos (WURZBACHER et al., 2010).

Os fungos presentes nos ambientes aquáticos apresentam grande importância ambiental, são os principais decompositores de matéria orgânica e desempenham papéis importantes na ciclagem de nutrientes, na bioremediação e no funcionamento do ecossistema (ORTIZ-VERA et al., 2018). Possuem elevado potencial adaptativo e são encontrados em ambientes preservados e ou impactados (SILVEIRA, 2012). Os fungos encontrados nesses ambientes podem ser classificados como residentes ou transeuntes. Os residentes reproduzem-se e são apenas encontrados nos ambientes aquáticos, enquanto que, os transeuntes são aqueles que são carregados para esse ambiente por meio de ventos, lixiviação, adesão a substratos orgânicos alóctones, entre outros (SHEARER et al., 2007; PEARMAN et al., 2010).

Atualmente, cerca de 4000 espécies (BÄRLOCHER, 2016) são descritas como fungos aquáticos e eles ocorrem em todos os habitats aquático, como riachos, rios (SHEARER & WEBSTER, 1991), lagos, lagoas, represas, buracos de árvores cheias de água entre outros (GÖNCZÖL & RÉVAY, 2006), além de habitats marinhos (VIJAYKRISHNA et al., 2006). Entretanto a indicação específica nos induz a entender que esses são fungos cultiváveis, e na atualidade, com as novas formas de análise independentes de cultivo, esse resultado pode significar de 1 a 10% ou menos do total de espécies presentes nesse habitat. Ressaltando que dos dez filos propostos para o reino Fungi: Basidiomycota, Ascomycota, Glomeromycota, Microsporidia, Cryptomycota,

Mucoromycota, Zoopagomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota e Neocallimastigomycota, (KAMESHWAR et al., 2019), os organismos frequentemente isolados de ambientes aquáticos são os pertencentes aos filos Chytridiomycota, Ascomycota e Basidiomycota (HIBBETT et al., 2007; SHEARER et al., 2007, CORTEZ, 2016).

Os autores, Shearer et al., (2007), afirmam que ocorre maior diversidade fúngica em áreas temperadas, seguida por áreas tropicais, entretanto estudos recentes demonstram uma maior diversidade específica, metabólica e gênica para os ambientes tropicais e sub-tropicais, como consequência de um ambiente de maior variação que o temperado. Essa afirmação é devido ao fato de os trópicos apresentarem condições ambientais, como alta temperatura e umidade, que favorecem o crescimento dos fungos (KRAUSS et al., 2011; JONES & PANG, 2012). Blackwell, (2011) salienta quanto à necessidade de mais investigações nessa área e que está claro que muitos fungos não descritos estão presentes em regiões tropicais.

Estudos contemporâneos vem sendo cada vez mais conduzidos na América do Sul, China e Austrália (SHEARER et al., 2015). Espera-se que muitas espécies ainda sejam descobertas em habitats aquáticos, dados os poucos especialistas taxonômicos que estudam esses fungos, os poucos tipos de substratos estudados e a vasta área geográfica ainda não amostrada (SHEARER et al., 2007). No entanto, de forma geral, pode-se afirmar que, pouco se conhece sobre a diversidade dos fungos presentes em ambientes aquáticos (SHEARER et al., 2007; SHEARER et al., 2009; RAJA et al., 2009).

3.2 POTENCIAL QUÍMICO E METABÓLICO DA DIVERSIDADE FÚNGICA

Os fungos representam uma rica fonte de produtos naturais e propriedades bioativas que podem servir como medicamentos, inseticidas, pesticidas e outros produtos químicos valiosos (HILLMAN et al., 2017). Os produtos naturais de fungos são moléculas atrativas para biotecnologia, especialmente após a descoberta da penicilina por Fleming, em 1928 (GAYNES, 2017) e posteriormente um interesse maior ressurgiu quando a ciclosporina A foi isolada de *Tolypocladium inflatum* em 1976 e aprovada para uso clínico como imunossupressor em 1983. Esta descoberta levou os pesquisadores a uma busca intensiva por produtos bioativos derivados principalmente de fungos de

ambientes aquáticos e aqueles que habitam o interior das plantas, os endofíticos (SCHULZ et al., 2002; BUGNI & IRELAND, 2004; BORGES et al., 2007).

Os fungos aquáticos apresentam um grande potencial para novos produtos naturais e um número crescente de novos metabólitos isolados destes microrganismos tornaram-se conhecidos nos últimos anos, enquanto grande parte do potencial oculto ainda precisa ser descoberto (IMHOFF, 2016) a partir do isolamento e de técnicas moleculares para produção heteróloga de metabólitos de interesse biotecnológico. Desta forma, considera-se que os fungos são uma fonte significativa de diversidade gênica, química e biológica a serem descritas (BUGNI & IRELAND, 2004).

De acordo com Kebede et al., (2017), um levantamento bibliográfico que abrange mais de 23.000 produtos microbianos bioativos, ou seja, agentes antifúngicos, antibacterianos, antivirais, citotóxicos e imunossuppressores, mostra que os organismos produtores são principalmente do reino fúngico. Nos anos de 2005 a 2010 foram identificados mais de 700 produtos naturais obtidos de fungos marinhos (RATEB, 2011). Compostos de microrganismos e organismos marinhos constituíram o maior grupo de drogas anticâncer promissoras entre os compostos avaliados em ensaios clínicos de oncologia a partir de 2004 (BUTLER, 2005). Foram isolados fungos da ordem Pleosporales de ecossistemas de água doce que produziam metabólitos com atividade antibiótica e antiviral (IMHOFF, 2016).

No ambiente aquático, os fungos são desafiados por múltiplos estressores bióticos e abióticos, e para se adaptar e sobreviver a essas condições, como resposta fisiológica, eles produzem um grande número de metabólitos secundários com bioatividades promissoras (MACHELEIDT et al., 2015, TIAN et al., 2017). No entanto, os caminhos que levam a esses produtos são mal compreendidos e frequentemente inativo em condições de laboratório fazendo da descoberta e da produção um desafio bioquímico.

Avanços recentes em abordagens e ferramentas de biologia molecular fornecem novos métodos poderosos para elucidar e aproveitar essa riqueza produzida por fungos em geral (HILLMAN et al., 2017). A correta identificação e classificação dos fungos é fundamental para o estudo de produtos naturais. Sem a devida identificação e preservação dos isolados fúngicos, os estudos dos metabólitos secundários tornam-se difíceis, se não impossíveis, de serem realizados (BUGNI & IRELAND, 2004), entretanto, como informado anteriormente o desenvolvimento da produção heteróloga pode suprir essa demanda.

Embora os fungos tenham sido historicamente identificados e classificados principalmente por características morfológicas, os micologistas agora empregam várias técnicas para ajudar na identificação. Principalmente, devido ao fato que algumas estruturas reprodutivas se apresentam apenas em uma pequena parte do ciclo de vida do fungo, tornando difícil a utilização desse caráter fenotípico (EL-ENSHASY, 2007; KRIMITZAS et al., 2013). Desta forma, para realizar a identificação taxonômica de espécies fúngicas mais precisas, é necessário a combinação das técnicas moleculares com as características morfológicas, fisiológicas e químicas (GEISER et al., 2007; SAMSON, 2011; VISAGIE et al., 2014), no que hoje chamamos de identificação polifásica.

3.3 FUNGOS ASSOCIADOS AOS MOSQUITOS

Os fungos são responsáveis por cerca de 80% das doenças naturais em insetos (ALVES, 1998), e são de grande interesse no controle de pragas e insetos de importância em saúde pública (LUZ et al., 2007). Mais de 700 espécies foram descritas como patogênicas para insetos e outros artrópodes, e estima-se que este número seja apenas 5% do total de fungos entomopatogênicos existentes (HAWKSWORTH, 1991; DESTÉFANO et al., 2004).

O aumento global de doenças transmitidas por vetores, novas e reemergentes, colocou em perspectiva mais uma vez a necessidade de métodos eficazes de controle de mosquitos vetores. Embora intervenções baseadas em inseticidas para manejar populações de mosquitos continuem sendo componentes importantes de programas de controle de vetorial, o uso de agentes de controle biológico, como fungos, oferece métodos alternativos (SCHOLTE et al., 2004; FARENHORST et al., 2008).

Muitas espécies de mosquitos são transmissoras de agentes etiológicos de diferentes doenças, causando sérios problemas de saúde pública em todo o mundo (FORATTINI, 2002; WHO, 2017). As doenças transmitidas por mosquitos estão entre as principais enfermidades que afetam os humanos. Essas doenças em conjunto representam cerca de 17% das enfermidades que acometem o homem e estima-se que mais de 80% da população mundial vive em áreas com risco de pelo menos uma dessas doenças e 50% sob o risco de infecção por duas ou mais, concomitantemente (WHO, 2017).

No Brasil, o controle químico com inseticidas de origem orgânica ou inorgânica é o mais adotado desde do início das primeiras campanhas de combate a

mosquitos vetores no país (CARVALHO & SILVA 1999; PINHEIRO & TADEI 2002; LIMA et al., 2003; SILVA et al., 2014). No entanto, o uso intensivo desses produtos químicos ao longo dos anos confirmou o seu impacto negativo, pelos seus efeitos tóxicos e persistentes sobre o meio ambiente, efeitos adversos à saúde humana e principalmente pelo surgimento de populações de insetos resistentes a estes produtos (DABIRÉ et al., 2008; ALOU et al., 2010; SMITH et al., 2016).

Desta forma, há necessidade urgente do desenvolvimento de novos produtos que levem a um mínimo de impacto para o ambiente, servindo de estímulo a busca por estratégias alternativas no controle mais eficaz desses vetores (VAN RIE et al., 1990; ZAIM & GUILLET, 2002; CIRIMOTICH et al., 2011). O fato de os mosquitos terem seus próprios agentes patogênicos naturais, foi o ponto de partida para uma extensa pesquisa sobre agentes de controle biológico de vetores da malária (ABDUL-GHANI et al., 2012).

Os fungos estão entre os principais microrganismos utilizados como ferramenta para controle biológico de vetores importantes em saúde pública (GUIMARÃES et al., 2006). Isolados fúngicos específicos para a praga-alvo é de grande importância em um programa de controle biológico, principalmente para os fungos entomopatogênicos, pois além da virulência, os aspectos produtividade, produção de metabólitos secundários nocivos à saúde humana e ao ambiente e a resistência aos fatores climáticos são relevantes para a produção de bioinseticidas eficientes e seguros (ALVES, 1998; WARD et al., 1998; ZIMMERMANN et al., 2007).

Segundo Singh & Prakash (2014), esporos, metabólitos, proteínas, toxinas, enzimas e nanopartículas de fungos têm sido utilizados com êxito no controle de mosquitos. Vários estudos mostram a utilização de fungos no controle vetorial, em seus diferentes estágios de vida e na redução das taxas de transmissão de doenças a humanos (RASGON, 2011; SINGH & PRAKASH, 2014).

Diferentes espécies fúngicas têm a capacidade de matar os mosquitos antes deles serem capazes de transmitir agentes patogênicos ao homem (HANCOCK et al., 2009; BLANFORD et al., 2011). Afetando e alterando diretamente a sua fecundidade (BLANFORD et al., 2011; GARZA-HERNANDEZ et al., 2013; SHARMA et al., 2013; GENDRIN et al., 2015), desempenho de vôo (BLANFORD et al., 2011), produção de ovos e escolha do local de oviposição (COON et al., 2016; ANGLERÓ-RODRÍGUEZ, et al., 2017; GUEGAN et al., 2018; SHELOMI et al., 2019; TAWIDIAN et al., 2019). Causando, redução do desejo alimentar (BLANFORD et al., 2005; SCHOLTE et al.,

2006; MAEHARA et al., 2007; BLANFORD et al., 2011; GEORGE et al., 2011), retardo do desenvolvimento e mortalidade de larvas e adultos (SEYE et al., 2009; RAJ et al., 2017).

Os fungos também podem ser transmitidos diretamente para os mosquitos no contato com a água do criadouro e principalmente durante a alimentação larval (COON et al. , 2016; TAWIDIANA et al., 2019). Além de ocorrer a transmissão vertical da mãe para a prole (FAVIA et al., 2007), por via sexual (FAVIA et al., 2007; DAMIANI et al., 2008; TAWIDIANA et al., 2019), transstadialmente (COON et al., 2014; CHAVSHIN et al., 2015; STEYN et al. 2016), dos néctares das plantas que os adultos se alimentam e dos locais onde descansam (ANGLERÓ-RODRÍGUEZ et al., 2017; BELDA et al., 2017).

Ressaltando que habitats aquáticos dos mosquitos estão repletos de microrganismos, que podem estabelecer relações parasitárias com mosquitos. Foram isolados fungos de ambientes aquáticos pertencentes ao filo Blastocladiomycota, que parasitam espécies de mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* podem causar infertilidade nas fêmeas adultas (COUCH & BLAND, 1985; EVANS et al., 2018).

Estes vetores encontram-se associados a uma grande variedade de microrganismos. A interação de fungos com as formas imaturas destes vetores, em seu habitat aquático é um fator relevante para estabelecer as estratégias de controle da transmissão de doenças. Além disso, muitas vezes, neste processo ocorrem relações simbióticas que contribuem para a harmonia ecológica do local e trazem, na maioria das vezes, benefícios para os insetos hospedeiros, como suplementação de nutrientes, aperfeiçoamento dos mecanismos digestivos, tolerância de perturbações ambientais e proteção contra vírus e parasitas (ENGEL & MORAN, 2013), além de poderem influenciar na forma e no modo de reprodução destes.

3.4 MOSQUITOS E IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

Os mosquitos são insetos de pequeno porte, conhecidos popularmente como muriçocas, pernilongos e carapanãs. Pertencentes à ordem Díptera, família Culicidae, da qual são conhecidas mais de 3.500 espécies, classificadas em 95 gêneros e distribuídas em todo planeta (ANTUÁRIA, 2012; HARBACH et al., 2017; WRBU, 2017). No Brasil, estima-se a ocorrência de cerca de 500 espécies divididas em 23 gêneros (WRBU, 2017) registradas, sobretudo, em biomas de floresta tropical úmida como a Mata Atlântica e a Floresta Amazônica.

Os mosquitos pertencentes aos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* tem alta relevância epidemiológica, pois são vetores de doenças como a dengue, zika, chikungunya, febre amarela, malária e filariose, todas com registro de casos no Brasil (EBI & NEALON, 2016; LIMA-CAMARA, 2016). Considerando as principais doenças que acometem a população brasileira, duas espécies ganham notoriedade científica, *Aedes aegypti* e *Anopheles darlingi*.

3.4.1. *Aedes aegypti* como Transmissor de Patógenos

O *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762), pertencente à ordem Díptera, família Culicidae, é o principal transmissor de vários arbovírus ao homem (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; WHO, 2017). Esta espécie de mosquito é amplamente distribuída no globo terrestre (**Figura 01**), presente nas regiões tropical e subtropical, possui hábito diurno, é um dos mosquitos mais associados à espécie humana por ser considerado altamente antropófilo (LOPES et al., 1993; FORATTINI, 2002).

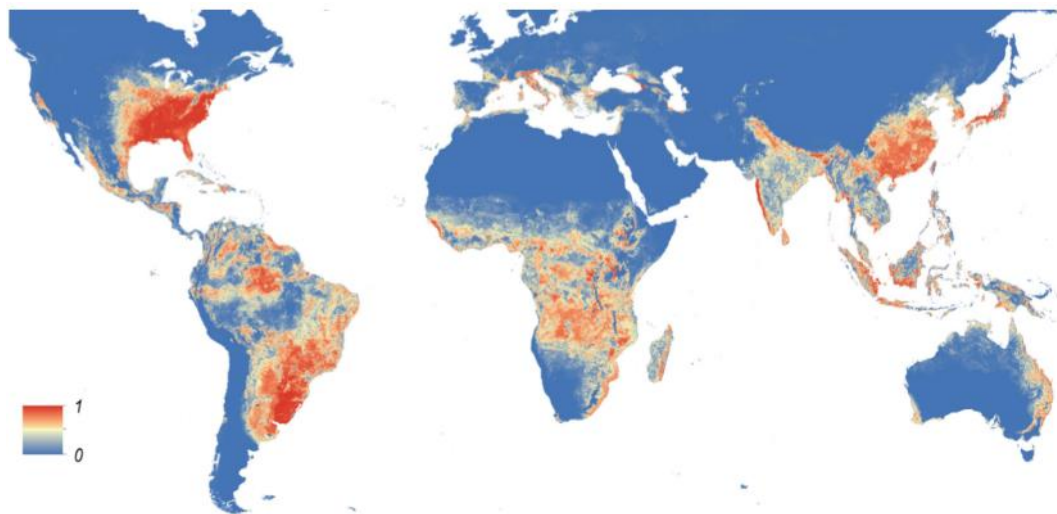


Figura 01: Mapa global da distribuição prevista de *Ae. aegypti*.

Legenda: O mapa mostra a probabilidade de ocorrência (de 0 azul para 1 vermelho).

Fonte: Kraemer et al., (2015).

As fêmeas desse vetor realizam o repasto sanguíneo preferencialmente no homem, é nesse momento que pode ocorrer a transmissão de agentes patogênicos à espécie humana. Após o repasto, as fêmeas dessa espécie realizam posturas de seus ovos, nos mais variados tipos de recipientes com água, mantidos pelo homem. Tem se mostrado

capaz de usar diferentes tipos de micro-habitat, o que facilita a sua dispersão (FORATTINI, 2002; SOARES-DA-SILVA et al., 2012; FERREIRA-KEPPLER et al., 2017; MONTAGNER et al., 2017).

Assim como os demais mosquitos, o *Ae. aegypti* possui desenvolvimento holometábolo, compreendendo os estágios de ovo, quatro instar larval, pupa e adultos, em condições naturais, seu ciclo de vida pode durar em torno de 10 dias (**Figura 02**) (FORATTINI, 2002). Os ovos é o estágio mais importante para a disseminação da espécie, pois mesmo necessitando de água para a eclosão, parte dos ovos de *A. aegypti* permanece viável por mais de 450 dias em ambiente ressecado (LUZ et al., 2008). Esse fato contribui com o sucesso adaptativo do vetor, pois além de permitir superação de condições climáticas adversas ainda auxilia na dispersão passiva desses ovos para outras regiões (DA SILVA, 1999).

As formas imaturas se desenvolvem em água doce, parada e com pouca matéria orgânica. Os adultos apresentam hábitos diurnos e atividades como acasalamento e alimentação ocorrem durante o dia. Machos e fêmeas alimentam-se de seiva, entretanto, a fêmea necessita de repastos sanguíneos para a maturação de ovos, sendo apenas as fêmeas hematófagas (FORATTINI, 2002). Os adultos, 24 horas após emergirem, estão aptos para o acasalamento, uma única cópula é suficiente para fecundar todos os ovos que a fêmea venha a produzir durante a vida. Cada fêmea representa de dois a três ciclos gonotróficos durante a vida e pode pôr de 100 a 200 ovos por vez (DEGALLIER et al., 2000; MARCONDES, 2011).

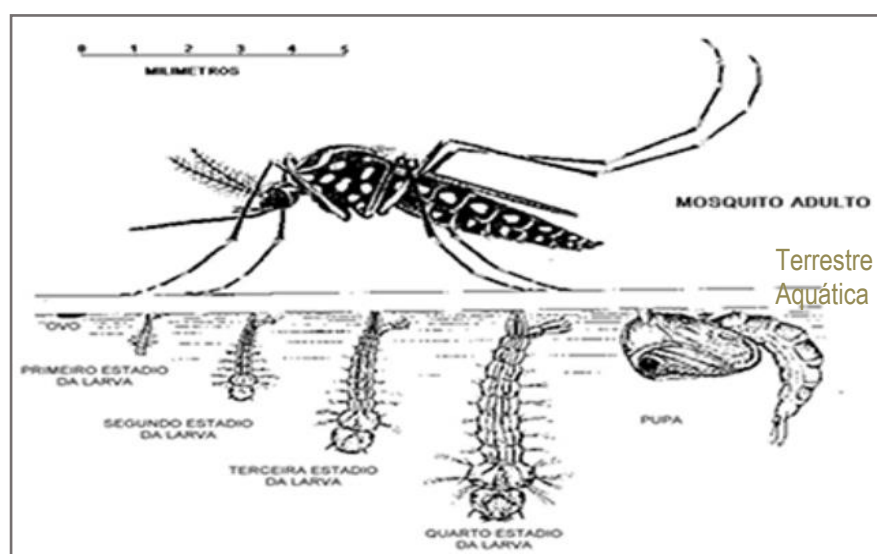


Figura 02: Ciclo biológico do *Aedes aegypti*.

Fonte: adaptado de Reles, (2009).

A presença desse vetor em áreas urbanas tem preocupado os órgãos de saúde pública, pois, comprovadamente, o *Ae. aegypti* é o principal transmissor de diferentes agentes patogênicos ao homem, como vírus Dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela Urbana (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; FORATINNI, 2002; BÖHM, et al., 2016; BRITO & CORDEIRO 2016; LIMA-CAMARA, 2016). Mudanças climáticas rápidas e efeitos antrópicos, como desmatamento e migração de populações, falta de condições sanitárias adequadas ou expansão de áreas urbanas sem controle e planejamento adequados, podem resultar no aumento da transmissão de arbovírus (ARGONDIZZO et al., 2020).

A transmissão desses patógenos ao homem se dá a partir da picada do mosquito fêmea infectadas com vírus, que, por sua vez, são contaminadas por meio de repasto sanguíneo em indivíduos infectados. Após a infecção, o homem serve como fonte de contaminação durante todo o período de viremia (FORATINNI, 2002; LIMA-CAMARA, 2016).

O vírus da dengue causa sintomas semelhantes aos da gripe e, em casos graves, hemorragia e potencialmente morte (CATTARINO et al., 2020). A incidência global da dengue cresceu dramaticamente e cerca da metade da população mundial está em risco (**Figura 03**). A Organização Mundial de Saúde estima que ocorra entre 100 a 400 milhões de infecções a cada ano, sendo esta doença endêmica em mais de 100 países nas regiões da África, Américas, Mediterrâneo Oriental, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental (WHO, 2021a). Essa doença aumentou 30 vezes nos últimos 50 anos, se ampliando para novos países. É uma doença emergente e reemergente em vários países e vem preocupando as autoridades em saúde, em quase todo o mundo, devido os casos graves e letais que já ocorreram (SUSAM, 2017).

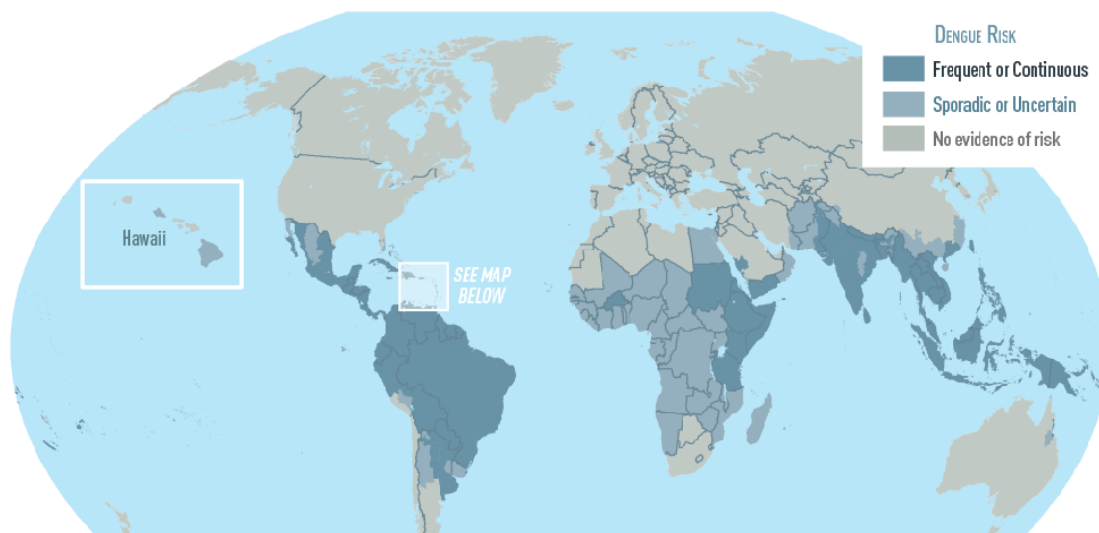


Figura 03: Risco global previsto de dengue.

Fonte: CDC, (2020a).

Desde fevereiro de 2020, o Brasil enfrenta uma pandemia do Covid-19 e, desde a confirmação dos primeiros casos, observou-se uma diminuição dos registros de casos prováveis de dengue. Esta diminuição pode ser consequência de uma subnotificação ou atraso nas notificações das arboviroses associadas a mobilização das equipes de vigilância e assistência para o enfrentamento da pandemia e ao receio da população em procurar atendimento em uma unidade de saúde (BRASIL, 2021).

No ano de 2020 o Brasil registrou 987.173 casos prováveis de dengue, com uma incidência de 469.8 casos por 100 mil habitantes. O estado do Amazonas apresentou 3.571 casos dos 22.026 registrados na região Norte (BRASIL, 2021a).

As doenças zika e chikungunya também têm preocupado os órgãos de saúde pública de todo o mundo, principalmente devido à associação do vírus Zika com complicações neurológicas em seres humanos, como a microcefalia, e também devido à síndrome de Guillain-Barré (ARAÚJO & HUGHES, 2016; DUARTE et al., 2017). No Brasil, essas arboviroses encontram-se disseminadas por todo território nacional, no qual são registrados elevados índices de casos dessas doenças.

No Brasil em 2020 foram notificados 82.419 e 7.387 casos prováveis, para chikungunya e zika, respectivamente. No estado do Amazonas foram registrados 64 casos de zika e 35 casos de chikungunya (BRASIL, 2021a).

A febre amarela, por outro lado, embora seja possível à vacinação da população humana contra essa doença, tem se tornado assunto preocupante na saúde pública, pois surtos dessa doença acontecem no Brasil. Nas últimas décadas, a febre

amarela tem sido registrada além dos limites da área considerada endêmica (região amazônica). O monitoramento da febre amarela no Brasil, realizado no período de julho 2017 a junho de 2018, demonstrou que foram investigados mais de 1.642 casos de febre amarela em humanos e foram confirmados 1.218 casos e 364 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Durante o monitoramento entre julho de 2020 e janeiro de 2021, foram notificados 574 casos humanos suspeitos, dos quais foram confirmados 37 casos (BRASIL, 2021b).

3.4.2. *Anopheles darlingi* como Transmissor da Malária

A malária se destaca por existir desde a antiguidade e apesar dos constantes esforços para o seu controle, ela permanece como um dos mais graves problemas de saúde pública do mundo. Seu controle é cada vez mais difícil devido à propagação da resistência do parasita aos medicamentos antimaláricos e a resistência do vetor aos inseticidas atuais (TADEI et al., 1988; HEMINGWAY & RANSON, 2000; TRAPE et al., 2011; WANG & JACOBS-LORENA, 2013).

Estima-se que 3.2 bilhões de pessoas - quase metade da população mundial em mais de 91 países correm o risco de contrair malária, afetando principalmente populações pobres em regiões tropicais e subtropicais (**Figura 04**) (CDC, 2020b). De acordo com as últimas estimativas, ocorreram 229 milhões de casos de malária no mundo no ano de 2019, causando cerca de 409 mil óbitos, sendo que, no continente Africano as crianças menores de 5 anos são o grupo mais vulnerável, elas representaram 67% (274.000) de todas as mortes por malária em todo o mundo (WHO, 2021b).

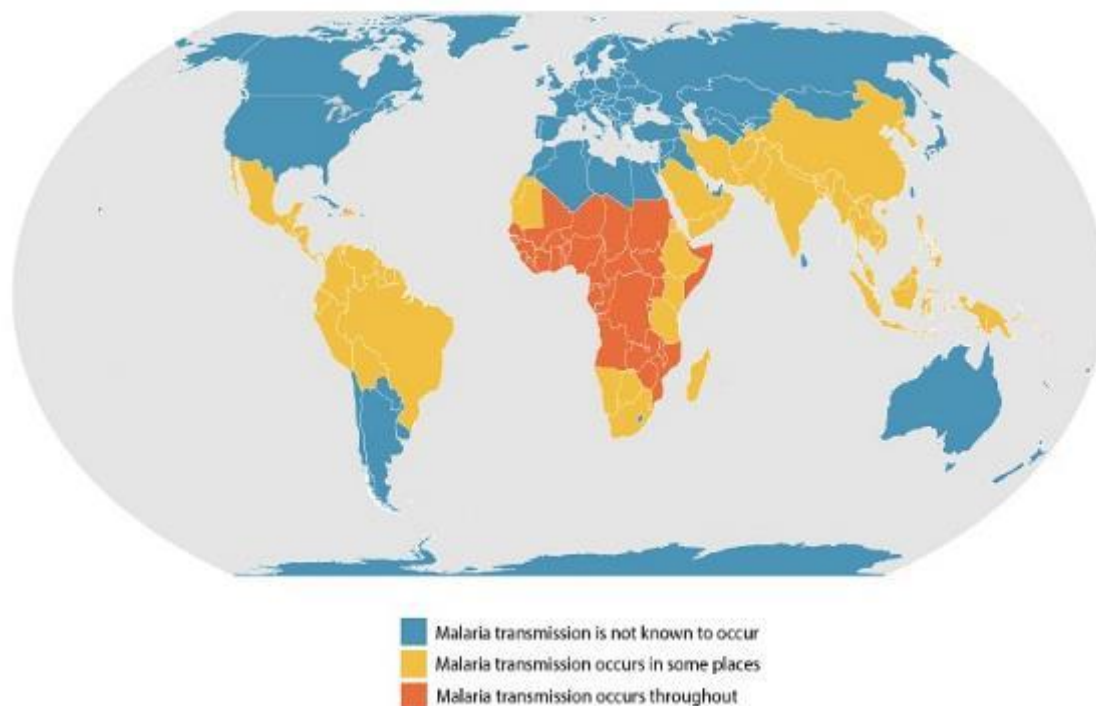


Figura 04: Distribuição global da transmissão da malária.

Fonte: CDC, (2020c).

A malária é uma doença parasitária, de regiões tropicais, que mais causa problemas socioeconômicos, sobretudo nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos (PARISE, 2009). Em virtude dos dias em que deixam de trabalhar, os doentes reduzem os esforços para desenvolver seus recursos econômicos, capacidade produtiva e melhorarem suas condições de vida (BRASIL, 2005), contribuindo desta forma para elevada perda econômica.

A malária humana tem como agente etiológico, protozoários do gênero *Plasmodium*, no qual são conhecidas cerca de 150 espécies causadoras de malária, em diferentes hospedeiros vertebrados. Entretanto, apenas cinco são atualmente descritas como capazes de infectar o ser humano: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie*, *P. ovale* – este ocorre apenas em regiões restritas ao oeste do continente africano (TUTEJA, 2007) e o *P. knowlesi*, um parasita simiano, descrito como a quinta espécie capaz de infectar naturalmente o homem (COX-SINGH & SINGH, 2008; WHITE, 2008).

No mundo, as duas espécies de maior prevalência são *P. falciparum* e *P. vivax*. O *P. falciparum* é o mais predominante no mundo, esta espécie é responsável pelos casos graves da doença, especialmente em crianças menores de 5 anos, e pelas estatísticas

alarmantes, como a morte de uma criança a cada 30 segundos (WHO, 2010). Enquanto no Brasil, o *P. vivax* é responsável por cerca de 90 % dos casos registrados de malária (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

A transmissão da malária dá-se pela picada da fêmea do inseto do gênero *Anopheles*, que agrupa cerca de 400 espécies, das quais 60 são descritas como transmissoras naturais da malária (TUTEJA, 2007). Os principais vetores no continente americano são: *An. freeborni*, *An. pseudopunctipennis*, *An. quadrimaculatus*, *An. albimanus*, *An. albitarsis*, *An. aquasalis*, *An. darlingi*, *An. marajoara* e *An. nuneztovari* (Figura 3) (SINKA et al., 2012). No entanto, o Brasil tem como principal o *An. darlingi* (**Figura 05**), pertencente ao subgênero *Nyssorhynchus* (HIWAT & BRETAS, 2011).

O *Anopheles darlingi* Root, 1926, tem ampla distribuição geográfica na América do Sul e Central, que se estende do sul do México ao norte da Argentina e do leste da cadeia dos Andes para a costa do Oceano Atlântico (KOMP, 1941; FORATTINI, 1987; MARINOTTI et al., 2013). O *An. darlingi* atua como vetor da malária em quase todos os países da América do Sul, sendo o principal vetor na Amazônia (HIWAT & BRETAS, 2011; ARAÚJO et al., 2012).

As fêmeas são consideradas eficientes na transmissão da malária, são antropofílicas, ou seja, alimentam-se de sangue humano, endofílicas e endofágicas, assim consideradas pelos seus hábitos domiciliares (KNELL, 1992).

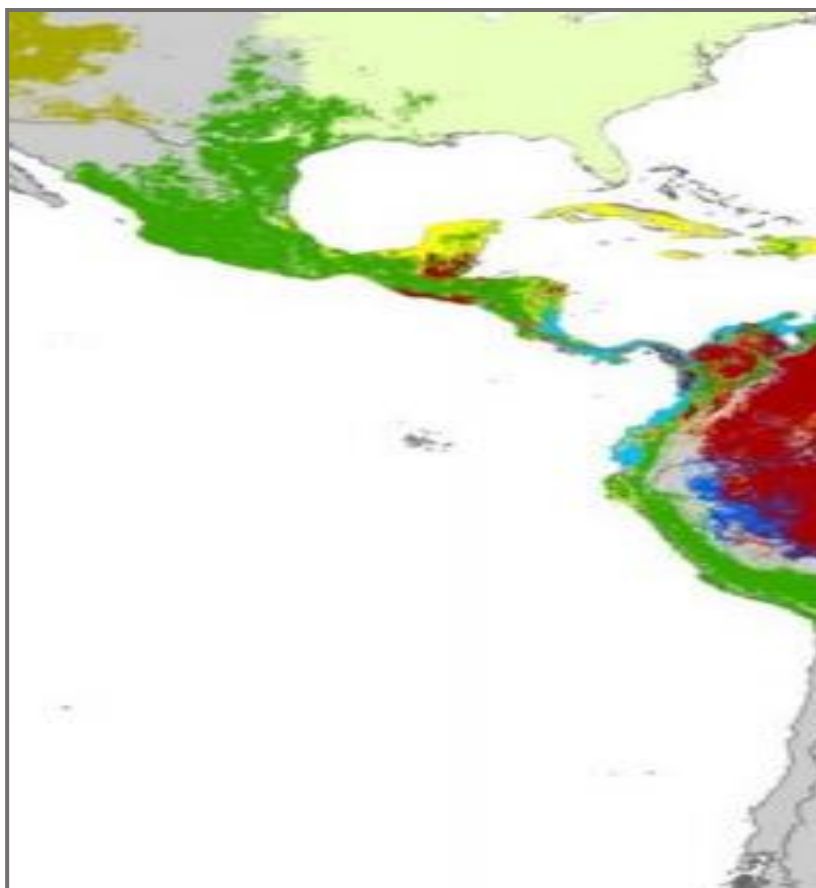


Figura 05: Distribuição das principais espécies de anofelinos vetores de malária no continente americano.

Fonte: Sinka, et al., (2012).

Intrusão humana em ecossistemas naturais e as mudanças ambientais modificam nichos estabelecidos e criam condições para novas configurações ecológicas, essas mudanças oferecem oportunidades para o estabelecimento de populações de vetores do mosquito e transmissão das respectivas doenças transmitidas por vetores, entre elas a malária (GUIMARÃES et al., 2004). Vittor et al., (2003), descobriram que a taxa de picada do *An. darlingi* está positivamente relacionada com a quantidade de terras desmatadas e, ainda descobriu que *An. darlingi* encontrados nessas áreas de desmatamento possuíam a taxa de picada 278 vezes maior do que a determinada para as áreas predominantemente florestais.

A Região Amazônica apresenta características socioeconômicas e ambientais extremamente favoráveis à transmissão da malária, as povoações humanas desordenadas (invasões) com conseqüentes condições precárias de vida, assim como a falta de saneamento básico, a exploração de recursos naturais, colocam o homem em contato

direto com a mata. Esse intenso contato homem-vetor provoca a disseminação da malária (DE FREITAS RODRIGUES et al., 2008). Além das condições climáticas, principalmente no verão, proporcionam o desenvolvimento dos parasitas nos vetores, tendo como um dos principais facilitadores as águas das chuvas, dos rios, igarapés entre outras, favorecendo dessa forma a instalação de focos epidêmicos na região. A associação desses fatores determina diferentes patamares de transmissão que originam níveis diferenciados na prevalência da endemia (MACHADO et al., 2003).

O Brasil é um dos países que concentra o maior número de casos de malária no continente americano. Sendo sua distribuição heterogênea, uma vez que 99 % dos casos registrados estão concentrados na Amazônia Legal (**Figura 06**), que engloba nove estados: Amazonas, Amapá, Acre, Pará, Rondônia, Roraima, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão (BRASIL, 2021c).

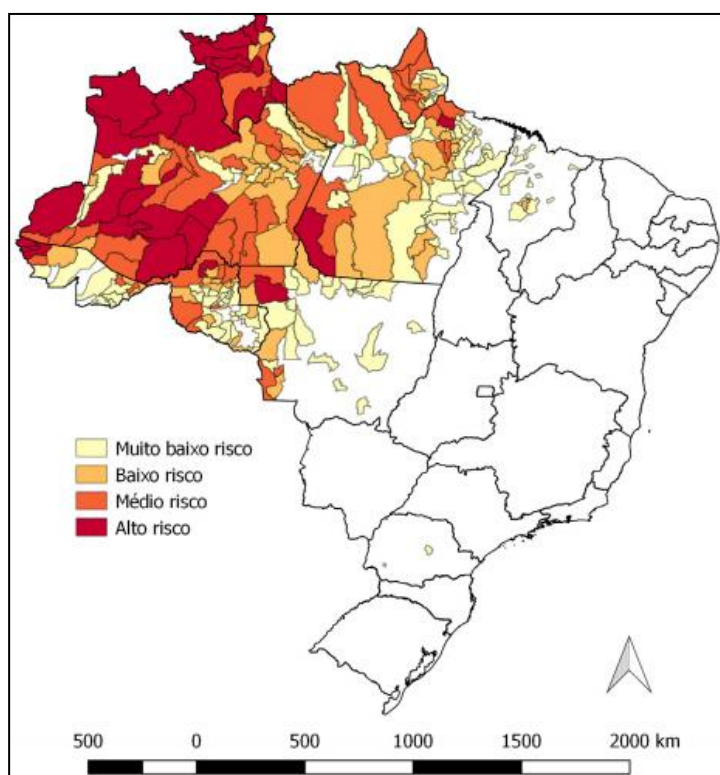


Figura 06: Risco de transmissão da Malária no Brasil, 2020.

Fonte: BRASIL, (2021c).

Em 2020 foram registrados 140.974 mil casos de malária no Brasil (BRASIL, 2021c). Amazonas é o estado que concentra a maior parcela dos casos de malária do Brasil, sendo considerada uma área altamente endêmica (SUÀREZ-MURTIS et al.,

2007). Até junho de 2020 o Amazonas havia registrado 26.501 casos de malária, em 2019 o estado foi responsável 65.382 dos 153.270 notificados do país (Brasil, 2021 malária).

A distribuição espacial e temporal dos mosquitos *Anopheles* é dependente da disponibilidade de habitats aquáticos adequados onde os estágios imaturos podem se desenvolver, rios constituem um importante habitat para diversas espécies de larvas de *Anopheles* de importância médica (ANTONIO-NKONDJIO et al., 2009). As margens da floresta são os principais locais de reprodução do *An. darlingi* na Amazônia (SINGER & CASTRO, 2001).

Gil et al., (2007), em estudo, fizeram distinção entre a malária de áreas ribeirinhas e malária de terra seca, explicando que as diferenças na natureza e o tempo de estabelecimento de criadouros favoráveis para *An. darlingi*, podem resultar em diferentes modelos ecológicos para a transmissão da malária. Para controlar os mosquitos, sejam adultos ou larvas, é crucial compreender a ecologia relevante das espécies alvo (GRIFFIN et al., 2010). O conhecimento das características ecológicas dos habitats de reprodução e os fatores ambientais que afetam a abundância de mosquitos podem ajudar na concepção de melhores estratégias de controle do vetor (DEANE et al., 2002; MOUTINHO et al., 2011).

Os anofelinos são insetos holometábolos, isto é, tem metamorfose completa passando por quatro estágios no seu ciclo evolutivo. Apresentando duas fases no seu ciclo de vida: aquática, que inclui três estágios de desenvolvimento: ovo, larva (quatro estádios larvais) e pupa e terrestre, que corresponde ao mosquito adulto (**Figura 07**) (FORATTINI, 2002).

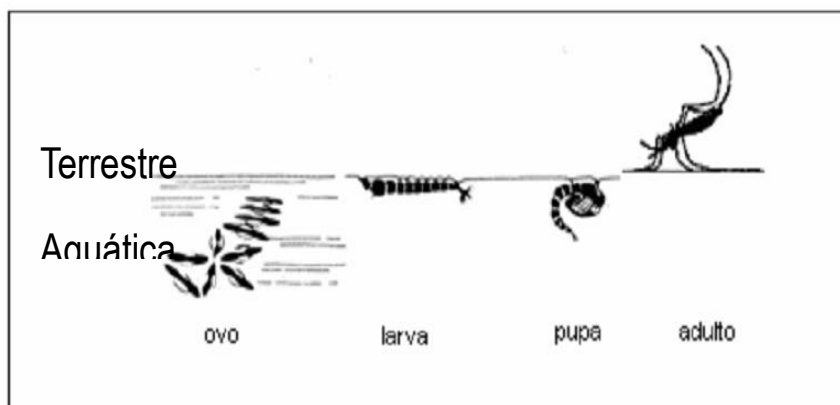


Figura 07: Ciclo de vida do *Anopheles*.

Fonte: adaptado de Rey, (2001).

As fêmeas adultas de *Anopheles* acasalam apenas uma única vez e esta única inseminação permite-lhes colocarem ovos durante todo o seu tempo de vida. Estas necessitam de alimentação sanguínea, pois as proteínas presentes no sangue auxiliam na maturação dos ovários e desenvolvimento dos ovos (FORATTINI, 2002).

Os ovos dos anofelinos são postos diretamente na superfície da água, possuem um aspecto alongado, simetria bilateral apresentando flutuadores laterais, o que permite sua flutuação (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). A larva tem uma cabeça bem desenvolvida, apresentando escovas bucais que são usadas para se alimentar através da filtração, podendo filtrar até dois litros de água por dia (FORATTINI, 1962). Elas se alimentam de microrganismos presente em seus habitats, constituído de algas, bactérias, protozoários, esporos de fungos, ou quaisquer partículas de matéria orgânica (CLEMENTS, 1963; FORATTINI, 1996).

Todas as larvas de mosquitos passam por quatro íntares de desenvolvimento, sendo o último destes o mais longo até se transformarem, por metamorfose em pupa (CLEMENTS, 1963; CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Seus habitats são variados e as espécies neotropicais usam água de lagos e margens de corpos d'água. Os micro-habitats são formados por vegetação flutuante ou emergente, como algas, e entre detritos flutuantes (FORATTINI, 1973; FLEMING, 1992; MANGUINS et al., 1996; FORATTINI, 2002). Das pupas emergem os adultos e é nesta fase que ocorre o maior processo de metamorfose, deixando o meio aquático para o meio terrestre (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

3.4.2.1 Ciclo de Vida do Parasita da Malária

Os plasmódios possuem ciclo biológico complexo, existindo duas formas de reprodução que definem dois ciclos distintos em sua evolução, a sexuada ou ciclo esporogônico (que ocorre no vetor) e a reprodução assexuada ou ciclo esquizogônico (que acontece no homem). O ciclo esquizogônico acontece em duas fases, no fígado (esquizogonia tecidual ou esquizogonia exo-eritrocítica) e nas hemácias (esquizogonia sanguínea ou esquizogonia eritrocítica) (REY, 2001; TRAMPUZ et al., 2003). O ciclo de vida do *Plasmodium* começa quando parasitas conhecidos como esporozoítos produzidos no inseto vetor entram no sangue do hospedeiro (**Figura 08**).

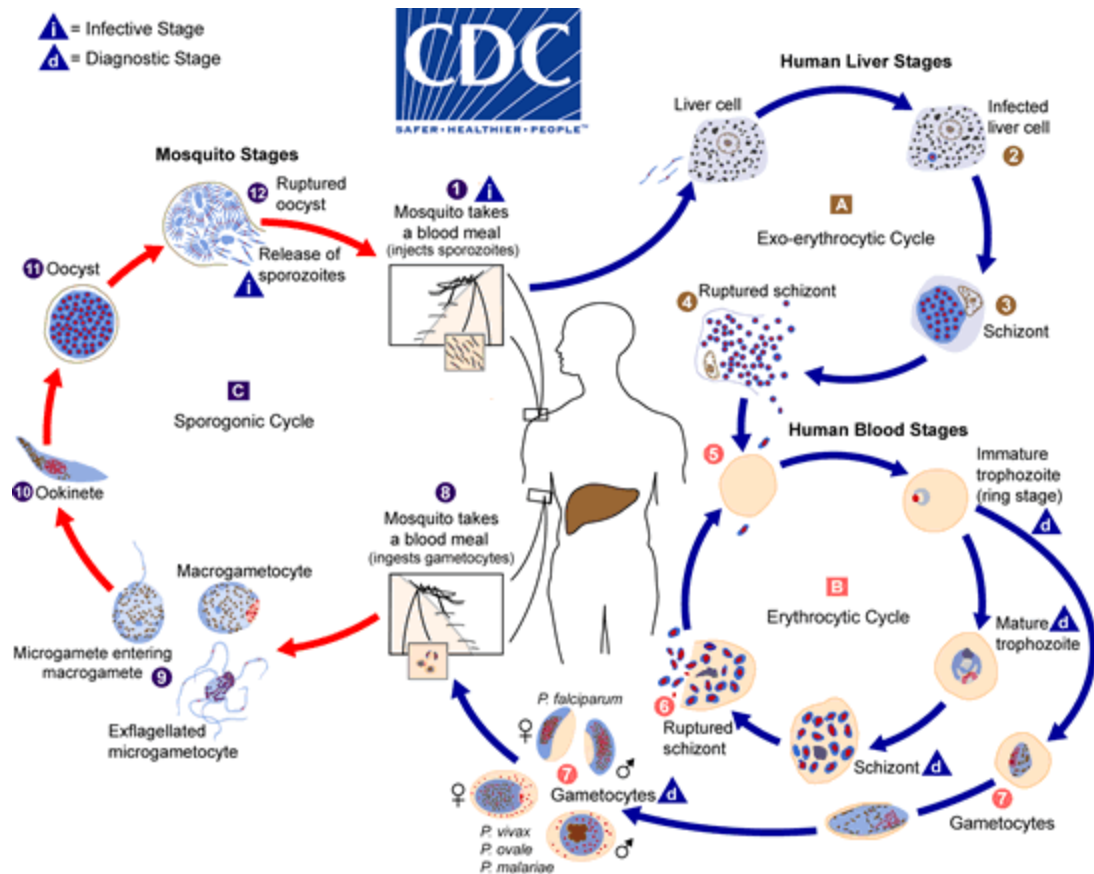


Figura 08: Ciclo de vida dos parasitas da malária.

Fonte: CDC, (2020d).

Os esporozoítos são transmitidos ao hospedeiro humano através da picada do mosquito infectado e depois viajam para o fígado e invadem os hepatócitos, amadurecem em esquizontes, que se rompem e liberam merozoítos (GAZZINELLI et al., 2014). Os merozoítos infectam os eritrócitos durante este ciclo repetido, alguns merozoítos diferenciam-se em formas sexuais masculinas e femininas conhecidas como gametócitos eritrocíticos com um núcleo e então aguardam a chegada de do mosquito (WIPASA et al., 2002). Após a ingestão pelo mosquito, os gametócitos se diferenciam em gametas e, após a fertilização, o zigoto resultante (que se desenvolve em uma forma móvel conhecida como oocineto) forma um oocisto (SMITH et al., 2014). Quando o oocisto se rompe, os esporozoítos são liberados, migram para as glândulas salivares e podem ser transmitidos aos humanos (JOSLING & LLINÁS, 2015).

4. APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS

O desenvolvimento da presente tese está apresentado em cinco capítulos, onde são mencionados os materiais, as metodologias, os resultados e discussão, de acordo com a apresentação abaixo e as revistas as quais estão sendo enviadas:

4.1. Capítulo I: “Fungi associated with *Anopheles darlingi* Root, 1926, larval breeding sites in the Brazilian Amazon”. Esse capítulo está formatado na forma de artigo e submetido à revista *Microbial Ecology* (ISSN 1432-184X).

4.2. Capítulo II: “Diversidade de fungos cultiváveis em habitats aquáticos de criadouros de *Anopheles darlingi* na Amazônia”. Esse capítulo está formatado na forma de artigo a ser traduzido e submetido à revista *Fungal Diversity* (ISSN 1560-2745).

4.3. Capítulo III: “Extracts of Amazonian fungi with larvicidal activities against *Aedes aegypti*”. Esse capítulo está formatado na forma de artigo e submetido à revista *Frontiers in Microbiology* (ISSN 1664-302X).

4.4. Capítulo IV: “Estudos bio guiados dos metabólitos fúngicos de habitats aquáticos da Amazônia frente a cepa de *Plasmodium falciparum* – K1”. Esse capítulo está formatado na forma de artigo a ser traduzido e submetido à revista *European Journal of Medicinal Chemistry* (ISSN 0223-5234).

4.5. Capítulo V: “Antimicrobial and cytotoxic activity of fungal mycelial extracts from aquatic environments in the Amazon”. Esse capítulo está formatado na forma de artigo e submetido à revista *Research, Society and Development* (ISSN 2525-3409) em 27 de julho de 2021 e aceito em 05 de agosto de 2021 e publicado em 10 de agosto de 2021.

5. CAPÍTULO I

Fungi associated with *Anopheles darlingi* Root, 1926, larval breeding sites in the Brazilian Amazon²

Marta Rodrigues de Oliveira, Thiago Fernandes Souza, Adriano Nobre Arcos, Sarah Raquel Silveira da Silva, Jeferson Chagas da Cruz, Gilvan Ferreira da Silva, Osvaldo Marinotti, Olle Terenius, Wanderli Pedro Tadei, Afonso Duarte Leão de Souza, Antonia Queiroz Lima de Souza.

Este capítulo apresenta o estudo da diversidade e a riqueza de fungos nos criadouros das larvas de *Anopheles darlingi* Root, 1926, em duas cidades endêmicas para malária no estado do Amazonas. Os resultados obtidos destacam a presença de comunidades fúngicas ricas e diversificadas em habitats aquáticos mais naturais, com ambientes mais preservados e menor diversidade em ambientes com influência antrópica. Muitos fungos dos gêneros encontrados neste trabalho foram relatados como potenciais contra larvas do mosquito *Anopheles*. Portanto, os dados gerados neste estudo podem servir de base para futuros trabalhos sobre o uso de fungos nativos da Amazônia no controle da malária. Outro destaque deste trabalho está relacionado à influência humana na diversidade de fungos presentes nos ambientes estudados.

¹ Artigo submetido à revista *Microbial Ecology* (ISSN 1432-184X).

Fungi associated with *Anopheles darlingi* Root, 1926, larval breeding sites in the Brazilian Amazon²

Marta Rodrigues de Oliveira¹; Thiago Fernandes Souza²; Adriano Nobre Arcos^{3,4}; Sarah Raquel Silveira da Silva¹; Jeferson Chagas da Cruz²; Gilvan Ferreira da Silva²; Osvaldo Marinotti⁵; Olle Terenius⁶; Wanderli Pedro Tadei^{1,4,†}; Afonso Duarte Leão de Souza^{1,7,8}; Antonia Queiroz Lima de Souza^{1,7,9}.

1. Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (PPG-BIONORTE), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM 69065-001, Brazil.

2. Embrapa Amazônia Ocidental, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Manaus, AM, 69010-970, Brazil.

3. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul / UFMS, Campo Grande, MS 79070-900, Brazil.

4. Laboratório de Malária e Dengue, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM 69011-970, Brazil.

5. MTEKPrime, Aliso Viejo California, USA.

6. Department of Cell and Molecular Biology, Microbiology, Uppsala University, Sweden.

7. Central Analítica - Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69077-000, Brazil.

8. Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 69077-000, Brazil.

9. Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 69077-000, Brazil.

†. in memoriam

Corresponding author: antoniaqueiroz@ufam.edu.br

Abstract

Fungi present in mosquito breeding waters are scarcely investigated. This work explored the diversity of cultivable fungi present in the breeding sites of the South American malaria vector mosquito *An. darlingi*. Water samples were collected from four sites located in the cities of Coari and São Gabriel da Cachoeira and four different culture media were used for the isolation of fungi. Two-hundred-and-six fungal strains were isolated and morphologically similar fungi were grouped into 30 morphotypes. Their taxonomic identities were assigned by macro- and microscopic observations and sequencing of rDNA internal transcribed spacers (ITS1-5.8S-ITS2). Twenty-six morphotypes were identified at the genus level, one only at the family level, and three were not identified. The identified morphotypes belong to the phyla, Ascomycota (80.6%), Basidiomycota (11.7%), and Mucoromycota (2.4%), distributed in five classes, ten orders, 25 families, and 26 genera. This study fills a considerable gap of knowledge about fungi present in the breeding sites of *An. darlingi* mosquitoes.

Keywords: Malaria vector, Freshwater, Mosquitoes, Fungal microbiota, Amazon.

Introduction

The Amazon basin has the largest volume of fresh water on the planet [1]. In that tropical environment biodiversity abounds, and much remains to be explored about species diversity and the ecological relationships among them. The mosquito *Anopheles darlingi* Root, 1926, is the major malaria vector in the Amazon Region [2–4]. Despite the importance of malaria in the Amazon and tropics, few efforts have been made to study and identify fungi associated with these vector mosquitoes [5], especially if compared with studies of bacteria associated with them [6–10].

While the complex mosquito-associated microbiota is composed of bacteria, fungi, protists, viruses, and nematodes, fungi have been largely neglected [11]. Fungi are an important part of mosquito larval diet, providing long-chain polyunsaturated fatty acids and phytosterols needed for their development [12]. Furthermore, fungi may synthesize and secrete volatile molecules that attract gravid female mosquitoes and signal suitable oviposition sites [13, 14].

Concerning public health applications, entomopathogenic fungi have been isolated, as well as fungi producing a wide variety of enzymes and toxins, among other metabolites, that have been used effectively in mosquito control [15, 16] providing alternatives to conventional synthetic insecticides [15, 17, 18]. Alternatively, fungi with low level of pathogenicity may modulate the mosquito immune system, interfering with malaria parasite development [19]. Fungi present in mosquito larvae aquatic habitats may provide appropriate means for developing and deploying biological control measures against malaria vectors [20–22], yet, few mosquito-fungi interactions have been well characterized. Therefore, this study fills a considerable gap of knowledge, in particular concerning fungi present in the breeding sites of *An. darlingi* mosquitoes.

Methods

Sampling sites and collection

Water samples were collected from permanent *An. darlingi* breeding sites identified by the Epidemiological Surveillance of the Municipal Health Secretariat from the municipalities of Coari and São Gabriel da Cachoeira, in the State of Amazonas - Brazil (Table 1). Two sites were selected in each municipality and from each site water samples were collected at four equidistant points (5 m from each other) (Supplementary Fig. 1). Water samples were collected on the surface of the breeding sites into sterile

glass bottles of 1 l and kept at 4°C during transportation to the Laboratory of Bioassays and Microorganisms of the Amazon (LaBMicrA) at Federal University of Amazonas (Universidade Federal do Amazonas, UFAM).

Isolation of fungi

One-hundred µl aliquots of the sample materials were transferred to Petri dishes (90x15 mm) containing one of the following culture media: AVA (10 g/l oats, 15 g/l agar, 4 g/l dextrose, 4 g/l yeast extract, and 10 g/l malt extract), PDA + L (200 g/l potato, 20 g/l dextrose, and 15 g/l of agar plus 2 g/l yeast extract) [23], ISP2 (10 g/l agar, 10 g/l starch, 4 g/l dextrose, 4 g/l yeast extract, and 10 g/l extract malt), and SDAY (15 g/l agar, 40 g/l dextrose, 10 g/l yeast extract, and 10 g/l peptone). Inoculation in each medium was in triplicate, and all media were supplemented with tetracycline and ampicillin (50 µg/ml) to inhibit bacterial growth.

The plates were incubated at 26 °C for up to 20 days and monitored daily. From the fifth day, fungal colonies were transferred individually to new plates with the same culture medium. Successive reinoculations were done until pure cultures were obtained. All purified cultures were preserved at -80 °C in 20% glycerol. Those with conidia or spores were also preserved in distilled water [24]. The isolated and preserved strains were deposited in the LaBMicrA/UFAM work collection and registered under the SisGen (National System for the Management of Genetic Heritage and Traditional Knowledge Associated) number AD64E07.

Morphological analysis

Morphological identifications followed taxonomic keys [25–30], according to the macro- and micro-morphological characters observed. Macroscopic characters included, color, shape, colony diameter, texture, mycelium elevation, and diffuse pigment.

For microscopic examinations, strains were inoculated in a Petri dish at three equidistant points, 1 cm from the edge. Coverslips were placed on top of two of these inoculums, leaving the third as visual control of the colonies. Whenever differentiation from the vegetative mycelium was observed, one coverslip was carefully removed and stained with lactophenol blue to confirm the appearance of the reproductive structures. Additional incubation time was allowed before removing the second micro-cultivation coverslip and staining, when necessary. The vegetative and reproductive microstructures were

examined and microphotographed using the Axio Lab.A1 trinocular microscope (Zeiss) with 400 and 1000X magnification. The fungal strains exhibiting similar morphological characteristics were grouped in morphotypes. At least 5% of the strains of each morphotype were randomly chosen to perform rDNA sequencing.

DNA extraction, rDNA amplification, and sequencing

Each fungal strain was grown in 125 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml Potato Dextrose Broth (PDB) medium for 24 - 72 h at 26 °C and 120 rpm. The mycelium was separated by vacuum filtration on Whatman paper, No. 4, and crushed with SilicaFlash Irregular Silica Gel G60 (SiliCycle) to lyse the cells. Genomic DNA was extracted with ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep kit (Zymo Research, USA), according to the manufacturer's instructions with minor modifications. The quantity and quality were assessed by UV-spectrophotometry (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, USA), and gel electrophoresis respectively.

Approximately 700 bp DNA fragments including the internal transcribed spacers (*ITS1-5.8S-ITS2*) of the *rDNA* were amplified using the primers ITS1 and ITS4 [31]. The amplification reaction had the final volume of 25 µl containing 0.5 µl of each primer at 10 pmol (Invitrogen), 1 µl DNA at 50-100 ng/µl, 2.5 µl 10x EasyTaq Buffer with Mg₂ (TransGen Biotech Co.), 0.3 µl EasyTaq DNA Polymerase at 5 U/µl (TransGen Biotech Co.), 1 µl dNTP at 2.5 mM (TransGen Biotech Co.), and 19.2 µl of milli-Q water. PCR amplification was performed using a BioRad S1000 thermal cycler (BioRad Laboratory, CA) with an initial incubation at 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles of [94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min], and a final incubation at 72 °C for 5 min.

Amplicons were visualized by electrophoresis on 1.5% agarose gel stained with GelRed (Invitrogen). PCR products were treated with ExoSAP Ilustra - ExoProStar (GE Healthcare) prior to sequencing reactions using BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and a 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) sequencer.

Sequence analysis and taxonomy assignment

Consensus sequences were assembled using DNA Sequence Assembly BASER Software v.4.5.0 (<http://www.dnabaser.com/index.html>) and all new sequences generated in this study were deposited in the NCBI GenBank database (accession numbers MZ781245 - MZ781299). The sequences were then

compared with sequences stored in GenBank applying BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) at the NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Statistical analysis of data

For the characterization of the species richness of the fungal communities in the different breeding sites of *An. darlingi*, we applied Shannon-Wiener (H') diversity and Jaccard similarity indexes, with formation of the points-clustering dendrograms., The Shapiro-Wilk normality test and subsequent analyses by the Kruskal Wallis non-parametric test and Dunn's multiple comparison post-test, with a significance level of 95% ($p \leq 0.05$) were applied to assess differences in fungal richness between breeding sites

Non-metric multidimensional scaling (nMDS) analysis was performed using similarity matrices generated through the Bray-Curtis distance index, to verify how similar these environments are in relation to the species distribution. The significance of the clusters was tested by the Similarity Analysis (ANOSIM), performed in R [32]. The Venn diagram was generated with the tool Interacti Venn developed by Heberle [33].

Results

Richness, diversity, and characterization of cultivable fungi from *An. darlingi* breeding sites

A total of 206 fungal strains was recovered from *An. darlingi* larvae breeding waters, collected in Coari (sites C1 and C2) and São Gabriel da Cachoeira (sites S1 and S2). The four culture media used in this work supported the growth of a large number of fungi and showed little difference in the number of isolates, indicating the applicability of the media in the recovery of fungi from aquatic freshwater habitats-SDAY (n = 57; 28%), PDA+L (n = 52; 25%), ISP2 (n = 50; 24%), and AVA (n = 47; 23%) - (Supplementary Table 1). The C1 site (n = 107; 52%) yield the highest number of isolates, followed by the sites S2 (n = 45; 22%), C2 (n = 44; 21%), and S1 (n = 10; 5%).

Macro and micro morphological characterization of the isolated strains allowed their classification in 30 morphotypes. The diversity of morphotypes grown in different culture media were different. PDA+L supported the greatest diversity of morphotypes (n=23), followed by SDAY (n=21), AVA (n =18), and ISP2 (n=15). Amplification and sequencing of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region, and comparison of the sequences with those in the NCBI database, revealed that the assembled

collection contains representatives of 26 genera. Species assignment of every queried sequence would be the desired outcome, but in many cases the limited resolution of the sequenced locus precluded an accurate classification at the species level. Taxonomic classification at the genus level was then assigned to the isolated strains. The taxa identified by morphological traits and those resulting from DNA sequencing of representatives of each morphotype were always identical, therefore for the purpose of estimating diversity and richness (below), all isolated strains of each morphotype were assigned the same taxa. The representative samples from morphotype G06 were identified only at the Cucurbitariaceae family level. Three morphotypes proved difficult to cultivate under the conditions described above and did not have their DNA sequenced (Table 2).

The sequenced morphotypes belong to three phyla: 80.6% Ascomycota, followed by Basidiomycota and Mucoromycota, 11.7% and 2.4%, respectively. The three most represented classes were Dothideomycetes, Sordariomycetes and Eurotiomycetes corresponding to 33.5%, 30.6%, and 16.5%, respectively (Fig. 1). Ten orders were identified, being the three main ones: Pleosporales representing 26.7%, Hypocreales 21.9%, and Eurotiales 16.5%. (Fig. 2). The sequenced morphotypes had representatives of 25 families and 26 genera (Supplementary_Table 4). The genus *Paraconiothyrium* was the most prevalent, represented by 11.2% of all fungi strains. Followed by *Fusarium* and *Microsphaeropsis*, both with 9.2% (Fig. 3).

Fungi of genera *Albifimbria*, *Cytospora*, *Eutypella*, *Nigrograna*, and *Peniophora* only grew on the SDA medium, while fungi of genera *Epicoccum*, *Striaticonidium*, and Fungo NID2 grew only on PDA+L medium (Fig. 4).

Analysis of diversity of fungi taxa

The diversity and richness of fungi, represented by the Shannon (H') and Chao1 indexes, indicated that the samples from the C1 site showed the highest values (Chao1 = 33.5 and H' = 2.772). Regarding the indexes of dominance (Simpson D) and equitability (Equitability_J), samples from site C2 showed the highest values (D = 0.931 and J = 0.944). In contrast, the S1 site showed the lowest values of diversity (H' = 1.834), richness (Chao1 = 12) and dominance (D = 0.82) (Supplementary Table 3).

Representatives of five genera (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Trametes*, and *Trichoderma*) were shared among the four sampling sites. Seven taxa (*Albifimbria*, *Cladosporium*,

Epicoccum, *Nigrograna*, *Peniophora* and *Pyrenochaetopsis* genera, and NID1), were only isolated from site C1. Taxa exclusively isolated from the sites C2 (*Cytospora* and *Eutypella* genera, and ND2) and sites S2 (*Emmia*) were also observed. All taxa isolated from S1 were also present in at least one other site (Fig. 5).

Jaccard similarity index revealed three groups, with C2 and S2 being the most similar to each other, while the S1 is the most divergent (Supplementary Fig. 2). The Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc tests to verify the difference in richness among the collection sites, indicates borderline statistical difference ($p < 0.06$) between sites C2 and S2. In contrast, C2 and S2 sites and the two other sites are significantly different ($p < 0.05$) from each other.

Non-metric multidimensional scaling (nMDS) analysis based on all fungal isolates obtained in the samples and separated by collection site shows that the spatial distribution of the composition of the fungal community obtained varied between the collection sites, with site S1 being less similar among the others. Two sub-sites of the C1 site were the most similar, with the same microbial composition (Fig. 6).

Discussion

Anopheles mosquitoes breed in natural and artificial water bodies, such as riverbanks, streams, lakes, ponds, dams, fishponds, usually containing organic matter, aquatic vegetation, clean and shaded water near human habitations [34–37]. This aquatic habitat hosts a wide variety of fungi, which are associated with mosquitoes throughout their life cycle.

Fungi present in mosquito breeding waters are both ingested during larval feeding [38–40] and attach to their cuticle and external body wall structures. Although most of the mosquito larvae-associated microbiota does not persist through metamorphosis, some fungi are transstadially transmitted across developmental stages and inherited by their progeny [19]. Adult mosquitoes may also get in contact with fungi when standing on or ingesting breeding site water immediately after emerging from the pupal stage [41, 42]. These adults can introduce or reintroduce fungi into the aquatic habitat through contact, feces deposition [43] or during egg-laying [44, 45], affecting the microbiota to which the larvae are exposed [45].

In this study, we explored and compared the diversity of cultivable fungi in *Anopheles darlingi* breeding water samples from the Brazilian Amazon, collected in the municipalities of Coari (C1 and C2) and São Gabriel da Cachoeira (S1 and S2). Coari is located on the Solimões Riverbanks, while São Gabriel

da Cachoeira is on the Rio Negro banks, two distinct hydrological basins. Both municipalities are considered highly endemic areas for malaria [46].

We found a rich diversity of fungi in the four investigated breeding sites with 206 fungal isolates grouped into 30 different morpho-groups. Of these, 26 were identified into their genus level, one into the family level, and three with undetermined genera or even family, a minimum rate of one genus for every 6.9 fungal strains. Moreover, the isolated strains represent a fraction of all fungi present in the sampled sites, as we expect that other fungi could be isolated with other cultivation media and conditions. Culture techniques do not capture the full spectrum of microbial diversity, in fact, it has been suggested that approximately 99% of the naturally occurring microorganisms remain unknown [47–49].

The frequent and heavy rainfall events in the Amazon rain forest, especially during the period when the collections for this study were carried out, suggest that some of the fungi found in the mosquito breeding waters are transient carried with plant and soil residues, mainly by the rains [50, 51].

Ascomycota was highly predominant among the three phyla found in *An. darlingi* breeding waters, followed by Basidiomycota, while only one morphotype was from the Mucoromycota phylum. This is consistent with previous reports showing that Ascomycota is the largest phylum of fungi, encompassing about two-thirds of all described fungal species [52, 53], while Basidiomycota is the second richest phylum in species [54]. Both the Ascomycota and Basidiomycota phyla are ubiquitous in nature and are the main phyla found in freshwater environments [53, 55, 56]. The scarcer phylum Mucoromycota consists mainly of mycorrhizal fungi, root endophytes, and plant material decomposers [57]. However, as in this work, Mucoromycota is also found in freshwater environments [58].

Similar results were described when analyzing fungi in other mosquito breeding sites in diverse localities worldwide [59, 60]. For example, Tawidian [58], analyzing the fungal microbiota in samples of *Ae. albopictus* and water from the larvae breeding sites, identified representatives of the phyla Ascomycota (59.5%), Basidiomycota (30.8%), and Mucoromycota (0.465%), among others.

The most represented classes Dothideomycetes, Sordariomycetes, and Eurotiomycetes, belong to the most abundant Ascomycota phylum as well, while Agaricomycetes and Mucoromycetes had lesser abundance and were the unique classes found for their respective phyla. Sordariomycetes contains nearly half of all known freshwater Ascomycota and corresponding to approximately 300 out of 620 taxa [61, 62].

The three main classes in this study are also the most abundant in waters from aquatic environments of the High Arctic [63] and other marine environments [50]. Therefore, our data indicate that the fungi of these three classes are adapted to occupy very different niches.

The site C1 displayed the highest-richness index, with the highest number of isolates, 26 of all 30 taxa found in this work were represented in C1. Seven taxa were found exclusively in C1 and 19 were shared with other sites (Fig. 5). Such diversity and richness are consistent with the suitable conditions for fungal growth found in the C1 site, a permanent dam with fish and vegetation in the margins and therefore rich in organic particles. As a whole, dams have characteristics closer to natural environments and are also favorable to breeding species of *Anopheles* [37].

The C2 and S2 sites, the second and third sites in richness respectively, are natural, permanent lakes, with fish and vegetation in the margins, a situation resembling that found in the site C1. The diversity in C2 was 20 taxa, while S2 had 16. The lowest indexes of diversity and richness of fungi were attributed to the site S1. This breeding site was a permanent fishpond, without vegetation on the margins and near a deforested area, most affected by anthropic actions, and probably poorer in conditions for fungal survival. Indeed, anthropogenic activities affect the biogeochemical properties of breeding sites and, in turn, affect the microbiota of mosquitoes [64], which would explain the lower fungal diversity index of the S1 site. In addition, human activities can directly affect the fungal community in aquatic environments, and the presence of contaminants can reduce fungal diversity [65]. S1 had only 7 taxa: none exclusive, two common to other two sites, and five common to all sites (Fig. 5).

The five genera of fungi found in all the four sites sampled in this work, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Trametes*, and *Trichoderma* are known as ubiquitous in the environment [50, 66–68]. Interactions between these five genera, and their metabolites, with vectors mosquitoes for human disease have been studied. *Penicillium* species present in the midgut of *Anopheles* made it more susceptible to *Plasmodium* [69, 70], favoring the transmission of malaria, while the fungus *Talaromyces*, can make *Aedes aegypti* more susceptible to dengue virus infection [71]. On the other hand, metabolites produced by *Trametes* species showed larvicidal activity against *Ae. aegypti* [72], while fungi belonging to the genera *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Trichoderma* have larvicidal and adulticidal activities against *Culex*, *Aedes*, and *Anopheles* [18, 73–76].

The present study explored the diversity of cultivable fungi from *An. darlingi* breeding sites in the state of Amazonas, Brazil revealing rich and diverse fungal communities in the more natural freshwaters and poorer diversity in the anthropic-influenced one. Many fungi of the genera found in this work have been reported as potential agents against *Anopheles* larvae. According to Bilgo and coworkers [77], native fungi isolates offer a superior alternative to the introduction of a fungal strain of foreign biocontrol, as they can be better adapted to kill local mosquitoes and survive local conditions. Therefore, data generated in this study are a basis for developing Amazonian native fungi as tools to control vector populations and malaria transmission.

Acknowledgements

We would like to thank the Central Analítica - Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM/UFAM), the Embrapa Amazônia Ocidental (EMBRAPA) and the technicians of the Laboratório de Malária e Dengue/INPA for their help in the collections. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, by the project Pró-Amazônia: Biodiversidade e Sustentabilidade (process number 23038.009442 / 2013-12).

Declarations

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, by the project Pró-Amazônia: Biodiversidade e Sustentabilidade (process number 23038.009442 / 2013-12).

Conflicts of interest/Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Availability of data and material

Not applicable.

Code availability

Not applicable.

Authors' contributions

Designed the study - Marta Rodrigues de Oliveira, Wanderli Pedro Tadei, Afonso Duarte Leão de Souza and Antonia Queiroz Lima de Souza.

Collected the samples and performed the fungal isolations - Marta Rodrigues de Oliveira, Sarah Raquel Silveira da Silva and Antonia Queiroz Lima de Souza.

Performed the molecular procedures (PCR and Sanger Sequencing) - Marta Rodrigues de Oliveira, Antonia Queiroz Lima de Souza, Jeferson Chagas da Cruz and Gilvan Ferreira da Silva.

Analyzed the results and wrote the manuscript - Marta Rodrigues de Oliveira, Adriano Nobre Arcos, Thiago Fernandes Souza, Osvaldo Marinotti, Olle Terenius, Duarte Leão de Souza and Antonia Queiroz Lima de Souza.

Supervised and finalized the manuscript - Marta Rodrigues de Oliveira, Osvaldo Marinotti, Olle Terenius, Afonso Duarte Leão de Souza and Antonia Queiroz Lima de Souza.

All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Ministério do Meio Ambiente M (2007) Áreas prioritárias para conservação, uso sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira: Atualização - Portaria MMA n°9, de 23 de janeiro de 2007., 1st ed. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, Brasília
2. Rocha EM, Katak R de M, Campos de Oliveira J, et al (2020) Vector-focused approaches to curb malaria transmission in the Brazilian Amazon: an overview of current and future challenges and strategies. *Tropical Medicine and Infectious Disease* 5:161. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5040161>
3. Consoli RAGB, Oliveira RL de (1994) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora FIOCRUZ
4. Brasil, Ministério da Saúde. (2019) Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. "Guia de vigilância em saúde, 3rd ed. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços, Brasília – DF
5. Pereira E da S, Sarquis MI de M, Ferreira-Keppler RL, et al (2009) Filamentous fungi associated with mosquito larvae (Diptera: Culicidae) in municipalities of the Brazilian Amazon. *Neotrop entomol* 38:352–359. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2009000300009>
6. Andrade RM, Rachou RG (1954) Sampling of plankton organisms in various breeding places of *Anopheles darlingi* in southern Brazil. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* 6:481–496

7. Rocha EM, Marinotti O, Serrão DM, et al (2021) Culturable bacteria associated with *Anopheles darlingi* and their paratransgenesis potential. *Malar J* 20:40. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03574-1>
8. Nilsson LKJ, de Oliveira MR, Marinotti O, et al (2019) Characterization of bacterial communities in breeding waters of *anopheles darlingi* in Manaus in the Amazon basin malaria-endemic area. *Microb Ecol* 78:781–791. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01369-9>
9. Arruda A, Ferreira GS, Lima NC da S, et al (2017) A simple methodology to collect culturable bacteria from feces of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *Journal of Microbiological Methods* 141:115–117. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.08.004>
10. Terenius O, de Oliveira CD, Pinheiro WD, et al (2008) 16S rRNA Gene Sequences from bacteria associated with adult *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Journal of Medical Entomology* 45:172–175. <https://doi.org/10.1093/jmedent/45.1.172>
11. Malassigné S, Valiente Moro C, Luis P (2020) Mosquito Mycobiota: An Overview of Non-Entomopathogenic Fungal Interactions. *Pathogens* 9:564. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070564>
12. Merritt RW, Dadd RH, Walker ED (1992) Feeding Behavior, Natural Food, and Nutritional Relationships of Larval Mosquitoes. *Annual Review of Entomology* 37:349–374. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.002025>
13. Girard M, Martin E, Vallon L, et al (2021) Microorganisms Associated With Mosquito Oviposition Sites: Implications for Habitat Selection and Insect Life Histories. <https://doi.org/10.20944/preprints202106.0504.v1>
14. Eneh LK, Saijo H, Borg-Karlson A-K, et al (2016) Cedrol, a malaria mosquito oviposition attractant is produced by fungi isolated from rhizomes of the grass *Cyperus rotundus*. *Malaria Journal* 15:478. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1536-7>
15. Wei G, Lai Y, Wang G, et al (2017) Insect pathogenic fungus interacts with the gut microbiota to accelerate mosquito mortality. *PNAS* 114:5994–5999. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703546114>
16. Singh G, Prakash S (2014) New Prospective on fungal pathogens for mosquitoes and vectors control technology. *Journal of Mosquito Research* 4:
17. Scholte E-J, Knols BG, Takken W (2004) Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Malar J* 3:45. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-3-45>
18. Vivekanandhan P, Bedini S, Shivakumar MS (2020) Isolation and identification of entomopathogenic fungus from Eastern Ghats of South Indian forest soil and their efficacy as biopesticide for mosquito control. *Parasitology International* 76:102099. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102099>
19. Nattoh G, Bargul JL, Magoma G, et al (2021) The fungus *Leptosphaerulina* persists in *Anopheles gambiae* and induces melanization. *PloS one* 16:e0246452
20. Gonzalez-Ceron L, Santillan F, Rodriguez MH, et al (2003) Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. *J Med Entomol* 40:371–374. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.3.371>
21. Lindh JM, Terenius O, Faye I (2005) 16S rRNA gene-based identification of midgut bacteria from field-caught *Anopheles gambiae* sensu lato and *A. funestus* mosquitoes reveals new species related to known insect symbionts. *Appl Environ Microbiol* 71:7217–7223. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7217-7223.2005>

22. Favia G, Ricci I, Damiani C, et al (2007) Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. PNAS 104:9047–9051. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610451104>
23. Souza AQL de, Souza ADL de, Astolfi Filho S, et al (2004) Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from amazonian toxic plants: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich and *Strychnos cogens* bentham. Acta Amazonica 34:185–195
24. Castellani A (1967) Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. Journal of Tropical Medicine & Hygiene 70:181–184
25. Barnett HL, Hunter BB (1988) Illustrated genera of imperfect fungi. American Phytopathological Society (APS Press), Minnesota
26. Bononi VLR, Grandi, R. A. P (1999) Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. Instituto de Botanica, São Paulo
27. Hanlin RT (1997) Illustrated genera of Ascomycetes. Aps Press, Minnesota
28. Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN (1995) Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi, 8th ed. Oxford University Press, Oxfordshire
29. Funder S (1953) Practical mycology. Manual for identification of fungi. Practical mycology Manual for identification of fungi.
30. Dugan FM, Dugan FM (2006) The identification of fungi: an illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature
31. White TJ, Bruns T, Lee SJWT, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications 18:315–322
32. R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. <https://www.r-project.org/index.html>. Accessed 4 Sep 2020
33. Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR, et al (2015) InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. BMC Bioinformatics 16:169. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0611-3>
34. Chu VM, Sallum MAM, Moore TE, et al (2020) Evidence for family-level variation of phenotypic traits in response to temperature of Brazilian *Nyssorhynchus darlingi*. Parasites & vectors 13:55
35. Forattini OP (2002) Culicidologia médica: Identificação, biologia. epidemiologia São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo 2:864
36. de Freitas Rodrigues A, Escobar AL, Souza-Santos R (2008) Spatial analysis and determination of malaria control areas in the state of Rondônia. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 41:
37. Arcos AN, Ferreira FA da S, Cunha HB da, Tadei WP (2018) Characterization of artificial larval habitats of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) in the Brazilian Central Amazon. Revista Brasileira de Entomologia 62:267–274. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2018.07.006>
38. Merritt RW, Dadd RH, Walker ED (1992) Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. Annual Review of Entomology 37:349–374. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.002025>

39. Chukalo E, Abate D (2017) Bacterial populations of mosquito breeding habitats in relation to maize pollen in Asendabo, south western Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research* 11:55–64
40. Tawidian P, Rhodes VL, Michel K (2019) Mosquito-fungus interactions and antifungal immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 111:103182. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.103182>
41. Lindh JM, Borg-Karlson A-K, Faye I (2008) Transstadial and horizontal transfer of bacteria within a colony of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) and oviposition response to bacteria-containing water. *Acta tropica* 107:242–250
42. Caragata EP, Tikhe CV, Dimopoulos G (2019) Curious entanglements: interactions between mosquitoes, their microbiota, and arboviruses. *Current Opinion in Virology* 37:26–36. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.05.005>
43. Urubshurov V, Janczyk P (2011) Biodiversity of yeasts in the gastrointestinal ecosystem with emphasis on its importance for the host. *The Dynamical Processes of Biodiversity-Case Studies of Evolution and Spatial Distribution* 277–302
44. Steyn A, Roets F, Botha A (2016) Yeasts associated with *Culex pipiens* and *Culex theileri* mosquito larvae and the effect of selected yeast strains on the ontogeny of *Culex pipiens*. *Microb Ecol* 71:747–760. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0709-1>
45. Coon KL, Brown MR, Strand MR (2016) Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. *Molecular Ecology* 25:5806–5826. <https://doi.org/10.1111/mec.13877>
46. FVS-AM, Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas (2018) Boletim Epidemiológico de Vigilância em Saúde. http://www.fvs.am.gov.br/media/publicacao/boletim_Epidemiol%C3%B3gico_2018.pdf. Accessed 23 Aug 2020
47. Kim M, Yoon H, You Y-H, et al (2013) Metagenomic analysis of fungal communities inhabiting the fairy ring zone of *Tricholoma matsutake*. *J Microbiol Biotechnol* 23:1347–1356. <https://doi.org/10.4014/jmb1306.06068>
48. Locey KJ, Lennon JT (2016) Scaling laws predict global microbial diversity. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:5970–5975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521291113>
49. Vitorino LC, Bessa LA (2018) Microbial diversity: The gap between the estimated and the known. *Diversity* 10:46. <https://doi.org/10.3390/d10020046>
50. Shearer CA, Descals E, Kohlmeyer B, et al (2007) Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodivers Conserv* 16:49–67. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9120-z>
51. Voronin LV (2014) *Terrigenous micromycetes* in freshwater ecosystems (review). *Inland Water Biol* 7:352–356. <https://doi.org/10.1134/S1995082914040191>
52. Naranjo-Ortiz MA, Gabaldón T (2019) Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the fungi. *Biological Reviews* 94:2101–2137. <https://doi.org/10.1111/brv.12550>
53. Panzer K, Yilmaz P, Weiß M, et al (2015) Identification of habitat-specific biomes of aquatic fungal communities using a comprehensive nearly full-length 18S rRNA Dataset enriched with contextual data. *Plos One* 10:e0134377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134377>
54. Zhao R-L, Li G-J, Sánchez-Ramírez S, et al (2017) A six-gene phylogenetic overview of Basidiomycota and allied phyla with estimated divergence times of higher taxa and a phylo proteomics perspective. *Fungal Diversity* 84:43–74. <https://doi.org/10.1007/s13225-017-0381-5>

55. Lepère C, Domaizon I, Humbert J-F, et al (2019) Diversity, spatial distribution and activity of fungi in freshwater ecosystems. *PeerJ* 7:e6247. <https://doi.org/10.7717/peerj.6247>
56. Grossart H-P, Van den Wyngaert S, Kagami M, et al (2019) Fungi in aquatic ecosystems. *Nature Reviews Microbiology* 17:339–354. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0175-8>
57. Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, et al (2016) A phylum-level phylogenetic classification of Zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* 108:1028–1046. <https://doi.org/10.3852/16-042>
58. Tawidian P, Coon KL, Jumpponen A, et al (2020) Host-environment interplay shapes fungal diversity in mosquitoes. *BioRxiv*,59. Luis P, Vallon L, Tran F-H, et al (2019) *Aedes albopictus* mosquitoes host a locally structured mycobiota with evidence of reduced fungal diversity in invasive populations. *Fungal Ecology* 39:257–266. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.02.004>
60. Thongsripong P, Chandler JA, Green AB, et al (2018) Mosquito vector-associated microbiota: Metabarcoding bacteria and eukaryotic symbionts across habitat types in Thailand endemic for dengue and other arthropod-borne diseases. *Ecology and Evolution* 8:1352–1368. <https://doi.org/10.1002/ece3.3676>
61. Cai L, Hu D-M, Liu F, et al (2014) 3. The molecular phylogeny of freshwater Sordariomycetes and discomycetes. *De Gruyter* 47-72..62. Shearer CA, Raja HA (2010) Freshwater Ascomycete Database. <http://fungi.life.illinois.edu/>. Accessed 15 Nov 2020
63. Zhang T, Wang N-F, Zhang Y-Q, et al (2016) Diversity and distribution of aquatic fungal communities in the Ny-Ålesund region, Svalbard (High Arctic): Aquatic fungi in the Arctic. *Microb Ecol* 71:543–554. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0689-1>
64. Scolari F, Casiraghi M, Bonizzoni M (2019) *Aedes* spp. and their microbiota: A review. *Front Microbiol* 10:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02036>
65. Ortiz-Vera MP, Olchanheski LR, da Silva EG, et al (2018) Influence of water quality on diversity and composition of fungal communities in a tropical river. *Sci Rep* 8:14799. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33162-y>
66. Almeida VR, Szpoganicz B, Chou L, et al (2016) Equilibrium and out-of-equilibrium investigation of proton exchange and cationic and anionic complexation on fungal mycelium (*Trametes hirsuta*). *J Braz Chem Soc* 27:15–29. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150236>
67. Samuels GJ (1996) *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological research* 100:923–935
68. Wong MKM, Goh T-K, Hodgkiss IJ, et al (1998) Role of fungi in freshwater ecosystems. *Biodiversity and Conservation* 7:1187–1206. <https://doi.org/10.1023/A:1008883716975>
69. Angleró-Rodríguez YI, Talyuli OA, Blumberg BJ, et al (2017) An *Aedes aegypti*-associated fungus increases susceptibility to dengue virus by modulating gut trypsin activity. *eLife* 6:e28844. <https://doi.org/10.7554/eLife.28844>
70. Balakrishnan S, Santhanam P, Srinivasan M (2017) Larvicidal potency of marine actinobacteria isolated from mangrove environment against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *J Parasit Dis* 41:387–394. <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0812-3>
71. Angleró-Rodríguez YI, Blumberg BJ, Dong Y, et al (2016) A natural *Anopheles*-associated *Penicillium chrysogenum* enhances mosquito susceptibility to *Plasmodium* infection. *Scientific reports* 6:34084

72. Waweru AW, Omolo JO, Cheplogoi PK, Njue AW (2017) Mosquito larvicidal trihydroxylindene derivative from submerged cultures of *Trametes* species. *African Journal of Biotechnology* 16:1457–1460
73. de Faria MR, Wraight SP (2007) Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological control* 43:237–256
74. Farenhorst M, Knols BG, Thomas MB, et al (2010) Synergy in efficacy of fungal entomopathogens and permethrin against west African insecticide-resistant *Anopheles gambiae* mosquitoes. *PLoS One* 5:e12081
75. Raj MM, Srikanth G, Rajikkannu M, Nandakumar R (2017) Evaluation of botanicals against: Mosquito larvae to the extracts of fungus *Beauveria* species. *World Scientific News* 88:199–210
76. Vivekanandhan P, Kavitha T, Karthi S, et al (2018) Toxicity of *Beauveria bassiana*-28 mycelial extracts on larvae of *Culex quinquefasciatus* Mosquito (Diptera: Culicidae). *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15:440. <https://doi.org/10.3390/ijerph15030440>
77. Bilgo E, Lovett B, St. Leger RJ, et al (2018) Native entomopathogenic *Metarhizium* spp. from Burkina Faso and their virulence against the malaria vector *Anopheles coluzzii* and non-target insects. *Parasites & Vectors* 11:209. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2796-6>

Table 1 Location and characteristics of the sites for collecting water samples from breeding sites in *An. darlingi*.

Site	Location	Characteristics	GPS Coordinates		Date (Month/year)
			Latitude (S)	Longitude (W)	
Coari					
1 -	Sítio do Gordo (C1)	- Dam, permanent, with fish and vegetation in margins.	4°06'43.7"	63°07'43.6"	02/2017
2 -	Sítio João do Boi (C2)	- Natural lake, permanent, with fish and vegetation in margins.	4°06'56.6"	63°08'34.4"	02/2017
São Gabriel da Cachoeira					
3 -	Sítio Matador (S1)	- Fishpond, permanent, with fish and no vegetation in margins.	0°6'54.873"	67°5'12.859"	02/2017
4 -	Sítio do Pelado (S2)	- Natural lake, permanent, with vegetation in margins and no fish.	0°7'6.866"	67°4'24.576"	02/2017

Table 2 Identification of taxa and distribution at the collection sites of fungi isolated from the waters of *An. darlingi* larvae breeding sites in the Brazilian Amazon.

Class	Taxon	N° of isolated strains	Distribution of isolates at collection sites			
			C1	C2	S1	S2
Agaricomycetes	<i>Emmia</i> ¹	4	0	0	0	4
	<i>Hypomontagnella</i> ¹	7	3	0	0	4
	<i>Peniophora</i> ¹	5	5	0	0	0
	<i>Trametes</i> ¹	8	3	2	1	2
Dothideomycetes	<i>Cladosporium</i> ²	2	2	0	0	0
	Cucurbitariaceae ¹	2	1	1	0	0
	<i>Epicoccum</i> ¹	1	1	0	0	0
	<i>Hongkongmyces</i> ¹	5	2	3	0	0
	<i>Microsphaeropsis</i> ¹	19	16	3	0	0
	<i>Nigrograna</i> ¹	1	1	0	0	0
	<i>Ochronis</i> ²	12	8	3	0	1
	<i>Paraconiothyrium</i> ⁸	23	19	0	3	1
	<i>Pyrenochaetopsis</i> ²	4	4	0	0	0
Eurotiomycetes	<i>Aspergillus</i> ⁵	12	5	2	2	3
	<i>Penicillium</i> ²	14	2	1	1	10
	<i>Talaromyces</i> ⁴	8	2	4	1	1
Mucoromycetes	<i>Gongronella</i> ¹	5	1	1	0	3
Sordariomycetes	<i>Albifimbria</i> ¹	1	1	0	0	0
	<i>Chrysosporthe</i> ¹	4	2	1	0	1
	<i>Cytospora</i> ³	3	0	3	0	0
	<i>Diaporthe</i> ³	6	1	2	0	3
	<i>Eutypella</i> ²	2	0	2	0	0
	<i>Fusarium</i> ⁴	19	12	4	0	3
	<i>Hyphodermella</i> ¹	3	1	1	0	1
	<i>Sarocladium</i> ²	5	1	1	0	3
	<i>Striaticonidium</i> ¹	3	1	1	0	1
	<i>Trichoderma</i> ²	17	6	6	1	4
	NID1 ¹	6	6	0	0	0
	NID2 ²	1	0	1	0	0
	NID3 ³	4	1	2	1	0
Total	30	206	107	44	10	45

NID (not identified) - morphotypes that could not be identified by morphology or by rDNA sequencing. ⁿ - Number of sequenced specimens.

Fig.1 Fungal community composition in different *Anopheles darlingi* breeding sites at class level.

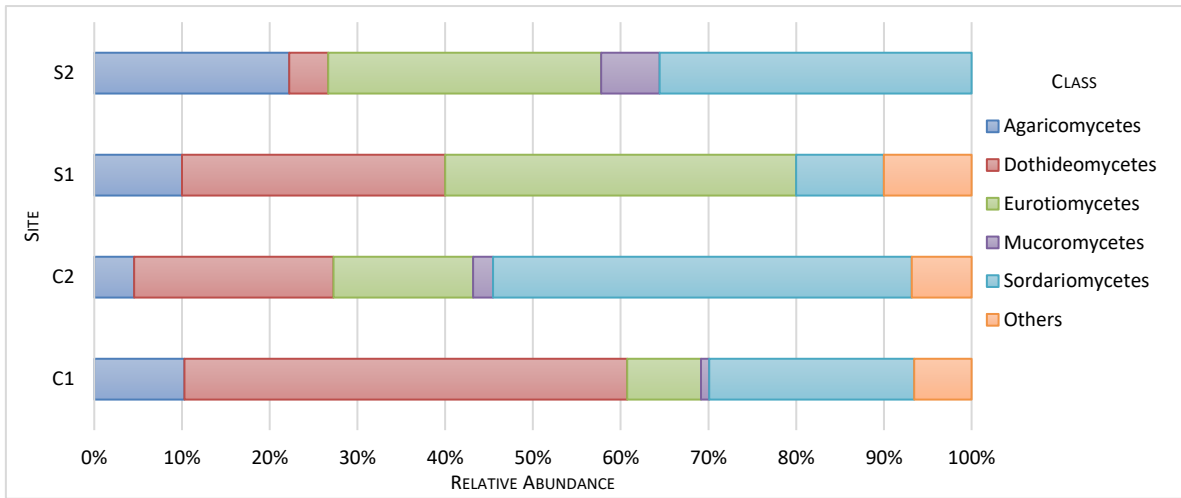


Fig. 2 Fungal community composition in different *Anopheles darlingi* breeding sites at the order level.

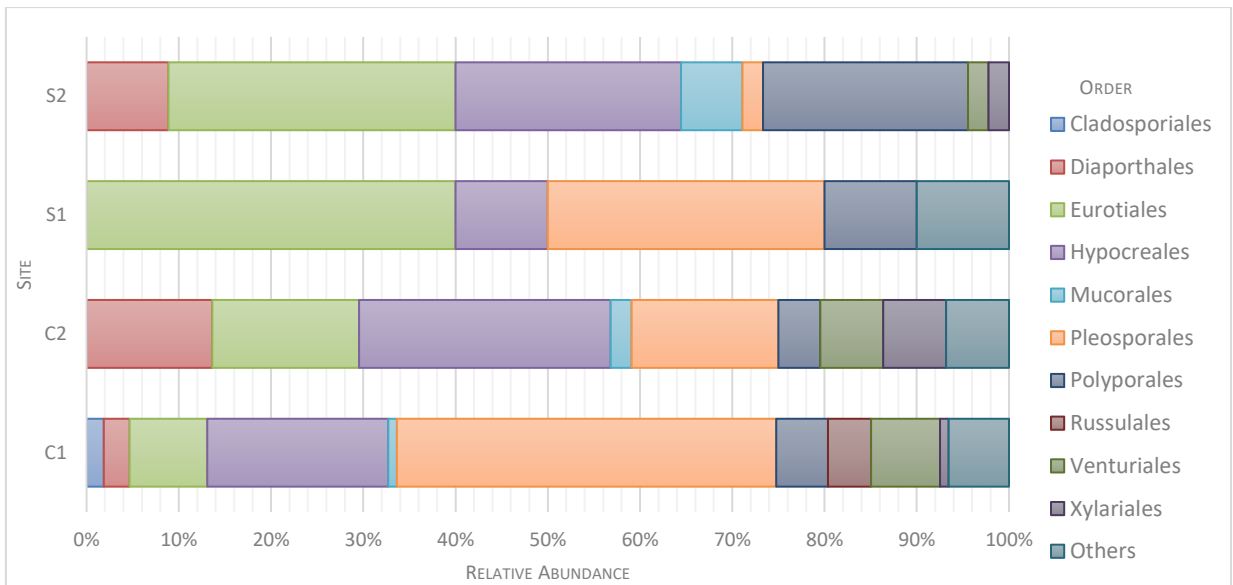


Fig. 3 Composition of fungal communities at the gender level at different collection sites.

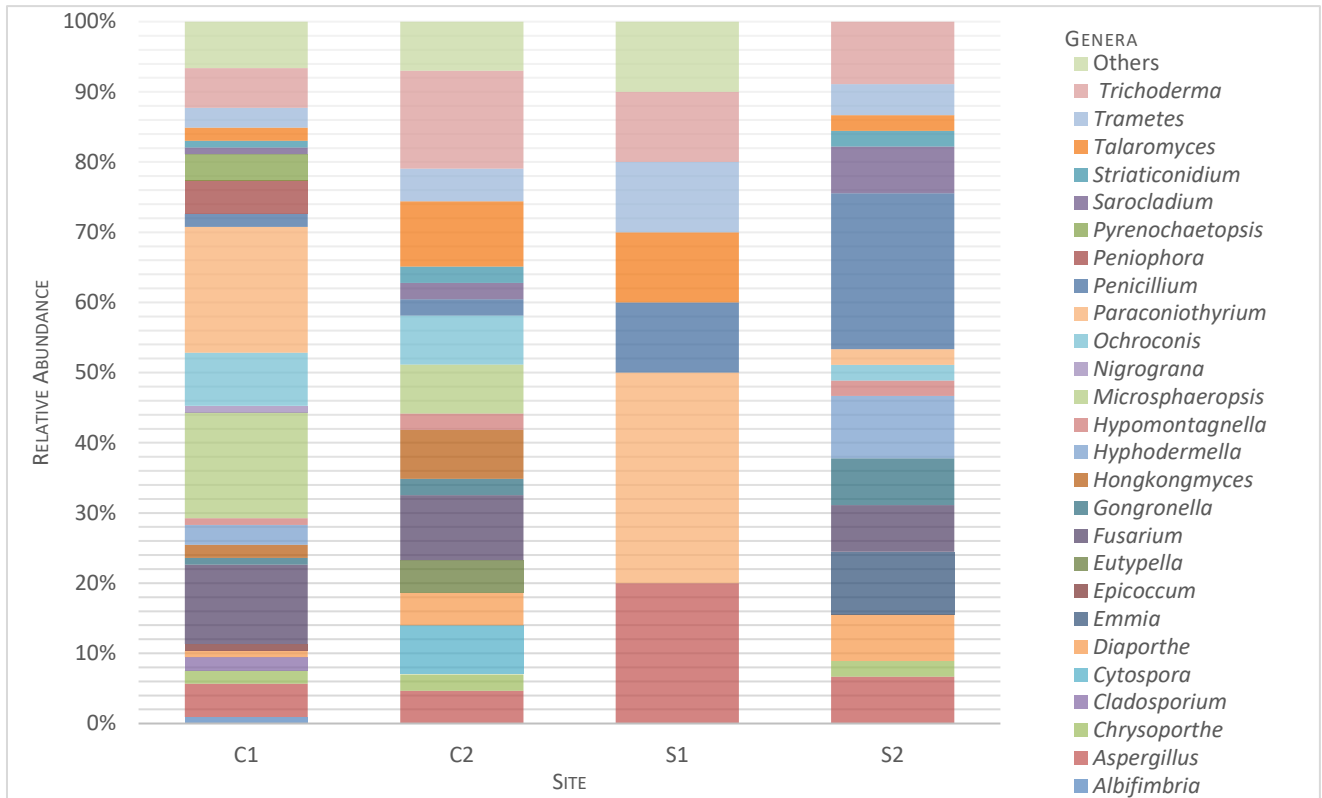


Fig. 4 Fungi isolated from *An. darlingi* larvae breeding sites in the different culture media AVA, ISP2, PDA + L, and SDAY. Taxonomic assignments of 30 morphotypes (Go-G29) was based on morphological and molecular characterization.

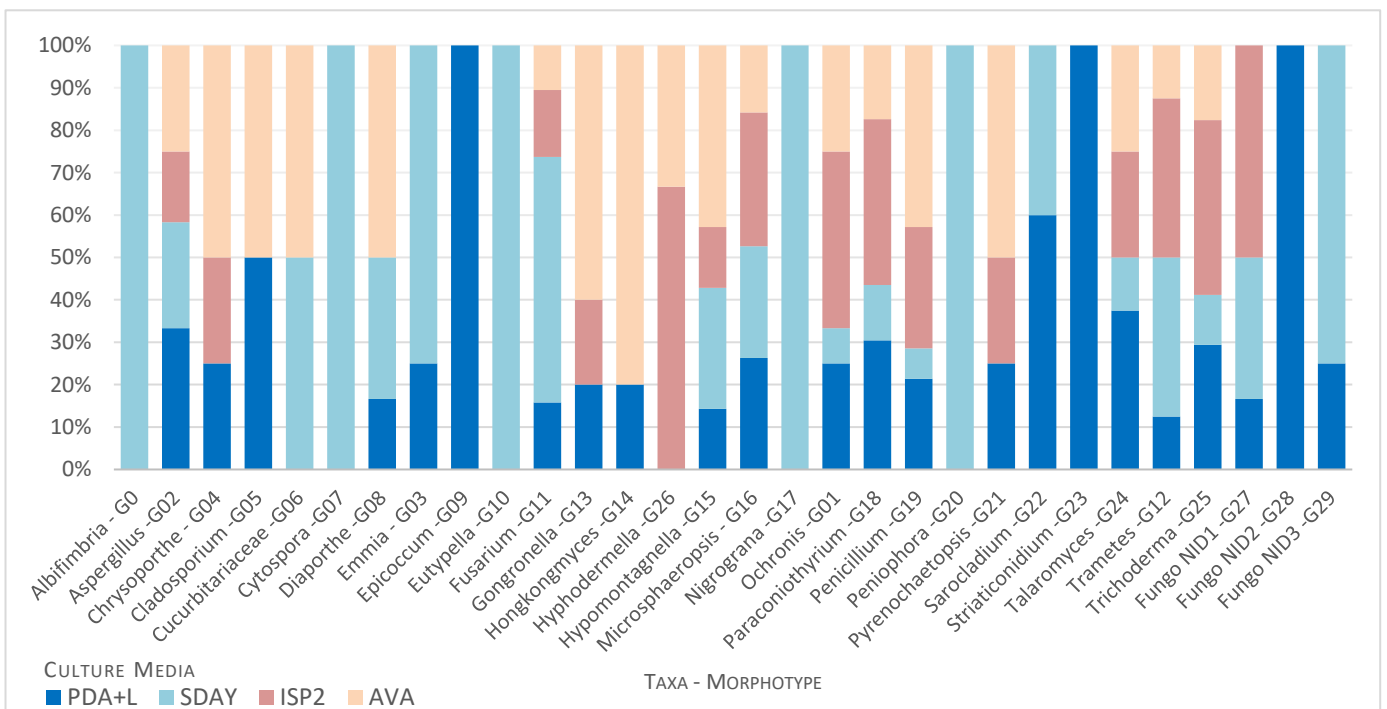


Fig. 5 Venn diagram showing the number of fungal taxa shared or exclusive of collection sites C1, C2, S1 and S2.

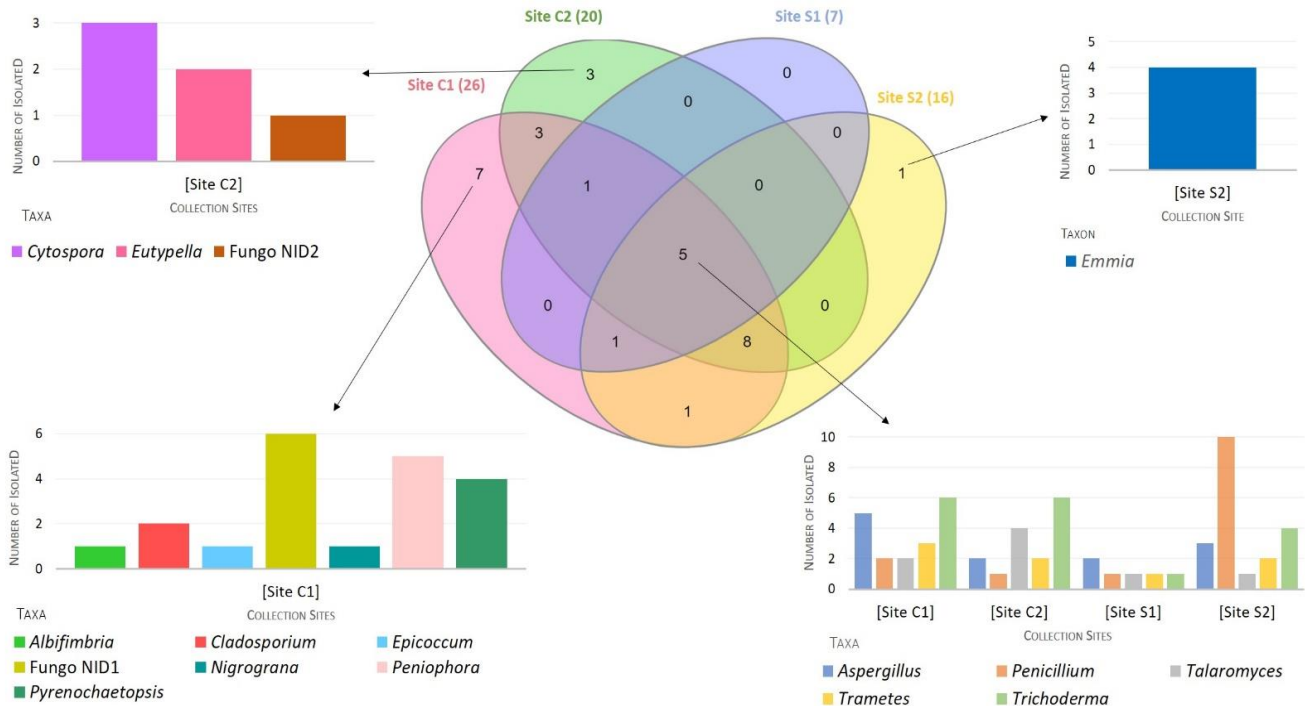
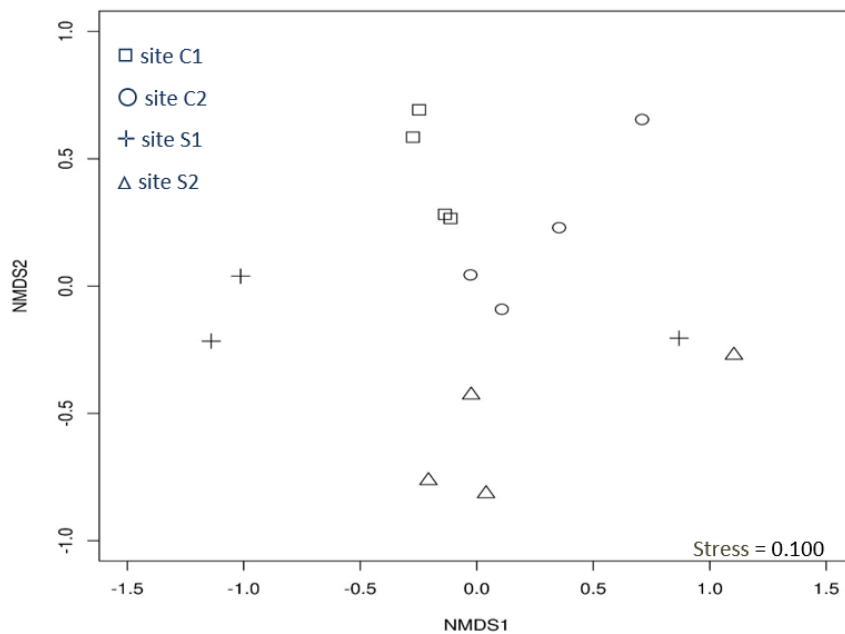
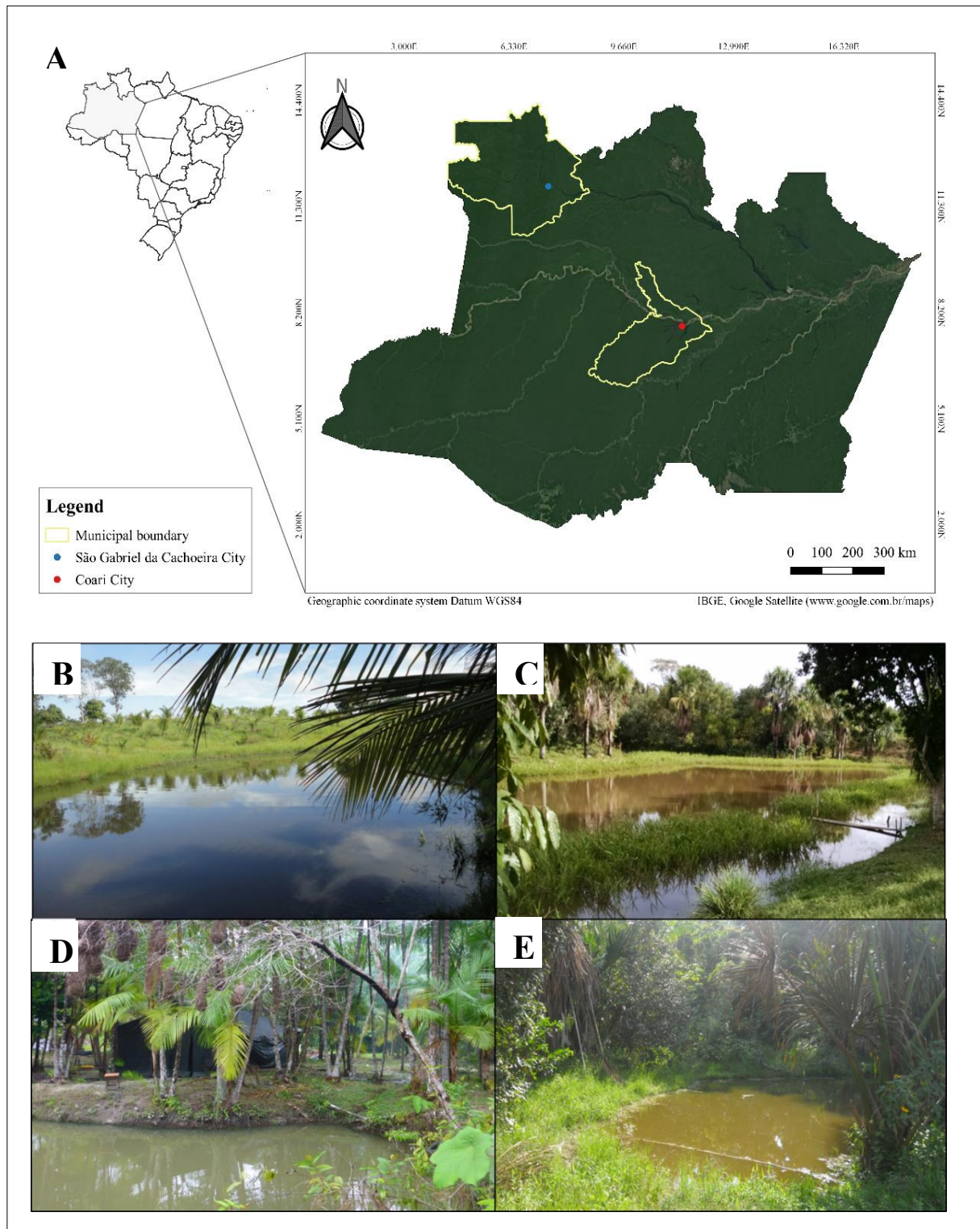


Fig. 6 Non-metric multidimensional scaling (nMDS) using the Bray-Curtis distance to show the similarities between the collection sites in relation to the distribution of fungal isolates. In each site, four sub-sites were sampled, however, the S1 site presented isolates in only 3 sub-sites.

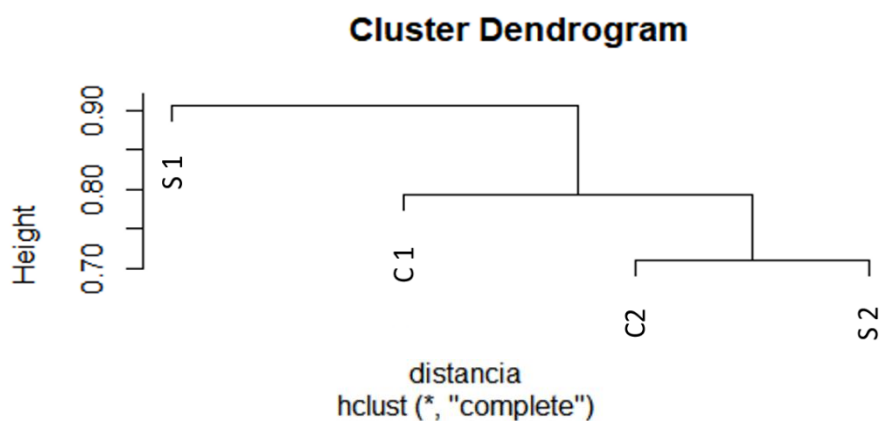


Supplementary Fig. 1 Places of sampling of surface water from the larval habitats of *Anopheles darlingi*.



A) Map showing the sampling sites in Coari and São Gabriel da Cachoeira - Amazonas/Brazil. Photos of the collection sites: B) Coari 1 - Gordo site (C1), C) Coari 2 - João do Boi site (C2), D) São Gabriel da Cachoeira 1 - Matador site (S1), E) São Gabriel da Cachoeira 2 - Pelado site (S2).

Supplementary Fig. 2 Dendrogram of fungi isolated from the aquatic freshwater habitat of *An. darlingi* at different collection sites C1, C2, S1 and S2, according to the Jaccard similarity. The analysis of the Jaccard similarity index showed the formation of three groups, in which C2 and S2 sites are the most similar to each other, while the S1 is the most different site, being more distant from the others.



Supplementary Table 1 Data from fungi isolated from breeding sites of *An. darlingi* larvae at the sampling sites in the municipalities of Coari (C1 and C2) and São Gabriel da Cachoeira (S1 and S2).

Code collection LabMicra	GenBank accession number	Taxon	Collection site	Isolation medium	Morphotype (Group)
1160	MZ781268	<i>Albifimbria</i>	C1	SDAY	G0
1126	MZ781261	<i>Aspergillus</i>	C1	ISP2	G02
1148	MZ781267	<i>Aspergillus</i>	S1	SDAY	G02
1171		<i>Aspergillus</i>	C2	PDA+L	G02
1204		<i>Aspergillus</i>	C1	AVA	G02
1209		<i>Aspergillus</i>	C1	SDAY	G02
1222		<i>Aspergillus</i>	S2	PDA+L	G02
1223		<i>Aspergillus</i>	S2	PDA+L	G02
1253	MZ781287	<i>Aspergillus</i>	S2	SDAY	G02
1255		<i>Aspergillus</i>	C1	AVA	G02
1257	MZ781289	<i>Aspergillus</i>	S1	AVA	G02
1259		<i>Aspergillus</i>	C2	PDA+L	G02
1283	MZ781299	<i>Aspergillus</i>	C1	ISP2	G02
1101		<i>Chrysosporthe</i>	C1	AVA	G04
1105		<i>Chrysosporthe</i>	C2	AVA	G04
1169	MZ781272	<i>Chrysosporthe</i>	C1	PDA+L	G04

1213		<i>Chrysosporthe</i>	S2	ISP2	G04
1132	MZ781262	<i>Cladosporium</i>	C1	AVA	G05
1135	MZ781264	<i>Cladosporium</i>	C1	PDA+L	G05
1078	MZ781245	Cucurbitariaceae	C2	SDAY	G06
1196		Cucurbitariaceae	C1	AVA	G06
1093	MZ781255	<i>Cytospora</i>	C2	SDAY	G07
1098	MZ781256	<i>Cytospora</i>	C2	SDAY	G07
1106	MZ781257	<i>Cytospora</i>	C2	SDAY	G07
1092	MZ781254	<i>Diaporthe</i>	C1	SDAY	G08
1108		<i>Diaporthe</i>	C2	SDAY	G08
1194		<i>Diaporthe</i>	S2	AVA	G08
1200		<i>Diaporthe</i>	C2	AVA	G08
1203	MZ781276	<i>Diaporthe</i>	S2	AVA	G08
1242	MZ781281	<i>Diaporthe</i>	S2	PDA+L	G08
1231		<i>Emmia</i>	S2	SDAY	G03
1232	MZ781279	<i>Emmia</i>	S2	SDAY	G03
1233		<i>Emmia</i>	S2	SDAY	G03
1236		<i>Emmia</i>	S2	PDA+L	G03
1248	MZ781286	<i>Epicoccum</i>	C1	PDA+L	G09
1165	MZ781271	<i>Eutypella</i>	C2	SDAY	G10
1240	MZ781280	<i>Eutypella</i>	C2	SDAY	G10
1084		<i>Fusarium</i>	C1	SDAY	G11
1085	MZ781250	<i>Fusarium</i>	C1	PDA+L	G11
1094		<i>Fusarium</i>	C1	SDAY	G11
1131		<i>Fusarium</i>	C1	SDAY	G11
1134		<i>Fusarium</i>	C2	PDA+L	G11
1143		<i>Fusarium</i>	C1	SDAY	G11
1144		<i>Fusarium</i>	C1	SDAY	G11
1146		<i>Fusarium</i>	C1	SDAY	G11
1149		<i>Fusarium</i>	C1	SDAY	G11
1154		<i>Fusarium</i>	C1	ISP2	G11
1155		<i>Fusarium</i>	C2	ISP2	G11
1182		<i>Fusarium</i>	C2	PDA+L	G11
1201	MZ781275	<i>Fusarium</i>	C2	AVA	G11
1210		<i>Fusarium</i>	C1	SDAY	G11
1226		<i>Fusarium</i>	S2	SDAY	G11
1227		<i>Fusarium</i>	S2	ISP2	G11
1262	MZ781291	<i>Fusarium</i>	C1	SDAY	G11
1280	MZ781298	<i>Fusarium</i>	S2	AVA	G11
1130		<i>Fusarium</i>	C1	SDAY	G11
1095		<i>Gongronella</i>	C1	AVA	G13
1111	MZ781258	<i>Gongronella</i>	C2	PDA+L	G13
1207		<i>Gongronella</i>	S2	AVA	G13
1264		<i>Gongronella</i>	S2	ISP2	G13
1267		<i>Gongronella</i>	S2	AVA	G13
1188		<i>Hongkongmyces</i>	C2	AVA	G14

1189		<i>Hongkongmyces</i>	C2	AVA	G14
1191		<i>Hongkongmyces</i>	C2	AVA	G14
1277	MZ781297	<i>Hongkongmyces</i>	C1	PDA+L	G14
1158		<i>Hongkongmyces</i>	C1	AVA	G14
1157		<i>Hyphodermella</i>	C1	ISP2	G26
1224		<i>Hyphodermella.</i>	C2	AVA	G26
1273	MZ781296	<i>Hyphodermella.</i>	S2	ISP2	G26
1167		<i>Hypomontagnella</i>	C1	AVA	G15
1197		<i>Hypomontagnella</i>	C1	PDA+L	G15
1199		<i>Hypomontagnella</i>	C1	AVA	G15
1205	MZ781277	<i>Hypomontagnella</i>	S2	AVA	G15
1208		<i>Hypomontagnella</i>	S2	ISP2	G15
1238		<i>Hypomontagnella</i>	S2	SDAY	G15
1239		<i>Hypomontagnella</i>	S2	SDAY	G15
1099		<i>Microsphaeropsis</i>	C2	AVA	G16
1082	MZ781248	<i>Microsphaeropsis</i>	C1	SDAY	G16
1097		<i>Microsphaeropsis</i>	C1	PDA+L	G16
1102		<i>Microsphaeropsis</i>	C1	PDA+L	G16
1103		<i>Microsphaeropsis</i>	C1	PDA+L	G16
1147		<i>Microsphaeropsis</i>	C2	SDAY	G16
1151		<i>Microsphaeropsis</i>	C2	SDAY	G16
1162		<i>Microsphaeropsis</i>	C1	SDAY	G16
1168		<i>Microsphaeropsis</i>	C1	AVA	G16
1174		<i>Microsphaeropsis</i>	C1	ISP2	G16
1175		<i>Microsphaeropsis</i>	C1	ISP2	G16
1176		<i>Microsphaeropsis</i>	C1	ISP2	G16
1178		<i>Microsphaeropsis</i>	C1	ISP2	G16
1179		<i>Microsphaeropsis</i>	C1	ISP2	G16
1183		<i>Microsphaeropsis</i>	C1	PDA+L	G16
1185		<i>Microsphaeropsis</i>	C1	PDA+L	G16
1186		<i>Microsphaeropsis</i>	C1	AVA	G16
1190		<i>Microsphaeropsis</i>	C1	SDAY	G16
1279		<i>Microsphaeropsis</i>	C1	ISP2	G16
1079	MZ781246	<i>Nigrograna</i>	C1	SDAY	G17
1122		<i>Ochronis</i>	C1	ISP2	G01
1123	MZ781259	<i>Ochronis</i>	C1	ISP2	G01
1125	MZ781260	<i>Ochronis</i>	C2	ISP2	G01
1145		<i>Ochronis</i>	C1	SDAY	G01
1159		<i>Ochronis</i>	C2	ISP2	G01
1161		<i>Ochronis</i>	C2	AVA	G01
1237		<i>Ochronis</i>	C1	PDA+L	G01
1081		<i>Ochronis</i>	C1	AVA	G01
1172		<i>Ochronis</i>	C1	ISP2	G01
1216		<i>Ochronis</i>	C1	PDA+L	G01
1218		<i>Ochronis</i>	C1	PDA+L	G01
1229		<i>Ochronis</i>	S2	AVA	G01

1083	MZ781249	<i>Paraconiothyrium</i>	C1	SDAY	G18
1142		<i>Paraconiothyrium</i>	S1	SDAY	G18
1163		<i>Paraconiothyrium</i>	C1	PDA+L	G18
1166	MZ781270	<i>Paraconiothyrium</i>	C1	AVA	G18
1177		<i>Paraconiothyrium</i>	C1	ISP2	G18
1180		<i>Paraconiothyrium</i>	C1	ISP2	G18
1184	MZ781274	<i>Paraconiothyrium</i>	C1	PDA+L	G18
1192		<i>Paraconiothyrium</i>	C1	PDA+L	G18
1193		<i>Paraconiothyrium</i>	C1	ISP2	G18
1195		<i>Paraconiothyrium</i>	C1	ISP2	G18
1225		<i>Paraconiothyrium</i>	S1	ISP2	G18
1256	MZ781288	<i>Paraconiothyrium</i>	C1	AVA	G18
1261	MZ781290	<i>Paraconiothyrium</i>	C1	AVA	G18
1265	MZ781293	<i>Paraconiothyrium</i>	S2	SDAY	G18
1275		<i>Paraconiothyrium</i>	S1	PDA+L	G18
1276		<i>Paraconiothyrium</i>	C1	ISP2	G18
1080	MZ781247	<i>Paraconiothyrium</i>	C1	AVA	G18
1088		<i>Paraconiothyrium</i>	C1	PDA+L	G18
1119		<i>Paraconiothyrium</i>	C1	ISP2	G18
1124		<i>Paraconiothyrium</i>	C1	ISP2	G18
1211	MZ781278	<i>Paraconiothyrium</i>	C1	PDA+L	G18
1215		<i>Paraconiothyrium</i>	C1	ISP2	G18
1217		<i>Paraconiothyrium</i>	C1	PDA+L	G18
1138	MZ781266	<i>Penicillium</i>	C1	ISP2	G19
1127		<i>Penicillium</i>	C2	PDA+L	G19
1212		<i>Penicillium</i>	S2	AVA	G19
1214		<i>Penicillium</i>	S2	ISP2	G19
1219		<i>Penicillium</i>	S1	PDA+L	G19
1220		<i>Penicillium</i>	S2	ISP2	G19
1235		<i>Penicillium</i>	S2	AVA	G19
1245	MZ781283	<i>Penicillium</i>	S2	AVA	G19
1249		<i>Penicillium</i>	S2	ISP2	G19
1250		<i>Penicillium</i>	S2	AVA	G19
1251		<i>Penicillium</i>	C1	SDAY	G19
1254		<i>Penicillium</i>	S2	AVA	G19
1260		<i>Penicillium</i>	S2	PDA+L	G19
1281		<i>Penicillium</i>	S2	AVA	G19
1107		<i>Peniophora</i>	C1	SDAY	G20
1109		<i>Peniophora</i>	C1	SDAY	G20
1113		<i>Peniophora</i>	C1	SDAY	G20
1150		<i>Peniophora</i>	C1	SDAY	G20
1164	MZ781269	<i>Peniophora</i>	C1	SDAY	G20
1181	MZ781273	<i>Pyrenochaetopsis</i>	C1	ISP2	G21
1202		<i>Pyrenochaetopsis</i>	C1	AVA	G21
1272	MZ781295	<i>Pyrenochaetopsis</i>	C1	PDA+L	G21
1278		<i>Pyrenochaetopsis</i>	C1	AVA	G21

1091	MZ781253	<i>Sarocladium</i>	C1	SDAY	G22
1258		<i>Sarocladium.</i>	S2	SDAY	G22
1252		<i>Sarocladium.</i>	S2	PDA+L	G22
1266	MZ781294	<i>Sarocladium.</i>	S2	PDA+L	G22
1269		<i>Sarocladium.</i>	C2	PDA+L	G22
1086		<i>Striaticonidium</i>	C1	PDA+L	G23
1089	MZ781252	<i>Striaticonidium</i>	C2	PDA+L	G23
1274		<i>Striaticonidium</i>	S2	PDA+L	G23
1087	MZ781251	<i>Talaromyces</i>	C2	PDA+L	G24
1096		<i>Talaromyces</i>	C2	AVA	G24
1118		<i>Talaromyces</i>	C2	AVA	G24
1120		<i>Talaromyces</i>	C1	ISP2	G24
1198		<i>Talaromyces</i>	C1	SDAY	G24
1244	MZ781282	<i>Talaromyces</i>	C2	PDA+L	G24
1246	MZ781284	<i>Talaromyces</i>	S2	ISP2	G24
1263	MZ781292	<i>Talaromyces</i>	S1	PDA+L	G24
1100		<i>Trametes</i>	C1	SDAY	G12
1112		<i>Trametes</i>	C2	PDA+L	G12
1115		<i>Trametes</i>	C1	ISP2	G12
1116		<i>Trametes</i>	C2	ISP2	G12
1117		<i>Trametes</i>	C1	ISP2	G12
1241		<i>Trametes</i>	S2	SDAY	G12
1243		<i>Trametes</i>	S1	AVA	G12
1247	MZ781285	<i>Trametes</i>	S2	SDAY	G12
1104		<i>Trichoderma</i>	C1	PDA+L	G25
1110		<i>Trichoderma</i>	C2	PDA+L	G25
1114		<i>Trichoderma</i>	C1	ISP2	G25
1121		<i>Trichoderma</i>	C1	ISP2	G25
1133	MZ781263	<i>Trichoderma</i>	C2	PDA+L	G25
1136	MZ781265	<i>Trichoderma</i>	C2	PDA+L	G25
1137		<i>Trichoderma</i>	C1	PDA+L	G25
1139		<i>Trichoderma</i>	C1	ISP2	G25
1140		<i>Trichoderma</i>	C2	ISP2	G25
1141		<i>Trichoderma</i>	C2	ISP2	G25
1187		<i>Trichoderma</i>	C1	AVA	G25
1206		<i>Trichoderma</i>	S2	AVA	G25
1221		<i>Trichoderma</i>	S2	ISP2	G25
1228		<i>Trichoderma</i>	S1	SDAY	G25
1230		<i>Trichoderma</i>	S2	ISP2	G25
1234		<i>Trichoderma</i>	S2	SDAY	G25
1268		<i>Trichoderma</i>	C2	AVA	G25
1153		Fungo NID1	C1	ISP2	G27
1156		Fungo NID1	C1	ISP2	G27
1170		Fungo NID1	C1	PDA+L	G27
1173		Fungo NID1	C1	ISP2	G27
1270		Fungo NID1	C1	SDAY	G27

1271	Fungo NID1	C1	SDAY	G27
1282	Fungo NID2	C2	PDA+L	G28
1090	Fungo NID3	C2	SDAY	G29
1128	Fungo NID3	C2	PDA+L	G29
1129	Fungo NID3	C1	SDAY	G29
1152	Fungo NID3	S1	SDAY	G29

LaBMicrA - Laboratory of Bioassays and Microorganisms of the Amazon of the Federal University of Amazonas – UFAM. Culture media: AVA (oats, agar, dextrose, yeast extract, and malt extract), PDA + L (potato, dextrose, and agar plus yeast extract), ISP2 (agar, starch, dextrose, yeast extract, and extract malt), and SDAY (agar, dextrose, yeast extract, and peptone).

Supplementary Table 2 Isolated fungi from larvae breeding sites of *An. darlingi* in the municipalities of Coari and São Gabriel da Cachoeira included in each step of this work.

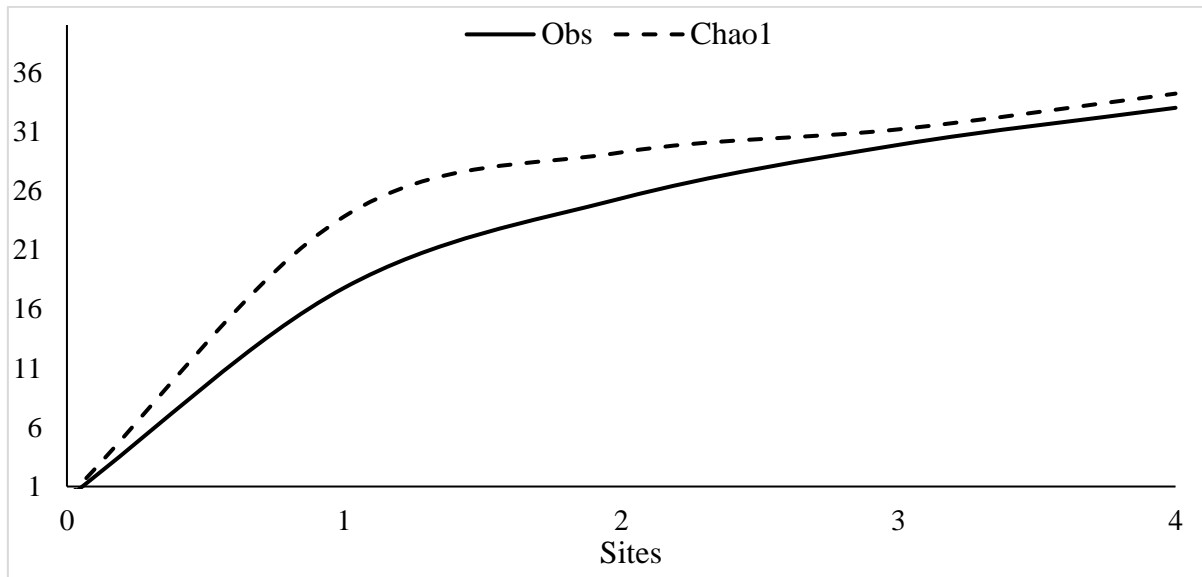
Collection site	Isolated fungi	Morphotypes (similar morphological characteristics)	High quality ITS rDNA region sequences ²
C1	107 (52%)	26 (86.6%)	26 (24.3%)
C2	44 (21%)	20 (66.6%)	14 (31.8%)
S1	10 (5%)	7 (23.3%)	3 (30.0%)
S2	45 (22%)	16 (53.3%)	12 (26.7%)
Total	206 (100%)	30 ¹	55 (26.7%)

¹Total of morphological groups obtained in this work. ²Values in brackets are percentages from isolated fungi.

Supplementary Table 3 Diversity estimates found at different collection sites.

Diversity index	Collection sites			
	C1	C2	S1	S2
Taxa_S	26	20	7	16
Individuals_n	107	44	10	45
Simpson_1-D	0.911	0.931	0.82	0.897
Shannon_H'	2.772	2.831	1.834	2.52
Equitability_J	0.851	0.944	0.942	0.909
Chao-1	33.5	24.67	12	21

Supplementary Fig. 3 The fungal richness accumulation curve obtained at the collection sites shows that the number of observed taxa is very close to the estimated number, however, the non-asymptote curve, suggesting that richness would continue to increase with greater sampling effort. Observed (Obs) and estimated (Chao1) fungal richness in aquatic habitats of *An. darlingi* at collection sites C1, C2, S1, and S2, represented in the graph with 1, 2, 3, and 4, respectively.



6. CAPÍTULO II

Diversidade de fungos cultiváveis em habitats aquáticos de criadouros de *Anopheles darlingi* na Amazônia²

Marta Rodrigues de Oliveira, Thiago Fernandes Souza, Jeferson Chagas da Cruz, Gilvan Ferreira da Silva, Osvaldo Marinotti, Olle Terenius, Wanderli Pedro Tadei, Afonso Duarte Leão de Souza, Antonia Queiroz Lima de Souza.

Este capítulo apresenta o estudo de identificação de espécies fúngicas isoladas de ambientes aquáticos na região Amazônia. Foram investigados 55 isolados fúngicos, e destes, 28 (51%) foram identificados até o nível de espécie, 21 (38%) como possíveis espécies novas, cinco (9%) foram identificados apenas como sp., e um (2%) isolado foi identificado somente até o nível de família. Portanto, este estudo fornece dados relevantes dos fungos presentes ambientes aquáticos da região amazônica e demonstram o potencial desse ambiente para atuar como reservatório de uma rica diversidade de espécies fúngicas, sendo esse habitat um bom candidato para a descoberta de novas espécies.

² Artigo a ser traduzido e submetido à revista *Fungal Diversity* (ISSN 1560-2745).

Diversidade de fungos cultiváveis em habitats aquáticos de criadouros de
Anopheles darlingi na Amazônia

Marta Rodrigues de Oliveira¹; Thiago Fernandes Souza²; Jeferson Chagas da Cruz²;
Gilvan Ferreira da Silva²; Osvaldo Marinotti³; Olle Terenius⁴; Wanderli Pedro Tadei^{1,5,†};
Afonso Duarte Leão de Souza^{1,6,7}; Antonia Queiroz Lima de Souza^{1,6,8,*}.

¹Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (PPG-BIONORTE),
Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM 69065-001, Brazil.

²Embrapa Amazônia Ocidental, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)
Manaus, AM, 69010-970, Brazil.

³MTEKPrime, Aliso Viejo California, USA.

⁴Department of Cell and Molecular Biology, Microbiology, Uppsala University, Sweden.

⁵Laboratório de Malária e Dengue, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA),
Manaus, AM 69011-970, Brazil.

⁶Central Analítica - Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM), Universidade Federal do
Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69077-000, Brazil.

⁷Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 69077-
000, Brazil.

⁸Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), Universidade Federal do Amazonas, Manaus,
AM, 69077-000, Brazil.

[†]in memoriam.

***Corresponding author:** antoniaqueiroz@ufam.edu.br

Resumo

Fungos de ambientes aquáticos ainda permanecem pouco explorados quando comparados com outros ambientes. Neste estudo, realizamos a identificação de espécies fúngicas isoladas de ambientes aquáticos na região Amazônia. Usamos análises morfológicas e moleculares para a identificação taxonômica dos fungos. Desta forma, investigamos 55 isolados, e destes, foram identificados fungos de 26 gêneros, sendo 28 (51%) isolados identificados até o nível de espécie, 21 (38%) como possíveis espécies novas, cinco (9%) isolados foram identificados apenas como sp., e um (2%) isolado

somente até o nível de família. Este estudo fornece dados relevantes dos fungos presentes ambientes aquáticos da região amazônica e demonstram o potencial desse ambiente para atuar como reservatório de uma rica diversidade de espécies fúngicas, sendo esse habitat um bom candidato para a descoberta de novas espécies.

Keywords: Fungos de água doce; Espécies novas; Isolados fúngicos; ITS.

Introdução

Os fungos são onipresentes em quase todos os ecossistemas da Terra (Wainwright et al., 2019). No entanto, ainda são negligenciados em ambientes aquáticos, apesar de apresentarem papéis importantes para o ciclo da matéria orgânica e dinâmica da teia alimentar (Grossart et al., 2019).

O ecossistema de água doce é um ambiente diversificado e fornece vários tipos de habitat para fungos, como ninhadas de plantas (como folhas caídas e madeiras em decomposição), solo, insetos aquáticos e plantas aquáticas (Heo et al., 2019). De acordo com Gai et al., (2011), os habitats de água doce abrigam táxons microbianos distintos daqueles frequentemente encontrados em ambientes marinhos e terrestres.

Ressaltamos que muitas espécies de fungos ainda precisam ser descobertas nos ambientes aquáticos, principalmente devido ao fato de poucos especialistas estudarem fungos desses ambientes e a vasta área geográfica ainda não amostrada (Shearer et al., 2007; Lepere et al., 2019). Desta forma, para conhecer efetivamente as espécies de fungos de habitats pouco estudados é preciso intensificar as coletas, os estudos taxonômicos e a formação de recursos humanos especializados, de modo a atingir as áreas insuficientemente conhecidas (Forzza et al., 2010).

O uso de dados moleculares baseados em sequências de DNA aumentou dramaticamente a identificação de espécies de fungos, sendo predominante em pesquisas de diversidade fúngica (Dai et al., 2015). Antigamente, os fungos eram classificados com base apenas nos dados morfológicos, o que tornava sua identificação muitas vezes difícil ou mesmo impossível (Lücking et al., 2020). Com o advento da tecnologia molecular métodos na taxonomia de fungos e combinando dados morfológicos e moleculares, tem sido possível desenvolver um sistema de classificação mais confiável e preciso (Liu et al., 2016).

No entanto, os bancos de dados de DNA estão cada vez mais cheios com sequências para as quais pouca ou nenhuma informação morfológica está disponível, levando a uma

lacuna entre dados de referências bem anotados e as sequências de DNA (Grossart et al., 2019). Portanto, existe uma grande necessidade de maior cultivo de linhagens fúngicas tanto para caracterização morfológica quanto filogenética e realizar os registros desses dados o que possibilitarão realizar a correta identificação taxonômica e descrição de espécies fúngicas de maneira satisfatória.

Desta forma, levando em consideração que a bacia amazônica é a rede mais complexa de habitats aquáticos do planeta (Aprile et al., 2013) e a sua microbiota fúngica é amplamente inexplorada tornan-se necessários estudos descrevendo a diversidade de fungos na região amazônica. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar a identificação de espécies fúngicas isoladas de ambientes aquáticos na região Amazônica.

Materiais e métodos

Locais de amostragem e Isolamento de fungos

As amostras de água foram coletadas nos municípios de Coari e São Gabriel da Cachoeira, no Estado do Amazonas - Brasil.

Para o isolamento das linhagens fúngicas foram utilizados quatros meios de cultura: AVA (10 g / l aveia, 15 g / l ágar, 4 g / l dextrose, 4 g / l de extrato de levedura e 10 g / l de extrato de malte), BDA + L (200 g / l de batata, 20 g / l de dextrose e 15 g / l de ágar mais 2 g / l de extrato de levedura) (Souza et al., 2004), ISP2 (10 g / l de ágar, 10 g / l de amido, 4 g / l de dextrose, 4 g / l de extrato de levedura e 10 g / l de extrato de malte) e SDAY (15 g / l de ágar, 40 g / l de dextrose , 10 g / l de extrato de levedura e 10 g / l de peptona).

As amostras foram cultivadas em placas de Petri contendo os meios de isolamentos. As placas foram mantidas em BOD a 26 ° C por um período máximo de 20 dias. Os fungos obtidos foram purificados por meio de sucessivas repique. Os fungos foram preservados a -80 °C em glicerol a 20% e em água destilada pelo método de Castellani (Castellani, 1967). Todos os preservados foram depositados na coleção de microrganismos do LaBMicrA (Laboratório de Bioensaios e Microorganismos da Amazônia) da Universidade Federal do Amazonas e registrados no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados) sob o número AD64E07.

Análise morfológica

As identificações morfológicas foram realizadas pela análise de estruturas macro e microscópicas usando chaves taxonômicas específicas (Hanlin et al., 1997; Hawksworth

et al., 1995; Bononi et al., 1999; Dugan & Dugan, 2006). As estruturas microscópicas foram examinadas e microfotografadas no microscópio trinocular Axio Lab.A1 (Zeiss) com aumento de 400 e 1000X.

Análise molecular

Para a extração do DNA genômico foi usado o kit ZR Fungal / Bacterial DNA MiniPrep (Zymo Research, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do rDNA foi amplificada usando os primers ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). As reações de PCR foram preparadas em um volume final de 25 µL, contendo 0,5 µl de cada primer a 10 pmol (Invitrogen), 1 µl de DNA a 50-100 ng / µl, 2,5 µl de tampão EasyTaq 10x com Mg2 (TransGen Biotech Co.), 0,3 µl EasyTaq DNA Polymerase a 5 U / µl (TransGen Biotech Co.), 1 µl de dNTP a 2,5 mM (TransGen Biotech Co.) e 19,2 µl de água milli-Q. As condições para amplificação foram de um ciclo inicial a 94 ° C por 3 min, seguido por 30 ciclos de 94 ° C por 30 s, 58 ° C por 30 s e 72 ° C por 1 min, e um ciclo final a 72 ° C por 5 min. As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante, no sequenciador 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

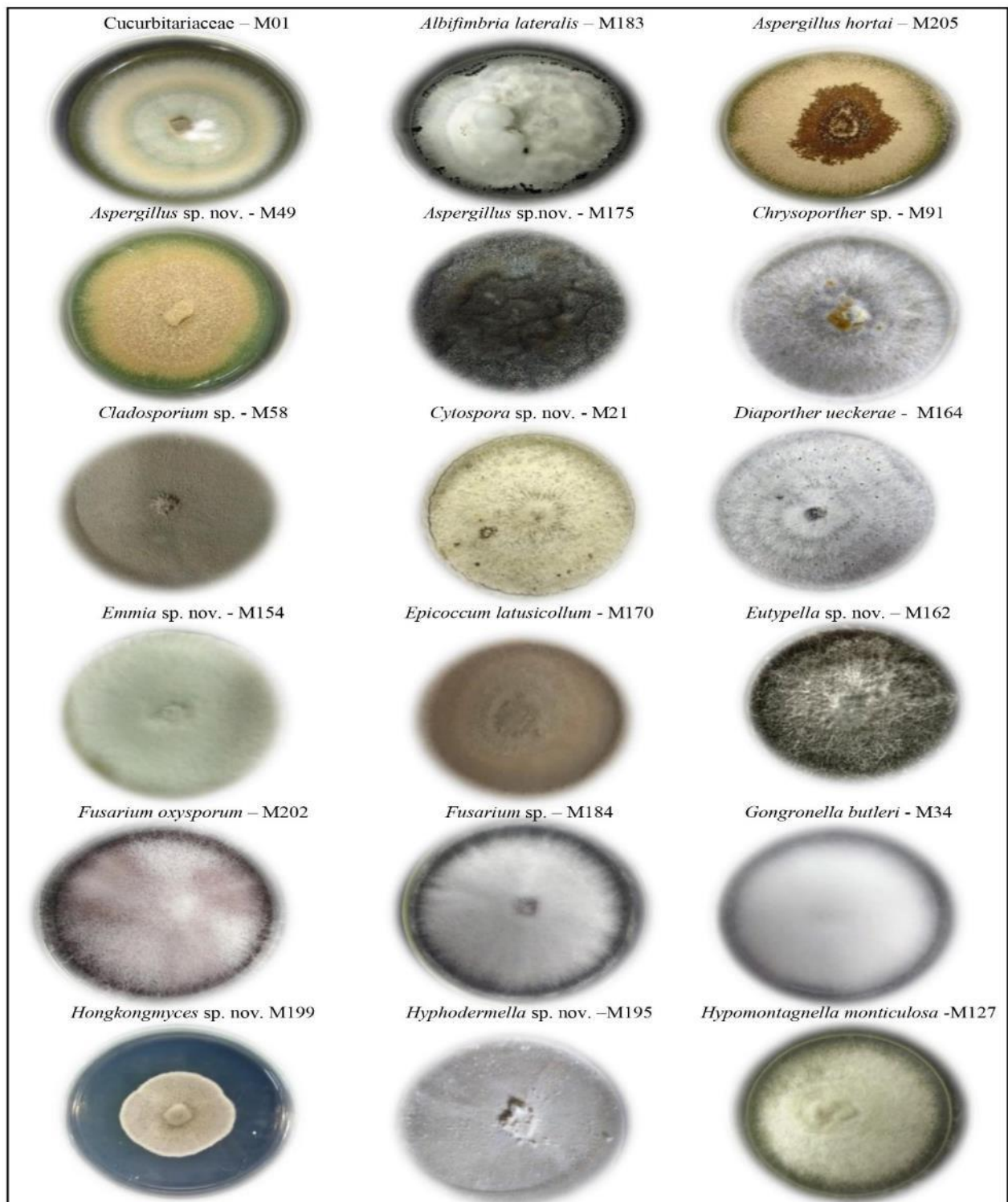
Análise das sequências e atribuição taxonômica

Os contigs foram montados utilizando o DNA Sequence Assembly BASER Software v.4.5.0 e comparados com as sequências banco de dados do GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Os alinhamentos foram realizados usando a interface online MAFFT (Kato & Standley, 2013), seguidos de ajustes manuais usando MEGA v. 7 (Kumar et al., 2016). Para as análises de máxima verossimilhança RAXML-HPC2 v.8.2.8 foi usado (Stamatakis, 2014) em XSEDE. Árvores filogenéticas foram projetadas na FigTree 1.4 (Rambaut, 2020) e todas as novas sequências geradas neste estudo foram depositadas no banco de dados do GenBank.

Resultado e discussão

Um total de 55 isolados fúngicos foram reativados e foram inicialmente identificados a partir dos dados morfológicos (Figura 1) e em termos de comparação usando a ferramenta BLASTn com o banco de dados GenBank, conforme mostrado na Tabela 1, e então confirmadas com a análise filogenética de sequências de DNA da região ITS.

Figura 1. Aspectos morfológicos e identificação taxonômica de diferentes isolados fúngicos obtidos de ambientes aquáticos da Amazônia.



Microsphaeropsis arundinis –M05



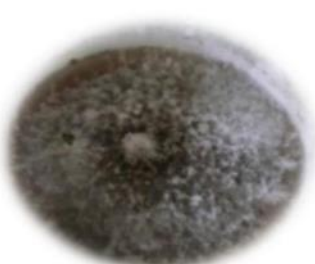
Nigrograna chromolaenae – M02



Ochroconis sp. nov. M46



Paraconiothyrium estuarium-M106



Penicillium citrosulfuratum-M167



Pyrenochaetopsis sinensis –M103



Pyrenochaetopsis sp. nov. –M194



Sarocladium sp. nov. - M188



Sarocladium sp. nov. - M14



Striaticonidium synnematum -M12



Talaromyces amestolkiae – M185



Talaromyces sp. nov – M166



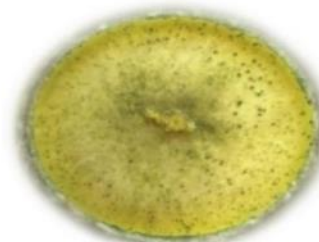
Talaromyces sp. nov. M168



Trametes menziesii -M169



Trichoderma atroviride – M56



As sequencias da região ITS, são consideradas como um código de barras fúngico formal e, sendo este o principal o marcador de escolha para a exploração da diversidade fúngica em amostras ambientais (Kõljalg et al., 2013). Entretanto, a identificação

taxonômica satisfatória permanece sendo um grande desafio devido à vasta e inexplorada diversidade e à falta de dados de espécies de referência.

A maioria das sequências (74.5%) apresentaram percentual de identidade acima de 98% em comparação com as sequências de espécies de referência depositadas no Genbank, entretanto, apesar de apresentar alto percentual de identidade, quando comparados com os dados morfológicos e análises filogenéticas algumas espécies foram consideradas como prováveis espécies novas, assim como as demais com baixo percentual de identidade requerendo análises adicionais para determinar a correta identificação taxonômica dessas espécies, bem como confirmar e descrever se são ou não novas espécies.

Desta forma, a partir das análises filogenéticas das sequências obtidas pelo sequenciamento da região ITS, foi possível identificar 28 (51%) isolados até o nível de espécie, cinco (9%) isolados demonstram dados inconclusivos quando comparados com as sequências da espécie-tipo e foram identificados como sp., 21 (38%) isolados como possíveis espécies novas e um (2%) isolado foi identificado somente até o nível de família (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação taxonômica de fungos isolados de ambientes aquáticos de Coari e São Gabriel da Cachoeira.

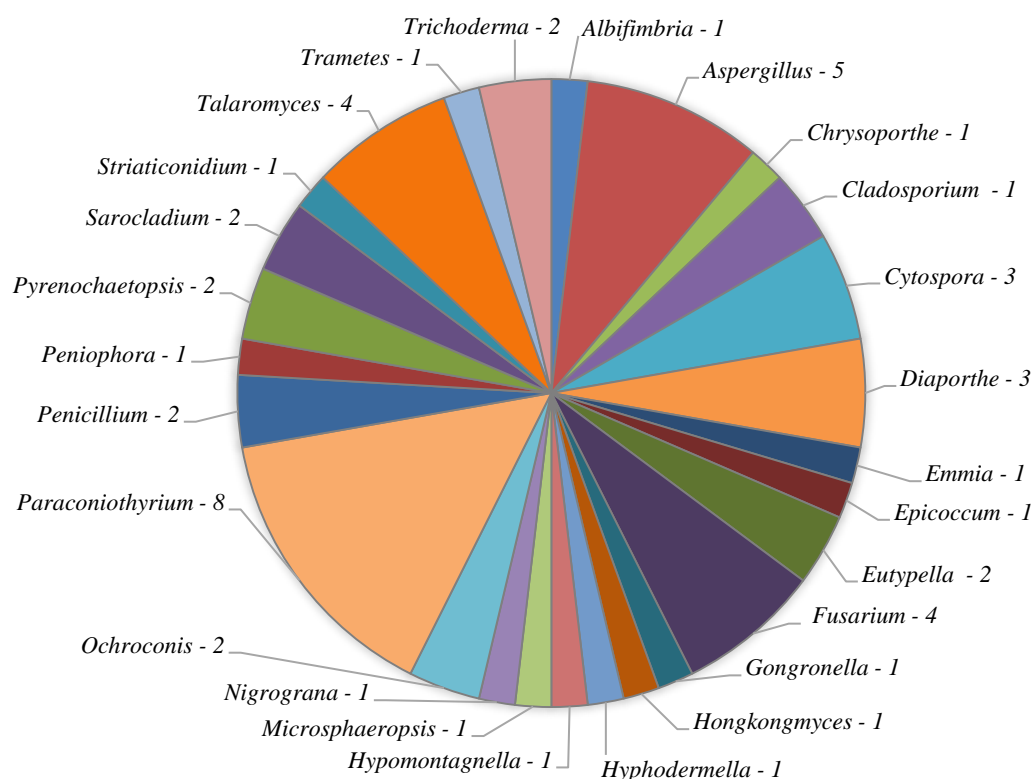
Nº de acesso Coleção Labmicra	Código do Isolado	Nº de acesso GenBank	Identificação Taxonômica	% Identidade	Identificação do GenBank ref	Nº de acesso GenBank ref
1078	M01	MZ781245	Cucurbitariaceae	99.79%	Cucurbitariaceae	LT592923.1
1160	M83	MZ781268	<i>Albifimbria lateralis</i>	100.00%	<i>Al. lateralis</i>	NR_153548.1
1148	M71	MZ781267	<i>Aspergillus hortai</i>	100.00%	<i>A. hortai</i>	KP987087.1
1257	M179	MZ781289	<i>Aspergillus hortai</i>	100.00%	<i>A. hortai</i>	KP987087.1
1283	M205	MZ781299	<i>Aspergillus hortai</i>	100.00%	<i>A.s hortai</i>	KP987087.1
1126	M49	MZ781261	<i>Aspergillus</i> sp. nov.	95.65%	<i>A. iranicus</i>	NR_156297.1
1253	M175	MZ781287	<i>Aspergillus</i> sp. nov.	94.60%	<i>A. homomorphus</i>	MH862768.1
1169	M91	MZ781272	<i>Chrysosporther</i> sp.	98.39%	<i>Ch. hodgesiana</i>	JN942329.1
1132	M55	MZ781262	<i>Cladosporium</i> sp.	98.24%	<i>Cl. ramotenellum</i>	MH863127.1
1135	M58	MZ781264	<i>Cladosporium</i> sp.	98.24%	<i>Cl. ramotenellum</i>	MH863127.1
1093	M16	MZ781255	<i>Cytospora</i> sp. nov.	97.21%	<i>C. lumnitzericola</i>	MG975778.1
1098	M21	MZ781256	<i>Cytospora</i> sp. nov.	97.11%	<i>C.lumnitzericola</i>	NR_172402.1
1106	M29	MZ781257	<i>Cytospora</i> sp. nov.	97.23%	<i>C. lumnitzericola</i>	NR_172402.1
1092	M15	MZ781254	<i>Diaporthe</i> sp. nov.	98.98%	<i>D. ueckerae</i>	NR_147543.1
1203	M125	MZ781276	<i>Diaporther ueckerae</i>	99.00%	<i>D. ueckerae</i>	NR_147543.1
1242	M164	MZ781281	<i>Diaporther ueckerae</i>	99.00%	<i>D. ueckerae</i>	NR_147543.1
1232	M154	MZ781279	<i>Emmia</i> sp. nov.	98.46%	<i>Em. latemarginata</i>	MH856427.1
1248	M170	MZ781286	<i>Epicoccum latusicollum</i>	100.00%	<i>Ep. latusicollum</i>	KY742101.1
1166	M88	MZ781270	<i>Eutypella scoparia</i>	98.31%	<i>E. scoparia</i>	NR_166007.1
1240	M162	MZ781280	<i>Eutypella</i> sp. nov.	85.89%	<i>E. parasitica</i>	NR_165995.1

1262	M184	MZ781291	<i>Fusarium oxysporum</i>	100.00%	<i>F. oxysporum</i>	MN817703.1
1280	M202	MZ781298	<i>Fusarium oxysporum</i>	100.00%	<i>F. oxysporum</i>	MN817703.1
1085	M08	MZ781250	<i>Fusarium</i> sp.	99.58%	<i>F. spathulatum</i>	EU329674.1
1201	M123	MZ781275	<i>Fusarium</i> sp.	99.58%	<i>F. spathulatum</i>	EU329674.1
1111	M34	MZ781258	<i>Gongronella butleri</i>	99.80%	<i>G. butleri</i>	JN942999.1
1277	M199	MZ781297	<i>Hongkongmyces</i> sp. nov.	96.09%	<i>H. pedis</i>	NR_149338.1
1273	M195	MZ781296	<i>Hyphodermella</i> sp. nov.	92.12%	<i>Hy. sp.</i>	KX008367.1
1205	M127	MZ781277	<i>Hypomontagnella monticulosa</i>	99.56%	<i>Hy. monticulosa</i>	MK131719.1
1082	M05	MZ781248	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	99.27%	<i>M. arundinis</i>	JX496010.1
1079	M02	MZ781246	<i>Nigrograna chromolaenae</i>	98.92%	<i>N. mackinnonii</i>	NR_132037.1
1123	M46	MZ781259	<i>Ochroconis</i> sp. nov.	90.70%	<i>O. minima</i>	NR_145366.1
1125	M48	MZ781260	<i>Ochroconis</i> sp. nov.	90.70%	<i>O. minima</i>	NR_145366.1
1165	M88e	MZ781271	<i>Paraconiothyrium cyclothyrioides</i>	99.62%	<i>P. cyclothyrioides</i>	LT796894.1
1083	M06	MZ781249	<i>Paraconiothyrium estuarium</i>	99.25%	<i>Pa. estuarinum</i>	NR_166007.1
1184	M106	MZ781274	<i>Paraconiothyrium estuarium</i>	98.31%	<i>Pa. estuarinum</i>	NR_166007.1
1256	M178	MZ781288	<i>Paraconiothyrium estuarium</i>	98.31%	<i>Pa. estuarinum</i>	NR_166007.1
1261	M183e	MZ781290	<i>Paraconiothyrium estuarium</i>	98.31%	<i>Pa. estuarinum</i>	NR_166007.1
1265	M187	MZ781293	<i>Paraconiothyrium estuarium</i>	99.64%	<i>Pa. estuarinum</i>	NR_166007.1
1080	M03	MZ781247	<i>Paraconiothyrium</i> sp. nov.	99.25%	<i>Pa. salinum</i>	MN369540.1
1211	M133	MZ781278	<i>Paraconiothyrium</i> sp. nov.	99.27%	<i>Pa. salinum</i>	MN369540.1
1138	M61	MZ781266	<i>Penicillium citrosulfuratum</i>	100.00%	<i>Pe. citreosulfuratum</i>	KP016814.1
1245	M167	MZ781283	<i>Penicillium citrosulfuratum</i>	100.00%	<i>Pe. citreosulfuratum</i>	KP016814.1
1164	M87	MZ781269	<i>Peniophora</i> sp. nov.	98.87%	<i>P. guadelupensis</i>	MH862304.1
1181	M103	MZ781273	<i>Pyrenochaetopsis sinensis</i>	99.77%	<i>Py. sinensis</i>	NR_171834.1
1272	M194	MZ781295	<i>Pyrenochaetopsis</i> sp. nov.	98.21%	<i>Py. poae</i>	KJ869117.1
1091	M14	MZ781253	<i>Sarocladium</i> sp. nov.	93.99%	<i>S. oryzae</i>	NR_14504
1266	M188	MZ781294	<i>Sarocladium</i> sp. nov.	92.45%	<i>S. gamsii</i>	NR_155780.1
1089	M12	MZ781252	<i>Striaticonidium synnematum</i>	98.57%	<i>St. synnematum</i>	NR_154432.1
1263	M185	MZ781292	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	99.82%	<i>Ta. amestolkiae</i>	NR_120179.1
1087	M10	MZ781251	<i>Talaromyces</i> sp. nov.	96.72%	<i>Ta. cinnabarinus</i>	MH860471.1
1244	M166	MZ781282	<i>Talaromyces</i> sp. nov.	96.67%	<i>Ta. cinnabarinus</i>	MH860471.1
1246	M168	MZ781284	<i>Talaromyces</i> sp. nov.	97.68%	<i>T. palmae</i>	NR_103617.1
1247	M169	MZ781285	<i>Trametes menziesii</i>	99.58%	<i>Tr. menziesii</i>	KC848326.1
1133	M56	MZ781263	<i>Trichoderma atroviride</i>	100.00%	<i>T. atroviride</i>	MN262486.1
1136	M59	MZ781265	<i>Trichoderma atroviride</i>	100.00%	<i>T. atroviride</i>	MN262486.1

Legenda: ref – sequencia de referência.

Vinte e seis gêneros foram identificados, demonstrando grande diversidade de fungos presentes no ambiente estudado. Os gêneros mais frequentes foram *Paraconiothyrium* com oito isolados, seguindo por *Aspergillus* com cinco isolados, *Fusarium* e *Talaromyces*, ambos com quatro isolados (Figura 2).

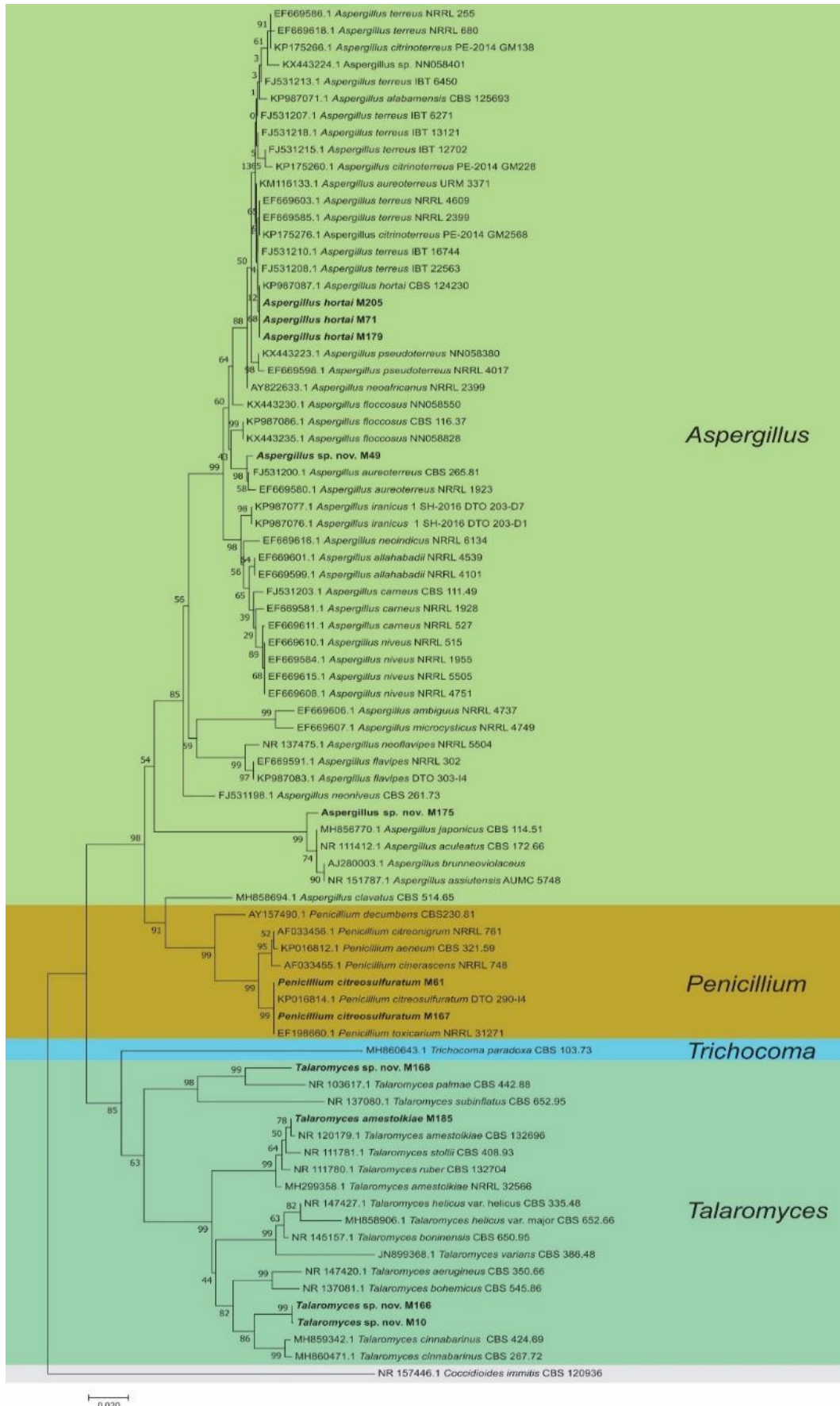
Figura 2. Gêneros de fungos identificados a partir das linhagens isoladas de ambientes aquáticos de Coari e São Gabriel da Cachoeira.



Foram construídas as árvores filogenéticas para ilustrar a relação entre sequências individuais previamente identificadas para seus parentes mais próximos recuperados do banco de dados GenBank, utilizando sequencias de espécies tipos, para confirmação taxonômica.

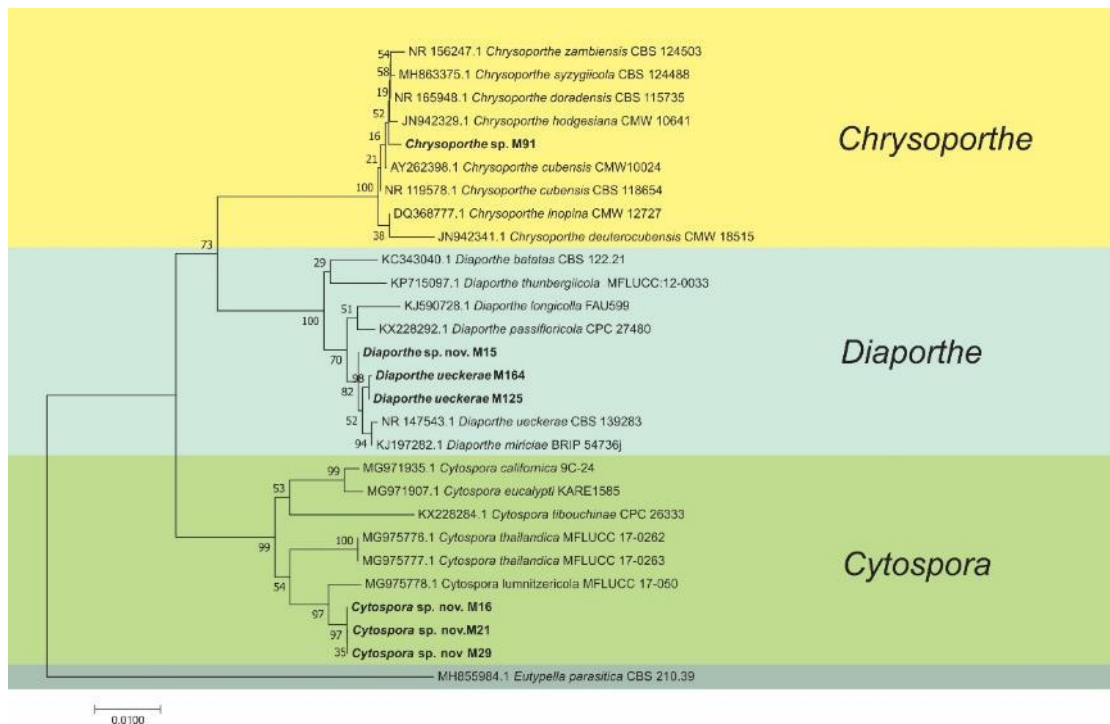
Onze isolados pertenciam a ordem Eurotiales, cinco espécies de *Aspergillus*, quatro espécies de *Talaromyces* e duas espécies de *Penicillium*, destes, sugerimos cinco prováveis espécies novas (Figura 3). Espécies desses gêneros podem colonizar uma grande variedade de substratos, são prevalentes em ambientes de água doce e desempenham um papel fundamental na manutenção do ecossistema (Heo et al., 2019). Além disso, membros desses gêneros são considerados de grande relevância ambiental e biotecnológica (Taniwaki et al., 2015). Produzem uma variedade de metabólitos, incluindo compostos anticâncer e antifúngicos, enzimas extracelulares e micotoxinas prejudiciais (Schafhauser et al., 2016).

Figura 3. Árvore filogenética de seqüências de fungos da ordem Eurotiales isolados de ambiente aquáticos da Amazônia e seus parentes mais próximos.



Foram identificados sete isolados da ordem Diaporthales, três prováveis espécies novas do gênero *Cytospora*, uma espécie do gênero *Chrysosporthe* e três do gênero *Diaporthe*, sendo duas espécies *D. ueckerae* e uma provável espécie nova (Figura 4). A ordem Diaporthales inclui 27 famílias com cerca de 138 gêneros (Senanayake et al., 2018), compreendendo fungos fitopatogênicos, sapróbios e endofíticos. Têm distribuição cosmopolita e alta diversidade com morfologias distintas (Senanayake et al., 2017), entretanto, as características morfológicas são complexas e não necessariamente informativas do ponto de vista taxonômico, sendo necessário o uso de dados moleculares para a correta determinação taxonômica (Hyde et al., 2014; Senanayake et al., 2018).

Material Suplementar Figura 4. Árvore filogenética de sequências de fungos da ordem Diaporthales isolados de ambiente aquáticos da Amazônia e seus parentes mais próximos.

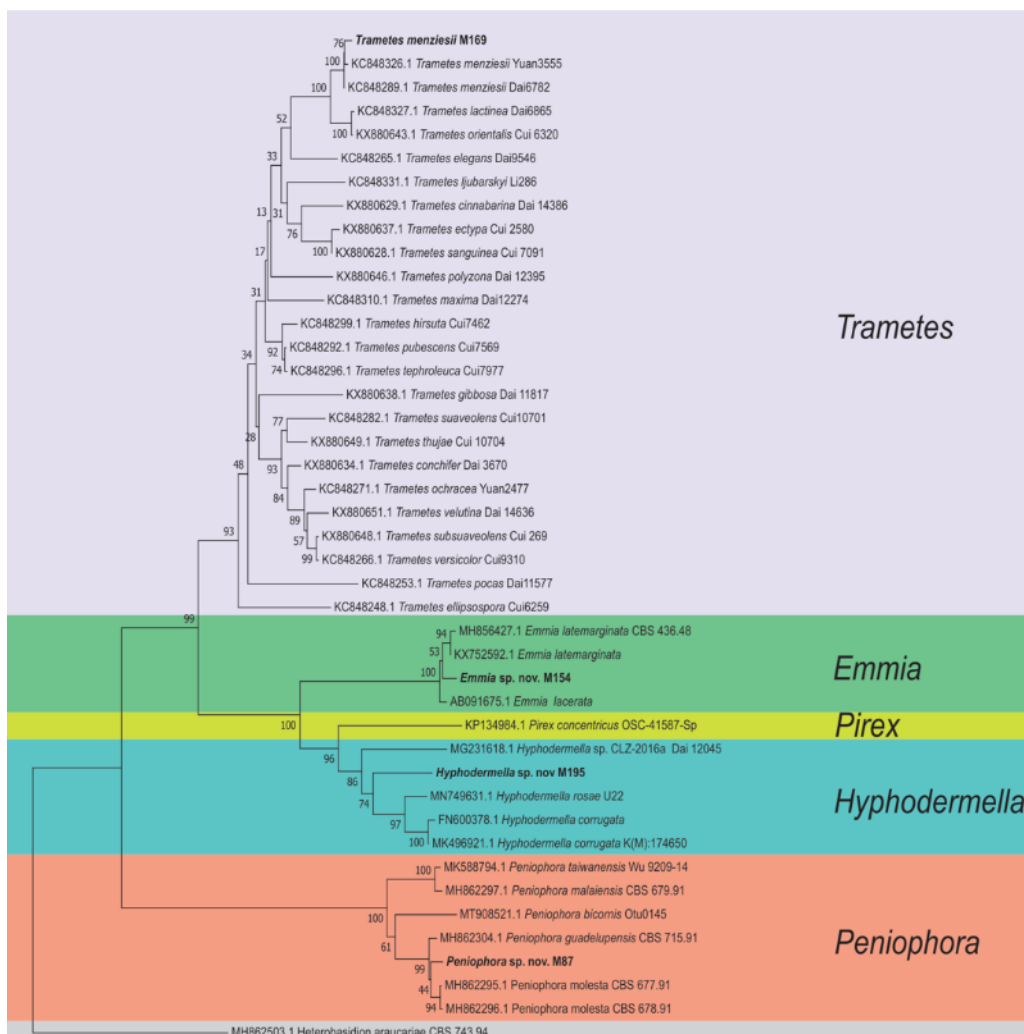


Foram identificados três isolados de diferentes gêneros da ordem Polyporales. As espécies identificadas foram: *Trametes menziesii* e duas prováveis espécies novas, sendo uma de gênero *Emmia* e outra pertencente ao gênero *Hyphodermella* (Figura 5). A ordem Polyporales é grande e altamente diversificada, representando 1.5% de todas as espécies de fungos descritos e são amplamente distribuídos em áreas boreais, temperadas, tropicais e subtropicais (Kirk et al., 2009; Hage et al., 2021). Fungos desta ordem são especificados para decomposição de madeira morta e detritos lenhosos e, portanto, são

atores cruciais na degradação da matéria orgânica e na ciclagem do carbono (Shen et al., 2019). Tian et al., (2018), ressalta que fungos Polyporales podem ser introduzidos em ambientes aquáticos por meio do vento e água da chuva. Desta forma, de acordo com Copot et al., (2019), a ampla distribuição de algumas espécies de fungos é devido à grande capacidade de dispersão de esporos.

Um isolado foi identificado como uma provável espécie nova de *Peniophora*, pertencente a ordem Russulales (Figura 5). Esta ordem é bem conhecida, contém cogumelos morfológicamente diversos, compreende cerca de 12 famílias e aproximadamente 80 gêneros (Miller et al., 2006). Seus fungos, têm diferentes estilos de vida, incluindo saprotrófico, ectomicorrízico, parasita de raízes e simbiótico de inseto (Gou et al., 2021). Para a identificação de fungos desta ordem são necessários a combinação de dados morfológicos e moleculares, entretanto devido à baixa amostragem de fungos, ainda há poucos dados moleculares em comparação com a diversidade presente na ordem (Zhou et al., 2013). Ressaltando, desta forma, a necessidade documentar dados morfológicos e principalmente moleculares de espécies de fungos desta ordem.

Figura 5. Árvore filogenética de sequências de fungos das ordens Polyporales e Russulales isolados de ambiente aquáticos da Amazônia e seus parentes mais próximos.



Foram identificados 14 isolados pertencentes a seis gêneros (*Epicoccum*, *Hongkongmyces*, *Microsphaeropsis*, *Nigrograna*, *Paraconiothyrium* e *Pyrenochaetopsis*) da ordem Pleosporales, destes, sugerimos quatro prováveis espécies novas, sendo uma espécie de *Hongkongmyces*, uma espécie de *Pyrenochaetopsis* e duas espécies de *Paraconiothyrium* (Figura 6 e 7). Pleosporales é a maior e mais diversa ordem dentro dos *Dothideomycetes* (Ascomycota), com cerca de 64 famílias e aproximadamente 400 gêneros (Bhunjun et al., 2021). Espécies desta ordem são onipresentes, ocorrendo em habitats terrestres, marinhos e de água doce (Zhang et al., 2009; Ariyawansa et al., 2020) e podem ser reconhecidos como epífitas, endófitos ou parasitas de folhas ou caules, hiperparasitas em fungos ou insetos, liquenizados ou sapróbios de caules, folhas ou cascas de plantas mortas (Zang et al., 2012; Hyde et al., 2013; Ariyawansa et al., 2014; Bhunjun et al., 2021). Devido ao acréscimo de um grande número de famílias relatadas de vários

habitats e com grande variação morfológica, para a classificação de fungos pertencentes a esta ordem são considerados os dados morfológicos e filogenéticos (Ariyawansa et al., 2018). Além disso, de acordo com Bhunjun et al., (2021), a descrição de novos táxons, não é surpreendente, uma vez que uma grande diversidade de fungos permanece desconhecidos para a ciência.

Figura 6. Árvore filogenética de seqüências de fungos do gênero *Epicoccum* da ordem Pleosporales isolados de ambiente aquáticos da Amazônia e seus parentes mais próximos

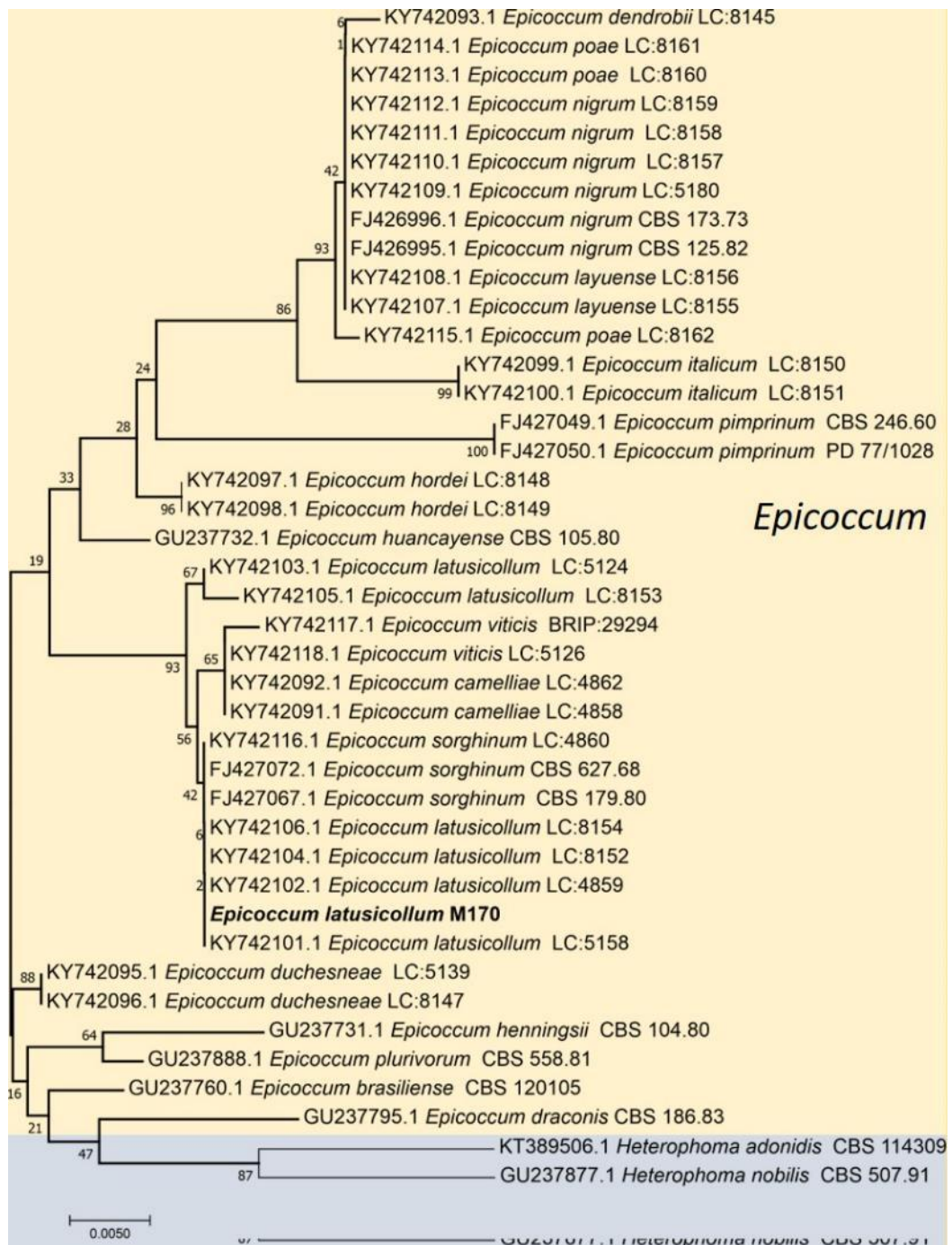
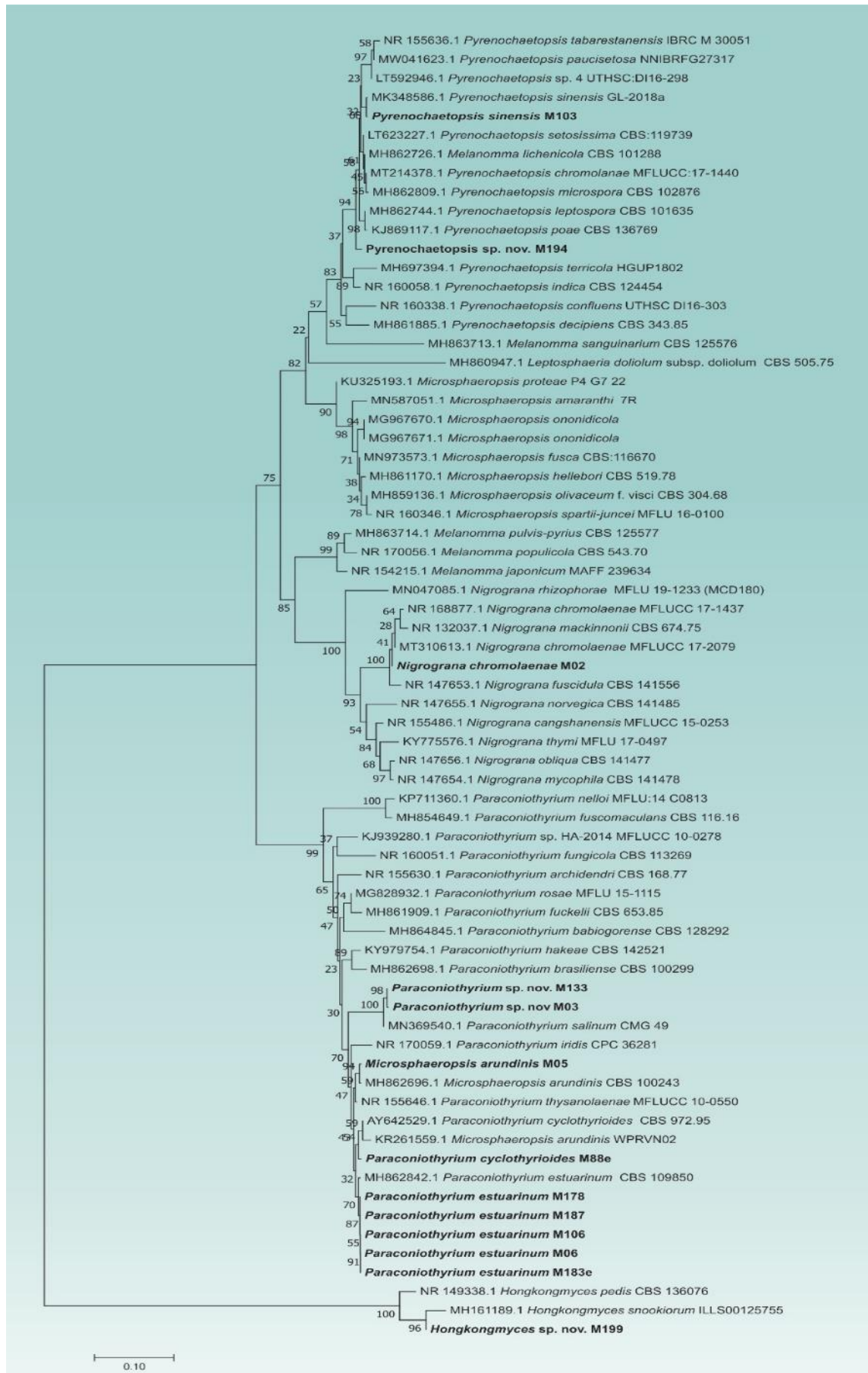
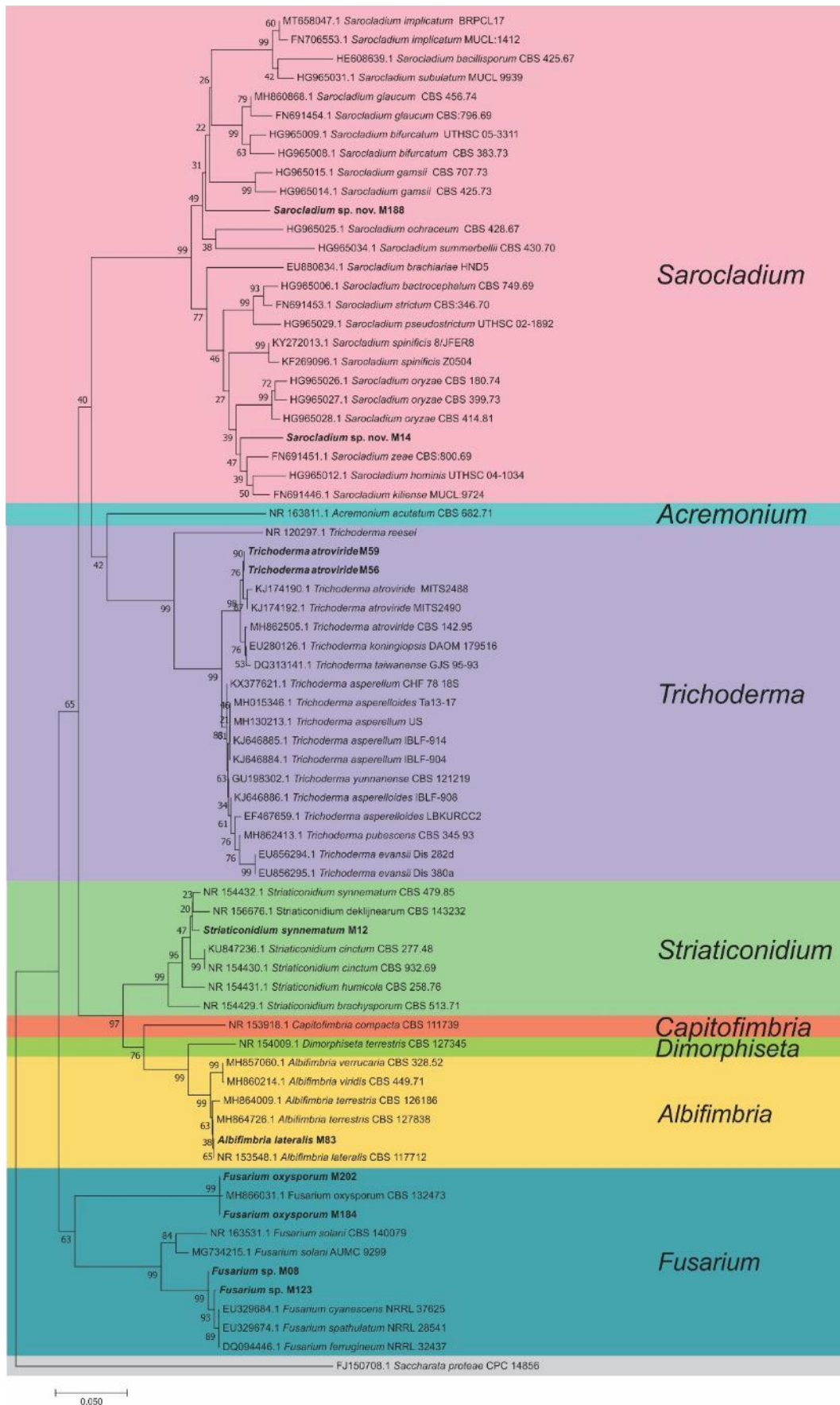


Figura 7. Árvore filogenética de sequências de fungos da ordem Pleosporales isolados de ambiente aquáticos da Amazônia e seus parentes mais próximos.



Dez isolados fúngicos pertencentes a cinco gêneros (*Albifimbria*, *Fusarium*, *Sarocladium*, *Striaticonidium* e *Trichoderma*) da ordem Hypocreales foram identificados. Destes, foram identificadas as espécies *Albifimbria lateralis* (1 isolado), *Fusarium oxysporum* (2 isolados), *Fusarium* sp. (2 isolados), *Striaticonidium synnematum* (1 isolado), *Trichoderma atroviride* (2 isolados) e duas possíveis espécies novas de *Sarocladium* (Figura 8). A ordem Hypocreales inclui cerca de 240 gêneros divididos em 12 famílias (Zeng et al., 2020). Esses fungos são onipresentes na natureza e exibem uma grande diversidade de espécies em regiões temperadas e tropicais, e podem ser sapróbico, entomopatogênico e micoparasítico (Rossman et al. 1999). Eles são economicamente importantes nos campos da indústria, proteção do meio ambiente, agricultura que têm maior aplicação em controle biológico (Islam et al., 2020; Zeng et al., 2020). Sua morfologia é diversa e as características taxonômicas desses fungos se sobrepõem dentro da ordem de Hypocreales (Driver et al., 2000; Islam et al., 2020). Entretanto, a abundância de dados moleculares disponíveis para esta ordem posiciona bem este grupo, o que torna a identificação molecular uma ferramenta precisa para identificação taxonômica (Steinwender et al., 2014; Kepler et al., 2017).

Figura 8. Árvore filogenética de sequências de fungos da ordem Hypocreales isolados de ambiente aquáticos da Amazônia e seus parentes mais próximo.

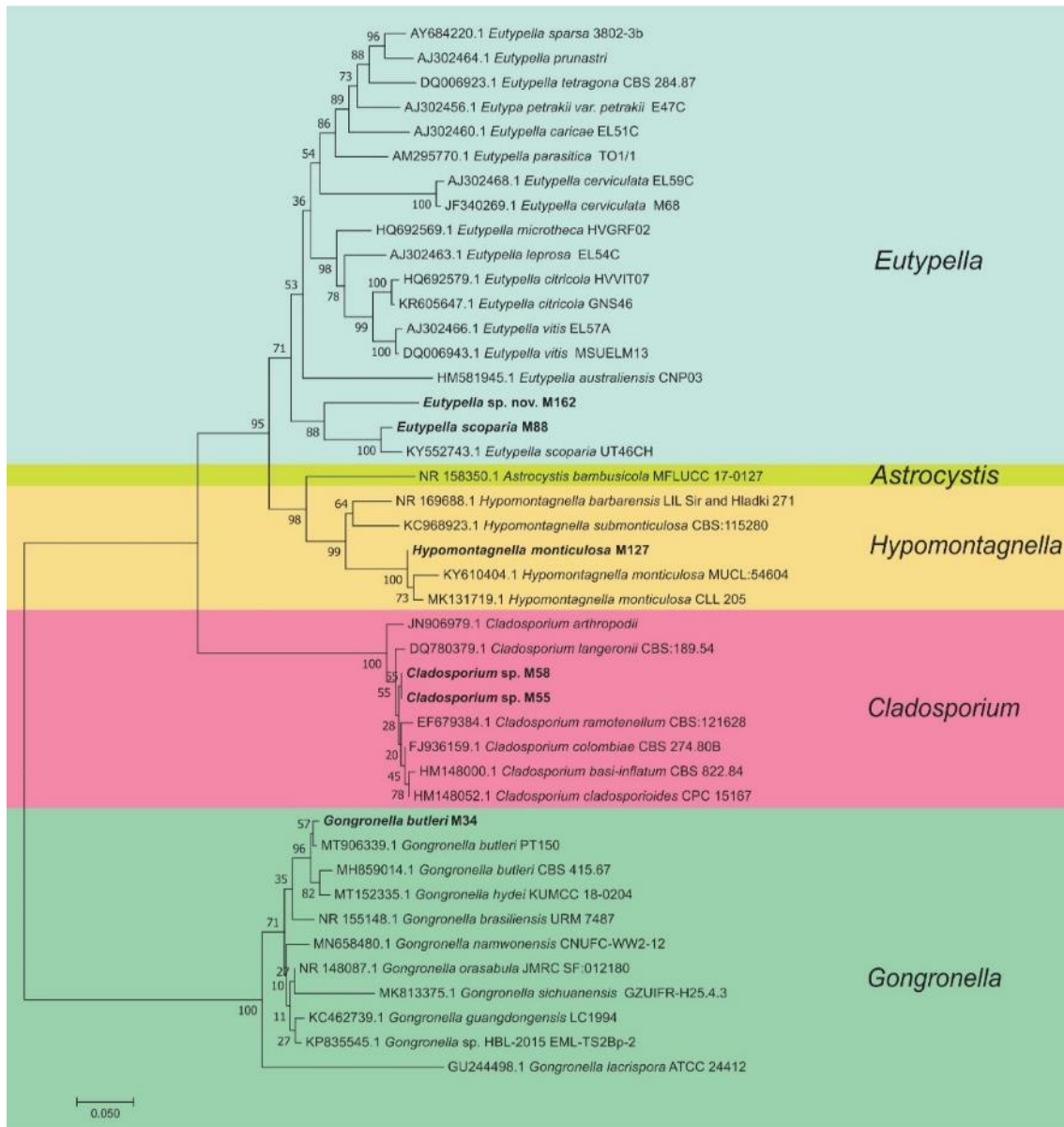


Foram identificados três isolados da ordem Xylariales, sendo uma espécie de *Hypomontagnella monticulosa*, uma espécie de *Eutypella scoparia* e uma provável espécie nova de *Eutypella* (Figura 9). Esta ordem é composta por 15 famílias e 160 gêneros (Hyde et al., 2020). Xylariales de países tropicais e subtropicais, são bem conhecidas por sua grande diversidade de espécies e riqueza de metabólitos secundários biologicamente ativos (Helaly et al., 2018). Os fungos da ordem geralmente parasitam plantas lenhosas, sendo encontrados em madeiras ou folhas, além de colonizarem excrementos de animais e a cobertura vegetal do solo de florestas (Lee et al., 2000). Alguns fungos desta ordem são considerados de difícil cultivo, desta forma, a maioria das espécies de fungos ainda não foram sequenciados e sua morfologia descrita, ressaltando importância da realização de estudos e divulgação de dados moleculares e morfológicos desses fungos (Helaly et al., 2018).

Dois isolados da ordem Cladosporiales foram identificados como *Cladosporium* sp. (Figura 9). Esta ordem foi proposta recentemente, era anteriormente tratada como Capnodiales (Abdollahzadeh et al., 2020), exibem uma gama interessante de estilos de vida, compreende espécies epífitas, endófitas, saprófitas, e também inclui fungos patogênicos para plantas, animais e humanos (Bensch et al., 2010; Iturrieta-González et al., 2021). O gênero *Cladosporium*, representa um dos maiores gêneros de hifomicetos demáceos, amplamente distribuído em diferentes habitats (Bensch et al., 2015). A diferenciação morfológica entre as espécies costuma ser confusa, sendo possível somente com o auxílio de dados moleculares para a correta identificação de espécies (Baron et al., 2021; Iturrieta-González et al., 2021).

Um isolado da ordem Mucorales, foi identificado como *Gongronella butleri* (Figura 9). A ordem Mucorales compreende espécies fúngicas saprotróficas, ubíquas e de crescimento rápido (Martins et al., 2020). Espécies de Mucorales têm um papel importante na natureza por serem decompositores primários da matéria orgânica do solo e demais substratos, contribuindo à ciclagem de nutrientes e manutenção de diversos ecossistemas (Bills et al. 2004; Lima et al., 2018). Além disso, algumas espécies podem ser parasitas e patógenas de plantas, fungos e animais (Partida-Martinez & Hertweck, 2005). As espécies de *Gongronella* são fungos de vida livre, são onipresentes e prolíficos em muitos ecossistemas (Hoffmann et al., 2013; Dong et al., 2018; Lima et al., 2018). Suas características morfológicas são altamente semelhantes o que dificulta a classificação e identificação de espécies desse gênero, sendo possível com o uso de ferramentas moleculares (Martins et al., 2020).

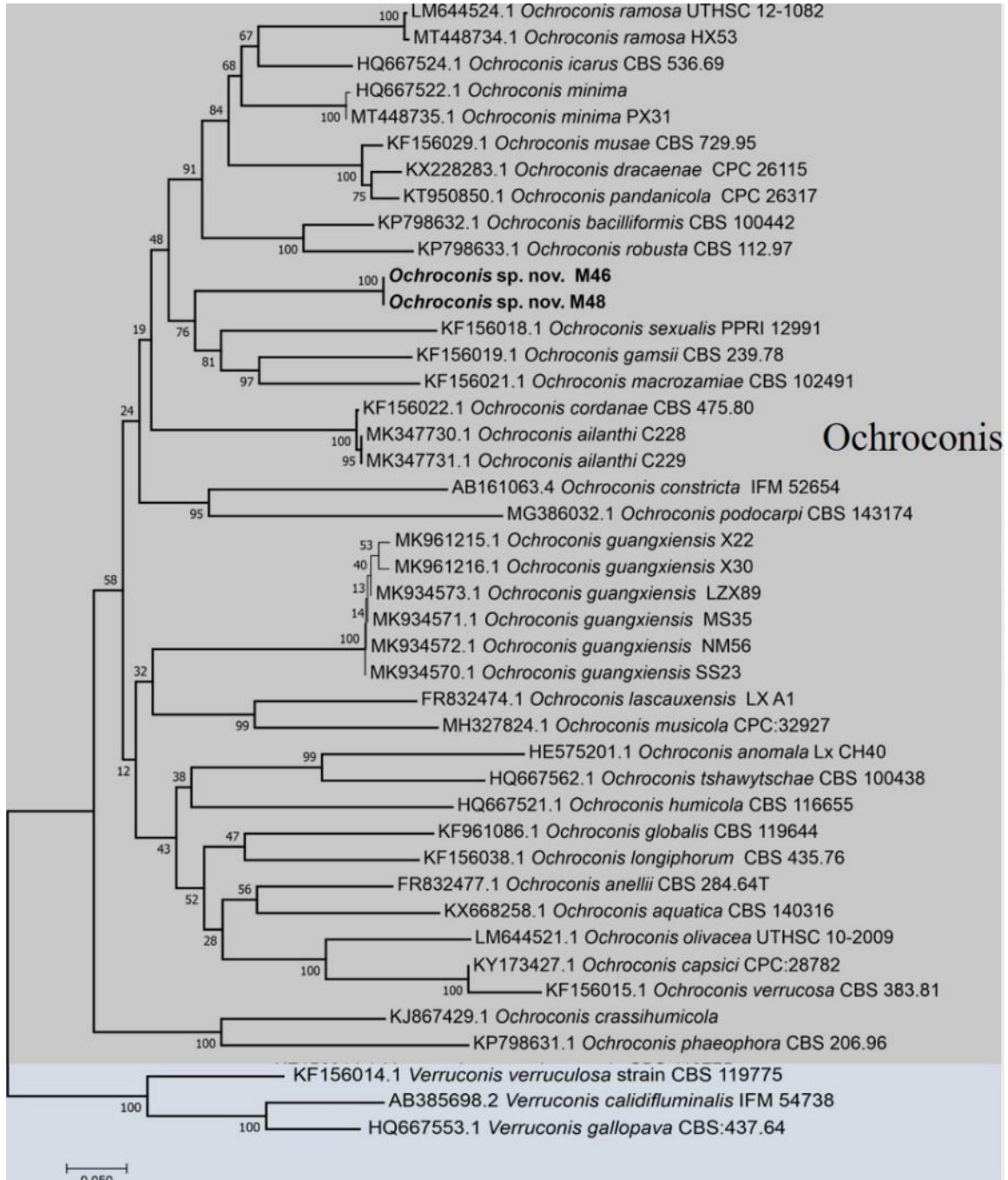
Figura 9. Árvore filogenética de sequências de fungos das ordens Xylariales, Cladosporiales e Mucorales isolados de ambiente aquáticos da Amazônia e seus parentes mais próximo.



Foram identificados dois isolados como prováveis espécies novas de *Ochroconis* da ordem Venturiales (Figura 10). Membros de Venturiales são amplamente distribuídos em áreas temperadas e tropicais do mundo, compreendem sapróbios, bem como patógenos vegetais, humanos e animais, representando 30 gêneros em três famílias na classificação atual (Shen et al., 2020). Fungos do gênero *Ochroconis* são cosmopolitas em distribuição e podem ser isolados e descritos a partir de diversas fontes (Singh et al., 2019). São fungos oportunistas que causam doenças principalmente em animais vertebrados e, ocasionalmente, em humanos (Giraldo et al., 2014). As características

morfológicas são bastante conservadoras e as regiões ITS fornecem diferenças significativas entre as espécies (Samerpitak et al., 2017; Singh et al., 2019).

Figura 10. Árvore filogenética de seqüências de fungos da ordem Venturiales isolados de ambiente aquáticos da Amazônia e seus parentes mais próximo.



Conclusão

Os resultados deste estudo fornecem dados relevantes dos fungos presentes em ambientes aquáticos da região amazônica e demonstram o potencial desse ambiente para atuar como reservatório de uma rica diversidade de espécies fúngicas, sendo esse habitat um bom candidato para a descoberta de novas espécies. No entanto, é necessário a realização de análises mais completa e detalhada das características morfológica desses fungos e uso de mais marcadores moleculares para análises filogenéticas. Desta forma, nosso estudo ressalta que para realizar a identificação taxonômica correta das espécies fúngicas, existe a necessidade do uso combinado dos dados filogenéticos e morfológicos, o uso de diferentes marcadores moleculares para melhorar a resolução dos dados filogenéticos e principalmente aumentar a descrição e divulgação de dados morfológicos e moleculares do maior número possível de fungos.

Agradecimentos

Agradecemos à Central Analítica - Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM / UFAM), à Embrapa Amazônia Ocidental (EMBRAPA) e aos técnicos do Laboratório de Malária e Dengue / INPA pela ajuda nas coletas. Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001, pelo projeto Pró-Amazônia: Biodiversidade e Sustentabilidade (processo número 23038.009442 / 2013-12).

References

- Abdollahzadeh, J., Groenewald, J. Z., Coetzee, M. P. A., Wingfield, M. J., & Crous, P. W. (2020). Evolution of lifestyles in Capnodiales. *Studies in Mycology*, 95, 381-414.
- Aprile, F., Darwich, A. J., Siqueira, G. W., Santos, F. R. R., & Miguéis, A. M. B. (2013). Application of hydrological and limnological studies on building model for water circulation of meromictic black water lakes at the Central Amazonia, Brazil. *International Research Journal of Environment Sciences*, 2(7), 58-63.
- Ariyawansa, H. A., Phillips, A. J., Chuang, W. Y., & Tsai, I. (2018). Tzeananiaceae, a new pleosporalean family associated with *Ophiocordycepsmacroacicularis* fruiting bodies in Taiwan. *MycKeys*, (37), 1.
- Ariyawansa, H. A., Tanaka, K., Thambugala, K. M., Phookamsak, R., Tian, Q., Camporesi, E., ... & Hyde, K. D. (2014). A molecular phylogenetic reappraisal of the Didymosphaeriaceae (= Montagnulaceae). *Fungal Diversity*, 68(1), 69-104.

- Ariyawansa, H. A., Tsai, I., Thambugala, K. M., Chuang, W. Y., Lin, S. R., Hozzein, W. N., & Cheewangkoon, R. (2020). Species diversity of Pleosporalean taxa associated with *Camellia sinensis* (L.) Kuntze in Taiwan. *Scientific reports*, *10*(1), 1-20.
- Bensch, K., Groenewald, J. Z., Braun, U., Dijksterhuis, J., de Jesús Yáñez-Morales, M., & Crous, P. W. (2015). Common but different: The expanding realm of *Cladosporium*. *Studies in Mycology*, *82*, 23-74.
- Bhunjun, C. S., Phukhamsakda, C., Jeewon, R., Promputtha, I., & Hyde, K. D. (2021). Integrating different lines of evidence to establish a novel Ascomycete genus and family (anastomitrabeculia, anastomitrabeculiaceae) in Pleosporales. *Journal of Fungi*, *7*(2), 94.
- Bills, G. F., & Foster, M. S. (2004). Formulae for selected materials used to isolate and study fungi and fungal allies. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*, 595-618.
- Bononi, V. L. R. (1999). *Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*. Instituto de Botânica.
- Castellani, A. (1967). Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *70*(8), 181.
- Copoț, O. V. I. D. I. U., & Tănase, C. Ǻ. T. Ǻ. L. I. N. (2019). Lignicolous fungi ecology-biotic and abiotic interactions in forest ecosystems. *Memoirs of the scientific sections of the Romanian academy*, *42*.
- Dai, Y. C., Cui, B. K., Si, J., He, S. H., Hyde, K. D., Yuan, H. S., ... & Zhou, L. W. (2015). Dynamics of the worldwide number of fungi with emphasis on fungal diversity in China. *Mycological Progress*, *14*(8), 1-9.
- Debroas, D., Domaizon, I., Humbert, J. F., Jardillier, L., Lepère, C., Oudart, A., & Taïb, N. (2017). Overview of freshwater microbial eukaryotes diversity: a first analysis of publicly available metabarcoding data. *FEMS Microbiology Ecology*, *93*(4), fix023.
- Dong, Y., Sun, Q., Zhang, Y., Wang, X., Liu, P., Xiao, Y., & Fang, Z. (2018). Complete genome of *Gongronella* sp. w5 provides insight into its relationship with plant. *Journal of biotechnology*, *286*, 1-4.
- Driver, F., Milner, R. J., & Trueman, J. W. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological research*, *104*(2), 134-150.
- Dugan, F. M., & Dugan, F. M. (2006). *The identification of fungi: an illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature*.
- Forzza, R. C., Leitman, P. M., Costa, A., Carvalho Jr, A. A. D., Peixoto, A. L., Walter, B. M. T., ... & Souza, V. C. (2010). *Catálogo de plantas e fungos do Brasil-Vol. 2*. JBRJ.

- Ghai, R., Rodríguez-Valera, F., McMahon, K. D., Toyama, D., Rinke, R., Cristina Souza de Oliveira, T., ... & Henrique-Silva, F. (2011). Metagenomics of the water column in the pristine upper course of the Amazon river. *PLoS one*, 6(8), e23785.
- Giraldo, A., Sutton, D. A., Samerpitak, K., De Hoog, G. S., Wiederhold, N. P., Guarro, J., & Gené, J. (2014). Occurrence of *Ochroconis* and *Verruconis* species in clinical specimens from the United States. *Journal of clinical microbiology*, 52(12), 4189-4201.
- Gou, Q., Ren, C., & Peng, C. (2021). Characterization of the complete mitochondrial genome of *Peniophora lycii* (Russulales: Peniophoraceae) with its phylogenetic analysis. *Mitochondrial DNA Part B*, 6(8), 2200-2202.
- Grossart, H. P., Van den Wyngaert, S., Kagami, M., Wurzbacher, C., Cunliffe, M., & Rojas-Jimenez, K. (2019). Fungi in aquatic ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 17(6), 339-354.
- Hage, H., Miyauchi, S., Virágh, M., Drula, E., Min, B., Chaduli, D., ... & Rosso, M. N. (2021). Gene family expansions and transcriptome signatures uncover fungal adaptations to wood decay. *Environmental Microbiology*.
- Hanlin, R. T. (1997). *Illustrated Genera of Ascomycetes*. Vol. 1. St. Paul.
- Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C., & Pegler, D. N. (1995). Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*, 38, 272-272.
- Helaly, S. E., Thongbai, B., & Stadler, M. (2018). Diversity of biologically active secondary metabolites from endophytic and saprotrophic fungi of the ascomycete order Xylariales. *Natural product reports*, 35(9), 992-1014.
- Heo, I., Hong, K., Yang, H., Lee, H. B., Choi, Y. J., & Hong, S. B. (2019). Diversity of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species isolated from freshwater environments in Korea. *Mycobiology*, 47(1), 12-19.
- Hoffmann, K., Pawłowska, J., Walther, G., Wrzosek, M., De Hoog, G. S., Benny, G. L., ... & Voigt, K. (2013). The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 30, 57.
- Hyde, K. D. (2020). Refined families of Sordariomycetes.
- Hyde, K. D., Jones, E. G., Liu, J. K., Ariyawansa, H., Boehm, E., Boonmee, S., ... & Zhang, M. (2013). Families of dothideomycetes. *Fungal diversity*, 63(1), 1-313.
- Hyde, K. D., Nilsson, R. H., Alias, S. A., Ariyawansa, H. A., Blair, J. E., Cai, L., ... & Zhou, N. (2014). One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I (2014). *Fungal Diversity*, 67(1), 21-125.

- Islam, S. M. N., Haque, M. A., Chowdhury, M. Z. H., Mishu, N. J., & Hossain, M. M. (2020). A Hypocrealean Fungus *Penicillifer diparietisporus*, First Reported in Bangladesh. *Bangladesh J. Sci. Res*, 31-33.
- Iturrieta-González, I., García, D., & Gené, J. (2021). Novel species of *Cladosporium* from environmental sources in Spain. *MycKeys*, 77, 1.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780.
- Kepler, R. M., Luangsa-Ard, J. J., Hywel-Jones, N. L., Quandt, C. A., Sung, G. H., Rehner, S. A., ... & Shrestha, B. (2017). A phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). *IMA fungus*, 8(2), 335-353.
- Kirk, P., Cannon, P., Minter, D., & Stalpers, J. (2009). Dictionary of the fungi. *Mycological Research*, 113(1), 908–910.
- Kõljalg, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F., Bahram, M., ... & Larsson, K. H. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Lee, J. Y., Woo, R. M., Choi, C. J., Shin, T. Y., Gwak, W. S., & Woo, S. D. (2019). *Beauveria bassiana* for the simultaneous control of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* mosquito adults shows high conidia persistence and productivity. *AMB Express*, 9(1), 1-9.
- Lepère, C., Domaizon, I., Humbert, J. F., Jardillier, L., Hugoni, M., & Debroas, D. (2019). Diversity, spatial distribution and activity of fungi in freshwater ecosystems. *PeerJ*, 7, e6247.
- Lima, D. X., Cordeiro, T. R. L., de Souza, C. A. F., Santiago, A. D. A., & Souza-Motta, C. M. (2018). Diversity of basal fungal order Mucorales (Mucoromycota) in a remaining area of the Brazilian Atlantic Rainforest. *Nova Hedwigia*, 107(3/4), 459-471.
- Liu, N. G., Ariyawansa, H. A., Hyde, K. D., Maharachchikumbura, S. S. N., Zhao, R. L., Phillips, A. J. L., ... & Jumpathong, J. (2016). Perspectives into the value of genera, families and orders in classification. *Mycosphere*, 7, 1649-1668.
- Lücking, R., Truong, B. V., Huong, D. T. T., Le, N. H., Nguyen, Q. D., Nguyen, V. D., ... & Di Vincenzo, V. (2020). Caveats of fungal barcoding: a case study in *Trametes s. lat.* (Basidiomycota: Polyporales) in Vietnam reveals multiple issues with mislabelled reference sequences and calls for third-party annotations. *Willdenowia*, 50(3), 383-403.

- Martins, M. R., Santos, C., Soares, C., Santos, C., & Lima, N. (2020). *Gongronella eborensis* sp. nov., from vineyard soil of Alentejo (Portugal). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(5), 3475-3482.
- Miller, S. L., Larsson, E., Larsson, K. H., Verbeken, A., & Nuytinck, J. (2006). Perspectives in the new Russulales. *Mycologia*, 98(6), 960-970.
- Partida-Martinez, L. P., & Hertweck, C. (2005). Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature*, 437(7060), 884-888.
- Rossmann, A. Y., Samuels, G. J., Rogerson, C. T., & Lowen, R. (1999). *Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes)* (No. 42). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
- Samerpitak, K., Gloyna, K., & de Hoog, G. S. (2017). A novel species of the oligotrophic genus *Ochroconis* colonizing indoor wet cells. *Mycoscience*, 58(4), 290-296.
- Schafhauser, T., Kirchner, N., Kulik, A., Huijbers, M. M., Flor, L., Caradec, T., ... & van Pée, K. H. (2016). The cyclochlorotine mycotoxin is produced by the nonribosomal peptide synthetase CctN in *Talaromyces islandicus* ('*Penicillium islandicum*'). *Environmental microbiology*, 18(11), 3728-3741.
- Senanayake, I. C., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Maharachchikumbura, S. S., Jeewon, R., Phillips, A. J., ... & Hyde, K. D. (2017). Families of Diaporthales based on morphological and phylogenetic evidence. *Studies in Mycology*, 86, 217-296.
- Senanayake, I. C., Jeewon, R., Chomnunti, P., Wanasinghe, D. N., Norphanphoun, C., Karunarathna, A., ... & Karunarathna, S. C. (2018). Taxonomic circumscription of Diaporthales based on multigene phylogeny and morphology. *Fungal Diversity*, 93(1), 241-443.
- Shearer, C. A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J., Marvanová, L., Padgett, D., ... & Voglymayr, H. (2007). Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 49-67.
- Shen, D., Nyawira, K. T., & Xia, A. (2020). New discoveries and applications of mosquito fungal pathogens. *Current Opinion in Insect Science*.
- Shen, L. L., Wang, M., Zhou, J. L., Xing, J. H., Cui, B. K., & Dai, Y. C. (2019). Taxonomy and phylogeny of *Postia*. Multi-gene phylogeny and taxonomy of the brown-rot fungi: *Postia* (Polyporales, Basidiomycota) and related genera. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 42, 101.
- Singh, A., Singh, N. K., Singh, P. N., Singh, R., & Dubey, N. K. (2019). Additions to *Ochroconis* from India. *Phytotaxa*, 427(3), 186-199.
- Souza, A. Q. L., de Souza, A. D. L., Astolffi Filho, S., Belém Pinheiro, M. L., de Moura Sarquis, M. I., & Pereira, J. O. (2004). Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from amazonian toxic plants: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich and *Strychnos cogens* bentham. *Acta amazônica*, 34(2), 185-196.

- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, *30*(9), 1312-1313.
- Steinwender, B. M., Enkerli, J., Widmer, F., Eilenberg, J., Thorup-Kristensen, K., & Meyling, N. V. (2014). Molecular diversity of the entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within an agroecosystem. *Journal of invertebrate pathology*, *123*, 6-12.
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Iamanaka, B. T., Massi, F. P., Fungaro, M. H. P., & Frisvad, J. C. (2015). *Penicillium excelsum* sp. nov from the Brazil Nut Tree Ecosystem in the Amazon Basin'. *PLoS One*, *10*(12), e0143189.
- Tian, J., Zhu, D., Wang, J., Wu, B., Hussain, M., & Liu, X. (2018). Environmental factors driving fungal distribution in freshwater lake sediments across the Headwater Region of the Yellow River, China. *Scientific reports*, *8*(1), 1-8.
- Wainwright, B. J., Bauman, A. G., Zahn, G. L., Todd, P. A., & Huang, D. (2019). Characterization of fungal biodiversity and communities associated with the reef macroalga *Sargassum ilicifolium* reveals fungal community differentiation according to geographic locality and algal structure. *Marine Biodiversity*, *49*(6), 2601-2608.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, *18*(1), 315-322.
- Wurzbacher, C., Warthmann, N., Bourne, E. C., Attermeyer, K., Allgaier, M., Powell, J. R., ... & Monaghan, M. T. (2016). High habitat-specificity in fungal communities in oligo-mesotrophic, temperate Lake Stechlin (North-East Germany). *MycKeys*, *(16)*, 17-44.
- Zeng, Z. Q., Zheng, H. D., Wang, X. C., Wei, S. L., & Zhuang, W. Y. (2020). Ascomycetes from the Qilian Mountains, China—Hypocreales. *MycKeys*, *71*, 119.
- Zhang, Y., Crous, P. W., Schoch, C. L., & Hyde, K. D. (2012). Pleosporales. *Fungal diversity*, *53*(1), 1-221.
- Zhou, L. W., & Dai, Y. C. (2013). Taxonomy and phylogeny of wood-inhabiting hydroid species in Russulales: two new genera, three new species and two new combinations. *Mycologia*, *105*(3), 636-649.

7. CAPÍTULO III

Extracts of Amazonian fungi with larvicidal activities against *Aedes aegypti*²

Marta Rodrigues de Oliveira, Ricardo de Melo Katak, Gilvan Ferreira da Silva, Osvaldo Marinotti, Olle Terenius, Wanderli Pedro Tadei, Afonso Duarte Leão de Souza, Antonia Queiroz Lima de Souza.

Este capítulo apresenta o estudo de linhagens fúngicas isoladas de ambientes aquáticos no estado do Amazonas, produtoras de metabólitos com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. Foram estudados extratos brutos de 36 fungos, 15 extratos fúngicos do meio líquido de cultivo apresentaram atividade larvicida igual ou superior a 50% e, destes, oito conseguiram matar mais de 90% das larvas em até 72 h, demonstrando alto potencial larvicida. Nossos resultados mostraram claramente que as larvas de *Ae. aegypti* foram suscetíveis aos extratos de meio líquido produzidos pelos fungos estudados. Essas descobertas são úteis para o desenvolvimento potencial de novos larvicidas naturais como agentes de controle do *Ae. aegypti*.

² Artigo submetido à revista *Frontiers in Microbiology* (ISSN 1664-302X).

Extracts of Amazonian fungi with larvicidal activities against

Aedes aegypti

Marta Rodrigues de Oliveira^{1*}; Ricardo de Melo Katak²; Gilvan Ferreira da Silva³; Osvaldo Marinotti⁴; Olle Terenius⁵; Wanderli Pedro Tadei^{1, 2, 6, †}; Afonso Duarte Leão de Souza^{1, 7, 8}; Antonia Queiroz Lima de Souza^{1, 7, 9*}.

¹ Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (PPG-BIONORTE), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 69065-001, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas - PPGBIOTEC/UFAM, Manaus, AM, 69080-900, Brazil.

³ Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, 69010-970, Brazil.

⁴ MTEKPrime, Aliso Viejo California, USA.

⁵ Department of Cell and Molecular Biology, Microbiology, Uppsala University, Uppsala, Sweden.

⁶ Laboratório de Malária e Dengue, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM, 69011-970, Brazil.

⁷ Central Analítica - Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69077-000, Brazil.

⁸ Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 69077-000, Brazil.

⁹ Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 69077-000, Brazil.

[†] in memoriam

*** Correspondence:**

Antonia Queiroz Lima de Souza

antoniaqueiroz@ufam.edu.br

Marta Rodrigues de Oliveira

moliveirabiotec@gmail.com

Keywords: biological control, arbovirus, *Aedes aegypti*, larvicidal activity, metabolites.

Abstract

The global increase in diseases transmitted by the vector *Aedes aegypti*, new and re-emerging, underscores the need for alternative and more effective methods of controlling mosquitoes. Our aim was to identify fungal strains from the Amazon rain forest that produce metabolites with larvicidal activity against *Aedes aegypti*. Thirty-six fungal strains belonging to 23 different genera of fungi, isolated from water samples collected in the state of Amazonas, Brazil were cultivated. The liquid medium was separated from the mycelium by filtration. Medium fractions were extracted with ethyl acetate and isopropanol 9:1 volume: volume, and the mycelia with ethyl acetate and methanol 1:1. The extracts were vacuum dried and the larvicidal activity was evaluated in selective bioassays containing 500 µg/ml of the dried fungal extracts. Larval mortality was evaluated up to 72 h. None of the mycelium extracts showed larvicidal activity greater

than 50% at 72 h. In contrast, 15 culture medium extracts had larvicidal activity equal to or greater than 50% and eight killed more than 90% of the larvae within 72 h. These eight extracts from fungi belonging to seven different genera (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Diaporthe*, *Albifimbria*, *Emmia* and *Serocladium*) were selected for the determination of LC₅₀ and LC₉₀. *Albifimbria lateralis* (1160) medium extracts presented the lowest LC₅₀ value (0.268 µg/ml) after 24 h exposure. *Diaporthe ueckerae* (1203) medium extracts presented the lowest value of LC₉₀ (2.928 µg/ml) at 24 h, the lowest values of LC₅₀ (0.108 µg/ml) and LC₉₀ (0.894 µg/ml) at 48 h and also at 72 h (LC₅₀ = 0.062 µg/ml and LC₉₀ = 0.476 µg/ml). Extracts from *Al. lateralis* (1160) and *D. ueckerae* (1203) showed potential for developing new, naturally derived products, to be applied in integrated vector management programs against *Ae. aegypti*.

1 Introduction

Aedes aegypti mosquitoes are the main vectors of arboviruses such as those that cause dengue, chikungunya and Zika illnesses (Consoli and Oliveira, 1994; Bitencourt et al., 2021). These diseases have occupied a prominent position in public health in several countries of the Americas, including Brazil where the occurrence of all these arboviruses has been recorded simultaneously since 2015 (Saúde and Saúde, 2016).

In 2014, chikungunya fever was first recorded in Brazil and spread rapidly throughout the country (Araújo et al., 2020). A short time later, Zika virus was detected in northeastern Brazil in 2015 (Possas et al., 2017). In 2016, the country reached a peak of cases, with more than 215 thousand estimated cases of Zika (Saúde and Saúde, 2018), which resulted in thousands of cases of neonatal microcephaly (Zanotto and Leite, 2018). Dengue is characterized as one of the main arboviruses with worldwide outbreaks occurring in the Americas, Africa, the Middle East, Asia, and the Pacific Islands. About 3.9 billion people in 129 countries are at risk of infection by the dengue virus, a notable increase from previous decades, partially explained by the improvement of records and recognition of the disease burden by governments (WHO, 2020). According to the Pan American Health Organization, the highest number of dengue cases ever reported globally was in 2019. Brazil alone reported about 2.2 million cases in 2019, representing 70% of the total recorded in the Americas (PAHO, 2020).

Since specific antiviral drugs and effective vaccines against these arboviruses are not available, measures to curb the transmission of these diseases remain focused on vector control, mostly through the elimination of breeding sites and the use of chemical insecticides (Zara et al., 2016). However, the frequent use of chemical insecticides is toxic to the environment and has resulted in the selection of insecticide-resistant mosquito

populations (Seetharaman et al., 2018; Araújo et al., 2020). It is therefore urgently necessary to explore new approaches to control these vectors.

Fungal secondary metabolites constitute a rich source of bioactive molecules (Daniel et al., 2017), potentially useful for mosquito control. More specifically, fungi isolated from aquatic habitats are a rich and unexplored source of new natural products. In order to adapt and survive in the aquatic environment, fungi accumulate unique bioactive secondary metabolites, not found in terrestrial environments (Imhoff, 2016; Bhakuni and Rawat, 2006).

In this work, we explored the larvicidal potential of the fungi isolated from the aquatic environments of the Amazon region. Our results suggest the possibility of utilizing fungi-derived extracts and/or their metabolites as part of integrated vector management programs.

2 Materials and Methods

2.1 Production of the fungal extracts

Fungi isolation and identification - Thirty-six fungi were isolated from water samples collected in the municipalities of Coari (muddy water) and São Gabriel da Cachoeira (black water), in the state of Amazonas, Brazil, using standard microbiological techniques. Water samples were collected at the following four sites: a) Coari/C1 – dam (4° 06' 43.7" S 63° 07' 43.6" W), b) Coari/C2 – natural lake (4° 06' 56.6" S 63° 08' 34.4" W), c) São Gabriel da Cachoeira/S3 – fish farm (0° 6' 54.873" S 67° 5' 12.859" W) and d) São Gabriel da Cachoeira/S4 – natural lake (0° 7' 6.866" S 67° 4' 24.576" W). Isolated fungi were preserved in glycerol 20%, at –80 °C and stored in the collection of microorganisms of the Laboratory of Bioassays and Microorganisms of the Amazon at

the Federal University of Amazonas (LabMicrA/UFAM). All fungi were registered in the Brazilian National System of Genetic Heritage Management and Associated Traditional Knowledge (SisGen) under the number AD64E07. The fungal strains were identified according to their unique deposit code in the LabMicrA/UFAM collection. Taxonomic identification of the strains was carried out in a previous study (Oliveira, 2021) and was based on the DNA sequences of the internal transcribed spacer region (ITS2) and macro- and micro morphological characters (Hanlin and Ulloa, 1988; Hawksworth et al., 1995; Dugan, 2006).

Fungal extract preparation -Each strain was first inoculated in Petri dishes containing a PDA + L semi-solid culture medium (200 g/l potato, 20 g/l dextrose and 15 g/l agar and 2 g/l yeast extract). Three fragments of the mycelium of the fungi (three-point inoculation) were sown at equidistant points and cultivated at 26 °C for eight days to confirm the purity of the preserved samples. Then a single fragment of each fungus was transferred into a new Petri dish (central point) containing the PDA + L medium and grown under the same conditions used previously. Then, five fragments of 1 cm² of each fungus were inoculated in 300 ml of PD+L liquid culture medium (200 g/l potato, 20 g/l dextrose and 2 g/l yeast extract) under sterile conditions (Souza et al., 2004). The samples were prepared in quintuplicate, including the media control and kept in static mode at 26 °C in the absence of light.

Glucose and pH measurements of all samples were carried out every three days using test strips (Uriclin 10). The optimal time of cultivation of each strain was established as the time needed for total consumption of the glucose provided in the fresh medium. The cultured liquid medium was then vacuum filtered (Filterflux[®]) and separated from the mycelium. The culture liquid was totaled to a final volume of 1.1 l for each fungus. Extracted in a separating funnel with a mixture of ethyl acetate (AcOEt) and isopropanol

(iPr-OH) 9:1 volume/volume (v/v) three times, using 300 ml of the solvent mixture for each extraction.

The mycelium fraction was soaked with a mixture of methanol (MeOH) and AcOEt 1:1 (v/v) for 48 h and was then filtered to obtain the extract. The mycelium was extracted twice more for 24 h and the extracts were collected. All the extracts obtained were concentrated in a rotary evaporator (Tecnal[®]), under reduced pressure with a vacuum pump and at 45 °C. Dried extracts were weighed and stored in a desiccator with activated silica.

2.2 Rearing *Aedes aegypti*

Field collected *Aedes aegypti* eggs (F0) (Manaus, Brazil, February 2018) were placed in containers with water for hatching. The larvae were reared in a plastic tray containing distilled water, and the water was changed every two days. The larvae were fed daily with a mixture of rat food (Teklad Global 18%) and cat food (Whiskas[®]) at a ratio of 1:1 until they reached the pupal stage and were then transferred to plastic cups containing 50 ml of water, which were placed in mosquito rearing cages (30 cm × 30 cm × 30 cm) for the emergence of adult mosquitoes. *Aedes aegypti* taxonomic identification was confirmed by morphological examination of the emerging adults.

Adults were fed with 10% sucrose solution soaked in cotton balls and, twice a week, the females were fed with blood by placing anesthetized hamsters (*Mesocricetus auratus*) on top of the entomological cage for 30 min, according to the protocol authorized by the Ethics Committee for the Use of Animals - CEUA (CEUA, opinion No. 054/2018). Plastic cups with 100 ml of water with partially immersed strip of filter paper were available for egg laying. The paper strips with laid eggs (F1) were dried for 2-3 days then placed in distilled water for hatching. The hatched larvae were again maintained in the

same way as described before. Third instar larvae of the second generation (F2) were used for the larvicidal bioassays. All mosquitoes were kept under controlled conditions of temperature of 26 ± 2 °C and relative humidity of $75 \pm 5\%$, with a photoperiod of 12:12 h (light/dark), as recommended by the WHO (2005).

2.3 Larvicidal bioassays

The selective and quantitative bioassays followed the criteria established by Dulmage et al. (1990) and the WHO (2005) with minor modifications. All bioassays were conducted under temperature, humidity, and photoperiod-controlled conditions, as previously mentioned.

Selective bioassays were performed in triplicate using 50 ml plastic cups containing 10 ml of distilled water, ten 3rd instar larvae, powdered rat food (Teklad Global 18%) and 500 µg/ml of the fungal extract. All tested samples were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO; Thermo Scientific). Mortality readings were recorded at 24, 48 and 72 h after exposure to the fungal extracts (Danga et al., 2014). The extracts that presented mortality equal to or greater than 90% in the selective bioassay were chosen to perform quantitative bioassays and determine lethal concentrations able to kill 50% (LC₅₀) or 90% of the larvae (LC₉₀).

To determine LC₅₀ and LC₉₀ values, larvae were exposed to eight different concentrations of the fungal extracts, ranging from 0.01 to 250 µg/ml. Each concentration was tested in quintuplicate with three repetitions. All assays were conducted in plastic cups with a capacity of 110 ml, containing 20 ml of distilled water, powdered food, twenty 3rd instar larvae and the quantity corresponding to each concentration of fungal extract tested. DMSO as the negative control and Temephos (Pestanal® Sigma-Aldrich) as the positive control were used at the same concentrations as the extracts. DMSO (maximum volume

of DMSO in the assay - 0.1 ml) did not cause mortality in any of the tested concentrations and Temephos (500 µg/ml) killed 100% of the larvae in the selective bioassay.

2.4 Statistical analysis

The mortality data obtained in the bioassays were submitted to Probit analysis $p \leq 0.05$ (Finney, 1952), using the statistical software Polo Plus (LeOra Software, CA, USA; Haddad, 1998). Lethal concentrations and the confidence interval (95% CI) were calculated using the Lilliefors normality test (K), analysis of variance (ANOVA), a multiple comparison test ($p \leq 0.05$) and the Student's t test using Biostat 5.3 for Windows software (Ayres et al., 2007).

3 Results

In this study, 36 isolates belonging to 23 genera of fungi were analyzed regarding their ability to produce mosquito larvicidal compounds. Extracts from isolated strain were obtained from both mycelium and culture liquid medium fractions of the cultures. The growth time of the fungi until no glucose was detected in the medium ranged from 17 to 85 days. The pH of the cultures ranged from 6 to 7.5 in comparison to the pH of 5.5 in the control (non-inoculated medium). The extracts obtained from the liquid medium presented yielded between 82 and 724 mg, after extraction and drying procedures. Mycelium extracts from fungi strains 1132 and 1126 yielded 256 and 5872 mg, respectively, being the lowest and the highest obtained values (**Table 1**).

Seven mycelium extracts originating from fungi belonging to six genera (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Diaporthe*, *Talaromyces* and *Trichoderma*) caused larval mortality from 3.3% to 43.3%, and none presented mortality equal to or greater than 50% up to 72 h of exposure (**Supplementary Table 1**). Larvicidal activity equal to or greater

than 50% was observed in 15 of the 36 extracts of liquid medium; six liquid medium extracts belonging to five genera (*Albifimbria*, *Aspergillus*, *Diaporthe*, *Emmia* and *Sorocladium*) killed 100% of the larvae within 72 h.

Eight extracts (from strains 1126, 1132, 1133, 1160, 1203, 1232, 1242 and 1266) showed larvicidal activity equal to or greater than 50% at 24 h, four (1244, 1246, 1248 and 1280) resulted in 50% mortality only at 48 h and three extracts (1184, 1240 and 1283) caused 50% mortality only at 72 h of exposure. Six extracts caused 100% larval mortality, three (1160, 1203 and 1242) in less than 24 h, two (1126 and 1266) at 48 h and one (1232) at 72 h (**Figure 1**).

Extracts with larvicidal activity equal to or greater than 90% (*Al. lateralis* 1160, *Aspergillus* sp. 1126, *Cladosporium* sp. 1132, *D. ueckerae* 1203 and 1242, *Emmia* sp. 1232, *Sorocladium* sp. 1266 and *T. atroviride* 1133) were further studied and LC₅₀ and LC₉₀ values determined (**Figure 1** and **Supplementary Table 1**).

Overall, the liquid medium extracts from *Al. lateralis* 1160 and *D. ueckerae* 1203 showed the best results, with highest mortality rates and lowest LC values. The extract of the strain 1160 (*Al. lateralis*) presented the lowest LC₅₀ (0.268 µg/ml) at 24 h. The extract of the 1203 strain (*D. ueckerae*) had the lowest LC₉₀ (2.928 µg/ml) at 24 h. Furthermore, *D. ueckerae* 1203 extracts had the lowest LC₅₀ (0.108 µg/ml) and LC₉₀ (0.894 µg/ml) at 48 h, and at 72 h with an LC₅₀ of 0.062 µg/ml and an LC₉₀ of 0.476 µg/ml (**Table 2**).

4 Discussion

The public health importance of *Ae. aegypti* in tropical regions has attracted the attention of local authorities and the World Health Organization due to the wide geographical distribution and severity of diseases transmitted by these mosquitoes in the last decades,

especially dengue, chikungunya, and Zika (Rodrigues-Alves et al., 2020). As such, there is a growing interest in new insecticides and larvicides capable of controlling this vector. Naturally derived insecticides have been pursued as potentially less toxic alternatives, aiming at reducing environmental pollution and preventing the selection of mosquitoes resistant to chemical insecticides (Al-Mekhlafi, 2017; Araújo et al., 2020).

For the control of *Ae. aegypti*, insecticides are frequently applied directly in natural bodies of water and/or artificial containers, usually located closely or kept inside human households. Therefore, the use of natural, potentially less-toxic, insecticides is desirable from both environmental and social perspectives. This work investigated for the first time extracts of fungi isolated from aquatic habitats of the Amazon region in order to identify fungal lineages that can produce larvicidal bioactive metabolites against *Ae. aegypti*.

Following the protocols described here, none of the mycelium extracts showed larvicidal activity resulting in mortality rates above 50% within 72 h. However, 15 extracts from the liquid culture medium resulted in more than 50% mortality. Six killed 100% of the larvae within 72 h and three of these were lethal in less than 24 h, resembling the positive control Temephos. These results demonstrate that some of the isolated fungal strains secrete metabolites with larvicidal activity against *Ae. aegypti*.

The fungi tested in this study were subjected to the similar cultivation conditions. However, cultivation times varied for each fungal strain. To avoid differences in nutrient availability, we used total glucose consumption in the culture medium as determinant of the cultivation time length. Fungi growth styles and physical, chemical and biological factors, among others, influence development time and the production of bioactive metabolites (Kavanagh, 2011; Costa and Nahas, 2012). Species-specific traits explain the

difference in cultivation time and biological activities among the isolated fungi studied in our work.

Mosquito larvicidal activities of the mycelial extracts and the liquid culture medium extracts, have been described for other fungi such as *Stereum* sp. (JO5289) (Chirchir et al., 2013), *Beauveria bassiana* (UNI 40) (Daniel et al., 2017), *Trametes* sp. (Waweru et al., 2017), *Pestalotiopsis virgulata* and *Pycnoporus sanguineus* (Bücker et al., 2013). However, the LC₅₀ values revealed in our work are lower than those previously published, such as *Metarhizium anisopliae* (LC₅₀ = 59.83 µg/ml, Vivekanandhan et al., 2020), *B. bassiana* (LC₅₀ = 1.230 µg/ml, Daniel et al., 2017) and *A. terreus* (LC₅₀ = 80.407 µg/ml, Ragavendran and Natarajan, 2015), indicating the potency of the metabolites obtained from the strains tested in our study.

It is worth noting that to date there have been no reports of biological activities against insect species of metabolites produced by fungal strains of the species *Al. lateralis*, *D. ueckerae* and *Emmia* sp. For the first time, lineages of these species of fungi with larvicidal activity against *Ae. aegypti* have been identified.

The genus *Albifimbria* consists of four species, i.e., *Al. lateralis*, *Al. terrestris*, *Al. verrucaria* and *Al. viridis*, which are usually found in soil, leaves, fruits, and in the air (Lombard et al., 2016). The species *Albifimbria lateralis* (L. Lombard & Crous, 2016) has been recently described and needs better investigation regarding the production of secondary metabolites, though our investigation indicates promising applications of this fungus species in vector control. Metabolites produced by *Al. verrucaria* exhibit antimicrobial activities (Zou et al., 2011) and bioherbicidal activities (Walker and Tilley, 1997) and are considered to be a potential biocontrol agent against the fungus *Botrytis cinerea* in grapes (Li et al., 2019).

The species *D. ueckerae* was described by Udayanga et al. (2015). Its occurrence in Brazil was identified by Soares et al. (2018) who isolated this species of fungus from *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae), a plant native to the Amazon region used in traditional medicine. There are few studies on this species of fungus and no reports in the literature about identification and isolation of bioactive metabolites from this species. Fungal species of the genus *Diaporthe* are known to be a rich source of secondary metabolites (Chepkirui and Stadler, 2017). Currently, 106 compounds derived from *Diaporthe* exhibiting biological activities, such as cytotoxic, antifungal, antibacterial, antiviral, antioxidant, anti-inflammatory, phytotoxic, antiparasitic, and herbicidal activities, have been studied (Ash et al., 2010; Meepagala et al., 2018; Xu et al., 2021). Meepagala et al., (2018) isolated a compound from the liquid medium extract of the fungus *D. eres*, identified as 3,4-dihydro-8-hydroxy-3,5-dimethylisocoumarin (1), which has larvicidal activity against *Ae. aegypti*.

Conclusion

This study is the first to evaluate aquatic fungi strains from the Amazon for their ability of producing mosquito larvicidal metabolites. Thirty-six strains were evaluated, and 8 presented strong larvicidal activity against *Ae. aegypti*. Of these, *Al. lateralis* (1160) and *D. ueckerae* (1203) resulted in the highest mortality rates and lowest LC₅₀ and LC₉₀ values. Such findings open opportunities for the development of new natural larvicides that may be used as mosquito control agents. Crude fungal extracts, such as those studied here, are a complex mixture of different classes of molecules. The process of fractionation and purification of raw extracts guided by bioactivity (Chirchir et al., 2013) is necessary for the isolation and characterization of the chemical compounds responsible for the larvicidal activities observed in our work. Further studies are needed to characterize the

active larvicidal metabolites produced by these fungi and define their mechanisms of action.

5 Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

6 Author Contributions

The designed the study - MRO, WPT, ADLS and AQLS. Performed the production of fungal extracts - MRO, ADLS and AQLS. Reared mosquitoes and carried out bioassays - MRO and RMK. Analyzed the results and wrote the manuscript - MRO, ADLS and AQLS. Supervised and finalized the manuscript - MRO, GFS, OM, OT, ADLS and AQLS. All authors read and approved the final manuscript.

7 Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, by the project Pró-Amazônia: Biodiversidade e Sustentabilidade (process number 23038.009442 / 2013-12) and FAPEAM.

8 Acknowledgments

We would like to thank the Graduate Program in Biodiversity and Biotechnology – PPG – BIONORTE, Analytical Center – CA/UFAM, the National Institute for Amazonian Research – INPA, Embrapa Western Amazonia/EMBRAPA, Malaria and Dengue Laboratory/INPA for helping in the rearing of mosquitoes and LaBMicrA/UFAM for providing the fungal strains from their microorganism collection.

9 Reference

Al-Mekhlafi, F. A. (2017). Larvicidal activity of some fungal extracts on *Aedes caspius* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Entomological Research* 47, 388–393.

Araújo, I. F., Loureiro, H. A., Marinho, V. H. S., Neves, F. B., Sarquis, R. S. F., Faustino, S. M. M., et al. (2020). Larvicidal activity of the methanolic, hydroethanolic and hexanic extracts from *Acmella oleracea*, solubilized with silk fibroin, against *Aedes aegypti*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 24, 101550.
doi:10.1016/j.bcab.2020.101550.

Ash, G. J., Stodart, B., Sakuanrungsirikul, S., Anschaw, E., Crump, N., Hailstones, D., et al. (2010). Genetic characterization of a novel *Phomopsis* sp., a putative biocontrol agent for *Carthamus lanatus*. *Mycologia* 102, 54–61.

Ayres, M., Ayres, J. R. M., Ayres, D. L., and Santos, A. dos (2007). Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. *Belém, Pará, Brasil: BioEstat (5.0)*.

Bhakuni, D. S., and Rawat, D. S. (2006). *Bioactive marine natural products*. Springer Science & Business Media.

Bitencourt, R. de O. B., Reis dos Santos Mallet, J., Mesquita, E., Silva Gôlo, P., Fiorotti, J., Rita Elias Pinheiro Bittencourt, V., et al. (2021). Larvicidal activity, route of interaction and ultrastructural changes in *Aedes aegypti* exposed to entomopathogenic fungi. *Acta Tropica* 213, 105732. doi:10.1016/j.actatropica.2020.105732.

Bucker, A., Bucker, N. C. F., Souza, A. Q. L. de, Gama, A. M. da, Rodrigues-Filho, E., Costa, F. M. da, et al. (2013). Larvicidal effects of endophytic and

basidiomycete fungus extracts on *Aedes* and *Anopheles* larvae (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 46, 411–419. doi:10.1590/0037-8682-0063-2013.

Chepkirui, C., and Stadler, M. (2017). The genus *Diaporthe*: a rich source of diverse and bioactive metabolites. *Mycol Progress* 16, 477–494. doi:10.1007/s11557-017-1288-y.

Chirchir, D. K., Ouma, R. B. O., Cheplogoi, P. K., and Omolo, J. O. (2013). Larvicidal activity of extracellular secondary metabolites from a *Stereum* species Hill ex Pers.(JO5289) against the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* (Linn)(Diptera: Culicidae). *African Journal of Biotechnology* 12, 6302–6309.

Consoli, R. A. G. B., and Oliveira, R. L. de (1994). *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Editora FIOCRUZ Available at: <http://books.scielo.org/id/th> [Accessed November 15, 2020].

Costa, B. de O., and Nahas, E. (2012). Growth and enzymatic responses of phytopathogenic fungi to glucose in culture media and soil. *Brazilian Journal of Microbiology* 43, 332–340.

Danga, Y. S. P., Nukenine, E. N., Younoussa, L., and Esimone, C. O. (2014). Phytochemicals and larvicidal activity of *Plectranthus glandulosus* (Lamiaceae) leaf extracts against *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *International Journal of Pure and Applied Zoology* 2, 160–171.

Daniel, J. F. S., Silva, A. A., Nakagawa, D. H., Medeiros, L. S. de, Carvalho, M. G., Tavares, L. J., et al. (2017). Larvicidal Activity of *Beauveria bassiana* Extracts

against *Aedes aegypti* and Identification of Beauvericins. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 28, 1003–1013. doi:10.21577/0103-5053.20160253

.Dugan, F. M. (2006). The Identification of fungi. An illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature. The American Phytopathological Society. *US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington State University, Pullman. APS Press. USA. St. Paul, Minnesota USA. 176p.*

Dulmage, H. T., Yousten, A. A., Singer, S., and Lacey, L. A. (1990). Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. World Health Organization. World Health Organization. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/61645> [Accessed May 18, 2020].

Fernandes, R. S., O'Connor, O., Bersot, M. I. L., Girault, D., Dokunengo, M. R., Pocquet, N., et al. (2020). Vector Competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Brazil and New Caledonia for Three Zika Virus Lineages. *Pathogens* 9. doi:10.3390/pathogens9070575.

Finney, D. J. (1952). *Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve*. Cambridge university press, Cambridge.

Haddad, M. de L. (1998). Utilização do Polo-PC para análise de Probit. *Controle microbiano de insetos. FEALQ, Piracicaba*, 999–1013.

Hanlin, R. T., and Ulloa, M. (1988). Atlas of Introductory Mycology 2nd edn. Hunter Textbooks. Inc., *Winston-Salem, North Carolina*, 196.

Hawksworth, D. L., KIRK, P. M., SUTTON, B. C., and PEGLER, D. N. (1995). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 8th ed. Oxfordshire: Oxford University Press.

Imhoff, J. F. (2016). Natural Products from Marine Fungi--Still an Underrepresented Resource. *Marine Drugs* 14, 19. doi:10.3390/md14010019.

Kavanagh, K. ed. (2011). *Fungi: biology and applications*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.

Li, Z., Chang, P., Gao, L., and Wang, X. (2019). The Endophytic Fungus *Albifimbria verrucaria* from Wild Grape as an Antagonist of *Botrytis cinerea* and Other Grape Pathogens. *Phytopathology*® 110, 843–850. doi:10.1094/PHYTO-09-19-0347-R.

Lombard, L., Houbraken, J., Decock, C., Samson, R. A., Meijer, M., Réblová, M., et al. (2016). Generic hyper-diversity in Stachybotriaceae. *Persoonia* 36, 156–246. doi:10.3767/003158516X691582.

Meepagala, K. M., Estep, A. S., Clausen, B. M., and Becnel, J. J. (2018). Mosquitocidal Activity of a Naturally Occurring Isochroman and Synthetic Analogs from the Plant Pathogenic Fungus, *Diaporthe eres* Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 55, 969–974. doi:10.1093/jme/tjy016.

Oliveira, M. R. (2021). Potencial da biodiversidade fúngica cultivável de habitats aquáticos da região Amazônica para o controle de doenças infecciosas. [theses / doctoral thesis]. [Manaus (AM)]: Universidade Federal do Amazonas. 165p.

PAHO (2020). Pan American Health Organization / World Health Organization. Epidemiological Update: Dengue. Washington, D.C Available at:

https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=dengue-2217&alias=51690-7-february-2020-dengue-epidemiological-update-1&Itemid=270&lang=en.

Possas, C., Brasil, P., Marzochi, M. C., Tanuri, A., Martins, R. M., Marques, E. T., et al. (2017). Zika puzzle in Brazil: peculiar conditions of viral introduction and dissemination - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 112, 319–327. doi:10.1590/0074-02760160510.

Ragavendran, C., and Natarajan, D. (2015). Insecticidal potency of *Aspergillus terreus* against larvae and pupae of three mosquito species *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, and *Aedes aegypti*. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 17224–17237.

Rodrigues-Alves, M. L., Melo-Júnior, O. A. de O., Silveira, P., Mariano, R. M. da S., Leite, J. C., Santos, T. A. P., et al. (2020). Historical Perspective and Biotechnological Trends to Block Arboviruses Transmission by Controlling *Aedes aegypti* Mosquitos Using Different Approaches. *Frontiers in Medicine* 7. doi:10.3389/fmed.2020.00275.

Saúde, M. da, and Saúde, S. de V. em (2016). Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2015. Available at: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/15/svs2016-be003-dengue-se52.pdf> [Accessed November 18, 2020].

Saúde, M. da, and Saúde, S. de V. em (2018). Boletim Epidemiológico 47: Situação Epidemiológica da Infecção Pelo Vírus Zika no Brasil, de 2015 a 2017.

Available at: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2018/novembro/12/2018-034.pdf>
[Accessed November 15, 2020].

Seetharaman, P. K., Chandrasekaran, R., Gnanasekar, S., Chandrakasan, G., Gupta, M., Manikandan, D. B., et al. (2018). Antimicrobial and larvicidal activity of eco-friendly silver nanoparticles synthesized from endophytic fungi *Phomopsis liquidambaris*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 16, 22–30.
doi:10.1016/j.bcab.2018.07.006.

Shearer, C. A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J., Marvanová, L., Padgett, D., et al. (2007). Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation* 16, 49–67. doi:10.1007/s10531-006-9120-z.

Soares, D. A., Oliveira, D. P. de, Santos, T. T. dos, Marson, P. G., and Pimenta, R. S. (2018). Multiloci identification of Diaporthe fungi isolated from the medicinal plant *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae). *Journal of Applied Microbiology* 125, 172–180. doi:<https://doi.org/10.1111/jam.13769>.

Souza, A. Q. L. de, Souza, A. D. L. de, Astolfi Filho, S., Pinheiro, M. L. B., Sarquis, M. I. de M., and Pereira, J. O. (2004). Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from amazonian toxic plants: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich and *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica* 34, 185–195. Udayanga, D., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Chukeatirote, E., and Hyde, K. D. (2015). The *Diaporthe sojae* species complex: Phylogenetic re-assessment of pathogens associated with soybean, cucurbits and other field crops. *Fungal Biology* 119, 383–407.

Vivekanandhan, P., Bedini, S., and Shivakumar, M. S. (2020). Isolation and identification of entomopathogenic fungus from Eastern Ghats of South Indian forest

soil and their efficacy as biopesticide for mosquito control. *Parasitology International* 76, 102099. doi:10.1016/j.parint.2020.102099.

Walker, H. L., and Tilley, A. M. (1997). Evaluation of an Isolate of *Myrothecium verrucaria* from *Sicklepod* (*Senna obtusifolia*) as a Potential Mycoherbicide Agent. *Biological Control* 10, 104–112. doi:10.1006/bcon.1997.0559.

Waweru, A. W., Omolo, J. O., Cheplogoi, P. K., and Njue, A. W. (2017). Mosquito larvicidal trihydroxylindene derivative from submerged cultures of *Trametes* species. *African Journal of Biotechnology* 16, 1457–1460.

WHO (2020). Dengue and severe dengue. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> [Accessed April 20, 2021].

WHO, W. H. O. (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69101> [Accessed October 12, 2020].

Xu, T.-C., Lu, Y.-H., Wang, J.-F., Song, Z.-Q., Hou, Y.-G., Liu, S.-S., et al. (2021). Bioactive Secondary Metabolites of the Genus *Diaporthe* and Anamorph Phomopsis from Terrestrial and Marine Habitats and Endophytes: 2010–2019. *Microorganisms* 9, 217. doi:10.3390/microorganisms9020217.

Zanotto, P. M. de A., and Leite, L. C. de C. (2018). The Challenges Imposed by Dengue, Zika, and Chikungunya to Brazil. *Front. Immunol.* 9. doi:10.3389/fimmu.2018.01964.

Zara, A. L. de S. A., Santos, S. M. D., Fernandes-Oliveira, E. S., Carvalho, R. G., and Coelho, G. E. (2016). [*Aedes aegypti* control strategies: a review]. *Epidemiol Serv Saude* 25, 391–404. doi:10.5123/S1679-49742016000200017.

Zou, X., Niu, S., Ren, J., Li, E., Liu, X., and Che, Y. (2011). Verrucamides A–D, Antibacterial Cyclopeptides from *Myrothecium verrucaria*. *Journal of Natural Products* 74, 1111–1116. doi:10.1021/np200050r.

10

11

12

13

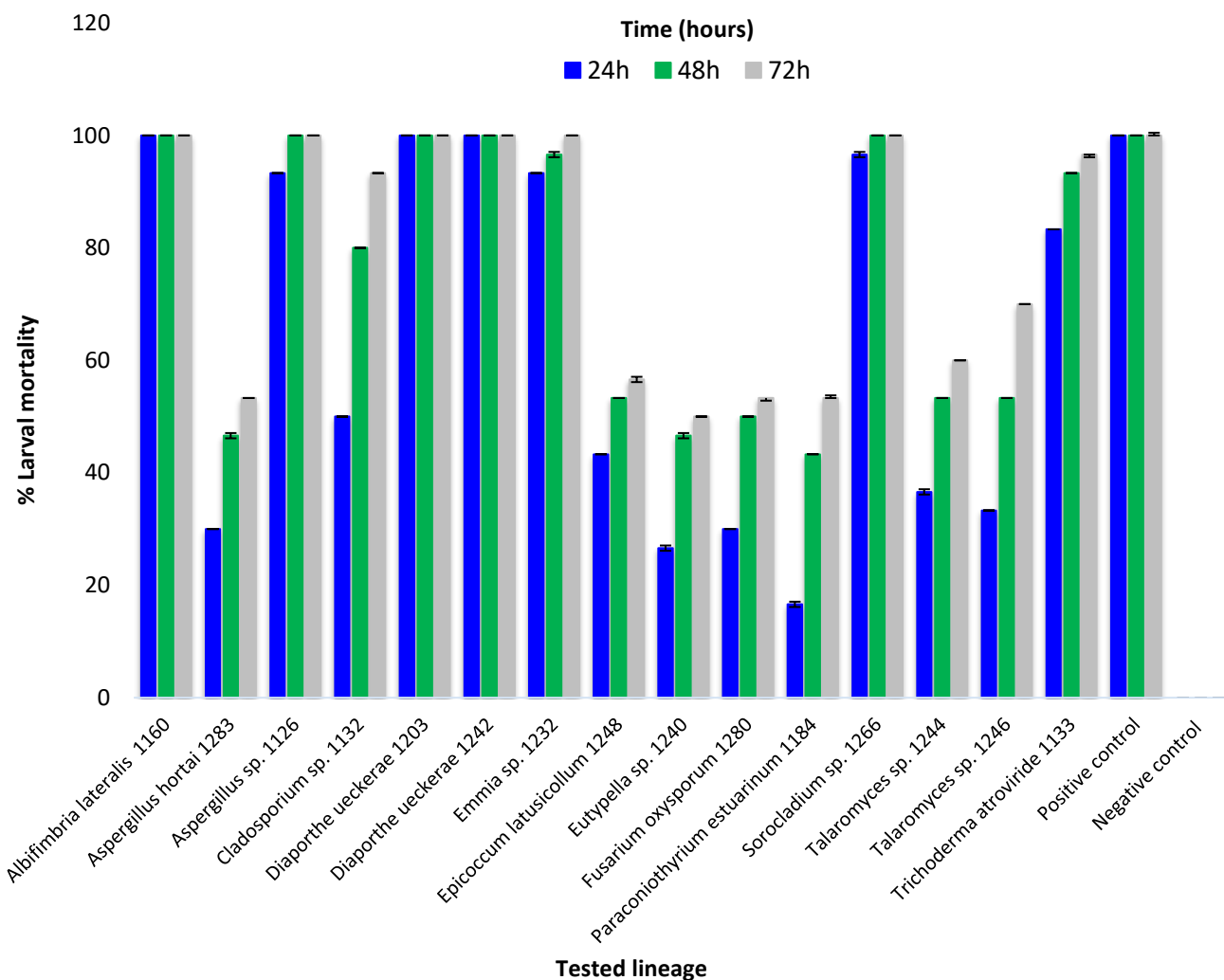


FIGURE 1. Percentage of mortality of 3rd instar *Aedes aegypti* larvae exposed to liquid medium extracts obtained from strains of fungi isolated from Amazonian aquatic environments. Mortality was assessed after 24, 48 and 72 h of exposure to fungal extract at a concentration of 500 µg/ml. Error bars represent standard deviation. Positive control (Temephos) and Negative control (dimethyl sulfoxide).

Tested lineage	GenBank accession numbers	Taxonomic identification	Cultivation time (days)	pH	Glucose	Extract yield (mg)	
						Liquid medium	Mycelium
1160	MZ781268	<i>Albifimbria lateralis</i> ^{C1}	50	6.5	0	120	820
1283	MZ781299	<i>Aspegillus hortai</i> ^{C1}	17	6.5	0	724	2577
1126	MZ781261	<i>Aspergillus</i> sp. ^{C1}	24	6.5	0	254	5872
1169	MZ781272	<i>Chrysosporthe</i> sp. ^{C1}	18	6.5	0	260	1624
1132	MZ781262	<i>Cladosporium</i> sp. ^{C1}	17	7	0	134	256
1135	MZ781264	<i>Cladosporium</i> sp. ^{C1}	17	6.5	0	177	334
1098	MZ781256	<i>Cytospora</i> sp. ^{C2}	52	6	0	180	628
1106	MZ781257	<i>Cytospora</i> sp. ^{C2}	41	6	0	443	3123
1203	MZ781276	<i>Diaporthe ueckerae</i> ^{S4}	41	6	0	249	2298
1242	MZ781281	<i>Diaporthe ueckerae</i> ^{S4}	28	7	0	152	872
1232	MZ781279	<i>Emmia</i> sp. ^{S4}	52	7.5	0	161	1128
1248	MZ781286	<i>Epicoccum latusicollum</i> ^{C1}	24	6.5	0	134	2564
1240	MZ781280	<i>Eutypella</i> sp. ^{S4}	41	6.5	0	221	3393
1262	MZ781291	<i>Fusarium oxysporum</i> ^{C1}	24	6.5	0	82	1559
1280	MZ781298	<i>Fusarium oxysporum</i> ^{C1}	24	6.5	0	98	959
1085	MZ781250	<i>Fusarium</i> sp. ^{S4}	27	7	0	90	1430
1277	MZ781297	<i>Hongkongmyces</i> sp. ^{S4}	72	6.5	0	92	439
1273	MZ781296	<i>Hyphodermella</i> sp. ^{C1}	67	6	0	85	547
1205	MZ781277	<i>Hypomontagnella monticulosa</i> ^{C1}	72	8	0	258	750
1082	MZ781248	<i>Microsphaeropsis arundinis</i> ^{C1}	52	7.5	0	129	947
1079	MZ781246	<i>Nigrograna chromolaenae</i> ^{C1}	55	6.5	0	117	2840
1123	MZ781259	<i>Ochronis</i> sp. ^{C1}	28	6.5	0	149	540
1083	MZ781249	<i>Paraconiothyrium estuarinum</i> ^{C1}	28	6.5	0	129	2830
1184	MZ781274	<i>Paraconiothyrium estuarinum</i> ^{S4}	63	6.5	0	140	2019
1265	MZ781293	<i>Paraconiothyrium estuarinum</i> ^{C1}	27	7	0	138	1850
1080	MZ781247	<i>Paraconiothyrium</i> sp. ^{S4}	28	6	0	132	1985
1245	MZ781283	<i>Penicillium citreosulfuratum</i> ^{S4}	35	6	0	250	838
1266	MZ781294	<i>Sorocladium</i> sp. ^{C2}	80	6.5	0	92	645
1089	MZ781252	<i>Striaticonidium synnematum</i> ^{S3}	31	7.5	0	205	1025
1263	MZ781292	<i>Talaromyces amestolkiae</i> ^{C2}	18	6	0	250	3028
1087	MZ781251	<i>Talaromyces</i> sp. ^{C2}	50	6.5	0	268	820
1244	MZ781282	<i>Talaromyces</i> sp. ^{S4}	80	6.5	0	262	901
1246	MZ781284	<i>Talaromyces</i> sp. ^{S4}	17	6	0	127	1292
1247	MZ781285	<i>Trametes menziesii</i> ^{C2}	35	6	0	158	2870
1133	MZ781263	<i>Trichoderma atroviride</i> ^{C2}	80	7.5	0	134	2109
1136	MZ781265	<i>Trichoderma atroviride</i> ^{C2}	85	6	0	223	334
		Control (culture medium)	80	5.5	2000	201	-

TABLE 1. Crude extracts of 36 fungi isolated from aquatic environments in the Amazonian municipalities of Coari and São Gabriel da Cachoeira were used in larvicidal tests against *Aedes aegypti*. The water samples were collected at the following four sites: a) ^{C1} Coari – dam; b) ^{C2} Coari – natural lake; c) ^{S3} São Gabriel da Cachoeira – fish rearing pond; and d) ^{S4} São Gabriel da Cachoeira – natural lake. GenBank accession numbers are nucleotide sequences of approximately 700 bp including the internal

transcribed spacers (ITS1-5.8S-ITS2). Cultivation time is the time needed for total consumption of the glucose provided in the fresh medium. Extract yield is the dry weight of extracted metabolites.

Tested lineage	LC ₅₀ µg/ml (CI 95%)	LC ₉₀ µg/ml (CI 95%)	χ ²	Df	Slope ± SE
24 h					
Tp	0.025 (0.003-0.063) ae	1.161 (0.647-3.364) a	6.9432	5	0.768 ± 0.075
1126	0.872 (0.200-3.956) abd	67.251 (9.676-0.228E+06) ac	2.8009	2	0.679 ± 0.066
1132	0.459 (0.043-1.057) abd	74.117 (11.419-0.152E+07) ac	3.9608	3	0.580 ± 0.057
1133	0.463 (0.367-0.586) bh	10.940 (6.789-20.553) bc	1.000	6	0.933 ± 0.060
1160	*0.268 (0.211-0.332) cdf	3.384 (2.429-5.223) ac	2.995	5	1.164 ± 0.061
1203	0.461 (0.123-0.789) adb	*2.928 (1.565-12.543) ac	9.5913	3	1.597 ± 0.065
1232	0.372 (0.087-0.731) adh	26.304 (6.548-35.519) ac	7.6254	4	0.693 ± 0.054
1242	0.427 (0.029-0.839) ah	67.918 (15.092-68.770) ac	0.460	2	0.582 ± 0.078
1266	1.904 (1.288-3.317) ef	205.87 (53.346-272.74) ac	0.961	4	0.630 ± 0.053
48 h					
Tp	0.016 (0.002-0.038) a	0.322 (0.203-0.555) a	5.3850	5	0.979 ± 0.111
1126	0.337 (0.191-0.489) ab	6.293 (3.826-14.549) a	1.922	2	1.009 ± 0.069
1132	0.170 (0.026-0.351) ab	9.896 (3.537-20.621) a	6.3742	4	0.726 ± 0.057
1133	0.142 (0.050- 0.253) ab	3.261 (1.548-15.627) a	12.854	5	0.942 ± 0.063
1160	0.123 (0.058-0.195) b	1.106 (0.666-2.735) a	13.497	5	1.345 ± 0.083
1203	*0.108 (0.062-0.157) b	*0.894 (0.604-1.637) a	8.1443	5	1.397 ± 0.091
1232	0.206 (0.030-0.412) b	2.876 (1.302412-35.975) a	15.328	4	1.119 ± 0.074
1242	0.140 (0.078-0.211) b	12.095 (5.974-37.560) a	1.821	5	0.662 ± 0.056
1266	0.391 (0.295-0.505) c	10.825 (6.378-22.952) a	3.846	5	0.889 ± 0.091
72 h					
Tp	0.025 (0.009-0.041) a	0.141 (0.107-0.185) a	2.532	5	1.694 ± 0.280
1126	0.120 (0.053-0.198) a	5.877 (3.351-15.174) a	1.393	4	0.759 ± 0.059
1132	0.079 (0.033-0.132) a	1.387 (0.847-3.138) a	7.5183	5	1.028 ± 0.074
1133	0.070 (0.023-0.126) a	0.890 (0.531-2.237) a	11.466	5	1.163 ± 0.086
1160	0.088 (0.055-0.122) a	0.692 (0.506-1.074) a	5.2154	5	1.434 ± 0.101
1203	*0.062 (0.024-0.103) a	*0.476 (0.315-0.941) a	10.131	5	1.453 ± 0.121
1232	0.096 (0.031-0.172) a	1.292 (0.713-4.132) a	14.264	5	1.134 ± 0.077
1242	0.088 (0.030-0.159) a	2.119 (1.139-6.806) a	9.3874	5	0.928 ± 0.068
1266	0.180 (0.101-0.269) a	2.216 (1.307-5.364) a	9.8043	5	1.174 ± 0.101

TABLE 2. Lethal larvicidal concentration of liquid culture medium extracts obtained from fungal strains against 3rd instar *Aedes aegypti* larvae. The LC₅₀ and LC₉₀ were determined at 24, 48 and 72 h after exposure to fungal extracts. LC - lethal concentration, CI - confidence interval, χ²-chi - square, Df - degrees of freedom, SE - standard error. Equal letters (a, b, c, etc.) do not differ in the probability level of 5% (p> 0.05), Tp - Temephos (positive control). The lowest LC values for each time evaluated are shaded in gray and marked with *.

Supplementary Material

Supplementary Table

Taxonomic identification	Tested strain	% of larval mortality \pm SD					
		Liquid medium extract			Mycelium extract		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<i>Albifimbria lateralis</i>	1160	100 \pm 00	100 \pm 00	100 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00
<i>Aspegillus hortai</i>	1283	30 \pm 00	46,6 \pm 0,47	53,3 \pm 0,47	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00
<i>Aspergillus</i> sp.	1126	93,3 \pm 0,47	100 \pm 00	100 \pm 00	16,6 \pm 0,47	23,3 \pm 00	23,3 \pm 00
<i>Chrysoporthe</i> sp.	1169	16,6 \pm 0,47	16,6 \pm 0,47	16,6 \pm 0,47	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00
<i>Cladosporium</i> sp.	1132	50 \pm 00	80 \pm 00	93,3 \pm 0,47	10 \pm 00	26,6 \pm 0,47	33,3 \pm 00
<i>Cladosporium</i> sp.	1135	3,3 \pm 0,47	26,6 \pm 0,47	43,3 \pm 0,47	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00
<i>Cytospora</i> sp.	1098	3,3 \pm 0,47	3,3 \pm 0,47	3,3 \pm 0,47	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00
<i>Cytospora</i> sp.	1106	13,3 \pm 0,47	13,3 \pm 0,47	13,3 \pm 0,47	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00
<i>Diaporthe ueckerae</i>	1203	100 \pm 00	100 \pm 00	100 \pm 00	6,6 \pm 0,47	10 \pm 00	10 \pm 00
<i>Diaporthe ueckerae</i>	1242	100 \pm 00	100 \pm 00	100 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00
<i>Emmia</i> sp.	1232	93,3 \pm 0,47	96,6 \pm 0,47	100 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00
<i>Epicoccum latusicollum</i>	1248	43,3 \pm 0,94	53,3 \pm 0,47	56,6 \pm 1,24	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00
<i>Eutypella</i> sp.	1240	26,6 \pm 0,47	46,6 \pm 0,47	50 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00
<i>Fusarium oxysporum</i>	1262	0 \pm 00	6,6 \pm 0,94	16,6 \pm 1,6	0 \pm 00	4 \pm 0,47	6 \pm 0,47
<i>Fusarium oxysporum</i>	1280	30 \pm 00	50 \pm 00	53,3 \pm 0,47	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00
<i>Fusarium</i> sp.	1085	16,6 \pm 0,94	23,3 \pm 0,62	30 \pm 0,81	0 \pm 00	3,3 \pm 0,47	3,3 \pm 0,47
<i>Hongkongmyces</i> sp.	1277	33,3 \pm 0,47	46,6 \pm 1,24	46,6 \pm 1,24	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00
<i>Hyphodermella</i> sp.	1273	3,3 \pm 0,47	6,6 \pm 0,47	6,6 \pm 0,47	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00
<i>Hypomontagnella monticulosa</i>	1205	23,3 \pm 0,47	23,3 \pm 0,47	23,3 \pm 0,47	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00
<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	1082	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00
<i>Nigrograna chromolaenae</i>	1079	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00
<i>Ochronis</i> sp.	1123	3,3 \pm 0,47	3,3 \pm 0,47	3,3 \pm 0,47	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00
<i>Paraconiothyrium estuarinum</i>	1083	6,6 \pm 0,47	10 \pm 1,4	13,3 \pm 1,24	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00
<i>Paraconiothyrium estuarinum</i>	1184	16,6 \pm 0,47	43,3 \pm 0,94	53,3 \pm 0,47	0 \pm 00	0 \pm 00	0 \pm 00

<i>Paraconiothyrium estuarinum</i>	1265	16,6 ± 0,94	26,6 ± 1,24	43,30 ± 1,24	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00
<i>Paraconiothyrium</i> sp.	1080	13,3 ± 0,47	20 ± 00	20 ± 00	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00
<i>Penicillium citreosulfuratum</i>	1245	23,3 ± 0,47	26,6 ± 0,47	33,3 ± 0,47	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00
<i>Sorocladium</i> sp.	1266	96,6 ± 0,47	100 ± 00	100 ± 00	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00
<i>Striaticonidium synnematum</i>	1089	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	1263	0 ± 00	0 ± 00	3,3 ± 0,47	0 ± 00	23,3 ± 0,47	40 ± 00
<i>Talaromyces</i> sp.	1087	0 ± 00	3,3 ± 0,47	6,6 ± 0,47	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00
<i>Talaromyces</i> sp.	1244	36,6 ± 0,47	53,3 ± 0,47	60 ± 00	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00
<i>Talaromyces</i> sp.	1246	33,3 ± 0,47	53,3 ± 0,47	70 ± 0,81	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00
<i>Trametes menziesii</i>	1247	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00
<i>Trichoderma atroviride</i>	1133	83,3 ± 0,47	93,3 ± 0,47	96,6 ± 0,47	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00
<i>Trichoderma atroviride</i>	1136	6,6 ± 0,47	16,6 ± 0,47	26,6 ± 0,47	13,3 ± 0,47	40 ± 00	43,3 ± 0,81
Positive control (Temephos)-----		100 ± 00	100 ± 00	100 ± 00	100 ± 00	100 ± 00	100 ± 00
Negative control (DMSO)-----		0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00

Supplementary Table 1. Larvicidal activity of extracts obtained from the liquid culture medium and from the mycelium of fungi isolated from aquatic environments in the Amazonian municipalities of Coari and São Gabriel da Cachoeira against 3rd instar larvae of *Aedes aegypti*. Mortality was assessed at 24, 48 and 72 h after exposure to the fungal extract at a concentration of 500 µg/mL. The extracts that presented 90% mortality in up to 72 h are shaded in gray. Standard Deviation (SD) and dimethylsulfoxide (DMSO).

8. CAPÍTULO IV

Estudos bioguiados dos metabólitos fúngicos de habitats aquáticos da Amazônia frente a cepa de *Plasmodium falciparum* – K1³

Marta Rodrigues de Oliveira, Ricardo de Melo Katak, Marlene Rodrigues Marcelino Camargo, Laís Garcia Jordão, Bárbara Janaína Paula da Silva, Thiago Fernandes Souza, Adrian Martin Pohlit, Emerson Silva Lima, Gilvan Ferreira da Silva, Osvaldo Marinotti, Olle Terenius, Wanderli Pedro Tadei, Afonso Duarte Leão de Souza, Antonia Queiroz Lima de Souza.

Neste capítulo, realizamos o estudo bioguiado pela atividade *antimalárica in vitro* dos extratos bruto, frações e substância de fungos isolados do habitat aquático de larvas de *Anopheles darlingi* na região amazônica. Desta forma, este estudo permitiu a seleção de cinco extratos extracelular acima de 75% de inibição do parasita a partir de 20 amostras. O cultivo de 18 L de meio de cultivo BDL, seguido de extração, fracionamento e o isolamento levaram a identificação por métodos espectrofotométricos (RMN e LC/MS) da substância Citocalasina H e misturas da mesma classe de moléculas isoladas do fungo *Diaporthe ueckerae* – 1242, com alta atividade antiplasmodial contra à cepa multirresistente de *Plasmodium falciparum* K1 (CI50 de 0.0179 µg/mL).

³ Artigo a ser traduzido e submetido à revista *European Journal of Medicinal Chemistry* (ISSN 0223-5234).

Estudos bioguiados dos metabólitos fúngicos de habitats aquáticos da Amazônia
frente a cepa de *Plasmodium falciparum* – K1

Marta Rodrigues de Oliveira¹; Ricardo de Melo Katak²; Marlene Rodrigues Marcelino Camargo²; Laís Garcia Jordão²; Bárbara Janaína Paula da Silva³; Thiago Fernandes Souza^{2,4}; Adrian Martin Pohlit^{2,5}; Emerson Silva Lima^{3,6}; Gilvan Ferreira da Silva^{2,4}; Osvaldo Marinotti⁷; Olle Terenius⁸; Wanderli Pedro Tadei^{1,2,9,†}; Afonso Duarte Leão de Souza^{1,10,11}; Antonia Queiroz Lima de Souza^{1,10,12}.

¹Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (PPG-BIONORTE), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM 69065-001, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas - PPGBIOTEC/UFAM, Manaus, AM, 69080-900, Brazil.

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, AM, 69080-900, Brazil.

⁴Embrapa Amazônia Ocidental, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Manaus, AM, 69010-970, Brazil.

⁵Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM 69011-970, Brazil.

⁶Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, 69067-005 Manaus-AM, Brazil.

⁷MTEKPrime, Aliso Viejo California, USA.

⁸Department of Cell and Molecular Biology, Microbiology, Uppsala University, Sweden.

⁹Laboratório de Malária e Dengue, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM 69011-970, Brazil.

¹⁰Central Analítica - Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69077-000, Brazil.

¹¹Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 69077-000, Brazil.

¹²Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 69077-000, Brazil.

[†]in memoriam.

Resumo

A malária é uma doença parasitária que afeta humanos e animais, causando problemas de saúde pública e bilhões em perdas econômicas por causar comorbidades até mortalidade. Apesar dos avanços no desenvolvimento de novos medicamentos, os graves efeitos colaterais dos tratamentos disponíveis para *Plasmodium* spp. e a resistência aos antimaláricos nos levam à busca de novas moléculas com atividade antiplasmodial, de fontes pouco exploradas como ambientes aquáticos de anofelinos. Neste trabalho, foi realizado o estudo bioguiado pela atividade antimalárica *in vitro* dos extratos, frações e substância de fungos isolados do habitat aquático de larvas de *Anopheles darlingi* na região amazônica. Este estudo permitiu a seleção de cinco extratos com atividade antiplasmodial acima de 75% das 20 amostradas. A partir do cultivo de 18 L foram possíveis a extração dos metabólitos extracelulares, o fracionamento, o isolamento e a identificação por métodos espectrofotométricos de RMN e de LC/MS da substância Citocalasina H e de uma mistura com a mesma classe de substâncias isoladas do fungo *Diaporthe ueckerae* – 1242, com alta atividade contra à cepa multirresistente K1 de *Plasmodium falciparum* (CI50 de 0.0179 µg/mL).

Palavras-chave: Atividade antimalárica, *Diaporthe ueckerae*, Citocalasina H, Malária, *P. falciparum*.

1. Introdução

A malária é uma doença letal causada pelos parasitas do gênero *Plasmodium*, que infectam os humanos através da picada do mosquito do gênero *Anopheles* (WHO, 2021). Até o momento, cinco espécies de parasitas foram identificadas como causadoras da malária em humanos (Zekar & Sharman, 2020). O *P. falciparum* destaca-se por apresentar resistência a quase todos os antimaláricos conhecidos, e ser considerado o mais letal e responsável pela maioria dos casos de malária no mundo (Ashley et al., 2018; Cowell & Winzeler, 2019).

A resistência aos medicamentos antimaláricos levou ao aumento dos casos de malária e um aumento na mortalidade, se tornando um grande desafio no controle e eliminação da doença (Patel et al., 2017; Alhadrami et al., 2021). Assim, esses medicamentos são administrados como terapia combinada com dois medicamentos para prevenir o rápido

surgimento de resistência (Cowell & Winzeler, 2019). Alhadrami et al., (2021), ressalta que com a falta de novos medicamentos mais eficazes contra a malária, consequentemente o número de novos casos e mortes podem aumentar. Portanto, é essencial que a descoberta e o desenvolvimento de novos medicamentos para tratar a malária sejam acelerados (Charman et al., 2020).

Os fungos são identificados como fontes proeminentes de produtos naturais bioativos estruturalmente únicos (Narayanan et al., 2019). Nos últimos anos, 283 metabólitos secundários de ampla diversidade química e uma ampla gama de atividades biológicas, foram isolados de fungos de água doce (El-Elimat et al., 2021). Metabólitos isolados de fungos com potencial antimalárico podem compor a base para a síntese de novos medicamentos que possam ser utilizados para enfrentar a malária e sua resistência (Ibrahim, et al., 2018).

Portanto, neste estudo, foi realizado o isolamento bioguiado pela atividade antimalárica *in vitro* de metabólitos secretados por fungos isolados do habitat aquático de larvas de *An. darlingi* do estado do Amazonas.

2. Seção Experimental

2.1 Cultura e Extração de Metabólitos Fúngico

As linhagens fúngicas foram obtidas da coleção microrganismos do Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia (LabMicrA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), registrados no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados) com o nº AD64E07. Os fungos foram isolados da água do criadouro de larvas da *Anopheles darlingi*, localizados nos municípios de Coari e São Gabriel da Cachoeira – Amazonas/Brasil. Os fungos foram reativados em placas de Petri contendo meio BDA + L (200 g / l de batata, 20 g / l de dextrose e 15 g / l de ágar mais 2 g / l de extrato de levedura) (Souza et al., 2004), e mantidas a 26 ° C por oito dias. Após esse período, foram retirados das placas, cinco fragmentos de 1 cm² de cada fungos e inoculados em 5 Erlenmeyer de 1 L contendo 300 mL de meio de cultura BD+L sob condições estéreis (Souza et al., 2004), mantidos a 26 °C por 28 dias, em modo estático e na ausência de luz. Posteriormente, o micélio foi separado do meio de cultivo por filtração a vácuo. A extração do meio de cultivo foi realizada com uma mistura de acetato de etila (AcOEt) e isopropanol (iPr-OH) 9:1 (v/v) por três vezes. Em seguida o extrato foi concentrado em evaporador rotativo a 45 °C, obtendo os extratos secos para a realização da triagem da atividade antimalárica.

Após a triagem, o fungo que apresentou a melhor atividade foi selecionado para produção de extrato em larga. Portanto, o fungo foi inoculado em 60 Erlenmeyer de 1 L (18 L), seguindo as mesmas condições descritas anteriormente, rendendo 2.3 g de extrato bruto.

2.2 Identificação Molecular e Análise Filogenética

Foi realizada a identificação taxonômica da linhagem fúngica que apresentou o melhor resultado no teste antimetabólico usando métodos moleculares e dados morfológicos. O fungo foi cultivado em um Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio de cultura BD por 48 h a 26 ° C e 120 rpm. O micélio foi separado por filtração a vácuo, e esmagado com SilicaFlash Irregular Silica Gel G60 (SiliCycle) para lisar as células. Em seguida, o DNA foi extraído com o kit ZR Fungal / Bacterial DNA MiniPrep (Zymo Research, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A região da beta-tubulina (tub2) foi amplificada usando os iniciadores Bt2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) e Bt2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) (Glass & Donaldson, 1995). A reação de amplificação teve o volume final de 25 µl contendo 1 µl de cada primer a 10 pmol (Invitrogen), 1 µl de DNA a 50-100 ng / µl, 2,5 µl de tampão EasyTaq 10x com Mg²⁺ (TransGen Biotech Co.), 0,3 µl EasyTaq DNA Polymerase a 5 U / µl (TransGen Biotech Co.), 1 µl de dNTP a 2,5 mM (TransGen Biotech Co.) e 18,2 µl de água milli-Q.

A amplificação por PCR foi realizada usando um termociclador BioRad S1000 (BioRad Laboratory, CA) com um ciclo inicial a 94 ° C por 3 min, seguido por 39 ciclos de 95 ° C por 30 s, 58 ° C por 50 s e 72 ° C por 1 min, e um ciclo final a 72 ° C por 5 min. Os produtos de PCR foram purificados com a enzima ExoSAP Ilustra - ExoProStar (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. Os produtos amplificados foram sequenciados com o kit de sequenciação de ciclo BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) em um Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

As sequências de consenso foram montadas usando DNA Sequence Assembly BASER Software v.4.5.0 (<http://www.dnabaser.com/index.html>). As sequências foram então comparadas com sequências homólogas armazenadas no GenBank aplicando BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) do NCBI (National Center for Biotechnology Information). O alinhamento foi realizado usando a interface online MAFFT (Katoh & Standley, 2013), seguidos de ajustes manuais usando MEGA v. 7 (Kumar et al., 2016). A árvore filogenética foi projetada no FigTree 1.4 (Rambaut, 2020) e as novas sequências geradas foram depositadas no banco de dados do GenBank do NCBI.

2.3 Ensaio Antimalárico

Para a realização da atividade antimalárica *in vitro* foi usada a cepa multi-resistente K1 (MRA-159, MR4, ATCC Manassas Virginia) de *P. falciparum*. A cepa K1 foi mantida em cultivo contínuo de acordo o método de Trager & Jensen (1976) com modificações. A cultura foi mantida a 37 °C, em frascos de cultivo de 50 mL contendo cerca de 500 µL de hemácias parasitadas e 4.5 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de plasma humano tipo A⁺ inativado, a uma atmosfera de baixa tensão de oxigênio (5% de CO₂, 5% de O₂ e nitrogênio balanceado).

As amostras foram solubilizadas em DMSO (Dimetilsulfóxido) na concentração estoque de 10 mg/mL, e posteriormente diluídas em meio de cultura para obtenção das concentrações para teste (100 a 0.02 µg/mL). O teste antimalárico foi realizado como descrito por Andrade-Neto et al., (2007). As amostras foram avaliadas em triplicata, em placas de 96 poços contendo a suspensão de hemácias parasitadas com parasitemia inicial de 1 a 2%. A placa foi incubada por 48 h, sob as mesmas condições de cultivo do parasita. Passado o período de incubação foram confeccionados esfregaços sanguíneos do conteúdo dos poços da placa, corados pelo Panótico® e depois avaliados por meio de microscopia óptica. A inibição do crescimento dos parasitas foi determinada pela comparação com os controles livres de drogas e branco (DMSO 1%).

Foi realizado primeiramente uma triagem onde os extratos foram testados nas concentrações de 50 e 5 µg/mL. Das amostras que se mostraram ativas apresentando inibição acima de 75% em uma das concentrações, foi determinada a concentração que inibe 50% do crescimento (CI₅₀). A inibição do crescimento dos parasitos foi determinada pela comparação com os controles de crescimento sem amostra, segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{parasitemia do controle} - \text{parasitemia com amostra})}{\text{parasitemia do controle}} \times 100$$

A concentração inibitória mínima (CI₅₀) foi calculada com o auxílio do software GraphPad Prism, com intervalo de confiança (IC) de 95%. Para controle positivo foi utilizado o Difosfato de cloroquina, um antimalárico padrão.

2.4 Ensaio de Citotoxicidade

A linhagem celular MRC-5 de fibroblastos humanos foi cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 µg / mL de estreptomicina e 100 U / mL de penicilina, e incubado a 37 ° C com uma atmosfera de 5% de CO₂. Para os ensaios, as células foram semeadas em

placas de 96 poços (0.5×10^4 células / poço) e o ensaio Alamar Blue foi realizado usando um procedimento descrito por Ahmed et al., (1994). Após incubação por 24 h, os compostos foram dissolvidos individualmente em DMSO e as soluções resultantes diluídas em meio de cultura. As soluções diluídas resultantes de cada amostra foram adicionadas aos poços nas concentrações finais (poços) de 1.56–100 µg / mL. Os grupos de controle tiveram concentrações finais de poço de 0.1% de DMSO. As placas foram incubadas adicionalmente por 48 h. Três horas antes do final do período de incubação, 10 µL de Alamar Blue TM (Sigma-Aldrich) foi adicionado a cada poço. O sinal fluorescente foi monitorado com um leitor de placas múltiplas usando excitação de 530-560 nm e comprimentos de onda de emissão de 590 nm.

As concentrações citotóxicas 50% (CC₅₀) das amostras testadas foram determinadas por análise de curvas de dose - resposta utilizando o software GraphPad Prism 7.0. Os índices de seletividade (IS) foram calculados para cada substância testada de acordo com os critérios de Reimão, (2009), usando a seguinte fórmula:

$$IS = CC_{50}(\text{linhagem celular}) / CI_{50}(P. \textit{falciparum})$$

2.5 Fracionamento e Isolamento da Substância Bioativa

O extrato bruto foi submetido ao ensaio antimalárico e após a confirmação da atividade o extrato foi submetido a coluna SPE C8 eluído com água- metanol (Grau HPLC) (70:30, 40:60, e 0: 100, v / v), gerando 3 frações (fr30, fr60, fr100). As frações foram submetidas ao ensaio antimalárico e a fração ativa (fr60) foi submetida a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) semi-preparativa (Sunfire, C18, 5 µm, 10 × 250 mm) Shimadzu, modelo UFLC (Shimadzu, Columbia, MD, EUA), usando água (A) e metanol (B) como fases móveis. O gradiente de eluição foi: 60 -100% B (v / v) durante 10 min, 10 -35 min, 62 -100% B e 35 - 40 min 100% B (v / v) em um fluxo taxa de 3.5 mL min⁻¹. A mesma coluna C18 acima foi empregado no fracionamento e nos canais de UV em 225 e 235 nm foram monitorados. Foram obtidos sete compostos e estes foram submetidos novamente ao ensaio antimalárico, o composto 4 (t_R 14.1 min, 50 mg) foi o mais ativo, este então foi submetido a análise de RMN para identificação.

2.6 Análise de RMN

O unidimensional (1D) e bidimensional (2D) a análise de ressonância magnética nuclear (NMR) foram realizados com um espectrômetro de NMR AVANCE III HD 500 (Bruker, Billerica, MA, EUA), operando a 11,75 T, observando ¹H a 500,13 e ¹³C a 125,76 MHz. Deuterado metanol (MeOD) (Cambridge Isotope, Tewksbury, MA, EUA)

foi usado como solvente. Todas as mudanças químicas (d) são fornecidas em ppm em relação ao sinal do solvente, e o acoplamento constantes (J) são dadas em Hz.

3. Resultado e discussão

Este estudo relata pela primeira vez a atividade de extratos do meio líquido oriundos de fungos isolados de ambientes aquáticos na região Amazônica, investigados contra o *P. falciparum*. O estudo de atividade antimalárica *in vitro* é considerado o ponto de partida para a triagem e descoberta de novas drogas com esta finalidade. Sendo este o método pelo qual todos os antimaláricos atuais foram descobertos (Ouattara et al., 2006; Lenzi et al., 2018).

Na triagem da atividade antimalárica *in vitro* frente à cepa K1 de *P. falciparum* nas concentrações de 50 e 5 µg/mL, foram testados extratos de 19 isolados fúngicos mais o controle do meio de cultivo. Destes, três extratos (15%) foram considerados ativos, 11 (55%) parcialmente ativos e seis (30%) considerados inativos (Tabela 1).

Tabela 1. Inibição do crescimento *in vitro* da cepa K1 de *P. falciparum* frente aos extratos de fungos isolados do habitat aquático de larvas de *An. darlingi* do estado do Amazonas.

Fungo testado	Atividade	Redução do crescimento do parasito (%)	
		50 (µg/mL)	5 (µg/mL)
1083	PA	54,19	21,69
1106	PA	77,37	30,34
1126	PA	72,16	14,70
1132	A	89,57	80,70
1133	PA	54,33	-16,92
1135	A	92,79	50,75
1136	PA	64,73	26,12
1169	I	-25,57	-35,62
1203	PA	52,29	2,42
1240	I	3,69	-13,99
1242	PA	73,49	78,81
1244	I	-3,61	0,50
1246	I	38,10	-9,48
1248	I	38,68	-27,48
1262	A	89,02	24,68
1263	PA	51,19	8,26
1266	I	-16,47	-7,04
1280	PA	69,72	0,72
1283	PA	56,63	-1,83

Controle do meio	I	-21,88	-29,90
------------------	---	--------	--------

Legenda: Para avaliação da atividade *in vitro* foi usado os critérios estabelecidos Bertani et al., (2005) que adotaram a seguinte classificação para extratos: de 80 a 100% = ativo (A), 50 a 79% = parcialmente ativo (PA), < 50% = inativo (I).

Cinco extratos (1106, 1132, 1135, 1242, 1262) apresentaram inibição maior que 75%, destes, foi determinada a concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitas (CI₅₀) (Tabela 2). O extrato do fungo 1242 foi o único considerado muito ativo, apresentando CI₅₀ de 0.054 µg/mL e este foi selecionado para a identificação taxonômica, o teste de citotoxicidade e o fracionamento e isolamento da substância ativa.

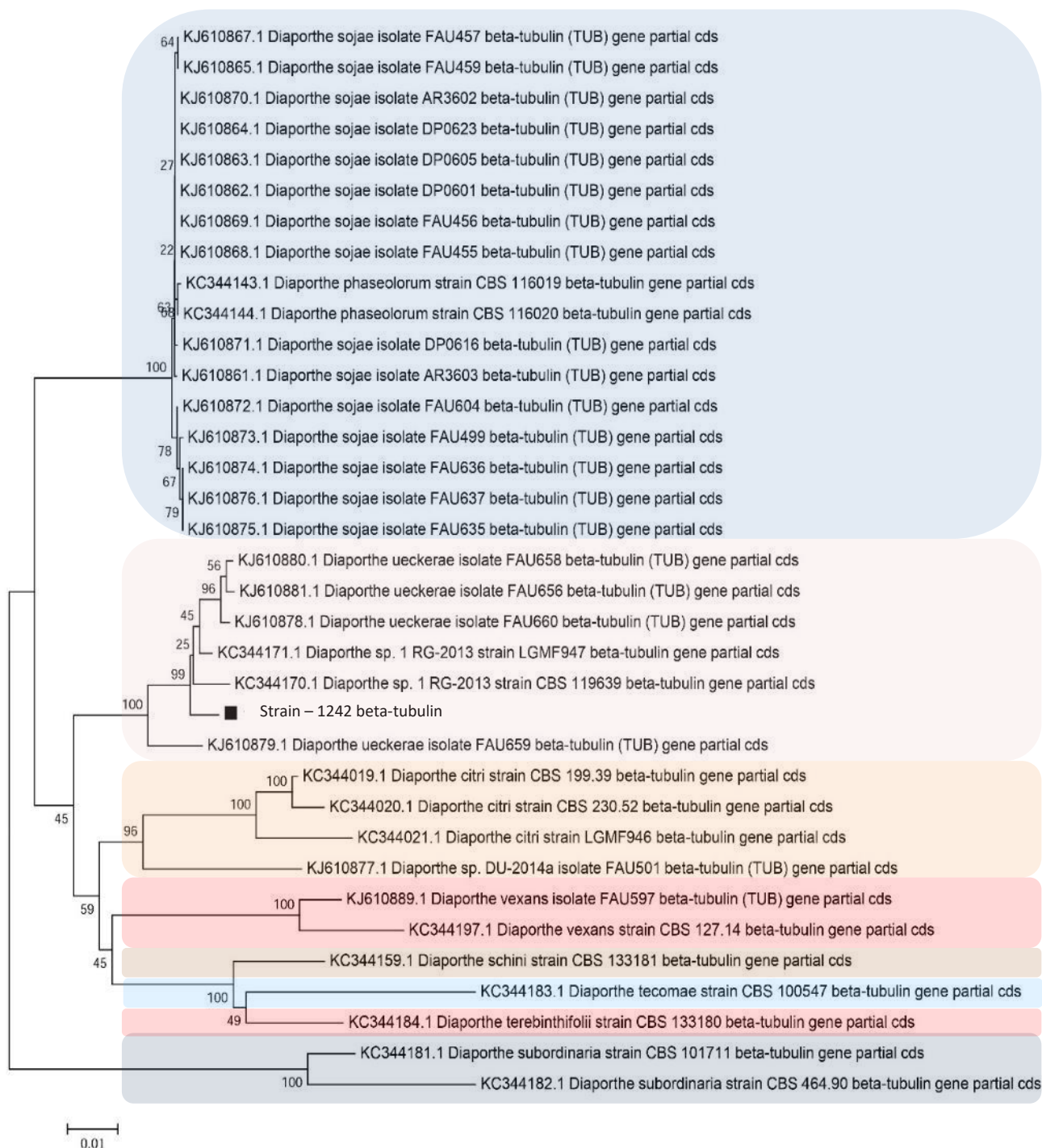
Tabela 2. Concentração inibitória 50% (IC₅₀) *in vitro* frente à cepa K1 de *P. falciparum* dos extratos dos fungos isolados do habitat aquático de larvas de *An. darlingi* do estado do Amazonas.

Fungo testado	Atividade	IC ₅₀ (µg/mL)
1106	AM	15,6
1132	A	3.7
1135	A	4.03
1242	MA	0.054
1262	AM	12.4
Difosfato de cloroquina	MA	0. 0.27

Legenda: Concentração Inibitória 50% (CI₅₀). Para avaliação da atividade *in vitro* foi usado os critérios estabelecido Bertani et al., (2005) que adotaram a seguinte classificação para extratos e frações: IC₅₀ < 1,0 µg/mL = muito ativo (MA); entre 10 e 1,0 µg/mL = ativo (A); entre 50 a 10 µg/mL = atividade moderada (AM); > 50 µg/mL = inativo (I).

O fungo 1242 foi identificado como *Diaporthe ueckerae*, de acordo com as análises dos dados filogenéticos e morfológicos (Figura 1). *D. ueckerae*, é uma espécie descrita por Udayanga et al., (2015), com base em isolados de *Cucumis melo* de Oklahoma nos Estados Unidos. Esta espécie também foi isolada de um abscesso humano na Alemanha e de *Glycine max* no Brasil (Gomes et al., 2013). Soares et al., (2018), reforçam que *D. ueckerae* é um patógeno que pode infectar humanos e plantas de maneira oportunista. No entanto, ainda há poucos estudos sobre esta espécie de fungo e não a relatos na literatura sobre a identificação e isolamento de metabólitos bioativos deste fungo.

Figure 1. Árvore filogenética do fungo *Diaporthe ueckerae* - 1242, isolado do habitat aquático de larvas de *An. darlingi*.



Fungos do gênero *Diaporthe* estão distribuídos mundialmente em muitos ecossistemas, a maioria das espécies podem ser endófitas ou fitopatógenas, ou decompositores da biomassa vegetal. Esses fungos também são prevalentes como endófitos associados a muitos hospedeiros em regiões temperadas e tropicais (Udayanga et al., 2011). O gênero *Diaporthe* compreende um grupo de fungos amplamente

estudados por sua capacidade de produzir metabólitos bioativos para diversas aplicações farmacológicas (Flores et al., 2013). Atualmente, existem 106 compostos derivados de *Diaporthe*, esses compostos exibem várias bioatividades, tais como citotóxicas, antifúngica, antibacteriana, antiviral, antioxidante, antiinflamatória, fitotóxica, antiangiogênica entre outras (Xu et al., 2021).

O teste antimalárico demonstrou que o extrato bruto do fungo *D. ueckerae* 1242 apresentou forte atividade contra a cepa de *P. falciparum* K1 com IC₅₀ de 0.054 µg/mL e índice de seletividade de 261 (Tabela 1). O índice de seletividade (IS), representa o grau de segurança para a utilização de uma amostra em teste *in vitro*, no qual mede o quanto o composto é ativo contra a célula alvo do parasita sem causar danos à célula do hospedeiro (Abrantes, 2006). Desta forma, valores de IS maior que 10 oferecem a potência para uma terapia mais segura (Ramazani et al., 2010). O potencial antiparasitário e o promissor efeito antimalárico com altos valores de IS exibido pelo extrato bruto do fungo estudado, nos encorajou a realizar o isolamento e identificação do composto bioativo.

Tabela 3. Concentração inibitória 50% (IC₅₀) *in vitro* das amostras frente à cepa K1 de *P. falciparum*.

Amostras	CI ₅₀ e IC ₉₅ <i>P. falciparum</i> e CC ₅₀ e IC ₉₅ MRC-5				IS
	<i>P.f</i> (µg/mL)	<i>P.f</i> (µM)	Atividade	MRC-5 (µg/mL)	
Extrato bruto	0.054 (0.035 – 0.081)	-	MA	14.1 (13.33 – 14.89)	261
Fração (fr30)	5.91 (3.39 – 10.3)	-	A	26.7 (25.45 – 27.93)	4.5
Fração(fr60)	0.027 (0.026 – 0.028)	-	MA	20.3 (18.73 – 21.90)	751
Fração(fr100)	0.082 (0.03 – 0.14)	-	MA	12.8 (12.28 – 13.33)	156
Citocalasina H (composto 4)	0.0179 (0.0167 – 0.0191)	0.036	MA	19.9 (18.46 – 21.43)	1112
Difosfato de cloroquina	0.27 (0.21 – 0.35)		Controle	-	-

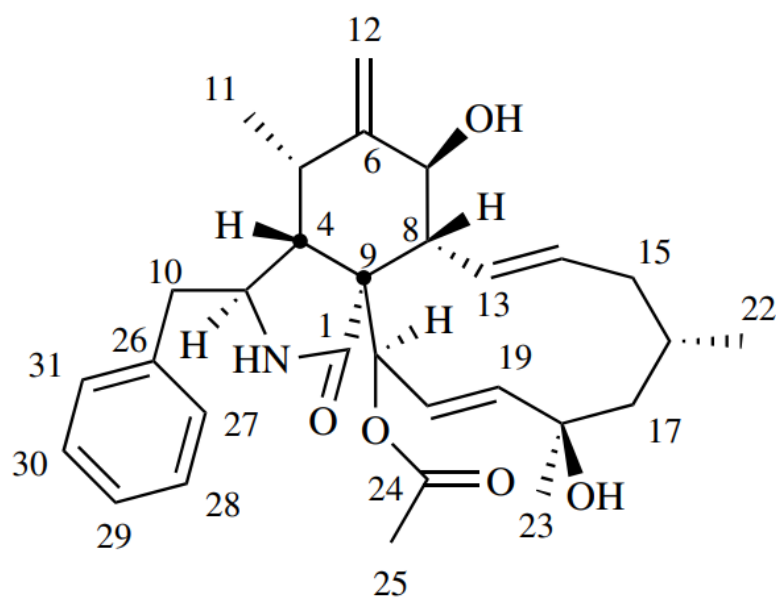
Legenda: Concentração Inibitória 50% (CI₅₀). Intervalo de Confiança de 95% (IC₉₅). Concentrações Citotóxicas 50% (CC₅₀). Linhagem celular de fibroblastos humanos (MRC-5). Índice de Seletividade (IS). Para avaliação da atividade *in vitro* foi usado os critérios estabelecido Bertani et al., (2005) que adotaram a seguinte classificação para extratos e frações: IC₅₀ < 1,0 µg/mL = muito ativo (MA); entre 10 e 1,0 µg/mL = ativo (A); entre 50 a 10 µg/mL = atividade moderada (AM); > 50 µg/mL = inativo (I).

Usamos o fracionamento bioguiado para direcionar a busca pelo composto antimalárico, desta forma, foram geradas três frações (fr30, fr60, fr100), que foram

submetidas novamente ao ensaio antimalárico. A fração fr60 apresentou-se como a mais ativa com valor de IC_{50} de 0.027 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando o aumento da atividade quando comparado com o extrato bruto. Em seguida, realizamos a purificação por HPLC da fração fr60 que levou ao isolamento de sete compostos, submetidos novamente ao ensaio antimalárico, o composto 4 (t_R 14.1 min, 50 mg) mostrou forte atividade com IC_{50} de 0.0179 $\mu\text{g/mL}$ e alto índice de seletividade de 1112 (Tabela 1).

Posteriormente, o composto 4 foi submetido a análise de RMN para identificação, a estrutura química foi atribuída com base na comparação da análise dos dados espectrais de RMN 1D e 2D e medições de rotação óptica dados apresentados no Material Suplementar (Figuras 1 a 5 e Tabela 1) com a literatura publicada (Tao et al., 2008). O composto 4 puro foi isolado como um cristal em formato de agulhas incolor e identificado como citocalasina H (Figura 2).

Figure 2. Estrutura química da Citocalasina H.



Fonte: Tao et al., (2008).

A citocalasina H, é um membro da família das citocalasinas, é derivada de metabólitos secundários ativos de fungos (Wells et al., 1976). Diferentes citocalasinas têm suas próprias funções exclusivas, o principal foco de estudo da citocalasina H, tem sido nos efeitos anti-inflamatórios, antifúngicos e antitumorais (Ma et al., 2018). O estudo de Heidarzadeh et al., (2019), mostrou que a citocalasina H age preferencialmente nas células cancerosas (U87MG) e não tem efeito de toxicidade nas células normais (HEK).

O resultado encontrado em nosso trabalho vai de acordo com a afirmação de Chepkirui & Stadler (2017), que citocalasinas podem ser predominantes em algumas espécies de *Diaporthe* e esse grupo de moléculas apresenta diferentes atividades biológicas. Citocalasina H foi isolada do fungo *Diaporthe* sp. GZU-1021, e mostrou forte atividade anti-inflamatória (Liu et al., 2019). 18-des-hidroxi citocalasina H foi obtido a partir de *D. phaseolorum*, e apresentou atividade leishmanicida, antioxidante e citotóxica contra as células de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7 (Brissow et al., 2017). Huang et al., (2019), estudou o fungo *Diaporthe* sp. GDG-118 de *Sophora tonkinensis*, e isolou sete citocalasinas, incluindo 21-acetoxicitocalasinas J2 e J3, 7-acetoxicitocalasina H e citocalasinas J3, H, J e E que apresentaram diferentes atividades antimicrobianas.

Nosso trabalho é o primeiro a relatar atividade antimalárica do extrato, frações e substância do fungo *D. ueckerae* frente ao *P. falciparum*. Entretanto, um trabalho semelhante foi realizado por Ferreira et al., (2017) ao estudarem o fungo endofítico *D. miriciae*, isolado de *Vellozia gigantea* do Brasil, isolaram o composto epoxicitocalasina H, que apresentou atividade contra cepa de *P. falciparum* resistente W2, com valor de IC₅₀ de 0.039 µg/ml, valor superior ao encontro em nosso estudo. A revisão realizado por Yang et al., (2018), identificou 255 produtos naturais de fungos, que podem possuir atividade antimalárica e estes, podem ser classificados como sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, alcalóides, peptídeos depsipeptídeos, xantonas, antraquinonas, antronas, bioxantracenos, bixantonas, preussotomerinas, depsidonas, fenóis, azaphliones, macrolídeos e esteroides. Demonstrando, desta forma que os fungos são uma importante fonte de novas substâncias ativas que ser usados como possíveis agentes antimaláricos.

Quatro compostos (fomoxidieno C, micoepoxidieno, desacetilmicoepoxidieno e fomoxidieno A) obtidos de *Phomopsis* sp. BCC 45011, apresentaram atividades antimalárica contra *P. falciparum* K1 com valores de IC₅₀ entre 2.41 e 3.52 µg/mL (Kornsakulkarn et al., 2015). O composto phomoarcherins AC isolado a partir de *Ph. archeri* exibiu atividade antimalárica contra *P. falciparum* com IC₅₀ de 0.79 µg/mL (Hemtasin et al., 2011). Tansuwan et al., (2007), identificou dois novos compostos: 2-cloro5-metoxi-3-metilciclohexa-2, 5-dieno-1,4-diona e xilariaquinona A, de *Xylaria* sp. PBR-30, os compostos exibiram atividade contra a cepa de *P. falciparum* K1 com IC₅₀ de 1.84 e 6.68 µM, respectivamente. Toghueo et al., (2021), isolou o composto aurasperona A do fungo *Aspergillus niger* 58, esse composto exibiu atividade contra a cepa resistente de *P. falciparum* (*Pf* INDO) com o valor de IC₅₀ de 1.76 µg/mL.

A necessidade de novos antimaláricos ainda é uma urgência impulsionada pelo fardo alarmante da doença em regiões endêmicas, com muitas pessoas morrendo anualmente. Nós identificamos um fungo de ambiente aquático da Amazônia *D. ueckerae* 1242, como tendo metabólito ativo contra os parasitas da malária. Este trabalho acrescenta credibilidade à noção de que os extratos de fungos isolados de ambientes aquáticos da Amazônia são depósitos potenciais para metabólitos bioativos potentes que podem ser aproveitados para combater o parasita da malária e reduzir o fardo desta doença em todo o mundo.

4. Conclusão

Neste estudo, identificamos que os extratos do meio líquido de fungos de ambientes aquáticos na região Amazônica apresentam atividade antimalárica *in vitro* frente à cepa K1 de *P. falciparum*. O extrato do fungo *D. ueckerae* 1242 foi o mais ativo, apresentando valor de CI_{50} de 0.054 $\mu\text{g/mL}$. Foi realizado o fracionamento bioguiado pela atividade antimalárica *in vitro* do extrato deste fungo. Após o fracionamento foram realizados novos ensaios quanto à atividade antimalárica contra o *P. falciparum* e foi demonstrado que o composto identificado como citocalasina H (4) era a principal responsável por tal atividade, sendo este um candidato a medicamento antimalárico em potencial.

Agradecimentos

Agradecemos à Central Analítica - Centro de Apoio Multidisciplinar, da Universidade Federal do Amazonas (CAM / UFAM), à Embrapa Amazônia Ocidental (EMBRAPA) e o Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001, pelo projeto Pró-Amazônia: Biodiversidade e Sustentabilidade (processo número 23038.009442 / 2013-12).

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

5. Referências

- Abrantes, J. (2006). Estudo da atividade anti-HSV-1 de terpenos isolados de algas pardas marinhas (Dissertação - Mestrado em Neuroimunologia), Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói.
- Ahmed, S. A., Gogal Jr, R. M., & Walsh, J. E. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*, 170(2), 211-224.
- Alhadrami, H. A., Thissera, B., Hassan, M. H., Behery, F. A., Ngwa, C. J., Hassan, H. M., ... & Rateb, M. E. (2021). Bio-Guided Isolation of Antimalarial Metabolites from the Coculture of Two Red Sea Sponge-Derived Actinokineospora and Rhodococcus spp. *Marine Drugs*, 19(2), 109.
- Andrade-Neto, V. F., Pohlit, A. M., Pinto, A. C. S., Silva, E. C. C., Nogueira, K. L., Melo, M. R., ... & Vieira, P. P. R. (2007). In vitro inhibition of Plasmodium falciparum by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(3), 359-366.
- Ashley, E. A., Pyae Phyo, A., & Woodrow, C. J. (2018). Malaria. *The Lancet*, 391(10130), 1608–1621. doi:10.1016/s0140-6736(18)30324-6
- Brissow, E. R., da Silva, I. P., de Siqueira, K. A., Senabio, J. A., Pimenta, L. P., Januário, A. H., ... & Soares, M. A. (2017). 18-Des-hydroxy Cytochalasin: an antiparasitic compound of Diaporthe phaseolorum-92C, an endophytic fungus isolated from Combretum lanceolatum Pohl ex Eichler. *Parasitology research*, 116(7), 1823-1830.
- Charman, S. A., Andreu, A., Barker, H., Blundell, S., Campbell, A., Campbell, M., ... & Abba, N. (2020). An in vitro toolbox to accelerate anti-malarial drug discovery and development. *Malaria journal*, 19(1), 1-27.
- Chepkirui, C., & Stadler, M. (2017). The genus Diaporthe: a rich source of diverse and bioactive metabolites. *Mycological Progress*, 16(5), 477-494.
- Cowell, A. N., & Winzeler, E. A. (2019). The genomic architecture of antimalarial drug resistance. *Briefings in functional genomics*, 18(5), 314-328.
- El-Elmat, T., Raja, H. A., Figueroa, M., Al Sharie, A. H., Bunch, R. L., & Oberlies, N. H. (2021). Freshwater Fungi as a Source of Chemical Diversity: A Review. *Journal of Natural Products*, 84(3), 898-916.
- Ferreira, M. C., Cantrell, C. L., Wedge, D. E., Gonçalves, V. N., Jacob, M. R., Khan, S., ... & Rosa, L. H. (2017). Antimycobacterial and antimalarial activities of endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic neotropical plant Vellozia gigantea from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112, 692-697.
- Flores, A. C., Pamphile, J. A., Sarragiotto, M. H., & Clemente, E. (2013). Production of 3-nitropropionic acid by endophytic fungus Phomopsis longicolla isolated from

- Trichilia elegans A. JUSS ssp. elegans and evaluation of biological activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 923-932.
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1323-1330.
- Gomes, R. R., Glienke, C., Videira, S. I. R., Lombard, L., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). Diaporthe: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 31, 1.
- Heidarzadeh, S., Motalleb, G., & Zorriehzahra, M. J. (2019). Evaluation of Tumor Regulatory Genes and Apoptotic Pathways in The Cytotoxic Effect of Cytochalasin H on Malignant Human Glioma Cell Line (U87MG). *Cell Journal (Yakhteh)*, 21(1), 62.
- Hemtasin, C., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Hahnvajjanawong, C., Soyong, K., Prabpai, S., & Kongsaree, P. (2011). Cytotoxic pentacyclic and tetracyclic aromatic sesquiterpenes from *Phomopsis archeri*. *Journal of natural products*, 74(4), 609-613.
- Huang, X., Zhou, D., Liang, Y., Liu, X., Cao, F., Qin, Y., ... & Yang, R. (2019). Cytochalasins from endophytic *Diaporthe* sp. GDG-118. *Natural product research*, 1-8.
- Ibrahim, S. R., Mohamed, G. A., Al Haidari, R. A., El-Kholy, A. A., & Zayed, M. F. (2018). Potential anti-malarial agents from endophytic fungi: A review. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 18(13), 1110-1132.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780.
- Kornsakulkarn, J., Somyong, W., Supothina, S., Boonyuen, N., & Thongpanchang, C. (2015). Bioactive oxygen-bridged cyclooctadienes from endophytic fungus *Phomopsis* sp. BCC 45011. *Tetrahedron*, 71(48), 9112-9116.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Liu, Y., Ruan, Q., Jiang, S., Qu, Y., Chen, J., Zhao, M., ... & Cui, H. (2019). Cytochalasins and polyketides from the fungus *Diaporthe* sp. GZU-1021 and their anti-inflammatory activity. *Fitoterapia*, 137, 104187.
- Ma, Y., Wu, X., Xiu, Z., Liu, X., Huang, B., Hu, L., ... & Tang, X. (2018). Cytochalasin H isolated from mangrove-derived endophytic fungus induces apoptosis and inhibits migration in lung cancer cells. *Oncology reports*, 39(6), 2899-2905.
- Narayanan, A., Sindhe, K. M., & Rai, L. S. (2019). Drug Resistance in *Plasmodium* sp. and Novel Antimalarial Natural Products-Emerging Trends. *Phytochemistry: An in-silico and in-vitro Update*, 95-108.
- Patel, P., Bharti, P. K., Bansal, D., Ali, N. A., Raman, R. K., Mohapatra, P. K., ... & Singh, N. (2017). Prevalence of mutations linked to antimalarial resistance in

Plasmodium falciparum from Chhattisgarh, Central India: a malaria elimination point of view. *Scientific reports*, 7(1), 1-8.

Ramazani, A., Zakeri, S., Sardari, S., Khodakarim, N., & Djadid, N. D. (2010). In vitro and in vivo anti-malarial activity of *Boerhavia elegans* and *Solanum surattense*. *Malaria Journal*, 9(1), 1-8.

Rambaut, A. (2020). FigTree ver. 1.4. 4. 2018. Disponível em: <https://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>. Acesso em: 20 abr. 2021.

Reimão, J. Q. (2009). Estudo da atividade anti-leishmania de compostos de invertebrados marinhos brasileiros.

Soares, D. A., De Oliveira, D. P., Dos Santos, T. T., Marson, P. G., & Pimenta, R. S. (2018). Multiloci identification of *Diaporthe* fungi isolated from the medicinal plant *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae). *Journal of applied microbiology*, 125(1), 172-180.

Souza, A. Q. L., de Souza, A. D. L., Astolffi Filho, S., Belém Pinheiro, M. L., de Moura Sarquis, M. I., & Pereira, J. O. (2004). Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from amazonian toxic plants: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich and *Strychnos cogens* bentham. *Acta amazônica*, 34(2), 185-196.

Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.

Tansuwan, S., Pornpakakul, S., Roengsumran, S., Petsom, A., Muangsinsin, N., Sihanonta, P., & Chaichit, N. (2007). Antimalarial benzoquinones from an endophytic fungus, *Xylaria* sp. *Journal of natural products*, 70(10), 1620-1623.

Tao, Y., Zeng, X., Mou, C., Li, J., Cai, X., She, Z., ... & Lin, Y. (2008). 1H and 13C NMR assignments of three nitrogen containing compounds from the mangrove endophytic fungus (ZZF08). *Magnetic Resonance in Chemistry*, 46(5), 501-505.

Toghueo, R. M. K., Kemgne, E. A. M., Sahal, D., Yadav, M., Kagho, D. U. K., Yang, B., ... & Boyom, F. F. (2021). Specialized antiplasmodial secondary metabolites from *Aspergillus niger* 58, an endophytic fungus from *Terminalia catappa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 269, 113672.

Trager, W., & Jensen, J. B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193(4254), 673-675

Udayanga, D., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Chukeatirote, E., and Hyde, K. D. (2015). The *Diaporthe sojae* species complex: Phylogenetic re-assessment of pathogens associated with soybean, cucurbits and other field crops. *Fungal Biology* 119, 383-407.

Udayanga, D., Liu, X., McKenzie, E. H., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H., & Hyde, K. D. (2011). The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal diversity*, 50(1), 189-225.

Wells, J. M., Cutler, H. G., & Cole, R. J. (1976). Toxicity and plant growth regulator effects of cytochalasin H isolated from *Phomopsis* sp. *Canadian journal of microbiology*, 22(8), 1137-1143.

WHO - World Health Organization (2021). Malaria. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>>. Acesso em: 20 abr. 2021.

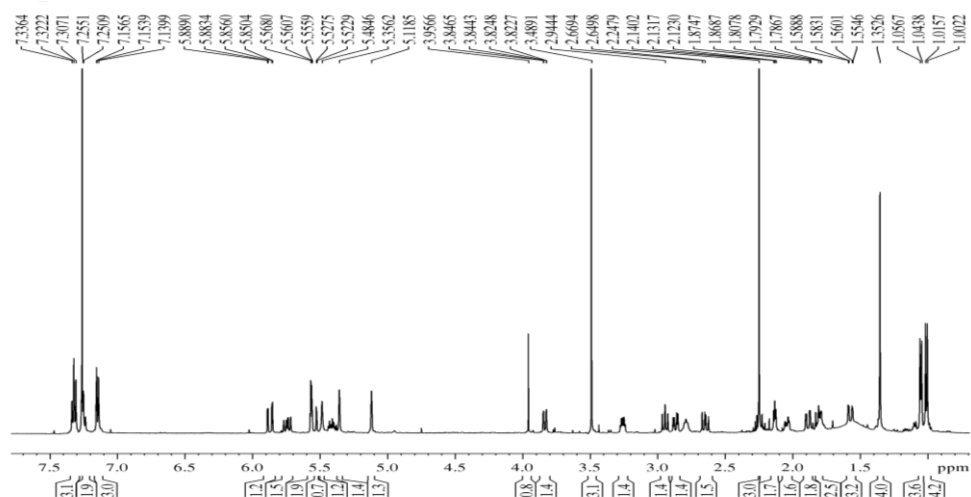
Xu, T. C., Lu, Y. H., Wang, J. F., Song, Z. Q., Hou, Y. G., Liu, S. S., ... & Wu, S. H. (2021). Bioactive secondary metabolites of the genus *diaporthe* and anamorph *phomopsis* from terrestrial and marine habitats and endophytes: 2010–2019. *Microorganisms*, 9(2), 217.

Yang, B., Huang, J., Zhou, X., Lin, X., Liu, J., Liao, S., ... & Liu, Y. (2018). The fungal metabolites with potential Antiplasmodial activity. *Current medicinal chemistry*, 25(31), 3796-3825.

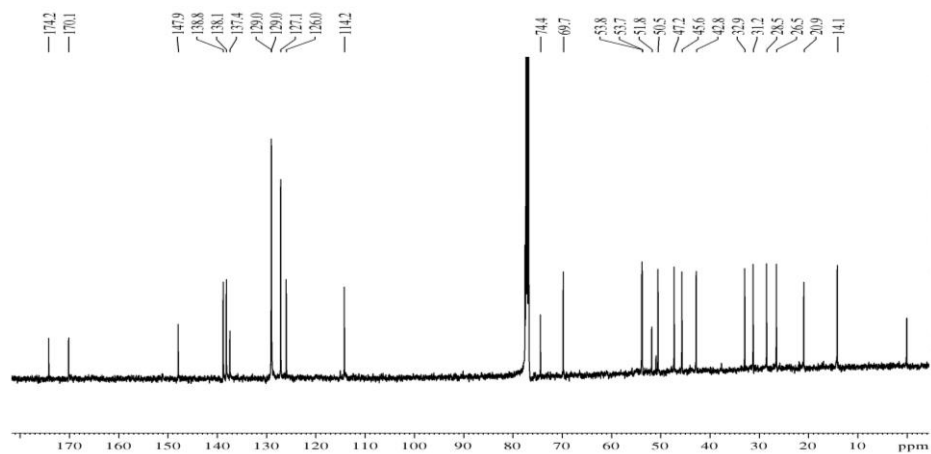
Zekar, L., & Sharman, T. (2020). *Plasmodium Falciparum* Malaria. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); PMID: 32310422.

Material Suplementar

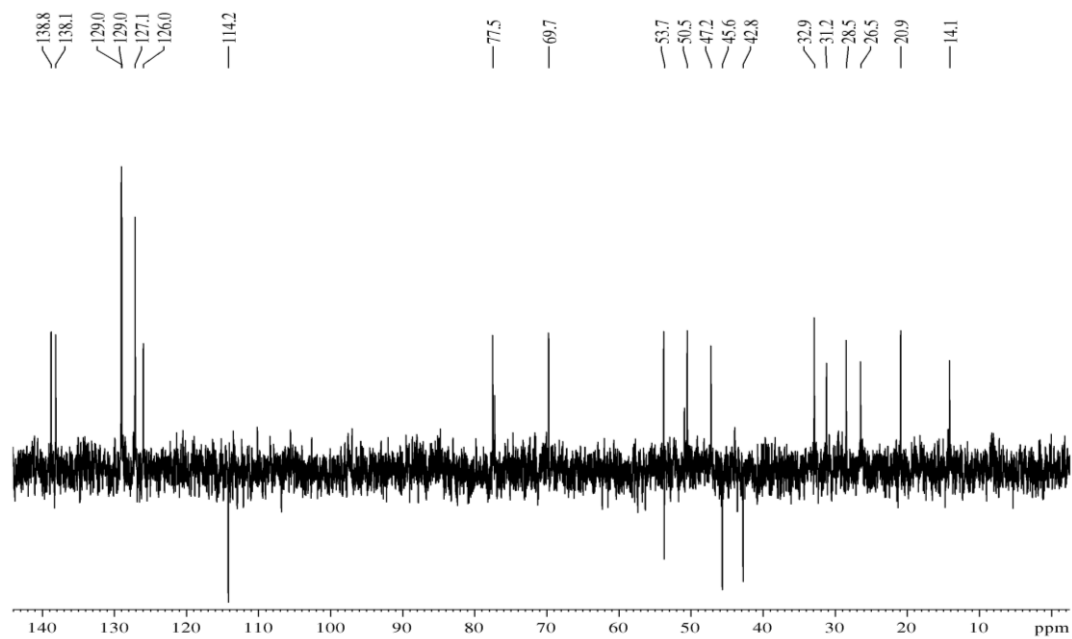
Material Suplementar Figura 1: Espectro de RMN de ^1H (500/125 MHz) do composto 4 (citocalasina H) em CDCl_3 .



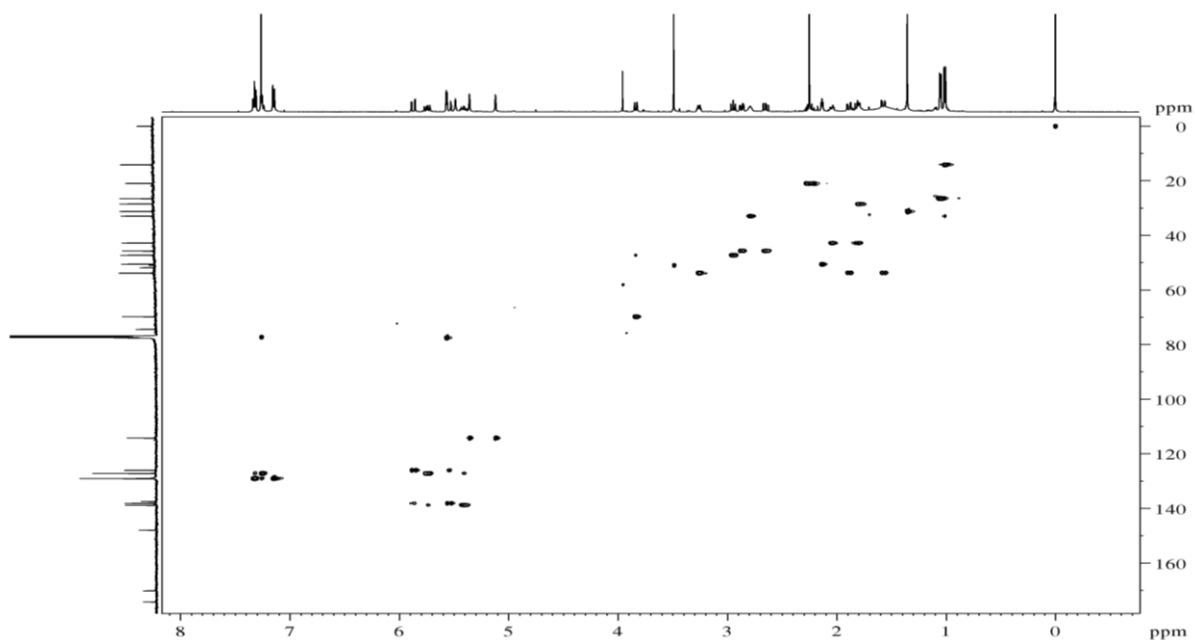
Material Suplementar Figura 2: Espectro de RMN de ^{13}C (500/125 MHz) do composto 4 (citocalasina H) em CDCl_3 .



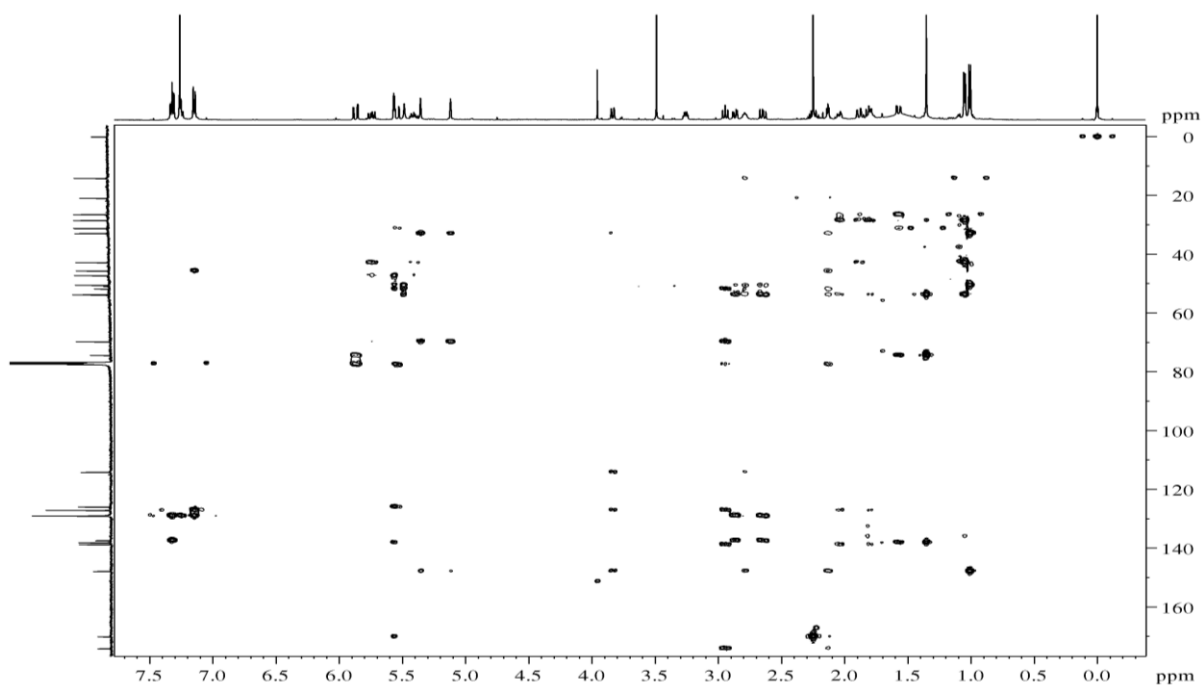
Material Suplementar Figura 3: Espectro de DEPT 135 (500/125 MHz) do composto 4 (**citocalasina H**) em CDCl_3 .



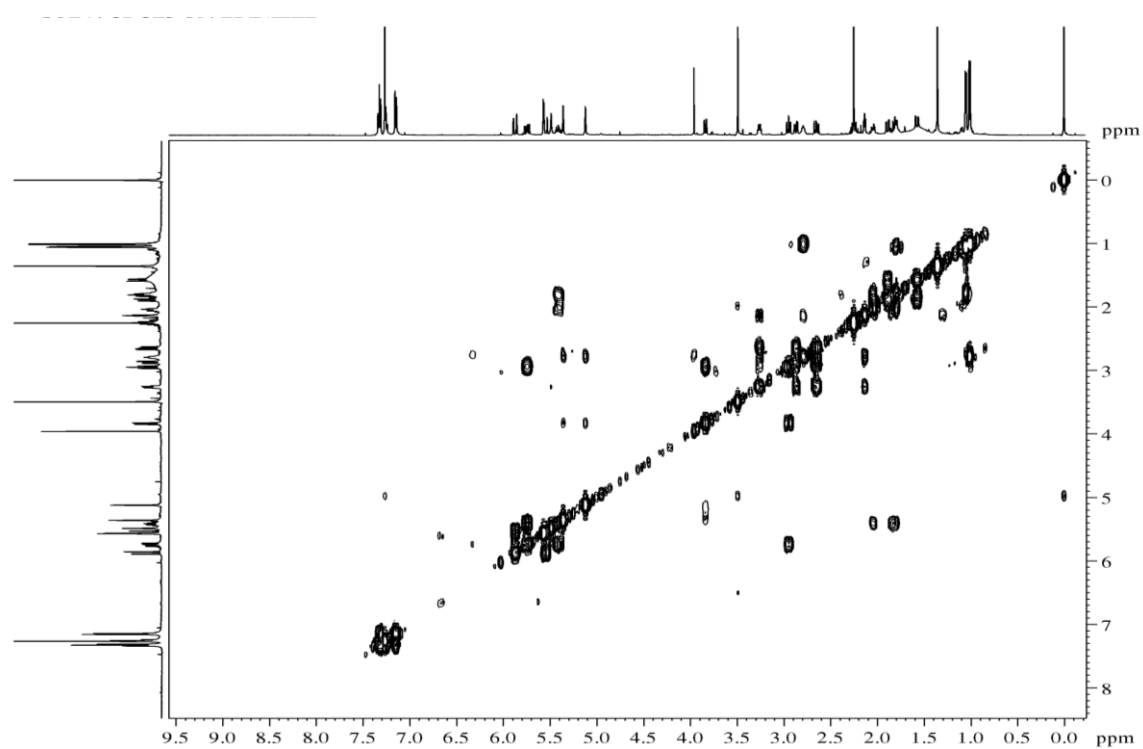
Material Suplementar Figura 4: Espectro de HSQC (500/125 MHz) do composto 4 (**citocalasina H**) em CDCl_3 .



Material Suplementar Figura 5: Espectro de HMBC (500/125 MHz) do composto 4 (citocalasina H) em CDCl₃.



Material Suplementar Figura 6: Espectro de HMBC (500/125 MHz) do composto 4 (citocalasina H) em CDCl₃.



Material Suplementar Tabela 1: Dados de RMN 1D e 2D do composto 4 (citocalasina H), 500/125 MHz; ppm; CDCl₃.

RMN de ¹³ C (δC)			RMN de ¹ H (δH)		
Posição	Obs.		H	HMBC	COSY
1	174,2	C	-	2,13; 2,94; 5,55	-
3	53,7	CH ₂	1,57 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 14,3; 3,0 Hz) 1,90 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 14,3; 3,0 Hz)	1,35; 1,81; 2,04	1,90 1,57
4	50,5	CH	2,13 (<i>tl</i> , <i>J</i> = 4,3 Hz)	1,00; 2,65; 2,78; 2,86; 5,55	3,26
5	32,9	CH	2,80 (<i>m</i>)	1,00; 2,13; 3,26; 3,84; 5,12; 5,35	1,00; 5,12; 5,36
6	147,9	C	-	1,00; 2,13; 2,78; 2,94; 3,84; 5,12; 5,36	-
7	69,7	CH	3,84 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 10,8; 1,2 Hz)	2,94; 5,12; 5,35	2,94; 5,12; 5,36
8	47,2	CH	2,94 (<i>t</i> , <i>J</i> = 10,2 Hz)	5,55	3,84; 5,75
9	51,8	C	-	2,13; 2,94; 5,55	-
10	45,6	CH ₂	2,65 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 13,4; 9,8 Hz) 2,86 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 13,7; 4,5 Hz)	2,13; 7,16	3,26 3,26
11	14,1	CH ₃	1,00 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,7 Hz)	2,78	2,78
12	114,2	CH ₂	5,12 (<i>sl</i>) 5,36 (<i>sl</i>)	2,78; 3,84	3,84; 2,80 3,84; 2,80
13	127,1	CH	5,75 (<i>dddd</i> , <i>J</i> = 1,0; 7,0; 9,7)	1,81; 2,04; 2,94; 3,84	2,94
14	138,8	CH	5,41 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 10,5; 10,5; 5,0 Hz)	2,94; 2,04; 1,81	1,81; 2,04; 5,75
15	42,8	CH ₂	1,81 (<i>m</i>) 2,04 (<i>m</i>)	1,59; 1,90; 5,75	2,04; 5,42 1,81; 5,41
16	28,5	CH	1,80 (<i>m</i>)	1,35; 1,59; 1,81; 1,90; 2,04	1,05
17	53,7	CH ₂	1,59 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 14,3; 3,0 Hz) 1,90 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 14,3; 3,0 Hz)	1,35; 1,81; 2,04	1,90 1,59
18	74,4	C	-	1,35; 1,59; 1,90; 5,87	-
19	138,1	CH	5,55 (<i>qap</i> , <i>J</i> = 6,0; 2,4 Hz)	1,35; 1,59; 5,55	2,96; 5,87
20	126,0	CH	5,87 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 7,0; 1,3 Hz)	1,35; 5,55	5,55
21	77,5	CH	5,55 (<i>qap</i> , <i>J</i> = 6,0; 2,4 Hz)	2,13; 2,94; 5,55; 5,87	2,94
22	26,5	CH ₃	1,05 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,7 Hz)	1,59; 1,90; 2,04	1,80
23	31,2	CH ₃	1,35 (<i>s</i>)	1,59; 5,55	3,5
24	170,1	C	-	5,55; 2,26	-
25	20,9	CH ₃	2,26 (<i>s</i>)		
1'	137,4	C	-	2,65; 2,86; 7,34	-
2'	129,0	CH	7,16 (<i>ddap</i> , <i>J</i> = 7,0; 1,3 Hz)	2,65; 2,86; 7,16; 7,27; 7,34	7,32
3'	128,9	CH	7,32 (<i>tap</i> , <i>J</i> = 7,0 Hz)		7,16
4'	127,1	CH	7,27 (<i>m</i>)	1,81; 2,04; 2,94; 3,84; 7,16	
5'	128,9	CH	7,32 (<i>tap</i> , <i>J</i> = 7,0 Hz)	2,94	7,16
6'	129,0	CH	7,16 (<i>ddap</i> , <i>J</i> = 7,0; 1,3 Hz)	2,65; 2,86; 7,16; 7,27; 7,34	7,32

9. CAPÍTULO V

Antimicrobial and cytotoxic activity of fungal mycelial extracts from aquatic environments in the Amazon³

Marta Rodrigues de Oliveira, Sarah Sarah Raquel Silveira da Silva Santiago, Ricardo de Melo Katak, Marlene Rodrigues Marcelino Camargo, Ivanildes dos Santos Bastos, Patrícia Puccinelli Orlandi, Wanderli Pedro Tadei, Afonso Duarte Leão de Souza, Antonia Queiroz Lima de Souza.

Neste capítulo foi avaliada a atividade antimicrobiana e citotóxica de metabólitos extraídos de micélios de fungos isolados de amostras de águas no estado do Amazonas. Foram estudados extratos de 12 linhagens fúngicas, avaliadas frente aos patógenos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *C. tropicalis* no ensaio antimicrobiano e no ensaio de citotoxicidade foi utilizada a linhagem VERO (ATCC® CCL-81TM). Os resultados obtidos mostraram que os extratos testados apresentam potencial antimicrobiano, sendo cinco extratos ativos contra cepas de *Candidas* e dos extratos ativos somente dois são potencialmente citotóxicos, exibindo viabilidade menor que 70%.

³ Artigo submetido à revista *Research, Society and Development* (ISSN 2525-3409) em Julho de 2021 e aceito para publicação em Agosto de 2021.

Antimicrobial and cytotoxic activity of fungal mycelial extracts from aquatic environments in the Amazon

Atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos miceliais de fungos de ambientes aquáticos da Amazônia

Actividad antimicrobiana y citotóxica de extractos miceliales de hongos de ambientes acuáticos en la Amazonía

Received: 07/27/2021 | Reviewed: 07/31/2021 | Accept: 08/05/2021 | Published: 08/10/2021

Marta Rodrigues de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6065-7480>

Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas - PPG-BIONORTE/UFAM, Brasil.

E-mail: mro.dbb@uea.edu.br

Sarah Raquel Silveira da Silva Santiago

<https://orcid.org/0000-0002-6943-8436>

Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas - PPG-BIONORTE/UFAM, Brasil.

E-mail: srhraquel@gmail.com

Ricardo de Melo Katak

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5318-4884>

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas - PPGBIOTEC/UFAM, Brasil.

E-mail: ricardokatak@gmail.com

Marlene Rodrigues Marcelino Camargo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0953-8507>

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas - PPGBIOTEC/UFAM, Brasil.

E-mail: marlene.camrr@gmail.com

Ivanildes dos Santos Bastos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8333-6885>

Instituto Leônidas e Maria Deane-Fiocruz Amazônia, Manaus 69057-070, Amazonas, Brasil.

E-mail: ivanildessantos21@hotmail.com

Patrícia Puccinelli Orlandi

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2104-577X>

Instituto Leônidas e Maria Deane-Fiocruz Amazônia, Brasil.

E-mail: patricia.orlandi@fiocruz.br

Wanderli Pedro Tadei

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0612-3285>

Laboratório de Malária e Dengue, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – LMD/INPA, Brasil.

† in memoriam.

Afonso Duarte Leão de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7007-3991>

Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas - PPG-BIONORTE/UFAM, Brasil.

Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas – DQ/UFAM, Brasil.

Central Analítica - Centro de Apoio Multidisciplinar, Universidade Federal do Amazonas – CA - CAM/UFAM, Brasil.

E-mail: souzadq@ufam.edu.br

Antonia Queiroz Lima de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5602-8617>

Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas - PPG-BIONORTE/UFAM, Brasil.

Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas – FCA/UFAM, Brasil.

E-mail: antoniaqueiroz@ufam.edu.br

Abstract

Fungi are a prolific source of biologically active metabolites, including a wide range of clinically important drugs. Therefore, this study aims to evaluate the antimicrobial and cytotoxic activity of secondary metabolites extracted from fungal mycelia isolated from freshwater samples in the state of Amazonas. Mycelial extracts from 12 fungal were used, extracted with MeOH/AcOEt (1:1) according to the criteria established by Souza et al. (2004). For antimicrobial activity, the extracts were tested against the pathogens *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Candida*

albicans and *C. tropicalis*. To identify the minimum inhibitory dosage (MID) the microdilution method was used. To perform the cytotoxicity assay, the VERO strain (ATCC® CCL-81TM) was used. The assays were determined by the Alamar Blue method according to Ahmed *et al.* (1994). The tested extracts did not show antibacterial activity. Five extracts (41.7%), obtained from the fungi *Aspergillus* - 1283, *Chrysosporthe* - 1169, *Diaporthe* - 1203, *Fusarium* - 1085, and *Trichoderma*, showed antifungal activity against *C. albicans*. *Diaporthe* extract (8.3%) - 1203 was active against *C. tropicalis*. In the cytotoxicity assay, 58.3% of the evaluated extracts showed no significant toxic effect. Five extracts, *Cladosporium* - 1135, *Chrysosporther* - 1169, *Cytospora* - 1098, *Fusarium* - 1085, and *Talaromyces* - 1244, showed cytotoxic potential, exhibiting viability lower than 70%. The results obtained suggest that mycelial extracts of fungi isolated from water samples from the Amazon region have potential against yeasts of medical interest. Only two of the active extracts were revealed potentially cytotoxic.

Keywords: Antifungal activity; Cytotoxicity; Bioactive metabolites.

Resumo

Os fungos são uma fonte prolífica de metabólitos biologicamente ativos, incluindo uma ampla gama de drogas clinicamente importantes. Portanto, este estudo tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e citotóxica de metabólitos secundários extraídos de micélios fúngicos isolados de amostras de água doce do estado do Amazonas. Foram utilizados extratos miceliais de 12 fungos, extraídos com MeOH/ AcOEt (1:1) de acordo com os critérios estabelecidos por Souza *et al.* (2004). Para atividade antimicrobiana, os extratos foram testados contra os patógenos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *C. tropicalis*. Para identificar a dosagem inibitória mínima (MID) foi utilizado o método de microdiluição. Para a realização do ensaio de citotoxicidade, foi utilizada a cepa VERO (ATCC® CCL-81TM). Os ensaios foram determinados pelo método Alamar Blue de acordo com Ahmed *et al.* (1994). Os extratos testados não apresentaram atividade antibacteriana. Cinco extratos (41,7%), obtidos dos fungos *Aspergillus* - 1283, *Chrysosporthe* - 1169, *Diaporthe* - 1203, *Fusarium* - 1085 e *Trichoderma*, apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans*. O extrato de *Diaporther* (8,3%) - 1203 foi ativo contra *C. tropicalis*. No ensaio de citotoxicidade, 58,3% dos extratos avaliados não apresentaram efeito tóxico significativo e cinco extratos, *Cladosporium* - 1135, *Chrysosporther* - 1169, *Cytospora* - 1098, *Fusarium* - 1085 e *Talaromyces* - 1244, apresentaram potencial citotóxico exibindo viabilidade menor que 70%. Os resultados obtidos sugerem que extratos miceliais de fungos isolados de amostras de água da região amazônica apresentam potencial contra leveduras de interesse médico. Apenas dois dos extratos ativos foram potencialmente citotóxicos.

Palavras-chave: Atividade antifúngica; Citotoxicidade; Metabólitos bioativos.

Resumen

Los hongos son una fuente prolífica de metabolitos biológicamente activos, incluida una amplia gama de fármacos clínicamente importantes. Así, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana y citotóxica de metabolitos secundarios extraídos de micelios fúngicos aislados de muestras de agua en el estado de Amazonas. Se utilizaron extractos miceliales de 12 hongos, extraídos con MeOH/ AcOEt (1:1) según los criterios establecidos por Souza *et al.* (2004). En la prueba antimicrobiana, los extractos fueron evaluados frente a los patógenos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* y *C. tropicalis*. Para identificar la dosis mínima inhibitoria (MID) se utilizó el método de microdilución. Para realizar el ensayo de citotoxicidad se utilizó la cepa VERO (ATCC® CCL-81TM). Los ensayos se determinaron mediante el método Alamar Blue según Ahmed *et al.* (1994). Los extractos probados no mostraron actividad antibacteriana. Cinco (41,7%) extractos obtenidos de los hongos *Aspergillus* - 1283, *Chrysosporthe* - 1169, *Diaporthe* - 1203, *Fusarium* - 1085 y *Trichoderma*, mostraron actividad antifúngica contra *C. albicans* y un extracto (8,3%) del hongo *Diaporther* - 1203 fue activo contra *C. tropicalis*. En el ensayo de citotoxicidad, el 58,3% de los extractos evaluados no mostraron ningún efecto tóxico significativo y cinco extractos, *Cladosporium* - 1135, *Chrysosporther* - 1169, *Cytospora* - 1098, *Fusarium* - 1085 y *Talaromyces* - 1244, mostraron potencial citotóxico con una viabilidad inferior al 70%. Los resultados obtenidos sugieren que extractos miceliales de hongos aislados de muestras de agua de la región amazónica tienen potencial contra levaduras de interés médico. Solo dos de los extractos activos fueron potencialmente citotóxicos.

Palabras clave: Actividad antifúngica; Citotoxicidad; Metabolitos bioactivos.

1. Introduction

Antimicrobial resistance is a major public health problem worldwide and jeopardizes the effectiveness of preventing and treating an increasing number of infectious diseases caused by viruses, bacteria, fungi, and parasites according to the Pan American Health Organization (PAHO, 2020).

The need to control emerging diseases or resistant strains requires the constant search for new sources of antimicrobial compounds with new action mechanisms, not only for human use but also for use in livestock (Santos et al., 2015; Premjanu & Jaynthy, 2015). Antimicrobials are natural or synthetic compounds capable of inhibiting or killing microorganisms through specific interactions with their targets, regardless of the compound source or its class (Davies & Davies, 2010).

Currently, natural products and their derivatives are still the most important resources for new drugs discovery (Ayoub et al., 2014; Atanasov et al., 2021). Fungi are considered an important source of biologically active secondary metabolites, including a wide variety of clinically important drugs (Hoeksma et al., 2019). Fungi have a chemical and biological rich diversity. Historically they have given rise to many new drugs and may hold the key to dealing with emerging antimicrobial resistances.

Fungi are excellent producers of hydrolytic enzymes, biofuels, organic acids, polysaccharides, and secondary metabolites, such as antibiotics, anticancer drugs, hypocholesterolemic agents, immunosuppressants, among other (Sanchez & Demain, 2017), which make them attractive for the discovery of new bioactive molecules with antimicrobial properties.

Given the economic and industrial importance of fungi, the aquatic environment is an important place to expand the discovery of new fungal species and new biological properties (Heo et al., 2019). According to Wurzbacher et al. (2016), freshwater ecosystems are neglected and harbor high microbial diversity. Magwaza et al. (2017), points out that freshwater fungi produce a wide variety of antimicrobial metabolites, which help them to compete against other microorganisms.

Considering the high fungi biodiversity estimates and the notion that only a small fraction of them have been biologically tested for active compounds production, it is evident that there is a great number of bioactive compounds yet to be discovered (Hoeksma et al., 2019). The isolation and identification of new fungal strains are the first steps towards the discovery of new metabolites with antimicrobial activities. This is more imperious for the Amazon region, which has one of the richest biodiversity on the planet but still has insufficient studies to cover all this diversity (Oliveira et al., 2021). In this context, we present an evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of extracts from mycelia of fungi isolated from freshwater samples in the Amazonas state.

2. Methodology

2.1 Fungal material

In this study, 12 fungal strains isolated from freshwater samples collected from aquatic environments in the State of Amazonas were used. The fungal isolates were obtained from the collection of microorganisms at the Laboratory of Bioassays and Microorganisms of the Amazon of the Federal University of Amazonas (LabMicrA/UFAM), registered under the SisGen (National System for the Management of Genetic Heritage and Traditional Knowledge Associated) with the number: AD64E07. All the strains were previously identified up to genus level by LabMicrA through macro and micro

morphological analysis of their structures and by rDNA sequence analysis with an internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2).

2.2 Production of fungal extracts

Fungi were reactivated in Petri plates containing PDA+L culture medium (potato, dextrose, and agar, with 0.2% yeast extract), cultivated at 26 °C for eight days. After this period, five fragments of 1 cm² from each fungus culture were inoculated into a 1000 mL Erlenmeyer containing 300 mL of PD+L liquid culture medium under sterile conditions (Souza et al., 2004) and maintained at 26°C, in static mode and in the absence of light.

The cultivation time of each fungus was determined until the glucose level in the culture was consumed. Then, the mycelium was separated from the culture medium by filtration on Whatman paper, n° 4. The mycelial mass obtained was covered with a mixture of ethyl acetate and methanol 1:1 (v/v) and kept in maceration for 48 hours, followed by filtration. This process of extraction was repeated more twice every 24 hours. Afterward, the extracts were combined and concentrated in a rotary evaporator at 45 °C. The samples obtained were kept in a desiccator with activated silica to obtain dry mycelial extracts.

2.3 Antimicrobial assay

To carry out the antimicrobial assay of the mycelial extracts of the studied fungi, pathogenic strains of bacteria and yeasts obtained from the Cefar Diagnóstica (CCCD) collection were used. Yeasts: *C. albicans* (CC 001) and *C. tropicalis* (CC 002) were reactivated in solid medium Sabouraud (SB) agar (Himedia®), at 36 ± 1° C for 48 hours. Bacteria: *Staphylococcus aureus* (S 007), *Escherichia coli* (E 004), *Pseudomonas aeruginosa* (P 004), and *Enterococcus faecalis* (E 002) were reactivated in Brain and Heart Infusion (BHI) agar (Himedia®), also at 36 ± 1°C, but only for 24 hours.

After reactivation of the pathogens, a pure culture of each strain was transferred to a test tube containing 5 mL of SB broth and BHI broth and kept at 36 ± 1 °C for 24 hours. Then, the concentrations of the colonies to be used in the tests was adjusted to achieve 2.5 x 10³ CFU/mL for yeast (CLSI, 2002) and 5 x 10⁵ CFU/mL for bacteria (CLSI, 2003). The samples of the fungi mycelial extracts were weighed and solubilized at a concentration of 2 mg/mL (stock solution) in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO).

For negative control, 10% DMSO solution was utilized, and positive control was performed using antibiotics at a concentration of 2 mg/mL, tetracycline for *E. coli* and *P. aeruginosa*, ampicillin for *S. aureus* and *E. faecalis*, and nystatin for *C. albicans* and *C. tropicalis*.

To determine the antimicrobial activity, a screening of the fungal extracts was initially carried out to verify their effectiveness against the tested pathogens. The screening was performed in 96-well Elisa microplates, where it was added in triplicate, 100 µL of the culture medium in doubled concentration (2x), 100 µL of the stock extract solution (2 mg/mL), and 10 µL of the pathogen cells suspension to be assayed, reaching a final pathogen concentration of 2.5 x 10³ for yeasts and 5 x 10⁵ for bacteria. Finally, the plates were incubated at 36 ± 1 °C for 24 hours. After incubation, 10 µl of 1% of a revelator, NBT (Nitroblue Tetrazolium) for fungal and TTC (2,3,5-2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride) for bacteria were added to all wells. When microbial growth occurs, the color in the well changes.

With the positive results of the screening, the successive dilution test was performed to determine the minimum inhibitory dosage (MID). In an Elisa plate were added in triplicate, 100 µL of the extract to the first well, with 100 µL of the culture medium in doubled concentration (2x). After homogenization, 100

μL was transferred from the first well to the subsequent one (B1, B2, B3), successively performing the dilutions in each well. The extract concentrations obtained after serial dilutions resulted in eight concentrations ranging from 1 to 0,0078125 mg/mL (CLSI, 2012). The same serial dilution procedure was performed for the positive and negative controls.

Subsequently, 10 μL of the pathogen cells suspension was added to all wells to achieve the same concentration as in the screening assay above. The plates were incubated at $36 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 hours. After this period, 10 μL of 1% revelators were added: NBT in wells with fungal inoculum and TTC in wells with bacterial inoculum. As a control, 10 μL of the tested pathogen cells suspension were inoculated on a plate with a solid medium to verify the microbial growth or its absence, being defined as fungicidal or bactericidal the complete absence of microbial growth and fungistatic or bacteriostatic the reduction of microbial growth.

2.4 In vitro cytotoxicity assay

To perform the cytotoxicity assay, the fungal extracts were solubilized in 0.5% dimethylsulfoxide (DMSO) and tested in eight concentrations, from 50 to 0.39 $\mu\text{g/mL}$. The VERO strain (ATCC® CCL-81TM) utilized was acquired from the American Type Culture Collection, grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), and supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (Gibco) and penicillin (50 $\mu\text{g/ml}$). All tests were performed in triplicate.

Assays were determined by the Alamar Blue method according to Ahmed et al. (1994). The cells suspension was plated at a concentration of 1.0×10^4 cells/well in 96 well Elisa plates and treated with extracts at the determined concentrations, totalizing a final volume of 200 μL . The plates were kept in a CO_2 incubator for 24 hours with 5% CO_2 at 37°C . After this period, 10 μL of 0.4% resazurin (diluted 1:20) was added to each well and the Alamar Blue™ (Sigma-Aldrich) metabolization time of 2 hours was awaited. Fluorescence was monitored in a microplate reader (GloMax® Explorer) with emission of wavelengths between 580 and 640 nm and an excitation of 520 nm.

The cell growth was used as a positive control, and 0.1% DMSO was used as a negative control. The percentage of cell viability was calculated according to the formula: %Viability= $F_t \times 100/F_b$, where F_t = (cell fluorescence + medium + substance + resazurin) and F_b = (cell fluorescence + medium + resazurin).

The result evaluation was performed according to the criteria established by ISO (2009) - the lower the % viability value, the higher the cytotoxic potential of the tested material. If the viability is less than 70%, the tested sample has cytotoxic potential.

3. Results and Discussion

For the screening assay, all twelve mycelial extracts were tested for antimicrobial activity against six pathogens - two fungi (*C. albicans* - CC 001 and *C. tropicalis* - CC 002) and four bacteria (*S. aureus* - S 007, *E. coli* - E 004, *P. aeruginosa* - P 004, and *E. faecalis* - E 002). No extract showed antibacterial activity and five, representing 41.7% of the tested extracts showed antifungal activity. The active extracts come from five different fungal genera (*Diaporthe*, *Chrysosporthe*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, and *Fusarium*) (Table 1).

Table 1. Antimicrobial activity of mycelial fungal extracts isolated from aquatic environments in the State of Amazonas.

N°	Fungal strain	Code LabMicrA	Tested Pathogens					
			S 007	E 004	P 004	E 002	CC 001	CC 002
1	<i>Aspergillus</i>	1283	-	-	-	-	+	-
2	<i>Chrysosporthe</i>	1169	-	-	-	-	+	-
3	<i>Cladosporium</i>	1132	-	-	-	-	-	-
4	<i>Cladosporium</i>	1135	-	-	-	-	-	-
5	<i>Cytospora</i>	1098	-	-	-	-	-	-
6	<i>Diaporthe</i>	1203	-	-	-	-	+	+
7	<i>Epicoecum</i>	1248	-	-	-	-	-	-
8	<i>Fusarium</i>	1085	-	-	-	-	+	-
9	<i>Fusarium</i>	1280	-	-	-	-	-	-
10	<i>Sorocladium</i>	1266	-	-	-	-	-	-
11	<i>Talaromyces</i>	1244	-	-	-	-	-	-
12	<i>Trichoderma</i>	1136	-	-	-	-	+	-

LabMicrA - Collection of microorganisms from the Laboratory of Bioassays and Microorganisms of the Amazon of the Federal University of Amazonas. (-) = no antimicrobial activity; (+) = antimicrobial activity. Bacteria tested: *Staphylococcus aureus* (S 007), *Escherichia coli* (E 004), *Pseudomonas aeruginosa* (P 004), and *Enterococcus faecalis* (E 002). Tested fungi: *C. albicans* (CC 001) and *C. tropicalis* (CC 002).

For the minimum inhibitory dosage (MID) assay, it was observed that five extracts showed fungistatic activity against *C. albicans*, three at a concentration of 1 mg/mL (*Chrysosporthe* - 1169, *Diaporthe* - 1203, and *Fusarium* - 1085) and two at a concentration of 0,25 mg/mL (*Aspergillus* - 1283 and *Trichoderma* - 1136). The extract of *Diaporthe* - 1203 also had fungistatic activity against *C. tropicalis* at a concentration of 1 mg/mL and the extract of *Aspergillus* - 1283 showed fungicidal activity against *C. albicans* at a concentration of 1 mg/mL (Table 2).

Table 2. Identification of the minimum inhibitory dosage (MID) of mycelial extracts of fungi isolated from aquatic environments in the State of Amazonas against *Candida albicans* and *C. tropicalis*.

Fungal extracts (mg/mL)	Fungal strain	Code LabMicrA	ATMA	Tested Pathogens	
				<i>Candida albicans</i> (CC 001)	<i>Candida tropicalis</i> (CC 002)
				<i>Aspergillus</i>	1283
			++	1	-
	<i>Chrysosporthe</i>	1169	+	1	-
			++	-	-
	<i>Diaporthe</i>	1203	+	1	1
			++	-	-
	<i>Fusarium</i>	1085	+	1	-
			++	-	-
	<i>Trichoderma</i>	1136	+	0,25	-
			++	-	-

LabMicrA - Collection of microorganisms from the Laboratory of Bioassays and Microorganisms of the Amazon of the Federal University of Amazonas. ATMA - antimicrobial activity: (+) fungistatic, (++) fungicidal, and (-) without activity.

In studies investigating metabolites with antifungal activity, an extract having a MIC value of 0,1 – 1 mg/mL is considered an effective or significant extract (Simões et al., 2009; Kholoujini et al., 2019). They are called fungicides, extracts capable of causing death of fungus, and fungistatic extracts, those that promote the inhibition of microbial growth (Perussi, 2007). Therefore, five of the mycelial extracts evaluated in this study can be considered extracts with antimicrobial potential.

Diaporthe – 1203 mycelial extract did not show activity against bacterial pathogens. However, it was the only extract with activity against more than one pathogen, showing fungistatic activity against *C. albicans* and *C. tropicalis*. In the study by Dos Reis et al. (2019), *Diaporthe* extracts also showed antifungal potential, inhibiting the growth of different *Candida* species. Different results were found by Moreira et al. (2020), in a study in which the fungus *Diaporthe* showed promising antimicrobial activity against *S. aureus* and *E. coli* but no activity against *C. albicans*. Fungal species of the *Diaporthe* genus are commonly studied for their ability to generate metabolites with diverse biotechnological applications (Flores et al., 2013; Moreira et al., 2020). Yenn et al. (2017) isolated a new compound (3-hydroxy-5-methoxyhex-5-ene-2,4-dione) with fungicidal activity against *C. albicans* from a *Diaporthe* strain.

Aspergillus - 1283 mycelial extract showed the best performance in the antimicrobial test, despite also not presenting antibacterial activity. The strain demonstrated fungistatic and fungicidal activity against *C. albicans*. The results obtained are similar to those found by Sakhri et al. (2019), in which an *Aspergillus crebe* strain exhibited only antifungal activity when evaluated against the pathogens: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, and *C. glabrata*. *Aspergillus* genus has a worldwide distribution and contain a large number of species, which stands out for producing a range of natural products with biological activities (Lotfy et al., 2018), such as asperlicin, echinocandin B, and fumagillin isolated from *A. alliaceus*, *A. nidulans*, and *A. fumigatus* which are used as antifungal, angiogenesis inhibitor, and antiparasitic, respectively (Bracarense & Takahashi, 2014).

Trichoderma – 1136, *Chrysosporthe* – 1169, and *Fusarium* – 1085 mycelial extracts showed only antifungal activity against *C. albicans*. In former reports, *Trichoderma* species were reported for producing metabolites with activities against different microbial pathogens (Saravanakumar et al., 2018). *Chrysosporthe* sp. exhibited strong antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus* (Nirma et al., 2015); and *Fusarium* species produced metabolites with activities against microbial pathogens (Sibero et al., 2019). Besides, from *F. larvarum*, an antifungal compound active against *C. albicans* and a wide range of pathogenic fungi was isolated, called Parafungin (Harvey et al., 2015).

There is a growing demand for new antibacterial and antifungal compounds due to the constant increase in the number of people with health problems caused by pathogenic microorganisms resistant to existing antimicrobials (Xu et al., 2015; Sanchez & Demain, 2017). Fungal infections are considered a serious complication of immunosuppression and are associated with substantial utilization of health services and high mortality rates (Sharma & Chowdhary, 2017).

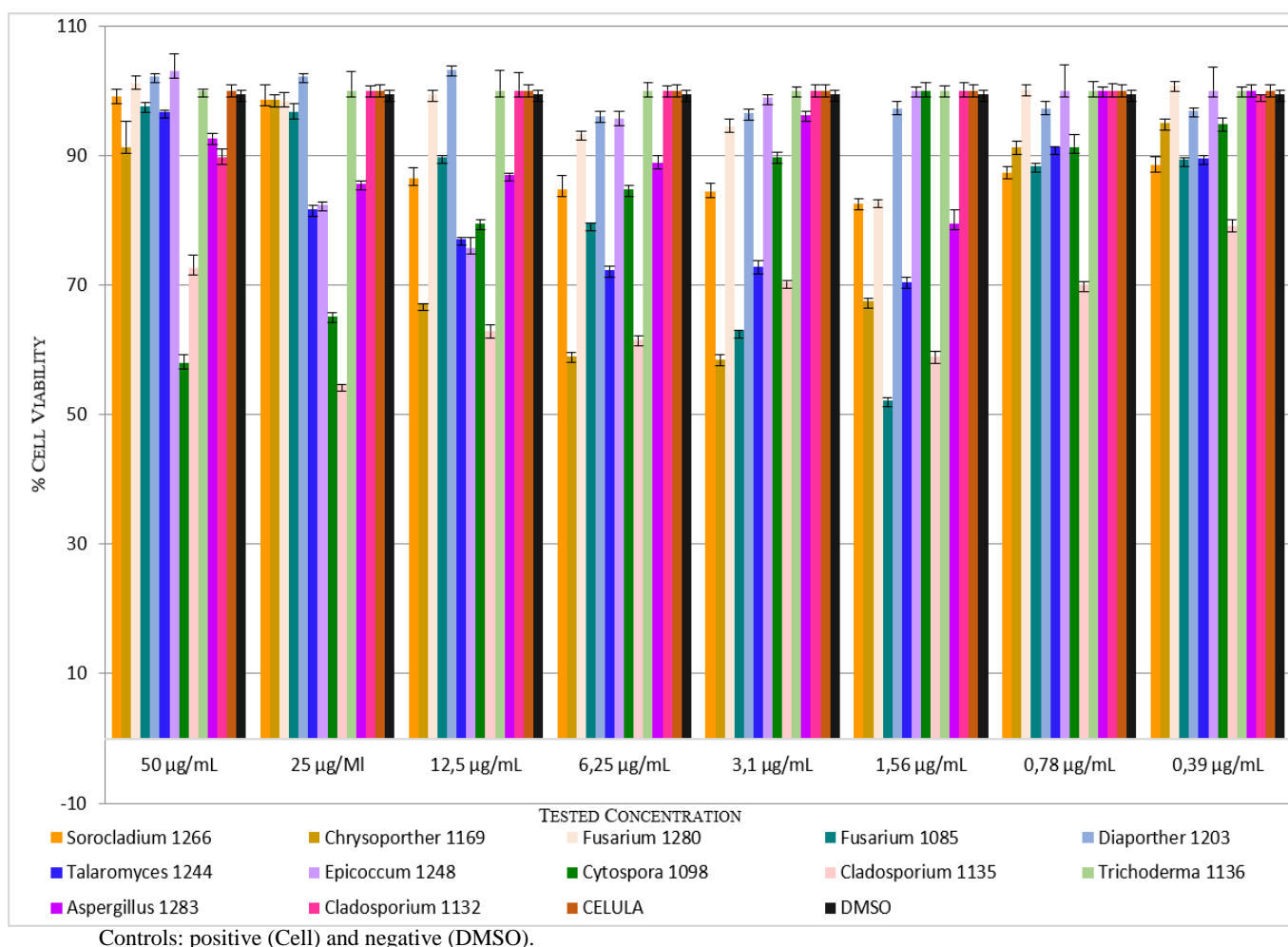
Microorganisms of the *Candida* genus are the main agents that cause fungal infections in the bloodstream, known as candidemia. It causes mortality rates varying from 15 to 35% and increases the period and costs of hospitalization, making the disease a serious public health problem, especially in developing countries (Canela et al., 2021). *C. albicans* and *C. tropicalis* are found in the microbiota of the reproductive and gastrointestinal mucosa, living symbiotically in about 50 -70% of healthy individuals

(Megri et al., 2020). However, these strains can become pathogenic through changes in the environment or in individuals with weakened immune systems (De Barros et al., 2018). *C. albicans* is known as the most prevalent cause of candidemia and *C. tropicalis* is the second most prevalent species in Brazil (Wille et al., 2013; Arastehfar et al., 2020).

According to Kholoujini et al. (2019) there are a small number of studies carried out in search of compounds with antifungal activity compared to the number of studies investigating antibacterial compounds. Considering the increase of fungal diseases, it is relevant to perform more research with this emphasis. As they are considered an important source of bioactive compounds, fungi have been important sources in the pursuit for new antibacterial and antifungal compounds (Sathi et al., 2015; Xu et al., 2015; De Medeiros et al., 2018).

The cytotoxicity assay against VERO cells, according to the criteria established by ISO (2009), showed that 58.3% of the extracts evaluated in this study had no significant toxic effect on cell viability (Figure 1). Of the twelve fungal mycelial extracts, five (41.7%) showed cytotoxic potential, with cell viability less than 70%. They belong to the strains *Cladosporium* - 1135, *Chrysosporthe* - 1169, *Cytospora* - 1098, *Fusarium* - 1085 and *Talaromyces* - 1244.

Figure 1. Cytotoxicity of mycelial extracts of fungi isolated from aquatic environments in the State of Amazonas on VERO cells (ATCC® CCL-81TM).



Saravanakumar et al. (2018) emphasizes that metabolites extracted from fungi in some cases can be naturally toxic, so it is essential to investigate the toxicity of extracts of fungal origin, considering that one of the most important steps during the development of a new drug is the absence of cellular cytotoxicity (Kholoujini et al., 2019). In the present study, considering the five active fungal mycelial extracts only *Chrysosporthe* – 1169 and *Fusarium* – 1085 showed cytotoxic potential against VERO cells. The other active extracts in the antimicrobial assay showed no cytotoxicity.

4. Conclusion

The present study revealed that mycelial extracts from five fungal strains isolated from water samples from the Amazon region, present antimicrobial activity against *C. albicans*, being one of them also active against *C. tropicalis*. Among them, only two strains showed cytotoxic potential on VERO cells. The data generated in this study contribute to the knowledge of the antimicrobial and cytotoxic activities of fungi obtained from water samples from the Amazon region. However, further studies aimed at the isolation and identification of bioactive compounds are needed.

Acknowledgments

The authors appreciate the Coordination of Superior Level Staff Improvement - Brazil (CAPES) - Financial Code 001, through the Pró-Amazônia: Biodiversity and Sustainability project, and the Oswaldo Cruz Foundation - Leônidas & Maria Deane Institute – Manaus/AM.

References

- Ahmed, S. A., Gogal Jr, R. M., & Walsh, J. E. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*, 170(2), 211-224.
- Arastehfar, A., Daneshnia, F., Hafez, A., Khodavaisy, S., Najafzadeh, M. J., Charsizadeh, A., ... & Boekhout, T. (2020). Antifungal susceptibility, genotyping, resistance mechanism, and clinical profile of *Candida tropicalis* blood isolates. *Medical Mycology*, 58(6), 766-773.
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200-216.
- Ayoub, I. M., El-Shazly, M., Lu, M. C., & Singab, A. N. B. (2014). Antimicrobial and cytotoxic activities of the crude extracts of *Dietes bicolor* leaves, flowers and rhizomes. *South African Journal of Botany*, 95, 97-101.
- Bracarense, A. A., & Takahashi, J. A. (2014). Modulation of antimicrobial metabolites production by the fungus *Aspergillus parasiticus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 313-321.
- Canela, H. M. S., Cardoso, B., Frazão, M. R., Falcão, J. P., Vitali, L. H., Martinez, R., & da Silva Ferreira, M. E. (2021). Genetic diversity assessed using PFGE, MLP and MLST in *Candida spp.* candidemia isolates obtained from a Brazilian hospital. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(2), 503-516.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-second edition. CLSI documents M27–A2. CLSI, Wayne.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2003). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved Standard—Sixth Edition.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA.
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(3), 417-433.
- De Barros, P. P., Rossoni, R. D., Freire, F., Ribeiro, F. D. C., Lopes, L. A. D. C., Junqueira, J. C., & Jorge, A. O. C. (2018). *Candida tropicalis* affects the virulence profile of *Candida albicans*: an in vitro and in vivo study. *Pathogens and Disease*, *76*(2), fty014.
- De Medeiros, A. G., Savi, D. C., Mitra, P., Shaaban, K. A., Jha, A. K., Thorson, J. S., ... & Glienke, C. (2018). Bioprospecting of *Diaporthe terebinthifolii* LGMF907 for antimicrobial compounds. *Folia Microbiologica*, *63*(4), 499-505.
- Dos Reis, C. M., da Rosa, B. V., da Rosa, G. P., do Carmo, G., Morandini, L. M. B., Ugalde, G. A., ... & Kuhn, R. C. (2019). Antifungal and antibacterial activity of extracts produced from *Diaporthe schini*. *Journal of Biotechnology*, *294*, 30-37.
- Flores, A. C., Pamphile, J. A., Sarragiotto, M. H., & Clemente, E. (2013). Production of 3-nitropropionic acid by endophytic fungus *Phomopsis longicolla* isolated from *Trichilia elegans* A. JUSS ssp. *elegans* and evaluation of biological activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *29*(5), 923-932.
- Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R., & Quinn, R. J. (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, *14*(2), 111-129.
- Heo, I., Hong, K., Yang, H., Lee, H. B., Choi, Y. J., & Hong, S. B. (2019). Diversity of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species isolated from freshwater environments in Korea. *Mycobiology*, *47*(1), 12-19.
- Hoeksma, J., Misset, T., Wever, C., Kemmink, J., Kruijtzter, J., Versluis, K., ... & den Hertog, J. (2019). A new perspective on fungal metabolites: identification of bioactive compounds from fungi using zebrafish embryogenesis as read-out. *Scientific Reports*, *9*(1), 1-16.
- International Organization for Standardization (ISO), UNI EN ISO 10993-5:2009, (2009) "Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: In Vitro Cytotoxicity Testing", International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Kholoujini, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Ghiasian, S. A., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2019). Isolation and Evaluation of Antifungal Metabolites from Endophytic Fungi Against Some Pathogenic Fungi. *Journal of Biochemical Technology*, (2): 97-106.
- Lotfy, M. M., Hassan, H. M., Hetta, M. H., El-Gendy, A. O., & Mohammed, R. (2018). Di-(2-ethylhexyl) Phthalate, a major bioactive metabolite with antimicrobial and cytotoxic activity isolated from River Nile derived fungus *Aspergillus awamori*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, *7*(3), 263-269.
- Magwaza, N. M., Nxumalo, E. N., Mamba, B. B., & Msagati, T. A. (2017). The occurrence and diversity of waterborne fungi in African aquatic systems: their impact on water quality and human health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *14*(5), 546.
- Megri, Y., Arastehfar, A., Boekhout, T., Daneshnia, F., Hörtnagl, C., Sartori, B., ... & Hamrioui, B. (2020). *Candida tropicalis* is the most prevalent yeast species causing candidemia in Algeria: the urgent need for antifungal stewardship and infection control measures. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, *9*, 1-10.

- Moreira, C. C., Luna, G. L. F., Soriano, B., Cavicchioli, R., Bogas, A. E. C., de Sousa, C. P., ... & Lacava, P. T. (2020). Leishmanicidal, cytotoxic, antimicrobial and enzymatic activities of *Diaporthe* species, a mangrove-isolated endophytic fungus. *African Journal of Microbiology Research*, 14(9), 516-524.
- Nirma, C., Eparvier, V., & Stien, D. (2015). Reactivation of antibiosis in the entomogenous fungus *Chrysosporthe* sp. SNB-CN74. *The Journal of Antibiotics*, 68(9), 586-590.
- Oliveira, J., Barreto, A., Silva, L., & Rhoden, S. (2021). Fungos, diversidade e prospecção no Brasil: Um recurso pouco explorado? *Metodologias e Aprendizado*, 4, 149-163.
- Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). (2020). *Resistência antimicrobiana OPAS/OMS*. Organização Pan-Americana da Saúde. <https://www.paho.org/pt/topicos/resistencia-antimicrobiana>
- Perussi, J. R. (2007). Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Química Nova*, 30(4), 988-994.
- Premjanu, N., & Jaynthy, C. (2015). Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Lansea corammendalica*. *International Journal of Chem Tech Research*, 7, 369-374.
- Sakhri, A., Chaouche, N. K., Catania, M. R., Ritieni, A., & Santini, A. (2019). Chemical composition of *Aspergillus creber* extract and evaluation of its antimicrobial and antioxidant activities. *Polish Journal of Microbiology*, 68(3), 309.
- Sanchez, S., & Demain, A. L. (2017). Bioactive products from fungi. In *Food Bioactives* (pp. 59-87). Springer, Cham.
- Santos, I. P. D., Silva, L. C. N. D., Silva, M. V. D., Araújo, J. M. D., Cavalcanti, M. D. S., & Lima, V. L. D. M. (2015). Antibacterial activity of endophytic fungi from leaves of *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae). *Frontiers in Microbiology*, 6, 350.
- Saravanakumar, K., Chelliah, R., Ramakrishnan, S. R., Kathiresan, K., Oh, D. H., & Wang, M. H. (2018). Antibacterial, and antioxidant potentials of non-cytotoxic extract of *Trichoderma atroviride*. *Microbial Pathogenesis*, 115, 338-342.
- Sathi, Z. S., Rahman, M., Faruk, A. L., & Rashid, M. A. (2015). Antimicrobial susceptibility assessment of compound from *Aspergillus fumigatus*. *African Journal of Biotechnology*, 14(3), 167-170.
- Sharma, C., & Chowdhary, A. (2017). Molecular bases of antifungal resistance in filamentous fungi. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50(5), 607-616.
- Sibero, M. T., Igarashi, Y., Radjasa, O. K., Sabdono, A., Trianto, A., Zilda, D. S., & Wijaya, Y. J. (2019). Sponge-associated fungi from a mangrove habitat in Indonesia: species composition, antimicrobial activity, enzyme screening and bioactive profiling. *International Aquatic Research*, 11(2), 173-186.
- Simões, M., Bennett, R. N., & Rosa, E. A. (2009). Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports*, 26(6), 746-757.
- Souza, A. Q. L. D., Souza, A. D. L. D., Astolfi Filho, S., Pinheiro, M. L. B., Sarquis, M. I. D. M., & Pereira, J. O. (2004). Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica*, 34(2), 185-195.
- Wille, M. P., Guimarães, T., Furtado, G. H. C., & Colombo, A. L. (2013). Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(3), 288-292.

Wurzbacher, C., Warthmann, N., Bourne, E. C., Attermeyer, K., Allgaier, M., Powell, J. R., ... & Monaghan, M. T. (2016). High habitat-specificity in fungal communities in oligo-mesotrophic, temperate Lake Stechlin (North-East Germany). *MycKeys*, (16), 17-44.

Xu, L., Meng, W., Cao, C., Wang, J., Shan, W., & Wang, Q. (2015). Antibacterial and antifungal compounds from marine fungi. *Marine Drugs*, 13(6), 3479-3513.

Yenn, T. W., Ring, L. C., Nee, T. W., Khairuddean, M., Zakaria, L., & Ibrahim, D. (2017). Endophytic *Diaporthe* sp. ED2 produces a novel anti-candidal ketone derivative. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(6), 1065-1070.

10. CONCLUSÃO

A partir das análises dos resultados obtidos conclui-se que:

O habitat aquático das larvas de *An. darlingi*, em duas cidades endêmicas para malária no estado do Amazonas, abrigam uma rica e diversificada comunidade microbiana. A diversidade microbiana é maior em habitats aquáticos mais naturais, com ambientes mais preservados e menor em ambientes com influência antrópica.

Cinquenta e cinco isolados fúngicos foram identificados a partir das análises dos dados morfológicas e moleculares, e destes, sugerimos que 21 isolados são prováveis espécies novas.

Extratos do meio líquido de oito isolados fúngicos demonstraram potente atividade larvicida contra *Ae. aegypti*. Entre eles, *Al. lateralis* (1160) e *D. ueckerae* (1203) resultaram nos melhores e mais baixos valores de LC₅₀ e LC₉₀.

O estudo bioguiado do extrato bruto do fungo *Diaporthe ueckerae* 1242 permitiu o isolamento e a identificação do composto bioativo conhecido citocalasina H, com atividade antimalárica contra a cepa multirresistente o *Plasmodium falciparum* K1.

Os extratos miceliais de cinco fungos isolados de amostras de água da região amazônica apresentam potencial antimicrobiano, sendo cinco extratos ativos contra cepas *C. albicans*, sendo uma delas também ativa contra *C. tropicalis*. Dos fungos com atividade antimicrobiana, apenas dois isolados apresentaram potencial citotóxico em células VERO.

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho confirmam que os ambientes aquáticos de larvas de *An. darlingi* apresentam uma alta diversidade microbiana, sendo esse ambiente um bom candidato para a descoberta de novas espécies fúngicas. Os metabólitos dos fungos isolados podem apresentar atividades larvicidas em *Ae. aegypti*, atividade antimalárica frente *P. falciparum* e antifúngica contra cepas de *Candidas*.

11. REFERÊNCIAS

ABDUL-GHANI, Rashad; AL-MEKHLAFI, Abdulsalam M.; ALABSI, Mogeab S. Microbial control of malaria: biological warfare against the parasite and its vector. **Acta tropica**, v. 121, n. 2, p. 71-84, 2012.

ALOU, Ludovic P. Ahoua et al. Distribution of ace-1 R and resistance to carbamates and organophosphates in *Anopheles gambiae* ss populations from Côte d'Ivoire. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2010.

ALVES, Sérgio Batista et al. Fungos entomopatogênicos. **Controle microbiano de insetos**, v. 2, p. 289-381, 1998.

ANGLERO-RODRIGUEZ, Yesseinia I. et al. An *Aedes aegypti*-associated fungus increases susceptibility to dengue virus by modulating gut trypsin activity. **Elife**, v. 6, p. e28844, 2017.

ANGLERO-RODRIGUEZ, Yesseinia I. et al. An *Aedes aegypti*-associated fungus increases susceptibility to dengue virus by modulating gut trypsin activity. **Elife**, v. 6, p. e28844, 2017.

ANTONIO-NKONDJIO, Christophe et al. Distribution and larval habitat characterization of *Anopheles moucheti*, *Anopheles nili*, and other malaria vectors in river networks of southern Cameroon. **Acta tropica**, v. 112, n. 3, p. 270-276, 2009.

ARAÚJO, João PM; HUGHES, David P. Diversity of entomopathogenic fungi: which groups conquered the insect body?. **Advances in genetics**, v. 94, p. 1-39, 2016.

ARAUJO, Maisa da-Silva et al. Larval food quantity affects development time, survival and adult biological traits that influence the vectorial capacity of *Anopheles darlingi* under laboratory conditions. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2012.

ARGONDIZZO, Ana Paula Corrêa; SILVA, Dilson; MISSAILIDIS, Sotiris. Application of Aptamer-Based Assays to the Diagnosis of Arboviruses Important for Public Health in Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 159, 2021.

BÄRLOCHER, Felix. Aquatic fungal ecology. **Fungal Ecology**, v. 100, n. 19, p. 1-4, 2016.

BELDA, Eugeni et al. Preferential suppression of *Anopheles gambiae* host sequences allows detection of the mosquito eukaryotic microbiome. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

BLACKWELL, Meredith. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. **American journal of botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.

BLANFORD, Simon et al. Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1638-1641, 2005.

BLANFORD, Simon et al. Lethal and pre-lethal effects of a fungal biopesticide contribute to substantial and rapid control of malaria vectors. *PLoS one*, v. 6, n. 8, p. e23591, 2011.

BÖHM, A.W.; COSTA, C.S.; NEVES, R.G.; FLORES, T.R.; NUNES, B.P. Dengue incidence trend in Brazil, 2002-2012. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v.25, p.725-733. 2016.

BORGES, Keyller Bastos et al. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 77, n. 3, p. 669-674, 2007.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.** Guia de Vigilância Epidemiológica. 6ª edição. Brasília, DF. 2005.

BRASIL. Boletim Epidemiológico. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2015**– Ministério da Saúde. Volume 48. Disponível em: <<https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/15/svs2016-be003-denguese52.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2020.

BRASIL. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe quinzenal sarampo – Brasil, semanas epidemiológicas 43 de 2020 a 1 de 2021**, 2021b- Ministério da Saúde. Volume 52. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/11/boletim_epidemiologico_svs_4.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2021.

BRASIL. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dia mundial de luta contra a malária**, 2021c- Ministério da Saúde. Volume 52. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2021/abril/26/boletim_epidemiologico_svs_dia-mundial-da-malaria.pdf>. Acesso em: 18 junho. 2021.

BRASIL. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, 2021a** - Ministério da Saúde. Volume 52. Disponível em: <<https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/15/svs2016-be003-denguese52.pdf>>. Acesso em: 18 junho. 2021.

BRITO, C.A.A.; CORDEIRO, M.T. One year after the Zika virus outbreak in Brazil: from hypotheses to evidence. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.49, p.53754. 2016.

BUGNI, Tim S.; IRELAND, Chris M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports*, v. 21, n. 1, p. 143-163, 2004.

BUTLER, Mark S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Natural product reports*, v. 22, n. 2, p. 162-195, 2005.

CANTUÁRIA, MARYELE FERREIRA. Ecologia de culicídeos (Diptera: Culicidae) da área de proteção ambiental do rio Curiaú, Macapá, Amapá. **Macapá: Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Tropical**, 2012.

CARVALHO, L.A.F.; SILVA, I.G. Atividade larvívica do *Temephos* a 1% sobre o *Aedes aegypti* (Lin., 1762), em diferentes criadouros artificiais. **Revista Patologia Tropical**, v.28, p.211-232. 1999.

CATTARINO, Lorenzo et al. Mapping global variation in dengue transmission intensity. **Science translational medicine**, v. 12, n. 528, 2020.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Dengue Around the World**, 2020a. <<https://www.cdc.gov/dengue/areaswithrisk/around-the-world.html>>. Acesso em: 20 abr. 2021.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Malaria's Impact Worldwide**, 2020c. <https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/impact.html>. Acesso em: 20 abr. 2021.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **World Malaria Day 2020: CDC and partners continue the fight against a global killer**, 2020b. <https://www.cdc.gov/malaria/features/wmd_feature_2020.html#:~:text=Still%2C%20a%20estimated%203.2%20billion,to%20become%20ill%20in%202018.>. Acesso em: 20 abr. 2021.

CHAVSHIN, Ali Reza et al. Susceptibility of *Anopheles maculipennis* to different classes of insecticides in West Azarbaijan Province, Northwestern Iran. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 5, p. 403-406, 2015.

CIRIMOTICH, Chris M.; RAMIREZ, Jose L.; DIMOPOULOS, George. Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. **Cell host & microbe**, v. 10, n. 4, p. 307-310, 2011.

CLEMENTS, Alan Neville et al. **The biology of mosquitoes. Volume 1: development, nutrition and reproduction**. Chapman & Hall, 1992.

CONSOLI, Rotraut AGB; OLIVEIRA, Ricardo Lourenço de. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora Fiocruz, 1994.

COON, Kerri L. et al. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. **Molecular ecology**, v. 23, n. 11, p. 2727-2739, 2014.

COON, Kerri L.; BROWN, Mark R.; STRAND, Michael R. Gut bacteria differentially affect egg production in the anautogenous mosquito *Aedes aegypti* and facultatively autogenous mosquito *Aedes atropalpus* (Diptera: Culicidae). **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2016.

CORTEZ, Ana Cláudia Alves et al. Influência da sazonalidade e do modo de coleta na diversidade de fungos decompositores de madeira submersa de ambientes aquáticos da região amazônica. 2016.

COUCH, JOHN N.; BLAND, CHARLES E. *Taxonomy*. 1985.

COX-SINGH, Janet; SINGH, Balbir. Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance?. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 9, p. 406-410, 2008.

DABIRÉ, Kounbobr Roch et al. Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. **Malaria Journal**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2008.

DAMIANI, Claudia et al. Paternal transmission of symbiotic bacteria in malaria vectors. **Current Biology**, v. 18, n. 23, p. R1087-R1088, 2008.

DE FREITAS RODRIGUES, Aline; ESCOBAR, Ana Lúcia; SOUZA-SANTOS, Reinaldo. Spatial analysis and determination of malaria control areas in the State of Rondônia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, 2008.

DEANE, Leônidas de Mello et al. Notas sôbre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil (Publicado originalmente em 1948). 2002.

DEGALLIER, N. P. T. V. et al. People's knowledge and practice about dengue, its vectors, and control means in Brasilia (DF), Brazil: its relevance with entomological factors. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 16, n. 2, p. 114-123, 2000.

DESTÉFANO, Ricardo Henri Rodrigues; DESTÉFANO, Suzete A. Lanza; MESSIAS, Claudio Luiz. Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 245-252, 2004.

DUARTE, Geraldo et al. Zika virus infection in pregnant women and microcephaly. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 39, p. 235-248, 2017.

EBI, Kristie L.; NEALON, Joshua. Dengue in a changing climate. **Environmental research**, v. 151, p. 115-123, 2016.

EL-ENSHASY, Hesham A. Filamentous fungal cultures—process characteristics, products, and applications. **Bioprocessing for value-added products from renewable resources**, p. 225-261, 2007.

ENGEL, Philipp; MORAN, Nancy A. The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 5, p. 699-735, 2013.

ESPOSITO, Elisa; AZEVEDO, JL de. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. **Caxias do Sul: Educs**, p. 510, 2004.

EVANS, Harry C.; ELLIOT, Simon L.; BARRETO, Robert W. Entomopathogenic fungi and their potential for the management of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Americas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, p. 206-214, 2018.

FARENHORST, Marit et al. Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 41, p. 17443-17447, 2009.

FAVIA, Guido et al. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 21, p. 9047-9051, 2007.

FERREIRA-KEPPLER, Ruth Leila et al. The community of Diptera (Insecta) colonizing axils of *Alocasia macrorrhizos* (L.) G. Don (Araceae), with records of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) in urban areas of Manaus, Amazonas. **Biota Neotropica**, v. 17, 2017.

FLEMING, Gleng. Biología y ecología de los vectores de la malaria en las Américas. **Washington DC: Organización Panamericana de la Salud**, p. 13-6, 1986.

FLOUDAS, Dimitrios et al. Evolution of novel wood decay mechanisms in Agaricales revealed by the genome sequences of *Fistulina hepatica* and *Cylindrobasidium torrendii*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 76, p. 78-92, 2015.

FORATTINI, O. P. Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia, vol. 2. **EDUSP, São Paulo**, p. 549, 2002.

FORATTINI, O. P. Entomologia Médica, 49 Volume, Psychodidae, Phlebotominae. Leishmanioses, Bartonelose. Editora Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 1973.

FORATTINI, O. P. Entomologia médica, vol. 1. **Universidade de São Paulo, São Paulo**, p. 185-302, 1962.

FORATTINI, Oswaldo Paulo. Exophilic behavior of *Anopheles darlingi* Root in a southern region of Brazil. **Revista de saúde pública**, v. 21, p. 291-304, 1987.

FORATTINI, Oswaldo Paulo. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia Vol. 2**. Edusp, 1996.

GARZA-HERNÁNDEZ, Javier A. et al. Vectorial capacity of *Aedes aegypti* for dengue virus type 2 is reduced with co-infection of *Metarhizium anisopliae*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 3, p. e2013, 2013.

GAYNES, Robert. The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 5, p. 849, 2017.

GAZZINELLI, Ricardo T. et al. Innate sensing of malaria parasites. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 11, p. 744-757, 2014.

GEISER, D. M. et al. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 59, p. 1-10, 2007.

GENDRIN, Mathilde et al. Antibiotics in ingested human blood affect the mosquito microbiota and capacity to transmit malaria. **Nature communications**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2015.

GEORGE, Justin et al. Malaria mosquitoes attracted by fatal fungus. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e62632, 2013.

GIL, Luiz Herman Soares et al. Urban and suburban malaria in Rondônia (Brazilian Western Amazon) II: perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 271-276, 2007.

GÖNCZÖL, J.; RÉVAY, Ágnes. Species diversity of rainborne hyphomycete conidia from living trees. **Fungal Diversity**, v. 22, p. 37-54, 2006.

GRIFFIN, Lachlan F.; KNIGHT, Jon M.; DALE, Pat ER. Identifying mosquito habitat microtopography in an Australian mangrove forest using LiDAR derived elevation data. **Wetlands**, v. 30, n. 5, p. 929-937, 2010.

GUÉGAN, Morgane et al. The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 1-17, 2018.

GUIMARÃES, Anthony Érico et al. Ecology of anopheline (diptera, culicidae), malaria vectors around the Serra da Mesa reservoir, state of Goiás, Brazil: 1-frequency and climatic factors. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, p. 291-302, 2004.

GUIMARÃES, Luis Henrique S. et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 474-480, 2006.

HANCOCK, P. A.; THOMAS, M. B.; GODFRAY, H. C. J. An age-structured model to evaluate the potential of novel malaria-control interventions: a case study of fungal biopesticide sprays. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1654, p. 71-80, 2009.

HARBACH, Ralph E. et al. *Aedes nigrinus* (Eckstein, 1918)(Diptera, Culicidae), a new country record for England, contrasted with *Aedes sticticus* (Meigen, 1838). **ZooKeys**, n. 671, p. 119, 2017.

HAWKSWORTH, David L.; LÜCKING, Robert. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 4, p. 5.4. 10, 2017.

HAWKSWORTH, David Leslie. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological research**, v. 95, n. 6, p. 641-655, 1991.

HEMINGWAY, Janet; RANSON, Hilary. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual review of entomology**, v. 45, n. 1, p. 371-391, 2000.

HIBBETT, David S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological research**, v. 111, n. 5, p. 509-547, 2007.

HILLMAN, Ethan T.; READNOUR, Logan R.; SOLOMON, Kevin V. Exploiting the natural product potential of fungi with integrated-omics and synthetic biology approaches. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 5, p. 50-56, 2017.

HIWAT, Hélène; BRETAS, Gustavo. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. **Parasites & vectors**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2011.

IMHOFF, Johannes F. Natural products from marine fungi—Still an underrepresented resource. **Marine drugs**, v. 14, n. 1, p. 19, 2016.

JONES, EB Gareth; PANG, Ka-Lai. Tropical aquatic fungi. **Biodiversity and conservation**, v. 21, n. 9, p. 2403-2423, 2012.

JOSLING, Gabrielle A.; LLINÁS, Manuel. Sexual development in Plasmodium parasites: knowing when it's time to commit. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 573-587, 2015.

KAMESHWAR, Ayyappa Kumar Sista; QIN, Wensheng. Systematic review of publicly available non-Dikarya fungal proteomes for understanding their plant biomass-degrading and bioremediation potentials. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, n. 1, p. 1-19, 2019.

KEBEDE, Bethlehem et al. Establishing the secondary metabolite profile of the marine fungus: *Tolypocladium geodes* sp. MF458 and subsequent optimisation of bioactive secondary metabolite production. **Marine drugs**, v. 15, n. 4, p. 84, 2017.

KNELL, A. J. Malaria: a publication of the Tropical Programme of the Wellcome Trust. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, p. 42-42, 1992.

KOMP, William H. Wood. The Occurrence of *Anopheles Darlingi* Root in Central America¹, 2. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1, n. 5, p. 659-670, 1941.

KRAEMER, Moritz UG et al. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. **Scientific data**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2015.

KRAUSS, Gerd-Joachim et al. Fungi in freshwaters: ecology, physiology and biochemical potential. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 4, p. 620-651, 2011.

KRIMITZAS, Antonios et al. A phylogenetic analysis of Greek isolates of *Aspergillus* species based on morphology and nuclear and mitochondrial gene sequences. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

LI, De-Wei (Ed.). **Biology of microfungi**. Springer, 2016.

LIMA, Francisco José C. et al. Análise de resíduos do inseticida metamidofós em soja e determinação final por cromatografia em fase gasosa. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 2003.

LIMA-CAMARA, Tamara Nunes. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, 2016.

LOGUERCIO-LEITE, Clarice et al. Résumé of Macromycetes from Santa Catarina state, southern Brazil Sinopse de Macromicetes em Santa Catarina, Brasil. **INSULA Revista de Botânica**, v. 38, p. 1-1, 2009.

LOPES, José et al. An ecological study of the mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. and associated culicifauna in an urban area of southern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 5, p. 326-333, 1993.

LUZ, C. et al. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 214-215, 2008.

LUZ, Christian; NETTO, Morel Cipriano Bastos; ROCHA, Luiz Fernando Nunes. In vitro susceptibility to fungicides by invertebrate-pathogenic and saprobic fungi. **Mycopathologia**, v. 164, n. 1, p. 39-47, 2007.

MACHADO, Ricardo Luiz Dantas et al. Malária em região extra-Amazônica: situação no Estado de Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 581-586, 2003.

MACHELEIDT, Juliane et al. Regulation and role of fungal secondary metabolites. **Annual review of genetics**, v. 50, p. 371-392, 2016.

MAEHARA, Noritoshi; HE, Xueyou; SHIMAZU, Mitsuaki. Maturation feeding and transmission of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae) by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) inoculated with *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of economic entomology**, v. 100, n. 1, p. 49-53, 2007.

MANGUIN, Sylvie et al. Characterization of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larval habitats in Belize, central America. **Journal of medical entomology**, v. 33, n. 2, p. 205-211, 1996.

MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. 2a ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

MARINOTTI, Osvaldo et al. The genome of *Anopheles darlingi*, the main neotropical malaria vector. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 15, p. 7387-7400, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monitoramento do período sazonal da febre amarela: Brasil–2017/2018**, 2018. Disponível em: <<https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/26/Informe-FA-23-25abr18.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2021.

MONTAGNER, Flávia Regina Girardi; SILVA, Onilda Santos da; JAHNKE, Simone Mundstock. Mosquito species occurrence in association with landscape composition in green urban areas. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, p. 233-239, 2017.

MOUTINHO, Paulo Rufalco et al. Population dynamics, structure and behavior of *Anopheles darlingi* in a rural settlement in the Amazon rainforest of Acre, Brazil. **Malaria journal**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2011.

OLIVEIRA-FERREIRA, Joseli et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria journal**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2010.

ORTIZ-VERA, Mabel Patricia et al. Influence of water quality on diversity and composition of fungal communities in a tropical river. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.

PARISE, Éldi Vendrame. Malária grave em Palmas, Estado do Tocantins: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 463-468, 2009.

PEARMAN, J. K.; TAYLOR, J. E.; KINGHORN, J. R. Fungi in aquatic habitats near St Andrews in Scotland. **Mycosphere**, v. 1, p. 11-21, 2010.

PINHEIRO, Valeria Cristina Soares; TADEI, Wanderli Pedro. Frequency, diversity, and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 245-250, 2002.

RAJ, M. et al. Evaluation of botanicals against: mosquito larvae to the extracts of fungus *Beauveria* species. **World Scientific News**, v. 88, n. 2, p. 199-210, 2017.

RAJA, Huzefa A.; SCHMIT, John Paul; SHEARER, Carol A. Latitudinal, habitat and substrate distribution patterns of freshwater ascomycetes in the Florida Peninsula. **Biodiversity and Conservation**, v. 18, n. 2, p. 419-455, 2009.

RASGON, Jason L. Using infections to fight infections: paratransgenic fungi can block malaria transmission in mosquitoes. **Future microbiology**, v. 6, n. 8, p. 851-853, 2011.

RATEB, Mostafa E.; EBEL, Rainer. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural product reports**, v. 28, n. 2, p. 290-344, 2011.

REY, Luis. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. In: **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 2001. p. 856-856.

SAMSON, Robert A. Ecology and general characteristics of indoor fungi. In: **Fundamentals of mold growth in indoor environments and strategies for healthy living**. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 2011. p. 101-116.

SCHOLTE, Ernst-Jan; KNOLS, Bart GJ; TAKKEN, Willem. Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae* ss. **Malaria Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2004.

SCHOLTE, Ernst-Jan; KNOLS, Bart GJ; TAKKEN, Willem. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. **Journal of invertebrate pathology**, v. 91, n. 1, p. 43-49, 2006.

SCHULZ, Barbara et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SEYE, Fawrou et al. Pathogenicity of the fungus, *Aspergillus clavatus*, isolated from the locust, *Oedaleus senegalensis*, against larvae of the mosquitoes *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of insect science**, v. 9, n. 1, 2009.

SHARMA, Anil et al. Gut microbes influence fitness and malaria transmission potential of Asian malaria vector *Anopheles stephensi*. **Acta tropica**, v. 128, n. 1, p. 41-47, 2013.

SHEARER, C. A. et al. The molecular phylogeny of freshwater Dothideomycetes. **Studies in Mycology**, v. 64, p. 145-153, 2009.

SHEARER, C. A.; WEBSTER, J. Aquatic hyphomycete communities in the River Teign. IV. Twig colonization. **Mycological Research**, v. 95, n. 4, p. 413-420, 1991.

SHEARER, Carol A. et al. Distributional patterns of freshwater ascomycetes communities along an Andes to Amazon elevational gradient in Peru. **Biodiversity and conservation**, v. 24, n. 8, p. 1877-1897, 2015.

SHEARER, Carol A. et al. Fungal biodiversity in aquatic habitats. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, p. 49-67, 2007.

SHELOMI, Matan. Bacterial and eukaryote microbiomes of mosquito habitats in dengue-endemic southern Taiwan. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 22, n. 2, p. 471-480, 2019.

SILVA, Ana Paula B. et al. Adaptação de um Bioensaio Simplificado para Avaliação do Status de Susceptibilidade em Larvas de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* ao Piretroide Deltametrina. 2014.

SILVEIRA, Erica da Silva. Fungos e leveduras na água e plantas macrófitas em decomposição na região estuarina da Lagoa dos Patos e praia do Cassino, RS-Brasil. 2012.

SINGER, Burton H.; DE CASTRO, Marcia Caldas. Agricultural colonization and malaria on the Amazon frontier. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 954, n. 1, p. 184-222, 2001.

SINGH, Gavendra and PRAKASH, Soam. New prospective on fungal pathogens for mosquitoes and vectors control technology. **Journal of Mosquito Research**, v. 4, n. 1, 2014.

SMITH, Leticia B.; KASAI, Shinji; SCOTT, Jeffrey G. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 133, p. 1-12, 2016.

SMITH, Ryan C.; VEGA-RODRÍGUEZ, Joel; JACOBS-LORENA, Marcelo. The Plasmodium bottleneck: malaria parasite losses in the mosquito vector. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 644-661, 2014.

SOARES-DA-SILVA, Joelma et al. Variation in *Aedes aegypti* (Linnaeus)(Diptera, Culicidae) infestation in artificial containers in Caxias, state of Maranhão, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 174-179, 2012.

STEYN, A.; ROETS, F.; BOTHA, Alfred. Yeasts associated with *Culex pipiens* and *Culex theileri* mosquito larvae and the effect of selected yeast strains on the ontogeny of *Culex pipiens*. **Microbial ecology**, v. 71, n. 3, p. 747-760, 2016.

SUÁREZ-MUTIS, Martha C. et al. Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic Plasmodium vivax infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 3, p. 159-164, 2007.

SUSAM - Secretaria de Saúde. **Descrição da doença**, 2017. Disponível em: <<http://www.saude.am.gov.br/servico/dengue/descricao.php>>. Acesso em: 12 ago. 2021.

TADEI, Wanderli Pedro et al. Biologia de anofelinos amazônicos: XII. Ocorrência de espécies de Anopheles, dinâmica da transmissão e controle da malária na zona urbana de Ariquemes (Rondônia). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 30, n. 3, p. 221-251, 1988.

TAWIDIAN, P.; RHODES, V. L.; MICHEL, K. Mosquito-fungus interactions and antifungal immunity. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 111, p. 103182, 2019.

TAYLOR, John W.; ELLISON, Christopher E. Mushrooms: morphological complexity in the fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 26, p. 11655-11656, 2010.

TIAN, Yuan; LI, Yan-Ling; ZHAO, Feng-Chun. Secondary metabolites from polar organisms. **Marine drugs**, v. 15, n. 3, p. 28, 2017.

TRAMPUZ, Andrej et al. Clinical review: Severe malaria. **Critical care**, v. 7, n. 4, p. 1-9, 2003.

TRAPE, Jean-François et al. Malaria morbidity and pyrethroid resistance after the introduction of insecticide-treated bednets and artemisinin-based combination therapies: a longitudinal study. **The Lancet infectious diseases**, v. 11, n. 12, p. 925-932, 2011.

TUTEJA, Renu. Malaria— an overview. **The FEBS journal**, v. 274, n. 18, p. 4670-4679, 2007.

VAN RIE, J. et al. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide Bacillus thuringiensis. **Science**, v. 247, n. 4938, p. 72-74, 1990.

VIJAYKRISHNA, D.; HYDE, Kevin D. Inter-and intra stream variation of lignicolous freshwater fungi in tropical Australia. **Fungal Diversity**, 2006.

VISAGIE, C. M. et al. Identification and nomenclature of the genus Penicillium. **Studies in mycology**, v. 78, p. 343-371, 2014.

VITTOR, A. Y. Deforestation and the Presence of Anopheles darlingi in the Peruvian Amazon [dissertation]. **Baltimore, MD: Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health**, 2003.

WANG, Sibao; JACOBS-LORENA, Marcelo. Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. **Trends in biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 185-193, 2013.

WARD, David M. et al. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1353-1370, 1998.

WHITE, N. J. Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. 2008.

WHO - World Health Organization. **Dengue and severe dengue**, 2021a. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>. Acesso em: 20 abr. 2021.

WHO - World Health Organization. **Malaria**, 2021a. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>>. Acesso em: 20 abr. 2021.

WHO - World Health Organization World. **World malaria report 2010**. In, World Health Organization. 93p. 2010.

WHO - World Health Organization. **Draft global vector control response 2017-2030**, 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789241512978>>. Acesso em: 18 junho. 2021

WIPASA, Jiraprapa et al. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. **Immunology and cell biology**, v. 80, n. 5, p. 401-414, 2002.

WRBU - Walter Reed Biosystematics Unit. 2017. Mosquito identification resources. (<http://www.wrbu.org/VeclD MQ.html>). Acesso em 12/10/ 2018.

WURZBACHER, Christian M.; BÄRLOCHER, Felix; GROSSART, Hans-Peter. Fungi in lake ecosystems. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 59, n. 2, p. 125-149, 2010.

ZAIM, Morteza; GUILLET, Pierre. Alternative insecticides: an urgent need. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 4, p. 161-163, 2002.

ZIMMERMANN, Gisbert. Review on safety of the entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and Beauveria brongniartii. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 553-596, 2007.