

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS VEGETAIS  
E DE FUNGOS CONTRA *DENGUE VIRUS*.**

por

Emerson de Castro Barbosa

Belo Horizonte

Fevereiro/2015

DISSERTAÇÃO MBCM-CPqRR E.C. BARBOSA 2015

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS VEGETAIS  
E DE FUNGOS CONTRA *DENGUE VIRUS*.**

por

Emerson de Castro Barbosa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dra. Jaqueline Germano de Oliveira

Belo Horizonte

Fevereiro/2015

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

B238a          Barbosa, Emerson de Castro.  
2015

Avaliação da Atividade Antiviral de Extratos Vegetais e de Fungos contra Dengue Virus / Emerson de Castro Barbosa. – Belo Horizonte, 2015.

XV, 115 f. il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 117 - 130

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Dengue/terapia 2. Flaviviridae/patogenicidade 3. Produtos Biológicos/uso terapêutico. Título. II. Oliveira, Jaqueline Germano de (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.918 52

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS VEGETAIS  
E DE FUNGOS CONTRA *DENGUE VIRUS*.**

por

Emerson de Castro Barbosa

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Jaqueline Germano de Oliveira (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente

Dra. Betania Barros Cota (CPqRR) Titular

Dra. Erna Geessien Kroon (UFMG) Titular

Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal (CPqRR) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em 24/02/2015

Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.

*Leonardo da Vinci*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Jaqueline Germano de Oliveira, pela dedicação, confiança, incentivo e aprendizado. Certamente, ela foi a principal responsável por aguçar meu desejo em compreender o mundo intrigante e desafiador da ciência;

Aos pesquisadores do LICM, Dr. Rodrigo Correa Oliveira, Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva, Dra. Érica Rocha e Dra. Soraya Gaze;

À Clari, secretária do ICM, que sempre me protegeu e mimou com balas, pirulitos, doces e travessuras. Seu cuidado e preocupação comigo sempre foram os mesmos que uma avó tem com o neto. Com ela meus dias no laboratório ficaram mais leves, divertidos e impossíveis de esquecer;

À equipe técnica administrativa do ICM, Luciana Lisboa, Vinícius Sampaio, Ana Pacheco e Ricardo Andrade pelo apoio;

À professora Dra. Erna G. Kroon, pela orientação, pelas valiosas discussões na realização dos ensaios biológicos e pelo acolhimento em seu laboratório para meu treinamento em técnicas de virologia, fornecimento de reagentes e amostras de células e de *Dengue virus*;

Aos pesquisadores do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), Dra. Tânia Maria de Almeida Alves e Dr. Carlos Leomar Zani pela disponibilidade, orientação, incentivo e pelas valiosas discussões no decorrer do trabalho;

À equipe técnica do LQPN, Fernanda Luiza de Melo Francisco pela preparação dos extratos e à Daniela Nabak pela ajuda e cooperação;

Ao pesquisador Dr. Luiz H. Rosa e equipe, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelas discussões e colaboração;

Ao João Rodrigues, Dra. Alessandra Ruiz, Dr. Eliseu Rocha, do Laboratório de vírus do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pelo treinamento em virologia, cultivo celular e sugestões para a realização deste trabalho;

À pesquisadora Dra. Laura Gil do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) – Fiocruz Pernambuco, pelas sugestões e contribuição a este projeto.

Ao Danilo Silvério Gontijo pela atenção, disponibilidade e preparo dos cálculos em planilhas do Excel;

Às alunas de Iniciação Científica, Marcelle Guimarães e Gabriela Casagrande pela contribuição no desenvolvimento do projeto;

À Juliana Bellardini, atual aluna de Iniciação Científica, pela dedicação e ajuda na execução dos experimentos;

Ao pesquisador Dr. Policarpo Ademar Sales pela disponibilidade na discussão dos resultados e sugestões;

Aos colegas e amigos do curso do mestrado, em especial à Anna Carolina Cançado e à Luiza Guimarães Tunes pela ajuda, cooperação e apoio;

À toda equipe do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (ICM), pós doutores, estudantes de pós graduação e alunos de iniciação científica que foram meus companheiros, receptivos, calorosos e dispostos a ajudar em todos os momentos;

À toda a equipe da secretaria acadêmica do CPqRR pelo apoio e atenção;

À toda minha família e amigos queridos, em especial Rafael Coelis, que entenderam a minha ausência em diversos momentos de dedicação a este trabalho;

E a minha gratidão sincera a todos que de alguma forma contribuíram para esta realização.

## **AGRADECIMENTOS ÀS INSTITUIÇÕES FINANCEIRAS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de mestrado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto, intitulado “Avaliação da Atividade Antiviral de Extratos Vegetais e de Fungos contra *Dengue virus*”. Número do processo: 474139/2010-7;

Ao apoio financeiro do projeto PROEP/CNPq/CPqRR intitulado “Busca de *hits* a partir de produtos naturais para o desenvolvimento de drogas contra leishmaniose, doença de Chagas, câncer, dengue e influenza”;

Ao apoio técnico-financeiro da plataforma tecnológica PDTIS/Fiocruz RPT10A (plataforma de Bioprospecção MG).



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	XI
LISTA DE TABELAS .....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XIII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT .....	XV
1 INTRODUÇÃO .....	16
2 OBJETIVOS .....	18
2.1 Objetivo Geral .....	18
2.2 Objetivos Específicos .....	18
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	19
3.1 Dengue .....	19
3.2 <i>Dengue virus</i> (DENV).....	21
3.3 Transmissão do DENV.....	26
3.4 Infecção e multiplicação do DENV .....	28
3.5 Epidemiologia da Dengue .....	30
3.6 A Dengue no Brasil .....	32
3.7 Prevenção e Tratamento da Dengue .....	34
3.8 A Biodiversidade como fonte de antivirais .....	36
3.9 Fungos e plantas como fonte de antivirais contra DENV .....	41
4 FLUXOGRAMA DO TRABALHO.....	45
5 MÉTODOS .....	46
5.1 Linhagens celulares e vírus .....	46
5.2 Multiplicação de DENV-2 em células C6/36 para obtenção de estoque viral ( <i>pool</i> / trabalho).....	46
5.3 Titulação de DENV-2 em células BHK-21 pelo método de formação de placas de lise (Dulbecco & Vogt, 1953).....	47
5.4 Extratos de plantas e de fungos da extratoteca Colab da Fiocruz Minas.....	49

5.5 Triagem da atividade antiviral de extratos de plantas e fungos contra DENV-2 por avaliação do ECP viral por microscopia óptica .....	50
5.6 Triagem da atividade antiviral de extratos de plantas e fungos contra DENV-2 pelo método do MTT .....	51
5.7 Determinação da CE <sub>50</sub> dos extratos de plantas e fungos com atividade antiviral .....	52
5.8 Determinação da CC <sub>50</sub> dos extratos contra DENV-2 por microscopia óptica e pelo MTT .....	54
5.9 Cálculo do Índice de Seletividade (IS) .....	55
6 RESULTADOS .....	56
6.1 Produção e titulação do <i>pool</i> trabalho de DENV-2 .....	56
6.2 Triagem de extratos de plantas e fungos com atividade antiviral .....	56
6.3 Determinação da concentração efetiva 50 (CE <sub>50</sub> ) .....	64
6.4 Determinação da concentração citotóxica 50 (CC <sub>50</sub> ) .....	68
6.5 Seleção dos extratos fúngicos promissores para recultivo .....	70
7 DISCUSSÃO .....	80
8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	90
9 ANEXOS .....	91
9.1 Artigo 1 .....	91
9.2 Artigo 2 .....	103
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	117

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação de casos de dengue com base nos níveis de gravidade.....	21
Figura 2 - Morfologia do DENV.. .....	23
Figura 3 - Distribuição do mosquito <i>A. aegypti</i> nas Américas. ....	31
Figura 4 - Evidência global consensual de risco e surto de dengue em 2010.....	32
Figura 5 - Mapa representativo da placa contendo 80 extratos utilizada na etapa de triagem da atividade antiviral deste estudo. ....	50
Figura 6 - Mapa representativo mostrando diluições decrescentes de extratos de plantas e de fungos utilizadas para determinação de CE <sub>50</sub> .....	53
Figura 7 - Mapa representativo mostrando diluições decrescentes de extratos de plantas utilizadas para determinação da CC <sub>50</sub> . ....	55
Figura 8 - Efeito citopático de DENV-2 em células C6/36. ....	56
Figura 9 - Classificação do ECP viral pelo método de cruzeiros (0 a 4+).....	58
Figura 10 - Representação esquemática dos resultados obtidos na avaliação do ECP viral pelo método de cruzeiros na triagem da atividade antiviral de extratos de plantas e fungos contra DENV-2.. .....	59
Figura 11 - Representação esquemática dos resultados obtidos pelo método do MTT na avaliação da atividade antiviral de extratos de plantas e fungos.....	60
Figura 12 - Comparação dos resultados obtidos pelo ensaio do MTT versus ECP viral.....	61
Figura 13 - Triagem de extratos de plantas e de fungos com atividade antiviral contra DENV-2. ....	63
Figura 14 - Origem dos 115 extratos que apresentaram atividade anti-DENV-2 nos ensaios de triagem.. .....	63
Figura 15 - Verificação da potencial citotoxicidade dos extratos de plantas e fungos nos ensaios de CE <sub>50</sub> .....	65
Figura 16 - CE <sub>50</sub> anti-DENV-2 e indicação de citotoxicidade de extratos de plantas e fungos quando testados em concentrações maiores ou igual a 50 µg/mL.....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos extratos selecionados nos ensaios de triagem (115) com atividade antiviral contra DENV-2.....	62
Tabela 2 - Valores de $CE_{50}$ , $CC_{50}$ e IS de extratos de plantas com atividade antiviral contra DENV-2 determinados através dos dois métodos: classificação do ECP viral ao microscópio óptico e pelo ensaio do MTT. ....	71
Tabela 3 - Valores de $CE_{50}$ de extratos fúngicos originais e obtidos de fungos recultivados determinados pela classificação do ECP viral e pelo ensaio do MTT ...	74
Tabela 4 - Valores de $CE_{50}$ , $CC_{50}$ e IS de extratos de plantas e de fungos mais promissores.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BHK-21 – células de rim de bebê de hamster (*Baby Hamster Kidney*)  
C6/36 – células derivadas de larvas do mosquito *Aedes albopictus*  
CC<sub>50</sub> – Concentração citotóxica 50  
CD206 - receptor de manose em macrófagos  
CE<sub>50</sub> – Concentração efetiva 50  
CMC – carboximetilcelulose  
Colab - Coleção de amostras para bioensaios  
DC-SIGN - ligante de ICAM-3 específico de células dendríticas  
DENV – *Dengue virus*  
DENV-2 – *Dengue virus type 2*  
DMEM - Meio de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's modified Eagle's medium*)  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
ECP – Efeito citopático  
FD – Febre da dengue  
FHD - Febre hemorrágica da dengue  
HTS - triagem de alta produtividade (*high throughput screening*)  
IL-8 - interleucina-8  
IS - Índice de Seletividade  
kDa - kilodalton  
L-15 – meio *LEIBOWITZ 15*  
m.o.i. – Multiplicidade de infecção (*multiplicity of infection*)  
MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
PBS – tampão fosfato salino (*Phosphate buffered saline*)  
pfu - Unidades formadoras de placa (*Plaque forming units*)  
rpm – rotações por minuto  
SCD - Síndrome do choque da dengue  
SFB – Soro fetal bovino  
ssRNA: RNA de fita simples

## RESUMO

Produtos naturais são potenciais fontes alternativas para o desenvolvimento de antivirais para o tratamento da dengue, assim como de outras doenças causadas por vírus da família *Flaviviridae* ou mesmo para um amplo espectro de viroses. Neste estudo foi feita a triagem da atividade *in vitro* contra o *Dengue virus 2* (DENV-2) de 3101 extratos, provenientes de plantas e de fungos da Coleção de Amostras para Bioensaios da Fiocruz. Para tal, células BHK-21 foram infectadas com DENV-2 e tratadas simultaneamente com 25 µg/mL de extrato sendo o resultado analisado por dois métodos: observação do grau de inibição do efeito citopático (ECP) por microscopia óptica e análise da viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico do MTT. Dentre os 3101 extratos testados, 115 extratos apresentaram atividade antiviral contra DENV-2 e foram selecionados para a determinação da respectiva concentração efetiva 50 (CE<sub>50</sub>). Cinquenta e cinco destes extratos foram obtidos de plantas pertencentes a 20 famílias distintas: *Amaryllidaceae* (3), *Annonaceae* (1), *Asteraceae* (5), *Begoniaceae* (1), *Clusiaceae* (1), *Combretaceae* (1), *Erythroxylaceae* (1), *Fabaceae* (4), *Lythraceae* (2), *Malpighiaceae* (8), *Malvaceae* (1), *Melastomataceae* (2), *Melochia* (1), *Myrtaceae* (3), *Rubiaceae* (8), *Sapindaceae* (9), *Ochnaceae* (1), *Primulaceae* (1), *Vitaceae* (1), *Vochysiaceae* (1). Os demais extratos (60) foram obtidos de culturas de fungos endofíticos coletados no Brasil, no continente Antártico e no Deserto do Atacama, ainda não identificados. Até o momento, os extratos vegetais mais promissores foram obtidos de plantas da família *Amaryllidaceae* (IS = 32,15) e da família *Fabaceae* (IS = 20,47) e (IS = 24,47). Vinte extratos fúngicos apresentaram valores de CE<sub>50</sub> que variaram entre 3,1 a 12,5 µg/mL e sem citotoxicidade aparente até a concentração de 100 µg/mL. Nossos resultados mostram que tais plantas e fungos são fontes promissoras de substâncias com ação antiviral contra DENV.

## ABSTRACT

Natural products are potential alternative sources for the development of antiviral drugs for dengue treatment of, as well as for other diseases caused by viruses of the *Flaviviridae* family or even caused by a broad spectrum of viruses. In this study, were performed an *in vitro* screening for activity against *Dengue virus* (DENV-2) of 3101 extracts from plants and fungi belonging to Fiocruz Minas extract sample collection. To this end, BHK-21 cells infected with DENV-2 were simultaneously treated with 25 µg/mL of extract and the results analyzed by two methods: observing the degree of inhibition of DENV cytopathic effect (CPE) by optical microscopy and also by analysis of cell viability MTT colorimetric assay. Among the 3101 extracts tested, 115 extracts showed antiviral activity against DENV-2 and were selected for determination of its half maximal effective concentration (EC<sub>50</sub>). Fifty-five of these extracts are taken from plants belonging to 20 different families: *Amaryllidaceae* (3), *Annonaceae* (1), *Asteraceae* (5), *Begoniaceae* (1), *Clusiaceae* (1), *Combretaceae* (1), *Erythroxylaceae* (1), *Fabaceae* (4), *Lythraceae* (2), *Malpighiaceae* (8), *Malvaceae* (1), *Melastomataceae* (2), *Melochia* (1), *Myrtaceae* (3), *Rubiaceae* (8), *Sapindaceae* (9), *Ochnaceae* (1), *Primulaceae* (1) *Vitaceae* (1), *Vochysiaceae* (1). The other extracts (60) were obtained from endophytic fungal cultures collected in Brazil, from Antarctic and the Atacama Desert soils, not identified yet. To date, the most promising plant extracts were obtained from plants of the *Amaryllidaceae* family (IS = 32.15) and *Fabaceae* (IS = 20.47) and (IS = 24.47). Twenty fungal extracts showed EC<sub>50</sub> values ranging from 3.1 to 12.5 mg/mL without any apparent cytotoxicity up to the concentration of 100 µg/mL. Our results show that these plants and fungi are promising sources of substances with antiviral action against *Dengue virus*.

# 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 20 anos, a dengue e a ocorrência das formas graves da doença, têm sido um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo, apresentando incidência e distribuição geográfica em expansão contínua. Infelizmente, os serviços de saúde pública e de atenção médica têm sido incapazes de diminuir efetivamente a incidência da doença (Guzman & Harris, 2015).

A dengue pode afetar a saúde de 3,6 bilhões de pessoas que vivem em mais de 100 países endêmicos e áreas onde o vírus pode ser transmitido. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorrem no mundo, anualmente, entre 50-100 milhões de infecções por dengue, mais de 500 mil casos de dengue grave e cerca de 22.000 mortes principalmente em crianças. (Souza *et al.*, 2007). No entanto, estudos recentes mostram que há uma subestimação desses dados, estimando com modelos de estudo mais precisos, cerca de 390 milhões de infecções assintomáticas e 96 milhões de infecções sintomáticas por ano em todo o mundo. Dessas, 14% ocorrem nas Américas, sendo mais da metade no Brasil e no México (Bhatt *et al.*, 2013).

Desse modo, a doença tem um alto custo para a sociedade, sendo que, apenas no hemisfério ocidental estima-se um custo em cerca de 2,1 bilhões de dólares por ano (Beatty *et al.*, 2011). Além dos custos econômicos e para a saúde pública, há um grande impacto social em países onde ocorrem epidemias de dengue, que muitas vezes precisam interromper a assistência primária para os pacientes hospitalizados (Bhatt *et al.*, 2013; OMS, 2015 - disponível em <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>).

Até o momento, não há vacina nem tratamento específico disponíveis no mercado e não existem medidas de controle efetivas e sustentáveis de combate ao mosquito vetor ou que garantam a proteção das comunidades afetadas (Gomez-Dantes & Willoquet, 2009). Portanto, é de extrema relevância a pesquisa e o desenvolvimento de estratégias para a busca de substâncias ativas ou antivirais para o tratamento dos pacientes.

Várias plantas medicinais têm se mostrado promissoras para tratamento de diversas infecções virais, sendo que algumas delas mostraram atividade antiviral de amplo espectro (Semple *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2013). Desse



modo, na busca de abordagens para a descoberta de antivirais e na tentativa de identificar compostos que podem ser usados como antivirais contra o *Dengue virus* (DENV), percebeu-se o grande potencial existente entre os produtos naturais. De fato, a natureza representa um fantástico reservatório de substâncias a ser explorado na descoberta de novas moléculas, que podem ser usadas diretamente como agentes farmacêuticos ou serem modificadas quimicamente para o desenvolvimento de agentes antivirais.

Neste trabalho, pretende-se identificar extratos de plantas e de fungos pertencentes à extratoteca Colab da Fiocruz Minas que apresentam atividade antiviral contra DENV. E uma forma de buscar novas substâncias antivirais é realizar a triagem de extratos de plantas e fungos visando detectar a bioatividade destes compostos em modelos *in vitro*.

Inibidores da infecção e/ou replicação do DENV encontrados em extratos de plantas triados neste trabalho, poderão ser eventualmente utilizados para o desenvolvimento de drogas antivirais para o tratamento da dengue e, para tratar doenças causadas por outros vírus da família *Flaviviridae* com grande relevância para a saúde pública, tais como o vírus da febre amarela, o vírus da Hepatite C, o vírus do Oeste do Nilo, o vírus da encefalite japonesa, o *Zica virus* e até mesmo de outros arbovírus de outras famílias, como, por exemplo, o *Chickungunya virus*.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Identificar extratos de plantas ou de fungos da extratoteca Colab da Fiocruz Minas, capazes de inibir, *in vitro*, a multiplicação de *Dengue virus*.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a atividade antiviral de extratos vegetais e fúngicos da extratoteca Colab da Fiocruz Minas, contra o vírus dengue tipo 2 (DENV-2) em células BHK-21 utilizando-se o ensaio do MTT e a avaliação do efeito citopático (ECP) viral por microscopia óptica;

- Determinar a concentração efetiva 50 (CE<sub>50</sub>) de extratos com atividade antiviral contra DENV-2, em células BHK-21, pelo ensaio do MTT e pela avaliação do ECP viral;

- Determinar a concentração citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) de extratos com atividade antiviral contra DENV-2, em células BHK-21, pelo ensaio de MTT e pela avaliação do ECP viral.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Dengue

A dengue é uma doença viral endêmica que atualmente afeta quase a totalidade dos países tropicais e subtropicais. Nos últimos 50 anos, sua incidência aumentou em cerca de 30 vezes, com ampliação da expansão geográfica para novos países. Ressalta-se que na presente década, a dengue também tem se espalhado para pequenas cidades e em áreas rurais (Guzman & Harris, 2015).

Há um amplo espectro de manifestações clínicas da dengue causadas pela infecção com o DENV que variam desde formas assintomáticas até a febre da dengue (FD), febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD). A FD é caracterizada pelo aparecimento súbito de febre alta, dor de cabeça intensa, especialmente na área retro-orbital, artralgia, mialgia, náuseas, vômitos e erupções cutâneas. Bebês e crianças tendem a apresentar uma doença febril indiferenciada, geralmente com erupção cutânea. A doença febril aguda dura cerca de 2 a 7 dias. Além dos sintomas apresentados na FD, a FHD é definida clinicamente por manifestações hemorrágicas, trombocitopenia grave ( $<100.000/\text{mm}^3$ ) e evidência de extravasamento de plasma para as cavidades do corpo. A perda do plasma é evidenciada pelo aumento do hematócrito acima de 20% da média considerada normal, bem como taquicardia, hipotensão, derrame pleural e ascite, podendo ocorrer ainda, sangramento do trato gastrointestinal, epistaxe, desconforto epigástrico, mialgia, vômitos, diarreia, dor abdominal e hipoproteinemia (Gubler *et al.*, 2007; Oishi *et al.*, 2007; Guzman & Harris, 2015).

A OMS, em 1997, definiu quatro graus de gravidade da dengue, onde no grau I verifica-se febre acompanhada de sintomas inespecíficos e prova do laço positiva como a única manifestação de dengue hemorrágica; no grau II em que, além das manifestações do grau I, são observadas hemorragias espontâneas leves (sangramento de pele, epistaxe, gengivorragia); no grau III, no qual se observa colapso circulatório com pulso fraco e rápido, hipotensão, inquietação, pele fria e colabada ao toque; e o grau IV, caracterizado por choque profundo com ausência de pressão arterial e pressão de pulso imperceptível. O grau III e grau IV são

considerados como SCD (OMS, 2009 - Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf?ua=1>).

A SCD está associada a uma elevada mortalidade. O extravasamento grave do plasma resulta em choque prolongado acompanhado de acidose metabólica, o que leva à coagulação intravascular disseminada (CID). Hemorragia maciça ou encefalopatia também podem ocorrer, necessitando de transfusão sanguínea intensiva. Outras manifestações como falência hepática e renal, miocardite e síndrome hemolítico-urêmica, embora raras, podem acontecer e parecem estar associadas aos níveis mais graves da doença. O percentual de pacientes com dengue grave que apresentam encefalopatia pode variar de 0,5 a 6,2%, com taxas de mortalidade de 22% (Malavige *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2007; Teo *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2014).

Dificuldades na aplicação do sistema de classificação de estadiamento em quatro estágios e aumento de casos graves que não preenchem os critérios para FHD, levantaram discussões acirradas fazendo com que uma nova classificação fosse proposta pela OMS em 2009. Nesta nova classificação, focada nos níveis de gravidade, a doença é classificada como (i) dengue, (ii) dengue com sinais de alerta e (iii) dengue grave. No entanto, o Brasil adotou essa nova classificação somente a partir de janeiro de 2014. Os critérios para cada nível de classificação estão representados na figura 1 (OMS, 2009).



**Figura 1 - Classificação de casos de dengue com base nos níveis de gravidade.** A nova classificação proposta pela OMS em 2009 para diagnóstico da dengue, adotada pelo Brasil em Janeiro de 2014, classifica a doença em: dengue, dengue com sinais de alerta e dengue grave. Fonte: OMS, 2009. (Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control - Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/documents/denguediagnosis.pdf?ua=1>>. Acesso em: Fevereiro de 2016).

### 3.2 Dengue virus (DENV)

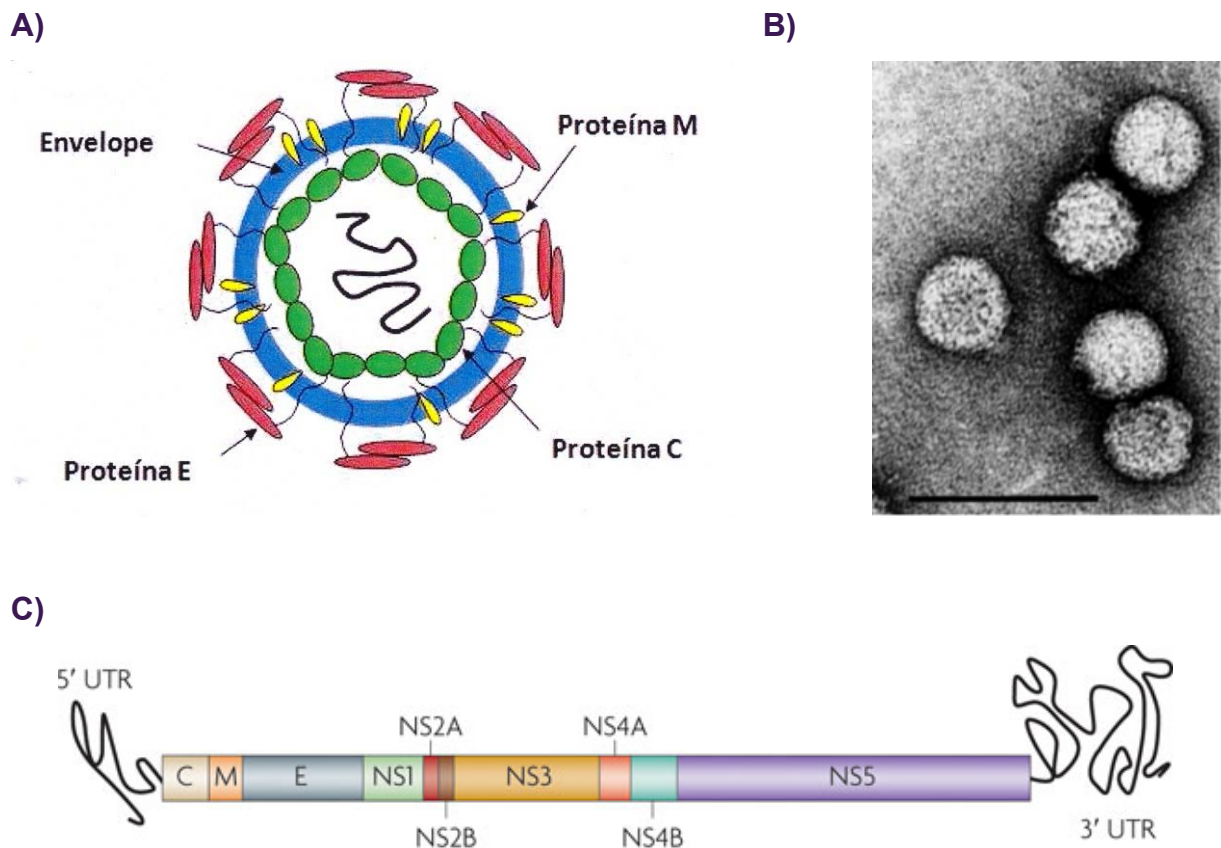
O *Dengue virus*, gênero *Flavivirus* e da família *Flaviviridae*, possui quatro sorotipos antígenicamente distintos, denominados DENV-1, 2, 3 e 4. A classificação em sorotipos é baseada nas características antigênicas dos vírus, analisadas por testes como neutralização viral, imunofluorescência em cultura de células, fixação de complemento e estudos de painéis de anticorpos monoclonais (Lindenbach *et al.*, 2003). Uma infecção com um sorotipo de DENV resulta em proteção por toda a vida contra reinfecções com o mesmo sorotipo, no entanto, garante apenas uma breve proteção contra reinfecções heterólogas. Anticorpos específicos para o sorotipo da primeira infecção ligam-se ao sorotipo heterólogo da infecção secundária, mas não são capazes de neutralizá-lo, aumentando o risco para o desenvolvimento das formas graves da dengue (Halstead *et al.*, 1988; Leardkamolkarn *et al.*, 2012).

Recentemente, foi anunciada a descoberta de um novo sorotipo, o *Dengue virus* tipo 5 (DENV-5), isolado de um surto na Malásia em 2007. Até o momento, esse novo sorotipo foi isolado somente nesse surto, mas os pesquisadores envolvidos no estudo suspeitam que o DENV-5 esteja circulando entre macacos nas florestas da Malásia (Mustafa *et al.*, 2015; Normile, 2013)

Análises filogenéticas revelam que os sorotipos de DENV são geneticamente distintos, em níveis semelhantes a diferentes espécies e, em um mesmo sorotipo, pode-se encontrar uma diversidade genética suficiente para caracterizá-los em diferentes genótipos (Holmes & Burch, 2000; Holmes & Twiddy, 2003; Mackenzie *et al.*, 2004; Vasilakis *et al.*, 2007, Figueiredo *et al.*, 2008; Barcelos Figueiredo *et al.*, 2014).

O DENV é esférico, coberto por um envelope lipídico e apresenta nucleocapsídeo icosaédrico com 30 nanômetros de diâmetro. O capsídeo é composto pela proteína do capsídeo (C) e envolto por uma membrana lipídica na qual as proteínas de membrana (M) e de envelope (E) estão ancoradas (figura 2). Seu genoma é composto por RNA fita simples (ssRNA) de 10,2 Kb, com polaridade positiva e possui apenas uma ORF (*open reading frame*), flanqueada por duas regiões não codificantes nas suas extremidades 5' e 3'. A poliproteína codificada pela ORF possui aproximadamente 3.400 aminoácidos, sendo posteriormente clivada em eventos co- e pós-traducionais por enzimas celulares e virais, resultando em três proteínas estruturais: envelope (E), capsídeo (C) e membrana (M); e sete proteínas não estruturais (NS), a saber: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (Ray & Shi, 2006; Lindenbach *et al.*, 2007).

As proteínas NS são necessárias para a replicação e tradução do genoma viral, podendo exercer um papel na montagem e liberação das partículas do DENV (Kummerer & Rice, 2002) e evasão da resposta imune inata (Muñoz-Jordan *et al.*, 2003, 2005; Ray & Shi, 2006; Lindenbach *et al.*, 2007).



**Figura 2 - Morfologia do DENV.** A) Desenho esquemático da estrutura do DENV. O RNA genômico encontra-se envolto por um nucleocapsídeo icosaédrico, composto pela proteína C. O nucleocapsídeo é, por sua vez, envolto em uma bicamada lipídica que contém as proteínas M e E. B) Micrografia eletrônica de partículas do DENV-2 coradas negativamente. Barra representa 100 nm. C) Organização do RNA genômico do DENV contendo genes codificadores para as três proteínas estruturais: capsídeo (C), membrana (M) e envelope (E), e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Fonte: Lindenbach & Rice, 2003; Guzman & Isturiz, 2010.

A glicoproteína E é a principal e maior proteína estrutural do DENV, sendo de fundamental importância para a ligação do vírus ao receptor celular e fusão da membrana viral com a membrana endossomal, além de participar da montagem da partícula viral. Vários receptores celulares capazes de se ligar à proteína E em células de mamíferos e invertebrados já foram descritos, entre os quais se incluem glicosaminoglicanos em células Vero e BHK-21 (Chen *et al.*, 1997; Hung *et al.*, 2004; Hung *et al.*, 1999), ligante de ICAM-3 específico de células dendríticas derivadas de monócitos (DC-SIGN) [Tassaneeritthep *et al.*, 2003], receptor de manose em

macrófagos (CD206) [Miller *et al.*, 2008] e proibitina em células derivadas de larvas do mosquito *Aedes albopictus* (C6/36) [Kuadkitkan *et al.*, 2010].

A proteína E apresenta atividade hemoaglutinante e é o principal alvo para anticorpos neutralizantes, sendo o maior determinante antigênico da partícula viral (Lindenbach *et al.*, 2007). Ela pode ser glicosilada de formas distintas, de acordo com o sorotipo ou o tipo de célula na qual o vírus é propagado, tendo sido relacionada com a ligação ao receptor e fusão endossomal (Clyde *et al.*, 2006).

Já a proteína M é uma pequena fração de 8 kDa originada a partir da clivagem proteolítica da precursora pré-M (pré-membrana) de 22 kDa durante a maturação viral. Esta clivagem precede a liberação do DENV da célula hospedeira e resulta na reorganização da estrutura superficial do vírus para então expor o domínio de ligação de E. A presença da proteína pré-M parece ser necessária para o correto dobramento da proteína E, e acredita-se que proteja a proteína E da reorganização por pH e fusão prematura durante a secreção. Além disso, a pré-M contém uma sequência sinal que permite a translocação da proteína E para dentro do retículo endoplasmático (Lindenbach *et al.*, 2007).

A proteína C é o primeiro polipeptídeo sintetizado e é capaz de interagir com o ssRNA viral. Trata-se de uma proteína de carga positiva devido à proporção dos aminoácidos básicos e isso parece neutralizar a carga negativa do ssRNA. Além disso, a proteína C contém uma sequência sinal hidrofóbica na região C-terminal que transloca a pré-M para o retículo endoplasmático durante a tradução (Lindenbach *et al.*, 2007).

As proteínas não estruturais NS1, NS3 e NS5 são as mais conservadas e também de maior peso molecular entre os flavivírus. A NS1 é uma glicoproteína conservada com 48 kDa e com seis ligações dissulfeto intramoleculares. Essa proteína é sintetizada como um monômero, mas sofre dimerização após modificações pós-traducionais, tais como a adição de resíduos de carboidratos no lúmen do retículo. Após o processamento, o dímero de NS1 pode localizar-se no interior da célula, no sítio de replicação viral, na superfície celular ou ainda no meio extracelular (Gutsche *et al.*, 2011). A maioria das moléculas de NS1 associada à célula localiza-se junto ao complexo de replicação viral, atuando como cofator da síntese de RNA viral. A NS1 atua na fase precoce da infecção viral e também parece estar envolvida na morfogênese da partícula viral. Entretanto, a função de NS1 na replicação viral ainda precisa ser esclarecida (Lindenbach & Rice, 1999;



Satchidanandam *et al.*, 2006). A presença da NS1 nas membranas celulares determina a citólise das células infectadas e a torna alvo dominante da imunidade humoral, sendo, também, caracterizada como molécula altamente imunogênica (Avirutnan *et al.*, 2006). A NS1 circulante tem sido considerada um importante marcador de diagnóstico de infecção, principalmente, durante a fase aguda, que ocorre do primeiro ao sétimo dia após o aparecimento dos primeiros sintomas da doença. Os níveis desta proteína podem variar entre os indivíduos durante o curso da doença, e dessa forma, a presença da NS1 circulante no soro permite a detecção precoce da infecção viral (Alcon *et al.*, 2002).

A proteína NS3 é a segunda maior proteína encontrada nos flavivírus com cerca de 70 kDa e possui atividade de helicase e de protease. É a melhor caracterizada entre as proteínas não estruturais e tem sido implicada na interação entre DENV e a proteína de ligação do receptor nuclear humano, que modula o tráfego intracelular entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. Epítomos de NS3 são comumente encontrados no repertório de linfócitos T citotóxicos específicos contra DENV. A proteína NS3 apresenta um terço da porção N-terminal com características de protease cuja atividade requer a presença da proteína NS2B, que atua como um cofator para a clivagem das junções NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A e NS4B-NS5 da poliproteína. A porção restante de NS3 forma um domínio helicase que age em conjunto com NS5 durante a polimerização do ácido nucleico viral (Johansson *et al.*, 2001).

A maior e mais conservada proteína entre os flavivírus é a proteína NS5 que codifica a RNA polimerase viral dependente de RNA. Esta proteína possui 104 kDa e tem pelo menos dois domínios distintos: a região N-terminal apresenta similaridade com metiltransferases de vários grupos e com uma ampla variedade de espécies (Koonin, 1993) e o domínio C-terminal que contém oito motivos de sequências altamente conservadas reconhecidas em muitas polimerases dependentes de RNA. A proteína NS5 foi encontrada formando um complexo com NS3 em células de macaco infectadas com DENV-2 (Kapoor *et al.*, 1995). Após sua tradução inicial, a NS5 inicia a produção do RNA viral de polaridade negativa, que atua como molde para síntese de novas cópias de RNA de polaridade positiva. Estas, por sua vez, podem ser empacotadas em partículas virais ou servir como RNA mensageiro (Fernandez-Garcia *et al.*, 2009). A NS5 também pode induzir a transcrição e tradução de interleucina-8 (IL-8) (Chang, 1997; Lindenbach & Rice, 2003).

As proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são pouco conservadas entre os flavivírus e acredita-se que participam do complexo de replicação viral como componentes da membrana (Lindenbach *et al.*, 2007). A proteína NS4A (16 kDa) e NS4B (27 kDa) participam na localização apropriada de proteínas virais e montagem do vírion (Lindenbach & Rice, 2003). A capacidade de NS4A juntamente com NS2A de bloquear a tradução de sinal mediada por interferon já foi relatada. A NS4 é um potente inibidor de sinalização de interferon beta (IFN- $\beta$ ) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) [Muñoz-Jordán *et al.*, 2003, 2005; Clyde *et al.*, 2006] e já foi sugerido que NS2A, NS4A e NS4B servem para ancorar a replicase viral às membranas celulares (Bartenschlager & Miller, 2008). A proteína NS2A é necessária para o apropriado processamento proteolítico de NS1. A proteína NS2B (14,5 kDa) está envolvida na função protease do complexo NS2B-NS3 (Chang, 1997).

### 3.3 Transmissão do DENV

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor que transmite o DENV. A infecção do mosquito inicia-se quando a fêmea se alimenta do sangue de um indivíduo infectado com DENV. Dentro do mosquito, o vírus infecta o intestino médio e espalha-se para as glândulas salivares no período de 8 a 12 dias. Após esse período de incubação, o vírus pode ser transmitido aos seres humanos, principais hospedeiros e amplificadores do DENV. Geralmente, o vírus circula no sangue de pessoas infectadas até 7 dias após a infecção (período de viremia) e pode ser transmitido novamente ao mosquito vetor (Watts *et al.*, 1987; Gubler, 1989).

O *A. aegypti*, principal vetor urbano, tem hábitos preferencialmente diurnos e alimenta-se de sangue humano, sobretudo ao amanhecer e ao entardecer, sendo considerado altamente eficiente para a transmissão do DENV. Entretanto, outros mosquitos vetores como o *Aedes albopictus* e *Aedes polynesiensis* também são capazes de transmitir o vírus (Mackenzie *et al.*, 2004; Gubler *et al.*, 2007). Alguns autores alertam para a rápida propagação e a potencial capacidade de transmissão pelo vetor *A. albopictus* mesmo este sendo considerado um vetor secundário para a transmissão do DENV (Paupy *et al.*, 2009).

A maioria das fêmeas adultas do *A. aegypti* vive dentro ou nos arredores dos domicílios onde estão seus criadores larvais. Geralmente, as larvas do mosquito são

encontradas em água limpa parada ou em água acumulada, com pouco material orgânico, dentro de recipientes como: cisternas, piscinas, caixas d'água, bromélias e pneus (OMS, 2015).

Os mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* também têm sido responsáveis pela transmissão do *Chikungunya virus* (CHIKV), membro da família *Alphaviridae*, que causa a febre chikungunya, uma doença grave, debilitante, que provoca artralgia grave que pode durar de meses até cinco anos em alguns pacientes. Desde 2004, o CHIKV tem ampliado sua abrangência geográfica, causando surtos epidêmicos de magnitude sem precedentes, principalmente em países da Ásia, África e se espalhando para vários outros territórios, como Ilhas do Oceano Índico, Itália, França e nas Américas (Rezza *et al.*, 2007; Pialoux *et al.*, 2007; Gould *et al.*, 2010; OPAS, 2011, 2015). No Brasil, em 2014, foram confirmados 2.753 casos autóctones de febre chikungunya e em 2015 foram notificados 17.765 casos autóctones suspeitos da doença. Destes, 6.784 foram confirmados, sendo 6.355 por critério laboratorial e 429 por critério clínico-epidemiológico. Mais de 9000 casos continuam em investigação. (Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/15/svs2016-be002-dengue-se51.pdf>> Acesso em 8 de fevereiro de 2016).

A transmissão do DENV, da fêmea infectada para sua progênie, chamada transmissão transovariana, pode ocorrer em todas as espécies de mosquito que atuem como vetores do DENV, aumentando a probabilidade de sobrevivência do vírus e promovendo um importante meio de amplificação viral (Mackenzie *et al.*, 2004). Vários fatores podem influenciar a dinâmica de transmissão do DENV, como, por exemplo, fatores climáticos, ambientais, interações vírus-hospedeiro e também características imunológicas da população (OMS, 2015). Apesar da principal rota de transmissão ocorrer por meio de mosquitos do gênero *Aedes*, o DENV pode ser transmitido por transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos (Teo *et al.*, 2009), picadas acidentais com agulhas e por transmissões verticais por meio do parto ou da amamentação (Chen & Wilson, 2004; Barthel *et al.*, 2013).

### 3.4 Infecção e multiplicação do DENV

A infecção do DENV ocorre quando o mosquito vetor, ao se alimentar, injeta o vírus no hospedeiro. O DENV tem o homem e outros primatas como hospedeiros vertebrados, mas somente o homem apresenta manifestação clínica da infecção e período de viremia longo. Em primatas, a viremia é baixa e de curta duração, durando apenas um ou dois dias e não atingindo títulos altos de carga viral. Em hospedeiros humanos, o vírus permanece no sangue por um período que pode durar de 2 a 12 dias e com altos títulos virais (Henchal & Putnak, 1990).

Em humanos, células da linhagem mononuclear fagocítica como monócitos, macrófagos e células dendríticas, são os principais alvos para a multiplicação do DENV. Estudos *in vitro* demonstraram que o DENV é capaz de infectar outros tipos de células como células B e T, células endoteliais, hepatócitos, células neuronais, assim como várias linhagens celulares usadas para sua propagação. Apesar de alguns estudos relatarem a possibilidade de hepatócitos, linfócitos, células endoteliais e neuronais atuarem também como alvo do vírus na infecção em humanos, isto ainda é controverso na literatura (Clyde *et al.*, 2006).

Dentre as várias moléculas de superfície celular já descritas como prováveis receptores para a infecção do DENV em células de mamíferos, as mais conhecidas são as moléculas com propriedades de lectinas: CLEC5A (lectina do domínio tipo C, família 5, membro A), o CD206 (Miller *et al.*, 2008) e o DC-SIGN. A interação melhor caracterizada foi entre o DENV e o DC-SIGN, já que esta proteína pode mediar a infecção de todos os quatro sorotipos de DENV (Tassaneetrithep, 2003; Navarro-Sanchez, 2003). Fatores relacionados com o enovelamento de proteínas, como proteínas *heat shock* (HSP70/HSP90) e a chaperonas GRP78 também podem estar envolvidos. Além disso, moléculas de glicosaminoglicanos sulfatados (GAG), como o heparano sulfato e glicosfingolípídeos (GSL), como o nLc4Cer (neolactotetraosilceramida), atuam como co-receptores, aumentando a concentração local de vírus na superfície celular e, conseqüentemente, a eficiência na penetração do vírus (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Clyde *et al.*, 2006; Lindebach *et al.*, 2007; Perera *et al.*; 2008; Hidari & Suzuki, 2011; Alen & Schols, 2012). A proibitina, já citada anteriormente, presente em células C6/36 derivadas de *A. albopictus*, foi o primeiro receptor proteico caracterizado do DENV (Kuadkitkan *et al.*, 2010).

Após a adsorção na superfície celular, o vírus entra na célula alvo por endocitose mediada por receptores. Logo após a internalização, as partículas virais são direcionadas para endossomos precoces ou intermediários que se tornarão endossomos tardios. Com a mudança de pH e acidificação no interior dos endossomos, ocorrem mudanças conformacionais na proteína E que resultam em sua trimerização e, conseqüentemente, na exposição do peptídeo de fusão, seguida de fusão das membranas viral e celular, que por sua vez, é seguida pela liberação do nucleocapsídeo no citoplasma (Lindenbach *et al.*, 2013; Perera *et al.*, 2008). Assim que o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma, a proteína C se dissocia do RNA viral que, então, é traduzido em uma poliproteína em ribossomos associados às membranas no retículo endoplasmático. A poliproteína é co- e pós-traducionalmente processada por proteases celulares e virais, produzindo as proteínas estruturais e não estruturais virais. A eficiência da tradução é um dos principais determinantes da infectividade dos flavivírus. Assim, diversas estruturas secundárias presentes nas regiões UTR 5' e 3' do genoma viral, regiões não traduzidas, favorecem esse processo (Clyde *et al.*, 2006; Lindenbach *et al.*, 2013).

Após a tradução, a replicação do genoma se inicia com a síntese de uma fita de senso negativo complementar ao RNA genômico viral que servirá como molde para a síntese do RNA de fita positiva. Em seguida, acontece a circularização do genoma viral que é essencial para a replicação do DENV. Por fim, para a montagem da partícula viral, o genoma é encapsidado pela proteína C e os nucleocapsídeos formados se acumulam na parte citoplasmática do retículo endoplasmático, onde sofrem brotamento para dentro do lúmen desta organela. Neste processo, os nucleocapsídeos adquirem envelopes com proteínas estruturais do vírus que foram previamente ancoradas à membrana do retículo endoplasmático, originando desta forma, as partículas imaturas (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010).

A maturação das partículas virais ocorre no complexo de Golgi, onde as proteínas pré-M, E e NS1 são glicosiladas. A proteína pré-M é clivada pela furina celular, produzindo a proteína M glicosilada. No momento da exocitose a proteína E sofre um rearranjo, resultando na partícula que é então liberada para o meio extracelular (Lindenbach *et al.*, 2013; Perera *et al.*, 2008). Embora a maioria das partículas virais maduras sejam exocitadas, cerca de 30% da progênie viral liberada para o meio extracelular é constituída de partículas totalmente imaturas, contendo

pré-M e M. Tal observação sugere que a clivagem da proteína pré-M não é um processo eficiente (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010).

### 3.5 Epidemiologia da Dengue

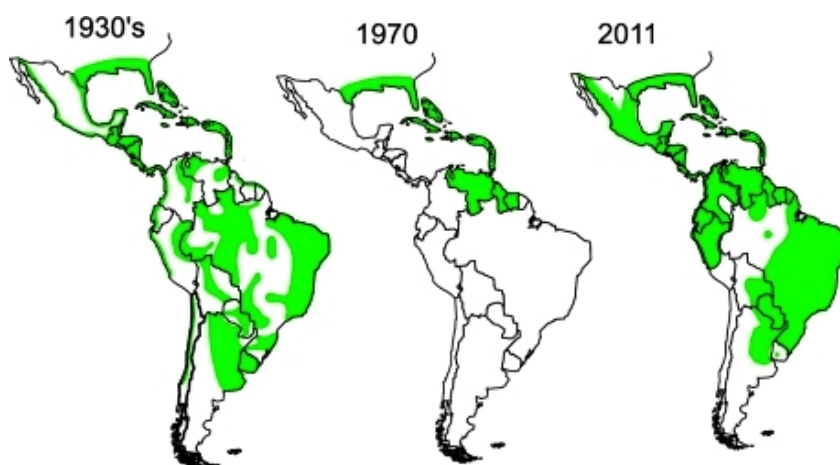
No século XIX, a dengue era considerada uma doença esporádica que causava epidemias em intervalos que variavam de 10 a 40 anos, que geralmente aconteciam quando um novo sorotipo do DENV era introduzido. Estes longos períodos entre epidemias são um reflexo de vários fatores, pois, apesar do DENV ter uma ampla distribuição pelos trópicos, a população urbana naquela época era bem menor, o vírus e o mosquito vetor dependiam primariamente de navios oceânicos para o transporte entre as regiões e o comércio naval tinha um ritmo muito lento. Além disso, apenas um ou dois sorotipos de DENV circulavam na maioria dos países tropicais (Gubler, 2002, 2011; OMS, 2015).

Durante a Segunda Guerra Mundial essa situação mudou drasticamente no sudeste asiático. A inserção de milhares de soldados susceptíveis em áreas endêmicas, somada à expansão da distribuição geográfica e da densidade dos mosquitos *A. aegypti*, resultaram em grandes epidemias de dengue. Além disso, a disseminação do DENV para novas regiões foi acelerada pela movimentação das tropas e materiais de guerra que transportavam o vírus e o mosquito vetor. Isso resultou, ao final da guerra, na hiperendemicidade da doença na maioria dos países do sudeste asiático e na cocirculação de múltiplos sorotipos do DENV. Com o fim da guerra, foram documentadas várias epidemias da FHD, inicialmente nas Filipinas (1953-1954) e, mais tarde, registradas em vários países: Tailândia (1958), Singapura, Malásia, Vietnã, Indonésia e Birmânia nos anos 1970. Como a urbanização e comércio continuaram a crescer, a frequência e magnitude das epidemias aumentaram (Gubler, 2002, 2011; Mackenzie *et al.*, 2004).

Na década de 1980, a FHD se tornou a principal causa de hospitalizações e morte entre crianças em vários países do sudeste asiático. Até então, as epidemias da FHD eram limitadas a esses países, em parte, devido ao isolamento geográfico das ilhas do Pacífico. Contudo, a partir da metade dos anos 70, vários dos países nas Américas foram reinvadidos pelo mosquito *A. aegypti* (figura 3). Além disso, a eficiência dos transportes modernos e a maior movimentação das pessoas levaram

a uma maior dispersão do DENV e dos seus vetores, resultando na disseminação de epidemias de FD/FHD no Pacífico e nas Américas (Gubler, 2002; 2011; OMS, 2015).

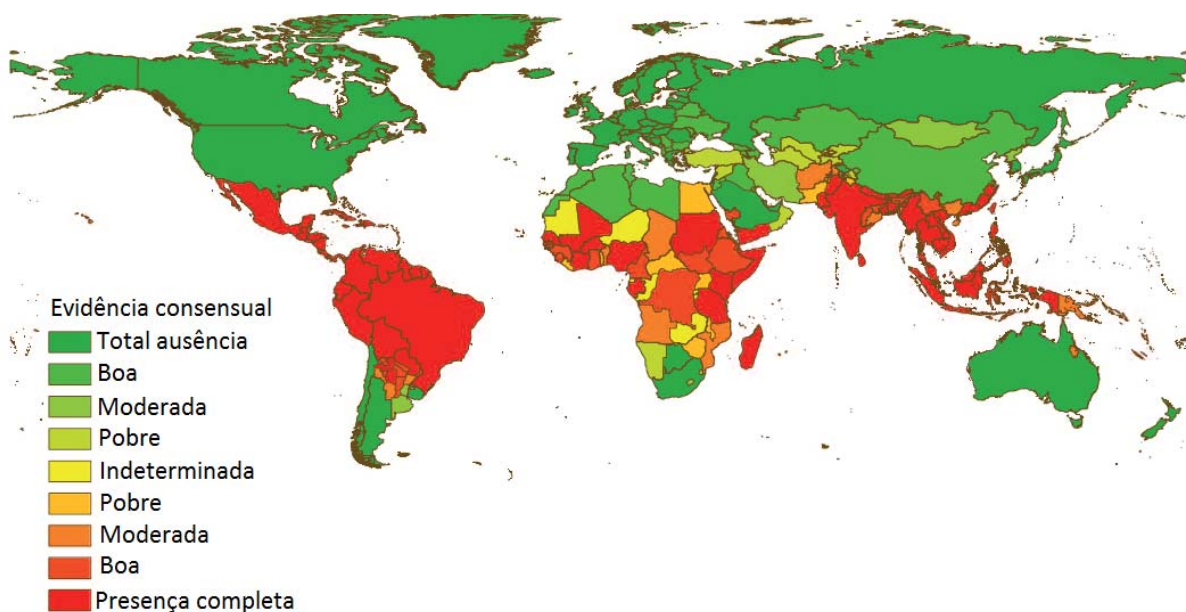
Atualmente, estima-se que 3,6 bilhões de pessoas vivem em mais de 100 países endêmicos e áreas onde o DENV pode ser transmitido. A dengue é endêmica no sudeste da Ásia, no Pacífico Ocidental, na América Central e do Sul, no Caribe e na África (figura 4). Além disso, já foram relatados casos nos Estados Unidos desde 2009 (Adalja *et al.*, 2012; Teets *et al.*, 2014) e casos autóctones isolados em países da Europa como na França (Marchand *et al.*, 2013), na Croácia (Gjenero-Margan *et al.*, 2011; Kurolt *et al.*, 2013), na Alemanha (Schmidt-Chanasi *et al.*, 2014) e em Portugal (Lourenço & Recker, 2014).



**Figura 3 - Distribuição do mosquito *A. aegypti* nas Américas nos anos de 1930, 1970 e 2011.** A reinvasão das Américas pelo mosquito *A. aegypti* ocorreu nos anos 70, 80 e 90 devido ao colapso dos programas de controle ao vetor. Fonte: Gubler, 2011.

De acordo com a OMS ocorrem anualmente mais de 500 mil casos de dengue grave e cerca de 22.000 mortes principalmente em crianças (OMS, 2015; Disponível em: < <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>>). Além do alto custo econômico e para a saúde pública, a dengue causa um grande impacto social nos países onde ocorrem epidemias. Somados ao crescimento urbano e a falta de vigilância adequada por dengue nos últimos 50 anos, há uma probabilidade enorme de que as estimativas citadas subestimem o verdadeiro ônus da doença (Gubler, 2011, 2012; Mackenzie *et al.*, 2004; Bhatt *et al.*, 2013; OMS, 2015).

De acordo com uma reanálise de dados por Bhatt e colaboradores, em 2010 aconteceram aproximadamente 390 milhões de infecções por DENV em todo o mundo. Sendo que cerca de 80% dessas infecções foram assintomáticas, ou seja, não foram detectadas pela vigilância epidemiológica e, portanto, não tiveram implicações para o manejo clínico. Assim, houve cerca de 96 milhões de infecções sintomáticas, em qualquer nível de gravidade da dengue, das quais aproximadamente 70% ocorreram na Ásia, 34% na Índia e 14% nas Américas, sendo deste último, mais da metade no Brasil e no México. Esse total de infecções de dengue é mais do que três vezes ao estimado atualmente pela OMS. (Bhatt *et al.*, 2013).



**Figura 4 – Evidência global consensual de risco e surto de dengue em 2010.** Evidência consensual nacional e subnacional da total ausência de dengue (verde) até a total presença (vermelho) de dengue. Fonte: Bhatt *et al.*, 2013.

### 3.6 A Dengue no Brasil

A reintrodução do mosquito *A. aegypti* no Brasil aconteceu no final da década de 1970. Além do clima tropical e condições ambientais receptivas ao mosquito vetor, isso aconteceu durante um período em que a vigilância entomológica e a estrutura logística para combaterem o vetor estavam quase desativadas no país (figura 3), permitindo a sua introdução em pontos estratégicos de combate e tendo uma enorme expansão territorial no Brasil (Amaral & Tauil, 1983). O primeiro surto de



dengue confirmado laboratorialmente no Brasil ocorreu em 1981 na cidade de Boa Vista, em Roraima, no qual foram isolados DENV-1 e 4 (Osanai *et al.*, 1983). Após 5 anos de intervalo sem casos de FD confirmados, uma epidemia causada pelo DENV-1 ocorreu no Rio de Janeiro em 1986 e foi seguida por diversas outras epidemias em grandes centros urbanos. Desde então, o Brasil se tornou um dos países com maior número de casos reportados à OMS, sendo responsável por 70% dos casos de dengue reportados no continente americano (Schatzmayr *et al.*, 1986; Teixeira *et al.*, 2009, OMS, 2015, Bhatt *et al.*, 2013).

Em 1990, o DENV-2 foi detectado no Rio de Janeiro, onde o primeiro caso de FHD foi confirmado. A partir de 1994 ocorreram epidemias por todo o país e durante todo o ano. Entre 1997 e 2000, o DENV-3 foi introduzido no país e os primeiros casos notificados em 2000 foram no Rio de Janeiro, se espalhando para outras localidades no Brasil (Nogueira *et al.*, 2007). Até em 2007, a maioria dos casos de FHD no Brasil ocorreram entre adultos com idade entre 20 a 40 anos de idade. Observou-se também que o número anual de casos de FHD dobrou em relação aos anos anteriores, sendo relatada uma mudança na distribuição etária dos pacientes. Neste mesmo ano, 2007, 53% dos casos ocorreram em crianças com menos de 15 anos de idade. (Teixeira *et al.*, 2009). O DENV-4 provavelmente foi reintroduzido no país durante 2004 a 2006, como sugerido por isolados obtidos em 2005 na região Norte e reemergiu no Brasil em 2010-2011 (Figueiredo *et al.*, 2008b; Souza *et al.*, 2011).

Atualmente, há a cocirculação de diferentes linhagens de DENV-1 genótipo V, diferentes genótipos de DENV-3 (genótipos I e III) e DENV-4 (genótipos I e II) no Brasil. Para o DENV-2, diferentes linhagens do genótipo americano/asiático foram detectadas (Figueiredo *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2011; Drumond *et al.*, 2013).

Em 2014, foram registrados 591.080 casos prováveis de dengue no país, sendo o maior número na região Sudeste (312.318 casos; 52,8%), seguida da região Centro-Oeste (114.814 casos; 4,1%). Comparando-se com 2013, foi observada uma redução de 59,3% dos casos de dengue no país em 2014, mas ainda assim, neste ano (2015), até a semana epidemiológica 45, foram notificados 1.534.932 de casos prováveis de dengue, sendo confirmados 1.488 casos de dengue grave. Além disso, foram confirmados 811 óbitos por dengue somente no período de janeiro a julho de

2015, o que representa um aumento no país de 79% em comparação com o mesmo período de 2014, quando foram confirmados 453 óbitos (Ministério da Saúde, 2015).

Quanto aos sorotipos virais de dengue encontrados entre os meses de janeiro a julho de 2015, foram identificados: DENV-1 (93,7%), seguido de DENV-4 (5,2%), DENV-2 (0,7%) e DENV-3 (0,4%) (Ministério da Saúde, 2015).

A capacitação e reciclagem de profissionais de saúde, principalmente da rede pública, para o enfrentamento dos casos suspeitos de dengue, têm sido fatores importantes que contribuem para melhorar as práticas de manejo clínico e favorecem o diagnóstico precoce, que é fundamental para o tratamento de suporte da doença. É preciso ressaltar que embora tenha ocorrido uma redução dos casos de dengue em 2014, o número de casos aumentou substancialmente em 2015, e qualquer descuido nas ações de contingência, se associados a outros fatores, podem contribuir para a ocorrência de epidemias. Ademais, são fatores importantes do ponto de vista epidemiológico, a entrada de um novo sorotipo em uma população, a circulação simultânea dos 4 sorotipos, assim como alterações climáticas com muito calor intercalado com pouca chuva (Ministério da Saúde, 2015).

### **3.7 Prevenção e Tratamento da Dengue**

O controle do vetor ainda é a única medida preventiva existente, no entanto, além de onerosa, é pouco eficiente, sendo difícil de ser mantida, pois depende de grandes investimentos com funcionários, máquinas, inseticidas e campanhas educacionais permanentes que mobilizem toda a comunidade (Gubler & Clark, 1994).

Grandes avanços estão sendo realizados no desenvolvimento de novos inseticidas e de métodos biológicos e genéticos para controle do mosquito vetor. Dentre os métodos biológicos, destaca-se a infecção de mosquitos pela bactéria intracelular *Wolbachia* sp. Essa bactéria, após infectar o mosquito, reduz seu tempo de vida, deixando-o menos apto para sobreviver ao período de exposição e tornar-se infeccioso. Além disso, a *Wolbachia* modula potencialmente a competência vetorial do mosquito para o DENV e/ou, em alguns casos, interferem na síntese do RNA viral (Moreira *et al.*, 2009; McMeniman & O'Neill, 2010; Hughes & Britton, 2013).

O método genético para controle do vetor consiste na liberação no ambiente de mosquitos transgênicos carreadores de genes letais que, após acasalarem com as fêmeas selvagens, geram descendentes que morrem antes de chegarem à vida adulta (Harris *et al.*, 2011).

Considera-se que o melhor método de prevenção contra a dengue seria o uso de uma vacina segura e eficaz contra todos os sorotipos. Atualmente, há várias vacinas candidatas em desenvolvimento que incluem vacinas baseadas em vírus atenuados, inativados, quiméricos, de DNA, de subunidades proteicas e até mesmo vetores recombinantes. Mas até o momento, todas encontram-se em fase de teste (Guy & Almond, 2008; Yauch & Shresta, 2014). Dentre as vacinas candidatas em fase clínica de testes, destaca-se a vacina quimérica desenvolvida pela Sanofi Pasteur. Essa vacina é tetravalente e contém vírus recombinantes atenuados, tendo como base a cepa da vacina 17D contra a febre amarela (YF17D). Os vírus que compõem essa vacina foram construídos por meio da substituição dos genes que codificam as proteínas da pré-membrana (prM) e do envelope (E) da cepa do vírus da febre amarela (YF 17D 204), pelos respectivos genes de cada um dos quatro sorotipos da dengue. Trata-se, portanto, de uma vacina combinada, que contém as cepas recombinantes resultantes CYD1, CYD2, CYD3 e CYD4 em uma única preparação (CYD1-4). Testes clínicos de fase III na América Latina e no Caribe foram concluídos em novembro de 2014 com uma eficácia global de 60,8% contra casos sintomáticos de dengue. Foi feito o acompanhamento de casos de dengue com mais de 20 mil crianças e adolescentes de 9 e 16 anos de idade, após um esquema de vacinação de 3 doses. Análises demonstraram uma proteção de 95,5% nos casos de doença grave e redução de 80,3% no risco de hospitalizações durante 25 meses no estudo (Villar *et al.*, 2015).

Embora o desenvolvimento de uma vacina seja prioridade da OMS e apesar dos grandes esforços para o desenvolvimento de tal vacina contra o DENV, ainda não existe nenhuma licenciada e disponível para uso comercial.

Como ainda não há tratamento específico para combater o DENV, usualmente é feito apenas o tratamento de suporte ao paciente para amenizar os sintomas da doença. As condutas terapêuticas iniciam-se com o gerenciamento da febre, cuidados de enfermagem, equilíbrio de fluidos, eletrólitos e parâmetros de coagulação do sangue (OMS, 2009; Beute & Vong, 2010). Pacientes com dengue podem ser tratados com acetaminofeno (Ahmad *et al.*, 2011), repouso e terapia de

reidratação oral. Caso ocorram sinais de desidratação ou sangramento, os pacientes devem ser hospitalizados (Goel *et al.*, 2004). Medicamentos a base de ácido acetil salicílico não devem ser utilizados, pois possuem efeito anticoagulante e aumentam o risco de hemorragias (Oishi *et al.*, 2007; Guy & Almond, 2008). Exames para a contagem de plaquetas, assim como a medida do hematócrito, devem ser feitos diariamente a partir do suposto dia 1 da doença até 1 a 2 dias após a defervescência (Ahmad *et al.*, 2011).

Vários são os desafios para o uso programático de uma possível terapêutica específica da dengue na prática clínica. Para evitar as complicações da dengue, observadas entre o quarto e o sexto dia, seria necessária a administração de uma terapia precoce no curso da doença. Isso levanta uma série de desafios, já que o paciente pode não apresentar os sinais de gravidade no início da infecção. Além disso, não é fácil diferenciar a dengue de outras doenças febris e os testes de diagnóstico rápido são relativamente caros e nem sempre estão disponíveis. Vale ressaltar que a identificação dos pacientes com risco de doença grave, mais suscetíveis de se beneficiarem com a terapêutica, ainda não é possível. Ademais, apesar de consideráveis esforços em pesquisas, a patogênese da dengue ainda não é totalmente compreendida (Whitehorn & Simmons, 2011).

Embora ainda não exista tratamento específico, há avanços significativos na identificação de alvos potenciais e no desenvolvimento de drogas específicas contra DENV. Inibidores da penetração, inibidores da protease NS3, análogos de nucleosídeo e oligonucleotídeos antisense são os mais promissores (Ray & Shi, 2006; Melino & Paci, 2007; Perera *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2008; Nair *et al.*, 2009; Alen & Schols, 2012). No entanto, embora o desenvolvimento de drogas anti-DENV esteja em andamento (Farrar *et al.* 2007), a sua utilização regular em contextos clínicos não parece iminente.

### **3.8 A Biodiversidade como fonte de antivirais**

A dengue tem alto custo para a sociedade, como salários perdidos, produtividade diminuída, despesas de custos relacionadas à prestação de cuidados de saúde, além de despesas médicas diretas. Apenas no hemisfério ocidental, o custo da dengue é estimado em cerca 2,1 bilhões de dólares por ano (Beatty *et al.*, 2011). Desse modo, pesquisadores têm focado sua atenção na natureza, utilizando

diferentes abordagens na tentativa de identificar substâncias que podem ser usadas como antivirais contra o DENV.

De fato, a natureza representa um fantástico reservatório de substâncias que podem ser exploradas objetivando a descoberta de novas moléculas, que podem ser usadas diretamente como agentes farmacêuticos ou serem utilizadas como protótipos e otimizadas para o desenvolvimento de agentes antivirais. Substâncias presentes em produtos naturais são derivadas de vários “fenômenos” da biodiversidade. Interações entre os organismos e seu ambiente permitem a formulação de diversas entidades químicas complexas dentro dos organismos, que favorecem sua sobrevivência e competitividade. Os produtos naturais e seus derivados têm sido uma rica fonte para a descoberta de novos medicamentos. As áreas terapêuticas das doenças infecciosas e da oncologia têm se beneficiado bastante com numerosas classes de drogas, capazes de interagirem com muitos alvos específicos dentro da célula. E de fato, por muitos anos, os produtos naturais têm sido fontes para o desenvolvimento e descoberta de drogas (Lee, 2011).

A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antiga quanto a civilização humana e, por um longo tempo, produtos minerais, vegetais e animais foram as principais fontes de drogas utilizadas para o tratamento de doenças na medicina alternativa.

A medicina alternativa ou complementar é baseada no conhecimento, experiência e práticas baseadas na sabedoria popular e também de crenças de culturas indígenas que são usadas para preservar a saúde, tratar e diagnosticar doenças físicas ou mentais. Plantas medicinais tradicionais têm mostrado atividade antiviral em vários estudos (Kudi & Myint, 1999; Betancur-Galvis *et al.*, 1999) e algumas têm sido usadas para tratar infecções com vários tipos de vírus DNA e RNA em animais e humanos (Müller *et al.*, 2007).

Há registros de um grande número de formulações empregando ervas medicinais descritas por diversas civilizações antigas. Os primeiros registros, feitos em tabletas de argila em escrita cuneiforme, são da Mesopotâmia datados de 2600 a.C. Há vários relatos de formulações por outras civilizações antigas, entre elas: a civilização egípcia (Papiro de Ebers, 1500 a.C.), a chinesa (Chinese Materia Medica, 1100 a.C.), a hindu (Ayurved; System of Medicine, 1000 a.C.) a grega (relatadas nos trabalhos de Teofrasto, de ~ 300 a.C. e de Galeno, de 130 - 200 d.C). Ainda hoje, entre milhares de substâncias derivadas de plantas, são descritas a utilização de

óleo de cedro (*Cedrus* spp.), de cipreste (*Cupressus sempervirens*), mirra (*Commiphora* spp.) e a dormideira (*Papaver somniferum*) que ainda estão em uso para o tratamento de tosse, resfriados, infecções parasitárias e inflamações (Pasquale, 1984).

De acordo com a OMS, em muitos países desenvolvidos, principalmente da Europa, uma grande parcela da população ainda hoje faz uso de práticas complementares de saúde, sobretudo com o uso de plantas medicinais. Mesmo sendo fácil o acesso à medicina moderna, o uso de plantas medicinais nesses países ainda mantém uma alta popularidade, tanto por razões culturais quanto históricas. Já nos países em desenvolvimento, principalmente nos continentes asiático e africano, 65-80% da população depende exclusivamente de plantas medicinais para cuidados básicos de saúde. Esse é outro importante motivo pelo qual plantas medicinais e sua biodiversidade são economicamente importantes (Rahman *et al.*, 2004; OMS, 2015).

No Brasil, o uso de plantas medicinais foi disseminado principalmente pela cultura indígena. É um país rico em biodiversidade cujo território possui cinco principais biomas: a floresta amazônica, o cerrado, a mata atlântica, o pantanal e a caatinga, que constituem uma fonte riquíssima de produtos terapêuticos. No entanto, o potencial para a descoberta de plantas como fonte de novas drogas, ainda é pobremente explorado ou regulamentado no Brasil, contrastando com países como Alemanha, Estados Unidos e Canadá (Calixto, 2000; Rates, 2001; Veiga-Junior, 2008).

Historicamente, companhias farmacêuticas utilizaram extratos de plantas para produzir formulações terapêuticas relativamente rudimentares, mas com o avanço dos antibióticos em meados do século XX, formulações de drogas de substâncias razoavelmente purificadas tornaram-se mais frequentes (Firn & Jones, 2003).

Atualmente, sabe-se que para um fármaco qualquer produzir um efeito real em oposição a um efeito placebo, ele deve interagir a nível molecular com pelo menos um componente do corpo ou com um micro-organismo infeccioso. Entretanto, algumas drogas ou compostos, podem interagir em local diferente do esperado e produzir um efeito indesejado. Considerando que, produtos naturais como extratos de plantas contêm uma complexidade de misturas variáveis de químicos, o risco de efeitos secundários indesejados é sempre alto. Embora uma das maneiras mais simples encontradas para diminuir o risco de efeitos indesejados seja isolar o

componente que produz a resposta desejada, esse não foi o motivo pelo qual inicialmente pretendeu-se a purificação de substâncias contidas em produtos naturais. O principal motivo foi a necessidade de identificar produtos de plantas adulterados através da determinação da quantidade de princípios ativos neles. Somente depois que isso pôde ser feito foi reconhecido que a composição dos produtos químicos e as substâncias ativas variavam quantitativamente e qualitativamente durante todo o ciclo de vida da planta, sendo influenciado por vários aspectos, como: mudanças nas condições climáticas, o tempo de colheita, a adequação do processo de secagem e a natureza e duração do armazenamento (Sneider, 2005).

Paralelamente à ideia de substâncias “puras”, despertou-se a possibilidade de modificações estruturais, visando à produção de drogas mais ativas e seguras, com aumento da atividade, seletividade e/ou a redução dos efeitos secundários ou toxicidade. Como exemplos destacam-se o isolamento da morfina por Emanuel Merck em 1826 e a primeira droga semissintética, a aspirina, produzida pela Bayer, em 1899 (Pasquale, 1984; Newman & Cragg, 2003; Chattopadhyay & Naik, 2007). A aspirina, um dos primeiros produtos químicos naturais modificados quimicamente, continua tendo um importante papel no mercado. Infelizmente, modificações químicas em produtos naturais não são simples de serem feitas, e frequentemente, as diferenças entre eles são quase imperceptíveis.

Apesar de muitas vantagens e sucessos do passado houve uma diminuição do uso de plantas, em ensaios de triagens, para a descoberta de novas drogas. Isso aconteceu em decorrência de algumas desvantagens, tais como: dificuldades de acesso, de fornecimento, complexidade da química, lentidão inerente de se trabalhar com esses produtos e preocupações sobre direitos de propriedade intelectual. Associado a esses fatores, houve o surgimento de novas tecnologias como o uso da química combinatória e o desenvolvimento de métodos de triagem biológicos automatizados, como o *High Throughput Screening* (HTS), para a obtenção de um maior número de substâncias. De modo geral, na química combinatória as reações são feitas em várias etapas, ocorrendo em paralelo ou em misturas a partir de poucos reagentes. Os produtos reacionais resultantes são combinações aleatórias dos reagentes e, portanto, um número muito grande de substâncias novas podem ser geradas (Yunes & Cechinel Filho, 2001). E o método HTS permite a avaliação *in vitro* de milhares de substâncias por experimento. Tais técnicas, empregadas

concomitantemente, permitem a identificação de novos compostos capazes de interagirem com os alvos terapêuticos ensaiados em escala, inicialmente, micromolar e, atualmente, nanomolar. Cabe mencionar que graças ao emprego dessas estratégias combinadas surgiu o termo *hit*, definindo uma nova substância identificada pelo emprego dessas estratégias, isto é, ativa *in vitro* sobre um alvo determinado na escala indicada.

Entretanto, mesmo com os avanços tecnológicos observados na pesquisa de novas entidades químicas e o investimento de bilhões de dólares em pesquisas e desenvolvimento no setor, não houve um aumento proporcional de descobertas inovadoras neste mesmo período. Além disso, essas novas tecnologias contribuíram para que as empresas farmacêuticas diminuíssem sensivelmente o interesse na triagem de produtos naturais principalmente entre 1984 e 2003, favorecendo o crescimento de bibliotecas de compostos sintéticos. Houve também nos últimos anos, a diminuição do número de novos fármacos lançados no mercado (Lam, 2007; Singh & Barret, 2006; Baker *et al.*, 2007; Rishton, 2008).

Atualmente, pode-se observar um ressurgimento no interesse por produtos naturais como fonte de novas substâncias bioativas. Este renovado interesse, também está associado com avanços nas técnicas de separação, purificação e identificação de misturas complexas de produtos e com a aplicação de vários métodos analíticos. Tais métodos incluem cromatografia, espectrometria, biologia estrutural, genômica, biologia molecular, bioquímica, entre outros. Através desses métodos, há uma possibilidade maior para a triagem de produtos naturais e análise de suas atividades biológicas, assim como da sua diversidade estrutural.

A natureza de forma geral produz a maioria das substâncias orgânicas já conhecidas, contudo, é o reino vegetal que tem contribuído de forma mais significativa com substâncias úteis para o tratamento de doenças. A variedade e complexidade de metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas teriam se formado e evoluído, como mecanismo de defesa às condições ambientais ricas em microrganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação. Dessa forma, as plantas constituem-se num enorme laboratório de síntese orgânica, fruto de milhões de anos de evolução e adaptação sobre a terra (Montanari & Bolzani, 2001).



### 3.9 Fungos e plantas como fonte de antivirais contra DENV

Assim como as plantas, os fungos têm feito parte da vida humana por milhares de anos, sendo usados como alimento (cogumelos), na preparação de bebidas alcoólicas (leveduras), medicamentos e para fins culturais. Atualmente, com os avanços da microbiologia, seu uso tem sido estendido para o desenvolvimento de enzimas, controle biológico, antibióticos e outros produtos farmacologicamente ativos.

Vias metabólicas fúngicas proporcionam uma enorme gama de compostos bioativos, incluindo diferentes classes de moléculas secundárias, tais como terpenoides, policetídeos, alcaloides, poliacetilenos e outros com diferentes atividades biológicas. Essas moléculas são consideradas importantes protótipos utilizados para o desenvolvimento de novos pesticidas e drogas.

Indubitavelmente, um dos produtos naturais mais conhecidos derivados de fungos (*Penicillium notatum*) é a penicilina, descoberta em 1929 por Alexander Fleming (Mann, 1994).

Os macrofungos (políporos), basidiomicetos e ascomicetos, são uma importante fonte de substâncias farmacologicamente ativas. Cerca de 75% dos fungos políporos testados mostraram forte atividade antimicrobiana e muitos exibiram atividades antiviral, citotóxica, antineoplásica, cardiovascular, anti-inflamatória, imunoestimulante e atividades anticancerígenas (Zjawiony, 2004; Stamets, 2002). Extratos obtidos de fungos basidiomicetos, mostraram atividade antiviral contra o vírus influenza A, *in vitro* e *in vivo* (Kabanov *et al.*, 2011). Em outro estudo foi mostrado que o extrato aquoso do fungo *Inonotus obliquus* possui um alto efeito virucida contra o vírus da hepatite C (Shibnev *et al.*, 2011).

Embora não tenha trabalhos mostrando atividade antiviral de fungos especificamente contra o vírus da dengue, várias plantas ao redor do mundo apresentam potencial de atividade antiviral contra o DENV (Kadir *et al.*, 2013). Até o momento, já foram descritas mais de 30 espécies distribuídas em todo o mundo, sendo que algumas ainda não foram investigadas cientificamente. Ademais, nos últimos anos têm aumentado o número de pesquisas que investigam a atividade antiviral de várias famílias de plantas contra DENV, sendo a maior parte dessas plantas consideradas medicinais (Teixeira *et al.*, 2014).

Nas Filipinas, a *Euphorbia hirta*, conhecida localmente como “tawa-tawa”, é usada na medicina popular pela população de áreas rurais para tratar a FD. Popularmente, acredita-se que o consumo das folhas de “tawa-tawa” possa atuar na infecção viral e prevenir hemorragias e evolução da doença para formas mais graves, mas ainda não existem estudos científicos comprovando sua eficácia (<http://www.curelibrary.com/blog/2007/04/>). Em outro estudo, no tratamento de um paciente com dengue com extrato aquoso de folhas de mamoeiro (*Carica papaya*), da família *Caricaceae*, foi possível avaliar um aumento da contagem de plaquetas e glóbulos brancos, principalmente neutrófilos, característica essencial para evitar progressão para as formas graves da dengue (Ahmad *et al.*, 2011).

Extratos metanólicos de *Andrographis paniculata* (família *Acanthaceae*) e *Momordica charantia* (família *Cucurbitaceae*) apresentaram alta atividade antiviral contra DENV-1 em ensaios *in vitro* baseados na análise do efeito citopático (Tang *et al.*, 2012). O extrato aquoso de folhas de Nim (*Azadirachta indica* Juss) da família *Meliaceae*, testados na sua dose máxima não tóxica em ensaios de inibição viral, inibiu completamente a replicação de DENV-2, *in vitro*. Nesse mesmo estudo, tal extrato também inibiu completamente a replicação de DENV-2, *in vivo*, após inoculação intracerebral em camundongos lactentes (Parida *et al.*, 2002). A Nim é uma planta nativa da Índia e do Paquistão que é comumente encontrada em países tropicais e subtropicais.

Substâncias da planta medicinal *Boesenbergia rotunda*, da família *Zingiberaceae* inibiram com grande potencial a protease NS3 de DENV-2 (Kiat *et al.*, 2006). Outro estudo indicou que vários extratos de plantas medicinais tailandesas, *Rhizophora apiculata* Blume., *Flagellaria indica* Linn., *Cladogynos orientalis* Zipp. e *Houttuynia cordata* Thunb., apresentaram um efeito substancial contra DENV-2, sendo fontes potenciais para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da dengue (Klawikkan *et al.*, 2011).

A *Uncaria tomentosa*, encontrada na região tropical da América do Sul e América Central, incluindo o Peru, a Colômbia, Equador, Guiana, Trinidad e Venezuela, membro da família *Rutaceae* e conhecida como unha-de-gato, é uma grande videira com potencial promissor. A atividade antiviral de *U. tomentosa* já foi demonstrada em monócitos humanos infectados com DENV-2 e tratados com o extrato, *in vitro*, pela redução de antígenos virais detectados por citometria de fluxo. Além disso, houve uma forte imunomodulação dessas células, reduzindo os níveis

de citocinas com potencial inflamatório, como o TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) e IFN- $\alpha$  (interferon alfa), e com uma tendência de modulação da citocina interleucina 10 (IL-10). Os alvos do DENV são principalmente fagócitos mononucleares, tais como monócitos e células dendríticas (Halstead, 1988; Scott *et al.*, 1980; Neves-Souza *et al.*, 2005), que são ativadas após a infecção e produzem mediadores pró-inflamatórios incluindo TNF- $\alpha$ , interleucina-6 (IL-6), IL-8, entre outros. Tais citocinas são também conhecidas por estarem aumentadas em pacientes durante a dengue (Bozza *et al.*, 2008; Hober *et al.*, 1993), provavelmente desempenhando um papel na ativação de células endoteliais e na permeabilidade vascular e podendo levar às manifestações clínicas mais graves da doença.

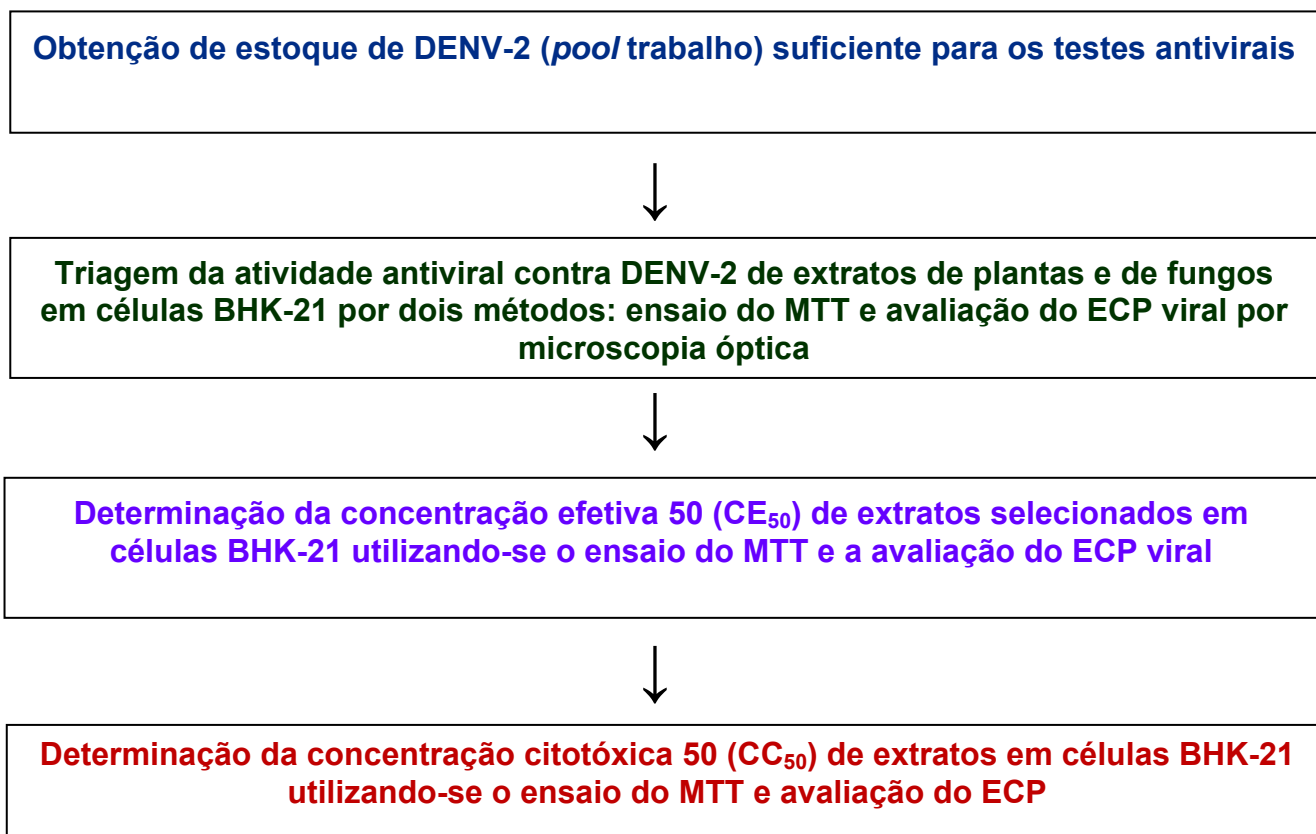
A *Cladogynos orientalis*, uma planta da família *Euphorbiaceae*, encontrada no sudeste da Ásia, Malásia e Tailândia, apresentou atividade anti-DENV-2 avaliada por ensaio MTT em células Vero (Klawikkan *et al.*, 2011).

Recentemente, foi demonstrada a atividade inibitória, *in vitro*, contra o DENV-2, com mais de 90% de redução viral verificada após tratamento simultâneo do coquetel de extratos aquosos de quatro espécies do gênero *Phyllanthus* (*P. urinaria*, *P. niruri*, *P. amarus*, e *P. watsonii*). Várias substâncias bioativas foram identificadas no coquetel de *Phyllanthus*, incluindo ácido gálico, geranina, siringina e corilagem. Além disso, houve a expressão diferencial de 13 proteínas demonstrada por uma análise proteômica. O estudo sugeriu que tal expressão diferencial pode estar associada à ligação e entrada do vírus às células, à produção da poliproteína viral, à replicação do RNA viral, bem como ao processo de montagem e maturação viral (Lee *et al.*, 2013).

O vasto reservatório de substâncias disponíveis na natureza, principalmente no Brasil, ainda tem sido muito pouco explorado com o objetivo de encontrar drogas efetivas e não citotóxicas para o tratamento da dengue. Certamente, a exploração da biodiversidade de plantas tem proporcionado uma variedade de substâncias que possuem atividade contra o DENV. No entanto, até o momento, a grande maioria dos estudos foi realizada em ensaios *in vitro*, demonstrando ainda mais a necessidade de fazer progressos para o desenvolvimento de ensaios *in vivo* e testes clínicos para avaliar melhor o potencial das substâncias antivirais. De fato, a realização de ensaios *in vivo*, são necessários para comprovar a atividade antiviral de substâncias derivadas de produtos naturais para potencial aplicação em terapias

antivirais contra a dengue, dado que a eficácia *in vitro*, não necessariamente significa eficácia *in vivo* (Teixeira *et al.*, 2014).

## 4 FLUXOGRAMA DO TRABALHO



## 5 MÉTODOS

### 5.1 Linhagens celulares e vírus

*Células BHK-21* - Linhagem celular de fibroblastos derivados de rim de hamster *Mesocricetus auratus* neonato, de um dia de idade. O cultivo das células BHK-21 foi feito utilizando-se meio de *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM) [Life Technologies], suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) [Cultilab, Campinas] e contendo 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (Life Technologies). As células foram mantidas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e foram utilizadas nos experimentos de titulação viral assim como para a triagem antiviral, determinação da concentração efetiva 50 (CE<sub>50</sub>) e determinação da citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) dos extratos de plantas e de fungos. Esta linhagem celular foi gentilmente cedida pela Dra. Laura Gil do Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz- Pernambuco.

*Células C6/36* – Linhagem celular derivada de larvas do mosquito *Aedes albopictus*. Para a manutenção desta linhagem celular e para os experimentos de produção de estoque DENV, foi utilizado meio Leibowitz 15 (L-15) [Cultilab] suplementado com 5% SFB contendo antibióticos (100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B) [Life Technologies]. As células foram mantidas em estufa a 28°C. Esta linhagem celular foi gentilmente cedida pela Dra. Erna Geessien Kroon do Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

*Dengue virus* - Neste trabalho utilizou-se o *Dengue virus* tipo 2 (DENV-2) cedido pela Dra. Erna Geessien Kroon. Esta amostra viral foi isolada de pacientes com febre do dengue do município de Ribeirão Preto – São Paulo, e desde então, foi multiplicada em cérebro de camundongo neonato e em células C6/36.

### 5.2 Multiplicação de DENV-2 em células C6/36 para obtenção de estoque viral (*pool* trabalho)

Para a multiplicação de DENV-2 foram utilizadas monocamadas de células C6/36 apresentando 80 a 90% de confluência observada ao microscópio óptico

invertido (marca: Olympus Optical CO LTDA, modelo IMT-2). Para tal, uma suspensão de DENV-2 com título conhecido foi diluída para se obter uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) igual a 0,1, ou seja, 1 vírion para cada 10 células. A amostra viral foi diluída em um volume adequado de meio L-15 suplementado com 2% de SFB e antibióticos. Em seguida, 2 mL da diluição foram inoculados em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> contendo a monocamada de células C6/36, de forma a cobrir toda a superfície da garrafa com um filme fino de líquido. Para a adsorção viral, a garrafa foi incubada por 1h a 28°C, com homogeneização delicada do meio sobre a monocamada a cada 10 minutos. Após, o sobrenadante foi aspirado e descartado, então, 12 mL de meio L-15 suplementado com 2% de SFB contendo antibióticos foram adicionados. A garrafa foi novamente incubada em estufa a 28°C por 5 dias e as células monitoradas diariamente ao microscópio óptico para a observação do ECP causado pelo DENV, caracterizado pela formação de sincícios (células multinucleadas). Vale ressaltar, que no terceiro dia de incubação foi acrescentado cerca de 30% do volume de meio L-15 completo para que as células não sofressem com falta de nutrientes. No quarto dia de incubação, um volume apropriado de SFB foi adicionado à garrafa, para obter-se uma concentração final de 10% de SFB no meio de cultura. Tal concentração de SFB favorece uma melhor estabilização da partícula viral e, conseqüentemente, a manutenção do título do vírus. No quinto dia, após confirmação da formação de sincícios em pelo menos 90% da monocamada celular, o sobrenadante foi transferido para tubos cônicos de polipropileno (50 mL) que foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm a 4°C (rotor RT-6000B, centrífuga Sorvall) para clarificação da suspensão viral. Após, a suspensão viral clarificada foi distribuída em tubos estéreis em alíquotas de 0,5 e 1 mL e armazenados a -70°C. O título viral foi determinado como descrito a seguir (item 5.3).

### **5.3 Titulação de DENV-2 em células BHK-21 pelo método de formação de placas de lise (Dulbecco & Vogt, 1953)**

A determinação do título de DENV-2 foi feita em duplicata em monocamadas de células BHK-21 em placas de 6 poços (Sarstedt, USA). Para tal, foram adicionadas  $4 \times 10^5$  células por poço contendo meio DMEM suplementado com 5%

de SFB e antibióticos. As placas foram incubadas por 24 horas em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Após, retirou o meio de meio de cultura e 1 mL das diluições decimais seriadas da suspensão viral a ser titulada (10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-7</sup>) foi adicionado aos respectivos poços. Um dos poços da placa foi reservado para o controle de células não infectadas. Para adsorção viral, as placas foram incubadas a 37°C durante 1 hora, sendo que neste período, foram homogeneizadas delicadamente a cada 15 min para melhor distribuição da suspensão viral. Após, o meio da placa foi desprezado e foram adicionados 5 mL por poço de meio semissólido contendo 1,5% de carboximetilcelulose (CMC) [Sigma Aldrich]. Para o preparo deste meio semissólido foi utilizado DMEM 2X (duas vezes concentrado) suplementado com 3% de SFB, o dobro da concentração de antibióticos e o mesmo volume de solução aquosa de CMC a 3%. A placa foi incubada em estufa a 37°C e com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 dias para a formação de placas de lise.

Após, as células foram fixadas adicionando-se cerca de 10 mL por poço de solução aquosa de formaldeído a 3,7% às placas ainda com meio semissólido, por 1h à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas abundantemente com água retirando-se o meio semissólido, sendo então, coradas com cristal violeta a 1% (p/v) diluído em solução de álcool etílico PA a 30% em água, durante 5 minutos. O título viral foi calculado pelo número de placas de lise verificadas a olho nu no poço da diluição que apresentou entre 30 a 300 placas. Após a contagem, o número de placas de lise foi multiplicado pelo inverso da diluição viral, sendo convertido para o volume final de 1 mL. Dessa forma, o título foi definido em unidades formadoras de placa (pfu) por mL de suspensão viral, já que teoricamente cada placa é iniciada pela infecção de uma única partícula viral infectante.

$$\text{pfu/mL} = n \times \text{FC} \times 10^*$$

Onde:

*n* é igual ao número de placas de lise contadas;

**FC** é o fator de correção, ou seja, é número pelo qual o valor do inóculo utilizado deve ser multiplicado para que se obtenha 1 mL. Como o inóculo utilizado foi de 1 mL, então nesse caso será 1;

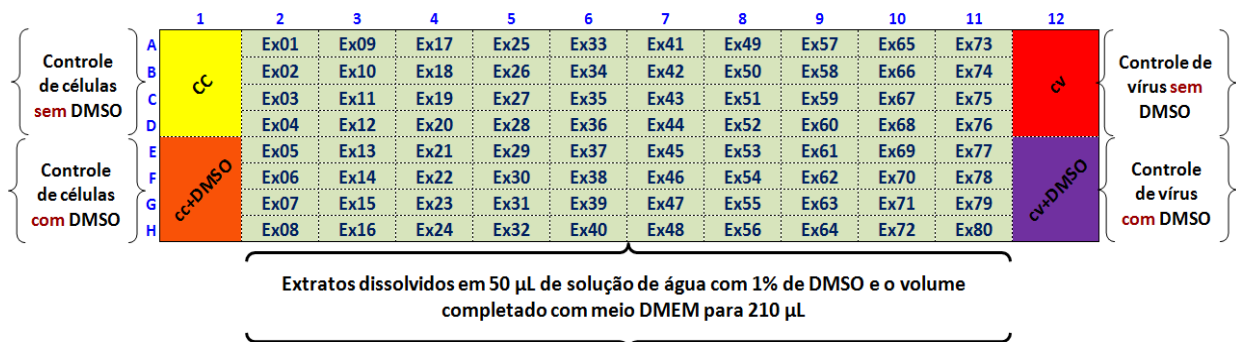
**E 10\*** é o inverso da diluição na qual foi encontrado o valor de *n*.



#### **5.4 Extratos de plantas e de fungos da extratoteca Colab da Fiocruz Minas**

Neste estudo foram utilizados extratos de plantas e de fungos fornecidos pela extratoteca Colab (Coleção de Amostras para Bioensaios) da Fiocruz Minas. Esta extratoteca é gerenciada pelo Laboratório de Produtos Químicos Naturais (LPQN) e contém cerca de 12.000 extratos provenientes de plantas, de fungos e também contém substâncias puras, que podem ser disponibilizados para pesquisadores pela Plataforma de Bioprospecção da Fiocruz ([http://plataformas.cdts.fiocruz.br/subunidade/exibe\\_sub/32](http://plataformas.cdts.fiocruz.br/subunidade/exibe_sub/32)).

Para os ensaios de triagem antiviral, os extratos foram fornecidos na forma de filme seco em placas de polipropileno com 96 poços, com capacidade para 250-300  $\mu\text{L}$ , na qual 80 amostras de extratos (10 microgramas/poço) são distribuídas nas colunas 2 a 11, ficando as colunas 1 e 12 livres, como mostrado na figura 5. As placas foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do ensaio antiviral. Imediatamente antes da realização do ensaio antiviral, foi feita a solubilização dos extratos em 50  $\mu\text{L}$ /poço de solução aquosa estéril com 1% de DMSO (Sigma-Aldrich). Para tal, a placa foi colocada sob agitação em vórtex (Scientific Industries, INC, modelo SI-A236) por 30 minutos a 500 rpm e em temperatura ambiente. Após, o volume da solução aquosa foi completado para 210  $\mu\text{L}$ /poço de meio DMEM suplementado com 2% de SFB e 1% de antibióticos para o ensaio antiviral.



**Figura 5 - Mapa representativo da placa contendo 80 extratos, utilizada na etapa de triagem da atividade antiviral deste estudo.** As placas de 96 poços contendo 80 diferentes extratos (10 µg/poço) foram fornecidas pela Plataforma de Bioprospecção da Fiocruz Minas. A coluna 1 é destinada ao controle de células (células não tratadas e não infectadas). Aos poços A1, B1, C1 e D1 não foram adicionados DMSO (cc) ao meio de cultura; e aos poços E1, F1, G1 e H1 foram adicionados meio de cultura contendo a mesma concentração de DMSO presente nos poços com os extratos solubilizados (Ex), sendo neste caso, a concentração final de 0,25% de DMSO/poço. Do mesmo modo, nos poços A12, B12, C12 e D12 contendo células infectadas e não tratadas (cv) não foi adicionado DMSO ao meio de cultura e aos poços E12; F12; G12 e H12 foram adicionados meio de cultura contendo DMSO na mesma concentração (cv + DMSO).

### 5.5 Triagem da atividade antiviral de extratos de plantas e fungos contra DENV-2 por avaliação do ECP viral por microscopia óptica

Os ensaios de triagem da atividade antiviral contra DENV-2 foram feitos em placas de 96 poços (em duplicata), onde a localização de todos os extratos foi intencionalmente a mesma da placa contendo os extratos solubilizados. Tais placas foram denominadas “placas espelho”. Para o ensaio antiviral foram adicionadas  $1,2 \times 10^4$  células BHK-21 por poço da “placa espelho” contendo meio DMEM adicionado de 5% de SFB e antibióticos. Após incubação de 24 horas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> foi observada uma monocamada celular com 80% de confluência. Vale ressaltar, que para a determinação do volume de suspensão viral necessária para obter-se uma m.o.i.= 5, foi considerado que cada poço continha aproximadamente  $1,6 \times 10^4$  células após 24 horas de incubação. Tal quantidade de células foi determinada em experimentos de multiplicação celular dentro desse mesmo período de incubação nas etapas de padronização (dados não mostrados).

Imediatamente antes da adição do extrato e DENV-2 às placas espelho, o volume adequado de suspensão de DENV-2 foi diluído em meio DMEM suplementado com 2% de SFB e antibióticos para se obter a m.o.i. desejada. Em

seguida, removeu-se o meio de cultura, adicionados no dia anterior, das placas contendo a monocamada celular e foram adicionados 100 µL das diluições das amostras de extratos e 100 µL da suspensão viral em cada poço. Desse modo, o volume final em cada poço com a monocamada celular foi de 200 µL de meio DMEM suplementado com 2% de SFB e a concentração final de extrato foi 25 µg/mL por poço.

Nos experimentos da etapa de triagem foram realizados os seguintes controles, a saber: células não tratadas e não infectadas sem DMSO (cc), células não tratadas e não infectadas em meio de cultura contendo DMSO (cc + DMSO); células não tratadas e infectadas sem o DMSO (cv) e de células não tratadas e infectadas em meio contendo DMSO (cv + DMSO) [figura 5].

As placas foram incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C por 72 horas. Após, para classificar a intensidade do ECP viral, foi utilizado o método de cruzes (+), que consiste na gradação (de 0 a 4+) na presença ou ausência do extrato (Kudi & Myint, 1999; Tang *et al.*, 2012), permitindo assim, no nosso caso, uma avaliação do ECP causado pelo DENV-2 na presença do extrato. Assim, após o tempo de incubação, foi observado a integridade da monocamada celular no controle de células e o ECP do DENV-2 no controle de vírus, considerado como 4+ (100% de ECP viral). Então, foi feita a leitura para a avaliação do ECP nos poços infectados com DENV-2 e tratados com os respectivos extratos, utilizando-se os seguintes critérios: (1+) até 25% de ECP viral, (2+) 26% a 50% de ECP viral, (3+) 51% a 75% de ECP viral e (4+) de 76% a 100% de ECP viral (figura 9). Após a avaliação do ECP viral, as placas foram imediatamente submetidas ao ensaio do MTT, como descrito no item 5.6.

## **5.6 Triagem da atividade antiviral de extratos de plantas e fungos contra DENV-2 pelo método do MTT**

Como mencionado no item 5.5, logo após a leitura do ECP viral por microscopia óptica, as placas foram submetidas ao ensaio colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).

Para o ensaio do MTT, o sobrenadante das placas foi removido e a cada poço foi adicionado 50 µL de PBS por poço para remoção de resíduos do meio de cultura.

Em seguida, foi adicionado 28  $\mu\text{L}$  de uma solução de MTT (2 mg/mL em PBS) a cada poço sendo as placas incubadas por 90 minutos a 37°C. Após, foram adicionados em cada poço, 130  $\mu\text{L}$  de DMSO puro para a dissolução dos cristais de formazana. As placas foram mantidas em agitação por 10 minutos em um agitador orbital a 200 rpm. A densidade óptica (DO) da reação foi determinada em 540 nm ( $\text{DO}_{540}$ ) em leitor de microplacas (SpectraMaxM5 - Molecular Devices). A porcentagem de proteção foi calculada no programa Excel através da fórmula  $[(A-B)/C-B] \times 100$ , onde A, B e C correspondem aos valores de  $\text{DO}_{540}$  verificados nos poços contendo células tratadas e infectadas (A), não tratadas e infectadas (B) e não tratadas e não infectadas (C), respectivamente.

### **5.7 Determinação da $\text{CE}_{50}$ dos extratos de plantas e fungos com atividade antiviral**

Define-se como concentração efetiva 50 ( $\text{CE}_{50}$ ) a concentração de um agonista capaz de produzir metade da resposta máxima que aquele agonista pode gerar numa determinada estrutura biológica. Portanto, a  $\text{CE}_{50}$  de cada extrato foi definida pela concentração do extrato na qual foi observada 50% de inibição do ECP viral, ou seja, a concentração do extrato que promoveu a proteção de 50% do ECP viral nas células tratadas comparadas ao ECP verificado nas células infectadas com DENV-2 na ausência do extrato em questão (controle de vírus).

Os extratos de plantas e de fungos que mostraram atividade antiviral de pelo menos 2+ (50% de proteção) nos ensaios de triagem foram selecionados para a determinação da respectiva  $\text{CE}_{50}$ . Tais extratos foram disponibilizados pela Plataforma de Bioprospecção, na concentração de 2 mg/mL em solução aquosa de DMSO a 10%.

Para realização dos experimentos de  $\text{CE}_{50}$ ,  $1,2 \times 10^4$  de células BHK-21 foram adicionadas por poço à placa de 96 poços, em meio DMEM suplementado com 5% de SFB e antibióticos. A placa foi incubada a 37°C em 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas para formação da monocamada celular. As seguintes concentrações dos extratos, em  $\mu\text{g/mL}$ , foram testadas: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78  $\mu\text{g/mL}$  (figura 6). Os extratos foram diluídos em 100  $\mu\text{L}$  de meio DMEM suplementado com 2% de SFB e antibióticos, de forma que a concentração final de DMSO por poço foi de 0,5%. Em

seguida, foram adicionados 100 µL/poço de suspensão de DENV-2 para obtenção de m.o.i. = 5. Os seguintes controles foram realizados: células não tratadas e não infectadas sem DMSO (cc), células não tratadas e não infectadas com DMSO a 0,5% (cc + DMSO); células não tratadas e infectadas sem o DMSO (cv) e células não tratadas e infectadas com DMSO a 0,5% (cv + DMSO) [figura 6]. A placa foi incubada em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas.

Em seguida foi realizada a leitura do ECP viral pelo método de cruzes (descrito no item 5.5) e imediatamente após, foi realizado o ensaio do MTT (descrito no item 5.6) Todas as concentrações de extratos foram testadas em duplicatas como mostrado na figura 6.

### Mapa representativo para determinação de CE<sub>50</sub> de extratos

	cc	cc+DMSO	Extrato A		Extrato B		Extrato C		Extrato D		cv	cv+DMSO
A			100	100								
B			50	50								
C			25	25								
D			12,5	12,5								
E			6,25	6,25								
F			3,125	3,125								
G			1,56	1,56								
H			0,78	0,78								

Diluições e concentrações finais dos extratos por poço (µg/mL)  
 cc - controle de células; cv - controle de vírus

**Figura 6 - Mapa representativo mostrando diluições decrescentes de extratos de plantas e de fungos utilizadas para determinação de CE<sub>50</sub>.** A primeira diluição foi feita usando um fator de 10 em meio DMEM sem DMSO, ou seja, foram adicionados 25 µL de solução de extrato (2 mg/mL em 10% de DMSO) em 225 µL, obtendo-se assim uma concentração final de DMSO a 1% e de extrato a 200 µg/mL. Em seguida, 125 µL desta diluição foram adicionados a outro poço (linha B) já contendo 125 µL de meio DMEM com 1% de DMSO. Este último passo foi repetido sucessivamente até a última diluição (linha H) para alcançar a concentração de 1,56 µg/mL. Após, foram adicionados 100 µL de cada diluição do extrato aos respectivos poços da placa contendo a monocamada de células BHK-21. Logo em seguida, foram adicionados 100 µL de suspensão viral (m.o.i. = 5) em todos os poços, exceto nos controles de células aos quais foram adicionados meio DMEM sem o vírus. Portanto, a concentração final do extrato variou de 100 a 0,78 µg/mL e a concentração final de DMSO foi de 0,5%.

## 5.8 Determinação da CC<sub>50</sub> dos extratos contra DENV-2 por microscopia óptica e pelo MTT

A concentração citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) de um extrato é definida pela concentração do extrato na qual se observa 50% de toxicidade nas células tratadas quando comparadas às células não tratadas (controle celular). Os extratos selecionados foram testados em diferentes concentrações para avaliação de sua toxicidade em células BHK-21. Para tal,  $1,2 \times 10^4$  células foram adicionadas por poço à placa de 96 poços, contendo DMEM suplementado com 5% de SFB e antibióticos, e incubadas a 37°C por 24 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para formação da monocamada celular. Os extratos foram adicionados à monocamada celular nas seguintes concentrações: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6 e 7,8 µg/mL em meio DMEM suplementado com 2% de SFB e antibióticos, sendo a concentração final de DMSO em cada poço de 0,5%. Controles de células não tratadas sem DMSO (cc) e células não tratadas com DMSO a 0,5% (cc + DMSO) foram feitos (figura 7). A placa foi incubada em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 72h. A avaliação do efeito citotóxico dos extratos foi feita por microscopia óptica após incubação de 72h onde foram observadas alterações morfológicas e/ou morte celular na presença do extrato (Kott *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 1990).

Imediatamente após a leitura ao microscópio, foi realizado o ensaio do MTT (descrito no item 5.6). A partir dos valores de absorbância obtidos foi calculada a CC<sub>50</sub> no programa Excel pela fórmula,  $[(A-B)/A] \times 100$ , onde A e B são os valores de DO<sub>540</sub> verificados nos poços que correspondem às células não tratadas (A) e tratadas (B), respectivamente. Em seguida, para calcular os valores de CC<sub>50</sub> com maior precisão, os percentuais de proteção obtidos a partir da leitura da densidade óptica, foram analisados por regressão não linear no programa Prism 5. Todas as concentrações de extratos foram testadas em duplicatas.

### Mapa representativo para determinação de CC<sub>50</sub> de extratos

	cc	cc+DMSO	Extrato A		Extrato B		Extrato C		Extrato D		Extrato E	
A			1000	1000								
B			500	500								
C			250	250								
D			125	125								
E			62,5	62,5								
F			31,25	31,25								
G			15,6	15,6								
H			7,8	7,8								

Diluições e concentrações finais dos extratos por poço (µg/mL); cc - controle de células

**Figura 7 - Mapa representativo mostrando diluições decrescentes de extratos de plantas utilizadas para determinação da CC<sub>50</sub>.** A primeira diluição do extrato foi feita usando um fator de 10 em meio DMEM sem DMSO, ou seja, foram adicionados 25 µL de solução aquosa com 10% de DMSO do extrato, na concentração de 20 mg/mL, em 225 µL de meio, obtendo-se assim uma concentração final de 2 mg/mL do extrato em 1% de DMSO. Em seguida, 125 µL desta diluição foram adicionados a outro poço contendo 125 µL de meio DMEM com 1% de DMSO (linha B). Este último passo foi repetido sucessivamente até a última diluição (linha H). Após, foram adicionados 100 µL de cada diluição do extrato aos respectivos poços de uma placa contendo a monocamada de células BHK-21 e o volume final completado para 200 µL com meio DMEM. Desse modo, a concentração final do extrato variou de 1000 a 7,8 µg/mL e a concentração final de DMSO foi de 0,5%. As colunas 1 e 2 da placa foram dedicadas aos controles de células (sem adição de extrato) sem DMSO e com DMSO, respectivamente.

### 5.9 Cálculo do Índice de Seletividade (IS)

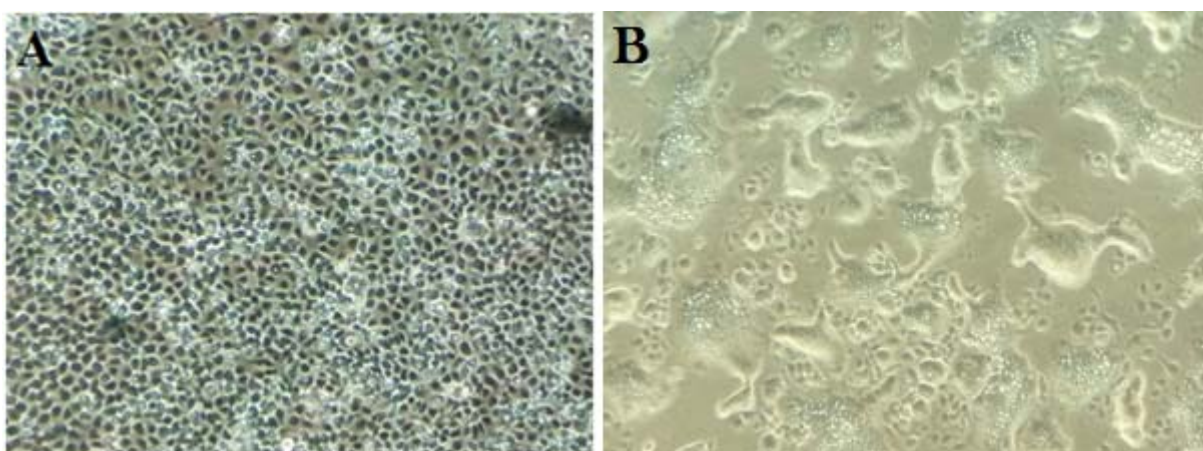
A relação entre os efeitos farmacológicos e tóxicos de uma amostra em estudo é um requisito importante na previsão de sua aplicabilidade como potencial agente terapêutico. O índice de seletividade (IS) expressa a razão entre a concentração da amostra que é tóxica para 50% da monocamada celular (CC<sub>50</sub>) e a concentração que inibe 50% da infecção viral (CE<sub>50</sub>). Portanto, tal índice é calculado através da fórmula  $IS = CC_{50} / CE_{50}$ .

Para o cálculo de IS dos extratos foram considerados apenas os valores de proteção obtidos através do ensaio do MTT, tanto nos ensaios de CE<sub>50</sub> quanto nos ensaios de CC<sub>50</sub>.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Produção e titulação do *pool* trabalho de DENV-2

A multiplicação de DENV-2 para obtenção do estoque viral ou “*pool trabalho*” foi realizada em células C6/36 (figura 8). O volume do “*pool trabalho*” de DENV-2 selecionado para os experimentos realizados neste estudo foi de 400 mL e o título viral foi de  $4,9 \times 10^7$  pfu/mL.



**Figura 8 - Efeito citopático de DENV-2 em células C6/36.** (A) Monocamada de células C6/36 com aproximadamente 90% de confluência antes de serem infectadas com DENV-2. (B) Efeito citopático de DENV-2 na monocamada de células C6/36 após 5 dias de incubação a 28°C. Aumento: 100X

### 6.2 Triagem de extratos de plantas e fungos com atividade antiviral

Para a triagem de extratos com atividade antiviral contra DENV-2, neste estudo foram testados 3101 extratos de plantas e fungos, superando em mais de 50% o número inicial proposto no projeto, que visava testar 2000 extratos.

Na etapa de triagem, a atividade antiviral de cada extrato na concentração de 25 µg/mL foi analisada em células BHK-21 tratadas simultaneamente com DENV-2 e extrato (aqui chamado de tratamento simultâneo). A atividade antiviral dos extratos foi determinada pela classificação do ECP viral pelo método de cruzes, descrito no item 5.5 e ilustrado nas figuras 9 e 10 e imediatamente após, pelo ensaio do MTT, descrito no item 5.6 e ilustrado na figura 11, também em valores percentuais.



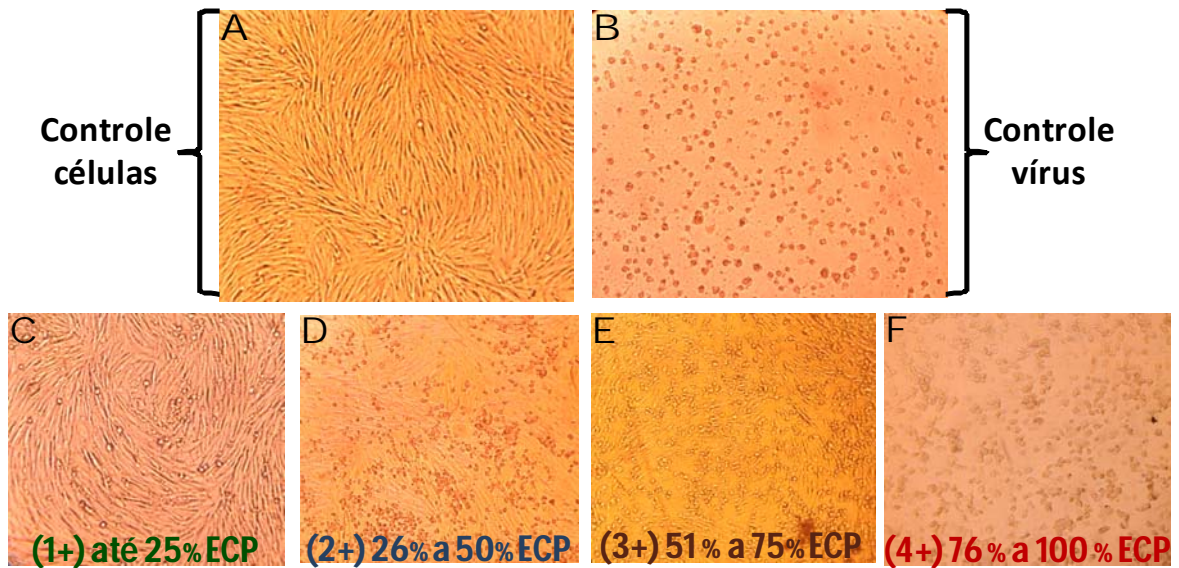
O DMSO adicionado ao meio de cultura na concentração de 0,25%, a mesma presente nos poços contendo extrato, não foi citotóxico para as células BHK-21, uma vez que não afetou a viabilidade celular nem a multiplicação do DENV-2 nessas células. Como mostrado nas colunas 1 e 12 das placas representadas nas figuras 11 e 12, os valores de DO obtidos e a observação da monocamada por microscopia óptica foram similares aos controles de células e de vírus sem a adição de DMSO.

Como observado na figura 12, os resultados obtidos pelo ensaio de MTT quando comparados aos resultados da avaliação do ECP viral pelo método de cruzes não foram 100% concordantes. Assim, todos os extratos que apresentaram no mínimo 50% de proteção, em pelo menos um dos ensaios utilizados, foram considerados positivos contra DENV-2, sendo, portanto, selecionados para a realização dos ensaios de  $CE_{50}$  e  $CC_{50}$ .

Dentre os 3101 extratos testados pelas duas técnicas de triagem, 115 extratos apresentaram efeito antiviral contra DENV-2, ou seja, reduziram em pelo menos 50% o ECP viral nas células infectadas. Ressalta-se, que dentre os 115 extratos selecionados, 37 inibiram o ECP viral em 75% ou mais (tabela 1 e figura 13). A origem dos extratos considerados negativos ainda não foi por nós pesquisada no banco de dados da extratoteca Colab da Fiocruz Minas.

Dentre os 115 extratos selecionados com atividade contra DENV-2, 55 pertencem a 20 famílias distintas de plantas, sem identificação de espécie e 60 são de origem fúngica como mostrado na figura 14.

Os extratos com atividade antiviral provenientes de fungos ainda não foram identificados, com exceção do extrato 13985, que foi já identificado pelo grupo do Dr. Luiz H. Rosa do Departamento de Microbiologia da UFMG, como pertencente ao gênero *Hypoxyton* sp.



**Figura 9 - Classificação do ECP viral pelo método de cruces (0 a 4+).** A classificação do ECP causado pelo DENV-2 na presença ou ausência do extrato em monocamadas de células BHK-21 foi realizada após 72h de incubação foi baseada nos critérios ilustrados nesta figura. Em (A) estão representadas células não infectadas e não tratadas; em (B) células infectadas com DENV-2 na ausência de extrato; em (C) monocamada apresentando até 25% de ECP viral classificada como 1+; ou seja, o extrato exerceu um efeito protetor do ECP viral acima de 75%; em (D) monocamada celular apresentando de 26 a 50% de ECP viral ou 2+ , logo o extrato conferiu um efeito protetor do ECP viral entre 50% a 74%; em (E) monocamada celular apresentando de 51 a 75% de ECP viral ou 3+, logo o extrato conferiu apenas 25% do ECP viral. Em (F) está representada uma monocamada celular apresentando de 76 a 100% de ECP viral (4+), logo o extrato conferiu pouca ou nenhuma proteção. Aumento 40x.

	cc	ext.	ext.	ext.	ext.	ext.	ext.	ext.	ext.	ext.	ext.	cv
A	-	4+	4+	2+	2+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
B	-	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
C	-	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
D	-	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
E	-	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
F	-	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
G	-	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
H	-	2+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+

placa 1

	cc	ext.	ext.	ext.	ext.	ext.	ext.	ext.	ext.	ext.	ext.	cv
A	-	4+	4+	2+	2+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
B	-	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
C	-	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
D	-	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
E	-	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
F	-	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
G	-	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
H	-	2+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+

placa 2

**Figura 10 - Representação esquemática dos resultados obtidos na avaliação do ECP viral pelo método de cruzes na triagem da atividade antiviral de extratos de plantas e fungos contra DENV-2.** Estão representados os valores da classificação do ECP viral pelo método de cruzes em um ensaio de triagem em duplicata (placas 1 e 2). Em cinza estão representados os poços onde foram adicionados 80 extratos distintos na concentração final de 25 µg/mL. O ECP viral foi classificado comparando-se as monocamadas infectadas com DENV-2 (cv) classificadas como 4+ (coluna 12) às monocamadas não infectadas ou controle de células (cc) classificadas como - (coluna 1). Para a classificação do ECP viral na presença dos extratos foram utilizados os seguintes critérios: (1+) até 25% de ECP, (2+) 26% a 50% de ECP, (3+) 51 % a 75 % de ECP, e (4+) de 76 % a 100% de ECP. Escrito em azul estão destacados 3 extratos que apresentaram atividade antiviral de aproximadamente 50% (2+). ( - ) ausência de efeito citopático; cc: controle de células sem DMSO (poços em amarelo) e com DMSO (poços em alaranjado); cv: controle de vírus sem DMSO (poços em vermelho) e com DMSO (poços de cor roxa); ext: extrato.

A)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<b>1,3341</b>	0,2256	0,2607	<b>0,7890</b>	<b>0,7054</b>	0,2533	0,2482	0,2917	0,2586	0,2113	0,3198	<b>0,3302</b>
B	<b>1,3075</b>	0,2247	0,2749	0,3927	0,2825	0,2810	0,2730	0,2885	0,3594	0,2551	0,3315	<b>0,3350</b>
C	<b>1,2293</b>	0,2639	0,3233	0,3639	0,3115	0,2867	0,2956	0,3307	0,2907	0,3048	0,3334	<b>0,3438</b>
D	<b>1,2170</b>	0,2675	0,3412	0,2966	0,3229	0,3037	0,3169	0,3230	0,3398	0,4291	0,3040	<b>0,3520</b>
E	<b>1,2074</b>	0,3128	0,3356	0,2884	0,3017	0,3122	0,2582	0,3369	0,3667	0,3616	0,3000	<b>0,3235</b>
F	<b>1,2530</b>	0,3027	0,2880	0,3335	0,3017	0,2862	0,3471	0,3203	0,3527	0,3803	0,3063	<b>0,3624</b>
G	<b>1,2461</b>	0,3106	0,2964	0,3072	0,2668	<b>0,5995</b>	0,2792	0,2482	0,3112	0,2863	0,2883	<b>0,3275</b>
H	<b>1,4056</b>	<b>0,5750</b>	0,4220	0,4168	0,3241	0,2705	0,2747	0,2721	0,2753	0,2871	0,3156	<b>0,3078</b>

placa 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<b>1,3694</b>	0,2026	0,2729	<b>0,7373</b>	<b>0,6653</b>	0,2325	0,2450	0,2541	0,2430	0,2035	0,2551	<b>0,2927</b>
B	<b>1,2429</b>	0,2172	0,2464	0,3847	0,2774	0,2575	0,2774	0,2710	0,2826	0,2298	0,3030	<b>0,2882</b>
C	<b>1,1612</b>	0,2221	0,2881	0,3451	0,2733	0,2393	0,2932	0,2994	0,2751	0,2609	0,3146	<b>0,3089</b>
D	<b>1,2104</b>	0,2267	0,3532	0,2508	0,2783	0,2702	0,2804	0,2842	0,2718	0,3322	0,2993	<b>0,3018</b>
E	<b>1,1936</b>	0,2363	0,2512	0,2486	0,2487	0,3227	0,2488	0,2965	0,3134	0,3314	0,2910	<b>0,2918</b>
F	<b>1,2542</b>	0,2446	0,2419	0,3236	0,2562	0,2611	0,3069	0,2834	0,3051	0,3035	0,2821	<b>0,3058</b>
G	<b>1,2865</b>	0,2761	0,2230	0,2652	0,2268	<b>0,3818</b>	0,2754	0,2167	0,2984	0,2483	0,2839	<b>0,3019</b>
H	<b>1,4356</b>	<b>0,5893</b>	0,3891	0,3179	0,2304	0,2051	0,2475	0,2531	0,2529	0,2819	0,2920	<b>0,3050</b>

placa 2

B)

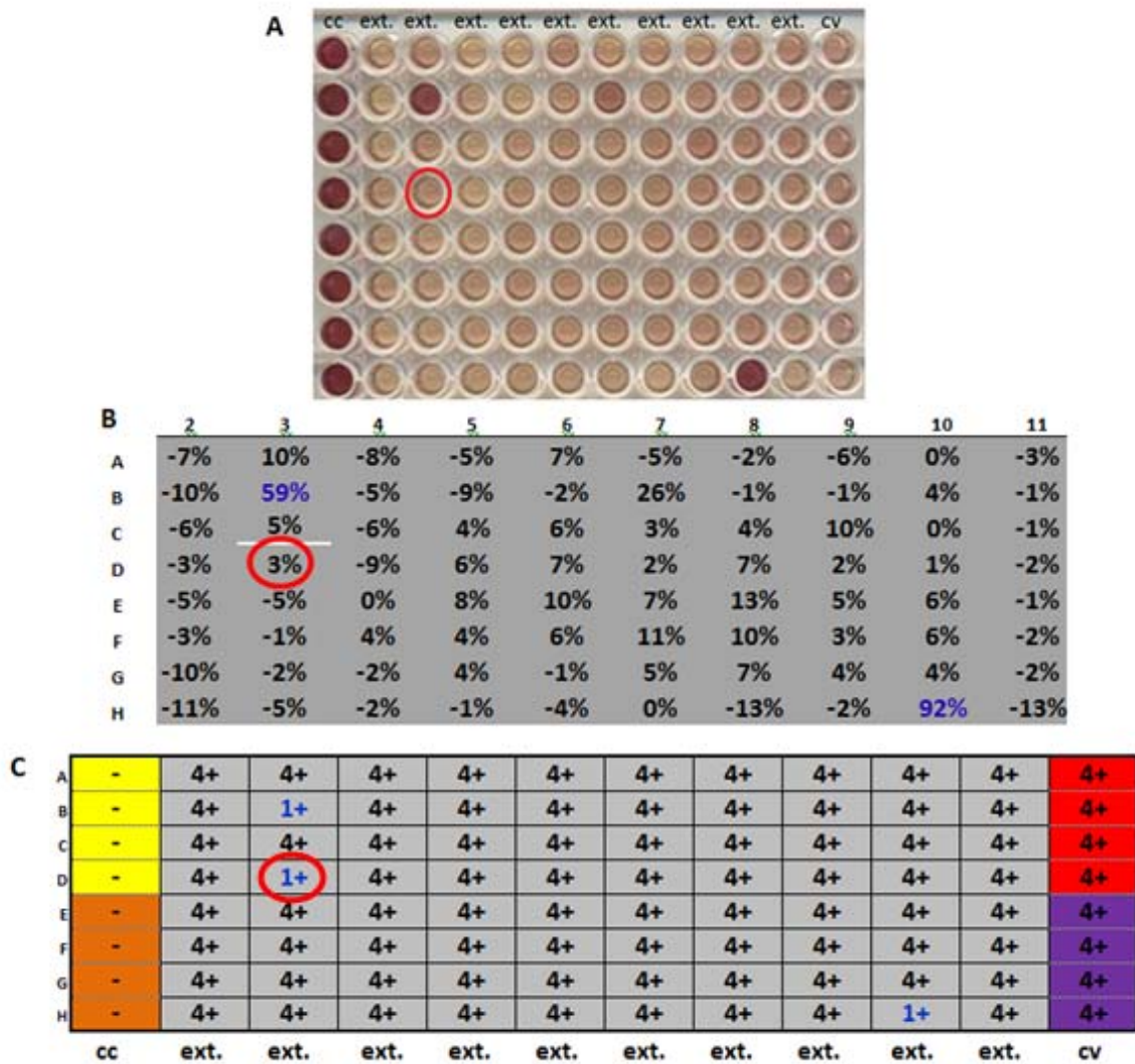
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	<b>-12%</b>	<b>-8%</b>	<b>48%</b>	<b>39%</b>	<b>-9%</b>	<b>-9%</b>	<b>-5%</b>	<b>-8%</b>	<b>-13%</b>	<b>-2%</b>
B	<b>-12%</b>	<b>-6%</b>	<b>6%</b>	<b>-6%</b>	<b>-6%</b>	<b>-7%</b>	<b>-5%</b>	<b>3%</b>	<b>-9%</b>	<b>0%</b>
C	<b>-8%</b>	<b>-1%</b>	<b>3%</b>	<b>-3%</b>	<b>-5%</b>	<b>-4%</b>	<b>0%</b>	<b>-5%</b>	<b>-3%</b>	<b>0%</b>
D	<b>-7%</b>	<b>1%</b>	<b>-4%</b>	<b>-1%</b>	<b>-3%</b>	<b>-2%</b>	<b>-1%</b>	<b>0%</b>	<b>10%</b>	<b>-3%</b>
E	<b>-2%</b>	<b>0%</b>	<b>-5%</b>	<b>-4%</b>	<b>-2%</b>	<b>-8%</b>	<b>0%</b>	<b>3%</b>	<b>3%</b>	<b>-4%</b>
F	<b>-3%</b>	<b>-5%</b>	<b>0%</b>	<b>-4%</b>	<b>-5%</b>	<b>1%</b>	<b>-2%</b>	<b>2%</b>	<b>5%</b>	<b>-3%</b>
G	<b>-3%</b>	<b>-4%</b>	<b>-3%</b>	<b>-7%</b>	<b>28%</b>	<b>-6%</b>	<b>-9%</b>	<b>-3%</b>	<b>-5%</b>	<b>-5%</b>
H	<b>26%</b>	<b>9%</b>	<b>9%</b>	<b>-1%</b>	<b>-7%</b>	<b>-6%</b>	<b>-7%</b>	<b>-6%</b>	<b>-5%</b>	<b>-2%</b>

placa 1

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	<b>-10%</b>	<b>-3%</b>	<b>45%</b>	<b>38%</b>	<b>-7%</b>	<b>-6%</b>	<b>-5%</b>	<b>-6%</b>	<b>-10%</b>	<b>-5%</b>
B	<b>-8%</b>	<b>-5%</b>	<b>9%</b>	<b>-2%</b>	<b>-4%</b>	<b>-2%</b>	<b>-3%</b>	<b>-2%</b>	<b>-7%</b>	<b>0%</b>
C	<b>-8%</b>	<b>-1%</b>	<b>5%</b>	<b>-3%</b>	<b>-6%</b>	<b>-1%</b>	<b>0%</b>	<b>-3%</b>	<b>-4%</b>	<b>2%</b>
D	<b>-8%</b>	<b>6%</b>	<b>-5%</b>	<b>-2%</b>	<b>-3%</b>	<b>-2%</b>	<b>-2%</b>	<b>-3%</b>	<b>3%</b>	<b>0%</b>
E	<b>-7%</b>	<b>-5%</b>	<b>-5%</b>	<b>-5%</b>	<b>2%</b>	<b>-5%</b>	<b>0%</b>	<b>1%</b>	<b>3%</b>	<b>-1%</b>
F	<b>-6%</b>	<b>-6%</b>	<b>2%</b>	<b>-4%</b>	<b>-4%</b>	<b>1%</b>	<b>-2%</b>	<b>1%</b>	<b>0%</b>	<b>-2%</b>
G	<b>-2%</b>	<b>-8%</b>	<b>-4%</b>	<b>-7%</b>	<b>8%</b>	<b>-2%</b>	<b>-9%</b>	<b>0%</b>	<b>-5%</b>	<b>-2%</b>
H	<b>30%</b>	<b>9%</b>	<b>2%</b>	<b>-7%</b>	<b>-10%</b>	<b>-5%</b>	<b>-5%</b>	<b>-5%</b>	<b>-2%</b>	<b>-1%</b>

placa 2

**Figura 11 - Representação esquemática dos resultados obtidos pelo método do MTT na avaliação da atividade antiviral de extratos de plantas e fungos contra DENV-2.** (A) Estão representados os valores de absorbância ( $DO_{540}$ ) verificados nas placas 1 e 2 mostradas na figura 10. Em cinza estão representados os poços onde foram adicionados 80 extratos distintos; em amarelo os poços com células não infectadas (controle de células); em alaranjado os poços com células não infectadas (controle de células) na presença de DMSO; em vermelho os poços contendo DENV-2 (controle de vírus) e em roxo os poços contendo DENV-2 e DMSO. Em (B) estão os valores percentuais de proteção dos 80 extratos. O cálculo da porcentagem de proteção dos extratos sobre a multiplicação viral foi feito no programa Microsoft Excel utilizando-se a fórmula  $[(A-B)/C-B] \times 100$ , onde A, B e C são os valores de absorbância dos poços contendo células tratadas e infectadas com DENV-2 (A), não tratadas e infectadas (B) e não tratadas e não infectadas (C), respectivamente. Em azul estão destacados os valores de proteção dos extratos que apresentaram atividade antiviral maior que 25%.



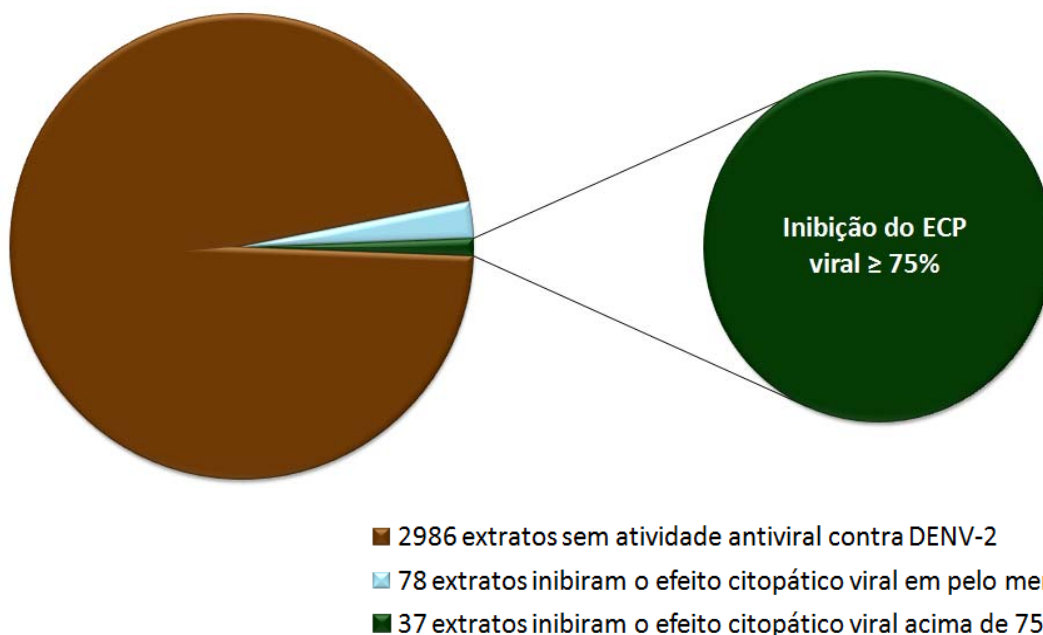
**Figura 12 - Comparação dos resultados obtidos pelo ensaio do MTT versus ECP viral.** Estão representados os resultados dos ensaios de triagem da atividade antiviral de 80 extratos de plantas e de fungos contra DENV-2 em células BHK-21. Neste experimento, não foi observado 100% de concordância entre os dois métodos de triagem utilizados (MTT e ECP). O poço D3 foi destacado em vermelho para ilustrar a discordância dos resultados obtidos pelos dois métodos mostrados em (A) placa após ensaio do MTT, (B) porcentagem de proteção de células tratadas com os extratos, calculada a partir dos valores de DO e, (C) avaliação do ECP viral pelo método de cruzes.



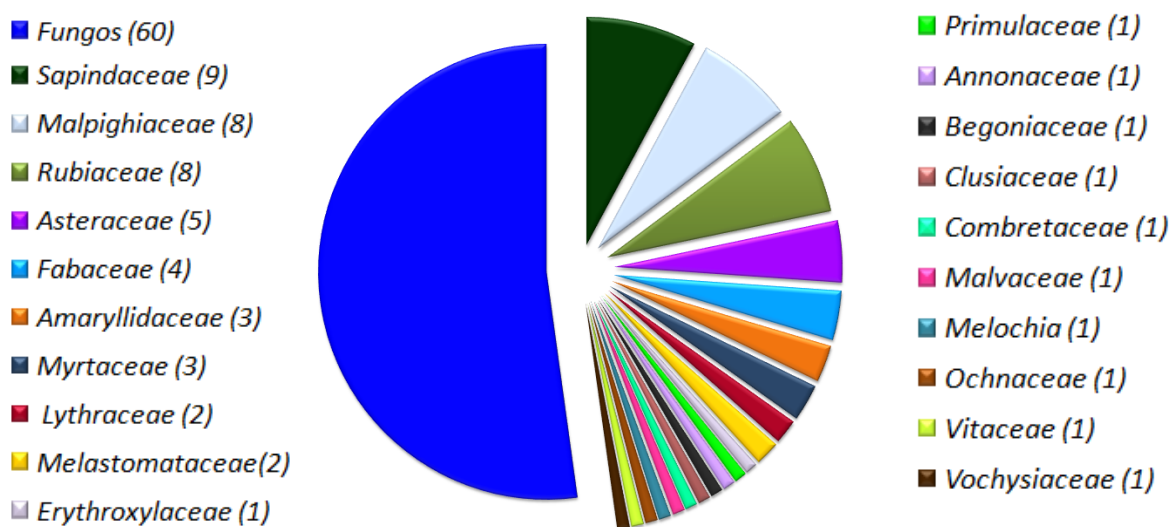
TABELA 1 - RELAÇÃO DOS EXTRATOS SELECIONADOS NOS ENSAIOS DE TRIAGEM (115) COM ATIVIDADE ANTIVIRAL CONTRA DENV-2

Extrato	Proteção	Extrato	Proteção	Extrato	Proteção	Extrato	Proteção	Extrato	Proteção
12073	≥ 75%	11751	≥50% < 75%	11699	≥ 75%	11305	≥50% < 75%	11123	≥ 75%
12148	≥50% < 75%	11764	≥50% < 75%	11700	≥50% < 75%	11311	≥ 75%	11125	≥50% < 75%
12220	≥50% < 75%	11768	≥50% < 75%	11705	≥ 75%	11320	≥ 75%	11126	≥50% < 75%
12278	≥50% < 75%	11802	≥50% < 75%	11706	≥ 75%	11321	≥50% < 75%	11128	≥ 75%
10343	≥50% < 75%	11817	≥50% < 75%	11707	≥ 75%	11323	≥50% < 75%	11129	≥ 75%
10347	≥50% < 75%	13356	≥ 75%	11711	≥50% < 75%	11324	≥ 75%	11135	≥ 75%
12815	≥50% < 75%	13358	≥ 75%	11716	≥ 75%	10307	≥50% < 75%	11136	≥50% < 75%
12829	≥50% < 75%	13418	≥ 75%	11719	≥50% < 75%	10312	≥50% < 75%	11137	≥50% < 75%
12860	≥ 75%	13194	≥50% < 75%	11721	≥50% < 75%	10333	≥50% < 75%	11158	≥50% < 75%
12802	≥ 75%	13203	≥50% < 75%	11726	≥50% < 75%	13864	≥ 75%	11159	≥50% < 75%
12875	≥ 75%	13211	≥50% < 75%	11730	≥ 75%	13865	≥ 75%	14463	≥50% < 75%
12956	≥ 75%	11667	≥50% < 75%	11735	≥50% < 75%	13870	≥50% < 75%	10426	≥50% < 75%
12957	≥ 75%	11670	≥50% < 75%	11736	≥50% < 75%	13897	≥50% < 75%	10437	≥50% < 75%
12969	≥ 75%	11673	≥50% < 75%	11737	≥50% < 75%	13899	≥50% < 75%	10463	≥50% < 75%
13015	≥50% < 75%	11674	≥ 75%	11738	≥ 75%	13957	≥50% < 75%	14240	≥ 75%
13023	≥50% < 75%	11679	≥50% < 75%	11740	≥50% < 75%	13985	≥50% < 75%		
11596	≥ 75%	11682	≥ 75%	11742	≥50% < 75%	11046	≥50% < 75%		
11656	≥50% < 75%	11683	≥50% < 75%	11744	≥50% < 75%	11067	≥50% < 75%		
11657	≥50% < 75%	11684	≥50% < 75%	11745	≥50% < 75%	11087	≥50% < 75%		
11658	≥50% < 75%	11685	≥50% < 75%	11746	≥50% < 75%	11106	≥50% < 75%		
11659	≥50% < 75%	11688	≥50% < 75%	11279	≥50% < 75%	11107	≥ 75%		
11513	≥ 75%	11689	≥ 75%	11280	≥50% < 75%	11108	≥ 75%		
13039	≥50% < 75%	11696	≥50% < 75%	11296	≥50% < 75%	11115	≥50% < 75%		
13097	≥ 75%	11697	≥50% < 75%	11298	≥ 75%	11117	≥50% < 75%		
11748	≥50% < 75%	11698	≥ 75%	11303	≥50% < 75%	11122	≥50% < 75%		

Nota: os extratos que conferiram proteção contra DENV-2 igual ou acima de 75% estão destacados em amarelo



**Figura 13 - Triagem de extratos de plantas e de fungos com atividade antiviral contra DENV-2.** A triagem foi realizada como descrito nos itens 5.5 e 5.6. Dentre os 3101 extratos testados, 115 inibiram em pelo menos 50% o ECP causado pela infecção de DENV-2, sendo que 37 destes inibiram o ECP viral acima de 75%.



**Figura 14 - Origem dos 115 extratos que apresentaram atividade anti-DENV-2 nos ensaios de triagem.** Dos 115 extratos selecionados, 60 foram obtidos de fungos, e 55 foram obtidos de 20 famílias de plantas. A triagem dos extratos com atividade anti-DENV-2 foi realizada como descrito nos itens 5.5 e 5.6. A identificação das espécies de fungos cujos extratos apresentaram atividade antiviral neste trabalho ainda não foi feita.

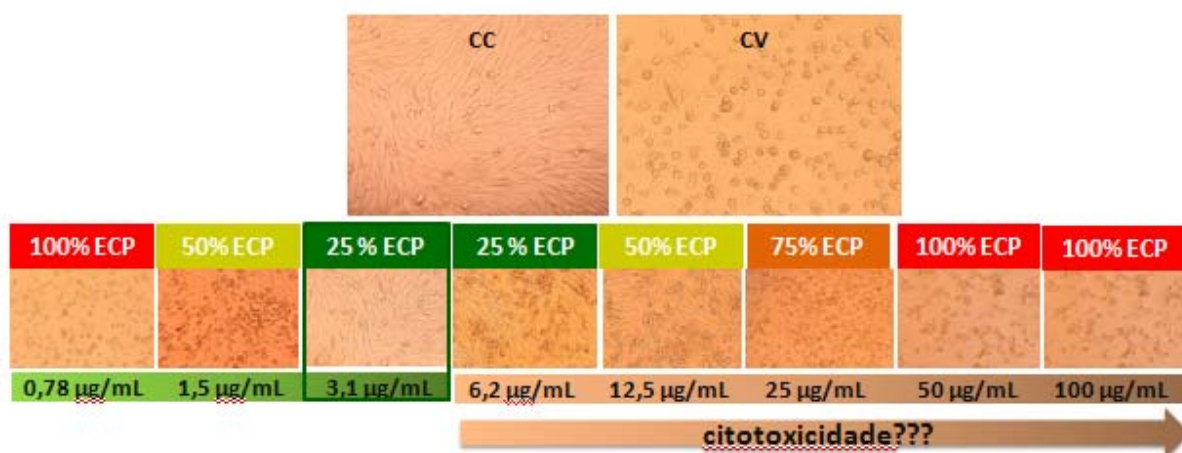
### 6.3 Determinação da concentração efetiva 50 (CE<sub>50</sub>)

Para a determinação das respectivas CE<sub>50</sub>, os 115 extratos considerados ativos nas etapas de triagem foram disponibilizados em solução aquosa de DMSO a 10% e na concentração de 2 mg/mL (como descrito no item 5.7). Para tal, foram testadas 8 concentrações distintas variando de 100 a 0,78 µg/mL como ilustrado na figura 6.

Os extratos de plantas (tabela 2) estão organizados e agrupados por famílias e os extratos de fungos (tabela 3), foram organizados pela concentração da CE<sub>50</sub>, de forma crescente determinada pelo ensaio do MTT. Os valores de CE<sub>50</sub> estimados através da visualização do ECP (método de cruzes) [figuras 9 e 10], também estão descritos em ambas as tabelas para comparação entre os dois métodos usados. Os valores obtidos pela observação do ECP ao microscópio óptico estão em concordância de aproximadamente 80% com os valores de proteção obtidos pelo método do MTT.

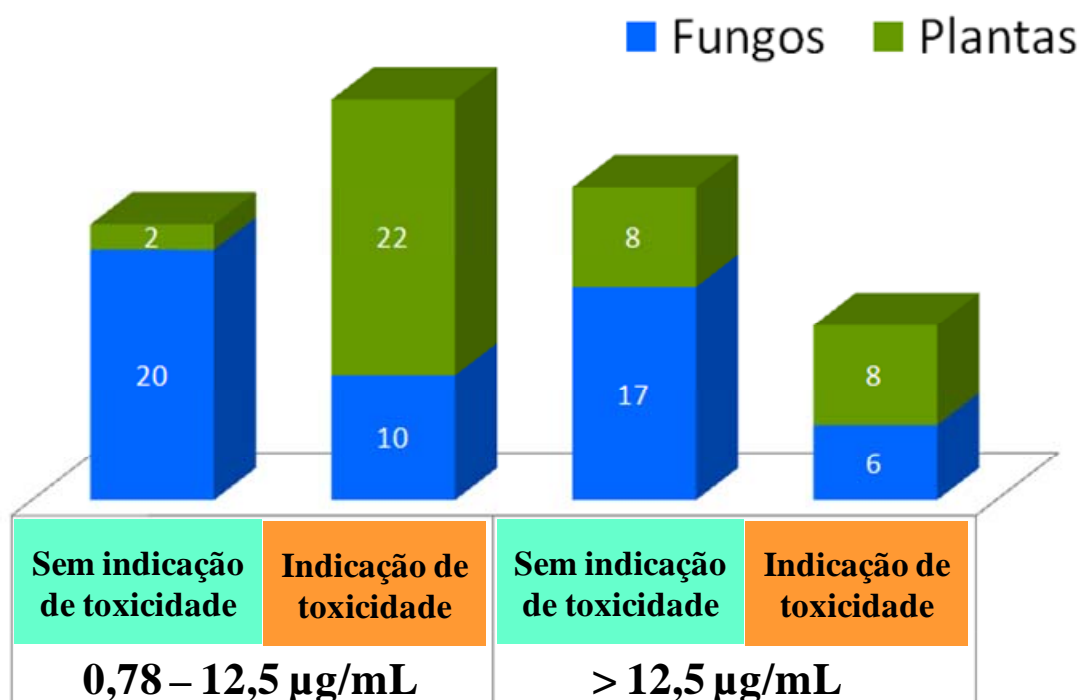
Nos ensaios de CE<sub>50</sub> realizados foi possível “prever” o efeito citotóxico de alguns extratos testados. Comumente era possível observar o efeito antiviral do extrato em concentrações menores, enquanto que, em maiores concentrações do mesmo extrato eram evidentes alterações morfológicas e/ou morte celular observadas na monocamada celular, indicando, portanto, citotoxicidade (figura 15). Tal observação foi corroborada nos experimentos para determinação da CC<sub>50</sub> de vários extratos de plantas, como por exemplo, o extrato 13211, obtido de planta da família *Asteraceae*. Os ensaios de CE<sub>50</sub> deste extrato indicaram uma provável citotoxicidade na concentração de 25 µg/mL, o que foi confirmado pela CC<sub>50</sub> obtida, cujo valor foi de 21,95 µg/mL (tabela 2).





**Figura 15 - Verificação da potencial citotoxicidade dos extratos de plantas e fungos nos ensaios de  $CE_{50}$ .** Foi feito o tratamento da monocamada de células BHK-21 infectadas com DENV-2 com diferentes concentrações do extrato. Após 72h de incubação, foi observada proteção de 50% do ECP viral na concentração do extrato de 1,5 µg/mL e 75% de proteção do ECP viral nas concentrações de 3,1 µg/mL e 6,2 µg/mL, quando comparadas ao controle de células (cc) e ao controle de vírus (cv). No entanto, quando a concentração do extrato foi aumentada para 12,5 a 100 µg/mL, observou-se um aumento do ECP na monocamada celular (alterações morfológicas e morte celular), ou seja, uma diminuição da proteção na monocamada celular à medida que se aumentou a concentração do extrato. Como o efeito antiviral do extrato foi evidenciado em concentrações menores, tal ECP nas concentrações maiores desse extrato, provavelmente não foi devido apenas à infecção com DENV-2, e sim, a uma possível citotoxicidade pelo extrato. Em destaque, a monocamada celular tratada com a concentração de 3,1 µg/mL do extrato que teve a melhor proteção.

Para facilitar a análise dos dados obtidos, os extratos de plantas (tabela 2) e fungos (tabela 3) foram divididos em grupos que apresentaram  $CE_{50}$  entre 0,78 a 12,5 µg/mL e extratos que apresentaram  $CE_{50}$  em concentrações acima de 12,5 µg/mL. Dentro desses 2 grupos optou-se por mostrar quantos desses extratos apresentaram indícios de citotoxicidade nas concentrações de 50 e 100 µg/mL testadas nos ensaios de  $CE_{50}$  (figura 16).



**Figura 16 - CE<sub>50</sub> anti-DENV-2 e indicação de citotoxicidade de extratos de plantas e fungos quando testados em concentrações maiores ou igual a 50 µg/mL.** A determinação da CE<sub>50</sub> foi realizada como descrito no item 5.7. Dentre os 30 extratos fúngicos com valores de CE<sub>50</sub> entre 0,78 a 12,5 µg/mL, 20 extratos não apresentaram nenhum indício de citotoxicidade. Já 10 extratos fúngicos mostraram possível citotoxicidade quando testados nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. E dos 24 extratos provenientes de plantas que tiveram CE<sub>50</sub> entre as concentrações 0,78 – 12,5 µg/mL, 2 destes extratos não apresentaram indício de citotoxicidade e os demais 22 extratos mostraram indicação de citotoxicidade quando testados nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Do mesmo modo, entre os extratos de plantas e fungos com CE<sub>50</sub> acima de 12,5 µg/mL, 17 extratos fúngicos não apresentaram indício de citotoxicidade e 6 extratos fúngicos mostraram possível citotoxicidade quando testados nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. E dos 16 extratos de plantas neste grupo de CE<sub>50</sub>, 8 destes não mostraram indícios de citotoxicidade e 8 mostraram indícios de citotoxicidade quando testados nas concentrações de 50 e 100 µg/mL.

Os extratos provenientes de plantas 10307, 10312, 10333, 11046, 11067, 11087, 11106, 11159, 11279, 11298, 11320, 12829, 12875, 12956, 12969, 13015, 13023, 13039, 13203, 13211, 13358 e 13418 foram ativos em concentrações que variaram de 0,78 a 12,5 µg/mL, consideradas como valor baixo de CE<sub>50</sub>, mas foram aparentemente citotóxicos em concentrações maiores ou igual a 50 µg/mL. Desse grupo de CE<sub>50</sub> considerada baixa, somente os extratos 13356 da família *Amaryllidaceae* e 11280 da família *Fabaceae*, (tabela 2) não apresentaram indícios de citotoxicidade em concentrações acima de 50 µg/mL (figura 16).

Alguns extratos de plantas com CE<sub>50</sub> acima de 12,5 µg/mL mostraram uma possível citotoxicidade nas concentrações de 50 e 100 µg/mL (10437, 11107, 11108,

11122, 11135, 12802, 13097, 13194). Tais extratos de plantas que também teve uma  $CE_{50}$  acima de 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , 10463, 11115, 11117, 11126, 11128, 11129, 11311, 11323 (tabela 2), não apresentaram indícios de citotoxicidade em concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  (figura 16).

Os extratos 11046 ( $CE_{50} = 0,87$ ), 11123 ( $CE_{50} = 23,75$ ), 11122 ( $CE_{50} = 50$ ) [tabela 2] mostraram uma perda progressiva da sua atividade antiviral, do primeiro ao terceiro experimento, sugerindo que a substância responsável pela atividade antiviral desses extratos pode ter sido degradada nos processos de armazenamento e congelamento.

Os extratos de plantas 11123, 11137, 11303, 11324, 12860 e 14463, tiveram um  $CE_{50}$  acima de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  (tabela 2), mas foram inconclusivos quanto a observações que sugerissem citotoxicidade nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Quanto aos demais extratos (10426, 11125, 11136, 11158, 11296, 11305, 11321, 12815 e 12957), os valores calculados com base na medida de absorbância, isto é, pelo ensaio do MTT, não refletiram proteção significativa, não sendo possível o cálculo de  $CE_{50}$  (tabela 2).

De uma forma geral, os extratos fúngicos foram considerados mais promissores neste estudo, já que não foi observado indícios de citotoxicidade nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  em 37 dos 53 extratos fúngicos testados para  $CE_{50}$ . Vinte extratos fúngicos com  $CE_{50}$  entre 0,78 a 12,5  $\mu\text{g/mL}$  (10343, 11513, 11656, 11657, 11670, 11674, 11679, 11683, 11684, 11688, 11698, 11659, 11700, 11707, 11738, 11748, 11751, 11764, 11768 e 11802) e 17 extratos fúngicos com  $CE_{50}$  acima de 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , (11673, 11682, 11685, 11697, 11699, 11719, 11721, 11726, 11730, 11736, 11740, 11744, 11745, 11746, 11817, 12073, 13864) não apresentaram qualquer indício de citotoxicidade (figuras 15 e 16) quando testados em concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . Em relação aos extratos fúngicos que indicaram possível citotoxicidade nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  (figuras 15 e 16), foram 10 extratos fúngicos com  $CE_{50}$  de 0,78-12,5  $\mu\text{g/mL}$  (10347, 11596, 11658, 11711, 13865, 13870, 13899, 13957, 13985, 14466) e 6 extratos fúngicos com  $CE_{50}$  acima de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  (11667, 11705, 11706, 11735, 11737, 11742).

Para os demais extratos fúngicos (11689, 11696, 11716, 12148, 12220, 12278, e 13897) os resultados foram inconclusivos quanto a possível citotoxicidade nos ensaios de  $CE_{50}$ . Alguns extratos de plantas e fungos considerados positivos nos testes de triagem, não repetiram a atividade antiviral nos ensaios de  $CE_{50}$ ,

principalmente quando testados pelo método do MTT (tabelas 2 e 3). Frequentemente, foi possível observar que o MTT não foi capaz de detectar/indicar a proteção de alguns extratos, sobretudo quando a densidade de células no poço estava menor do que a densidade do controle de células. Mesmo estando o ECP viral claramente inibido pela visualização ao microscópio óptico, isso não era evidenciado no valor de DO medido pelo MTT.

Vários extratos deste estudo são candidatos promissores para investigação mais detalhada de sua atividade antiviral. Na tabela 4 estão listados os 27 extratos considerados os mais promissores com base nos seguintes critérios: (a) reprodutibilidade entre os experimentos; (b) indicação de citotoxicidade nas concentrações de 50 e 100 µg/mL utilizadas nos ensaios de CE<sub>50</sub>; (c) concordância entre os métodos MTT e ECP e (d) valores de CE<sub>50</sub> entre 12,5 a 0,78 µg/mL. Por exemplo, os extratos fúngicos (11656, 11657, 11751, 11764, 11768, 11700, 11719) não foram citotóxicos em nenhuma das concentrações testadas nos ensaios de CE<sub>50</sub>, tiveram uma concordância excelente entre os dois métodos e mostraram reprodutibilidade entre experimentos realizados em datas diferentes.

Assim como alguns extratos de plantas, notou-se que em alguns extratos de fungos também havia perda de atividade de forma progressiva entre diferentes experimentos. Como por exemplo, o extrato 13985 (*Hypoxylon* sp.) que inibiu o ECP viral no primeiro experimento nas concentrações de 1,5 a 25 µg/mL, com valores de proteção que variaram de 31 a 69% pelo MTT, mas que não se repetiram nos experimentos seguintes.

#### **6.4 Determinação da concentração citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>)**

A determinação da concentração citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) de todos os extratos selecionados com atividade antiviral contra DENV-2 na etapa de triagem ainda não foi possível, porque a extratoteca do Colab da Fiocruz Minas não dispõe de quantidade suficiente da grande maioria dos extratos para a realização dos experimentos. Portanto, até o momento nos foram fornecidos apenas 12 extratos de plantas provenientes das famílias *Fabaceae* (extratos 10333 e 11280), *Amaryllidaceae* (extratos 13358 e 13356), *Ochnaceae* (extrato 12969), *Combretaceae* (extrato 10312), *Asteraceae* (extrato 13211), *Erythroxylaceae* (extrato

13023), *Malpighiaceae* (extratos 13203, 11298 e 11311), *Annonaceae* (extrato 12829).

Nos ensaios de  $CC_{50}$  foram utilizadas 8 diferentes concentrações dos extratos que variaram de 1000 a 7,8  $\mu\text{g/mL}$  e os resultados foram analisados pelos dois métodos, observação ao microscópio óptico do ECP causado pelo extrato e logo em seguida, pelo método do MTT. No entanto, somente os valores obtidos através do método do MTT foram considerados para cálculo de IS, sendo os valores obtidos pelo ECP apenas para comparação com o método do MTT. Os resultados de  $CC_{50}$  foram determinados a partir dos valores obtidos em experimentos distintos por regressão não linear no programa Prism 5. A  $CC_{50}$  obtida foi concordante em 10 dos 12 extratos testados e comparados entre ambos os métodos (tabela 2). Dos extratos com valores de  $CC_{50}$  não concordantes entre os dois métodos, ainda assim tiveram valores aproximados. O extrato 12969 apresentou  $CC_{50}=59,77 \mu\text{g/mL}$  pelo método do MTT e de 125  $\mu\text{g/mL}$  quando avaliado pelo método ECP. E o extrato 13203, com valor de  $CC_{50} = 26,71 \mu\text{g/mL}$  pelo MTT, apresentou  $CC_{50}$  de 62,5  $\mu\text{g/mL}$  estimado pelo método ECP.

O extrato que apresentou maior citotoxicidade às células BHK-21, dentre os 12 extratos de plantas testados, foi o extrato 13358 da família *Amarillydaceae*, com  $CC_{50}$  de 4,8  $\mu\text{g/mL}$  obtida pelo ensaio do MTT e 12,5  $\mu\text{g/mL}$  quando avaliado pelo método do ECP (tabela 2).

Os extratos que foram menos tóxicos às células BHK-21 foram o 13356, também da família *Amarillydaceae* ( $CC_{50} = 87,79 \mu\text{g/mL}$ ) e o extrato 11280 da família *Fabaceae* ( $CC_{50} = 159,7 \mu\text{g/mL}$ ) [tabela 2]. Estes dois extratos não apresentaram citotoxicidade visível até a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , quando foram submetidos aos ensaios de  $CE_{50}$ .

Após a determinação da  $CC_{50}$  destes extratos de plantas, calculou-se o índice de seletividade (IS). Cinco extratos se destacaram por apresentarem um alto IS, a saber: extrato 13356 (IS = 32,15) da família *Amarillydaceae*, extratos 10333 (IS = 24,47) e 11280 (IS = 20,47) da família *Fabaceae*, extrato 12829 da família *Annonaceae* (IS = 11,64) e extrato 12969 (IS = 11,54) da família *Ochnaceae*.

## 6.5 Seleção dos extratos fúngicos promissores para recultivo

Após realização dos ensaios de  $CE_{50}$ , o próximo passo foi testar todos os extratos fúngicos para a determinação das respectivas  $CC_{50}$ . Entretanto, a extratoteca Colab da Fiocruz Minas não dispunha de quantidades suficientes de nenhum dos extratos fúngicos para serem disponibilizados para os experimentos subsequentes. Dessa forma, foi necessário fazer um recultivo dos fungos dos quais foram obtidos tais extratos. Os extratos dos fungos recultivados foram retestados para a verificação e comparação da sua  $CE_{50}$  com os extratos originais.

A escolha dos fungos a serem recultivados para obtenção de novos extratos foi feita de acordo com os seguintes critérios; (i) extratos com resultados concordantes em pelo menos dois experimentos distintos; (ii) extratos que apresentaram proteção acima de 75%; (iii) extratos com baixas concentrações de  $CE_{50}$ . Foram escolhidos 36 extratos fúngicos para o recultivo pela equipe do Dr. Luiz H. Rosa do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Foram recultivados com sucesso 27 fungos dos quais foram obtidos os extratos: 10343, 11513, 11596, 11657, 11658, 11659, 11667, 11685, 11683, 11688, 11689, 11700, 11705, 11706, 11711, 11719, 11721, 11726, 11735, 11736, 11742, 11744, 11745, 11748, 11751, 11764, 11768. Já os respectivos fungos dos quais foram obtidos os extratos 11656, 11684, 11685, 11698, 11699, 11707, 11716, 11730 e 11740, não cresceram na tentativa de recultivo.

Como mostrado na tabela 3, os resultados de  $CE_{50}$  dos extratos obtidos dos fungos recultivados não mostraram concordância com os resultados de  $CE_{50}$  verificados e testados anteriormente nestes mesmos extratos obtidos dos fungos coletados em seu ambiente natural, aqui denominados como originais. Apenas 3 extratos obtidos de fungos recultivados (11748, 11658, 11688) conferiram proteção contra o DENV-2, mas em concentrações bem maiores do que as utilizadas nos experimentos feitos com os extratos de fungos originais. Como exemplo, podemos citar o extrato 11748 original, que exibiu uma  $CE_{50}$  de 3,1  $\mu\text{g/mL}$  pelo ensaio do MTT, mas tal extrato quando foi obtido do fungo recultivado exibiu uma  $CE_{50}$  de 37,93  $\mu\text{g/mL}$  (tabela 3).

TABELA 2 - VALORES DE CE<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> E IS DE EXTRATOS DE PLANTAS COM ATIVIDADE ANTIVIRAL CONTRA DENV-2 DETERMINADOS ATRAVÉS DOS DOIS MÉTODOS: CLASSIFICAÇÃO DO ECP VIRAL AO MICROSCÓPIO ÓPTICO E PELO ENSAIO DO MTT.

Cod. EX	Família	CE <sub>50</sub> (MTT) µg/mL	CE <sub>50</sub> (ECP) µg/mL	CC <sub>50</sub> (MTT) µg/mL	CC <sub>50</sub> (ECP) µg/mL	IS
13358	<i>Amaryllidaceae</i>	1,03	0,78	4,8	15,6	4,66
13356	<i>Amaryllidaceae</i>	2,73	1,5	87,79	> 125 < 250	32,15
13418	<i>Amaryllidaceae</i>	11,65	> 3,1 < 12,5	NT	NT	-
12829	<i>Annonaceae</i>	9,86	< 12,5	114,8	> 125 < 250	11,64
11087	<i>Asteraceae</i>	0,78	0,78	NT	NT	-
13211	<i>Asteraceae</i>	8,96	< 12,5	21,95	> 31,3 < 125	2,44
13194	<i>Asteraceae</i>	20,62	< 25	NT	NT	-
12802	<i>Asteraceae</i>	40,24	< 50	NT	NT	-
12815	<i>Asteraceae</i>	I	I	NT	NT	-
13097	<i>Begoniaceae</i>	58,33	25	NT	NT	-
10307	<i>Clusiaceae</i>	12,5	12,5	NT	NT	-
10312	<i>Combretaceae</i>	7,29	6,2	26,26	> 31,25 < 62,5	3,6
13023	<i>Erythroxylaceae</i>	9,07	< 12,5	39,35	62,5	4,33
11280	<i>Fabaceae</i>	7,8	12,5	159,7	125	20,47
10437	<i>Fabaceae</i>	50	50	NT	NT	-
10333	<i>Fabaceae</i>	0,91	> 0,78 < 1,5	22,27	31,3	24,47
11279	<i>Fabaceae</i>	2,97	3,1	NT	NT	-
11320	<i>Lythraceae</i>	7,08	3,1	NT	NT	-
11321	<i>Lythraceae</i>	I	25	NT	NT	-

Cod. Ex = Código do extrato; I = resultado inconclusivo; NT = não testado

CE<sub>50</sub> = concentração efetiva 50; CC<sub>50</sub> concentração citotóxica 50; IS = índice de seletividade

MTT = ensaio do MTT; ECP = ensaio para classificação do efeito citopático por observação ao microscópio óptico

## CONTINUAÇÃO DA TABELA 2

Cod. EX	Família	CE <sub>50</sub> (MTT) µg/mL	CE <sub>50</sub> (ECP) µg/mL	CC <sub>50</sub> (MTT) µg/mL	CC <sub>50</sub> (ECP) µg/mL	IS
13203	<i>Malpighiaceae</i>	9,35	< 12,5	26,71	62,5	2,85
11298	<i>Malpighiaceae</i>	12,5	< 12,5	36,3	> 31,25 < 62,5	2,9
11323	<i>Malpighiaceae</i>	23,86	50	NT	NT	-
11311	<i>Malpighiaceae</i>	23,9	< 25	64,29	62,5	2,69
11117	<i>Malpighiaceae</i>	34,76	< 50	NT	NT	-
11115	<i>Malpighiaceae</i>	41,02	< 50	NT	NT	-
11324	<i>Malpighiaceae</i>	49,04	< 50	NT	NT	-
11296	<i>Malpighiaceae</i>	I	25	NT	NT	-
14463	<i>Malvaceae</i>	50	50	NT	NT	-
11303	<i>Melastomataceae</i>	65	25	NT	NT	-
11305	<i>Melastomataceae</i>	I	50	NT	NT	-
10426	<i>Melochia</i>	I	12,5	NT	NT	-
13015	<i>Myrtaceae</i>	5,04	6,2	NT	NT	-
11159	<i>Myrtaceae</i>	12,03	< 12,5	NT	NT	-
11158	<i>Myrtaceae</i>	I	50	NT	NT	-
12969	<i>Ochnaceae</i>	5,18	< 6,2	59,77	125	11,54
12875	<i>Primulaceae</i>	11,83	< 12,5	NT	NT	-
12860	<i>Rubiaceae</i>	18,06	< 25	NT	NT	-

Cod. Ex = Código do extrato; I = resultado inconclusivo; NT = não testado

CE<sub>50</sub> = concentração efetiva 50; CC<sub>50</sub> = concentração citotóxica 50; IS = índice de seletividade

MTT = ensaio do MTT; ECP = ensaio para classificação do efeito citopático por observação ao microscópio óptico



## CONTINUAÇÃO DA TABELA 2

Cod. EX	Família	CE <sub>50</sub> (MTT) µg/mL	CE <sub>50</sub> (ECP) µg/mL	CC <sub>50</sub> (MTT) µg/mL	CC <sub>50</sub> (ECP) µg/mL	IS
11135	<i>Rubiaceae</i>	31,82	25	NT	NT	-
11129	<i>Rubiaceae</i>	41,03	50	NT	NT	-
11126	<i>Rubiaceae</i>	41,18	50	NT	NT	-
11128	<i>Rubiaceae</i>	42,36	50	NT	NT	-
11137	<i>Rubiaceae</i>	43,48	< 50	NT	NT	-
11125	<i>Rubiaceae</i>	I	100	NT	NT	-
11136	<i>Rubiaceae</i>	I	50	NT	NT	-
11106	<i>Sapindaceae</i>	0,78 a 12,5	0,78	NT	NT	-
11046	<i>Sapindaceae</i>	0,87	0,78	NT	NT	-
13039	<i>Sapindaceae</i>	9,8	< 6,2	NT	NT	-
12956	<i>Sapindaceae</i>	11,11	< 12,5	NT	NT	-
11108	<i>Sapindaceae</i>	17,83	< 25	NT	NT	-
11123	<i>Sapindaceae</i>	23,75	< 25	NT	NT	-
11107	<i>Sapindaceae</i>	29,65	25	NT	NT	-
11122	<i>Sapindaceae</i>	50	50	NT	NT	-
12957	<i>Sapindaceae</i>	-	-	NT	NT	-
11067	<i>Vitaceae</i>	< 0,78	< 1,5	NT	NT	-
10463	<i>Vochysiaceae</i>	57,63	50	NT	NT	-

Cod. Ex = Código do extrato; I = resultado inconclusivo; NT = não testado

CE<sub>50</sub> = concentração efetiva 50; CC<sub>50</sub> concentração citotóxica 50; IS = índice de seletividade

MTT = ensaio do MTT; ECP = ensaio para classificação do efeito citopático por observação ao microscópio óptico

TABELA 3 - VALORES DE CE<sub>50</sub> DE EXTRATOS FÚNGICOS ORIGINAIS E OBTIDOS DE FUNGOS RECVLTIVADOS DETERMINADOS PELA CLASSIFICAÇÃO DO ECP VIRAL E PELO ENSAIO DO MTT

Cod. EX	Extrato fúngico	CE <sub>50</sub> (MTT) µg/mL	CE <sub>50</sub> (ECP) µg/mL
11657	original	0,94	< 1,5
	recultivado	SA	SA
13957	original	1,11	< 1,5
13985	Original ( <i>Hypoxylon</i> sp.)	1,18	< 1,5
10347	original	1,36	1,5
14466	original	1,43	< 1,5
13870	original	1,44	< 12,5
13865	original	1,46	25
13899	original	1,46	1,5
11674	original	2,44	3,1
11656	original	2,66	< 3,1
11748	original	3,1	6,2
	recultivado	37,93	> 25 < 50
11596	original	3,4	3,1
	recultivado	SA	SA
10343	original	3,7	3,1
	recultivado (DCM)	SA	SA
	recultivado (MeOH)	SA	SA
11670	original	5,65	1,5

Cod. Ex = Código do extrato; SA = extrato sem atividade antiviral; I = resultado inconclusivo

DCM = extração com diclorometano; MeOH = extração com metanol;

CE<sub>50</sub> = concentração efetiva 50; CC<sub>50</sub> = concentração citotóxica 50; IS = índice de seletividade

MTT = ensaio do MTT; ECP = ensaio para classificação do efeito citopático por observação ao microscópio óptico

## CONTINUAÇÃO DA TABELA 3

Cod. EX	Extrato fúngico	CE <sub>50</sub> (MTT) µg/mL	CE <sub>50</sub> (ECP) µg/mL
11658	original	7,38	3,1
	recultivado	21,55	> 12,5 < 25
11513	original	7,41	3,1
	recultivado	SA	SA
11700	original	7,46	3,1
	recultivado	SA	SA
11738	original	8,45	3,1
	recultivado	SA	SA
11684	original	8,65	12,5
11751	original	8,93	3,1
	recultivado	SA	SA
11688	original	9,11	6,2
	recultivado	30,77	> 25 < 50
11683	original	10,4	12,5
	recultivado	SA	SA
11768	original	10,5	6,2
	recultivado	SA	100
11659	original	10,51	12,5
	recultivado	SA	SA

Cod. E = Código do extrato; SA = extrato sem atividade antiviral; I = resultado inconclusivo

DCM = extração com diclorometano; MeOH = extração com metanol;

CE<sub>50</sub> = concentração efetiva 50; CC<sub>50</sub> = concentração citotóxica 50; IS = índice de seletividade

MTT = ensaio do MTT; ECP = ensaio para classificação do efeito citopático por observação ao microscópio óptico

## CONTINUAÇÃO DA TABELA 3

Cod. EX	Extrato fúngico	CE <sub>50</sub> (MTT) µg/mL	CE <sub>50</sub> (ECP) µg/mL
11764	original	11,16	6,2
	recultivado	SA	SA
11679	original	11,46	3,1
11707	original	11,56	6,2
11698	original	11,87	< 6,2
11711	original	11,87	6,2
	recultivado	SA	SA
11802	original	12,01	< 12,5
11706	original	13,46	6,2
	recultivado	SA	SA
11699	original	15	< 12,5
11685	original	15,95	12,5
11719	original	17,19	6,2
	recultivado	SA	SA
11744	original	17,76	< 12,5
	recultivado	SA	SA
11740	original	18,29	12,5
11817	original	18,4	12,5

Cod. Ex = Código do extrato; SA = extrato sem atividade antiviral; I = resultado inconclusivo

DCM = extração com diclorometano; MeOH = extração com metanol;

CE<sub>50</sub> = concentração efetiva 50; CC<sub>50</sub> = concentração citotóxica 50; IS = índice de seletividade

MTT = ensaio do MTT; ECP = ensaio para classificação do efeito citopático por observação ao microscópio óptico

## CONTINUAÇÃO DA TABELA 3

Cod. EX	Extrato fúngico	CE <sub>50</sub> (MTT) µg/mL	CE <sub>50</sub> (ECP) µg/mL
11682	original	19,44	25
13864	original	20	12,5
11737	original	20,45	6,2
11736	original	23,26	< 25
	recultivado	SA	SA
11667	original	23,33	12,5
	recultivado	SA	12,5
11726	original	24,38	12,5
	recultivado	SA	SA
11705	original	24,4	12,5
	recultivado	SA	SA
11721	original	30,95	6,2
	recultivado	SA	SA
12073	original	31,23	3,1
11746	original	32,65	1,5
11742	original	33,33	25
	recultivado	SA	SA

Cod. Ex = Código do extrato; SA = extrato sem atividade antiviral; I = resultado inconclusivo

DCM = extração com diclorometano; MeOH = extração com metanol;

CE<sub>50</sub>= concentração efetiva 50; CC<sub>50</sub> concentração citotóxica 50; IS = índice de seletividade

MTT = ensaio do MTT; ECP = ensaio para classificação do efeito citopático por observação ao microscópio óptico

## CONTINUAÇÃO DA TABELA 3

Cod. EX	Extrato fúngico	CE <sub>50</sub> (MTT) µg/mL	CE <sub>50</sub> (ECP) µg/mL
11730	original	34,62	12,5
11745	original	35,63	50
	recultivado	SA	SA
11697	original	38,89	25
11735	original	40,87	25
	recultivado	SA	SA
11673	original	43,71	3,1
12148	original	I	SA
12220	original	I	3,1
12278	original	I	I
11696	original	I	I
11716	original	I	1,5
11689	original	I	I
	recultivado	SA	SA
13897	original	I	< 12,5

Cod. Ex = Código do extrato; SA = extrato sem atividade antiviral; I = resultado inconclusivo  
 DCM = extração com diclorometano; MeOH = extração com metanol;  
 CE<sub>50</sub> = concentração efetiva 50; CC<sub>50</sub> = concentração citotóxica 50; IS = índice de seletividade  
 MTT = ensaio do MTT; ECP = ensaio para classificação do efeito citopático por observação ao microscópio óptico

TABELA 4 - VALORES DE CE<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> E IS DE EXTRATOS DE PLANTAS E DE FUNGOS MAIS PROMISSORES

Extratos	Reprodutibilidade	Indicação de citotoxicidade	Concordância entre métodos	CE <sub>50</sub>	CC <sub>50</sub>	IS	Origem
13356	●	●	●	2,73	87,79	32,15	plantas
11280	●	●	●	7,8	159,7	20,47	
12829	●	●	●	9,86	114,8	11,64	
13358	●	●	●	1,03	4,8	4,66	
11106	●	●	●	0,78 - 12,5	-	-	
11657	●	●	●	0,94	-	-	Fungos
11656	●	●	●	2,66	-	-	
11513	●	●	●	7,41	-	-	
11700	●	●	●	7,46	-	-	
11738	●	●	●	8,45	-	-	
11751	●	●	●	8,93	-	-	
11768	●	●	●	10,5	-	-	
11659	●	●	●	10,51	-	-	
11764	●	●	●	11,16	-	-	
11707	●	●	●	11,56	-	-	
11698	●	●	●	11,87	-	-	
11699	●	●	●	15	-	-	
11719	●	●	●	17,19	-	-	
11740	●	●	●	18,29	-	-	
11736	●	●	●	23,26	-	-	
11721	●	●	●	30,95	-	-	
10347	●	●	●	1,3	-	-	
11596	●	●	●	3,4	-	-	
11711	●	●	●	11,87	-	-	
13864	●	●	●	20	-	-	
13957	●	●	●	1,11	-	-	
13985	●	●	●	1,18	-	-	

**Extratos considerados promissores. Coluna de reprodutibilidade:** marcador verde indica que houve reprodutibilidade dos resultados em no mínimo 3 experimentos diferentes, enquanto o marcador amarelo indica ausência de reprodutibilidade em diferentes experimentos. **Coluna indicação de citotoxicidade:** Possível citotoxicidade apenas nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. O marcador verde indica que tal extrato não apresentou indícios de citotoxicidade e o marcador amarelo indica que tal extrato apresentou indícios de citotoxicidade nas concentrações citadas. **Coluna de concordância entre os métodos:** MTT x ECP, métodos usados para revelação da atividade antiviral de tais extratos. O marcador verde indica concordância e o marcador amarelo indica discordância entre os resultados obtidos por ambos os métodos.

## 7 DISCUSSÃO

A natureza sempre despertou no homem um fascínio, não só por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado, mas também pelos recursos oferecidos para sua alimentação, manutenção e também para os cuidados básicos de saúde. Por séculos, plantas medicinais formaram a base dos medicamentos tradicionais da China (Chang & But, 1986), da Índia (Dev, 1999), África e muitas outras civilizações (Schultes & Raffauf, 1990). E ainda hoje, 80% da população mundial utilizam plantas medicinais para cuidados primários de saúde enquanto 20% usam produtos de plantas como ingredientes de várias drogas (Farnsworth, 1990). Desse modo, a natureza é responsável pela produção da maioria das substâncias conhecidas, sendo que a maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura pertence ao reino vegetal (Montanari & Bolzani, 2001). Ao longo de toda evolução humana, milhares de produtos de plantas ativos biologicamente foram identificados e eles formam uma parte integral do sistema medicinal tradicional em todo o mundo.

Há um forte impacto de plantas e também de fungos para o desenvolvimento de drogas e isso pode ser notado nas principais áreas terapêuticas. Ressalta-se que entre 1981 e 2002, dos 90 antibacterianos e entidades químicas aprovadas pela FDA, 10% foram produtos naturais enquanto outros 68% foram derivados de produtos naturais (Newman & Cragg, 2003). Além disso, plantas e outros produtos naturais têm inspirado o desenvolvimento da química orgânica, levando ao avanço de metodologias sintéticas e a possibilidade de fazer análogos do composto original com melhora das propriedades farmacológicas, farmacêuticas e também diminuição da citotoxicidade (Wilson & Danishefsky, 2006; Newman, 2008; Sunazuka *et al.*, 2008).

Diversos outros motivos fortalecem e justificam o interesse terapêutico na busca de antivirais a partir de produtos naturais, entre os quais: (i) o limitado tempo de utilização de alguns medicamentos para o tratamento de certas infecções virais devido aos problemas relacionados à resistência viral; (ii) problemas de latência e recorrência de infecções virais em pacientes imunocomprometidos; (iii) a falta de medicamentos eficientes para o tratamento da maior parte das doenças causadas por vírus; e (iv) a diversidade estrutural de metabólitos secundários provenientes de plantas e de fungos.



No entanto, sabe-se que apenas uma pequena fração do vasto reservatório de compostos disponíveis na natureza, tenha sido explorada visando à descoberta de substâncias antivirais. Além disso, a disponibilidade limitada de drogas antivirais tem sido atribuída, parcialmente, à dificuldade de encontrar alvos ou drogas que eliminem o vírus sem prejudicar as células hospedeiras (Cock & Kalt, 2010).

A rápida propagação de doenças virais emergentes e reemergentes, como por exemplo, a dengue, tem incentivado a pesquisa para a descoberta de substâncias antivirais derivadas de produtos naturais que possam ser utilizadas para o tratamento dessas doenças (Jassim & Naji, 2003; Chattopadhyay & Naik, 2007).

A dengue continua sendo uma crescente ameaça à saúde pública em todo o mundo e é considerada como a maior arbovirose durante as últimas décadas (OMS, 2015; Bhatt *et al.*, 2013). Embora existam grandes esforços para o desenvolvimento de um medicamento eficaz, infelizmente, ainda não existe nenhuma droga aprovada para o tratamento da dengue.

Até o momento, a exploração do *pool* de produtos naturais já identificou uma variedade de extratos vegetais que possuem atividade contra o DENV, entretanto pesquisas extensivas sobre tais plantas ainda não foram realizadas.

Certamente, a biodiversidade de plantas e fungos os tornam detentores de substâncias que podem ser usadas para o tratamento da dengue e de várias doenças virais. De fato, nossos resultados fortalecem essa hipótese, visto que dentre os 3101 extratos testados neste estudo, 115 apresentaram efeito antiviral contra DENV-2, sendo que 37 destes extratos inibiram em 75% ou mais o ECP causado pelo DENV-2 em células BHK-21.

Embora os estudos realizados para a descoberta de compostos ativos de extratos brutos usualmente iniciam-se pela análise da citotoxicidade dos extratos nos modelos de células em estudo, neste trabalho adotou-se uma estratégia diferente. Para identificar os extratos da extratoteca Colab da Fiocruz Minas com atividade antiviral, as etapas de triagem e determinação de  $CE_{50}$  foram feitas antes da realização dos ensaios para a determinação da  $CC_{50}$ . Portanto, somente os extratos considerados positivos contra o DENV-2, na etapa de triagem, utilizando-se a concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$ , foram submetidos aos ensaios de  $CE_{50}$  e se disponíveis em quantidade suficiente, aos ensaios de citotoxicidade ( $CC_{50}$ ). Tal escolha justifica-se porque a extratoteca Colab da Fiocruz Minas não possui quantidade suficiente de todos os extratos depositados para a realização dos

ensaios para determinação da  $CC_{50}$ , os quais requerem quantidades maiores do extrato depositado. Além disso, os extratos depositados na extratoteca Colab da Fiocruz Minas também são utilizados por outros pesquisadores para avaliação da sua ação contra outros organismos infecciosos como protozoários do gênero *Leishmania*, tripanossomatídeos e ação antiproliferativa em linhagens de células tumorais.

Neste estudo, os 3101 extratos de plantas e fungos que foram submetidos aos ensaios de triagem para a avaliação da atividade antiviral *in vitro* contra DENV-2, foram em sua maioria obtidos a partir de espécimes de plantas e de fungos coletados no vasto território brasileiro. Entretanto, alguns dos extratos estudados foram obtidos de fungos isolados de ambientes áridos e de temperaturas extremas, como o continente Antártico (Godinho *et al.*, 2015) e o deserto do Atacama no Chile (Gonçalves *et al.*, 2015).

Após a seleção dos 115 extratos com atividade antiviral, estes extratos foram submetidos aos ensaios de  $CE_{50}$  e alguns deles, aos ensaios de determinação de  $CC_{50}$ . Em todos os ensaios, foram utilizados os dois métodos de avaliação, o ensaio do MTT e a avaliação do ECP viral observado ao microscópio óptico.

O ensaio do MTT é uma técnica colorimétrica, sensível e quantitativa, vastamente utilizada para a avaliação *in vitro* da viabilidade celular e citotoxicidade, bem como no estudo de aditivos, micotoxinas e fármacos. Tal análise é feita baseando-se numa reação biológica, em células viáveis, catalisada por desidrogenases mitocondriais que reduzem o sal de tetrazólio, composto hidrossolúvel de coloração amarelo-pálido, à cristais de formazana. A absorvância da formazana, medida espectrofotometricamente, é diretamente correlacionada com o número de células metabolicamente ativas. Sendo assim, valores de absorvância altos indicam uma elevada produção de formazana (cor roxa), o que significa uma alta atividade enzimática e, conseqüentemente, um maior número de células viáveis (Mosmann, 1983). Como desvantagens, a precisão do ensaio pode estar relacionada com o intervalo de concentrações utilizado, pode sofrer a interferência de soluções turvas ou coloridas, além da presença de substâncias com potencial intrínseco redutor que podem levar a resultados falso-positivos (Vanden Bergue *et al.*, 1993; Bruggisser *et al.*, 2002). Além disso, se o efeito protetor do extrato estiver associado apenas à prevenção do ECP viral nas células infectadas, o ensaio do

MTT não será sensível a tal extrato, já que a capacidade metabólica da célula poderá estar comprometida devido à replicação viral.

O método de cruces para avaliação do ECP viral por microscopia óptica é uma técnica comumente usada em laboratórios de virologia que consiste na observação de danos morfológicos celulares causados pelo vírus. Essa avaliação permite uma estimativa da concentração de extratos/substâncias que inibem o ciclo de multiplicação viral ou impedem a infecção viral (Dargan & Subak-Sharpe, 1985; Rodriguez *et al.*, 1990).

Tanto nos ensaios de triagem dos extratos quanto nos ensaios de determinação da  $CE_{50}$ , verificou-se uma concordância de aproximadamente 80% entre os resultados obtidos pelos dois métodos utilizados (método do MTT e método de cruces para avaliação do ECP viral). Tal discordância entre os métodos de análise pode ser atribuída ao fato de que frequentemente observava-se que monocamadas infectadas com DENV-2 e tratadas com determinado extrato apresentava-se íntegra e sem danos morfológicos aparentes, claramente indicando a inibição do ECP viral pelo extrato. No entanto, após a realização do ensaio do MTT, verificava-se que o valor de absorbância não indicava efeito antiviral de tal extrato. Por exemplo, os extratos 11296 (*Malpighiaceae*), 11158 (*Myrtaceae*), 11305 (*Melastomataceae*) e 10426 (*Melochia*), inibiram e/ou diminuíram o ECP causado pelo vírus em células BHK-21, mas essa proteção não foi detectada pelo ensaio do MTT, sugerindo que talvez estes extratos tenham inibido apenas o ECP viral sem inibir a replicação viral. Tang e colaboradores (2012), estudando a atividade antiviral de extratos metanólicos de plantas medicinais (*Andrographis paniculata*, *Citrus limon*, *Cymbopogon citratus*, *Momordica charantia*, *Ocimum sanctum* e *Pelargonium citrosum*) contra DENV-1 em células Vero, também observaram variação semelhante entre os resultados obtidos pelo ensaio do MTT e pela classificação do ECP viral pelo método de cruces. Os autores de tal trabalho sugeriram que alguns desses extratos inibiram o ECP viral sem inibir a replicação do vírus. Em outras palavras, tais extratos estariam impedindo/diminuindo o ECP causado pelo vírus resultando em uma “falsa-proteção”, mas, no entanto, não impediram a multiplicação viral que certamente interfere no metabolismo celular, resultando na leitura de uma DO baixa no ensaio do MTT .

Os resultados do nosso trabalho indicaram que a classificação do ECP viral pelo método de cruces, apesar de ser subjetiva e depender da *expertise* do

experimentador, foi útil para a triagem do efeito antiviral dos extratos em células BHK-21. Portanto, como já mencionado anteriormente, todos os extratos que mostraram inibição do ECP viral maior ou igual a 50% (2+) nos testes de triagem foram selecionados para determinação de CE<sub>50</sub>, independente dos valores obtidos no ensaio do MTT.

Muito frequente nos ensaios para determinação da CE<sub>50</sub> foi a verificação de valores de DO obtidos para monocamadas tratadas com determinados extratos (por exemplo os extratos 11106 e 11659) muito maiores do que os valores de DO verificados no controle de células (cc). Neste caso, as monocamadas tratadas com o extrato não apresentavam nenhum sinal de ECP viral e células mortas e, de forma interessante, exibiam uma densidade menor do que as monocamadas dos poços do controle de células (cc). De fato, Kasugai e colaboradores (1990) verificaram em células RPC-C2A derivadas de polpa dentária de rato, que a absorbância (DO) medida nos ensaios de MTT pode variar de acordo com a densidade da monocamada. Esses autores verificaram que monocamadas com densidade um pouco menor do que monocamadas que já sofreram inibição por contato tendem a mostrar valores de absorbância maiores. Isto poderia ser devido ao fato de que, células ainda em proliferação, possuem o dobro de mitocôndrias comparadas às células em fase de repouso, fato este que interfere no metabolismo do MTT pelas mitocôndrias (Posakony *et al.*, 1977). Portanto, as células de monocamadas ainda em expansão apresentariam uma maior capacidade de metabolizar o MTT do que células já na fase de repouso induzida pela inibição por contato.

Outra observação interessante neste estudo na realização dos ensaios de CE<sub>50</sub> foi a possibilidade de “prever” a citotoxicidade dos extratos testados, pois comumente, era possível observar o efeito antiviral do extrato em concentrações menores, enquanto que o dano observado na monocamada celular era muito evidente em concentrações maiores do mesmo extrato, indicando portanto, citotoxicidade e não o efeito da multiplicação do DENV-2 (figura 15). Tal observação foi corroborada nos experimentos para determinação da CC<sub>50</sub> de vários extratos de plantas, como por exemplo o extrato 13211, obtido de planta da família *Asteraceae*. Os ensaios de CE<sub>50</sub> deste extrato indicaram uma provável citotoxicidade na concentração de 25 µg/mL, o que foi confirmado pela CC<sub>50</sub> obtida, cujo valor foi de 21,95 µg/mL.

Uma perda significativa da atividade antiviral e de forma progressiva foi verificada em alguns extratos nos experimentos para determinação de  $CE_{50}$ . Para realização desses experimentos, os extratos foram fornecidos dissolvidos em solução de DMSO e em seguida foram congelados e descongelados algumas vezes para sua utilização em um próximo experimento. Alguns dos extratos foram testados em até 7 experimentos diferentes. Para alguns extratos que apresentaram boa atividade antiviral no primeiro experimento verificou-se a perda da atividade antiviral a partir do segundo experimento e assim sucessivamente. Uma possível explicação pode ser devido à inativação ou degradação do princípio ativo durante os sucessivos episódios de congelamento/descongelamento dos extratos, ou mesmo durante o tempo de armazenamento a  $-20^{\circ}C$ .

Dentre os 55 extratos vegetais que apresentaram atividade antiviral contra DENV-2, cinco extratos foram obtidos de plantas da família *Asteraceae*. Espécies dessa família já foram relatadas por apresentarem atividade antiviral contra HSV-2 resistente ao aciclovir e contra poliovírus tipo 2, e neste caso, a atividade antiviral foi atribuída ao composto isolado apigenina (Visintini Jaime *et al.*, 2013). Silveira e colaboradores (2009) atribuíram uma alta toxicidade a espécies dessa família devido a uma alta concentração de cumarinas. No nosso trabalho, embora alguns extratos dessa família tenham apresentado uma atividade antiviral em concentrações baixas, como por exemplo o extrato 11087, os demais extratos pertencentes a essa família, apresentaram indícios de citotoxicidade quando testados em baixas concentrações, como por exemplo o extrato 13211 que apresentou  $CC_{50} = 21,95 \mu g/mL$ .

No nosso estudo, nenhum dos extratos da família *Rubiaceae* foram testados para  $CC_{50}$ . No entanto, alguns apresentaram indícios de citotoxicidade e quase todos os extratos dessa família apresentaram  $CE_{50}$  em concentrações em torno de  $40 \mu g/mL$ , exceto o extrato 12860 que teve uma  $CE_{50}$  de  $18,06 \mu g/mL$ . Algumas espécies de plantas da família *Rubiaceae* já foram descritas por apresentarem atividade antiviral contra vírus aviários (Barros *et al.*, 2013) e vírus causadores de doenças em humanos, como o HSV-1 (Konigheim *et al.*, 2012) e também contra DENV-2 (Reis *et al.*, 2008). No caso da atividade antiviral contra DENV-2, esta foi possivelmente exercida por uma fração alcaloide da planta *Uncaria tomentosa*. Alcaloides de plantas podem ser potenciais candidatos para inibir a protease NS2B/NS3 de DENV-2, o que poderia inibir a replicação viral (Qamar *et al.*, 2014). Neste estudo, os extratos obtidos de plantas apresentaram atividade antiviral em

concentrações mais altas quando comparadas aos extratos obtidos de fungos e embora pareçam não ser tão promissores, ainda assim, merecem ser investigados quanto à substância ativa e também para determinação da  $CC_{50}$ .

Nove extratos identificados com potencial atividade antiviral contra DENV-2 foram obtidos de plantas da família *Sapindaceae*. Essa família compreende cerca de 1600 espécies, sendo que algumas já foram descritas por apresentarem atividade antiviral contra HSV-1 (Oliveira *et al.*, 2012) e HIV (Asres *et al.*, 2001). A  $CE_{50}$  do extrato 11046 dessa família foi apenas 0,87  $\mu\text{g/mL}$ , no entanto esse extrato apresentou indícios de citotoxicidade, exemplificado na figura 15, na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ . Outro extrato interessante foi o 11106 ( $CE_{50} = 0,78$  a 12,5  $\mu\text{g/mL}$ ), considerado promissor pela reprodutibilidade de proteção entre os diferentes experimentos e por conferir proteção acima de 75% do ECP viral em células BHK-21. Estes dois extratos ainda não foram testados para a determinação das suas respectivas  $CC_{50}$ . Três extratos ativos contra o DENV foram obtidos de plantas da família *Amaryllidaceae*. Estudos com plantas dessa família despertam grande interesse, sobretudo pelas potenciais atividades farmacológicas que os seus alcaloides apresentam. A licorina, um dos principais alcaloides produzidos por plantas dessa família, foi descrita como sendo a responsável pela inibição de ECP causado por vírus RNA (poliovírus) em concentrações tão baixas quanto 1  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto concentrações acima de 25  $\mu\text{g/mL}$  foram citotóxicas (Ieven *et al.*, 1982). Outro alcaloide conhecido dessa família, a pancratistatina, exibiu pronunciado efeito antiviral contra o vírus da encefalite japonesa, vírus da febre amarela e DENV (Gabrielsen *et al.*, 1992). Extratos de *Haemanthus albigiflos*, outra planta da família *Amaryllidaceae*, foram testados contra rotavírus e vírus da poliomielite e a atividade antiviral observada foi relacionada à presença de alcaloides como licorina e galantamina (Husson *et al.*, 1991). Verificou-se que a atividade antiviral destes alcaloides decorre da inibição da replicação viral e não pela inativação extracelular direta dos vírus (Renard-Nozaki, 1989). No nosso estudo, o extrato 13356, obtido também de planta pertencente à família *Amaryllidaceae*, foi o segundo extrato de planta menos citotóxico. Este extrato apresentou uma  $CC_{50}$  de 87,79  $\mu\text{g/mL}$ ,  $CE_{50}$  de 2,73  $\mu\text{g/mL}$ , apresentando um IS de 32,15, ou seja, tal extrato apresentou citotoxicidade em concentração 32 vezes maior do que a concentração necessária para proteger 50% da monocamada celular de BHK-21 infectada com DENV-2. Geralmente, considera-se que quanto maior for o valor de IS, razão entre  $CC_{50}$  e

CE<sub>50</sub>, melhor a atividade antiviral do extrato ou substância. O extrato 13358, também da família *Amaryllidaceae*, embora tenha apresentado CE<sub>50</sub> de 1,03 µg/mL, apresentou alta toxicidade, com CC<sub>50</sub> de 4,8 µg/mL. Aparentemente, extratos com CE<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub> muito próximas não são bons candidatos para isolamento de compostos antivirais já que a relação entre eficácia e toxicidade é de extrema relevância. Entretanto, vale ressaltar que mesmo os extratos considerados muito citotóxicos podem ser utilizados para isolamento da substância responsável pela atividade antiviral, uma vez que, a toxicidade não é necessariamente causada pela substância/composto com propriedades antivirais *per se* e sim por uma ou mais substâncias presentes no extrato bruto. Além disso, diferentes linhagens de células podem ser usadas nos ensaios antivirais, pois pode haver variação na forma de como os compostos de plantas e fungos agem em diferentes tipos celulares (Hudson, 1999).

O extrato menos tóxico encontrado foi o 11280, obtido de planta da família *Fabaceae*. Este extrato apresentou CC<sub>50</sub> de 159,7 µg/mL e CE<sub>50</sub> de 7,8 µg/mL, resultando em um IS de 20,47, o que pode ser considerado altamente promissor. Além disso, este extrato apresentou uma excelente reprodutibilidade entre diferentes experimentos e concordância entre as duas técnicas usadas. Ono e colaboradores (2003) estudaram a atividade antiviral da espécie *Mimosa scabrella*, da família *Fabaceae*, nativa da região sul do Brasil e conhecida por suas várias atividades farmacológicas, como antidiabética, anti-hepatotóxica e na cicatrização de feridas. Essa planta possui vários compostos bioativos, tais como hidratos de carbono, flavonoides, alcaloides e fenóis e apresentou atividade antiviral contra o DENV-1 e o vírus da febre amarela. A planta *Quercus lusitanica*, também da família *Fabaceae*, inibiu a replicação de DENV-2 e mostrou regulação negativa da expressão da proteína NS1 (DENV-2) que é essencial para a viabilidade do vírus (Muliawan *et al.*, 2006). Outro estudo sugeriu a castanospermina como um candidato promissor para o tratamento da dengue em seres humanos. A castanospermina é um alcaloide natural derivado da árvore *Castanospermum australe*, também da família *Fabaceae*. Esse alcaloide inibiu, *in vitro*, infecções por todos os sorotipos de DENV e ainda foi altamente eficaz em impedir a morte de camundongos tratados após serem infectados com DENV. Em células, a castanospermina atua como um inibidor I da alfa-glicosidase do retículo endoplasmático e reduz a infecção de vários vírus DNA e RNA envelopados, como DENV-1 (Courageot *et al.*, 2000), HIV-1 e HSV-1 (Bridges

*et al.*, 1994, 1995) e citomegalovírus humano (Yamashita *et al.*, 1996). Estudos sobre o mecanismo de ação da castanospermina sugerem que ela pode interromper o dobramento de algumas proteínas virais por impedir a remoção do resíduo terminal de glicose em glicanos N-ligados.

Até onde sabemos, não há descrição na literatura sobre atividade antiviral de fungos contra DENV-2. Dentre os extratos testados neste estudo, consideramos que os extratos de fungos apresentaram os resultados mais animadores, uma vez que em sua grande maioria, apresentaram  $CE_{50}$  baixa, sem indicação de citotoxicidade em concentrações mais altas como 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . Vinte extratos fúngicos apresentaram  $CE_{50}$  na faixa de 0,78 a 12,5  $\mu\text{g/mL}$  e sem indícios de citotoxicidade até na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Dos 27 extratos escolhidos por nós como mais promissores, a maioria foram obtidos de fungos. Alguns dos extratos de fungos testados neste projeto são provenientes de fungos endofíticos. Tais fungos são conhecidos por passar pelo menos parte de seu ciclo de vida dentro dos tecidos vegetais sem causar quaisquer sinais visíveis de infecção ou doença (Gwinn *et al.*, 1992; Tan & Zou, 2001). Estes fungos já foram encontrados habitando árvores, gramíneas, algas e plantas herbáceas, podendo viver em espaços intercelulares de caules de plantas, raízes e folhas (Petrini, 1986).

Recentemente, alguns programas de pesquisa de bioprospecção têm buscado fungos presentes em ambientes extremos e/ou inexplorados, como no deserto do Atacama, no Chile, habitat de várias espécies de fungos (Conley *et al.*, 2006; Ortiz *et al.*, 2014) e também em solos do continente Antártica, onde diversos grupos de fungos habitam esse ecossistema (Fell *et al.*, 2006). Isso representa uma estratégia interessante para encontrar novas vias metabólicas, bem como, novos componentes bioativos. Acredita-se que fungos extremófilos poderão ter desenvolvido vias metabólicas únicas ou incomuns para produzir novos compostos bioativos, que poderiam ser usados para desenvolver novas drogas e pesticidas, tendo várias aplicações.

Entre as dificuldades enfrentadas na execução deste trabalho e que provavelmente persistirá para a sua continuidade é a quantidade insuficiente dos extratos ativos para realização dos vários ensaios propostos. Quando utilizamos extratos obtidos de fungos recultivados, verificamos que a maioria deles não conferiram nenhuma proteção contra DENV-2. Provavelmente, a quantidade, composição e a complexidade de substâncias presentes nos fungos sejam



influenciadas por vários fatores, como condições climáticas, solo, contato com outras espécies, entre outras. As possíveis alternativas para este problema seriam recultivar os fungos em diferentes condições de cultivo, como por exemplo, a temperatura de incubação e composição do meio de cultura utilizado.

A identificação das substâncias presentes nos extratos que podem ser responsáveis pela atividade antiviral contra DENV-2 ainda não foi realizada pelo nosso grupo de pesquisa. Espera-se que tais substâncias possam ser isoladas e identificadas e que, futuramente, possam ser utilizadas para amenizar os sintomas da infecção pelo DENV ou até mesmo evitar a evolução para as formas mais graves da doença.

Os resultados deste trabalho fortalecem as evidências do quão é importante a pesquisa e descoberta de compostos biologicamente ativos encontrados em produtos naturais que inibam a multiplicação viral. Certamente, são necessários mais estudos para desvendar os mecanismos de ação, toxicidade e também a realização de ensaios *in vivo* e ensaios clínicos.

## 8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base nos resultados do presente estudo, conclui-se que extratos de plantas e de fungos são uma fonte rica de compostos com atividade antiviral. Os 115 extratos de plantas e fungos com atividade antiviral contra DENV-2 identificados neste trabalho merecem estudos mais aprofundados para identificação e caracterização das substâncias responsáveis pela inibição do efeito citopático de DENV-2 em células BHK-21.

Extratos de plantas e fungos depositados na extratoteca institucional da Fiocruz Minas, sobretudo aqueles com atividade antiviral identificados neste trabalho, também poderão ser caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) para identificação e isolamento de substâncias com atividade antiviral até então desconhecidas. Conseqüentemente, poderão ser realizados estudos sobre o mecanismo de ação de tais substâncias isoladas. Em médio prazo, a prospecção de agentes úteis no controle da infecção pelo DENV, poderá potencialmente gerar produtos úteis para o Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro, assim como pedidos de patentes.

Além disso, tais extratos/substâncias poderão ser testados em outros modelos de células infectadas com DENV-2 e demais sorotipos e em outros vírus da família *Flaviviridae*, de importância para a saúde pública, tais como o vírus da febre amarela, o vírus Zica, o vírus do Oeste do Nilo e o vírus da encefalite de Saint Louis. Ademais, tais substâncias com potencial antiviral poderão também ser usadas para um amplo espectro viral, como os vírus chikungunya, vaccínia e Bunyavirus, ampliando o impacto deste estudo.

De fato, a diversidade e complexidade de produtos naturais os tornam fontes de macromoléculas biológicas altamente selecionadas. Certamente, dentro deste universo há uma enorme possibilidade de descobertas e desenvolvimento de novos fármacos.

## 9 ANEXOS

### 9.1 Artigo 1

Extremophiles

DOI 10.1007/s00792-015-0741-6

ORIGINAL PAPER

## Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica

Valéria M. Godinho · Vivian N. Gonçalves · Iara F. Santiago · Hebert M. Figueredo · Gislaine A. Vitoreli · Carlos E. G. R. Schaefer · Emerson C. Barbosa · Jaqueline G. Oliveira · Tânia M. A. Alves · Carlos L. Zani · Policarpo A. S. Junior · Silvano M. F. Murta · Alvaro J. Romanha · Erna Geessien Kroon · Charles L. Cantrell · David E. Wedge · Stephen O. Duke · Abbas Ali · Carlos A. Rosa · Luiz H. Rosa

Received: 20 November 2014 / Accepted: 16 February 2015  
© Springer Japan 2015

**Abstract** We surveyed the diversity and capability of producing bioactive compounds from a cultivable fungal community isolated from oligotrophic soil of continental Antarctica. A total of 115 fungal isolates were obtained and identified in 11 taxa of *Aspergillus*, *Debaryomyces*, *Cladosporium*, *Pseudogymnoascus*, *Penicillium* and *Hypocreales*. The fungal community showed low diversity and richness, and high dominance indices. The extracts of *Aspergillus sydowii*, *Penicillium allii-sativi*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium rubens* possess antiviral, antibacterial, antifungal, antitumoral, herbicidal and antiprotozoal activities. Bioactive extracts were examined using  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and detected the presence of secondary metabolites with chemical shifts. Our results show that the fungi present in cold-oligotrophic soil from Antarctica included few dominant species, which may have important implications for

understanding eukaryotic survival in cold-arid oligotrophic soils. We hypothesize that detailed further investigations may provide a greater understanding of the evolution of Antarctic fungi and their relationships with other organisms described in that region. Additionally, different wild pristine bioactive fungal isolates found in continental Antarctic soil may represent a unique source to discover prototype molecules for use in drug and biopesticide discovery studies.

**Keywords** Antarctica · Drug discovery · Ecology · Fungi · Taxonomy

### Introduction

Antarctica has an area of approximately 4 million km<sup>2</sup> and is reported to be the most pristine environment on the planet. However, only approximately 2 % of the total Antarctic area is ice free and comprises extensive mountains, nunataks and coastal outcrops (Azmi and Seppelt 1998). In general, Antarctic soils represent extreme habitats for the colonization and survival of life. Among the biota present in Antarctica,

Communicated by A. Oren.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00792-015-0741-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

V. M. Godinho · V. N. Gonçalves · I. F. Santiago ·  
H. M. Figueredo · G. A. Vitoreli · E. G. Kroon · C. A. Rosa ·  
L. H. Rosa (✉)  
Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas  
Gerais, Belo Horizonte, MG CEP 31270-901, Brazil  
e-mail: lhrosa@icb.ufmg.br

C. E. G. R. Schaefer  
Departamento de Ciência do Solo, UFV, Viçosa, MG, Brazil

E. C. Barbosa · J. G. Oliveira · T. M. A. Alves · C. L. Zani ·  
P. A. S. Junior · S. M. F. Murta · A. J. Romanha  
Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte,  
MG, Brazil

A. J. Romanha  
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,  
UFSC, Florianópolis, SC, Brazil

C. L. Cantrell · D. E. Wedge · S. O. Duke  
USDA-ARS, Natural Products Utilization Research Unit,  
University, USA

A. Ali  
The University of Mississippi, NCNPR, University, USA

Published online: 26 March 2015

 Springer



the microbial life is represented by archaea, bacteria and cyanobacteria. Fungi are the most highly diverse group in the different Antarctic ecosystems, including the extremophile soils. According to Fell et al. (2006), the soils of the continental region within Antarctica offer an interesting opportunity to investigate the regional-to-global environmental effects of microbial webs on community structures.

The kingdom Fungi represents an important element within the microbial communities in Antarctica. Various species of fungi have been isolated from different habitats including freshwater, the marine environment, rocks, plant tissues, lakes, marine sediments and different types of soil. The mycobiota of Antarctica have typically included yeasts and filamentous fungi consisting of species in the phyla *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* and *Basidiomycota* (Ruisi et al. 2007). Additionally, fungi range in diversity across the latitudinal gradient in the sub-Antarctic islands, Antarctic Peninsula and continental Antarctic ecosystems. According to Rao et al. (2012), life in continental Antarctica is restricted to rare occurrences of some species of lichens, mosses, invertebrates and soil microbial communities. In continental Antarctica, fungi have been more often described in lichens symbioses; however, the occurrence of free-living fungi in soils remains poorly understood.

Fungal metabolic pathways are a rich source of bioactive compounds, including different classes of secondary molecules such as terpenoids, polyketides, alkaloids, polyacetylenes and others with different biological activities. Such molecules can be important prototype used to develop new drugs and pesticides. In recent years, the capability of different fungal communities across the Antarctic environments to produce compounds for use in biotechnological processes has been reported. However, few bioprospecting research programs have focused on the fungi present in unique and/or unexplored environments. Thus, the search for extremophile fungi in Antarctica may represent a useful strategy for finding new eukaryotic metabolic pathways and, consequently, new bioactive compounds (Santiago et al. 2012). For the reasons presented above, the aims of the present study were to characterize the diversity, richness, dominance and similarity of the fungal community present in the cold-arid oligotrophic soil of continental Antarctica region and to investigate the capability of these fungi to produce bioactive compounds with antimicrobial, antiviral, antitumor, antiprotozoal, herbicidal and insecticidal activities.

## Materials and methods

### Study area

Thirteen soil samples were collected in the Ellsworth Mountains (Supplementary Fig. 1) in the summer of 2011

from ice-free areas of the Union Glacier region in the southern Heritage Range. Samples of soil at 0–8 cm depth were collected using sterile scoops, placed in Whirl-Pak (Nasco, Ft. Atkinson, WI) bags and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until transported to the laboratory at the Federal University of Minas Gerais, where they were processed to isolate the fungi. The soil samples were studied by routine chemical analyses (pH, available P, exchangeable  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$  and  $\text{Al}^{3+}$ ) according to international standard protocols established by Kuo (1996) and EMBRAPA (1997). Total organic carbon was determined according to Yoemans and Bremner (1988).

### Fungal isolation

To isolate the fungal species from soil, 1 g of each sample was added to 9 ml of 0.85 % NaCl and 100  $\mu\text{L}$  of a  $10^{-1}$  dilution was inoculated onto YM (0.3 % yeast extract, 0.3 % malt extract, 0.5 % peptone, 2 % glucose, 2 % agar), MEA (1.5 % malt extract, 1.5 % glucose, 0.1 % peptone, 2 % agar), DG18 (Oxoid, USA) and DRBC (Oxoid, USA) media containing  $100\ \mu\text{g}\ \text{mL}^{-1}$  of chloramphenicol (Sigma) and incubated at  $5^{\circ}$ ,  $10^{\circ}$  and  $15 \pm 2^{\circ}\text{C}$  for 60 days. Fungal colony-forming units (CFUs) were counted, and subcultures were made of all of the morphologically distinct colonies from each sample. The subcultures were grouped into different morphotypes according to their cultural (colony color and texture, border type and radial growth rate) and micromorphological characteristics on YM agar. All fungal isolates were deposited in the Collection of Microorganisms and Cells of the Universidade Federal of Minas Gerais under code UFMGCB, which are available to be accessed by other scientists.

### Fungal identification

The protocol for DNA extraction from filamentous fungi followed Rosa et al. (2009). The internal transcribed spacer (ITS) region was amplified with the universal primers ITS1 and ITS4 (White et al. 1990). Amplification of the ITS region was performed as described by Rosa et al. (2009). Amplification of the  $\beta$ -tubulin (Glass and Donaldson 1995) and ribosomal polymerase B2 (Houbraken et al. 2012) genes were performed with the B2a/B2b and RPB2-5F-Pc/RPB2-7CR-Pc 7CR primers, respectively, according to protocols established by Godinho et al. (2013). Yeasts were characterized via standard methods and the taxonomic keys according to Kurtzman et al. (2011). Yeast identities were confirmed by sequencing the D1-D2 variable domains of the large subunit ribosomal RNA gene using the primers NL1 and NL4 (Lachance et al. 1999) and the ITS region using the primers ITS1 and ITS4 (White et al. 1990).

Representative consensus sequences of fungal taxa were deposited into Gen Bank (Supplementary Table 1). To achieve



species-rank identification based on ITS,  $\beta$ -tubulin data and ribosomal polymerase B2, the consensus sequence was aligned with all sequences from related species retrieved from the NCBI GenBank database using BLAST (Altschul et al. 1997). The criteria suggested by Godinho et al. (2013) were used to interpret BLAST results from the GenBank database. The phylogenetic analysis were conducted using MEGA Version 5.0 (Tamura et al. 2011). The maximum composite likelihood method was employed to estimate evolutionary distances with bootstrap values calculated from 1000 replicate runs. To complete the molecular identification, the sequences of known-type fungal strains or reference sequences obtained from fungal species deposited in international culture collections found in GenBank were added to improve the accuracy of the phylogenetic analysis. The information about fungal classification generally follows Kirk et al. (2008), MycoBank (<http://www.mycobank.org>) and Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>) databases.

#### Diversity, richness, dominance and distribution

To quantify species diversity, richness and dominance, we used Fisher's  $\alpha$ , Margalef's and Simpson's indices, respectively. The similarities among fungal taxa from different sites were estimated using the Bray–Curtis measure. All diversity and similarity indices were performed using the computer program PAST, version 1.90 (Hammer et al. 2001).

#### Fungal cultivation and preparation of extracts for biological assays

All fungal isolates were cultivated using solid-state fermentation according to protocols established by Rosa et al. (2013). Briefly, a 5-mm diameter plug of fungus was placed on 20 mL of YM medium at the center of 200 Petri dishes (90 mm diameter) and cultured for 15 days at  $10 \pm 2$  °C. These fungal cultures were lyophilized for 72 h, cut in small pieces and transferred to 50-mL glass centrifuge tubes followed by the addition of 50 mL of dichloromethane (DCM, Fisher, USA). After 72 h at room temperature, the organic phase was filtered and the solvent removed under rotary evaporation at 40 °C. An aliquot of each dried extract was dissolved in DMSO (Merck) to prepare a 100 mg mL<sup>-1</sup> stock solution, which was stored at -20 °C. Sterile YM medium was extracted using the same procedure. The sterile YM extract was used as the control in the screening procedure.

#### Assay for antimicrobial activity

Susceptibility testing against *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 6258 and *Cladosporium*

*sphaerospermum* CCT 1740 was performed using a protocol established by Carvalho et al. (2012). All extracts (dissolved in DMSO) were diluted to a final concentration of 250  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> for use in the antimicrobial assays. The results are expressed as the percent inhibition in relation to controls without drugs. All antimicrobial assays were performed in duplicate.

#### Assay with human cancer cell lines

The effect of crude extract on the survival and growth of the human cancer cell lines MCF-7 (breast) and TK-10 (renal) was determined using a colorimetric method developed at the National Cancer Institute, USA (Monks et al. 1991). All assays were run in triplicate wells and repeated at least once. All extracts (dissolved in DMSO) were diluted to a final concentration of 20  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> for use in the cytotoxic assays. Etoposide (16  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) and cancer cell lines without fungal extracts were used in parallel as positive and negative controls, respectively. The results are expressed as percentage of growth inhibition in comparison to the control without drug.

#### Assay with *Leishmania amazonensis*

In vitro assays with promastigote forms of *Leishmania amazonensis* were performed according to protocols established by Teixeira et al. (2002). The results are expressed as percent inhibition in relation to controls without drugs. All extracts (dissolved in DMSO) were diluted to a final concentration of 20  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> for use in the assay. Amphotericin B at 0.2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (Fungison® Bristol-Myers Squibb B, Brazil) was used as a positive drug control. All assays were performed in triplicate.

#### In vitro assays with intracellular amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*

In vitro assays with amastigote forms of *T. cruzi* were performed according to protocols established by Romanha et al. (2010). Each extract diluted in DMSO was tested in duplicate at 20  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Benznidazole at its IC<sub>50</sub> (1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) was used as positive control. The results were expressed as the percentage of growth inhibition.

#### Assays against *Dengue virus*

For antiviral activity assays against *Dengue virus* 2, monolayers of Baby Hamster Kidney 21 cells (BHK-21) grown in flat bottom, 96-well plates using Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5 % fetal bovine serum (FBS), 100 U mL<sup>-1</sup> penicillin, 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> streptomycin and 0.25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> amphotericin B, were



exposed to different concentrations of fungal extracts for 72 h in the presence of *Dengue virus 2*. Fungal extracts were provided as 2 mg mL<sup>-1</sup> in 10 % DMSO. Virus suspensions and extracts, at concentrations ranging from 100 to 0.78 mg mL<sup>-1</sup> were simultaneously added to the plates, in two replicates. Controls for cells (uninfected untreated cells), virus (infected untreated cells) in the presence or not of DMSO were run in parallel during each experiment. The antiviral activity was evaluated by grading system of the peculiar cytopathic effect (CPE) caused by *Dengue virus* observed by optic microscopy (Tang et al. 2012) followed by colorimetric assay using the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2 H-tetrazolium bromide (MTT/Sigma-USA) (Betancur-Galvis et al. 1999). The results are expressed as the percent of CPE inhibition in relation to controls without extracts. All antiviral assays were repeated at least three times.

#### Assay against fungal plant pathogens

The phytopathogens *Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea* were used as target species for the antifungal assay according to protocols established by Wedge and Kuhajek (1998) and Wedge et al. (2009). The extracts were diluted in DCM and assayed at 180 µg spot<sup>-1</sup>. Spots of the technical-grade fungicides benomyl, cyprodinil, azoxystrobin and captan (Chem Service, Inc. West Chester, Pennsylvania) at 2 µL (at 2 µM) diluted in ethanol were used as standard controls. All antifungal assays were performed in duplicate.

#### Herbicide assay

The herbicidal activities of fungal extracts were guided by *Lactuca sativa* (lettuce) and *Agrostis stolonifera* (bentgrass) bioassays according to Dayan et al. (2000). The fungal extracts (dissolved in acetone) were diluted to a final concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup>. Phytotoxicity was qualitatively evaluated by visually comparing the amount of germination of the seeds in each well with the untreated controls after 7 days. The qualitative estimate of phytotoxicity was evaluated by using a rating scale of 0–5, where 0 = no effect and 5 = no growth or no germination of the seeds. Each experiment was repeated in duplicate.

#### Mosquito larval bioassays

Larvae of *Aedes aegypti* L. used in these screening bioassays were hatched from the eggs obtained from a laboratory colony maintained at the Mosquito and Fly Research Unit at the Center for Medical, Agricultural and Veterinary Entomology, USDA-ARS, Gainesville, Florida. The eggs were hatched and the larvae were maintained at a temperature of

27 ± 2 °C and 60 ± 10 % RH in a photoperiod regimen of 12:12 h (L:D). Bioassays were conducted using the system described by Pridgeon et al. (2009) to determine the larvicidal activity of these compounds against *Ae. aegypti*. All extracts (dissolved in ethanol) were diluted to a final concentration of 125, 62.5 and 31.25 ppm.

#### NMR spectroscopy

Bioactive fungal extracts were analyzed by NMR spectroscopy on a Varian INOVA 600 MHz spectrometer (Palo Alto, CA). <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded in either CDCl<sub>3</sub> or MeOD. Samples were prepared at approximately 10 mg mL<sup>-1</sup> and analysis recorded in 3 mm NMR tubes using a standard <sup>1</sup>H NMR pulse program.

## Results

### Fungal taxonomy

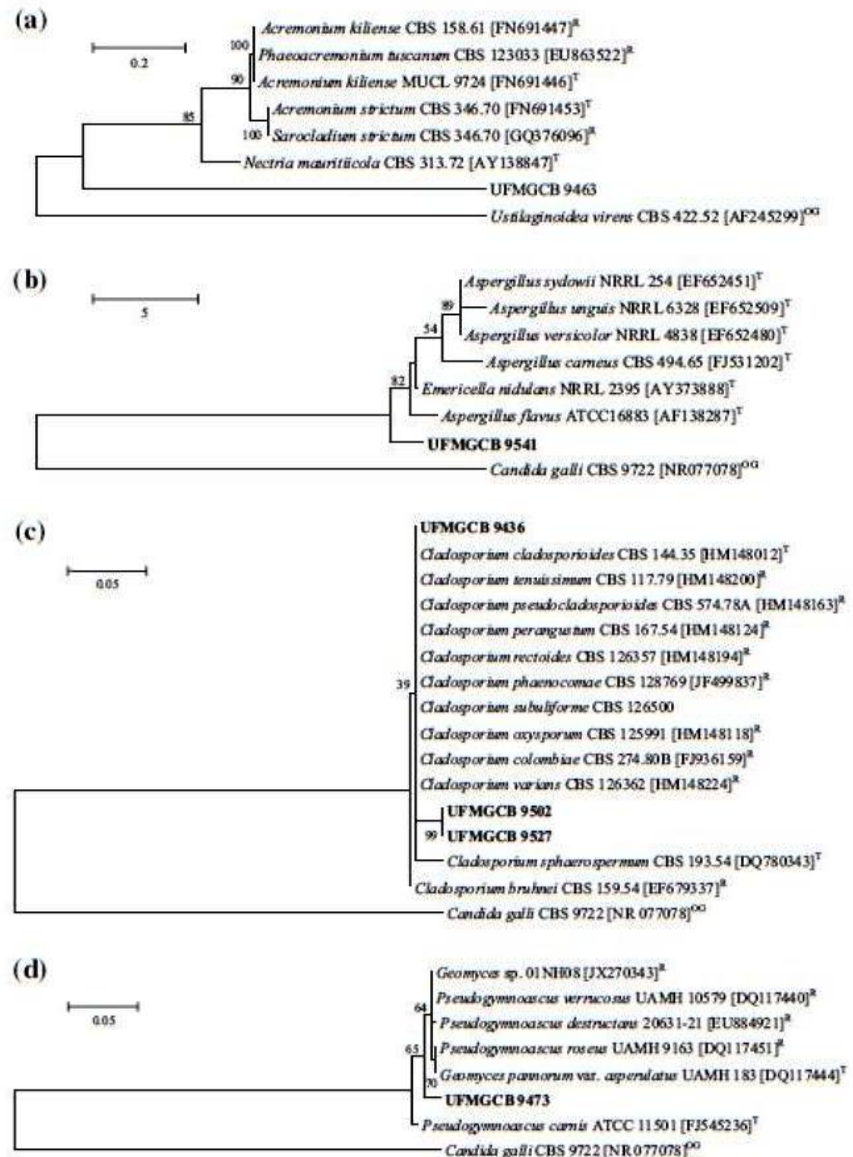
A total of 115 fungal isolates were recovered from eight soil samples collected in continental Antarctica. The fungal isolates were identified by molecular sequencing of the ITS, β-tubulin, ribosomal polymerase B2 and D1-D2 domains representing 11 taxa in the genera *Aspergillus*, *Debaryomyces*, *Cladosporium*, *Pseudogymnoascus*, *Penicillium* and one labeled as *Hypocreales* (Supplementary Table 1; Figs. 1, 2, 3). The taxa with the greatest densities were *Hypocreales* sp., *Penicillium brevicompactum*, and *Aspergillus sydowii*. In contrast, *Cladosporium* sp. 3, *Cladosporium* sp. 2 and *Debaryomyces hansenii* were rare components within the community. *Cladosporium* sp. 1, *Cladosporium* sp. 2, *Cladosporium* and sp. 3 (Figs. 1c, 2c), *Pseudogymnoascus* sp. (Fig. 1d) and *Hypocreales* sp. (Fig. 1a) presented low molecular identities and inconclusive information compared with known fungal sequences deposited in the GenBank database.

### Fungal diversity

In general, the fungal community showed low diversity (Fisher's α = 1.42) and richness (Margalef = 1.25) and high dominance (Simpson = 0.8) indices; however, the diversity indices varied according to the different sites (Supplementary Table 2). Sites ELL 11, ELL 7 and ELL 13 showed the highest Fisher's α and Margalef indices, respectively, which also displayed moderate concentrations of TOC. At the same time, site ELL 8 showed the highest TOC concentration, but displayed moderate Fisher's and Margalef indices. The fungal diversity in the sites did not appear to be related to any other parameters that were measured.



**Fig. 1** Phylogenetic analysis of the sequences of fungi (*in bold*) isolated from continental Antarctic soil compared with type (T) or reference (R) sequences of the closest species following BLAST analysis, deposited in the GenBank database. The trees were constructed based on the ITS region sequences using the maximum composite likelihood method. *OG* reference sequence used as out-group

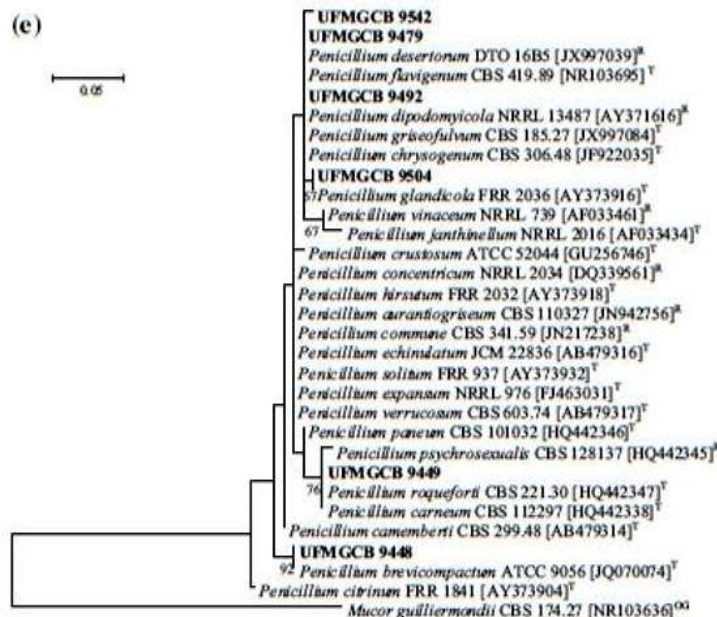


In addition to the low fungal diversity present in the cold-arid continental Antarctic soil, the Bray–Curtis similarity index (Supplementary Fig. 2) showed that the sites with the most similar species assemblages were ELL 12 and ELL 13, both with high concentrations of phosphorus.

The fungi isolated from the cold-arid soil of the Ellsworth Mountains in continental Antarctica showed a different temperature profile and type of culture media preference (Supplementary Table 3). The majority of the fungi grew at 10° and 15 °C. Only *Cladosporium* sp. 2 and *Cladosporium* sp. 3 grew at 5 °C and may exhibit a

psychrophilic physiology. Additionally, *P. chrysogenum*, *P. rubens*, *P. allii-sativi*, *P. brevicompactum*, *Cladosporium* sp. 1, *Cladosporium* sp. 3, *Pseudogymnoascus* sp. and *D. hansenii* were able to grow on DG18 medium, which might indicate physiological capabilities to survive in xerophilic conditions. Additionally, *Cladosporium* sp. 3, which may be a new species, was isolated on DG18 medium at 5 °C and may represent a species adapted to the cold-arid conditions of continental Antarctica. However, further physiological studies are needed to characterize the abilities of these fungi to survive in extreme cold and arid conditions.

Fig. 1 continued



## Bioprospection

Under the growth conditions we used, 17 fungal isolates produced compounds with biological activities against the targets screened (Supplementary Table 4) and (Table 1). Among them, the extracts of different isolates of *Aspergillus sydowii*, *Penicillium allii-sativi*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum* and *P. rubens* showed antibacterial, antifungal, antitumoral, antiprotozoal and herbicidal activities, which have equal or greater activity compared with the control drugs. Extracts from *P. allii-sativi*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, in particular, the *P. brevicompactum* (strain UFMGCB 9480) showed a broad high antiviral activity against *Dengue virus 2* and antiprotozoal activity against *T. cruzi*, the agent of the Chagas disease (both neglected tropical diseases), strong antifungal activity against the fungal plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*, as well as herbicidal activity. In contrast, the extracts of *P. brevicompactum* (strain UFMGCB 9478) and *P. chrysogenum* (strain UFMGCB 9438) had selective activities against *C. gloeosporioides*. No activity was observed for any extracts against *Aedes aegypti* larvae at the highest concentration of 125 ppm. Bioactive extracts were examined using <sup>1</sup>H NMR analysis to inspect for the presence of secondary metabolites with interesting chemical shifts (Fig. 4). In general, all of the extracts contained the presence of fatty acid functional groups, and most extracts contained signals indicative of the presence of triglycerides. More importantly, downfield <sup>1</sup>H NMR signals for nearly all

of the extracts indicated the presence of highly functionalized secondary metabolites due to the presence of protons in the aromatic and olefinic regions.

## Discussion

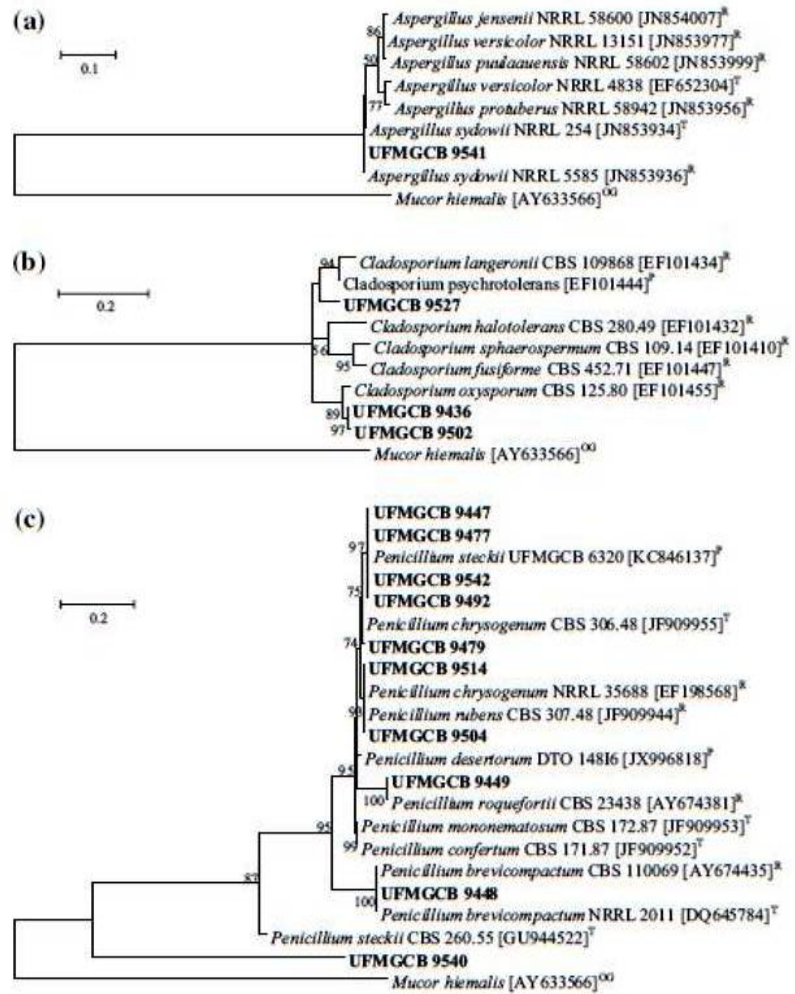
### Fungal taxonomy, distribution and diversity

In the present study, the soil samples were collected in the Heritage Range that forms the southern part of the Ellsworth Mountain system. The fungi isolated from the cold-arid oligotrophic soil of Heritage Range belongs to the classes *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Leotiomycetes*, *Saccharomycetes* and *Sordariomycetes*. According to Ruisi et al. (2007), *Ascomycota* in anamorphic stages is the most common fungal phylum found in Antarctica; these fungi seem to have given up sexual reproduction as a simplified means to conclude their life cycles in a shorter time without high metabolic costs. Most of the known Antarctic fungi are cosmopolitan, cold-tolerant species that have been selected by, or have adapted to, the prevailing low temperatures (Möller and Dreyfuss 1996).

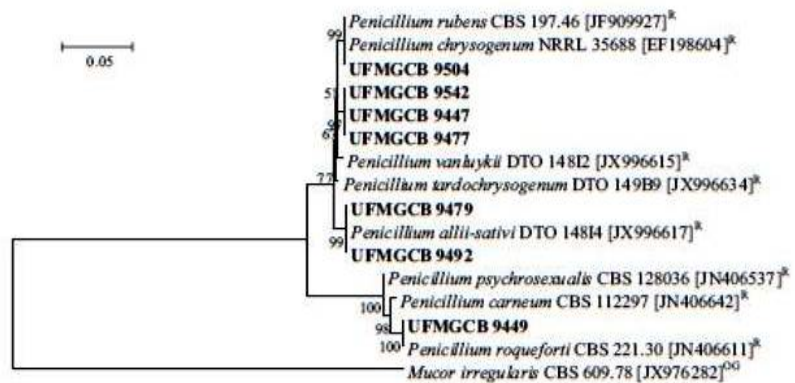
In our study, *Hypocreales* sp. (which might represent a new fungal species), *P. brevicompactum* and *A. sydowii* showed the highest densities and were the dominant species in the fungal community; the genus *Penicillium* also occurs predominantly in the cold-arid soil sampled. According to McRae et al. (1999), the genus *Penicillium* is cosmopolitan



**Fig. 2** Phylogenetic analysis of the  $\beta$ -tubulin sequences of the UFMGCB fungi (*in bold*) compared with type (T) or reference (R) sequences of the closest species following BLAST analysis, deposited in the GenBank database. The trees were constructed based on the  $\beta$ -tubulin gene sequences using the maximum composite likelihood method. *OG* reference sequence used as out-group



**Fig. 3** Phylogenetic analysis of the ribosomal polymerase B2 gene sequences of the *Penicillium* species (UFMGCB) *in bold* compared with reference (R) sequences of the closest species following BLAST analysis, deposited in the GenBank database. The tree was constructed based on the polymerase B2 gene sequences using the maximum composite likelihood method. *OG* reference sequence used as out-group



**Table 1** Phytopathogenic antifungal, herbicidal and activities of the extracts of fungal species from cold-arid oligotrophic soil of the continental Antarctica

Fungal species	UFMGCB	Targets to detect pesticides compounds						
		Phytopathogenic fungi <sup>a</sup>					Plants	
		<i>C. gloesporioides</i>	<i>C. fragariae</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>L. sativa</i>	<i>A. stolonifera</i>
<i>Aspergillus sydowii</i>	9541	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1	0
<i>Penicillium allii-sativi</i>	9451	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1	0
<i>P. allii-sativi</i>	9458	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	3	3
<i>P. allii-sativi</i>	9508	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0	0
<i>P. allii-sativi</i>	9509	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1	2
<i>P. allii-sativi</i>	9524	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	3	2
<i>Penicillium brevicompactum</i>	9446	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1	0
<i>P. brevicompactum</i>	9448	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1	0
<i>P. brevicompactum</i>	9478	<b>26 ± 2.7</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1	3
<i>P. brevicompactum</i>	9480	<b>25.8 ± 3</b>	<b>6 ± 0.5</b>	<b>4 ± 0.3</b>	0 ± 0	0 ± 0	2	4
<i>P. brevicompactum</i>	9538	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1	1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	9466	0 ± 0	<b>7 ± 0</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	3	3
<i>P. chrysogenum</i>	9470	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1	2
<i>P. chrysogenum</i>	9445	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1	0
<i>P. chrysogenum</i>	9534	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1	1
<i>P. chrysogenum</i>	9438	<b>24.3 ± 2.2</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1	4
<i>Penicillium rubens</i>	9496	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1	0
<b>Control drugs</b>	Benomyl	<b>20.5 ± 0.7</b>	<b>19.5 ± 0.7</b>	<b>14.5 ± 2.1</b>	–	<b>24 ± 1.4</b>	–	–
	Cypro	<b>22.5 ± 0.7</b>	<b>20 ± 0</b>	<b>11.5 ± 0.7</b>	–	–	–	–
	Cap	<b>19.5 ± 0.7</b>	<b>17.5 ± 0.7</b>	<b>15 ± 1.4</b>	<b>15.5 ± 0.7</b>	<b>24 ± 1.4</b>	–	–
	Azo	<b>29.5 ± 0.7</b>	–	<b>17 ± 1.4</b>	–	–	–	–

The bioactive extracts are in bold

<sup>a</sup> Mean inhibitory clear zones and standard errors were used to determine the level of antifungal activity against each fungal species; UFMGCB Culture of Microorganisms and Cells of the Universidade Federal de Minas Gerais. Technical-grade agrochemical fungicides, *Ben* benomyl, *Cypro* cyprodinil, *Cap* captan, *Azo* azoxystrobin with different modes of action were used at 2 µL (at 2 µM) as internal standards. – not assayed. Fungal targets: *C. gloesporioides*, *Colletotrichum gloesporioides*; *C. fragariae*, *Colletotrichum fragariae*; *C. acutatum*, *Colletotrichum acutatum*; *F. oxysporum*, *Fusarium oxysporum albicans*; *B. cinerea*, *Botrytis cinerea*. The qualitative estimate of phytotoxicity was evaluated by using a rating scale of 0–5, where 0 = no effect and 5 = no growth or no germination of the seeds. Plant targets: *L. sativa*, *Lactuca sativa* (lettuce); *A. stolonifera*, *Agrostis stolonifera* (bentgrass). Against the phytopathogens fungi, the extracts were assayed at 180 µg spot<sup>-1</sup>. For the herbicidal activity, the extracts were assayed and 1 mg mL<sup>-1</sup>.

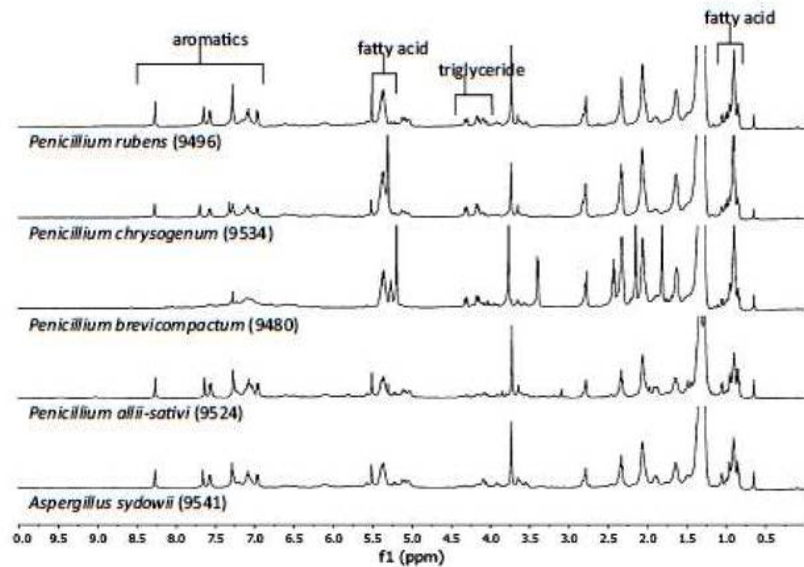
and found virtually everywhere from the tropics to the poles; however, its occurrence, diversity and frequency may be limited in some regions of the world (Pitt 1979). *Penicillium* has been described as the most common fungal genus in Antarctic ecosystems (McRae et al. 1999), as it is found in lakes (Gonçalves et al. 2012), soils (Azmi and Seppelt 1998), historic woodlands (Arenz et al. 2006), ice (D'Elia et al. 2009), macroalgal thalli (Loque et al. 2010) and marine sediments (Gonçalves et al. 2013). According to Corry (1987), most of the filamentous fungi found in areas distant from the marine coast are *Penicillium* species that are known to produce spores able to tolerate dry conditions. *Penicillium brevicompactum* is one of the most xerophilic penicillia and is resistant to ultraviolet radiation (Gehrke et al. 1995); it is known as an in vitro cellulose decomposer, and its ecological role may be mycophily and/

or mycoparasitism (Scott et al. 2008). Fletcher et al. (1985) demonstrated that *P. brevicompactum* was one of the taxa that was most often isolated from the soil of Enderby Land, Antarctica. *Aspergillus* is a cosmopolitan genus commonly isolated from soil and plant debris. In Antarctica, *Aspergillus* species were isolated from ornithogenic soil (Wicklow 1968). *Aspergillus sydowii* has a worldwide distribution and occurs in many substrates in indoor and outdoor environments, including soil (Klich 2002). In Antarctica, *A. sydowii* was isolated from the soil of the Ross Sea Region and Antarctic Peninsula (Arenz and Blanchette 2011).

*Penicillium chrysogenum* and *P. rubens* are very common panglobal species found in indoor environments, deserts, dried foods, salterns and cheese (Frisvad and Samson 2004). In Antarctica, *P. chrysogenum* was detected in different samples, including soil with plant populations,



**Fig. 4**  $^1\text{H}$  NMR spectrum (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ ) of representative crude extracts from each species of fungi. Labels indicate regions typically indicative of identifying protons for particular types of compounds



in ornithogenic soils (McRae et al. 1999) and was associated with macroalgae (Godinho et al. 2013). Zucconi et al. (2012) isolated *P. chrysogenum* as a dominant species present in permafrost in Antarctica. *Penicillium allii-sativi* was recently described as a new species isolated from garlic, soil, salterns, sorghum malt and mixed pig feed (Houbraken et al. 2012), and it has a broad distribution. This is the first report of *P. allii-sativi* in Antarctica.

Fletcher et al. (1985) suggested that the genus *Penicillium* has an extensive distribution in Antarctica, indicating that some species may play a role in decomposition processes in these ecosystems. The studies of Blok (1994) and Rudolph and Benninghoff (1977) indicate that *Penicillium* species are major decomposers and represent an important element of the terrestrial nutrient cycle in the harsh Antarctic environment where a limited range of other microbial taxa can tolerate the extreme climate. McRae et al. (1999) suggested that *Penicillium* populations isolated from Antarctica may be useful as biological indicators of anthropogenic contamination because they are common contaminants of human foods, fibers, fuels and building materials.

*Debaromyces hansenii*, an ascomycetous yeast and a known cryotolerant and halotolerant species associated with food spoilage (Kurtzman et al. 2011), was isolated from soil of the Ross Sea Region and Antarctic Peninsula (Arenz and Blanchette 2011). According to Rao et al. (2012), the yeasts found in Antarctica may emerge as a physiological group well adapted to Antarctic soils, although a systematic landscape-scale survey is needed to test this hypothesis.

According to Bensch et al. (2010), *Cladosporium* is one of the largest genera of dematiaceous hyphomycetes

with a worldwide distribution, which includes saprobic and parasitic species. However, some *Cladosporium* species are known only from specific hosts or have a restricted geographical distribution. *Cladosporium* has usually been associated with plants in Antarctica (Meyer et al. 1967), but was found as one of the dominant genera in the soil of Dry Valleys in Antarctica (Arenz et al. 2006).

*Pseudogymnoascus* species, typically and historically identified under the name *Geomyces*, have been frequently recorded in Antarctica with a ubiquitous distribution and from a number of substrates, including in the soils of cold regions (Mercantini et al. 1989), mosses (Tosi et al. 2002), leaves of *Colobanthus quitensis* (Rosa et al. 2010), thalli of macroalgae (Loque et al. 2010; Minnis and Lindner 2013; Furbino et al. 2014), freshwater lakes (Gonçalves et al. 2012) and the soil of the Ross Sea Region and Antarctic Peninsula (Arenz and Blanchette 2011). According to Lorch et al. (2013) and Minnis and Lindner (2013), the diversity of *Geomyces* and allies, including *Pseudogymnoascus* as revealed by DNA sequence data, is greater than previously recognized on the basis of traditional taxonomic methods.

An important aspect of the present study was the low diversity represented by few fungal genera found in the soil of the Heritage Range. This contrasts with the study of Fell et al. (2006), which found a complex community of symbionts, saprobes, predators and parasitic/pathogenic fungi in the Dry Valleys soils of Antarctica, a region considered to be among the world's most extreme environments. However, the physico-chemical characteristics of the Heritage Range seem to be more limiting to life compared with the Dry Valleys, especially regarding the amount of organic compounds and pH.



*Hypocreales* sp. UFMGCB 9463, the three *Cladosporium* species and *Pseudogymnoascus* sp. which showed low molecular identities with the sequences of the nearest species deposited in GenBank, have changes that represent endemic taxa. These fungi could represent unknown fungi or a known group of fungi whose sequences have not been submitted to GenBank, and additional phylogenetic and morpho-physiological taxonomic studies are necessary to confirm whether these fungi represent new fungal taxa. Future taxonomic studies will describe the potential new fungal species, in particular, the taxon *Pseudogymnoascus* sp. UFMGCB 9473, which showed genetic similarity with species able to kill bats in Europe and North America.

#### Bioprospection

According to Santiago et al. (2012), the ability of Antarctic fungi to survive in extreme conditions suggests that they may display unusual biochemical pathways that allow them to generate specific or new molecules that could be used as prototypes to develop new drugs. Our bioprospecting results show that the extracts from *Penicillium* and *Aspergillus* species present in the cold-arid oligotrophic soil of Antarctica are able to produce strong antiviral, antibacterial, antifungal, antitumoral, antiprotozoal, and herbicidal compounds.

*Aspergillus* and *Penicillium* species are well-known producers of many bioactive compounds, but few species found in Antarctica have been chemically investigated. *Aspergillus sydowii* isolated from the deep sea produced 4-dihydroxy-3,5,6-trimethylbenzaldehyde, a strong cytotoxic agent (Li et al. 2007). From extracts of *A. sydowii*, Ren et al. (2010) isolated cytotoxic hetero-spirocyclic  $\gamma$ -lactams, and Triswan et al. (2011) obtained a hydrogenated xanthon with antioxidant activity. *Penicillium allisativii* produces several secondary metabolites, including penicillins (Houbraken et al. 2012). *Penicillium brevicompactum* produces mycophenolic acid (MPA), one of the oldest known antibiotics (Danheiser et al. 1986). *Penicillium rubens* produces the polyketide compound chlortanspirone A that inhibits human leukemia HL-60 and a lung cancer cell line (Ireland et al. 2003).

In Antarctica, Brunati et al. (2009) found *Penicillium* species living in Antarctic lakes, and these species were able to produce cytotoxic and antimicrobial compounds. Among them, the extract of *P. chrysogenum* displayed selective antibacterial activity against *S. aureus*, *Enterococcus faecium* and *E. coli*, due to the presence of rugulosin and skyrin, two bioactive bis-antraquinones. The extract of *P. chrysogenum* recovered from the endemic Antarctic macroalga *Palmaria decipiens* yielded extracts with high and selective antifungal and/or trypanocidal activities (Godinho et al. 2013).

We also observed discrepancies among the bioactivities of different isolates of the same fungal species (*P. allisativii*, *P. brevicompactum* and *P. chrysogenum*). This result is not uncommon, as intra-specific genetic differences have already been observed for different fungal strains of the same species. In fact, distinct secondary metabolites can be produced by conspecific isolates in other fungi (Möller et al. 1996). This result indicates that the low inter-specific diversity of the fungal community present in the oligotrophic soil of continental Antarctica may be offset with a high intra-specific diversity of the different strains of the same species. Thus, if secondary metabolic diversity is of interest, it is important to keep different samples/isolates of the same species of extremophiles fungi in the culture collections.  $^1\text{H}$  NMR signals indicating the presence of highly functionalized secondary metabolites are promising. These results together with the previous reports on interesting compounds having been isolated from these species, support studies aimed at the isolation and identification of the active compounds from the most promising extracts disclosed in this research.

#### Conclusions

Despite the published studies about fungi from Antarctica, little information exists about their ecological roles (Bridge and Spooner 2012). According to Fell et al. (2006), the micro-eukaryotic webs in continental Antarctica may offer a unique opportunity to investigate the regional-to-global environmental effects on the community structures of microbial webs. Our results show that the fungal community present in the cold-arid oligotrophic soils of the Antarctic continent includes a few dominant species. These may represent cold-adapted taxa with biochemical capabilities for surviving in the extreme conditions of the isolated and undisturbed habitat in continental Antarctica. These dominant taxa may have important implications for understanding eukaryotic survival in cold-arid oligotrophic soils. We hypothesize that detailed investigations of fungal occurrence and frequency dynamics over time may provide a more comprehensive understanding about the evolution and relationships among the indigenous fungal species with other organisms, including prokaryotes, autotrophic organisms, nematodes and alien species described for the region. The characterization and monitoring of these unique fungal communities associated with changes in the physico-chemical characteristics of the cold-arid oligotrophic soils over time might serve as a model to study the effect of climate changes in continental Antarctica. In addition, the fungal isolates of the community demonstrated be source of bioactive compounds that may confer advantages during competition with dominant species and help the species survive in the pristine environmental conditions. These bioactive



fungi may represent a potential source of prototype molecules to use in drug and agrochemical discovery studies. Additionally, among the *Penicillium* species obtained from continental Antarctic soil, one was reported as producer of the beta-lactam antibiotic penicillin. Different wild, pristine bioactive isolates of *P. allii-sativi*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum* and *P. rubens* found in continental Antarctic soil may represent a unique source of new prototype molecules for drug and agrochemical discovery studies.

**Acknowledgments** We acknowledge the financial support from CNPq (Processes PROANTAR 407230/2013-0 and INCT Criosfera), FAPEMIG (0050-13), CAPES (23038.003478/2013-92), FINEP (208407), PDITS Fiocruz. The authors thank Solomon Green III and Robert D. Johnson for technical assistance.

**Conflict of interest** There is no conflict of interest among the authors.

## References

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W et al (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
- Arenz BE, Blanchette RA (2011) Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. *Soil Biol Biochem* 43:308–315
- Arenz BE, Held BW, Jurgens JA, Farrell RL, Blanchette RA (2006) Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biol Biochem* 38:3057–3064
- Azmi OR, Seppelt RD (1998) Fungi of the Windmill Islands, continental Antarctica. Effect of temperature, pH and culture media on the growth of selected microfungi. *Polar Biol* 18:128–134
- Bensch K, Groenewald JZ, Dijksterhuis J, Starink-Willemsse M, Andersen B, Summerell BA et al (2010) Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*). *Stud Mycol* 67:1–94
- Betancur-Galvis L, Sæz J, Granados H, Salazar A, Ossa J (1999) Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:531–535
- Block W (1994) Terrestrial ecosystems: Antarctica. *Polar Biol* 14:293–300
- Bridge PD, Spooner BM (2012) Non-lichenized Antarctic fungi: transient visitors or members of a cryptic ecosystem? *Fungal Ecol* 5:381–394
- Brunati M, Rojas JL, Sponga F, Ciciliato I, Losi D, Elke Göttlich E et al (2009) Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. *Marine Gen* 2:43–50
- Carvalho CR, Gonçalves VN, Pereira CB, Johann S, Galliza IV et al (2012) The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (*Fabaceae*) from the Brazilian savannah. *Symbiosis* 57:95–107
- Corry JEL (1987) Relationships of water activity to fungal growth. In: Benchant LR (ed) *Food and Beverage Mycology*. AVI Pub. Co., Philadelphia, pp 51–99
- Danheiser RL, Gee SK, Perez JJ (1986) Total synthesis of mycophenolic acid. *J Chem Soc* 108:806–810
- Dayan FE, Romagni JG, Duke SO (2000) Investigating the mode of action of natural phytotoxins. *J Chem Ecol* 26:2079–2094
- D'Elia T, Veerapaneni R, Theraisnathan V, Rogers SO (2009) Isolation of fungi from lake Vostok accretion ice. *Mycology* 101:751–763
- EMBRAPA (1997) *Manual de métodos de análise de solo*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Rio de Janeiro
- Fell JW, Scorzetti G, Connell L, Craig S (2006) Biodiversity of micro-eukaryotes in Antarctic Dry Valley soils with <5 % soil moisture. *Soil Biol Biochem* 38:3107–3119
- Fletcher LD, Kerry EJ, Weste GM (1985) Microfungi of Mac. Robertson and Enderby Lands Antarctica. *Polar Biol* 4:81–88
- Frisvad JC, Samson RA (2004) Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* a guide to identification of food and airborne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud Mycol* 49:1–174
- Furbino LE, Godinho VM, Santiago IF, Pellizzari FM, Alves TMA, Zani CL et al (2014) Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. *Microbial Ecol* 67:775–787
- Gehrke C, Johanson U, Callaghan TV, Chadwick D, Robinson CH (1995) The impact of enhanced ultraviolet-B radiation on litter quality and decomposition processes in *Vaccinium* leaves from the subarctic. *Oikos* 72:213–222
- Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 61:1323–1330
- Godinho VM, Furbino LE, Santiago IF, Pellizzari FM, Yokoya N et al (2013) Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *ISME J* 7:1434–1451
- Gonçalves VN, Vaz ABM, Rosa CA, Rosa LH (2012) Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol* 82:459–471
- Gonçalves VN, Campos LS, Melo IS, Pellizzari VH, Rosa CA, Rosa LH (2013) *Penicillium solitum*: a mesophilic, psychrotolerant fungus present in marine sediments from Antarctica. *Polar Biol* 36:1823–1831
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleont Electron* 4:1–9
- Houbraken J, Frisvad JC, Seifert KA, Overy DP, Tuthill DM, Valdez JG et al (2012) New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section *Chrysogena*. *Persoonia* 29:78–100
- Ireland C, Aalbersberg W, Andersen R, Ayzal-Kaloustian S, Berlink R, Beman V et al (2003) Anticancer agents from unique natural products sources. *Pharm Biol* 41:15–38
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008) *Dictionary of the Fungi*, 10th edn. CAB International, Wallingford
- Klich MA (2002) Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Netherlands
- Kuo S (1996) Phosphorus. In: Sparks DL, Page AL, Helmke PA, Loeppert RH, Soltanpour PN, Tabatabai MA, Summer CTME (eds.) *Methods of soil analysis: chemical methods*. Part 3. Soil Science Society of America: Madison, pp 869–919
- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (2011) *The yeast, a taxonomic study*, 5th edn. Elsevier, Amsterdam
- Lachance MA, Bowles JM, Starmer WT, Barker JS (1999) *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolenensis*, two new ascomycetous yeast species from Australian hibiscus flowers. *Can J Microbiol* 45:172–177
- Li DH, Cai SX, Li T, Lin ZJ, Zhu TJ, Fang YC et al (2007) Two new metabolites with cytotoxicities from deep-sea fungus, *Aspergillus sydowii* YH11-2. *Arch Pharm Res* 30:1051–1054
- Loque CP, Medeiros AO, Pellizzari FM, Oliveira EC, Rosa CA, Rosa LH (2010) Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. *Polar Biol* 33:641–648
- Lorch JM, Lindner DL, Gargas A, Muller LK, Minnis AM, Blehert DSA (2013) Culture-based survey of fungi in soil from bat



- hibernacula in the eastern United States and its implications for detection of *Geomyces destructans*, the causal agent of bat white-nose syndrome. *Mycology* 105:237–252
- McRae CF, Hocking AD, Seppelt RD (1999) *Penicillium* species from terrestrial habitats in the Windmill Islands, East Antarctica, including a new species, *Penicillium antarcticum*. *Polar Biol* 21:97–111
- Mercantini R, Marsella R, Cervellati MC (1989) Keratinophilic fungi isolated from Antarctic soil. *Mycopathologia* 106:47–52
- Meyer GH, Morrow MB, Wyss O (1967) Bacteria, fungi and other biota in the vicinity of Mirny Observatory. *Antarctic J US* 2:248–251
- Morris AM, Lindner DL (2013) Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. *Fungal Biol* 117:638–649
- Möller C, Dreyfuss MM (1996) Microfungi from Antarctic lichens, mosses and vascular plants. *Mycology* 88:922–933
- Möller C, Weber G, Dreyfuss MM (1996) Intraspecific diversity in the fungal species *Chaenopycnis alba*: implications for microbial screening programs. *J Ind Microbiol* 17:359–372
- Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K et al (1991) Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Nat Cancer Inst* 83:757–766
- Pitt JI (1979) The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London
- Pridgen JW, Beemel JJ, Clark GG, Linticum KJ (2009) A high-throughput screening method to identify potential pesticides for mosquito control. *J Med Entomol* 46:335–341
- Rao S, Chan Y, Lacap DC, Hyde KD, Pointing SB, Farrell RL (2012) Low-diversity fungal assemblage in an Antarctic Dry Valleys soil. *Polar Biol* 35:567–574
- Ren H, Liu R, Chen L, Zhu TJ, Zhu WM, Gu QQ (2010) Two new hetero-spirocyclic  $\gamma$ -lactam derivatives from marine sediment-derived fungus *Aspergillus sydowii* D 2-6. *Arch Pharm Res* 33:499–502
- Romanha AJ, de Castro SL, Soeiro MNC, Lannes-Vieira J, Ribeiro I et al (2010) *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105:233–238
- Rosa LH, Vaz ABM, Caligiorno RB, Campolina S, Rosa CA (2009) Endophytic fungi associated with the Antarctic Grass *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*). *Polar Biol* 32:161–167
- Rosa LH, Vieira MLA, Santiago IF, Rosa CA (2010) Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*) in Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol* 73:178–189
- Rosa LH, Queiroz SCN, Moraes RM, Wang X, Tehen N, Pan Z et al (2013) *Coniochaeta lignaria*: antifungal activity of the cryptic endophytic fungus associated with autotrophic tissue cultures of the medicinal plant *Smallanthus sonchifolius* (*Asteraceae*). *Symbiosis* 60:133–142
- Rudolph ED, Benninghoff WS (1977) Competitive and adaptive responses of invading versus indigenous biotas in Antarctica  $\pm$  a plea for organized monitoring. In: Llano GA (ed) *Adaptations within Antarctic ecosystems*. Smithsonian Institution, Washington, pp 1211–1225
- Ruisi S, Barreca D, Selbmann L, Zucconi L, Onofri S (2007) Fungi in Antarctica. *Rev Environ Sci Biotechnol* 6:127–141
- Santiago IF, Alves TMA, Rabello A, Sales-Júnior PA, Romanha AJ, Zani CL et al (2012) Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Extremophiles* 16:95–103
- Scott JA, Wong B, Summerbell RC, Untereiner WA (2008) A survey of *Penicillium brevicompactum* and *P. bialowiezense* from indoor environments, with commentary on the taxonomy of the *P. brevicompactum* group. *Can J Bot* 86:732–741
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739
- Tang LI, Ling AP, Koh RY, Chye SM, Voon KG (2012) Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. *BMC Complement Altern Med* 12:3
- Teixeira MC, Jesus SR, Sampaio RB, Pontes CL, Santos WL (2002) A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitol Res* 88:963–968
- Tosi S, Casado B, Gerdol R, Caretta G (2002) Fungi isolated from Antarctic mosses. *Polar Biol* 25:262–268
- Trisuwana K, Rukachaisirikul V, Kaewpet M, Phongpaichit S, Hutadilok-Towatana N, Freedanon S et al (2011) Sesquiterpene and xanthone derivatives from the sea fan-derived fungus *Aspergillus sydowii* PSU-F154. *J Nat Prod* 74:1663–1667
- Wedge DE, Kuhajek JM (1998) A microbioassay for fungicide discovery. *SAAS Bull Biochem and Biotechnol* 11:1–7
- Wedge DE, Klun JA, Tabanca N, Demirci B, Ozek T, Baser KHC et al (2009) Bioactivity-guided fractionation and GC-MS fingerprinting of *Angelica sinensis* and *A. archangelica* root components for antifungal and mosquito deterrent activity. *J Agric Food Chem* 57:464–470
- White TJ, Bruns TD, Lee SB (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis NA, Gelfand J, Sninsky J et al (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp 315–322
- Wicklow DT (1968) *Aspergillus fumigatus* fresenius isolated from ornithogenic soil collected at Hallett station, Antarctica. *Can J Microbiol* 14:717–719
- Yoemans JC, Bremner JM (1988) A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. *Comm Soil Sci Plant Anal* 19:1467–1476
- Zucconi L, Selbmann L, Buzzini P, Turchetti B, Guglielmin M et al (2012) Searching for eukaryotic life preserved in Antarctic permafrost. *Polar Biol* 35:749–757



## Fungi associated with rocks of the Atacama Desert: taxonomy, distribution, diversity, ecology and bioprospection for bioactive compounds

Vivian N. Gonçalves,<sup>1</sup> Charles L. Cantrell,<sup>2</sup> David E. Wedge,<sup>2</sup> Mariana C. Ferreira,<sup>1</sup> Marco Aurélio Soares,<sup>1</sup> Melissa R. Jacob,<sup>3</sup> Fabio S. Oliveira,<sup>4</sup> Douglas Galante,<sup>5</sup> Fabio Rodrigues,<sup>6</sup> Tânia M. A. Alves,<sup>7</sup> Carlos L. Zani,<sup>7</sup> Policarpo A. S. Junior,<sup>7</sup> Silvana Murta,<sup>7</sup> Alvaro J. Romanha,<sup>7,8</sup> Emerson C. Barbosa,<sup>7</sup> Ema G. Kroon,<sup>1</sup> Jaqueline G. Oliveira,<sup>7</sup> Benito Gomez-Silva,<sup>9</sup> Alexandra Galetovic,<sup>9</sup> Carlos A. Rosa<sup>1</sup> and Luiz H. Rosa<sup>1\*</sup>

Departamento de <sup>1</sup>Microbiologia and

<sup>4</sup>Geografia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>2</sup>United States Department of Agriculture, Natural Products Utilization Research Unit, USDA-ARS, Oxford, MS, USA

<sup>3</sup>National Center for Natural Products Research, The University of Mississippi, Oxford, MS, USA

<sup>5</sup>Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, SP, Brazil

<sup>6</sup>Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>7</sup>Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ-MG, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>8</sup>Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>9</sup>Biomedical Department and Centre for Biotechnology and Bioengineering (CeBiB), Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile

### Summary

**This study assessed the diversity of cultivable rock-associated fungi from Atacama Desert. A total of 81 fungal isolates obtained were identified as 29 Ascomycota taxa by sequencing different regions of DNA. *Cladosporium halotolerans*, *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium cf. citrinum* were the most frequent species, which occur at least in four**

different altitudes. The diversity and similarity indices ranged in the fungal communities across the latitudinal gradient. The Fisher- $\alpha$  index displayed the higher values for the fungal communities obtained from the siltstone and fine matrix of pyroclastic rocks with finer grain size, which are more degraded. A total of 23 fungal extracts displayed activity against the different targets screened. The extract of *P. chrysogenum* afforded the compounds  $\alpha$ -linolenic acid and ergosterol endoperoxide, which were active against *Cryptococcus neoformans* and methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* respectively. Our study represents the first report of a new habitat of fungi associated with rocks of the Atacama Desert and indicated the presence of interesting fungal community, including species related with saprobes, parasite/pathogen and mycotoxigenic taxa. The geological characteristics of the rocks, associated with the presence of rich resident/resilient fungal communities suggests that the rocks may provide a favourable microenvironment fungal colonization, survival and dispersal in extreme conditions.

### Introduction

The Atacama Desert, located between 17° and 27°S latitude in northern Chile, has been considered to be the oldest hyper-arid desert on Earth, where average annual rains of less than 2 mm is not unusual (Azua-Bustos *et al.*, 2012). Some regions of the Atacama Desert have no rainfall for years (Conley *et al.*, 2006) and its sedimentary records suggest that the semi-arid to hyper-arid climates have origins from the Jurassic period to the present day (Hartley *et al.*, 2005; Clarke, 2006). These extreme environmental characteristics make the Atacama Desert an ideal field laboratory for studies about life in the extreme of conditions.

During recent years some studies have tried to characterize the microbial life living in the Atacama Desert, which reported the presence of bacteria and cyanobacteria (Navarro-González *et al.*, 2003; Warren-Rhodes *et al.*, 2006; Gómez-Silva, 2010; Crits-Christoph *et al.*, 2013), and fungi (Conley *et al.*, 2006; Gómez-Silva, 2010; Ortiz *et al.*, 2014). Species of Ascomycota and Basidiomycota are among the fungal groups found in the Atacama Desert

Received 10 February, 2015; revised 21 July, 2015; accepted 23 July, 2015. \*For correspondence. E-mail lhrosa@icb.ufmg.br; Tel. (+55) 31 3409 2749; Fax (+55) 31 3409 2730.

© 2015 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd



(Conley *et al.*, 2006; Ortiz *et al.*, 2014), were described as spore-forming saprobe taxa dispersed by the wind.

Fungi are highly adapted to their habitat and able to survive in harsh environments including extreme temperatures, prolonged desiccation and high solar irradiation by changing their physiology and morphology, and via the production of macromolecules (enzymes, melanin and micospoines) and micromolecules (secondary metabolites). Among the fungi groups, the rock-inhabiting fungi (RIF) have been studied because of their capacity to survive on rock surfaces, which are unique habitats where rapid changes in the radiation, temperature, water and nutrients represent a challenge to microbial survival in different environments throughout the world (Gueidan *et al.*, 2008). According to Ruibal and colleagues (2009), RIF include specific species in the asexual states, small colony and compact form, presence of melanin, which occur in hot and cold deserts and others temperate ecosystems of the planet.

Additionally, different fungal species have been used as an important source of bioactive metabolites, most of them considered important prototype molecules used in the development of new drugs. Still in the beginning, some bioprospecting research programmes have begun sourcing fungi present in extreme environments, including RIF taxa, which represent an interesting strategy for finding new metabolic pathways and ultimately new bioactive constituents. In the present mycological study, we focused on the taxonomy, diversity, community structure, ecology, phylogenetic inferences and bioprospecting of bioactive compounds of fungi associated with rocks across the latitudinal gradient in the Atacama Desert, Chile.

## Results

After the analysis of rock samples from eight different altitudes, 81 fungal isolates were recovered, 29 were identified as *Ascomycota* species of the genera *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Cochliobolus*, *Devriesia*, *Eupenicillium*, *Fusarium*, *Pseudogymnoascus*, *Hypoxylon*, *Macroventuria*, *Neosartorya* and *Penicillium* using molecular techniques (Table 1; Figs S3, S4 and S5). These *Ascomycota* taxa are included in the classes *Dothideomycetes*, *Sordariomycetes*, *Eurotiomycetes* and *Leotiomycetes*. A total of eight taxa were identified to genus, family or phylum level, which displayed low-sequence similarity with sequences of different regions of rRNA deposited in the GenBank and may represent new species. The fungal colony density present in the rock samples ranged from 100 to > 300 colony-forming units per gram (CFU g<sup>-1</sup>). *Cladosporium halotolerans*, *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium citrinum* were the most frequent, which occur at a minimum of four altitudes and displayed the highest total CFU g<sup>-1</sup> (Table S1).

Petrographic analyses revealed the presence of siltstone, pyroclastic rock and granodiorite. The macro- and microscopic aspects of three rocks are shown in Fig. S1 and its chemical composition in Table S2. Siltstone has light colours that are whitish to yellowish-red (Fig. S1I). Fractures are common and occur in parallel and perpendicular orientation (Fig. S1C). Microscopically, the minerals are angular and do not have homogeneous texture (Fig. S1A, B). The main minerals are quartz, sericite, muscovite and plagioclase. The minerals are changed, including bays and alveoli (Fig. S1D). Siltstone is mainly composed of SiO<sub>2</sub> and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> content has a relationship with the widespread iron associated with the fractures.

Pyroclastic rock was associated with the expelled material during violent volcanic activity (Le Maitre *et al.*, 1989). In this rock, angular and poorly selected minerals were recognized (Fig. S1II, E, F). The matrix of pyroclastic rocks was oriented, indicated that rock may have been formed by pumice-flow (Fig. S1H) and classified as ignimbrite (Pimentel, 1976). Microscopically, angular phenocrysts of plagioclase was observed with zoning features (Fig. S1E, F). There was also the presence of phlogopite phenocrysts, microcline and magnetite. Chemically, the pyroclastic rocks have acidic to intermediate composition with high SiO<sub>2</sub> content. Samples collected at lower altitudes (2600 m.a.s.l.) were strongly cemented by calcium (Fig. S1III), suggesting weathering with new calcite precipitation, forming a microcrystalline Ca-matrix (Fig. S1G). Some samples located at higher altitudes (4519 and 5047 m.a.s.l.) showed specific degraded zones in the matrix, with reddish septas associated with biological structures (Fig. S1I, J). Scanning electron microscope (SEM) images confirm these observations and emphasized the presence of mineral dissolving microsites (Fig. S2). Such structures may signify the presence of fungi degrading the mineral matrix (Gadd, 2007).

The granodiorite is characterized as a holocrystalline, inequigranular and medium to coarse-grained mesocratic rock (Fig. S1IV). Microscopically, the granodiorite has equigranular texture, i.e., mainly composed by crystals of similar orders of magnitude to one another. The contact between the crystals is irregular (Fig. S1K, L). The main minerals identified were quartz, plagioclase, biotite, K-feldspar (microcline) and hornblende. Magnetite, apatite and zircon are present as accessory minerals. Chemically, the rocks had high content of SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CaO and MgO. The silica content confirms the presence of intermediate magma, similar to that associated with pyroclastic rocks.

Distribution and density of fungal taxa ranged across the altitude but the majority of fungal taxa were found in rocks present at one or two different altitudes. The diversity, richness and dominance ranged in the fungal communities across the altitudinal gradient; in general the diversity



**Table 1.** Fungal taxa obtained from rocks of Atacama Desert and identified by sequence comparison with the BLASTN match with the NCBI GenBank database.

UFMGCB <sup>a</sup>	Top BLAST search results (GenBank accession number)	Query cover (%)	Identity (%)	N <sup>o</sup> of bp analysed	Proposed taxa <sup>a</sup> (GenBank acc. n <sup>o</sup> )
8012 <sup>b</sup>	<i>Alternaria arborescens</i> (KJ609138)	100	100	484	<sup>b</sup> <i>Alternaria</i> sp. 1 (KP973594 <sup>1</sup> )
8018 <sup>b</sup>	<i>Alternaria alternata</i> (KJ605840)	100	100	462	<sup>b</sup> <i>Alternaria</i> cf. <i>arborescens</i> (KP973595 <sup>1</sup> )
8013 <sup>b</sup>	<i>Alternaria alternata</i> (KF051239)	100	99	488	<sup>b</sup> <i>Alternaria</i> sp. 2 (KP973596 <sup>1</sup> )
8088 <sup>b</sup>	Uncultured fungus (GU054203)	100	97	587	<sup>b</sup> <i>Ascomycoata</i> sp. (KP973597 <sup>1</sup> )
8035 <sup>b,c</sup>	<i>Aspergillus aff. fumigatus</i> (JN246062)	99	100	594	<sup>b,c</sup> <i>Aspergillus lentulus</i> (KP973598 <sup>1</sup> , KT253231 <sup>9</sup> )
8046 <sup>b,c</sup>	<i>Aspergillus sclerotiorum</i> (AY373866)	100	99	498	<sup>b,c</sup> <i>Aspergillus persii</i> (KP973599 <sup>1</sup> , KT253228 <sup>9</sup> )
8058 <sup>b,c</sup>	<i>Aspergillus sydowii</i> (AY373869)	100	99	516	<sup>b,c</sup> <i>Aspergillus sydowii</i> (KP973600 <sup>1</sup> , KT253232 <sup>9</sup> )
8047 <sup>b,c</sup>	<i>Aspergillus westerdijkiae</i> (FM986325)	100	98	536	<sup>b,c</sup> <i>Aspergillus westerdijkiae</i> (KP973601 <sup>1</sup> , KT253229 <sup>9</sup> )
8029 <sup>b</sup>	<i>Aspergillus cristatus</i> (KF923732)	99	98	505	<sup>b,c</sup> <i>Aspergillus</i> sp. (KP973602 <sup>1</sup> , KT319054 <sup>9</sup> )
8025 <sup>b,c</sup>	<i>Aspergillus felis</i> (KF558318)	100	99	546	<sup>b,c</sup> <i>Aspergillus felis</i> (KP973603 <sup>1</sup> , KT253230 <sup>9</sup> )
8042 <sup>b,c</sup>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (KJ658295)	100	99	443	<sup>b,c</sup> <i>Cladosporium haloblerans</i> (KP973604 <sup>1</sup> , KT253236 <sup>9</sup> )
8017 <sup>b,c</sup>	<i>Cladosporium bruhnei</i> (KC461496)	100	99	473	<sup>b,c</sup> <i>Cladosporium</i> cf. <i>cladosporioides</i> (KP973605 <sup>1</sup> , KT253235 <sup>9</sup> )
8085 <sup>b</sup>	<i>Cladosporium flabelliforme</i> (KJ439170)	100	99	483	<sup>b</sup> <i>Cladosporium</i> cf. <i>myrtacearum</i> (KP973606 <sup>1</sup> )
8048 <sup>b,c</sup>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (JN033465)	99	99	500	<sup>b,c</sup> <i>Cladosporium</i> cf. <i>gossypicola</i> (KP973607 <sup>1</sup> , KT253234 <sup>9</sup> )
8028 <sup>b,c</sup>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (KJ598781)	100	99	493	<sup>b,c</sup> <i>Cladosporium oxysporum</i> (KP973608 <sup>1</sup> , KT253233 <sup>9</sup> )
8072 <sup>b</sup>	<i>Cochliobolus lunatus</i> (JQ885447)	100	99	522	<sup>b</sup> <i>Cochliobolus lunatus</i> (KP973609 <sup>1</sup> )
8061 <sup>b</sup>	<i>Devriesia xanthorrhoeae</i> (HQ599605)	100	92	570	<sup>b</sup> <i>Devriesia</i> sp. (KP973610 <sup>1</sup> )
8044 <sup>b</sup>	<sup>b</sup> <i>Didymella</i> sp. (KC871035)	100	99	527	<sup>b</sup> <i>Didymella</i> sp. (KP973611 <sup>1</sup> )
8027 <sup>b,c</sup>	<i>Eupenicillium javanicum</i> (KF313084)	100	99	561	<sup>b,c</sup> <i>Eupenicillium javanicum</i> (KP973612 <sup>1</sup> , KT253240 <sup>9</sup> )
8023 <sup>b</sup>	<i>Fusarium oxysporum</i> (GU205817)	100	100	484	<sup>b</sup> <i>Fusarium oxysporum</i> (KP973613 <sup>1</sup> )
8020 <sup>b</sup>	<i>Hypoxyton</i> sp. (HM752513)	98	97	502	<sup>b</sup> <i>Hypoxyton</i> cf. <i>trugodes</i> (KP973615 <sup>1</sup> )
8050 <sup>b</sup>	<i>Phoma multirostrata</i> (KJ767077)	100	99	424	<sup>b</sup> <i>Macroventuria</i> cf. <i>anomachaeta</i> (KP973622 <sup>1</sup> )
8079 <sup>b,c</sup>	<i>Neosartorya udagawae</i> (HQ263363)	100	100	582	<sup>b,c</sup> <i>Neosartorya</i> cf. <i>udagawae</i> (KP973616 <sup>1</sup> , KT253239 <sup>9</sup> )
8069 <sup>b,c</sup>	<i>Neosartorya glabra</i> (EF669938)	100	99	502	<sup>b,c</sup> <i>Neosartorya</i> sp. 1 (KP973617 <sup>1</sup> , KT253237 <sup>9</sup> )
8069 <sup>b,c</sup>	<i>Neosartorya hiratsukae</i> (FR837959)	100	99	523	<sup>b,c</sup> <i>Neosartorya</i> sp. 2 (KP973618 <sup>1</sup> , KT253238 <sup>9</sup> )
8045 <sup>b,c,d</sup>	<i>Penicillium chrysogenum</i> (KJ413370)	100	100	627	<sup>b,c,d</sup> <i>Penicillium chrysogenum</i> (KP973619 <sup>1</sup> , KT253242 <sup>9</sup> , KT253243 <sup>9</sup> )
8090 <sup>b,c,d</sup>	<i>Penicillium citrinum</i> (KJ606689)	100	100	609	<sup>b,c,d</sup> <i>Penicillium</i> cf. <i>citrinum</i> (KP973620 <sup>1</sup> , KT253241 <sup>9</sup> , KT253244 <sup>9</sup> )
8039 <sup>b,c</sup>	<i>Penicillium ochrochloron</i> (KF358720)	100	99	663	<sup>b,c</sup> <i>Penicillium</i> cf. <i>pulvillum</i> (KP973621 <sup>1</sup> , KT253227 <sup>9</sup> )
8082 <sup>b</sup>	<i>Geomyces pannorum</i> (HQ115661)	100	99	638	<sup>b</sup> <i>Pseudogymnoascus</i> cf. <i>pannorum</i> (KP973614 <sup>1</sup> )

a. UFMGCB = Culture Collection of Microorganisms and Cells from the Federal Universidade de Minas Gerais. Taxa subjected to phylogenetic analysis based on the b. ITS, c.  $\beta$ -tubulin and d. Polymerase II regions for elucidation of taxonomic positions. e. Taxonomic position suggested by the phylogenetic analyses according to <sup>b</sup>ITS, <sup>c</sup> $\beta$ -tubulin, and/or <sup>d</sup>Polymerase II. f. ITS, g.  $\beta$ -tubulin, and h. Polymerase II sequences deposited in GenBank database.

(Fisher's  $\alpha$ ), richness (Margalefs) and dominance (Simpson's) indices showed intermediate values (Table S2). The highest values of diversity, richness and dominance indices occurred at 3003–3981 m.a.s.l. and the lowest diversity indices were found at 2602 m.a.s.l. Despite the highest altitude sampled, *Cladosporium* cf. *gossypicola*, *Macroventuria* cf. *anomachaeta*, *P. chrysogenum* and *P. cf. citrinum* were obtained at 5047 m.a.s.l. Only *Pseudogymnoascus* cf. *pannorum* was isolated at 4342 m.a.s.l. Figure 1 shows the Sorensen and Bray–Curtis coefficient comparisons among the fungal assemblages associated with rocks at different altitudes. The Sorensen index indicated that the most similar assemblages were found between 3003 and 5047 m.a.s.l.; in contrast, the altitude of 4342 m.a.s.l. displayed the lowest similarity comparison with the other seven sites. The Bray–Curtis index demonstrated that altitudes that had the most similar species assemblages were the 746 and 3003 m.a.s.l., followed by 4519 and 5047 m.a.s.l.

Among all fungal extracts screened, 23 displayed at least one biological activity above 70% inhibition against the different targets (Table 2). Extracts of *Alternaria* cf. *arborescens* UFMGCB 8018 and *P. chrysogenum* UFMGCB 8074 displayed antimicrobial activities and inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* respectively. A total of 20 fungal extracts displayed cytotoxic activity against MCF-7 tumor cells; among them, extracts of *Aspergillus felis* UFMGCB 8025, 8011 and 8019 showed the highest activities (inhibition >90%). Five extracts from *Fusarium oxysporum*, *Hypoxyton* cf. *trugodes* and *P. chrysogenum* were able to inhibit the amastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with values equal or next to the benzimidazole control. The extract *Hypoxyton* cf. *trugodes* UFMGCB 8020 obtained from rock at 3570 m.a.s.l. displayed very strong and selective antiviral activity against dengue virus with an effective concentration 50 (EC<sub>50</sub>) at 1.18  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>.



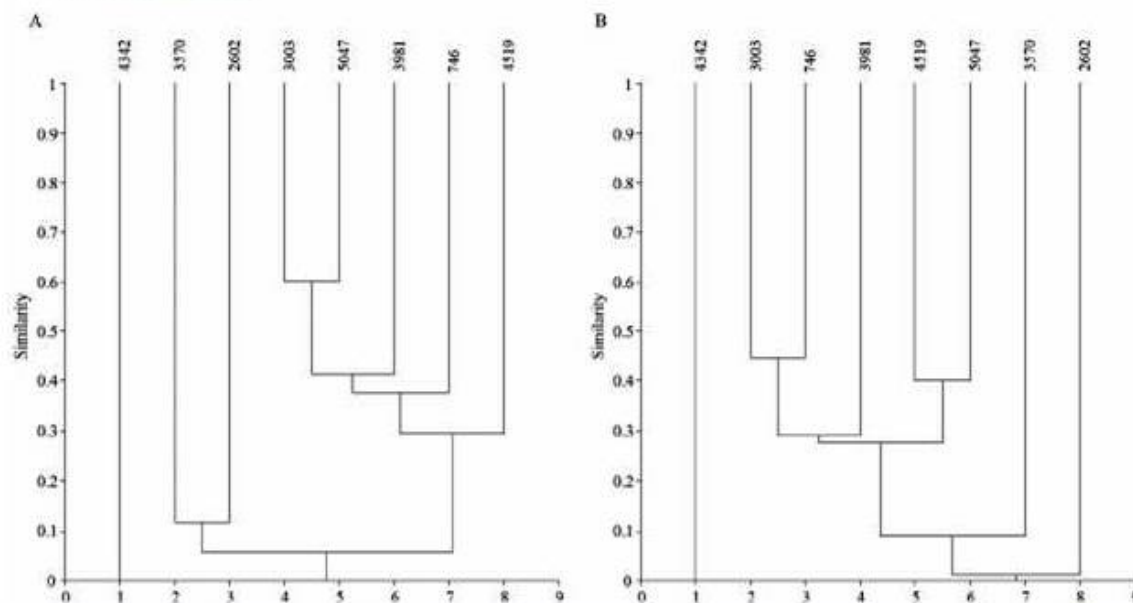


Fig. 1. Dendrogram showing the comparison of Sorensen (A) and Bray-Curtis (B) similarity measures for the fungal communities isolated from rocks of different altitudes in the Atacama Desert, Chile. The results were obtained with 95% confidence and the bootstrap values were calculated from 1000 iterations.

Bioactive extracts were examined using Proton nuclear magnetic resonance (NMR).  $^1\text{H}$  NMR analysis to inspect for the presence of secondary metabolites with interesting chemical shifts. The extract of *P. chrysogenum* UFMGCB 8074 showed the presence of fatty acid functional groups, and most extracts contained signals indicative of the presence of triglycerides. More importantly, downfield  $^1\text{H}$  NMR signals for nearly all of the extract indicated the presence of highly functionalized secondary metabolites due to the presence of protons in the aromatic and olefinic regions. For this reason, the extract of the *P. chrysogenum* UFMGCB 8074 was subjected to antimicrobial activity directed fractionation using NMR spectroscopy and gas chromatography–flame ionization detection (GC-FID) analysis (Fig. 2). The extract of *P. chrysogenum* UFMGCB 8074 afforded a mix of compounds including linoleic and  $\alpha$ -linolenic fatty acids as well as ergosterol endoperoxide (Fig S6). The  $\alpha$ -linolenic fatty acid inhibited the growth of *Cryptococcus neoformans* (Table S3) and the ergosterol endoperoxide was active against methicillin-resistant *S. aureus* (MRS; Table S4).

## Discussion

Our study shows that the majority of the RIF from the Atacama Desert could be placed in the class *Dothideomycetes* (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Cochliobolus*

and *Phoma*). According to Ruibal and colleagues (2009), *Dothideomycetes* includes a high number of plant pathogens or epiphytes, saprobes, coprophilous or symbiotic species. However, despite the characterization of saprobes, parasitic, mycotoxigenic and symbiotic fungal taxa associated with rocks in extreme environments, few studies have shown the functional ecology role under extreme conditions.

*Alternaria* (Woudenberg *et al.*, 2013) has worldwide distribution and include different species found in substrates such as seeds, plants, agricultural products, animals, atmosphere and soils; in addition, include saprobes, symbionts (endophytes) and pathogenic species. Despite not considered specific RIF, *Alternaria* is common in sandstone, limestones, rock monuments and rock outcrops throughout Europe and Africa (Diakumaku *et al.*, 1995). Sequences of the three *Alternaria* taxa do not display high similarities with sequences deposited in the GenBank, suggest that they may represent a new species.

Some *Cladosporium* species were isolated from extreme environments and included hypersaline habitats (Gunde-Cimerman *et al.*, 2000). *Cladosporium halotolerans* UFMGCB 8042 displayed phylogenetic similarity with *C. halotolerans* CBS 280.49 (EF101432), which were isolated from *Hypericum perforatum* stems. According to Zalar and colleagues (2007), *C. halotolerans* also have been detected in hypersaline water salterns and

**Table 2.** Biological activities of the extracts obtained from fungal species from rocks of Atacama Desert Chile.

Fungal species	Inhibition of the biological targets (%)											
	Protozoa			Tumoral cell			Fungus		Bacteria			Virus
	UFMGCB <sup>a</sup>	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i>	MCF-7	C. albicans	<i>C. krusei</i>	<i>C. sphaerospermum</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	DE-NV-2 <sup>b</sup>	
<i>Albarnia</i> cf. <i>ardorescens</i>	0 ± 1	3 ± 0	54 ± 8	17 ± 0	53 ± 1	0 ± 0	17 ± 34	99 ± 19	0 ± 2	na	na	
<i>Aspergillus</i> <i>felis</i>	0 ± 4	12 ± 0	92 ± 1	17 ± 0	55 ± 2	0 ± 35	0 ± 5	0 ± 3	16.1 ± 0	na	na	
<i>Aspergillus</i> <i>persii</i>	0 ± 7	9 ± 0	82 ± 20	15 ± 0	0 ± 8	0 ± 1	0 ± 5	0 ± 2	2.4 ± 3	na	na	
<i>Aspergillus</i> <i>felis</i>	0 ± 0	1 ± 0	92 ± 19	9 ± 0	52 ± 4	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 5	na	na	
<i>Aspergillus</i> <i>felis</i>	4 ± 0	1 ± 0	92 ± 14	16 ± 0	51 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	10 ± 0	0 ± 11	na	na	
<i>Aspergillus</i> <i>felis</i>	0 ± 1	13 ± 0	80 ± 15	12 ± 0	52 ± 3	0 ± 23	0 ± 5	0 ± 13	0 ± 0	na	na	
<i>Aspergillus</i> <i>felis</i>	13 ± 2	0 ± 0	89 ± 4	0 ± 0	26 ± 3	13 ± 40	0 ± 5	0 ± 6	14.8 ± 0	na	na	
<i>Aspergillus</i> <i>felis</i>	12 ± 0	0 ± 1	81 ± 18	0 ± 0	48 ± 1	10.5 ± 4	0 ± 1	0 ± 6	11.8 ± 0	na	na	
<i>Aspergillus</i> <i>felis</i>	8 ± 4	8 ± 0	89 ± 5	0 ± 1	39 ± 1	1 ± 18	0 ± 11	0 ± 4	22.4 ± 0	na	na	
<i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	0 ± 6	18 ± 2	77 ± 4	16 ± 0	37 ± 1	14 ± 18	17 ± 3	0 ± 22	10 ± 2	na	na	
<i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	0 ± 1	30 ± 0	23 ± 0	14 ± 0	16 ± 35	0 ± 26	0 ± 15	0 ± 9	0 ± 2	na	na	
<i>Hypoxylon</i> cf. <i>trigobas</i>	4 ± 1	25 ± 0	77 ± 0	16 ± 1	35.1 ± 1	0 ± 16	0 ± 0	17 ± 1	17.1 ± 5	50 ± 0	50 ± 0	
<i>Neosartorya</i> cf. <i>udagawae</i>	1 ± 0	0 ± 0	87 ± 0	0 ± 0	49 ± 1	0 ± 15	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 10	na	na	
<i>Neosartorya</i> cf. <i>udagawae</i>	20 ± 1	0 ± 0	83 ± 12	0 ± 3	49.5 ± 0	0 ± 5	0 ± 0	17 ± 1	0 ± 1	na	na	
<i>Neosartorya</i> cf. <i>udagawae</i>	0 ± 2	0 ± 0	81 ± 9	23 ± 0	48.4 ± 2	0 ± 26	0 ± 5	0 ± 0	7.4 ± 1	na	na	
<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i>	0 ± 2	28 ± 1	77 ± 4	13 ± 30	25 ± 7	0 ± 65	10 ± 20	56 ± 9	17 ± 4	na	na	
<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i>	9 ± 1	8 ± 0	70 ± 4	0 ± 0	13 ± 2	42 ± 26	40 ± 5	0 ± 1	15 ± 0	na	na	
<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i>	0 ± 2	8 ± 0	79 ± 0	0 ± 0	13 ± 2	42 ± 26	40 ± 5	0 ± 1	15 ± 0	na	na	
<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i>	0 ± 2	12 ± 0	71 ± 9	0 ± 0	52.4 ± 0	0 ± 44	0 ± 1	0 ± 3	0 ± 23	na	na	
<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i>	0 ± 3	3 ± 0	74 ± 2	10 ± 0	34.7 ± 1	22.4 ± 0	0 ± 5	0 ± 2	16.1 ± 0	na	na	
<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i>	0 ± 1	0 ± 0	83 ± 4	0 ± 0	35 ± 3	25.6 ± 16	0 ± 5	0 ± 24	8.8 ± 0	na	na	
<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i>	0 ± 3	6 ± 0	80 ± 1	77 ± 56	3.2 ± 2	42.7 ± 35	0 ± 3	8.7 ± 11	13.4 ± 3	na	na	
<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i>	0 ± 2	22 ± 0	12 ± 1	100 ± 23	100 ± 13	100 ± 5	100 ± 5	96 ± 12	83 ± 6	na	na	
Controls	Chilo	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Amph B	82 ± 3	85 ± 2.67	100 ± 23	100 ± 13	100 ± 5	100 ± 5	96 ± 12	83 ± 6	na	na	
	Ed	—	96 ± 5	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Benz	—	30 ± 7	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Benomyl	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

Result of the Effective Concentration 50 (EC<sub>50</sub>) at 1.18 µg ml<sup>-1</sup> of the extract against dengue virus 2.

a. UFMGCB = Culture Collection of Microorganisms and Cells of the Universidade Federal de Minas Gerais.

b. Result of the Effective Concentration 50 (EC<sub>50</sub>) at 1.18 µg ml<sup>-1</sup> of the extract against dengue virus 2.

—, not assayed; Amph B, amphiphenin B; Benz, benzimidazole; C. albicans, *Candida albicans*; C. krusei, *Candida krusei*; C. sphaerospermum, *Claosporium sphaerospermum*; Chilo, chloramphenicol; DENV-2, dengue virus 2; E. coli, *Escherichia coli*; EtO, etoposide; L. amazonensis, *Leishmania amazonensis*; MCF-7, breast tumor cell; na, not active; P. aeruginosa, *Pseudomonas aeruginosa*; S. aureus, *Staphylococcus aureus*; T. cruzi, *Trypanosoma cruzi*; Bold format is relevant in the inhibition percentages (all numbers that we considered active).



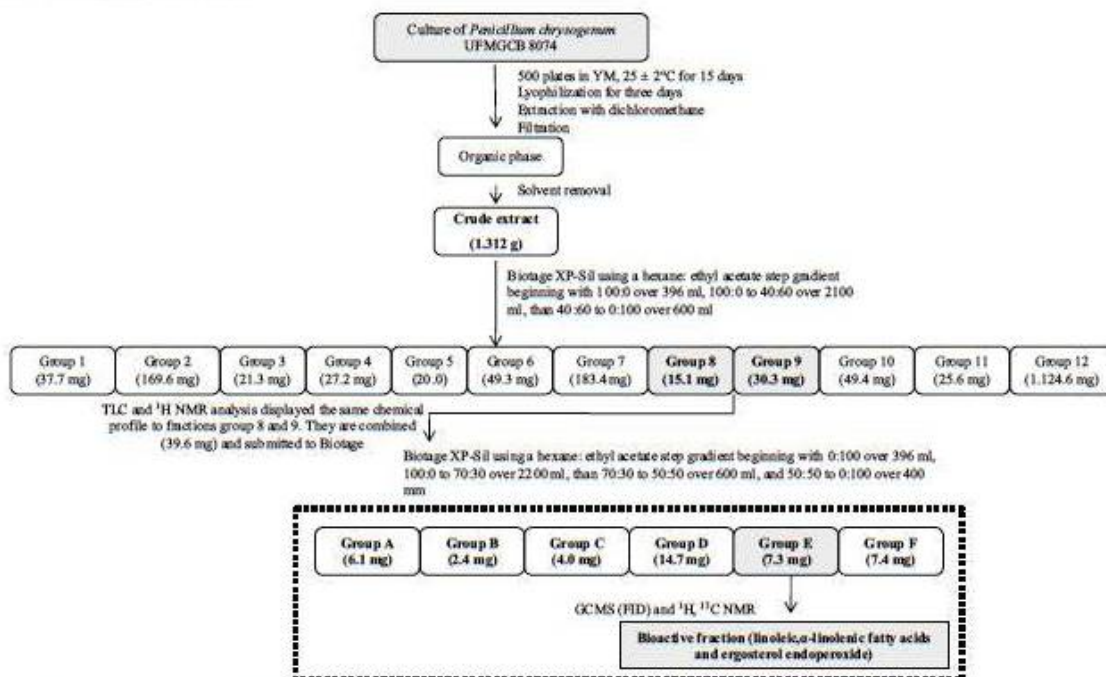


Fig. 2. Flowcharts illustrating the process of chemical characterization of bioactive compounds produced by *Penicillium chrysogenum* UFMGCB 8074, which were guided by the antifungal bioassay. In bold all bioactive fractions and compounds.

other saline environments and it is possible that this fungus is a species closely linked to salty or hypersaline environments.

*Fusarium* species have worldwide distribution in soil, on the surface or inside plants, plant debris and other organic substrates in tropical, temperate and polar regions as well as in deserts where harsh climatic conditions prevail (Nelson *et al.*, 1994). Although *Fusarium* represents an airborne fungi group, some species are isolated from the surface of stones (Páramo-Aguilera *et al.*, 2012). *Penicillium* and *Aspergillus* have been recovered in a very wide range of habitats including extreme environments. In addition, *Neosartorya* species were also found associated with rocks of Atacama Desert, are heat-resistant fungi which are teleomorph of *Aspergillus* species (Yaguchi *et al.*, 2012). According to Tang and Lian (2012), *Penicillium* and *Aspergillus* species appear to be ubiquitous in endolithic rock environments.

Although *Pseudogymnoascus* and *Geomyces* taxa (aff. *Thelebolales*, *Leotiomyces*, *Ascomycota*) were historically considered to represent the sexual and asexual stages of the same genus under a two-name per fungus system of classification, respectively, Minnis and Lindner (2013) treated the two as closely related but distinct genera under a one-name per fungus system of classification based on phylogenetic placement of the type

species. *Pseudogymnoascus* species, typically and historically identified under the name *Geomyces*, have been obtained frequently from extreme environments such as soils of cold regions (Furbino *et al.*, 2014). According to Lorch and colleagues (2013) and Minnis and Lindner (2013), the diversity of *Geomyces* and allies including *Pseudogymnoascus* as revealed by DNA sequence data is greater than previously recognized based on traditional taxonomic methods. We found the *Pseudogymnoascus* cf. *pannorum* UFMGCB 8082 only at 4342 m.a.s.l., which was the first report of the genus to the region. However, according to Furbino and colleagues (2014), a critical taxonomic re-evaluation of the diversity of *Pseudogymnoascus* and its allies is not available. Our phylogenetic analysis suggested that the *Pseudogymnoascus* cf. *pannorum* UFMGCB 8082 might represent an undescribed species, which will be subject to further studies to elucidate its taxonomic positions in the context of a biogeographic study comparing northern and southern hemisphere isolates.

Among the RIF species obtained from rocks of Atacama Desert, fungi UFMGCB 8025 and 8046 demonstrated high sequences similarities with *A. felis* and *Aspergillus persii*, respectively. *Aspergillus felis* was a recently described as a new species isolated from a human patient and domestic cats and dogs with disseminated invasive



aspergillosis (Barrs *et al.*, 2013). According to Barrs and colleagues (2013), aspergillosis caused by *A. felis* in the host species was often refractory to aggressive antifungal therapeutic regimens. *Aspergillus persii* was described also as a new species that causes onychomycosis in the nails of human patient (Zotti *et al.*, 2010).

Among the eight fungal taxa from rocks that were not identified to species level, *Ascomycota* sp. UFMGCB 8088 and *Devriesia* sp. UFMGCB 8061 displayed a low molecular similarity with the sequences of known fungi deposited in GenBank, suggested that they are candidates for new fungal species. The *Ascomycota* UFMGCB 8088 sequence matched the Ascomycete fungus (GenBank access code DQ683973) that was isolated from sand samples from Atacama Desert by Conley and colleagues (2006). According to Seifert and colleagues (2004) the genus *Devriesia* included 16 species. However, new species of *Devriesia* have been described in recent years including taxa found in rocks of different ecosystems such as those in Antarctica and regions of Spain and Italy (Egidi *et al.*, 2014). The sequence of the fungus *Devriesia* sp. UFMGCB 8061 showed 100% of query coverage, but only 92% of similarity with *Devriesia xanthorhoeae* CBS 128219 (GenBank access code HQ599605) obtained from leaves surface of the plant *Xanthorhoea australis* in Australia. However, after the phylogenetic analysis (Fig. S3E), *Devriesia* sp. UFMGCB 8061 remained as a separate clade when compared with other *Devriesia* sequences analysed. As not all described fungal species are deposited in the GenBank database, further taxonomic analyses including detailed physiological and macro- and micromorphological characterization and molecular sequencing of other DNA regions, together with new phylogenetic analyses will be needed to describe these potentially new species.

Few fungal taxa have been reported from in the Atacama Desert. Among the mycological studies published for the region, Conley and colleagues (2006) and Ortiz and colleagues (2014) described those included in the *Ascomycota* and *Basidiomycota* phyla present in sands and structures built of wood respectively. In common with the fungal community characterized in sands of the Atacama Desert by Conley and colleagues (2006) and Ortiz and colleagues (2014), we found the taxa of the genera *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eupenicillium*, *Gibberella*/*Fusarium*, and *Penicillium* associated with rocks. In contrast, we identified taxa of the genera *Cochliobolus*, *Devriesia*, *Pseudogymnoascus*, *Hypoxyton*, *Macroventuria* and *Neosartorya* undescribed before to the region.

Additionally, the ecological diversity indices of richness, dominance and similarity in the fungal communities ranged across latitudinal gradient. The pyroclastic (Fig.

S11, II) and siltstone (Fig. S1D) rocks that displayed dissolution features also showed the highest fisher index. Fine-grained rocks, such as siltstone, had the highest values of Fisher- $\alpha$ . Among the pyroclastic rocks, only samples with Ca-enrichment and lower proportion of matrix had low diversity Fisher index. Enrichment in calcium denotes a drier environment and voids filled, being less favourable to biological colonization. The predominance of a thin matrix can contribute to increased microporosity and responsible for retention of water generated by night time dew and occasional melting snow. Growth of the fungi in these microenvironments promotes the biomechanical and biochemical degradation of minerals, mainly the finer grains (Burford *et al.*, 2003a,b). Fungal weathering processes, such as dissolution, sorption, transport, diffusion and recrystallization of mobilized cations (Gadd, 2007), are very important in alteration rocks in arid environments, such as Atacama Desert.

According to Gueidan and colleagues (2008), physiological abilities referred to RIF, such as survival in high temperatures and oligotrophism, meristematic growth, resistance to desiccation, melanization, production of extrolites, appear to be prerequisites to colonize animals and plants as well as contaminate food with mycotoxins. We demonstrated fungal species of *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Cochliobolus*, *Aspergillus*, *Neosartorya*, *Penicillium* and *Pseudogymnoascus*, which are related as pathogens of plant and animals and able to produce mycotoxins. These results may indicate that the dry habitat, such as rocks of extreme natural environments, may represent the natural habitat of pathogenic and mycotoxigenic wild fungal species.

*Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Hypoxyton* and *Penicillium* species occur in several habitats from different environments, which are able to produce several secondary metabolites with different bioactivities. The fungus UFMGCB 8046, that showed cytotoxic activity against tumoral cell line MCF-7, displayed high sequence similarity with *A. persii* (GenBank access code AY819988) that was characterized as a producer of ochratoxin A (Frisvad *et al.*, 2004). The fungus UFMGCB 8023, identified as *F. oxysporum*, was also able to produce cytotoxic activity against MCF-7. In general, *Fusarium* species produce numerous bioactive compounds with different biological activities.

*Neosartorya* species (*Trichocomaceae*) have not been reported as producers of bioactive compounds. Among the bioactive compounds produced by *Neosartorya* species, neosartolactone and its 7-methyl ester analogue that inhibited NO production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages (Yang *et al.*, 2010). From *Neosartorya pseudofisherii*, Eamvijarn and colleagues (2012) reported the isolation of cadenene sesquiterpenes and the indole derivative eurochevalierine that displayed



*in vitro* cytostatic activities against human cancer. The indole alkaloid sartorymnsin, an analogue of tryptoquivaline and fiscalins produced by *Neosartorya siamensis* showed growth inhibition activity in human U373 and Hs683 glioblastoma, A549 non-small cell lung cancer, MCF-7 breast cancer and SKMEL-28 melanoma cell lines (Buttachon *et al.*, 2012). Eamvijarn and colleagues (2013) isolated aszonalenin analogue, a meroditerpene aszonalenin, acetylaszonalenin, 13-oxofurmitremorgin B, aszonapyrone A and helvolic acid from *N. fischeri*, *Neosartorya laciniosa* and *Neosartorya tsunoda*, which displayed cytotoxic activity. According to our knowledge, there are no reports about bioactive compounds produced by *A. felis*, *A. persii* or *N. udagawae*.

The genus *Hypoxylon* is one of the largest of *Xylariaceae* (*Ascomycota*) and includes 130 species widespread (Kirk *et al.*, 2008) and from South America, Spegazzini described 49 species (Hladik and Romero, 2009). *Hypoxylon* species have been described as producer of bioactive secondary metabolites with antimicrobial activity (Quang *et al.*, 2005). *Hypoxylon* sp. UFMGCB 8020 displayed strong and selective antiviral activity against dengue virus. According to our knowledge, only one antiviral agent was described to *Hypoxylon fragiforme* which showed high activity as an human immunodeficiency virus protease enzyme (Bills *et al.*, 1993). However, there is no one antiviral secondary metabolite reported to *Hypoxylon* species.

From the extract of *P. chrysogenum* UFMGCB 8074 the compounds  $\alpha$ -linoleic acid and ergosterol endoperoxide were identified as active against fungal and bacterial targets, respectively. Fatty acids, including  $\alpha$ -linoleic acid, are known to possess different biological properties, including antibacterial, antimycobacterial, antimalarial and antifungal activities (Pohl *et al.*, 2011). In addition, ergosterol endoperoxide was described as an antimycobacterial compound able to affect the growth of *Mycobacterium tuberculosis* (Cantrell *et al.*, 1999).

In conclusion, our study represents the first report and description of new habitat of fungi associated with rocks of the Atacama Desert. Additionally, despite the high extreme conditions found in the Atacama Desert, our results indicated the presence of interesting fungal community with different ecological roles, including species phylogenetically related with saprobes, parasite/pathogen and mycotoxigenic fungal taxa, which some of them might represent new and/or endemic species. The geological characteristics of the Atacama rocks, when compared with the external environment conditions of the Atacama Desert, associated with the presence of rich resident/resilient fungal communities, suggest that the microhabitat inside of the rocks may provide a favourable microenvironment to microbial colonization, survival and dispersal in extreme conditions. Finally, the characteriza-

tion of fungal communities associated with rocks of extreme natural environments may have important implications for further studies to understand the physiological, biochemistry and genetic mechanism used by eukaryotic cells to survive and colonize extreme environments.

## Experimental procedures

### Study area

A total of 24 rock samples were collected in the Atacama Desert, Chile, in January of 2012 across the altitudinal gradient of 746, 2602, 3003, 3570, 3981, 4342, 4519 and 5047 m above sea level (m.a.s.l.), where three samples of each site were collected. The rocks were sampled and stored in Whirl-Pak (Nasco, Ft. Atkinson, WI, USA) bags and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until arrive in laboratory at the Federal University of Minas Gerais, Brazil, where the samples were processed for fungal isolation.

### Rock characterization

Petrographic and chemical analyses were made to identify the types of rocks and their main features. Petrographic analyses were made at macro and microscopic scale, using 'hand samples' and 'thin sections' respectively. The mineral constituents, colours, textures and structures were analysed. In thin sections, optical microscopic investigations were carried using a Zeiss trinocular optical microscope (AxioPhot model) with an integrated digital camera. The most representative sites were selected for morphological aspects using a SEM (JEOL JSM-5510). The chemical analysis was performed by X-ray fluorescence (XRF – Magix PANalytical Philips spectrometer with a PW2540 autosampler). The following elements were analysed: Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Si and Ti. Additionally, the oxide contents were reported (wt%).

### Fungal isolation

Fragments of 1–2 cm of each rock were powdered using a blender for at least 10 min. After that, 1 g of each sample was added to 9 ml of 0.85% NaCl and 100  $\mu\text{l}$  of a  $10^{-1}$  dilution was inoculated onto agar malt extract-yeast extract (YM) (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 2% glucose, 2% agar), malt yeast extract agar (MYEA) (2% malt extract, 0.2% yeast extract, 2% agar), dichloran-glycerol agar base (DG18) (Oxoid, USA) and dichloran-rose bengal agar base (DRBC) (Oxoid, USA) media containing 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  chloramphenicol (Sigma) and incubated at  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  for 60 days. Fungal CFUs were counted, and subcultures were made of all of the morphologically distinct colonies from each sample. The subcul-



tures were grouped into different morphotypes according to their cultural and morphological characteristics on YM agar. All fungal isolates were deposited in the Culture Collection of Microorganisms and Cells of the Universidade Federal de Minas Gerais under code UFMGCB.

#### Fungal identification

The protocol for DNA extraction was described elsewhere Rosa and colleagues (2009). The internal transcribed spacer (ITS) region was amplified with the universal primers ITS1 and ITS4 (White *et al.*, 1990). Amplification of the ITS region was performed as described by Rosa and colleagues (2009). Amplification of the  $\beta$ -tubulin (Glass and Donaldson, 1995) and ribosomal polymerase II genes (RPB2) (Houbraken *et al.*, 2012) was performed with the B2a/B2b and RPB2-5F-Pc/RPB2-7CR-Pc 7CR primers, respectively, according to protocols established by Godinho and colleagues (2013). The obtained sequences were analysed with SeqMan P with LASERGENE software (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA), and a consensus sequence was obtained using BRCCREDIT v. 7.0.5.3 software (Carlsbad, ON, Canada). Representative consensus sequences of fungal taxa were deposited in GenBank (Table 1). To achieve species-rank identification based on ITS,  $\beta$ -tubulin data and ribosomal polymerase B2, the consensus sequence was aligned with all sequences from related species retrieved from the NCBI GenBank database using BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Taxa that displayed query coverage and identities  $\leq$  97% or an inconclusive taxonomic position were subjected to phylogenetic ITS,  $\beta$ -tubulin and ribosomal polymerase B2-based analysis in comparison with sequences of type species deposited in the GenBank database, with estimations conducted using MEGA version 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). The maximum composite likelihood method was employed to estimate evolutionary distances with bootstrap values calculated from 1000 replicate runs. The information about fungal classification generally follows Kirk and colleagues (2008), MycoBank (<http://www.mycobank.org>) and Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>) databases.

#### Diversity, richness, dominance and distribution

To quantify species diversity, richness and dominance, we used Fisher's  $\alpha$ , Margalef's and Simpson's indices respectively. The similarities among fungal taxa from different sites were estimated using the Sorensen and Bray-Curtis coefficient. All diversity and similarity indices were performed using the computer program PAST, version 1.90 (Hammer *et al.*, 2001).

#### Fungal cultivation and preparation of extracts for biological assays

All fungal isolates were cultivated according to protocols established by Rosa and colleagues (2013). Briefly, a 5 mm diameter plug of each fungus was placed on 20 ml of YM medium at the centre of 5 Petri dishes (90 mm diameter) and cultured for 15 days at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (time enough for fungi to produce secondary metabolites). These fungal cultures were lyophilized for 72 h, cut in small pieces and transferred to 50 ml glass centrifuge tubes followed by the addition of 50 ml of dichloromethane (DCM, Fisher, USA). After 72 h at room temperature, the organic phase was filtered and the solvent removed under rotary evaporation at  $40^\circ\text{C}$ . An aliquot of each dried extract was dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO; Merck, USA) to prepare a  $100 \text{ mg ml}^{-1}$  stock solution, which was stored at  $-20^\circ\text{C}$ . Sterile YM medium was extracted using the same procedure and used as the control in the screening procedure.

#### Assays for antimicrobial activity

Susceptibility testing of the fungal extracts against *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Candida albicans* ATCC 18804, *C. krusei* ATCC 6258 and *Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740 was performed using a protocol established by Carvalho and colleagues (2012). The extracts (dissolved in DMSO) were diluted to a final concentration of  $250 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  for use in the antimicrobial assays. Each extract was tested at  $250 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ . The results are expressed as the percent inhibition in relation to controls without drugs. All antimicrobial assays were performed in triplicate.

Subsequent evaluation of fractions and compounds from purification of extracts was performed against *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258, *Cryptococcus neoformans* ATCC 90113, *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305, *S. aureus* ATCC 29213, methicillin-resistant *S. aureus* ATCC 33591 (MRS), *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and *Mycobacterium intracellulare* ATCC 23068. All microorganisms were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and tested using modified versions of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)] methods (NCCLS M27 – A2, vol. 22 n° 15, 2002a; NCCLS M7 – A7, vol. 26 n° 2, 2006; NCCLS M24 – A, vol. 23 n° 18, 2003; NCCLS M38 – A, vol. 22 n° 16, 2002b). The bioassay test on *M. intracellulare* was done using a modified method (Franzblau *et al.*, 1998). Samples were serially diluted in 20% DMSO/saline and transferred in duplicate to 96-well flat bottom microplates. Microbial inocula were prepared



by correcting the  $OD_{530}$  of microbe suspensions in incubation broth to afford final target inocula. Ciprofloxacin (ICN Biomedicals, Ohio) at  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  for bacteria and amphotericin B (ICN Biomedicals) at  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  for fungi are included as positive controls in each assay. All organisms were read at either 530 nm using the Biotek Powerwave XS plate reader (Bio-Tek Instruments, Vermont) or 544ex/590em (*M. intracellulare*, *A. fumigatus*) using the Polarstar Galaxy Plate Reader (BMG Lab Technologies, Germany) prior to and after incubation. Percent growth was plotted versus test concentration to afford the  $IC_{50}$ .

#### Assay with human breast cancer cell line

The effect of crude extract on the survival and growth of the human breast cancer cell line MCF-7 (breast) was determined using a colorimetric method developed at the National Cancer Institute-USA (Monks *et al.*, 1991). Each extract was tested at  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ . The results were expressed as percentage of growth inhibition in comparison with the control without drug.

#### Assay with *Leishmania amazonensis*

Promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (strain IFLA/BR/196/PH-8) obtained from lesions of infected hamsters were used to detect the leishmanicidal activity according to protocols established by Callahan and colleagues (1997). Each extract was tested at  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ . The results are expressed as percent inhibition in relation to controls without drugs. Amphotericin B at  $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$  (Fungison Bristol-Myers Squibb B, Brazil) was used as a positive drug control. All assays were performed in triplicate.

#### In vitro assays with intracellular amastigote forms of *T. cruzi*

*In vitro* assays with amastigote forms of *T. cruzi* were performed according to protocols established by Romanha and colleagues (2010). Each extract was tested in duplicate at  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Benznidazole at its  $IC_{50}$  ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) was used as positive control. The results were expressed as the percentage of growth inhibition.

#### Assays against dengue virus

For antiviral activity assays against dengue virus 2 (DENV-2), monolayers of Baby Hamster Kidney 21 cells (BHK-21) grown in flat bottom, 96-well plates using Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 5% foetal bovine serum,  $100 \text{ U ml}^{-1}$  penicillin,  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  streptomycin, and  $0.25 \mu\text{g ml}^{-1}$  amphotericin B, were

exposed to different concentrations of fungal extracts for 72 h in the presence of DENV-2. Fungal extracts were provided as  $2 \text{ mg ml}^{-1}$  in 10% DMSO. Virus suspensions multiplied of infection (m.o.i. = 5) and extracts, at concentrations ranging from 100 to  $0.78 \mu\text{g ml}^{-1}$  were simultaneously added to the plates, in two replicates. Controls for cells (uninfected untreated cells), virus (infected untreated cells) in the presence or not of DMSO were run in parallel during each experiment. The antiviral activity was evaluated by grading system of the peculiar cytopathic effect (CPE) caused by DENV-2 observed by optic microscopy (Tang and Lian, 2012) followed by colorimetric assay using the 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2 H-tetrazolium bromide (MTT/Sigma, USA) (Betancur-Galvis *et al.*, 1999). The results are expressed as the percent of CPE inhibition in relation to controls without extracts. All antiviral assays were repeated at least three times.

#### NMR spectroscopy

Bioactive fungal extracts, fractions and pure compounds were analysed by NMR spectroscopy on a Varian INOVA 600 MHz spectrometer (Palo Alto, CA, USA).  $^1\text{H-NMR}$  spectra recorded in either  $\text{CDCl}_3$  or deuterated methanol (MeOD) using a standard  $^1\text{H}$  NMR pulse program.

#### Crude extract preparation to bioassay-directed purification

Five millimetres diameter plug of fungus was placed on 20 ml of YM medium at the centre of 500 Petri dishes (90 mm diameter) and cultured for 15 days at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . The fungal cultures were lyophilized for 72 h, cut in small pieces and transferred to 50 ml erlenmeyer flasks followed by the addition of 50 ml of DCM. After 72 h at room temperature, the organic phase was filtered and the solvent removed under rotary evaporation at  $40^\circ\text{C}$ . Initially, 1.312 g of *P. chrysogenum* UFMGCB 8074 extract was adsorbed to silica and applied to a silica gel chromatography column (40–63  $\mu\text{m}$ ,  $40 \times 150 \text{ mm}$ , 60  $\text{\AA}$ ). For the *P. chrysogenum* UFMGCB 8074 extract the elution of the column was performed using increasing polarity mixtures of hexane/EtOAc in a series of three linear steps as follows: (step 1) 100:0 over 396 ml, (step 2) 100:0 to 40:60 using 2100 ml, and (step 3) 40:60 to 0:100 using 600 ml. Column eluate was collected into 27 ml portions and, on the basis of thin layer chromatography (TLC) similarities, recombined into 12 fractions [(1) 1–17, 37.7 mg; (2) 18–20, 169.6 mg; (3) 21–25, 21.3 mg; (4) 26–31, 27.2 mg; (5) 32–35, 20.0 mg; (6) 36–38, 49.3 mg; (7) 39–53, 183.4 mg; (8) 54–56, 15.1 mg; (9) 57–61, 30.3 mg; (10) 62–67, 49.4 mg; (11) 68–104, 25.6 mg; and (12) 105–117, 1124.6 mg]. Frac-



fractions 8 and 9 were selected for further investigation based on activities in the antimicrobial and antifungal assays against *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. neoformans*, *S. aureus*, MRS, *E. coli* and *P. aeruginosa*. <sup>1</sup>H NMR analysis displayed the same chemical profile for fractions 8 and 9. Both fractions were combined and 39.6 mg was adsorbed to silica gel and applied to the silica gel chromatography column. The elution of the column was performed using increasing polarity mixtures of hexane/EtOAc in a series of four linear steps as follows: (step 1) 100:0 over 396 ml, (step 2) 100:0 to 70:30 using 2200 ml, (step 3) 70:30 to 50:50 using 600 ml and (step 4) 50:50 to 0:100 over 400 ml. Column eluate was collected into 25 ml portions and, on the basis of TLC similarities, recombined into 6 fractions [(A), 1–84, 6.1 mg; (B), 85–91, 2.4 mg; (C), 92–95, 4.0 mg; (D), 96–99, 14.7 mg; (E), 100–103, 7.3 mg; (F), 104–132, 7.4 mg]. Fraction E was selected for further investigation based on activities in the antimicrobial and antifungal assay against *S. aureus*, MRS, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. neoformans*. Three compounds were identified from Fraction E as ergosterol-5,8-endoperoxide as well as linoleic and  $\alpha$ -linolenic fatty acids.

#### Identification of ergosterol endoperoxide

The compound ergosterol-5,8-endoperoxide (fraction E): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz in CDCl<sub>3</sub>) 10.98 s (1H), 7.27 d (1H, *J* = 8.0), 6.79 d (1H, *J* = 8.0), 4.67 (1H), 2.94 (dd, *J* = 12.0, 12.0, 1H), 2.70 (dd, *J* = 12.0, 12.0, 1H), 2.14 s (3H), 1.54 d (3H, *J* = 4.0). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz in CDCl<sub>3</sub>) 170.3 q, 160.4 q, 137.9 s, 137.0 q, 124.9 q, 115.6 s, 108.0 q, 75.4 s, 31.9 d, 20.9 t, 18.1 t. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data for fraction E indicated complete agreement with that previously reported (Cantrell *et al.*, 1999) providing structural confirmation as ergosterol-5,8-endoperoxide. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data also indicated the presence of functional groups associated with fatty acids signals. Subsequently this fraction was investigated by fatty acids analysis.

#### Fatty acid reference standards and methyl ester synthesis

Fatty acids abbreviations used throughout the manuscript are identified in parentheses. Individual saturated fatty acids hexanoic acid (C<sub>6:0</sub>), heptanoic acid (C<sub>7:0</sub>), octanoic acid (C<sub>8:0</sub>), nonanoic acid (C<sub>9:0</sub>), and tridecanoic acid (C<sub>13:0</sub>) and individual unsaturated fatty acids undecanoic acid (C<sub>11:1</sub>), 11-dodecanoic acid (C<sub>12:1</sub>), 12-tridecanoic acid (C<sub>13:1</sub>), myristoleic acid (C<sub>14:1</sub>) and palmitoleic acid (C<sub>16:1</sub>) were all purchased from Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA). Decanoic acid (C<sub>10:0</sub>), undecanoic acid (C<sub>11:0</sub>), dodecanoic acid (C<sub>12:0</sub>), tetradecanoic acid (C<sub>14:0</sub>), hexadecanoic acid (C<sub>16:0</sub>), octadecanoic acid (C<sub>18:0</sub>), oleic acid (C<sub>18:1</sub>), and linoleic acid (C<sub>18:2</sub>) were all purchased from

Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Fatty acid methyl esters used in the analyses of extracts and fractions were either synthesized from the corresponding free fatty or analysed as a premixed reference standard from Supelco (St Louis, MO, USA), part number 18919. Briefly, 2.5 g of KOH was dissolved in 4 ml of deionized water and placed in the reaction vessel followed by the addition of 5 ml of ethanol. A separatory funnel containing 2.5 g of diazald dissolved in 22.5 ml of ether was placed above the reaction vessel. The reaction vessel was warmed to 65°C using a water bath followed by the drop wise addition of the diazald solution over a period of 50 min. The receiving flask and condenser cold finger were cooled using a dry-ice/acetone bath. The co-distilled diazomethane (CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) in ether solution was stored in sealed vials at -20°C until needed (Cantrell *et al.*, 2008). Both internal and external standards were used to quantitative analysis.

#### GC-FID analysis

GC-FID analysis was performed on a Varian CP-3800 GC. The GC was equipped with a DB-23 (Agilent Technologies) column (60 m × 0.25 mm capillary column, film thickness of 0.25 μm) operated using the following conditions: injector temperature, 270°C; column temperature, 130°C held for 1 min followed by 130° to 170°C at 6.5°C min<sup>-1</sup> followed by 170–215°C at 2.8°C min<sup>-1</sup> and held for 12 min followed by 215–230°C at 40°C min<sup>-1</sup> and held for 3 min; injection volume, 1 μl (split 20:1); 3 ml min<sup>-1</sup> constant flow; FID temperature of 300°C. Fatty acid methyl esters were identified by injection of commercially available standards and comparison of retention times with that of unknowns. The fatty acids were quantified by performing area percentage calculations based on the total combined FID area. For example, the area for each reported peak was divided by the total integrated area from the FID chromatogram from all reported peaks and multiplied by 100 to arrive at a percentage. The percentage is a percentage by weight relative to all other constituents integrated in the FID chromatogram.

#### Acknowledgements

We acknowledge the financial support from CNPq (Universal 471721/2013-1 and INCT Crisfera), CNPq PROANTAR 407230/2013-0, FAPEMIG (0050-13), Fapesp 2012/18936-0, CAPES (23038.003478/2013-92), FINEP (2084/07), PDTIS FIOCRUZ, NIH, NIAID, Division of AIDS Grant No. AI 27094 and the USDA Agricultural Research Service Specific Cooperative Agreement No. 58-6408-1-603. Dr. B. Gómez-Silva and Dr. A. Galetovic were supported by CODEI 5394 and CeBiB FB0001. There is no conflict of interest among the authors. The authors thank Mr. Solomon Green III, Ms. J.L. Robertson, Mrs. R. Pace, Mrs. Amber Reichley and Ms. Marsha Wright for technical assistance.



## References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J.H., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3399–3402.
- Azua-Bustos, A., Urrejola, C., and Vicuña, R. (2012) Life at the dry edge: microorganisms of the Atacama Desert. *FEBS Lett* **586**: 2939–2945.
- Barrs, V.R., Van Doorn, T.M., Houbraeken, J., Kidd, S.E., Martin, P., Pinheiro, M.D., et al. (2013) *Aspergillus felis* sp. nov., an emerging agent of invasive aspergillosis in humans, cats, and dogs. *PLoS ONE* **6**: e64871.
- Betancur-Galvis, L., Saez, J., Granados, H., Salazar, A., and Ossa, J. (1999) Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **94**: 531–535.
- Bills, G.F., Hensens, O.D., Koupal, L., Lingham, R.B., Ondeyka, J.G., and Zink, D.L. (1993) *U.S. Patent No. 5,183,826*. Washington, DC, USA: U.S. Patent and Trademark Office.
- Burford, E.P., Kierans, M., and Gadd, G.M. (2003a) Geomycology: fungal growth in mineral substrata. *Mycologist* **17**: 98–107.
- Burford, E.P., Fomina, M., and Gadd, G.M. (2003b) Fungal involvement in bioweathering and biotransformation of rocks and minerals. *Mineral Mag* **67**: 1127–1155.
- Buttchon, S., Chandrapatya, A., Manoch, L., Silva, A., Gales, L., Bruyere, C., et al. (2012) Sartorymensen, a new indole alkaloid, and new analogues of tryptovaline and fiscalins produced by *Neosartorya siamensis* (KUFC 6349). *Tetrahedron* **68**: 3253–3262.
- Callahan, H.L., Portal, A.C., Devereaux, R., and Grogil, M. (1997) An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 818–822.
- Cantrell, C.L., Rajab, M.S., Franzblau, S.G., Fronczek, F.R., and Fischer, N.H. (1999) Antimycobacterial ergosterol-5,8-endoperoxide from *Ajuga remota*. *Planta Med* **65**: 732–734.
- Cantrell, C.L., Case, B.P., Mena, E.E., Kniffin, T.M., Duke, S.O., and Wedge, D. (2008) Isolation and identification of antifungal fatty acids from the basidiomycete *Gomphus floccosus*. *J Agric Food Chem* **56**: 5062–5068.
- Carvalho, C.R., Gonçalves, V.N., Pereira, C.B., Johann, S., Galliza, I.V., Alves, T.M.A., et al. (2012) The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. *Symbiosis* **57**: 95–107.
- Clarke, J.D.A. (2006) Antiquity of aridity in the Chilean Atacama Desert. *Geomorphology* **73**: 101–114.
- Conley, C.A., Ishkhanova, G., McKay, C.P., and Ken, C.K. (2006) A Preliminary survey of non-lichenized fungi cultured from the hyperarid Atacama Desert of Chile. *Astrobiology* **6**: 521–526.
- Crits-Christoph, A.K., Robinson, C., Barnum, T., Fricke, W.F., Davila, A.F., Jedynek, B., et al. (2013) Colonization patterns of soil microbial communities in the Atacama Desert. *Microbiome* **1**: 1–28.
- Diakumaku, E., Gorbushina, A.A., Krumbein, W.E., Panina, L., and Soukharjevski, S. (1995) Black fungi in marble and limestones – an aesthetical, chemical and physical problem for the conservation of monuments. *Sci Total Environ* **167**: 295–304.
- Eamviarn, A., Kijjoa, A., Bruyere, C., Mathieu, V., Manoch, L., Lefranc, F., et al. (2012) Secondary metabolites from a culture of the fungus *Neosartorya pseudofischeri* and their in vitro cytostatic activity in human cancer cells. *Planta Med* **78**: 1767–1776.
- Eamviarn, A., Gomes, N.M., Dethoup, T., Buaruang, J., Manoch, L., Silva, A., et al. (2013) Bioactive meroditerpenes and indole alkaloids from the soil fungus *Neosartorya fischeri* (KUFC6344), and the marine-derived fungi *Neosartorya laciniosa* (KUFC 7896) and *Neosartorya tsunodae* (KUFC9213). *Tetrahedron* **69**: 8583–8591.
- Egidi, E., de Hoog, G.S., Isola, D., Onofri, S., Quaedvlieg, W., de Vries, M., et al. (2014) Phylogeny and taxonomy of meristematic rock-inhabiting black fungi in the Dothideomycetes based on multi-locus phylogenies. *Fungal Diversity* **65**: 127–165.
- Franzblau, S.G., Witzig, R.S., McLaughlin, J.C., Torres, P., Madico, G., Hernandez, A., et al. (1998) Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate alamar blue assay. *J Clin Microbiol* **36**: 362–366.
- Frisvad, J.C., Frank, J.M., Houbraeken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., and Samson, R.A. (2004) New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Stud Mycol* **50**: 23–43.
- Furbino, L.E., Godinho, V.M., Santiago, I.F., Pellizzari, F.M., Alves, T.M.A., Zani, C.L., et al. (2014) Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. *Microb Ecol* **67**: 775–787.
- Gadd, G.M. (2007) Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol Res* **3**: 3–49.
- Glass, N.L., and Donaldson, G.C. (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1323–1330.
- Gómez-Silva, B. (2010) On the limits imposed to life by the hyperarid Atacama desert in northern Chile, Chapter 9. In *Astrobiology: Emergence, Search and Detection of Life*. Basiuk, V.A. (ed.). Los Angeles, CA, USA: American Scientific Publishers, pp. 199–213.
- Godinho, V.M., Furbino, L.E., Santiago, I.F., Pellizzari, F.M., Yokoya, N., Pupo, D., et al. (2013) Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *ISME J* **7**: 1434–1451.
- Gueidan, C., Villaseñor, C.R., de Hoog, G.S., Gorbushina, A.A., Untereiner, W.A., and Lutzoni, F. (2008) A rock-inhabiting ancestor for mutualistic and pathogen-rich fungal lineages. *Stud Mycol* **61**: 111–119.
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., de Hoog, G.S., and Plemenitaš, A. (2000) Hypersaline water in saltens – natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol Ecol* **32**: 235–240.



- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and Ryan, P.D. (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron* **4**: 1–9.
- Hartley, A.J., Chong, G., Houston, J., and Mather, A.E. (2005) 150 million years of climatic stability: evidence from the Atacama Desert, northern Chile. *J Geol Soc* **162**: 421–424.
- Hladki, A.I., and Romero, A.I. (2009) Taxonomic and nomenclatural aspects of *Hypoxyton* taxa from southern South America proposed by Spegazzini. *Mycologia* **101**: 733–744.
- Houbraken, J., Frisvad, J.C., Seifert, K.A., Overy, D.P., Tuthill, D.M., Valdez, J.G., and Samson, R.A. (2012) New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section *Chrysogena*. *Persoonia* **29**: 78–100.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., and Stalpers, J.A. (2008) *Dictionary of the Fungi*, 10th edn. Wallingford, UK: CAB International.
- Le Maître, R.W., Bateman, P., Dudek, A., Keller, J., Streckeisen, A., Zanettin, B., et al. (1989) *A Classification of Igneous Rocks and Glossary of Terms: Recommendations of the International Union of Geological Sciences Subcommission on the Systematics of Igneous Rocks*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Lorch, J.M., Lindner, D.L., Gargas, A., Muller, L.K., Minnis, A.M., and Blehert, D.S. (2013) A culture-based survey of fungi in soil from bat hibernacula in the eastern United States and its implications for detection of *Geomyces destructans*, the causal agent of bat white-nose syndrome. *Mycologia* **105**: 237–252.
- Minnis, A.M., and Lindner, D.L. (2013) Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. *Fungal Biol* **117**: 638–649.
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., et al. (1991) Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* **83**: 757–766.
- Navarro-González, R., Rainey, F.A., Molina, P., Bagaley, D.R., Hollen, B.J., de la Rosa, J., et al. (2003) Mars-like soils in the Atacama Desert, Chile, and the dry limit of microbial life. *Science* **302**: 1018–1021.
- NCCLS (2002a) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard M27-A2. *National Committee on Clinical Laboratory Standards* **22**: 15.
- NCCLS (2002b) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard, M38-A. *National Committee on Clinical Laboratory Standards* **22**: 16.
- NCCLS (2003) Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia, and other aerobic actinomycetes; Tentative Standard; approved standard, M24-A. *National Committee on Clinical Laboratory Standards* **23**: 18.
- NCCLS (2006) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, seventh edition M7-A7. *National Committee on Clinical Laboratory Standards* **26**: 2.
- Nelson, P.E., Dignani, M.C., and Anaissie, E.J. (1994) Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev* **7**: 479–504.
- Ortiz, R., Navarrete, H., Navarrete, J., Párraga, M., Carrasco, I., de la Veja, E., et al. (2014) Deterioration, decay and identification of fungi isolated from wooden structures at the Humberstone and Santa Laura saltpeter works: a world heritage site in Chile. *Int Biodeterior Biodegradation* **86**: 309–316.
- Páramo-Aguilera, L., Ortega-Morales, B.O., and Narváez-Zapata, J.A. (2012) Culturable fungi associated with urban stone surfaces in Mexico City. *Electron J Biotechnol* **15**: 4.
- Pimentel, F. (1976) Informe geológico resumido: area San Pedro de Atacama. *Est Atac* **4**: 3–17.
- Pohl, C.H., Kock, J.L.F., and Thibane, V.S. (2011) Antifungal free fatty acids: a review, in Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. In *Microbiology Book Series – Number 3*. Méndez-Vilas, A. (ed.). Formatex Research Center. Barcelona, Spain, pp. 61–71.
- Quang, D.N., Hashimoto, T., Stadler, M., Radubovic, N., and Asakawa, Y. (2005) Antimicrobial azaphilones from the fungus *Hypoxyton multifforme*. *Planta Med* **71**: 1058–1062.
- Romanha, A.J., de Castro, S.L., Soeiro, M.N.C., Lannes-Vieira, J., Ribeiro, I., Talvani, A., et al. (2010) *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **105**: 233–238.
- Rosa, L.H., Vaz, A.B.M., Caligiome, R.B., Campolina, S., and Rosa, C.A. (2009) Endophytic fungi associated with the Antarctic Grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). *Polar Biol* **32**: 161–167.
- Rosa, L.H., Queiroz, S.C.N., Moraes, R.M., Wang, X., Tehen, N., Pan, Z., et al. (2013) *Coniochaeta lignaria*: antifungal activity of the cryptic endophytic fungus associated with autotrophic tissue cultures of the medicinal plant *Smilanthus sonchifolius* (Asteraceae). *Symbiosis* **60**: 133–142.
- Ruibal, C., Gueidan, C., Selbmann, L., Gorbushina, A.A., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., et al. (2009) Phylogeny of rock-inhabiting fungi related to *Dothideomycetes*. *Stud Mycol* **64**: 123–133–S7.
- Seifert, K.A., Nickerson, N.L., Corlett, M., Jackson, E.D., Louis-Seize, G., and Davies, R.J. (2004) *Devriesia*, a new hyphomycete genus to accommodate heat-resistant, dactylosporium-like fungi. *Can J Bot* **82**: 914–926.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731–2739.
- Tang, Y., and Lian, B. (2012) Diversity of endolithic fungal communities in dolomite and limestone rocks from Nanjiang Canyon in Guizhou karst area, China. *Can J Microbiol* **58**: 685–693.
- Warren-Rhodes, K., Rhodes, K.L., Pointing, S.B., Ewing, S., Lacap, D.C., Gomez-Silva, B., et al. (2006) Hypolithic cyanobacteria, dry limit of photosynthesis and microbial ecology in the hyperarid Atacama Desert, Chile. *Microb Ecol* **52**: 389–398.
- Warren-Rhodes, K.A., Rhodes, K.L., Pointing, S.B., Ewing, S.A., Lacap, D.C., Gomez-Silva, B., and McKay, C.P. (2006) Hypolithic cyanobacteria, dry limit of



- photosynthesis, and microbial ecology in the hyperarid Atacama Desert. *Microb Ecol* **52**: 389–398.
- White, T.J., Bruns, T.D., and Lee, S.B. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis, N.A., Gelfand, J., Sninsky, J., et al. (eds). San Diego, CA, USA: Academic Press, pp. 315–322.
- Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z., Binder, M., and Crous, P.W. (2013) *Altemaria* redefined. *Stud Mycol* **75**: 171–212.
- Yaguchi, T., Imanishi, Y., Matsuzawa, T., Hosoya, K., Hitomi, J., and Nakayama, M. (2012) Method for identifying heat-resistant fungi of the genus *Neosartorya*. *J Food Prot* **75**: 1806–1813.
- Yang, S.S., Wang, G.J., Cheng, K.F., Chen, C.H., Ju, Y.M., Tsau, Y.J., and Lee, T.H. (2010) Bioactive  $\gamma$ -lactones from the fermented broth of *Neosartorya* sp. *Planta Med* **76**: 1701–1705.
- Zalar, P., de Hoog, G.S., Schroers, H.J., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., and Gunde-Cimerman, N. (2007) Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Stud Mycol* **58**: 157–183.
- Zotti, M., Machetti, M., Perotti, M., Barabino, G., and Persi, A. (2010) A new species, *Aspergillus persii*, as an agent of onychomycosis. *Med Mycol* **48**: 656–660.

### Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

**Fig. S1.** Macromorphological appearance of the some collected rocks (hand samples): I – Siltstone; II – Typical pyroclastic rock, highlighting the zones accumulation of lithic fragments (dotted yellow trace); III – Pyroclastic rock, highlighting the zones accumulation of lithic fragments (dotted yellow trace) and zones cemented by calcium (yellow arrow); IV – Granodiorite. Micromorphological (optical microscope photomicrograph) appearance of the: A – siltstone in parallel nicols, highlighting the fracture filled by Fe-micromass; B – siltstone in crossed polarized light; C – siltstone in parallel nicols, highlighting the parallel and perpendicular fractures; D – siltstone in parallel nicols, highlighting the some dissolution features in dotted yellow trace (irregular edges, bays and alveoli); E – pyroclastic rock in parallel nicols, highlighting the plagioclase (pg), quartz (qz) and phlogopite (ph)

phenocrysts; F – pyroclastic rock in crossed polarized light; G – pyroclastic rock with a microcrystalline calcium matrix in parallel nicols (left) and crossed polarized light (right); H – pyroclastic rock in parallel nicols with oriented matrix formed by pumice-flow; I and J – pyroclastic rock in parallel nicols highlighting the presence of oxidation zones in the matrix associated by biological colonization (dotted yellow trace); K – granodiorite in parallel nicols highlighting the presence of plagioclase (pg), amphibole (am), quartz (qz) and K-feldspar (mc); L – granodiorite in crossed polarized light highlighting the corroded minerals.

**Fig. S2.** Scanning Electron Microscope (SEM) photomicrograph from thin section showing mineral degraded zones, with dissolving micro-sites, in matrix of pyroclastic rock sample.

**Fig. S3.** Phylogenetic analysis of the sequences of fungi (in bold) associated with rocks from Atacama Desert in comparison with type (T), reference (R) and (OG) out group sequences deposited in the GenBank database. The trees were constructed based on the ITS1-5.8S-ITS2 rRNA gene sequences using the maximum composite likelihood model.

**Fig. S4.** Phylogenetic analysis of the sequences of fungi (in bold) associated with rocks from Atacama Desert in comparison with type (T), reference (R) and (OG) out group sequences deposited in the GenBank database. The trees were constructed based on the  $\beta$ -tubulin rRNA gene sequences of using the maximum composite likelihood model.

**Fig. S5.** Phylogenetic analysis of the sequences of fungi (in bold) associated with rocks from Atacama Desert in comparison with type (T), reference (R) and (OG) out group sequences deposited in the GenBank database. The trees were constructed based on the polymerase II rRNA gene sequences of using the maximum composite likelihood model.

**Fig. S6.** Chemical structures of the bioactive compounds (a) Ergosterol endoperoxide, (b) Linoleic acid and (c) linolenic acid produced by the fungus *Penicillium chrysogenum* UFMGCB 8074.

**Table S1.** Fungal taxa from rocks of Atacama Desert distributed according to their altitude and density.

**Table S2.** Type and chemical composition (%) of the rocks from Atacama Desert and diversity indices of the fungal communities.

**Table S3.** Antifungal activity of the fraction and compounds obtained from *Penicillium chrysogenum* UFMGCB 8074.

**Table S4.** Antibacterial activity of the fraction and compounds obtained from *Penicillium chrysogenum* UFMGCB 8074.

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adalja AA, Sell TK, Bouri N, Franco C. Lessons Learned during Dengue Outbreaks in the United States, 2001–2011. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18(4):608–614.

Ahmad N, Fazal H, Ayaz M, Abbasi BH, Mohammad I, Fazal L . Dengue fever treatment with *Carica papaya* leaves extracts. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2011; 1(4):330–3.

Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(2):376-81.

Alen MM, Schols D. Dengue virus entry as target for antiviral therapy. *J Trop Med.* 2012 (2012).

Amaral R, Tauil PL. Duas ameaças e um mosquito: febre amarela e dengue. *Saúde Bras* 1983; 4:236-8.

Asres K, Bucar F, Kartnig T, Witvrouw M, Pannecouque C, De Clercq E. Antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and type 2 (HIV-2) of ethnobotanically selected Ethiopian medicinal plants. *Phytother Res.* 2001; 15(1):62-9.

Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, Jairungsri A, Kanlaya R, Tangthawornchaikul N, Puttikhunt C, Pattanakitsakul SN, Yenchitsomanus PT, Mongkolsapaya J, Kasinrerak W, Sittisombut N, Husmann M, Blettner M, Vasanawathana S, Bhakdi S, Malasit P. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis.* 2006; 193(8):1078-88.

Baker DD, Chu M, Oza U, Rajgarhia V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Nat Prod Rep.* 2007; 24(6):1225-44.

Barcelos Figueiredo L, Sakamoto T, Leomil Coelho LF, de Oliveira Rocha ES, Gomes Cota MM, Ferreira GP, de Oliveira JG, Kroon EG. Dengue virus 2 American-Asian genotype identified during the 2006/2007 outbreak in Piauí, Brazil reveals a Caribbean route of introduction and dissemination of dengue virus in Brazil. *PLoS One.* 2014; 9(8):e104516.

Barros AV, Conceição AO, Simoni IC, Padilla MA, Fernandes MJB, Arns CW. *In vitro* antiviral activity of seeds from *Guettarda angelica* against avian viruses. *J App Pharmaceut Sci.* 2013; 3:31-33.

- Bartenschlager R, Miller S. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiol.* 2008; 3(2):155-65.
- Barthel A, Gourinat AC, Cazorla C, Joubert C, Dupont-Rouzeyrol M, Descloux E. Breast milk as a possible route of vertical transmission of dengue virus? *Clin Infect Dis.* 2013; 57(3):415-7.
- Beatty ME, Beutels P, Meltzer MI, Shepard DS, Hombach J, Hutubessy R, Dessis D, Coudeville L, Dervaux B, Wichmann O, Margolis HS, Kuritsky JN. Health economics of dengue: a systematic literature review and expert panel's assessment. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84(3):473-88.
- Beaute J, Vong S. Cost and disease burden of dengue in Cambodia. *BMC Public Health.* 2010; 10:521–6.
- Betancur-Galvis LA, Saez J, Granados H, Slazar A, Ossa JE. Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94(4): 531–5.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013; 496(7446):504-7.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária, Brasil. Boletim Epidemiológico – Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica (SE) 51 de 2015. Acesso em Fevereiro de 2016; Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/15/svs2016-be002-dengue-se51.pdf>>.
- Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, Bozza PT, Kubelka CF. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis.* 2008; 8:86.
- Bridges CG, Ahmed SP, Kang MS, Nash RJ, Porter EA, Tyms AS. The effect of oral treatment with 6-O-butanoyl castanospermine (MDL 28,574) in the murine zosteriform model of HSV-1 infection. *Glycobiology.* 1995; 5(2):249-53.
- Bridges CG, Brennan TM, Taylor DL, McPherson M, Tyms AS. The prevention of cell adhesion and the cell-to-cell spread of HIV-1 *in vitro* by the alpha-glucosidase 1 inhibitor, 6-O-butanoyl castanospermine (MDL 28574). *Antivir.* 1994; 25:169–75.
- Bruggisser R, von Daeniken K, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med.* 2002; 68(5):445-8.
- Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33(2): 179–89.

- Chang GJ. Molecular biology of dengue virus. In: Gubler DJ, Kuno G. (Ed). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. CAB Intern.1997; 175-97.
- Chang HM, But PPH. Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica. World Scientific Inc. 1986; 1(2).
- Chattopadhyay D, Naik TN. Antivirals of ethnomedicinal origin: structure-activity relationship and scope. Mini Rev Med Chem. 2007; 7(3):275-301.
- Chen LH, Wilson ME. Transmission of dengue virus without a mosquito vector: nosocomial mucocutaneous transmission and other routes of transmission. Clin Infect Dis. 2004; 39(6):e56-60.
- Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. Nat Med. 1997; 3(8):866-71.
- Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. J Virol. 2006; 80(23):11418-31.
- Cock I, Kalt FR. A modified MS2 bacteriophage plaque reduction assay for the rapid screening of antiviral plant extracts. Pharmacognosy Res. 2010; 2(4):221-8.
- Conley CA, Ishkhanova G, McKay CP, Cullings K. A preliminary survey of non-lichenized fungi cultured from the hyperarid Atacama Desert of Chile. Astrobiology. 2006; 6(4):521-6.
- Courageot MP, Frenkiel MP, Dos Santos CD, Deubel V, Desprès P. Alpha-glucosidase inhibitors reduce dengue virus production by affecting the initial steps of virion morphogenesis in the endoplasmic reticulum. J Virol. 2000; 74(1):564-72.
- Dargan DJ, Subak-Sharpe JH. The effect of triterpenoid compounds on uninfected and herpes simplex virus-infected cells in culture. I. Effect on cell growth, virus particles and virus replication. J Gen Virol. 1985; 66 (Pt 8):1771-84.
- Dev S. Environ. Health Perspect. 1999; 107-783.
- Drumond BP, Mondini A, Schmidt DJ, de Moraes Bronzoni RV, Bosch I, Nogueira ML. Circulation of different lineages of Dengue virus 2, genotype American/Asian in Brazil: dynamics and molecular and phylogenetic characterization. PLoS One. 2013; 8(3):e59422.
- Dulbecco R, Vogt M. Some problems of animal virology as studied by the plaque technique. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1953; (18) 273-79.
- Farnsworth NR. In: Bioactive compounds from plants, Chadwick DJ, Marsh JE. Ciba Foundation Symposium. John Wiley and Sons, Chichester, 1990; 174: 2-21.

Farrar J, Focks D, Gubler D, Barrera R, Guzman MG, Simmons C, Kalayanarooj S, Lum L, McCall PJ, Lloyd L, Horstick O, Dayal-Drager R, Nathan MB, Kroeger A; WHO/TDR Dengue Scientific Working Group. Towards a global dengue research agenda. *Trop Med Int Health*. 2007; 12(6): 695-9.

Fell JW, Scorzetti G, Connell L, Craig S. Biodiversity of micro-eukaryotes in Antarctic Dry Valley soils with <5% soil moisture. *Soil Biology and Biochemistry*. 2006; 38: 3107-19.

Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe*. 2009; 23;5(4):318-28.

Figueiredo LB, Cecílio AB, Ferreira GP, Drumond BP, Oliveira JG, Bonjardim CA, Peregrino Ferreira PC, Kroon EG. Dengue virus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14(2):314-6.

Figueiredo RM, Naveca FG, Bastos MS, Melo MN, Viana SS, Mourão MP, Costa CA, Farias IP. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008b; 14(4):667-9.

Firn RD, Jones CG. Natural products--a simple model to explain chemical diversity. *Nat Prod Rep*. 2003; 20(4): 382-91.

Gabrielsen B, Monath TP, Huggins JW, Kefauver DF, Pettit GR, Groszek G, Hollingshead M, Kirsi JJ, Shannon WM, Schubert EM, *et al*. Antiviral (RNA) activity of selected Amaryllidaceae isoquinoline constituents and synthesis of related substances. *J Nat Prod*. 1992; 55(11):1569-81.

Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krajcar D, Lesnikar V, Klobučar A, Pem-Novosel I, Kurečić-Filipović S, Komparak S, Martić R, Duričić S, Betica-Radić L, Okmadžić J, Vilibić-Čavlek T, Babić-Erceg A, Turković B, Avsić-Županc T, Radić I, Ljubić M, Sarac K, Benić N, Mlinarić-Galinović G. Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. *Euro Surveill*. 2011; 16(9).

Godinho VM, Gonçalves VN, Santiago IF, Figueredo HM, Vitoreli GA, Schaefer CGR, Barbosa EC, Oliveira JG, Alves TMA, Zani CL, ASJ Policarpo, Romanha AJ, Kroon EG, Cantrell CL, Wedge DE, Duke S, Ali A, Rosa CA, Rosa LH. Fungal community present in oligotrophic cold-arid soil of continental Antarctica: taxonomy, diversity and bioprospection for bioactive compounds against neglected tropical diseases, their vectors, and crop pathogens. *Extremophiles*, 2015.

Goel A, Patel DN, Lakhani KK, Agarwal SB, Agarwal A, Singla S, Agarwal R. Dengue fever\_a dangerous foe. *J Indian Acad Clin Med*. 2004; 5(3):247-58.

Gomez-Dantes H, Willoquet JR. Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. *Cad. Saúde Pública*. 2009; 25(suppl-1)S19-S31.

Gonçalves VN, Cantrell CL, Wedge DE, Ferreira MC, Soares MA, Jacob MR, Oliveira FS, Galante D, Rodrigues F, Alves TM, Zani CL, Junior PA, Murta S, Romanha AJ,



- Barbosa EC, Kroon EG, Oliveira JG, Gomez-Silva B, Galetovic A, Rosa CA, Rosa LH. Fungi associated with rocks of the Atacama Desert: taxonomy, distribution, diversity, ecology and bioprospection for bioactive compounds. *Environ Microbiol.* 2016; 18(1):232-45.
- Gould EA, Gallian P, De Lamballerie X, Charrel RN. First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16(12):1702-4.
- Gubler DJ, Clark GG. Community-based integrated control of *Aedes aegypti*: a brief overview of current programs. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 50(6 Suppl):50-60.
- Gubler DJ, Kuno G, Markoff L. Flaviviruses. In DM Knipe, PM Howley. *ED Virology.* Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2007; 1153-1252.
- Gubler DJ. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Trop Med Health.* 2011; 39(4 Suppl):3-11.
- Gubler DJ. Dengue. In: Monath TP (ed) *The Arboviruses: epidemiology and ecology.* CRC Press, Boca Raton. 1989; 2:223–60.
- Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* 2002; 10(2):100-3.
- Gubler DJ. The Economic Burden of Dengue. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86(5):743–4.
- Gutsche I, Coulibaly F, Voss JE, Salmon J, d'Alayer J, Ermonval M, Larquet E, Charneau P, Krey T, Mégret F, Guittet E, Rey FA, Flamand M. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2011; 108(19):8003-8.
- Guy B, Almond JW. Towards a dengue vaccine: progress to date and remaining challenges. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2008; 31(2-3):239-52.
- Guzman A, Isturiz RE. Update on the global spread of dengue. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 36S:S40–S42.
- Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet.* 2015; 385:453–65.
- Gwinn KD, Schardl CL, Friburg A. Southern regional information exchange group (SRIEG-37) on the tall fescue endophyte. *J. Prod. Agric.* 1992;1(5):189–90.
- Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988; 239:476–81.
- Harris AF, Nimmo D, McKemey AR, Kelly N, Scaife S, Donnelly CA, Beech C, Petrie WD, Alphey L. Field performance of engineered male mosquitoes. *Nat Biotechnol.* 2011; 29(11):1034-7.
- Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev.* 1990; 3(4):376-96.

- Hidari KI, Suzuki T. Dengue virus receptor. *Trop Med Health*. 2011; 39(4):37–43.
- Hober D, Poli L, Roblin B, Gestas P, Chungue E, Granic G, Imbert P, Pecarere JL, Vergez-Pascal R, Wattré P, *et al*. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg*. 1993; 48(3):324-31.
- Holmes EC, Burch SS. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends Microbiol*. 2000; 8(2):74-7.
- Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol*. 2003; 3(1):19-28.
- Hudson JB. *Antiviral Compounds from Plants*. Boca Raton, Ann Arbor, Boston: CRC Press. 1999.
- Hughes H, Britton NF. Modelling the use of Wolbachia to control dengue fever transmission. *Bull Math Biol*. 2013; 75(5):796-818.
- Hung JJ, Hsieh MT, Young MJ, Kao CL, King CC, Chang W. An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J Virol*. 2004; 78(1):378-88.
- Hung SL, Lee PL, Chen HW, Chen LK, Kao CL, King CC. Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells. *Virology*. 1999; 257(1):156-67.
- Husson GP, Vilagines P, Sarrete B, Vilagines R. Effet antiviral d'un extrait de bulbe d'Amaryllidaceae sur trois entérovirus et un réoviride. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*. 1991; 2(3):89-99.
- Ieven M, Vlietinck AJ, Vanden Berghe DA, Totte J, Dommissé R, Esmans E, Alderweireldt F. Plant antiviral agents. III. Isolation of alkaloids from *Clivia miniata* Regel (Amaryllidaceae). *J Nat Prod*. 1982; 45(5):564-73.
- Jassim SA, Naji MA. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J Appl Microbiol*. 2003; 95(3):412-27.
- Johansson M, Brooks AJ, Jans DA, Vasudevan SG. A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin-beta and the viral helicase, NS3. *J Gen Virol*. 2001; 82(Pt 4): 735-45.
- Kabanov AS, Kosogova TA, Shishkina LN, Tepliakova TV, Skarnovich MO, Mazurkova NA, Puchkova LI, Malkova EM, Stavskii EA, Drozdov IG. Study of antiviral activity of extracts obtained from basidial fungi against influenza viruses of different subtypes in experiments *in vitro* and *in vivo*. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2011; (1):40-3.

Kadir SL, Yaakob H, Mohamed Zulkifli R. Potential anti-dengue medicinal plants: a review. *J Nat Med.* 2013; 67(4):677-89.

Kapoor M, Zhang L, Ramachandra M, Kusukawa J, Ebner KE, Padmanabhan R. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J Biol Chem.* 1995; 270(32):19100-6.

Kasugai S, Hasegawa N, Ogura H. A simple *in vitro* cytotoxicity test using the MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay: analysis of eugenol toxicity on dental pulp cells (RPC-C2A). *Jpn J Pharmacol.* 1990; 52(1):95-100.

Kiat TS, Pippen R, Yusof R, Ibrahim H, Khalid N, Rahman NA. Inhibitory activity of cyclohexenyl chalcone derivatives and flavonoids of fingerroot, *Boesenbergia rotunda* (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006; 16(12):3337-40.

Klawikkan N, Nukoolkarn V, Jirakanjanakir N, Yoksan S, Wiwat C, Thirapanmethee K. Effect of Thai medicinal plant extracts against *Dengue virus in vitro*. *MU J Pharm.* 2011; 38(1-2):13-8.

Konigheim BS, Beranek M, Comini LR, Aguilar JJ, Marioni J, Cabrera JL, Contigiani MS, Montoya SC. *In vitro* antiviral activity of *Heterophyllaea pustulata* extracts. *Nat Prod Commun.* 2012; 7(8):1025-8.

Koonin EV. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. *J Gen Virol.* 1993; 74 (Pt 4):733-40.

Kott V, Barbini L, Cruanes M, Munoz JD, Vivot E, Cruanes J, Martino V, Ferraro G. Antiviral activity in Argentine medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 64(1):79-84.

Kuadkitkan A, Wikan N, Fongsaran C, Smith DR. Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. *Virology.* 2010; 406(1):149-61.

Kudi AC, Myint SH. Antiviral activity of some Nigerian medicinal plant extracts. *J Ethnopharmacol.* 1999; 68(1-3):289-94.

Kummerer BM, Rice CM. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J. Virol.* 2002; 76(10):4773-84.

Kurolt IC, Betica-Radić L, Daković-Rode O, Franco L, Zelená H, Tenorio A, Markotić A. Molecular characterization of dengue virus 1 from autochthonous dengue fever cases in Croatia. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19(3):E163-5.

- Lam KS. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends Microbiol.* 2007; 15(6):279-89.
- Leardkamolkarn V, Srigulpanit W, Phurimsak C, Kumkate S, Himakoun L, Sripanidkulchai B. The inhibitory actions of *Houttuynia cordata* aqueous extract on *Dengue virus* and Dengue- infected cells. *J Food Biochem.* 2012; 36(1):86–92.
- Lee SH, Tang YQ, Rathkrishnan A, Wang SM, Ong KC, Manikam R, Payne BJ, Jaganath IB, Sekaran SD. Effects of cocktail of four local Malaysian medicinal plants (*Phyllanthus* spp.) against dengue virus 2. *BMC Complement Altern Med.* 2013; 13: 192.
- Lindenbach BD, CL Murray, HJ Thiel, CM Rice. “*Flaviviridae: The Viruses and Their Replication.*” Chapter 26 in DM Knipe *et al.* (ed), *Fields Virology*, 6th Edition. 2013; Lippincott Williams & Wilkins, New York, NY.
- Lindenbach BD, Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol.* 1999; 73(6):4611-21.
- Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res.* 2003; 59:23-61.
- Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. *Flaviviridae: the viruses and their replication.* In Fields BN, Knipe DM, Howley PM. (Ed.). *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2007; 1101-54.
- Lourenço J, Recker M. The 2012 Madeira dengue outbreak: epidemiological determinants and future epidemic potential. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(8):e3083.
- Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med.* 2004; 10(12):98-109.
- Malavige GN, Ranatunga PK, Jayaratne SD, Wijesiriwardana B, Seneviratne SL, Karunatilaka DH. Dengue viral infections as a cause of encephalopathy. *Indian J Med Microbiol.* 2007; 25(2):143-5.
- Mann J. *Murder, Magic, and Medicine.* Oxford University Press: New York, NY, USA, 1994; 164–70.
- Marchand E, Prat C, Jeannin C, Lafont E, Bergmann T, Flusin O, Rizzi J, Roux N, Busso V, Deniau J, Noel H, Vaillant V, Leparç-Goffart I, Six C, Paty MC. Autochthonous case of dengue in France, October 2013. *Euro Surveill.* 2013; 18(50): 20661.
- McMeniman CJ, O'Neill SL. A virulent *Wolbachia* infection decreases the viability of the dengue vector *Aedes aegypti* during periods of embryonic quiescence. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4(7):e748.

- Melino S, Paci M. Progress for dengue virus diseases. Towards the NS2B-NS3pro inhibition for a therapeutic-based approach. *FEBS J.* 2007; 274(12):2986-3002.
- Miller JL, deWet BJM, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, Gordon S. The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages. *PLoS Pathog.* 2008; 4(2):e17.
- Montanari CA, Bolzani VS. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Quím Nova.* 2001; 24(1):105-11.
- Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, vanden Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell.* 2009; 139(7):1268-78.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2):55-63.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3(1):13-22.
- Muliawan SY, Kit LS, Devi S, Hashim O, Yusof R. Inhibitory potential of *Quercus lusitanica* extract on dengue virus type 2 replication. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2006; 37(Suppl3):132-5.
- Müller V, Chávez JH, Reginatto FH, Zucolotto SM, Niero R, Navarro D, Yunes RA, Schenkel EP, Barardi CR, Zanetti CR, Simões CM. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. *Phytother Res.* 2007; 21(10):970-4.
- Muñoz-Jordán JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martínez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, García-Sastre A. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol.* 2005; 79(13):8004-13.
- Muñoz-Jordan JL, Sánchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, García-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(24):14333-8.
- Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med J Armed Forces India.* 2015; 71(1):67-70.
- Nair V, Chi G, Shu Q, Julander J, Smee DF. A heterocyclic molecule with significant activity against dengue virus. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009; 19(5):1425-7.
- Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Desprès P. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* 2003; 4(7):723-8.

Neves-Souza PC, Azeredo EL, Zagne SM, Valls-de-Souza R, Reis SR, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during *in vitro* infection. *BMC Infect Dis.* 2005; 5:64.

Newman DJ. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? *J. Med. Chem.* 2008; 51(9):2589–99.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *J. Nat. Prod.* 2003; 66(7):1022–37.

Nogueira RM, de Araújo JM, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica.* 2007; 22(5):358-63.

Normile D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science.* 2013; 342(6157):415.

Oishi K, Saito M, Mapua CA, Natividad FF. Dengue illness: clinical features and pathogenesis. *J Infect Chemother.* 2007; 13(3):125-33.

Oliveira SQ, Almeida MTR, Maraslis F, Silva IT, Sincero TCM, Palermo JA, Cabrera GM, Caro MSB, Simões CMO, Schenkel EP. Isolation of three new ent-labdane diterpenes from *Dodonaea viscosa Jacquin (Sapindaceae)*: preliminary evaluation of antiherpes activity. *Phytochem Lett.* 2012; (5):500–5.

Ono L, Wollinger W, Rocco IM, Coimbra TL, Gorin PA, Sierakowski MR. *In vitro* and *in vivo* antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). *Antiviral Res.* 2003; 60(3):201-8.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control - New edition. WHO Press Geneva, 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>>. Acesso em: Janeiro de 2015.

Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Preparedness and response for chikungunya virus: introduction in the Americas. Washington (DC): PAHO, 2011. Disponível em: <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=16984&Itemid=&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=16984&Itemid=&lang=en)>.

Ortiz R, Navarrete H, Navarrete J, Párraga M, Carrasco I, de la Vega E, Ortiz M, Herrera P, Blanchette RA. Deterioration, decay and identification of fungi isolated from wooden structures at the Humberstone and Santa Laura saltpeter works: A world heritage site in Chile. *Intern Biodeterioration and Biodegradation.* 2014; 86C:309–16.

Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. [Preliminary report]. *Rev Inst Med Trop.* 1983; 25(1):53-4.

Parida MM, Upadhyay C, Pandya G, Jana AM. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on Dengue virus type-2 replication. *J Ethnopharmacol.* 2002; (79):273–8.

Pasquale A. Pharmacognosy: the oldest modern science. *J Ethnopharmacol.* 1984; 11(1):1-16.

Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes and Infection.* 2009; 11:1177-85

Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Res.* 2008; 80(1):11-22.

Petrini O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In *Microbiology of Phyllosphere*; Fokkema NJ, van den Heuvel J, Eds: Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1986; 175–87.

Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7(5):319-27.

Posakony JW, England JM, Attardi G. Mitochondrial growth and division during the cell cycle in HeLa cells. *J Cell Biol.* 1977; 74(2):468–91.

Qamar MT ul, Mumtaz A, Ashfaq UA, Adeel MM, Fatima T. Potential of plant alkaloids as dengue ns3 protease inhibitors: Molecular docking and simulation approach. *Bangladesh J Pharmacol.* 2014; 9(3):262-67.

Qi RF, Zhang L, Chi CW. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008; 40(2):91-101.

Rahman MA, Mossa JS, Al-Said MS, Al-Yahya MA. Medicinal plant diversity in the flora of Saudi Arabia 1: a report on seven plant families. *Fitoterapia.* 2004; 75(2):149-61.

Rates SM. Plants as source of drugs. *Toxicon.* 2001; 39(5):603-13.

Ray D, Shi PY. Recent advances in flavivirus antiviral drug discovery and vaccine development. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2006; 1(1):45-55.

Reis SR, Valente LM, Sampaio AL, Siani AC, Gandini M, Azeredo EL, D'Avila LA, Mazzei JL, Henriques Md, Kubelka CF. Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. *Int Immunopharmacol.* 2008; 8(3):468-76.

Renard-Nozaki J, Kim T, Imakura Y, Kihara M, Kobayashi S. Effect of alkaloids isolated from *Amaryllidaceae* on Herpes Simplex Virus. *Research in Virol.* 1989; 140:115-28.

Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, Silvi G, Angelini P, Dottori M, Ciufolini MG, Majori GC,

- Cassone A; CHIKV study group. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*. 2007; 370(9602):1840-6.
- Rishton GM. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. *Am J Cardiol*. 2008; 101(10A):43D-49D.
- Rodenhuis-Zybert IA, van der Schaar HM, da Silva Voorham JM, van der Ende-Metselaar H, Lei HY, Wilschut J, Smit JM. Immature dengue virus: a veiled pathogen? *PLoS Pathog*. 2010; 6(1):e1000718.
- Rodriguez DJ, Chulia J, Simões CM, Amoros M, Mariotte AM, Girre L. Search for "*in vitro*" antiviral activity of a new isoflavonic glycoside from *Ulex europaeus*. *Planta Med*. 1990; 56(1):59-62.
- Santos FB, Nogueira FB, Castro MG, Nunes PC, de Filippis AM, Faria NR, Simões JB, Sampaio SA, Santos CR, Nogueira RM. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virology*. 2011; 8:387.
- Satchidanandam V, Uchil PD, Kumar P. Organization of flaviviral replicase proteins in virus-induced membranes: a role for NS1' in Japanese encephalitis virus RNA synthesis. *Novartis Found Symp*. 2006; 277:136-45.
- Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Rosa APAT. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1986; 81:245-6.
- Schmidt-Chanasit J, Emmerich P, Tappe D, Gunther S, Schmidt S, Wolff D, Hentschel K, Sagebiel D, Schoneberg I, Stark K, Frank C. Autochthonous dengue virus infection in Japan imported into Germany. *Eurosurveill*. 2014; 19(3).
- Schultes RE, Raffauf RF. *The Healing Forest*. Dioscorides. Press, Portland, 1990.
- Scott RM, Nisalak A, Cheamudon U, Seridhoranakul S, Nimmannitya S. Isolation of dengue viruses from peripheral blood leukocytes of patients with hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 1980; 141:1-6.
- Semple SJ, Reynolds GD, O'Leary MC, Flower RL. Screening of Australian medicinal plants for antiviral activity. *J Ethnopharmacol*. 1998; 60(2):163-72.
- Shibnev VA, Mishin DV, Garaev TM, Finogenova NP, Botikov AG, Deryabin PG. Antiviral activity of *Inonotus obliquus* fungus extract towards infection caused by hepatitis C virus in cell cultures. *Bull Exp Biol Med*. 2011; 151(5):612-614.
- Silveira CS, Martins FO, Costa CS, Romanos MTV, Kaplan MAC, Menezes FS. *In vitro* cytotoxic, antioxidant and antiviral effects of *Pterocaulon alopecuroides* and *Bidens segetum* extracts. *Brazilian J Pharmacognosy*. 2009; 19(2a):343-348.
- Singh SB, Barrett JF. Empirical antibacterial drug discovery--foundation in natural products. *Biochem Pharmacol*. 2006; 71(7):1006-15.
- Sneader W. *Drug discovery: a history*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2005.



Souza LJ, Nogueira RM, Soares LC, Soares CE, Ribas BF, Alves FP, Vieira FR, Pessanha FE. The impact of dengue on liver function as evaluated by aminotransferase levels. *Braz J Infect Dis.* 2007; 11(4):407-10.

Souza RP, Rocco IM, Maeda AY, Spenassatto C, Bisordi I, Suzuki A, Silveira VR, Silva SJ, Azevedo RM, Tolentino FM, Assis JC, Bassi MG, Dambrós BP, Tumoto GL, Gregianini TS, Souza LT, Timenetsky Mdo C, Santos CL. Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: looking beyond the veil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(12):e1439.

Stamets P. Novel Antimicrobials from mushrooms. *Herbal Gram.* 2002; 54:28–33.

Sunazuka T, Hirose T, Omura S. Efficient total synthesis of novel bioactive microbial metabolites. *Acc. Chem. Res.* 2008; 41(2):302–14.

Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep.* 2001; 18(4):448-59.

Tang LI, Ling AP, Koh RY, Chye SM, Voon KG. Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. *BMC Complement Altern Med.* 2012; 12:3.

Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med.* 2003; 197(7):823-9.

Teets FD, Ramgopal MN, Sweeney KD, Graham AS, Michael SF, Isern S. Origin of the dengue virus outbreak in Martin County, Florida, USA 2013. *Viol Rep.* 2014; 1-2:2-8.

Teixeira MG, Costa Mda C, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica.* 2009; 25(Suppl1):S7-18.

Teixeira RR, Pereira WL, Oliveira AF, da Silva AM, de Oliveira AS, da Silva ML, da Silva CC, de Paula SO. Natural products as source of potential dengue antivirals. *Molecules.* 2014; 19(6):8151-76.

Teo D, Ng LC, Lam S. Is dengue a threat to the blood supply? *Transfusion Medicine (Oxford, England)* 2009; 19(2):66-77.

Vanden Berghe DA, Haemers A, Vlietinck AJ. Antiviral agents from higher plants and an example of structure-activity relationship of 3-methoxyflavones. In: Colegate SM, Molyneux RJ (Eds.), *Bioactive Natural Products. Detection, Isolation, and Structural Determination.* CRC Press. Boca Raton; 1993; 405–40.

Vasilakis N, Shell EJ, Fokam EB, Mason PW, Hanley KA, Estes DM, Weaver SC. Potential of ancestral sylvatic dengue-2 viruses to re-emerge. *Virology.* 2007; 358(2):402-12.

Veiga-Junior VF. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira Farmacogn. Braz J. Pharmacogn.* 2008; 18(2).

Verma R, Sahu R, Holla V. Neurological manifestations of dengue infection: a review. *J Neurol Sci.* 2014; 346 (1-2):26-34.

Villar L, Dayan GH, Arredondo-García JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, Reynales H, Costa MS, Morales-Ramírez JO, Carrasquilla G, Rey LC, Dietze R, Luz K, Rivas E, Miranda Montoya MC, Cortés Supelano M, Zambrano B, Langevin E, Boaz M, Tornieporth N, Saville M, Noriega F, CYD15 Study Group. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N Engl J Med.* 2015; 372(2):113-23.

Visintini Jaime MF, Redko F, Muschietti LV, Campos RH, Martino VS, Cavallaro LV. In vitro antiviral activity of plant extracts from Asteraceae medicinal plants. *Virology J.* 2013; 10:245.

Watts DM, Burke DS, Harrison BA, Whitemire R, Nisalak A. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; 36(1):143–52.

Whitehorn J, Simmons CP. The pathogenesis of dengue. *Vaccine.* 2011; 29(42): 7221-8.

Wilson RM, Danishefsky SJ. Small molecule natural products in the discovery of therapeutic agents: the synthesis connection. *J. Org. Chem.* 2006; 71(22):8329–51.

Yamashita Y, Shimokata K, Mizuno S, Daikoku T, Tsurumi T, Y Nishiyama. Calnexin Acts as a Molecular Chaperone during the Folding of Glycoprotein B of Human Cytomegalovirus. *J Virol.* 1996; 70(4):2237–46.

Yauch LE, Shresta S. Dengue virus vaccine development. *Adv Virus Res.* 2014; 88:315-72.

Yunes RA, Cechinel Filho V. Em Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Yunes RA, Calixto JB, eds.; 1ª ed.; Ed. Argos: Chapecó, 2001; 24:147

Zjawiony JK. Biologically active compounds from *Aphylllophorales* (polypore) fungi. *J Nat Prod.* 2004; 67(2):300-10.