



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



Maria Dolores Pinheiro Fonseca

ESTUDO DA DIVERSIDADE E ATIVIDADE LARVICIDA DE
AGARICOMYCETES LIGNOLÍTICOS (BASIDIOMYCOTA) NO
ESTADO DO AMAZONAS

Manaus
Maior/2016

Maria Dolores Pinheiro Fonseca

**ESTUDO DA DIVERSIDADE E ATIVIDADE LARVICIDA DE
AGARICOMYCETES LIGNOLÍTICOS (BASIDIOMYCOTA) NO
ESTADO DO AMAZONAS**

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

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo- ESALQ

Co-Orientadora: Profa. Dra. Antonia Queiroz de Lima Souza-UFAM

Co-Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Baphista Gibertoni-UFPE

**Manaus
Maio/2016**

Ficha Catalográfica

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

F676e Fonseca, Maria Dolores Pinheiro
Estudo da Diversidade e Atividade Larvícida de Agaricomycetes
Lignolíticos (Basidiomycota) No Estado do Amazonas / Maria
Dolores Pinheiro Fonseca. 2016
92 f.: il.; 31 cm.

Orientador: João Lúcio de Azevedo
Coorientadora: Antonia Queiroz de Lima Souza
Coorientador: Tatiana Baphista Gibertoni
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede
Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Agaricomycetes. 2. Diversidade. 3. Taxonomia. 4. Larvícida. 5.
Aedes aegypti. I. Azevedo, João Lúcio de II. Universidade Federal
do Amazonas III. Título

MARIA DOLORES PINHEIRO FONSECA

**ESTUDO DA DIVERSIDADE E ATIVIDADE LARVICIDA DE
AGARICOMYCETES LIGNOCELULOLÍTICOS (BASIDIOMYCOTINA) NO
ESTADO DO AMAZONAS**

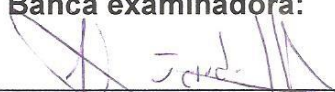
Tese de doutorado apresentada ao Curso de
Doutorado do Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de
Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia
Legal, na Universidade do Estado do
Amazonas, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutora em Conservação
e Uso da Biodiversidade.

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

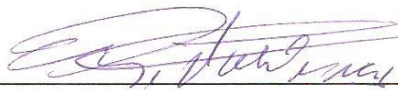
Co-orientadora: Profa. Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza

Co-orientadora: Profa. Dra. Tatiana Baphista Gibertoni

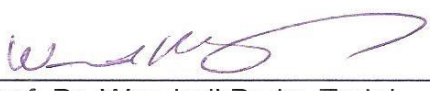
Banca examinadora:



Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
Orientador – Presidente da banca



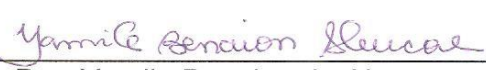
Prof. Dr. José Odair Pereira
Membro



Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei
Membro



Prof. Dr. Ademir Castro e Silva
Membro



Profa. Dra. Yamile Benaion de Alencar
Membro

Lista de Figuras

- Figura 1:** Mapa do estado do Amazonas e seus possui 62 municípios, nos quais 12 foram visitados para coleta. Fonte: www.guiageo.com/amazonas.htm. 29
- Figura 2:** *Punctularia* sp. Aspecto macroscópico do (A) Basidioma, (B) da superfície himenial foram coletados espécimes no minicipio de Borba, Manicoré, Coari e Nova Olinda do Norte. Cultura pura cultivada em meio BDL (Batata, Dextrose, Extrato de Levedura), (C) 5 dias de crescimento, (D) 10 dias de crescimento no escuro a 28 °C. 47
- Figura 3:** *Daedaleopsis flavida*. Aspecto macroscópico do (A) Basidioma, (B) da superfície himenial espécime coletado no minicipio de Parintins. Cultura pura cultivada em meio BDL (Batata, Dextrose, Extrato de Levedura), (C) 10 dias de crescimento, (D) 20 dias de crescimento no escuro a 28 °C. 47
- Figura 4:** *Schizophyllum commune*. Aspecto macroscópico do (A) Basidioma, (B) da superfície himenial espécime coletados nos minicipio de Coari-Am, Careiro da Várzea, Anamã, Autazes, Parintins, Borba, Barcelos, Nova Olinda do Norte, Manaus, Manicoré, Novo Aripuanã. Cultura pura cultivada em meio BDL (Batata, Dextrose, Extrato de Levedura), (C) 15 dias de crescimento, (D) 30 dias de crescimento no escuro a 28 °C (formou corpo de frutificação (Basidioma). 48
- Figura 5:** *Pycnoporus sanguineus*. Aspecto macroscópico do (A) Basidioma, (B) da superfície himenial espécime coletados nos minicipios de Anamã, Autazes, Borba, Manaus BR 174, Coari, Manicoré, Nova Olinda do Norte, Novo Aripuanã, Parintins, Barcelos e Presidente Figueiredo. Cultura pura cultivada em meio BDL (Batata, Dextrose, Extrato de Levedura), (C) 10 dias de crescimento, (D) 20 dias de crescimento no escuro a 28 °C. 48
- Figura 6:** Perfil eletroforético em gel agarose 0,8% corado com gel red da extração de DNA das amostras de Agaricomycetes. Poço 1-Marcador molecular de 1Kb, os seguintes, as demais amostras. 49
- Figura 7:** Reconstrução filogenética da família Polyporaceae a partir do alinhamento dos nucleotídeos relativos aos fragmentos da região ITS (rDNA). Valores de *bootstrap* foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (1.000.000 *bootstrap*). Duas sequências da espécie (*Boletopsis leucomelaena* e *Hydnellum geogenium*) foram utilizados como grupo externo. Em negrito, apresentam-se as sequências obtidas neste trabalho. 53
- Figura 8:** Reconstrução filogenética da família Ganodermataceae a partir do alinhamento dos nucleotídeos relativos aos fragmentos da região ITS (rDNA). Valores de *bootstrap* foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (1.000.000 *bootstrap*). Três sequências da espécie (*Perenniporia medulla-panis*) foram utilizadas como grupo externo. Em negrito, apresentam-se as sequências obtidas neste trabalho. 56
- Figura 9:** Reconstrução filogenética da família Fomitopsidaceae a partir do alinhamento dos nucleotídeos relativos aos fragmentos da região ITS (rDNA). Valores de *bootstrap* foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (1.000.000 *bootstrap*). Duas sequências da espécie (*Trametes versicolor*) foram utilizadas como grupo externo. Em negrito, apresentam-se as sequências obtidas neste trabalho. 57
- Figura 10:** Reconstrução filogenética da família Stereaceae a partir do alinhamento dos nucleotídeos relativos aos fragmentos da região ITS (rDNA). Valores de *bootstrap* foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (1.000.000 *bootstrap*). Duas sequências das espécies (*Laxitextum incrustatum* e *Laxitextum bicolor*) foram utilizadas como grupo externo. Em negrito, apresentam-se a sequência obtidas neste trabalho. 58

- Figura 11:** Reconstrução filogenética da família Meruliaceae a partir do alinhamento dos nucleotídeos relativos aos fragmentos da região *ITS* (rDNA). Valores de *bootstrap* foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (1.000.000 *bootstrap*). Duas sequências da espécie (*Trametes versicolor*) foram utilizadas como grupo externo. Em negrito, apresentam-se as sequências obtidas neste trabalho. 59
- Figura 12:** Reconstrução filogenética da família Pleurotaceae a partir do alinhamento dos nucleotídeos relativos aos fragmentos da região *Its* (rDNA). Valores de *bootstrap* foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (1.000.000 *bootstrap*). Sequência da espécie de *Trametes versicolor* foi utilizada como grupo externo. Em negrito, apresentam-se as sequências obtidas neste trabalho. 60
- Figura 13:** Reconstrução filogenética de *Sebipora* pertencente a ordem Polyporales a partir do alinhamento dos nucleotídeos relativos aos fragmentos da região *Its* (rDNA). Valores de *bootstrap* foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (1.000.000 *bootstrap*). Duas sequências da espécie (*Trametes versicolor*) foram utilizadas como grupo externo. Em negrito, apresenta-se a sequência obtida neste trabalho. 61
- Figura 14:** Reconstrução filogenética da família Schizophyllaceae a partir do alinhamento dos nucleotídeos relativos aos fragmentos da região *Its* (rDNA). Valores de *bootstrap* foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (1.000.000 *bootstrap*). Sequência da espécie de *Trametes versicolor* foi utilizada como grupo externo. Em negrito, apresentam-se as sequências obtidas neste trabalho. 62
- Figura 15:** Dendograma por espectrometria de massa, MALDI-TOF de Agaricomycetes isolados no Estado do Amazonas, adquiridos com uma matriz DHB em escala de massa de peptídeo até m/z 2000. 64
- Figura 16:** Apresenta os espectros de massa analisados por MALDI-TOF das amostras dos Agaricomycetes. O último espectro de cor amarela indica a amostra controle de *Escherichia coli*. 65
- Figura 17:** Exemplo de uma análise da espectrometria de massa dos peptídeos que formam uma escala de massa de compostos da espécie *Trametes elegans* D030 com *T. elegans* D078. Os picos (íons) detectados são destacados em azul e amarelo. Considerando que os picos mais elevados indicam a correspondência de posições de pico entre ambas as espécies nos espectros. 66
- Figura 18:** Regressão linear dose-probit da mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* observados em bioensaios com extratos oriundos do micélio de Agaricomycetes sendo A=24 horas de observação e B=48 horas de observação gráficas dos resultados de dose/resposta no intervalo de 24 horas com valores de Probit dos extratos oriundos do micélio de Agaricomycetes contra larvas de 3º estágio de *A. aegypti*. 71

Lista de Tabelas

Tabela 1: Cálculo da reação de amplificação do PCR para as amostras fúngicas.	34
Tabela 2: Quantidade de espécimes táxon e família identificados, coletados nos municípios de Autazes; Anamá; Careiro da várzea; Coari; Barcelos; Borba; Novo Aripuanã; Nova Olinda do Norte; Manaus; Manicoré; Parintins e Presidente Figueiredo. As novas ocorrências no estado, as ocorrências para o norte do país e literaturas consultadas.	41
Tabela 3: Culturas puras dos Agaricomycetes oriundas dos isolados e breve descrição morfológica das colônias.	46
Tabela 4: Lista de espécies de Agaricomycetes isolados e oriundas do GenBank utilizadas na análise molecular para construção das árvores filogenéticas a partir do método de máxima verossimilhança (ML).	50
Tabela 5: Código e nome científico dos extratos fúngicos promissores para o controle de larvas, selecionados os que apresentaram melhores resultados de mortalidades controle de larvas de <i>A. aegypti</i> , utilizados nos bioensaios.	68
Tabela 6: Porcentagens de mortalidade observados nos bioensaios utilizando os extratos miceliais fúngicos contra larvas de <i>A. aegypti</i> (cepa Rockfeller).	69
Tabela 7: Concentração letal de extratos de fungos encontradas em testes com larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 JUSTIFICATIVA	13
3 OBJETIVOS	14
3. 1 Geral	14
3. 2 Específicos	14
4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
4. 1 Estado do Amazonas	15
4. 2 Principais Características dos Agaricomycetes Lignolíticos	15
4. 3 Ecologia dos Agaricomycetes Lignolíticos	17
4. 4 Importância Econômica de Agaricomycetes Lignolíticos	18
4. 5 Ocorrências de Agaricomycetes na Região Norte - Amazônia	19
4. 6 <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus, 1762	20
4. 6. 1 Ecologia e Biologia do Vetor	20
4. 6. 2 Dengue, Chikungunya e Zika	22
4. 7 Dengue, Chikungunya e Zika em Manaus –Amazonas	23
4. 8 Controle de Vetores	24
4. 9 Importância dos Extratos Fúngicos: Larvicidas	26
5 METODOLOGIA	28
5. 1 Áreas de Coleta e Procedimentos	28
5. 2 Identificação Taxonômica Clássica	29
5. 3 Preparo dos Cultivos	30
5. 3. 1 Produção de Metabólitos Extrato Fúngico	30
5. 3. 2 Preparos de Culturas para Extração de DNA	31
5. 4 Identificação Taxonômica Molecular	31
5. 4. 1 Extração de DNA	31
5. 4. 2 Quantificações do DNA	32
5. 4. 3 Purificação e Sequenciamento do DNA por PCR ExoSAP	33
5. 4. 4 Identificação Molecular	33
5. 5 Identificação pela Técnica de MALDI-TOF Espectrometria de Massa	34
5. 6 Preservação e Exsiccatas dos Agaricomycetes	34
5. 7 Testes de Patogenicidade e Atividade larvicida	35
5. 8 Concentrações Letais (CL50 - CL90) e Análise	36
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6. 1 Diversidade e Identificação Taxonômica Clássica	37
6. 2 Isolamento	45
6. 2. 1 Culturas Puras	45
6. 3 Análise Molecular	48
6. 4 Análise por MALDI-TOF Espectrometria de Massa	63
6. 5 Atividade Larvicida	67
7 CONCLUSÕES	73
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	74
ANEXOS	

RESUMO

Os estudos sobre a biodiversidade são de suma importância para a utilização racional dos recursos naturais, principalmente em regiões mega-diversas, como a Amazônia. O estudo da diversidade de fungos Agaricomycetes é importante para contribuir com o conhecimento sobre a diversidade destes no Estado do Amazonas e apresentar novos registros para a região. A relevância dessa pesquisa está em contribuir para o conhecimento da biodiversidade e da prospecção de produtos bioativos, identificando fungos Agaricomycetes degradadores de madeira com potencial inseticida contra larvas do mosquito transmissor do vírus da dengue, chikungunya e zika o *Aedes aegypti*. A metodologia utilizada para identificação taxonômica clássica foi realizada através de análises dos basidiomas macro e microscopicamente, A partir das coletas realizadas em 12 municípios do Estado do Amazonas (Autazes; Anamá; Careiro da várzea; Coari; Barcelos; Borba; Novo Aripuanã; Nova Olinda do Norte; Manaus; Manicoré; Parintins e Presidente Figueiredo) no período de janeiro a março de 2013 e de janeiro a maio de 2014. Nesse sentido, foi possível expandir o conhecimento sobre a diversidade de Agaricomycetes na região. Foram coletados 323 espécimes, destes foram identificados 263, representados por 40 gêneros, 76 espécies, classificadas em 15 famílias e 4 ordens de Agaricomycetes. Os basidiocarpos saudáveis foram isolados, dos quais foram obtidas 43 culturas puras. Estes foram utilizados na produção de extratos, identificação molecular e identificação por MALDI- TOF. A identificação molecular foi através do sequenciamento das regiões *Its 1 e 2* do rDNA, e pela técnica de MALDI TOF Espectrometria de Massa. As análises da identificação molecular foram realizadas por comparação das sequências depositadas no GenBank. O resultado do sequenciamento molecular permitiu um alinhamento com as sequências nucleotídicas que corresponde a identificação dos fungos como sendo do grupo Agaricomycetes, com taxa de similaridade acima de 96 %. Na técnica de MALDI TOF apenas 26 espécimes foram possíveis ser submetidas à análise IC /MALDI TOF MS. Foram obtidos dados espectrais com padrões de pico (íons) exclusivo para os fungos com similaridade das misturas de proteínas, o que refere-se a porcentagem de identidade para a quantidade de valores idênticos em massa. A atividade larvicida apresentou-se eficaz, seis fungos apresentaram substâncias bioativas com potencialidade letal contra larvas de 3º estágio de *A. aegypti*. O extrato de *P. sanguineus*, apresentou mortalidade de 5,3 probit para larvas de *A. aegypti*, o que confere a este fungo, um potencial entomopatogênico bastante expressivo. Os demais extratos não foram possíveis de análise sendo necessário para avaliação, e aumento do número amostral.

Palavras Chave: Agaricomycetes, diversidade, taxonomia, larvicida, *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Studies on biodiversity has great importance to the rational use of natural resources, especially in mega-diverse regions such as the Amazonia. The study of fungal diversity Agaricomycetes is important to contribute with the knowledge of the diversity of them in the state of Amazon and introduce new records to the region. The relevance of this research is to contribute to the knowledge about biodiversity and the prospect of bioactive products, identifying fungi Agaricomycetes wood-degrading potential insecticide against larvae of mosquito of dengue virus, chikungunya and zika the *Aedes aegypti*. The methodology used for classical taxonomic identification was performed through analysis of macro-and microscopically, basidiomatas from the collections held in 12 municipalities of the state of Amazon (Autazes; Anamã; Careiro da várzea; Coari; Babu; Borba; Novo Aripuanã; Nova Olinda do Norte; Manaus; Manicoré; Parintins and Presidente Figueiredo) in the period from January to March 2013 and from January to May 2014. In that sense, it was possible to expand knowledge about the diversity of the Agaricomycetes. 323 specimens were collected, 263 of them were identified, represented by 40 genera, 76 species, classified into 15 families and 4 orders of Agaricomycetes. The healthy basidiocarps were recovered, of which 43 were pure cultures. These were used for the production of extracts, molecular identification and identification by MALDI-TOF. Molecular identification was through the sequencing of the *Its* regions 1 and 2 of the rDNA, and by MALDI TOF mass spectrometry. Molecular identification analyses were performed by comparison of the sequences deposited in GenBank. The result of the molecular sequencing allowed an alignment with the nucleotide sequences that matches the identification of fungi as being of the group, the Agaricomycetes similarity above 96 %. In MALDI TOF only 26 specimens were possible be submitted to IC/MALDI TOF MS analysis. Spectral data were obtained with peak patterns (ions) exclusive to fungi with similarity of protein mixtures, which refers to the percentage of identity for the amount of identical values. Larvicidal activity performed effectively, six fungi showed bioactive compounds with lethal capability against larvae of third stage of *A. aegypti*. The extract of *P. sanguineus*, presented mortality of probit to 5.3 larvae of *A. aegypti*, which gives this fungus, a potential entomopatogênico quite expressive. The other extracts were not possible being necessary for analysis, evaluation and increased sample number.

Key words: Agaricomycetes, diversity, taxonomy, larvicidal, *Aedes aegypti*.

1 INTRODUÇÃO

Biodiversidade é uma medida da variação ou variabilidade existente entre as espécies de seres vivos (AZEVEDO, 1999; SENNA e col., 2013). O termo foi usado pela primeira vez em 1986, resultado da contração das palavras "diversidade biológica" ou "diversidade biótica", e mede, em princípio, toda a variação biológica do planeta Terra (AZEVEDO e col., 2002). O conhecimento sobre biodiversidade é ainda precário e fragmentado, principalmente em regiões mega-diversas, como o Brasil, nas quais a rapidez das alterações ambientais confere urgência à necessidade do reconhecimento de sua biota (RICCARDI e BASHORE, 2003). Apesar da mega-diversidade de fungos tropicais ser amplamente reconhecida, existe a necessidade de amplitude no conhecimento sobre as espécies, e da relação destas com os organismos sobre os quais convivem.

Os fungos compreendem um dos maiores grupos de organismos do planeta em número de espécies, participam praticamente de quase todas as modificações físicas ou químicas na natureza, pois são decompositores importantes nos ecossistemas e associados essencialmente a muitos organismos (BLACKWELL, 2011; FLOUDAS, e col., 2015). Há aproximadamente duas décadas foi estimado existir 1,5 milhões de fungos na Terra. Porque apenas 70 mil fungos haviam sido descritos na época, a estimativa foi o impulso para pesquisar fungos até então desconhecidos. Estimativas mais recentes com base em métodos de sequenciamento sugerem que existam até 5,1 milhões de espécies de Fungos (BLACKWELL, 2011). Os fungos são recursos de uso potencial nas indústrias alimentícia, farmacêutica (antifúngicos, antibacterianos e metabólitos secundários) e cosmética, ainda como nutracêuticos e nutraceuticos (HYDE, e col., 2010; PETRE, e col., 2014). Também são utilizados na recuperação ambiental, em processos de biodegradação e biorremediação (HORTÊNCIO, 2009), bem como na produtividade e sustentabilidade dos recursos naturais.

Inventariar a diversidade de espécies fúngicas é um levantamento sistêmico de dados inter-relacionados que retratam um bem cultural de extrema importância, pois coleções científicas são um registro permanente da herança natural do planeta e a base para o desenvolvimento de grande parte das pesquisas. Visa o conhecimento e a proteção do acervo científico de determinada região e requer estudo de habitats, principalmente tropicais (BLACKWELL, 2011; SENNA e col., 2013).

A taxonomia é um sistema de referência para toda a biologia, e com o surgimento de novas técnicas e conceitos como a microscopia eletrônica, a sistemática filogenética e a biologia molecular, promoveu-se profundas alterações nos sistemas de classificação (LIPSCOMB e col., 2003, BASEIA, 2007, CARVALHO e col., 2007). Nos dias atuais, tornou-se comum um periódico científico estabelecer em seu escopo que não mais aceita artigos meramente taxonômicos, demonstrando o desinteresse da comunidade científica pela “simples” taxonomia. A crise da taxonomia tornou-se a crise da biodiversidade, uma vez que, diariamente, diversos ambientes são completamente destruídos sem que sua fauna, flora e microbiota tenham sido levantadas e catalogadas (SENNA e col., 2013). Faz-se então, necessário catalogar as espécies fúngicas com simultânea elaboração de bancos de dados.

Os Agaricomycetes são fungos popularmente conhecidos como cogumelos, orelha de pau ou urupê e formam um grupo com mais de 2.200 espécies distribuídas por todo o mundo. Estão incluídos, de acordo com Kirk e col. (2008), no filo Basidiomycota, classe Agaricomycetes e distribuídos em seis ordens: Corticiales, Gloeophyllales, Hymenochaetales, Polyporales, Russulales e Trechisporales. A maioria das espécies do filo Basidiomycota e aproximadamente 98% das espécies do subfilo Agaricomycotina conhecidas são da classe Agaricomycetes. Os Agaricomycetes compreendem todos os fungos do filo Basidiomycota que formam basidiomas, com himênio definido (HIBBETT e col., 2007; HIBBETT e col., 2014). Dentre os Basidiomycota, os Agaricomycetes lignolíticos representam os fungos com papel fundamental na decomposição e reciclagem de nutrientes. Sabe-se que espécies de Basidiomycetes lignocelulolíticos são abundantes em todos os tipos de florestas e os maiores decompositores de madeira (BODDY e JONES, 2008; BOER e VAN DER VAL, 2008; FLOUDAS e col., 2012.), também podendo ainda ser fitopatógenos (STALPERS e LOERAKKER, 1982, RAYMUNDO e col., 2013). A maioria das espécies possui complexo enzimático que incluem lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase (AGUIAR e FERRAZ, 2007; GERLACH e col., 2013), enzimas capazes de degradar compostos químicos recalcitrantes como a lignina e os polifenóis das plantas (SOUZA e ROSAD, 2009).

Os fungos degradadores de madeira juntamente com as algumas bactérias são aparentemente os únicos organismos capazes de decompor totalmente a lignina (HOLF e col., 2004). Além da importância biológica, os Agaricomycetes têm recebido especial atenção na pesquisa científica durante as duas últimas décadas, no que diz respeito ao seu potencial de aplicabilidade tanto no tratamento de contaminantes ambientais, como biorremediadores do

solo por exemplo, como na produção de antibióticos (SCHMIT e MUELLER, 2007; PETRE e col., 2014). Esses fungos são conhecidos pelo seu valor nutricional e medicinal, apesar dos mecanismos por trás destas atividades não serem completamente conhecidos. Durante as últimas décadas são vários os países envolvidos em pesquisa com polissacarídeos com atividade biológica, extraídos por fungo Agaricomycetes, desde o Japão, China, Coreia do Sul e em 2007 os EUA (CUI e col., 2007).

Com o intuito de conseguir maior eficácia de programas de controle de vetores, há necessidade da busca de medidas alternativas que sejam oriundas da biodiversidade Amazônica. A necessidade de reduzir o consumo de agroquímicos tem aumentado o interesse por estratégias de controle biológico de pragas e de vetores de doenças. O controle de pragas e doenças por meio do controle biológico pode ser feito alterando as condições ambientais que possibilitam o aparecimento de vetores. O controle de insetos sejam eles nocivos à agricultura ou vetores de doenças, é feito, atualmente, na sua maioria, por produtos químicos. O uso desses inseticidas vem causando danos aos seres vivos e ao meio ambiente, contaminando alimento, solo, água e favorecendo uma rápida seleção de insetos resistentes (ARANTES e col., 2002). Esse controle biológico pode ser feito alterando as condições ambientais que possibilitam o aparecimento de praga ou da doença, ou utilizando micro-organismos com propriedades antagônicas a pestes (AZEVEDO e col., 2002).

O interesse desta pesquisa é colaborar com o conhecimento da diversidade de Agaricomycetes no estado do Amazonas, bem como, apresentar novos registros para a região e contribuir para a prospecção de produtos da biodiversidade Amazônica, identificando fungos com potencial larvicida para o controle de mosquitos que transmitem doenças, em especial as arboviroses, onde está inserido o vírus da dengue, chikungunya e zika. Portanto, para se conseguir uma maior eficácia dos programas de controle de vetores, há necessidade da busca de medidas alternativas.

2 JUSTIFICATIVA

O conhecimento sobre a biodiversidade amazônica ainda é restrito devido às constantes alterações ambientais, falta de coleta de espécimes, falta de investimento financeiro e falta de pesquisadores o que contribui para baixa produção científica. Existe a necessidade do conhecimento de sua micobiota, tornando-se assim, imprescindível avaliar a diversidade fúngica desta região. Segundo Moore e Frazer (2002), houve uma queda de identificações entre as décadas de 1980 e 2000, provavelmente porque a taxonomia deixou de ser interessante, aliada à popularidade de outras áreas. Desse modo, a formação de profissionais em taxonomia diminuiu. Muitas espécies de Agaricomycetes podem, nesse caso, ser extintas mesmo antes de serem descobertas pela ciência. O valor científico da biodiversidade fúngica motiva a investigação e o aumento do conhecimento destes fungos em nossa região.

Com o intuito de conseguir maior eficácia de programas de controle de vetores de doenças tropicais, há necessidade da busca de medidas alternativas. Produtos oriundos de elementos da biodiversidade, tais como, extratos de Agaricomycetes com ação bioinseticida, apresentam menor toxicidade ao ser humano e ao meio ambiente, tornando-se opções mais econômicas e ecologicamente corretas, ainda contribuindo para melhoria das condições socioeconômica da região. A necessidade de reduzir o consumo de agroquímicos tem aumentado o interesse por estratégias de controle biológico de pragas e vetores que transmitem doenças tropicais. O controle de insetos vetores de doenças atualmente é feito na sua maioria, por produtos químicos. O uso desses inseticidas podem causar danos ao ser humano e ao meio ambiente, contaminando alimento, água, solo, e favorecendo uma rápida seleção de insetos resistentes, além de possuírem custos elevados para produção.

Portanto, faz-se necessária o conhecimento sobre a diversidade e o potencial biotecnológico de Agaricomycetes amazônicos, através de isolamento, manutenção, identificação taxonômica clássica e por técnicas de biologia molecular e avaliação do potencial larvicida contra o *Aedes aegypti*.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Contribuir com o conhecimento sobre a diversidade de Agaricomycetes lignolíticos (Basidiomycota) no estado do Amazonas e sua aplicação no controle biológico contra as larvas do *Aedes aegypti*.

3.2 Específicos

- ✓ Obter Agaricomycetes lignolíticos (Basidiomycota) no Estado do Amazonas para conhecimento desta biodiversidade, caracterizar macro e micro morfológicamente os basidiomas;
- ✓ Identificar espécies com auxílio de bibliografia específica da área, comparação com coleções de herbários (INPA, URM/UFPE e outros) e por meio de análise das regiões *Its* 1 e 2 do DNA ribossomal;
- ✓ Isolar e preservar pelo uso de técnicas específicas os Agaricomycetes coletados;
- ✓ Constituir os dados dos fungos Agaricomycetes coletados em um Banco de Dados no formato eletrônico;
- ✓ Verificar a atividade bioinseticida de extratos de Agaricomycetes sobre as larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*;
- ✓ Determinar a concentração letal mediana - CL₅₀, bem como a CL₉₀, nos intervalos de 24 a 72 horas de exposição para a leitura da mortalidade.

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 Estado do Amazonas

O conhecimento sobre a micodiversidade Amazônica é de grande importância para se entender a dinâmica envolvida nesse bioma. Diversos aspectos da Amazônia são abordados por uma enorme quantidade de pesquisadores, contudo, poucos relatos têm sido observados em relação à diversidade fúngica existente nesse importante ecossistema. Surge, dessa forma, a necessidade de pesquisas para investigar a micobiota Amazônica, pois, espécies podem ser extintas antes de serem descritas.

O estado do Amazonas é o mais extenso dos estados brasileiros, com uma área de 1.559.159,148 km² (IBGE, 1990). Possui 31,27% da Floresta Amazônica brasileira e enorme diversidade de ecossistemas naturais, os quais abrigam grande biodiversidade (INPE, 2003). De acordo com Noronha (2003), são vários os tipos de vegetação da Amazônia: floresta de terra firme, floresta de várzea, floresta pantanosa (igapó), campinarana e savana. O Estado do Amazonas possui em seu território o rio de maior volume de água do mundo, o Amazonas. O rio Amazonas possui 6.570 quilômetros de extensão, e o volume de 100.000 metros cúbicos. Somente a Bacia do Amazonas representa, aproximadamente, 20 % de toda reserva de água doce do mundo (SANTOS e SANTOS, 2005). O Estado do Amazonas é banhado por uma infinidade de rios interligados, formando uma rede hidrográfica integrada, dos quais se destacam os rios Purus, Juruá, Iça, Vapés, Negro, Madeira e Solimões (SIOLI, 1967; MELACK, 1984). A hidrografia do Estado é de extrema importância no transporte hidroviário, economia, atividade pesqueira entre outros. O estado possui 62 municípios, nos quais 12 foram visitados para coleta.

4.2 Principais Características dos Agaricomycetes Lignolíticos

Os fungos Agaricomycetes lignolíticos são degradadores de madeira, macroscópicos conhecidos popularmente como cogumelos, orelhas-de-pau, ferrugens, carvões, entre outros (HIBBETT e col., 2014). De acordo com a estimativa de Kirk e col.(2008), os Agaricomycetes incluem 17 ordens, 100 famílias, 1.147 gêneros e cerca de 21 mil espécies. No entanto, novos táxons são continuamente descritos e rotineiramente dados moleculares são adicionados por depósitos de sequências de DNA de Agaricomycetes, sugerindo-se que a diversidade real do grupo até agora excede o catálogo atual de Kirk e col. (2008), (BLACKWELL 2011; HIBBETT e col., 2011).

Fungos do filo Basidiomycota, produzem esporos de origem sexual denominados basidiósporos produzidos em células especializadas denominadas basídios, encontrados em grande número na parte fértil do basidioma, denominada himênio (quando existir, pois nem todos os Basidiomycota possui himênio). O himênio exhibe estruturas estéreis conhecidas como setas, cistídios e basidiolos. A maioria apresenta micélio primário, secundário e terciário; possuem poro septal do tipo doliporo; o corpo de frutificação é um basidioma ou basidiocarpo. Os Basidiomycetes são fungos que possuem uma fase vegetativa formada pelo agrupamento de hifas septadas e binucleadas. O septo da hifa pode apresentar grampos de conexão. São reconhecidos como um grupo polifilético de acordo com Kirk e col. (2008). A classificação evolutiva dos Basidiomycetes é baseada tanto na morfologia como em características moleculares e, compreende três linhas evolutivas representadas pelas classes: Hymenomycetes (cogumelos, orelhas-de-pau), Ustilaginomycetes (carvões) e, Urediniomycetes (ferrugens) (ALEXOPOULOS e col., 1996).

O Reino dos Fungos está dividido por Kirk e col. (2008) em quatro filos, dentre eles o filo Basidiomycota que é composto por três classes: Basidiomycetes, Urediniomycetes e Ustilaginomycetes. De acordo com esta classificação os Basidiomycetes ainda estão divididos em duas subclasses: Tremellomycetidae e Agaricomycetidae, sendo esta última a subclasse que compõem a ordem Polyporales e mais cinco ordens (Agaricales, Boletales, Hymenochaetales, Russulales e Thelephorales). Baseados em dados moleculares, Hibbett e col. (2007) apresentam um novo subfilo de Basidiomycota, Agaricomycotina. As classes Tremellomycetes, Dacrymycetes, Wallemiomycetes, Entorrhizomycetes e Agaricomycetes passam a compreender este novo subfilo. A classe Agaricomycetes (HIBBETT e col., 2007) equivalente a subclasse Agaricomycetidae na classificação de Kirk e col. (2001), passa a ser composta por duas subclasses: Agaricomycetidae e Phallomycetidae. As ordens Corticiales, Gloeophyllales, Hymenochaetales, Polyporales, Russulales e Thelephorales, passar a compor a subclasse Agaricomycetidae. Segundo Kirk e col. (2008) a ordem Polyporales, em que estão inseridas a maior parte das espécies de fungos Agaricomycetes poróides, é composta por 23 famílias e 298 gêneros, sendo um grupo bastante diversificado morfologicamente. O corpo de frutificação, também chamado de basidioma, pode variar quanto à morfologia, coloração e consistência. O sistema hifálico, de acordo com os tipos de hifas presente pode ser mono, di ou trimítico e a morfologia do basidiósporo é bastante variável (RYVARDEN, 2002).

Estudos relevantes contribuíram com a taxonomia de Agaricomycetes nesse século, pois apresentaram grande progresso na classificação filogenética desses fungos (RAJCHENBERG, 2014). Nos últimos anos trabalhos importantes foram divulgados

envolvendo filogenia, aumentando o acervo do banco de dados com sequências de DNA de todos os organismos vivos (Genbank).

Pesquisas realizadas no Genbank permitem atualizações constantes, embora incoerências possam ser encontradas na taxonomia de fungos quando comparadas com Mycobank (www.mycobank.org) e Index Fungorum (www.indexfungorum.org). Por exemplo, a classe Basidiomycetes citada na 9ª edição do Dictionary of Fungi corresponde aos Hymenomycetes do Genbank. Essa discrepância pode comprometer o entendimento das atualizações contidas nos bancos de dados (FIGUEIREDO, 2008). Segundo Hibbett e col. (2007), é imprescindível que a comunidade científica adote uma classificação padrão para uso universal pelos bancos de dados.

4.3 Ecologia dos Agaricomycetes Lignolíticos

A importância ecológica dos Agaricomycetes lignolíticos reside na atividade sapróbia, pois são considerados os principais causadores de podridão de madeira, especialmente os que pertencem às famílias Hymenochaetaceae, Polyporaceae e Corticiaceae. São também encontrados em árvores vivas e em solo, parasitando raízes ou em associações micorrízicas, além de degradarem outros restos animais, microbianos e fúngicos (DONK, 1964; WEBSTER e WEBER, 2007). Cumprem, de maneira específica em ecossistemas arbóreo-arbustivos, papel crucial na reciclagem de nutrientes, sobretudo do carbono removido da atmosfera pelos organismos autotróficos (PRESCOTT e col., 2002).). Determinadas espécies são parasitas, podendo causar danos e até a morte de plantas. Algumas são utilizadas por insetos fungívoros. Os basidiomas (corpo de frutificação) adaptam um microhabitat para diversas espécies de insetos, e além de proporcionar alimento. Certas espécies podem atuar como parasitas dependendo das condições ambientais e do hospedeiro, sendo oportunistas e lignícolas facultativas ao se instalar na árvore senescente ou injuriada, permanecendo após sua morte como sapróbios, desempenhando papel fundamental na degradação da lignina (RYVARDEN, 1991; ALEXOPOULOS e col., 1996; BLACKWELL, 1996; BODDY e JONES, 2008; DE BOER e VAN DER VAL, 2008).

Algumas espécies desse grupo são comestíveis. Existem mais de 200 gêneros de Agaricomycetes utilizados pelo homem por suas propriedades proteicas (BOA, 2004). Cerca de 35 espécies são cultivadas comercialmente. No Brasil, os cogumelos mais cultivados são: *Agaricus bisporus* (J. E.Lange) Imbach, *Lentinula edodes* (Berck.) Pegler e *Pleurotus* spp. As

espécies com potencialidade para fungicultura que ocorrem na Amazônia são *Auricularia* ssp, *Lentinula raphanica* (Murril) J.L.Mata e R.H. Petersen, *Panus lecomtei* (Fr.) Corner, *Panus strigellus* (Berk.) *Pleurotus* spp e *Favolus brasilienses* (ISHIKAWA, 2012).

Sendo os Agaricomycetes os principais agentes de degradação de lignocelulose (MORGENSTERN e col., 2008) e dependendo do aparato enzimático que possuem, podem ser classificados em dois tipos: causadores de podridão parda (ou castanha ou marrom ou cúbica), quando secretam enzimas que degradam, principalmente, a celulose e a hemicelulose, mas não mineralizam a lignina, que permanece como um resíduo amorfo marrom (AGUIAR e FERRAZ, 2007), e os causadores de podridão branca, que degradam todos os componentes da parede celular vegetal, incluindo a hemicelulose, celulose e lignina (KERSTEN e DAN CULLEN, 2007). Em áreas tropicais, a maioria dos Basidiomycetes (96 %) são fungos de podridão-branca (OKINO e col., 2000). O tipo de podridão também é considerado um caráter de grande importância taxonômica. Estas denominações referem-se ao aspecto final do substrato após a decomposição. Na decomposição parda, o substrato decomposto adquire aspecto castanho, quebradiço, fendido e rachado no sentido das fibras, devido à presença da lignina residual. A decomposição branca caracteriza-se pela perda gradual das propriedades de resistência da madeira, que torna-se esbranquiçada e de aparência macia, fibrosa e esponjosa (GILBERTSON e RYVARDEN, 1986; RYVARDEN, 1991; BLANCHETTE, 1995; XAVIER-SANTOS, 2003).

4.4 Importância Econômica de Agaricomycetes Lignolíticos

Na indústria, algumas espécies de Agaricomycetes são conhecidas pela geração de produtos secundários com propriedades medicinais, substâncias utilizadas na indústria farmacológica, tais como o ibuprofeno e carbamazepina de *Trametes versicolor* (MARCO-URREA e col., 2009) e também contra atividade antimicrobiana de várias bactérias e fungos com resultados favoráveis (WANG e col., 2009). Substâncias com atividades antivirais (GREGORI, 2013), extraídas de fungos tem sido testada inclusive contra a ação ao vírus HIV-1 (EL DINE e col., 2009), indicados para tratamento de diferentes tipos de câncer, hepatites crônicas, infecções do sistema respiratório, urinário e digestivo (CHENG e LEUNG, 2008; KHAN e col., 2013), tratamentos de diabetes (ZHOU e col., 2007).

Muitos desses Agaricomycetes, como por exemplo *Agaricus subrufescens* Peck, amplamente consumida e estudada devido as suas propriedades nutricionais e medicinais, relacionadas principalmente às β -glucanas presentes em sua parede celular, ou ainda, aos

componentes extracelulares secretados pelo fungo no meio de cultivo (MIZUNO e col., 1990; WISITRASSAMEEWONGA, e col., 2012). A esses polissacarídeos são atribuídas atividades biológicas imunomoduladora, anti-inflamatória, antitumoral, antimutagênica e antimicrobiana, sendo no conjunto denominadas modificadores da resposta biológica, pois interagem e modificam a resposta imunológica (biorregulação) do hospedeiro, controlam a homeostase, regulam o biorritmo, prevenindo várias doenças (ROSS e col., 1999; WASSER; WEIS, 1999; DIJKGRAAF e col., 2002).

Devido à estrutura enzimática desses fungos, algumas espécies estão sendo testadas em processos de biorremediação e ou biorreparação e têm-se evidenciado um forte potencial biotecnológico. Como em tratamento dos efluentes da indústria têxtil (BALAN e MONTEIRO 2001; DA PAZ e col. 2010), purificação de águas afetadas por extração de óleo de oliva (MATOS e col., 2007), ação pesticidas, bioinseticida (RAMOS, e col., 2013) larvicida (BUCKER e col., 2013), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (VALENTÍN e col., 2007), entre outros.

4.5 Ocorrências de Agaricomycetes na Região Norte - Amazônia

O histórico de ocorrências de fungos Agaricomycetes na Amazônia foram relatados em uma lista por Gomes-Silva e Gibertoni (2009), reportaram 216 espécies de fungos Agaricomycetes (aphyllophoraceous) anteriormente publicados a partir da Amazônia brasileira. As espécies foram distribuídas em 90 gêneros e 22 famílias 9 ordens (Agaricales, Auriculariales, Cantharellales, Corticiales, Gloeophyllales, Hymenochaetales, Polyporales, Russulales e Trechisporales). Polyporales apresentou o maior número de espécies (146), famílias (7) e gêneros (61). Entre as famílias, Polyporaceae foi a espécie mais rica (79), seguido por Hymenochaetaceae (32) e Meruliaceae (29). Botryobasidiaceae, Cantharellaceae, Corticiaceae, Cystostereaceae, Meripilaceae, Peniophoraceae, Schizophyllaceae e Schizoporaceae cada um representado por uma espécie. Entre os gêneros, Amauroderma (16), Phellinus (15), Trametes (14), Hymenochaete (8), Ganoderma (8), Polystictus (7), e Podoscypha (7). A espécie Phellinus gilvus (pers.) Pat. e Earliella scabrosa Gilb. & Ryvarden, foi registrado em todos os Estados da Amazônia brasileira.

Novas publicações foram relataram para o Amazonas de acordo com Jesus e Ryvarden (2010) apresentaram novas as espécies *Perenniporia amazonica* Jesus & Ryvarden e *Phaeolus amazonicus* Jesus & Ryvarden. Na sequência Maia e Carvalho-Junior (2010) apresentaram uma lista de 519 espécies de fungos para a Amazônia, dentre as ordens nas quais estão inseridos

os fungos poróides. Polyporales com 333 espécies, é a que apresenta o maior número de registros no Brasil.

De modo recente Soares e col. (2014) identificaram 637 espécimes de fungos poliporóides, representantes por 97 espécies, 36 gêneros e oito famílias das ordens Hymenochaetales (Hymenochaetaceae e Schizoporaceae), Polyporales (Fomitopsidaceae, Ganodermataceae, Meripilaceae, Meruliaceae e Polyporaceae) e Russulales (Bondarzewiaceae).

A lista de Espécies da Flora do Brasil (2016) disponibiliza dados online (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2016>) com 5.712 espécies de fungos registradas para o país, das quais 850 são Agaricomycetes que ocorrem na Amazônia brasileira. Entre estes, registra-se 327 para o estado do Amazonas, 57 para Acre, 49 para Amapá, 155 para Rondônia, 180 para o Pará, 84 para Roraima.

4.6 *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762

A. aegypti foi introduzido no Brasil durante o período colonial, provavelmente na época do tráfico de escravos. Devido a sua importância como vetor da febre amarela, foi intensamente combatido em nosso território. *A. aegypti* é considerado um mosquito cosmopolita, com ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais. Por ter sido disseminada principalmente de forma passiva pelo homem, esta espécie tem, muitas vezes, a sua distribuição geográfica descontínua: está presente nos locais para onde o homem a levou em embarcações, trens, automóveis, aviões etc., e onde encontrou condições favoráveis para a sua multiplicação (CONSOLI, 1994).

4.6.1 Ecologia e Biologia do Vetor

O ciclo de vida do *A. aegypti* abrange quatro fases: ovo, larva (quatro estágios larvários), pupa e adultos. Os ovos são depositados pela fêmea, individualmente, próximos à superfície da água, nas paredes internas dos depósitos que servem como criadouros. A fecundação se dá durante a postura e o desenvolvimento do embrião se completa em 48 horas, em condições favoráveis de umidade e temperatura. Uma vez completado o desenvolvimento embrionário, os ovos são capazes de resistir a longos períodos de dessecação, que podem chegar a mais de um ano. Sendo um inseto holometabólico, suas larvas passam a maior parte do tempo alimentando-se principalmente de material orgânico acumulado nas paredes e fundo

dos depósitos, possuindo estas, quatro estágios evolutivos. A duração da fase larvária depende da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade das larvas no criadouro. Em condições favoráveis, o período entre a eclosão e a pupação pode não exceder a cinco dias. Contudo, em baixa temperatura e escassez de alimento, o 4º estágio larvário pode prolongar-se por várias semanas, antes de sua transformação em pupa. As pupas não se alimentam e nesta fase ocorre a metamorfose da larva para o mosquito adulto. Quando inativas, se mantêm na superfície da água, flutuando, o que facilita a emergência do inseto. O estado pupal dura, geralmente, de dois a três dias. Uma única inseminação é suficiente para fecundar todos os ovos que a fêmea venha a produzir durante sua vida (GOMES e col., 2006; LAGROTTA, 2006).

É durante o período chuvoso que sua população realmente atinge níveis elevados e de importância para fins de transmissão. As fêmeas de *A. aegypti* restringem seus hábitos hematófagos aos horários diurnos. Seus picos de maior atividade acham-se, geralmente, situados no amanhecer e pouco antes do anoitecer, mas ataca o homem, e por vezes animais domésticos, a qualquer hora do dia. À noite, embora raramente, podem ser oportunistas, atacando o homem se este se aproxima de seu abrigo. O hábito diurno também é o demonstrado pelos machos, que seguem as fêmeas em seus abrigos domiciliares e peridomiciliares, para efetuarem a cópula e obter substâncias açucaradas. *A. aegypti* é dotado de certo ecletismo em relação à fonte sanguínea para alimentação, mas o homem é sua principal vítima. Ataca animais das mais diversas categorias, desde que estejam próximos a seus criadouros e abrigos (CONSOLI, 1994). Como, no Brasil, tais locais acham-se quase sempre no domicílio ou em sua imediata vizinhança, é o homem o hospedeiro mais procurado por este mosquito. O homem é atacado principalmente nos pés e na parte inferior das pernas. A longa associação do *A. aegypti* com a espécie humana parece tê-lo dotado de certa habilidade para escapar de ser morto por sua vítima durante o repasto sanguíneo. De tal modo, se o hospedeiro produz movimento, mesmo que suave, uma fêmea de *A. aegypti* prontamente o abandona, voltando a atacá-lo ou procurando outra vítima, depois de cessado o iminente perigo de ser atingida. Esta peculiaridade tem grande importância, pois uma só fêmea de *A. aegypti* infectada pode, enquanto procura alimentar-se satisfatoriamente de sangue, produzir várias alimentações curtas em diferentes hospedeiros e disseminar o dengue ou a febre amarela. A domesticidade deste mosquito é ressaltada pelo fato de que ambos os sexos são encontrados, em proporções semelhantes, dentro das casas e nos abrigos peridomiciliares.

No Brasil, *A. aegypti* foi o único vetor conhecido de febre amarela urbana e é também o único transmissor do dengue, em nossos dias (CONSOLI, 1994). Hoje, o *A. aegypti*, está associado à transmissão do Chikungunya e Zika, arboviroses com rápido processo de dispersão

ao endemismo para as Américas, porém já bem conhecidos na África e Ásia. (VASCONCELOS, 2015)

4.6.2 Dengue, Chikungunya e Zika

O *A. aegypti*, somente essa espécie no Brasil está associada à transmissão de três arboviroses, Dengue, Chikungunya e Zika, cresce o desafio da vigilância epidemiológica em reconhecer precocemente as novas áreas com transmissão dessas doenças na população (VASCONCELOS, 2015).

O agente etiológico da dengue é um vírus de RNA do gênero flavivírus. Atualmente são conhecidos quatro sorotipos: DEN-1; DEN-2; DEN-3; DEN-4. A suscetibilidade à infecção é caótica, a imunidade é temporária e parcial a outros sorotipos e permanente ou no mínimo duradoura, àquele sorotipo que causou a doença (TAUIL, 2001). Os quatro sorotipos do vírus da dengue são antigenicamente diferentes, entretanto há evidência de que pode existir subcomplexos sorológicos em cada grupo. Atualmente estes vírus têm sido analisados através dos estudos moleculares, por sequenciamento dos vírus que permitem uma visualização maior das relações genéticas, permitindo reuni-los em grupos genômicos ou em subgrupos. A progressão da epidemiologia molecular é de grande relevância, pois tem contribuído para determinar a origem dos vírus que vêm causando novas epidemias, especialmente na tentativa de estabelecer a correlação entre a virulência da amostra e impacto destes na população (BASTOS, 2004).

A dengue é avaliada como a arbovirose mais frequente em todo o mundo, estabelecendo causa importante de morbidade e mortalidade (CHATURVEDI, 2006). Estima-se que 2,5 a 3,0 bilhões de pessoas residam em áreas onde existe transmissão dos vírus da dengue e que, a cada ano, ocorram 50 milhões de infecções com 500.000 casos de dengue hemorrágica e 12.000 mortes em todo o mundo (BRICKS, 2004; CAVALCANTI, 2010). Ocorre em regiões tropicais e subtropicais, predominantemente em áreas urbanas, suburbanas e agora em áreas rurais também (CHATURVEDI, 2006).

No Brasil, a circulação do vírus Chikungunya foi identificada pela primeira vez em 2014. A febre Chikungunya é uma doença transmitida pelos mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* é um problema significativo de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais (PIALOUX, 2007). Desde sua descoberta em 1952 foram identificados quatro genótipos CHIKV (WEAVER, 2014). Genótipos leste-Central-Sul-Africano (ECSA), Oeste Africano, genótipo asiático e linhagem do Oceano Índico (IOL), (NUNES e col., 2014). Os primeiros

casos de CHIKV no Brasil foram confirmados em Oiapoque, estado do Amapá, em 13 de setembro de 2014. (MD, 2016).

De acordo com Nunes e col. (2014), as cepas etiológicas associadas ao surto CHIKV fase inicial no Brasil pertencem aos genótipos ECSA e asiático, dados confirmados através de filogenia genética (NUNES e col., 2014). Esse aparecimento dos genótipos tanto asiático quanto ECSA CHIKV no Brasil são relatados pela primeira vez nas Américas. Dados epidemiológicos e genéticos sugerem que o genótipo ECSA foi introduzido de Angola para Feira de Santana-BA, em junho de 2014, onde está em curso a investigação epidemiológica (MD, 2016), CHIKV parece ser endêmica em Angola (FILIPE e PINTO, 1973).

O vírus Zika no Brasil, foi reconhecido quase simultaneamente com o vírus da febre Chikungunya em 2015, a circulação da doença causada pelo vírus Zika foi rapidamente confirmada pelo uso de métodos moleculares. Mostrando uma capacidade de dispersão impressionante, somente vista no Chikungunya nos últimos dois anos nas Américas (VASCONCELOS, 2015). O vírus Zika foi isolado em 1947 de um macaco rhesus na floresta Zika Entebbe, Uganda (SIMPSON, 1964), somente em 2006 seu genoma foi sequenciado (KUNO e CHANG, 2007). ZIKV é um vírus de RNA contendo 10.794 nucleotídeos codificação 3.419 aminoácidos. E está relacionada ao vírus da encefalite japonesa e vírus do Nilo Ocidental (DUFFY e col., 2009). Análises por sequências filogenéticas das cepas encontradas no Brasil coincide com as sequências de linhagem asiática (ZANLUCA e col., 2015).

O vírus ZIKV está associado com complicações neurológicas, auto-imunes e incluindo associações de casos da síndrome de Guillain-Barré. (MUSSO e col., 2014). No entanto, mais estudos são necessários para descobrir se co-infecção e subsequente infecção por diferentes arbovírus podem afetar o curso da doença, a ocorrência de casos graves e as formas de transmissão (vertical, perinatal, sexual), (FOY e col., 2011). O correto diagnóstico diferencial clínico e laboratorial entre infecção aguda de ZIKV, CHIKV e DENV contribuirá para o prognóstico dos pacientes e as ações de vigilância epidemiológica.

4.7 Dengue, Chikungunya e Zika em Manaus –Amazonas

Manaus foi uma das últimas capitais do Brasil a ser infectada pelo mosquito da dengue na década de 1990. Em novembro de 1996 foi encontrado pela primeira vez o *A. aegypti* no bairro da Praça 14, na época estava totalmente infestada pelo mosquito da dengue e não teve como evitar que se espalhasse pela cidade (JORNAL A CRÍTICA-MANAUS, 2014). Já na

área rural foi encontrado pela primeira vez em 2002 (BARBOSA, 2003). Em março de 1998 ocorreu a primeira epidemia de dengue, na qual foram detectados os sorotipos DENV 1 e DENV 2. Em 2002, foi isolado pela primeira vez o DENV 3, a partir daí outros casos de DENV 3 foram diagnosticados por isolamento viral. Em 2008, foi isolado em Manaus pela primeira vez o DENV 4 (FIGUEIREDO, 2008). A urbanização em Manaus é precária com a existência de numerosas invasões de terra e falta de saneamento básico suficiente associada às condições climáticas de temperatura alta, umidade e índices de chuva são fatores que favorecem a proliferação e dispersão do vetor da dengue (PINHEIRO e TADEI, 2002).

Em Manaus foram notificados 139 casos de febre Chikungunya até a Semana Epidemiológica 52, Brasil, 2015 e um (1) caso suspeito de Zika sem relação com a microcefalia (MS, 2016).

4.8 Controle de Vetores

Os inseticidas químicos têm sido largamente utilizados no controle de vetores de doenças, desde a segunda guerra mundial. Depois da descoberta do inseticida DDT (diclorodifeniltricloroetano) em 1943, as instruções e os programas de controle se ampararam amplamente na sua aplicação em decorrência da sua eficácia. A utilização do DDT revolucionou as técnicas de combate às pragas agrícolas e aos vetores de doenças. Ficou conhecida como “a era dos pesticidas orgânicos”. As experiências de controle foram enfraquecendo em 1967 onde as maiores críticas estabelecida ao seu uso estavam relacionadas ao fato de deixarem resíduos do produto no ambiente. Os vários efeitos adversos e ordem ecológicas a grande resistência dos insetos e a não especificidade fizeram dele um instrumento de ação não muito significativa a manutenção do controle de pragas agrícolas e agentes vetores de doenças (IVANISSEVICH e NUSSENZVEIG, 1991; OKOYE e col., 2008). Outros inseticidas de contato foram introduzidos no mercado como os carbamatos, organofosforados, e os piretróides (NICOLAS, 1986, DOS SANTOS e col., 2007).

Devido ao uso indiscriminado desses produtos, determinadas populações de mosquitos desenvolveram mutação genética, de acordo com a exposição tóxica, e está a cada ano resistente a vários tipos de inseticidas (JORNAL A CRÍTICA-MANAUS, 2014).

Segundo Tadei e col. (2007), somente o controle dos mosquitos adultos não é suficiente para diminuir a densidade do vetor. As formas imaturas desenvolvem-se em coleções hídricas, seus criadouros naturais, sob excelentes condições. Neles há condições de temperatura, luminosidade e pH suficientes para rapidamente se desenvolverem e atingirem a fase adulta.

Em decorrência dessa pressão de seleção, há necessidade de novos produtos que levem a um mínimo de impacto para o ambiente, servindo de estímulo a busca por estratégias alternativas no controle de vetores (VAN RIE e col., 1990; SCHAFFNER e col., 2013).

O controle biológico é a regulação de populações de elementos vivos como um resultado de interações antagônicas como parasitismos, predação e competição, consiste no uso de opositores naturais tais como fungos, vírus, bactérias entomopatogênicas e peixes (GHOSH e col., 2005; 2006; GHOSH e DASH, 2007). O controle nas regiões onde a presença do parasita e o vetor são frequentes é realizado através de uma sólida estratégia de controle, intensificação e manutenção de controle de vetores (FUNASA, 2003). A finalidade desse tipo de controle é a redução da população de um organismo hospedeiro, com o uso de opositores naturais. De outro modo, a abundância destes hospedeiros influencia a população de opositores naturais. Estas influências mútuas originam um equilíbrio dinâmico, onde nenhuma das populações suprime outra causando efeitos ecológicos indesejáveis (FOWLER e DI ROMAGNANO, 1992; FONTES, 1992). Nos 60 anos de uso, não existe evidência de danos ao homem e ao meio ambiente produzidos por esse agente de controle (ARANTES e col., 2002; CARDOSO, 2014).

O controle biológico no Brasil, deu-se início com a utilização do fungo *Metarhizium anisopliae* e com o *Baculovírus*, no controle da *Anticarsia gematalis* na soja, no controle das cigarrinhas da cana e pastagens, simultaneamente. O fungo *Trichoderma* tem sido utilizado com sucesso na cultura do cacau, em restos de ramos doentes para o controle do fungo *Moniliophthora*, agente causal da vassoura-de-bruxa (AZEVEDO e col., 2002). Com métodos apropriados de bioensaios é possível selecionar isolados de fungos altamente virulentos, específicos ou não, com características adequadas para serem utilizados como inseticidas microbianos (ALVES, 1998, KUMARI e col. 2014)). Entre as bactérias utilizadas no controle biológico sobressai o gênero *Bacillus thuringiensis* que produz proteínas codificadas que formam cristais proteicos com ação inseticida que surge apenas quando atingem o intestino médio da larva (HABIB, 1989; GERMANI, 1993). Este tipo de controle das formas imaturas de mosquitos vem sendo empregada pela toxicidade de cerca de 130 espécies de insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera bem como os vetores de doenças humana, como contra os gêneros *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* (LERECLUS e col., 1993, BALDACCHINO, 2015).

As vantagens relacionadas na utilização desse tipo de controle em relação aos inseticidas químicos convencionais são: 1) não são tóxicos, ou seja, não poluem o meio ambiente, portanto não afetam os animais e o próprio homem exceto para as populações alvos; 2) controle associado, pode ser empregado juntamente com inseticida seletivo em subdosagens visando a

ação e, portanto, em controle mais rápido e eficaz da praga sem os inconvenientes das superdosagens dos inseticidas químicos; 3) a especificidade, apontada como vantajosa no caso do ataque direto ao inseto alvo e por não afetar parasitados e predadores dessas pragas como o fazem os inseticidas químicos, portanto não causando desequilíbrio ecológico; 4) a multiplicação e dispersão, a capacidade que os patógenos têm de persistir no ambiente por meio dos indivíduos da população mesmo de uma geração para outra como focos secundários, terciários e outros, por meio dos ovos dos insetos. Nesses efeitos secundários, além da mortalidade direta, os patógenos conseguem afetar as gerações seguintes diminuindo a ovoposição e a viabilidade dos ovos (ALVES, 1986).

4.9 Importância dos Extratos Fúngicos: Larvicidas

Os larvicidas desempenham um papel fundamental no controle de mosquitos vetores responsáveis por doenças de importância de saúde pública. Os larvicidas utilizados são geralmente inseticidas químicos, onde se destacam os organofosforados e piretróides (Duque e col., 2004), sendo tóxico pode causar dores de cabeça, perda de memória, e irritabilidade (NICC, 2003). Além disso, o frequente emprego de inseticidas químicos no controle de vetores pode favorecer o desenvolvimento de resistência dos mesmos, contribuindo para o aumento das populações de mosquitos (PINHEIRO e TADEI, 2002; RAFAEL e col., 2008).

Metabólitos secundários bioativos e microbianos são promissores naturais para descoberta de novos produtos para combater *A. aegypti*. Vários estudos focaram em produtos naturais para controlar os mosquitos de *A. aegypti* como inseticidas e larvicidas (CONSOLI e col., 1988; PERICH e col., 1995; JAYAPRAKASHA e col., 1997; PIZARRO e col., 1999; RAHUMAN e col., 2000; MARKOUK e col., 2000; CICCIA e col., 2000; TSAO e col., 2002, BUCKER e col., 2013; KUMARI e col. 2014)).

Mais de 20.000 metabólitos secundários bioativos de origem microbiana eram conhecidos até o final de 2002, este número vem aumentando principalmente com resultados de estudos com fungos de acordo com a literatura. (BÉRDY, 2005).

Metabólitos secundários são compostos que possuem características especiais com estruturas geralmente diferentes das de metabólitos primários como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, dos quais são derivados. Entre estes compostos encontram-se antibióticos, pigmentos, toxinas, indutores de competição ecológica e simbiose, pesticidas, inibidores de enzimas, agentes moduladores de resposta imunológica, agentes anti-tumorais, feromônios e

promotores de crescimento de animais e plantas (AZEVEDO e col., 2002). Esses metabólitos não são essenciais para o crescimento dos micro-organismos que os produzem, mas é uma via alternativa que colabora para a sua sobrevivência na natureza. A produção de metabólitos secundários por micro-organismos encontra ampla aplicação na área de fármacos e de agroquímicos (NOGUEIRA e col., 2006).

Os metabólitos fúngicos apresentam grande interesse no uso farmacêutico principalmente devido as suas propriedades antibióticas e o mundo microbiano é rico em espécies e possui imensa variedade de enzimas agrupadas, possibilitando uma ampla gama de reações sobre diversas classes de compostos (YU e KELLER, 2005).

Os produtos derivados dos fungos apresentam alta toxicidade para os mosquitos e ainda baixa toxicidade para os organismos não alvos. Os metabólitos secundários extracelulares de muitos fungos já foram testados para atividade larvicida contra mosquitos (VIJAYAN e BERNAR, 1991), pois são promissores para o controle biológico dos mesmos (KIRSCHBAUM, 1985).

Os extratos oriundos dos metabolitos secundários funcionam como inseticidas microbianos estão sendo considerados como alternativas aos produtos químicos inseticidas, por causa, de sua seletiva toxicidade e decomposto naturalmente no ecossistema. Além disso ao contrário de inerentes perigos com o processo de produção de inseticida sintéticos, os processos para a fabricação de produtos microbianos são seguros, bem controlado e não agressivo ao meio ambiente (MISATO, 1983).

Fungos oriundos da biodiversidade Amazônica constituem uma fonte de produtos de origem biológica com potencial larvicida para o controle de mosquitos que são os principais responsáveis pela transmissão de doenças nesta região, especialmente malária, a febre amarela e arboviroses em geral, onde está inserido o vírus da dengue e mais recentemente o vírus chikungunya e zika. De acordo BUCKER e col. (2013) um estudo promissor para o Amazonas utilizando extrato de fungos endofíticos e Agaricomycetes como larvicida obtiveram resultados positivos contra larvas de mosquitos vetores de doenças e continua, necessidade na busca de medidas alternativas no controle destes de mosquitos.

5 METODOLOGIA

5.1 Áreas e Procedimentos de Coleta

As áreas de coleta desta pesquisa se atem ao Estado do Amazonas, conforme descrito a seguir: Foram realizadas 12 coletas no período de janeiro a março de 2013 e janeiro a maio de 2014, em área de floresta (Figura 1), nos municípios de Anamã (S49°10'.00"; W50°18'00"); Autazes (S03°34'.48"; W59°07'51"); Careiro da várzea (S03°11'.580"; W59°52.130"); Coari (S02°03'.04"; W60°01'30"); Barcelos (S04°05.6041"; W063°09.050"); Borba (S03°53'.342"; W59°05.630"); Novo Aripuanã (S05°08'.592"; W60°20'.264"); Nova Olinda do Norte (S03°52'.108"; W59°02.902"); Manaus (S03°04.00"; W5°51.043"); Manicoré (S05°077'.58"; W06°022'.511"); Parintins (S02°37'.40"; W56°44'.09"); Presidente Figueiredo (S02°03'04"; W60°01'30").

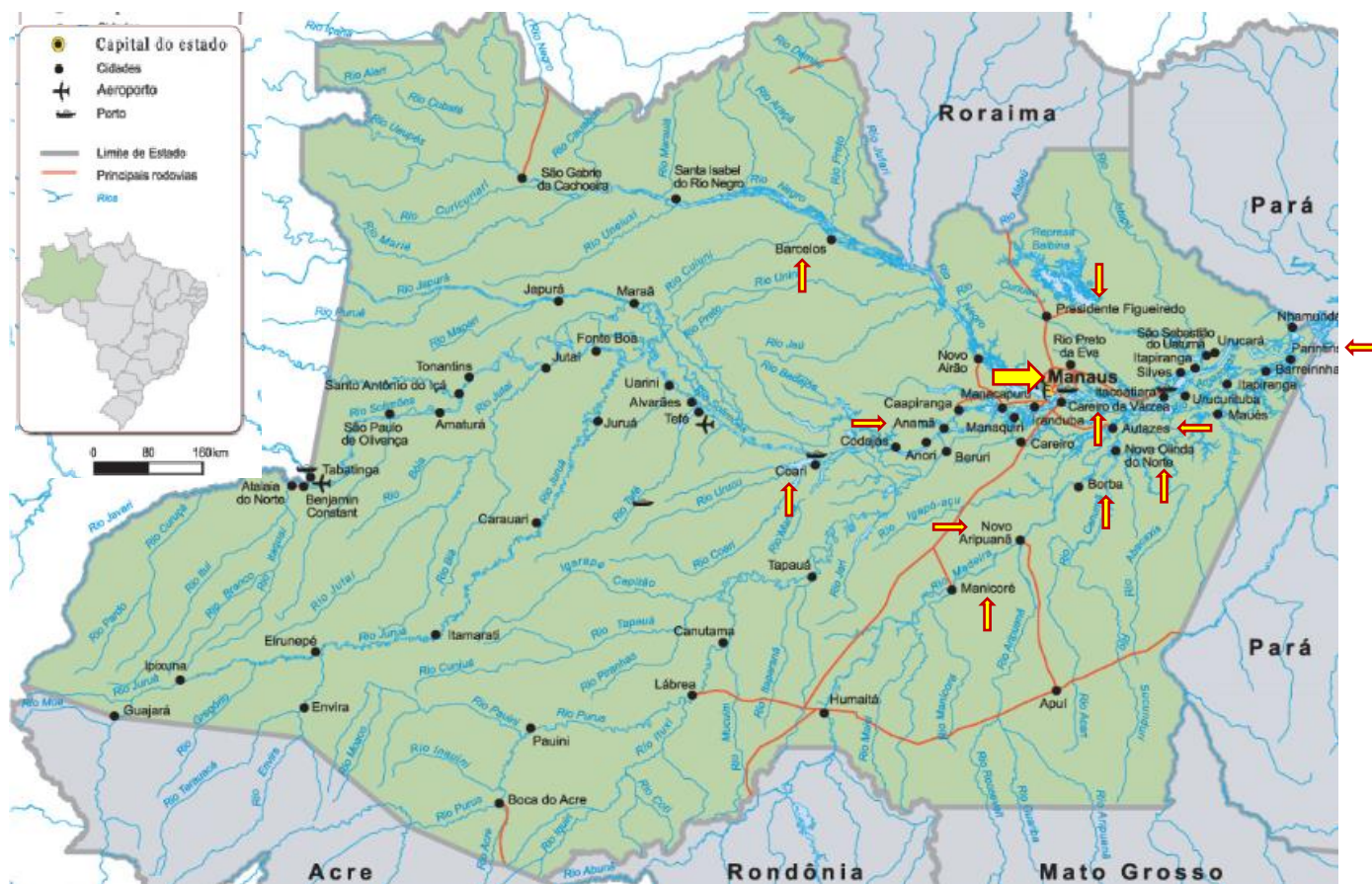


Figura 1: Mapa do estado do Amazonas e seus 62 municípios, dos quais 12 foram visitados para coleta. Mapa adaptado. Fonte: www.guiageo.com/amazonas.htm.

A coleta dos basidiomas se deu de forma oportunística. A permanência nos locais foi de 3 a 5 horas, dependendo das condições climáticas. Para a coleta de Agaricomycetes, foram

observados os substratos de madeira, tais como troncos mortos, inclusive queimados e raízes. No momento da coleta, foram anotados dados tais como: número da coleta, data, local, além das características macroscópicas relativas aos espécimes, que, eram fotografados. Posteriormente, os basidiomas foram retirados dos substratos com o auxílio de uma faca e colocados individualmente em sacos de papel. A coleta e preservação dos espécimes coletados seguiram as recomendações técnicas de Fidalgo e Bononi (1989). Posteriormente, o material foi levado ao laboratório de genética da Universidade do Estado do Amazonas-UEA para isolamento e em seguida seco em estufa, com temperatura aproximada de 60 °C por 72 a 120 horas.

Após a coleta, foi realizado o isolamento para obtenção de culturas axênicas dos fungos. Nesse sentido, objetivando o isolamento direto dos fungos a partir dos basidiomas (AINSWORTH, 1993), utilizando álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2,5% por 1 a 4 minutos (tempo de ação da substância dependendo da consistência do basidioma), novamente imersão em álcool 70% por 30 segundos e finalmente lavagem com água destilada esterilizada (SOUZA e col., 2004). Fragmentos de tecido interno dos basidiomas foram transferidos assepticamente, para placas de Petri contendo meio ágar batata dextrose (BDA+2% de Extrato de Levedura) previamente esterilizado à 121 °C por 15 minutos. O meio de isolamento continha ampicilina e tetraciclina (200 µg/mL) a fim de evitar o crescimento de bactérias.

Após isolamento, as placas de Petri foram mantidas em incubadora à 28 °C até observação de crescimento micelial, as culturas foram sucessivamente repicadas até obtenção de culturas axênicas. As culturas puras foram mantidas em tubo contendo fragmentos de madeira com meio de cultivo e tubo inclinado contendo meio de cultivo Batata Dextrose Agar (BDA) e meio Ágar Malte (AEM).

5.2 Identificação Taxonômica Clássica

A análise macroscópica foi realizada a olho nu (no campo com lupa) e com auxílio de microscópio estereoscópico em laboratório. Foram observados os dados sobre o basidioma (tipo, forma do píleo modo de fixação no substrato, cor, consistência e dimensões), superfície do píleo (cor e aspecto), margem (cor e aspecto), superfície himenial (tipo e cor; número de poros por milímetros e comprimento dos tubos), estipe (posição, forma, dimensões, superfície e cor) e contexto (cor, espessura e aspecto).

A identificação taxonômica foi realizada no Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. A análise microscópica foi realizada por meio de

cortes dos exemplares à mão livre, em microscópio estereoscópico, com o auxílio de uma lâmina de aço inoxidável para observação das microestruturas. Estes cortes continham as superfícies abhimeniais e contexto, foram depositados entre lâmina e lamínula com o reagente de Melzer para a observação da reação amilóide (azulada) ou dextrinóide (avermelhada) e, solução aquosa de hidróxido de potássio 3% para observação da reação xantocróica (negra) (SINGER, 1951).

As lâminas assim montadas permitiram a observação do sistema hifal (mono, di ou trimítico), da disposição das hifas do contexto, de elementos estéreis (cistídios, setas), de basídios e de basidiósporos.

Na montagem dos cortes (entre lâmina e lamínula), para observação ao microscópio óptico, foram usadas as seguintes soluções:

- ✓ Soluções aquosas de floxina a 1% e de KOH a 3-5%, misturadas sobre a lâmina. A primeira é um corante citoplasmático e a segunda um hidratante (RYVARDEN, 1991).
- ✓ Floxina 1%: 1g de floxina dissolvido em 100 ml de água destilada.
- ✓ KOH 3-5% dissolver 3-5g de hidróxido de potássio dissolvidos em 100 ml de água destilada.
- ✓ Reagente de Melzer: composto à base de iodo, utilizado para detectar a presença de polissacarídeos constituintes de paredes de hifas, basidiósporos e outras microestruturas.
- ✓ Azul de algodão dissolvido em ácido láctico, para verificar a reação de cianofilia para basidiósporos, basídios, pseudoparáfises, cistídios e hifas.

5.3 Preparo dos Cultivos

5.3.1 Produção de Metabólitos Extrato Fúngico

O extrato 01 foi obtido a partir da cultura fúngica crescida em meio líquido utilizando o micélio, descrito a seguir: As culturas puras obtidas dos isolados de Agaricomycetes foram cultivados em quintuplicata, em Erlenmeyer de 1000 ml contendo 300 ml de meio BDL (Batata, Dextrose, Extrato de Levedura) e levados a estufa B.O.D (Biological Oxygen Demand) a temperatura de 28 °C. Foram adicionados aos Erlenmeyers 3 (três) fragmentos miceliais, com tamanho aproximado de 5 mm² por aproximadamente 30 dias ou de acordo com crescimento de cada isolado. Após o período de 30 dias o micélio foi filtrado através de filtro vacum filter (filtropur v25: 0.2 µ 250 ml). Ao micélio foi adicionado 100 ml de etanol P.A para a maceração e, após 24 horas a mistura resultante foi filtrada. Este processo foi repetido após 48 horas. Após a obtenção dos extratos, foram concentrados em um aparelho evaporador rotativo a pressão

reduzida em temperatura de 47 °C. Posteriormente, após observar o ponto de ebulição do solvente etanol, em seguida os extratos foram pesados para obter rendimento.

O extrato 02 foi obtido a partir da cultura fúngica crescida meio líquido utilizando o caldo fermentado, descrito a seguir: As culturas puras obtidas dos isolados de Agaricomycetes foram cultivados em quintuplicata, em Erlenmeyer de 1000 ml contendo 300 ml de meio BDL (Batata, Dextrose, Extrato de Levedura) e levados a estufa B.O.D (Biological Oxygen Demand) a temperatura de 28 °C. Foram adicionados aos Erlenmeyers 3 (três) fragmentos miceliais, com tamanho aproximado de 5 mm² por aproximadamente 30 dias ou de acordo com crescimento de cada isolado. Após o período de 30 dias a cultura fúngica foi filtrada através de filtro vacuum filter (filtropur v25: 0.2 µ 250 ml). O filtrado foi congelado e levado ao liofilizador por 24 horas, e após, liofilizado os extratos foram pesados para obtenção do rendimento. Tanto o extrato 01 quanto o extrato 02 após a obtenção do rendimento foram resuspendidos em 10mL de metanol solução mãe.

5.3.2 Preparos de Culturas para Extração de DNA

As culturas puras obtidas dos isolados de Agaricomycetes foram crescidas em triplicatas, em Erlenmeyer de 250 ml contendo 125 ml de meio BDL (Batata, Dextrose, Extrato de Levedura) e levados a incubadora-agitadora, submetidos a rotação de 120 rpm e a temperatura de 28 °C. Foram adicionados aos Erlenmeyers 3 (três) fragmentos miceliais, com tamanho aproximado de 5 mm² aproximadamente 5 dias ou de acordo com crescimento de cada isolado. Após 5 dias de crescimento, o cultivo foi filtrado a vácuo com papel Whatman, nº 4 sendo obtida a massa micelial para a extração de DNA.

A extração dos Agaricomycetes que não foram isolados em cultura pura foi realizada a partir de fragmentos de basidiomas congelados.

5. 4 Identificação Taxonômica Molecular

5.4.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada via kit, ZR Fungal/Bacterial DNA MicroPrep™ Catalog No. D6007 conforme o seguinte protocolo com modificações: Após o micélio ter sido triturado utilizando nitrogênio líquido foi adicionado 200 mg (peso úmido) de células fúngicas do isolado para o tubo de Lise ZR BashingBead™, já contendo 200 µl de tampão isotônico, e adicionado 750 µl de solução de Lise, este foi levando ao vortex em velocidade máxima por 5

minutos. Após a agitação, a amostra foi centrifugada em uma microcentrífuga a 12.000 g durante 2 minutos. Posteriormente, foi transferido 400 µl do sobrenadante para um tubo filtro Zymo-Spin™ IV Spin (de cor laranja) em um tubo coletor e centrifugado a 5.000 g durante 2 minutos (destacado a base para usar o filtro de Spin™ IV Zymo-Spin). Foi adicionado ao sobrenadante 1.200 µl tampão binding bacteria/fungos DNA para posteriormente, ser transferido 800 µl da mistura para uma coluna de IC Zymo-Spin™ em um tubo coletor e centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos, em seguida foi descartado o filtrado do tubo coletor, e realizado o processo novamente com os 800 µl da mistura restante. Foi adicionado Foram adicionados 200 µl de tampão de pré-lavagem de DNA à coluna de IC Zymo-Spin™, em um novo tubo coletor e centrifugado a 8.000 g por 2 minutos. Posteriormente, foi adicionado 500 µl de tampão de lavagem de DNA de bactérias/ fungos para a coluna de IC Zymo-Spin™ e centrifugado a 8.000 g por 2 minutos. Foi transferido da coluna de IC Zymo-Spin™ para um microtubo limpo de 1,5 ml e adicionado 50 µl de tampão de eluição de DNA diretamente à coluna matriz. Esperou-se 2-3 minutos e em seguida centrifugou-se a 8.000 g durante 30 segundos para Eluir o DNA.

5.4.2 Quantificações do DNA

A partir da suspensão do DNA extraído foram utilizados 2,0 µL juntamente com 2,0 µL de solução de gel red (contendo bromofenol) aplicado em gel agarose a 0,8%. Após a corrida de 30 minutos, a leitura da presença das bandas do DNA foi realizada em um transiluminador luz branca/UV (Loccus biotecnologia) e comparada com a intensidade e tamanho do marcador de 1Kb. O marcador em questão, serve para leitura das bandas correspondentes a concentração estimada do DNA aplicado.

As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C, por 4 minutos, seguido de 40 ciclos de 2 minutos de desnaturação a 94 °C, 2 minutos de anelamento a 55 °C e 2 minutos de elongação a 72 °C e finalizando com 10 minutos a 72 °C. O produto da PCR foi conferido por eletroforese em gel agarose a 1,5%, corado com solução de gel red, comparado com DNA MARCADOR (*DNA ladder*) de 300pb e estimado o peso molecular, para amplificação das regiões *Its* do rDNA com os oligonucleotídios iniciadores *Its1* e *Its2*. (5'- TTCCGTAGGTGAACCTGCGG -3') e (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'), (WHITE e col., 1990).

A reação de amplificação de PCR foi realizada conforme o protocolo descrito na Tabela 1, com o volume final de 25 µL.

Tabela 1: Cálculo da reação de amplificação do PCR para as amostras fúngicas.

Reagentes	Reação (5 µL)	Concentração
Tampão 5X	5 µL	1X
MgCl ₂ 25mM	1,5 µL	2,5 mM
DNTPs 2,5 mM	1 µL	2,5 mM
Primer F 5pmoles/ µL	1,0 µL	0,2 µL
Primer R 5pmoles/ µL	1,0µL	0,2 µL
DNA10ng/ µL	5,0 µL	---
Taq 5U/µL	0,3 µL	--
Água miliQ	77 µL	---
Total	25,0 µL	--

5.4.3 Purificação e Sequenciamento do DNA por PCR ExoSAP

A purificação da reação foi realizada através de enzimas Exonuclease 1 e Fosfatase Alcalina de Camarão foram utilizadas para limpar a reação de PCR de restos de iniciadores (*primes*) que foram incorporados ao DNA. Essa reação de limpeza teve como volume final 28 µL para cada amostra: 20 µL da amostra e adicionado mais 8 µL de ExoSAP (para cada 5 µL da amostra, colocou-se 2 µL de ExoSAP). Ocorreu nas seguintes condições: incubação a 37 °C por 15 minutos; Inativação com ExoSAP a 80 °C por 15 minutos. A reação de sequenciamento se deu com 8 µL do Mix (Primes, H₂O e BigDye) adicionados a 2 µL de DNA.

5.4.4 Identificação Molecular

Com o intuito de verificar a qualidade geral do sequenciamento, foi utilizado o programa Chromas 2.24 (Technelysium Ltd), que mostra de maneira gráfica a incorporação de cada base de DNA presente na sequência nucleotídica.

As sequências de nucleotídeos obtidas dos isolados foram submetidas à pesquisa no BLASTn do NCBI (National Center for Biotechnology Information – www.ncbi.nlm.nih.gov), para análise de similaridade com o banco de dados. Em seguida, as sequências que apresentaram os dez melhores valores de similaridade (scores) foram selecionadas e alinhadas utilizando o programa ClustalW (THOMPSON e col., 1994). Para a construção das árvores filogenéticas, foi utilizado o método de máxima verossimilhança, implementado no programa IQ-TREE (TRIFINOPOULOS e col., 2016). A similaridade das sequências de nucleotídeos entre os isolados foi calculada pelo programa DNASTAR (LASERGENE, 1994).

5.5 Identificação pela Técnica de MALDI-TOF Espectrometria de Massa

Esta técnica baseia-se na identificação de padrões característicos de proteínas derivada da composição fúngica dos Agaricomycetes seguido de avaliação de similaridade direto do banco de dados atualizados para identificação das espécies.

Identificação pela técnica de MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption. Ionization – Time of Flight). Espectrometria de massa, aparelho AutoFlex Speed (Bruker), foi realizada utilizando as culturas puras de Agaricomycetes por posicionamento de uma pequena quantidade de células fúngicas na placa (matriz polimérica), que foram sobrepostas com uma matriz contendo uma solução ácida, mistura de solventes orgânicos (Acetonitrila 500 µL; Meruliaceae Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico 20 mg/ml; Água miliq 500 µL; Acido trigluoacético AFA 25 µL solubilizados em aparelho ultra-sônico à 45 °C). As amostras fúngicas foram em seguida, secas ao ar, e durante esse processo todas as moléculas ficaram embebidas na matriz, e, em seguida, a placa (matriz polimérica) foi posicionada no espectrômetro de massa para medição automatizada. Um espectro de massa foi definido e obtido, abrangendo normalmente os picos de 2000 a 20000 Da intervalo m / z. Os espectros brutos a partir das amostras foram adquiridos utilizando o software FlexControl, no entanto, para as amostras de Agaricomycetes desta pesquisa não foi possível utilizar o programa software Biotyper para comparar os espectros com o banco de dados da biblioteca, pois dados de Agaricomycetes até o momento não estão inseridos.

5.6 Preservação e Exsiccatas dos Agaricomycetes

Todos os fungos isolados em cultura pura foram preservados em tubo contendo meio de cultivo BDA e fragmentos de madeira (madeira de reflorestamento, *Pinus* sp), em água destilada esterilizada pelo método Castellani, (1939) em triplicata, e também em meio de cultivo BDA contendo óleo mineral. Estes estão depositados no Laboratório de Genética da Escola Superior de Saúde da Universidade do Estado do Amazonas-UEA.

As exsiccatas foram secas em estufa, com temperatura de 50 °C por 72 horas e guardados em sacos de papel devidamente identificados e adicionados cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) a fim de evitar ataques de insetos. Os exemplares estão depositados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA.

5.7 Testes de patogenicidade e Atividade Larvicida

Os testes larvicidas foram realizados no Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA. Em ambiente laboratorial, as condições de temperatura foram de 27 ± 1 °C e umidade relativa superior a 80%.

Os bioensaios de ação inibidora dos extratos fúngicos foram realizados de acordo com Dulmage e col., (1990), com modificações. A partir dos bioensaios seletivos foram utilizados 66 extratos fúngicos item 5.4.1, sendo 33 oriundos do meio líquido e 33 oriundos do micélio. Dos 66 extratos testados os que apresentaram mortalidade de 70% foram separados para os bioensaios. Seis extratos oriundos do micélio foram os que apresentaram potencialidade letal.

Em condições de laboratório ovos desidratados de *A. aegypti* aderidos a tiras de papel filtro foram transferidos para cubas esmaltadas contendo água, após a eclosão dos ovos as larvas foram alimentadas a cada dois dias com ração (compostos de uma mistura de farinha de peixe e pó de fígado, e outras rações adicionadas), até atingirem o terceiro estágio do desenvolvimento larval (WHO, 1985; BUCKER e col., 2013).

Os bioensaios foram realizados em copos plásticos descartáveis de 50 mL, contendo 10 mL de água potável, 10 larvas de terceiro estágio, e alimentado em dias alternados, mais a aplicação dos extratos fúngicos (item 5.4.1), e foi estabelecido concentrações de 1.000; 2.000; 3.000; 4.000 e 5.000 ppm o controle com água potável e mais o controle negativo que recebeu apenas Metanol nas mesmas concentrações, no entanto, a mortalidade não ultrapassou 5 %.

Após a aplicação dos extratos, as leituras foram realizadas nos intervalos de 24 h, 48 h e 72 horas, verificando o número de larvas vivas e mortas em cada concentração (WHO, 1985; BUCKER e col., 2013).

5.8 Concentrações Letais (CL50 - CL90) e Análise

Para cada diluição de dose testada, foram feitas 5 repetições, e os bioensaios foram repetidos em três testes alternados. A partir dos dados de mortalidade das larvas obtidas, o cálculo da concentração letal para matar 50% e 90% de população das larvas, em 24, 48 e 72 horas de observação, foi realizado por análise de probit com assistência do programa Polo PC (LEORA SOFTWARE, 1987; HADDAD, 1998). Os dados foram adicionados ao programa, e a partir dos dados obtidos pelo programa Polo PC foi montado um gráfico comparativo entre a

mortalidade esperada e observada das concentrações e os probits gerados pela equação de regressão:

$$y = (\alpha + 5) + \beta \cdot \log x$$

Onde: y = Probit;

α = coeficiente linear (parameter dose ppm);

β = coeficiente angular (slope); x = concentração.

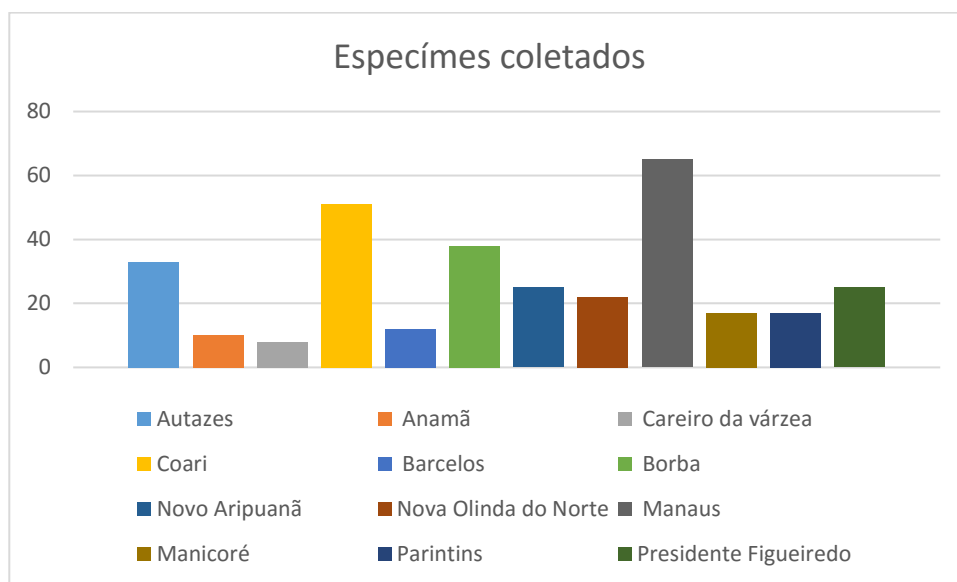
Esta análise permitiu determinar a relação positiva ou negativa existente entre as variáveis dependente (y) e independente (x), (MOTTA e WAGNER, 2003).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Diversidade e Análise Identificação Taxonômica Clássica

A partir das coletas realizadas em 12 municípios do Estado do Amazonas no período de janeiro a março de 2013 e de janeiro a maio de 2014 (Gráfico 1), foram coletados 323 espécimes, dos quais foram identificados 263, representados por 40 gêneros e 76 espécies, classificados em 15 famílias (Auriculariaceae, Corticiaceae, Dacrymycetaceae, Fomitopsidaceae, Ganodermatacea, Gloeophyllaceae, Hymenochaetaceae, Meripilaceae, Meruliaceae, Omphalotaceae, Phanerochaetaceae, Pleurotaceae, Polyporaceae, Schizophyllaceae, Stereaceae) (Tabela 2). As famílias aqui coletadas pertencem às ordens Agaricales Underw. (Schizophyllaceae QuéL, Omphalotaceae), *Gloeophyllales* Thorn (Gloeophyllaceae) Hymenochaetales Oberw. (Hymenochaetaceae Imazeki & Toki) e Polyporales Gäum. (Fomitopsidaceae, Ganodermataceae, Meripilaceae, Meruliaceae, Phanerochaetaceae e Polyporaceae) e Russulales (Stereaceae), (ALEXOPOULOS e col., 1996; KIRK e col., 2008).

Gráfico 1: Espécimes de Agaricomycetes lignolíticos coletados nos municípios do estado do Amazonas. A quantidade de espécimes coletados dependeu dos dias de permanências em cada área.



Na lista de espécies da Flora do Brasil (2016) a ordem Polyporales até o momento registra 116 gêneros com 453 espécies (GUGLIOTA e col., 2016).

No presente estudo (Tabela 2) a família Polyporaceae apresentou maior número de gêneros (20) e espécies (43), representada por *Corioloopsis floccosa* (Jungh.) Ryvarden, *Daedaleopsis flavida* (Lév.), *Datronia brunneoleuca* (Berk), *Dichomitrus cavernulosus* (Berk.), *Earliella scabrosa* (Pers.) Gilb. & Ryvarden, *Favolus brasiliensis* (Fr.), *Flabellophora obovata* (Jungh.) Núñez & Ryvarden, *Fomes fasciatus*, *Grammothele subargentea* (Speg.) Rajchenb, *Hexagonia glabra* (P. Beauv.) Ryvarden, *Lentinus crinitus* Lloyd., *Lenzites betulina* (L.) Fr., *Mycobonia flava* (Sw.) Pat., *Nigroporus vinosus* (Berk.) Murrill, *Perenniporia centrali-africana* Decock & Mossebo, *Perenniporia inflexibilis* (Berk.) Ryvarden, *Polyporus coltricioides* Fonseca & Ryvarden, *Trametes punicea* Fr., *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murrill, *Trichaptum byssogenum* (Jungh.) Ryvarden, *Sebipora aquosa* Miettinen.

Enquanto que Hymenochaetaceae apresentou três gêneros e quatro espécies: *Hymenochaete damicornis* (Link) Lév., *Phellinus calcitratus* (Berk. & M.A. Curtis) Ryvarden, *Fulvifomes merrillii* (Murrill) Baltazar & Gibertoni, *Cyclomyces iodinus* (Mont.) Pat. Ganodermataceae apresentou quatro gêneros *Amauroderma intermedium* (Bres. & Pat.) Torrend, *Ganoderma australe* (Fr.) Pat., *Humphreya coffeata* (Berk.) Steyaert e *Tomophagus colossus* (Fr.). Fomitopsidaceae apresentou um gênero e quatro espécies *Fomitopsis nivosa* (Berk.) Gilb. & Ryvarden, *Fomitopsis durescens* (Overh. ex J. Lowe) Gilb. & Ryvarden, *Fomitopsis roseoalba* Soares & Ryvarden, *Fomitopsis lilacinogilva* (Berk.) J.E. Wright & J.R. Deschamps. Meruliaceae apresentou dois gêneros e duas espécies: *Flavodon flavus* (Klotzsch) Ryvarden e *Irpex lacteus* (Fr.) Pilát., Meripilaceae: um gênero e quatro espécies *Rigidoporus lineatus* (Pers.) Ryvarden, *Rigidoporus microporus* (Sw.) Overeem, *Rigidoporus mutabilis* I. Lindblad & Ryvarden, *Rigidoporus ulmarius* (Sowerby) Imazeki. Auriculaceae apresentou um gênero e duas espécies *Auricularia delicata* (Mont. ex Fr.) Henn., *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc. As demais famílias apresentaram apenas um gênero e uma espécie: Corticiaceae: *Punctularia* sp. Gloeophyllaceae: *Gloeophyllum stratum* (Fr.) Murril. Omphalotaceae: *Caripia montagnei* (Berk.) Kuntze, Schizophyllaceae: *Schizophyllum commune* Fr. Plurotaceae: *Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn., Phanerochaetaceae *Flaviporus liebmannii* (Fr.) Ginns., Stereaceae: *Stereum sanguinolentum* (Alb. & Schwein.) Fr.

De acordo com a literatura a maior riqueza de espécies da família Polyporaceae já se esperava por ser uma família com maior diversidade (GILBERTSON e RYVARDEN, 1991; 1987; NÚÑEZ e RYVARDEN, 1995; KIRK e col., 2008).

Esses resultados apoiam estudos anteriores sobre fungos Agaricomycetes degradadores de madeira, no Brasil, na Amazônia e no estado do Amazonas. Para a Amazônia Gomes-Silva e Gibertoni (2009a, 2009b), divulgaram uma lista de Agaricomycetes, com 216 espécies, 90

gêneros, 22 famílias e nove ordens (Agaricales, Auriculariales, Corticiales, Cantharellales, Gloeophyllales, Hymenochaetales, Polyporales, Russulales e Trechisporales). Para a ordem Polyporales, foi divulgado o maior número de espécies 146, de famílias 07 e de gêneros 61. O estado do Pará foi representado por 126 espécies (58 %), com 53 exclusiva para o estado. O estado do Amazonas apresentou 86 espécies relatadas (35 exclusiva) e 35 espécies foram registrados para o estado de Roraima (15 exclusivas). Os Estados de Rondônia e Acre registraram 48 e 28 espécies, respectivamente, cada um com 7 espécies exclusivas e os Estados de Mato Grosso e Amapá registraram 23 e 36 espécies respectivamente, cada um com 6 espécies exclusivas. (GOMES-SILVA e GIBERTONI, 2009a, 2009b),

Maia e Carvalho-Junior (2010) citaram 519 espécies de Agaricomycetes e Polyporales representada por 333 espécies.

De acordo com Soares e col. (2014), dados para o estado do Amapá apresentaram 637 espécimes, representantes de 97 espécies, 36 gêneros e oito famílias das ordens Hymenochaetales (Hymenochaetaceae e Schizoporaceae), Polyporales (Fomitopsidaceae, Ganodermataceae, Meripilaceae). A família com o maior número de representantes também foi Polyporaceae, com 19 gêneros e 52 espécies, acompanhada por Hymenochaetaceae e Ganodermataceae (15 e 16 respectivamente), *Amauroderma* Murril foi o gênero com o maior número de espécies (10), seguido por *Perenniporia* Murril (8) e *Polyporus* (8). As espécies que apresentaram a maior densidade foram *Ganoderma tornatum* (Pers.) Bres. (48), *Polyporus dictyopus* Mont (45), *P. leprieurii* Mont. (37) e *Lenzites elegans* (Spreng.) Pat. (34).

Com o estudo da distribuição geográfica das espécies encontradas, baseada na literatura, mostrou-se que *Auricularia delicata*, *Dacryopinax spathularia*, *Fomitopsis durescens*, *Fomitopsis roseoalba*, *Amauroderma intermedium*, *Ganoderma lobatum*, *Tomophagus colossos*, *Ganoderma parvulum*, *Phellinus callimorphus*, *Phellinus callimorphus*, *Flavodon flavus*, *Rigidoporus mutabilis*, *Caripia montagnei*, *Coriolopsis polyzona*, *Datronia brunneoleuca*, *Earliella scabrosa*, *Grammothele subargentea*, *Hexagonia glabra*, *Hexagonia hydroides*, *Hexagonia hirta*, *Lentinus strigosus*, *Lentinus velutinus*, *Lenzites betulina*, *Trametes elegans*, *Trametes rosea*, *Schizophyllum commune*, constituem primeiras citações para o estado do Amazonas (Tabela 2). As espécies *Daedaleopsis flava*, *Perenniporia centrali-africana*, *Trametes punicea*, *Sebipora aquosa* e o gênero *Punctularia* sp representam novas ocorrências para o Brasil. Uma espécie foi identificada como nova para a ciência *Polyporus coltricioides* Fonseca&Ryvarden.

Tabela 2. Quantidade de espécimes táxon e família identificados, coletados nos municípios de Autazes; Anamã; Careiro da várzea; Coari; Barcelos; Borba; Novo Aripuanã; Nova Olinda do Norte; Manaus; Manicoré; Parintins e Presidente Figueiredo. As novas ocorrências no estado, as ocorrências para o norte do país e literaturas consultadas.

Família/ Taxon	Nova Ocorrência	Ocorrência na Amazônia	Literatura	Local de Coleta/Município
Auriculariaceae				
<i>Auricularia delicata</i> (Mont. ex Fr.) Henn. 1893	AMAZONAS	MG, PA, RO	Fidalgo (1968); Batista e col.(1966); Capelari & Maziero (1988)	Novo Aripuanã
<i>Auricularia polytricha</i> (Mont.) Sacc. 1885		AM, MG; PA; RO, RR	Sotão e col. (1991, 2002a, 2003); Fidalgo (1968); Batista e col. (1966); Sotão e col. (2002a, 2003); Jesus (1996)	Manicoré
Corticiaceae				
<i>Punctularia</i> sp	BRASIL		Kirk e col. (2008)	Borba, Manicoré, Coari, Nova Olinda do Norte
Dacrymycetaceae				
<i>Dacryopinax spathularia</i> (Schwein.) G.W. Martin 1948	AMAZONAS		Bauermann & Guerrero (1989)	Manaus
Fomitopsidaceae				
<i>Fomitopsis nivosa</i> (Berk.) Gilb. & Ryvar den 1986		AC, AM, RO, RR	Buchanan & Hood (1992)	Coari
<i>Fomitopsis durescens</i> (Overh. ex J. Lowe) Gilb. & Ryvar den 1986	AMAZONAS		Ryvar den (1986)	Borba
<i>Fomitopsis roseoalba</i> Soares & Ryvar den 2015	AMAZONAS		Soares, e col. (2015)	Presidente Figueiredo
<i>Fomitopsis lilacinogilva</i> (Berk.) J.E. Wright & J.R. Deschamps 1975		AM, PA, RO, RR	Gomes-Silva e col. (2013)	Manaus
Ganodermataceae				
<i>Amauroderma intermedium</i> (Bres. & Pat.) Torrend 1920	AMAZONAS	RO, RR, MT, PA	Gomes-Silva e col. (2013)	Manaus
<i>Ganoderma australe</i> (Fr.) Pat. 1889		AC, AM, AP, RR; RO	Ryvar den (2004)	Manaus
<i>Ganoderma lobatum</i> (Schwein.) G.F. Atk. 1908	AMAZONAS		Bononi e col. (2008)	Parintins
<i>Ganoderma subfor nicatum</i> Murrill 1908		AM, PA, RO, RR	Drechsler-Santos e col. (2013)	Barcelos
<i>Humphreya coffeata</i> (Berk.) Steyaert 1972		AM; PARÁ	Furtado (1967); Sotão e col. (2008)	

CONTINUA

CONTINUAÇÃO DA TABELA

<i>Tomophagus colossus</i> (Fr.) Murrill 1905	AMAZONAS	PA, RO	Ryvarden (2004); Gomes-Silva e col. (2013)	Autazes
<i>Ganoderma parvulum</i> Murrill 1902	AMAZONAS		Gugliotta e col., (2016)	Presidente Figueiredo
Gloeophyllaceae				
<i>Gloeophyllum striatum</i> (Fr.) Murrill 1905		AC, AM, RO, AC, AM	Núñez & Ryvarden (2001); Corner (1984)	Coari; Autazes
Hymenochaetaceae				
<i>Hymenochaete damicornis</i> (Link) Lév. 1846		AM, PA, AC, RO, RR	Gomes-Silva & Gibertoni (2009); Gibertoni & Drechsler-Santos (2010)	Nova Olinda do Norte, Manaus
<i>Hymenochaete luteobadia</i> (Fr.) Höhn. & Litsch. 1907		AM, PA, RO, RR, TO	Gomes-Silva & Gibertoni (2009); Baltazar, J.M. & Gibertoni (2009)	Manaus; Nova Olinda do Norte
<i>Phellinus calcitratus</i> (Berk. & M.A. Curtis) Ryvarden 1972		AM, PA, RO	Baltazar & Gibertoni (2009); Gomes-Silva & Gibertoni (2009)	Manaus
<i>Phellinus callimorphus</i> (Lév.) Ryvarden 1980	AMAZONAS		Abrahã e col. (2009)	Coari
<i>Phellinus fastuosus</i> (Lév.) S. Ahmad 1972		AM, MT, PA, RO, RR	Sousa (1980); Sotão e col. (2003, (2008); Campos e col. (2005); Sousa (1980)	Presidente Figueiredo
<i>Phellinus gilvus</i> (Schwein.) Pat. 1900		AC, AM, AM, PA, RO, RO	Drechsler-Santos e col., (2009); Gibertoni & Drechsler-Santos (2010); Gomes-Silva & Gibertoni (2009)	Coari, Manicoré, Autazes
<i>Fulvifomes merrillii</i> (Murrill) Baltazar & Gibertoni 2010	AMAZONAS	AP, PA, RO	Ryvarden (2004); Baltazar & Gibertoni, (2010).	Borba
<i>Cyclomyces iodinus</i> (Mont.) Pat. 1903		AC, AM, AM, PA, RO, RO	Baltazar & Gibertoni, (2009); Gibertoni. & Drechsler-Santos (2010)	Manaus
Meruliaceae				
<i>Flavodon flavus</i> (Klotzsch) Ryvarden 1973	AMAZONAS		Ryvarden (1973)	Presidente Figueiredo; Coari, Borba; Novo Aripuanã; Autazes
<i>Irpex lacteus</i> (Fr.) Fr. 1828		AC, AM, PA	Núñez & Ryvarden (2001)	Autazes; Novo Olinda do Norte
Meripilaceae				
<i>Rigidoporus lineatus</i> (Pers.) Ryvarden 1972		AC, AM, MA, PA, RO, RR	Leal & Gugliotta (2008)	Presidente Figueiredo; Borba
<i>Rigidoporus microporus</i> (Sw.) Overeem 1924		AC, AM, AP, MT, PA, RO, RR	Ryvarden & Johansen (1980)	Presidente Figueiredo; Manaus; Nova Olinda do Norte; Novo Aripuanã

CONTINUA

CONTINUAÇÃO DA TABELA

<i>Rigidoporus mutabilis</i> I. Lindblad & Ryvarden 1999	AMAZONAS		Gomes-Silva e col. (2014)	Nova Olinda do Norte
<i>Rigidoporus ulmarius</i> (Sowerby) Imazeki 1952		AP, AM, RR PA	Ryvarden & Gilbertson (1994)	Manaus
Omphalotaceae				
<i>Caripia montagnei</i> (Berk.) Kuntze 1898	AMAZONAS	PA	Ginns, (2011)	Manicoré; Manaus
Polyporaceae				
<i>Coriolopsis floccosa</i> (Jungh.) Ryvarden 1972		AC, AM, MT, AP, RO, RR	Ryvarden & Johansen (1980)	Anamã; Manaus; Manicoré; Novo Aripuanã
<i>Coriolopsis polyzona</i> (Pers.) Ryvarden 1972	AMAZONAS	RO, RR	Ryvarden & Johansen (1980)	Autazes; Borba; Coari; Manaus; Manicoré; Nova Olinda do Norte; Novo Aripuanã
<i>Coriolopsis psila</i> (Lloyd) Ryvarden 2012		AM, RO, RR	Nogueira-Melo e col. (2012)	Manaus
<i>Daedaleopsis flava</i> (Lév.) A. Roy & A. Mitra 1984	BRASIL		Roy & Mitra (1983)	Parintins
<i>Datronia brunneoleuca</i> (Berk.) Ryvarden 1988	AMAZONAS		Ryvarden (1988)	Manaus; Nova Olinda do Norte; Manicoré
<i>Dichomitus cavernulosus</i> (Berk.) Masuka & Ryvarden 1999		AM, RO, RR, PA	Masuka & Ryvarden (1999)	Manaus Anamã; Autazes; Borba; Careiro da várzea; Manaus; Coari; Manicoré; Nova Olinda do Norte; Novo Aripuanã; Parintins
<i>Earliella scabrosa</i> (Pers.) Gilb. & Ryvarden 1985	AMAZONAS	MT, PA, RR, RO	Ryvarden & Johansen (1980)	
<i>Favolus brasiliensis</i> (Fr.) Fr. 1830		AC, AM, PA, RO	Capelari & Maziero (1988) Bononi (1992), Sotão e col. (1997, 2002b), Sotão e col. (2008); Capelari & Maziero (1988)	Borba; Coari; Manaus
<i>Favolus tenuiculus</i> P. Beauv. 1806		AC, AM, PA, RO		Presidente Figueiredo
<i>Flabellophora obovata</i> (Jungh.) Núñez & Ryvarden 2001		AM, PA, RO	Sotão e col. (1997, 2002, 2008); Capelari & Maziero (1988)	Anamã; Presidente Figueiredo
<i>Fomes fasciatus</i> (Sw.) Cooke 1885		AC, AM, MT, PA, RO	Sotão e col. (2008); Jesus (1996)	Presidente Figueiredo
<i>Grammothele subargentea</i> (Speg.) Rajchenb. 1983	AMAZONAS	RR, PA	Drechsler-Santos e col. (2008)	Borba
<i>Hexagonia glabra</i> (P. Beauv.) Ryvarden 1999	AMAZONAS	PA, RO	Sotão e col. (2008)	Manaus; Presidente Figueiredo

CONTUNUA

CONTINUAÇÃO DA TABELA

<i>Hexagonia hydroides</i> (Sw.) M. Fidalgo 1968	AMAZONAS	AC, RR, PA, RO	Ryvarden & Johansen (1980)	Anamã; Autazes; Borba; Manaus; Coari; Careiro da várzea
<i>Hexagonia hirta</i> (P. Beauv.) Fr. 1838	AMAZONAS		Abrahão e col. (2009)	Manaus
<i>Lentinus crinitus</i> Lloyd 1920		AM, AP, PA, RO	Bononi e col. 2008; Meijer (2008)	Anamã; Autazes; Borba; Manaus; Careiro da várzea; Coari; Manicoré; Novo Aripuanã; Parintins
<i>Lentinus scleropus</i> (Pers.) Fr. 1836		AM	Gugliotta e col. (2016)	Coari
<i>Lentinus strigosus</i> Fr. 1825	AMAZONAS	RR	Gugliotta e col. (2016)	Anamã; Coari
<i>Lentinus velutinus</i> Fr. 1830	AMAZONAS	RO	Pegler (1983) , Meijer (2008)	Borba; Manaus
<i>Lenzites betulina</i> (L.) Fr. 1838	AMAZONAS	PA	Gugliotta e col. (2016)	Borba
<i>Lenzites elegans</i> (Spreng.) Pat		AM, PA, RO	Gugliotta (1999)	Coari; Manaus; Parintins
<i>Mycobonia flava</i> (Sw.) Pat. 1894		AM	Gomes-Silva & Gibertoni (2009)	Barcelos
<i>Nigroporus vinosus</i> (Berk.) Murrill 1905		AM, RR, PA	Ryvarden & Johansen (1980)	Manaus
<i>Perenniporia centrali-africana</i> Decock & Mossebo 2002	BRASL			Novo Aripuanã
<i>Perenniporia inflexibilis</i> (Berk.) Ryvarden 1972		MT, RO, AM	Ryvarden & Johansen (1980)	Coari
<i>Perenniporia martia</i> (Berk.) Ryvarden 1972		AM, AP, RO	Gugliotta e col. (2016)	Parintins; Presidente Figueiredo
<i>Perenniporia tephropora</i> (Mont.) Ryvarden 1972		AC, PA, RR, RO AM	Núñez & Ryvarden (1995)	Coari; Novo Aripuanã
<i>Polyporus coltricioides</i> nova espécie Fonseca & Ryvarden 2016	NOVA ESPÉCIE			Coari; Manaus
<i>Polyporus grammacephalus</i> Berk. 1842		AC, AM, PA, RO	Gibertoni e col. (2004)	Manaus; Presidente Figueiredo
<i>Polyporus guianensis</i> Mont. 1840		AC, AM, AP, RR, RO	Núñez & Ryvarden (2001)	Borba
<i>Polyporus leprieurii</i> Mont. 1840		AC, AM, RO, RR	Silveira & Wright (2005)	Barcelos; Manaus
<i>Trametes punicea</i> Fr. 1851	BRASIL			Anamã; Autazes; Borba; Manaus; Coari;
				Anamã; Autazes; Borba; Manaus; Careiro da várzea; Coari; Manicoré; Nova Olinda do Norte; Novo Aripuanã; Parintins; Barcelos; Presidente Figueiredo,
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.) Murrill 1904		AC, AM, PA, AP, RO	Gugliotta (1999)	

CONTUNUA

CONTINUAÇÃO DA TABELA

<i>Tinctoporellus epimiltinus</i> (Berk. & Broome) Ryvarden 1979		AC, AM, RO	Ryvarden & Johansen (1980)	Manaus
<i>Trametes elegans</i> (Spreng.) Fr. 1838	AMAZONAS	PA, RO	Sotão e col. (2002, 2003); Sotão e col. (2008), Capelari & Maziero (1988)	Autazes, Borba, Coari, Manaus, Parintins, Presidente Figueiredo
<i>Trametes lactinea</i> (Berk.) Sacc. 1888		AC, AM, RO, AC, PA, RR	Núñez & Ryvarden (2001)	Amanã, Barcelos, Careiro da Várzea Coari, Manaus, Novo Aripuanã, Nova Olinda do Norte,
<i>Trametes modesta</i> (Kunze ex Fr.) Ryvarden 1972		AC, AM, PA, RO, RR	Abrahão e col. (2009)	Novo Aripuã, Careiro da Várzea, Manaus, Borba,
<i>Trametes ochroflava</i> Cooke 1880		AC, AM, RO, RR, PA	Ryvarden (1988)	Manaus, Presidente Figueiredo
<i>Trametes rosea</i> Lloyd 1915	BRASIL			Coari
<i>Trichaptum byssogenum</i> (Jungh.) Ryvarden 1972		AC, AM, PA, RO, RR	Gugliotta e col. (2010)	Novo Aripuanã, Autazes, Manaus, Coari
<i>Trichaptum perrottetii</i> (Lév.) Ryvarden 1972		AC, AM, RO, RR	Gilbertson & Ryvarden (1987)	Borba
<i>Trichaptum sprucei</i> (Berk.) Rajchenb. & Bianchin. 1992		AM, PA, RO	Gibertoni e col. (2011)	Presidente Figueiredo
<i>Sebipora aquosa</i> Miettinen 2012	BRASIL		Miettinen (2012)	Borba
Phanerochaetaceae				
<i>Flaviporus liebmannii</i> (Fr.) Ginns 1980		AM, PA, RO,	Sotão e col. (2008); Capelari & Maziero (1988)	Presidente Figueiredo
Pleurotaceae				
<i>Pleurotus djamor</i> (Rumph. ex Fr.) Boedijn 1959		AM, AP, PA, RO	Sotão e col. (2009)	Coari, Barcelos
Schizophyllaceae				
<i>Schizophyllum commune</i> Fr. 1815	AMAZONAS	AP, RO	Sotão e col. (1991)	Coari-Am, Careiro da Várzea, Anamã, Autazes, Parintins, Borba, Barcelos, Nova Olinda do Norte, Manaus, Manicoré, Novo Aripuanã
Stereaceae				
<i>Stereum sanguinolentum</i> (Alb. & Schwein.) Fr. 1838	BRASIL		Calderoni (2003)	Novo Aripuanã, Manicoré, Autazes, Manaus

6.2 Isolamento

6.2.1 Culturas Puras

Dos 323 fungos coletados, aqueles que apresentaram basidiocarpos saudáveis foram isolados, dos quais foram obtidas 43 culturas puras (Figuras 2,3,4 e 5). Estes foram utilizados na produção de extratos, identificação molecular e identificação por MALDI- TOF (Tabela 3).

Tabela 3 Culturas puras dos Agaricomycetes oriundas dos isolados e breve descrição morfológica das colônias.

Nº	Código	Identificação	Descrição da cultura
01	D024	<i>Trametes elegans</i>	Crescimento moderado; colônia branca; margem lisa
02	D025	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Crescimento rápido; colônia branca a princípio, tornando-se salmão com os dias; margem lisa
03	D028	<i>Trametes polyzona</i>	Crescimento moderado; colônia branca; margem lisa
04	D029	<i>Trametes</i>	Crescimento moderado; colônia branca; margem lisa
05	D030	<i>Trametes elegans</i>	Crescimento muito rápido; colônia branca; margem lisa
06	D039	<i>Lentinus striatulus</i>	Crescimento moderado; colônia branca; margem lisa
07	D046	<i>Flavodon flavus</i>	Crescimento rápido; colônia amarelo claro; margem lisa
08	D054	<i>Trametes elegans</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
09	D059	<i>Trametes polyzona</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
10	D060	<i>Trametes menziesii</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
11	D063	<i>Schizophyllum commune</i>	Crescimento lento, colônia branca a pardo, margem irregular
12	D064	<i>Schizophyllum commune</i>	Crescimento lento, colônia branca a pardo, margem irregular
13	D065	<i>Punctularia sp</i>	Crescimento moderado; colônia ferrugínea; margem lisa
14	D067	<i>Pleurotus djamor</i>	Crescimento moderado; colônia branca; margem lisa
15	D124	<i>Perenniporia tephropora</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
16	D072	<i>Fomitopsis nivosa</i>	Crescimento moderado; colônia branca; margem lisa
17	D077	<i>Coriolopsis polyzona</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
18	D078	<i>Lenzites elegans</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
19	D079	<i>Lenzites elegans</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
20	D080	<i>Daedaleopsis flavida</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
21	D083	<i>Trametes elegans</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
22	D086	<i>Schizophyllum commune</i>	Crescimento moderado, colônia branca a pardo, margem irregular
23	D089	<i>Ganoderma tornatum</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
24	D088	<i>Lenzites elegans</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
25	D094	<i>Trametes elegans</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
26	D096	<i>Lentinus sp.</i>	Crescimento moderado; colônia branca; margem lisa
27	D097	<i>Rigidosporus sp</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
28	D103	<i>Ganoderma orbiforme</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
29	D104	<i>Schizophyllum commune</i>	Crescimento moderado; colônia branca; margem lisa
30	D106	<i>Trametes elegans</i>	Crescimento moderado; colônia branca; margem lisa
31	D107	<i>Sebipora aquosa</i>	Crescimento moderado; colônia branca; margem lisa
32	D114	<i>Fomitopsis nivosa</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
33	D118	<i>Flavodon flavus</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
34	D119	<i>Fomitopsis nivosa</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
35	D124	<i>Coriolopsis polyzona</i>	Crescimento moderado; colônia branca; margem lisa
36	D128	<i>Perenniporia centrali-africana</i>	Crescimento moderado; colônia branca; margem lisa
37	D134	<i>Stereum saguinolentum</i>	Crescimento rápido; colônia creme escuro; margem lisa
38	D145	<i>Coriolopsis polyzona</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
39	D173	<i>Coriolopsis polyzona</i>	Crescimento moderado; colônia branca; margem lisa
40	D172	<i>Coriolopsis rigida</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
41	D192	<i>Perenniporia tephropora</i>	Crescimento moderado; colônia branca; margem lisa
42	D249	<i>Trametes elegans</i>	Crescimento rápido; colônia branca; margem lisa
43	D294	<i>Fomitopsis roseoalba</i>	Crescimento moderado; colônia branca; margem lisa



Figura 2: *Punctularia* sp. Aspecto macroscópico do (A) Basidioma, (B) da superfície himenial foram coletados espécimes no município de Borba, Manicoré, Coari e Nova Olinda do Norte. Cultura pura cultivada em meio BDL (Batata, Dextrose, Extrato de Levedura), (C) 5 dias de crescimento, (D) 10 dias de crescimento no escuro a 28 °C.

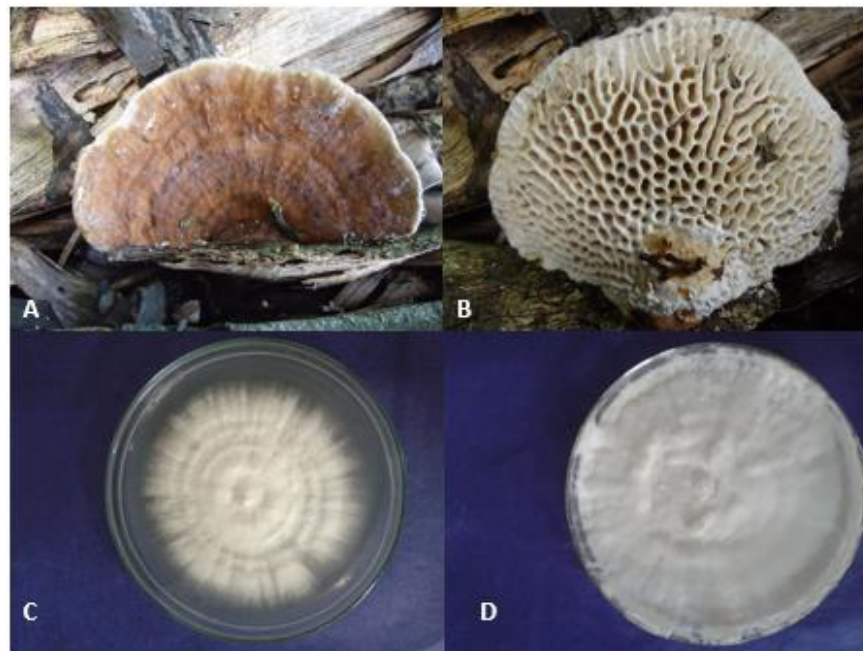


Figura 3: *Daedaleopsis flava*. Aspecto macroscópico do (A) Basidioma, (B) da superfície himenial espécime coletado no município de Parintins. Cultura pura cultivada em meio BDL (Batata, Dextrose, Extrato de Levedura), (C) 10 dias de crescimento, (D) 20 dias de crescimento no escuro a 28 °C.



Figura 4: *Schizophyllum commune*. Aspecto macroscópico do (A) Basidioma, (B) da superfície himenial espécime coletados nos municípios de Coari-Am, Careiro da Várzea, Anamã, Autazes, Parintins, Borba, Barcelos, Nova Olinda do Norte, Manaus, Manicoré, Novo Aripuanã. Cultura pura cultivada em meio BDL (Batata, Dextrose, Extrato de Levedura), (C) 15 dias de crescimento, (D) 30 dias de crescimento no escuro a 28 °C (formou corpo de frutificação (Basidioma)).

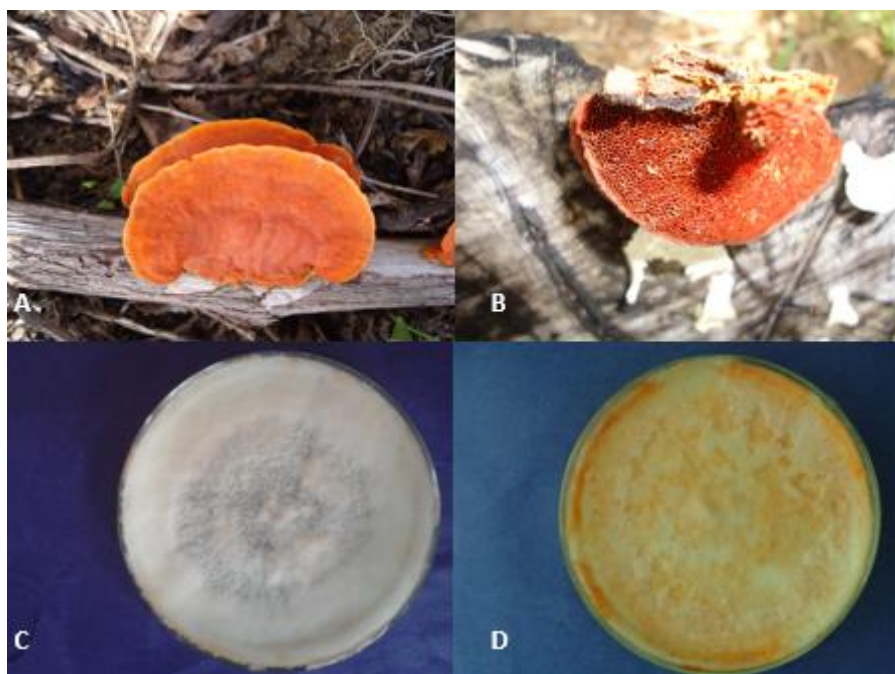


Figura 5: *Pycnoporus sanguineus*. Aspecto macroscópico do (A) Basidioma, (B) da superfície himenial espécime coletados nos municípios de Anamã, Autazes, Borba, Manaus BR 174, Coari, Manicoré, Nova Olinda do Norte, Novo Aripuanã, Parintins, Barcelos e Presidente Figueiredo. Cultura pura cultivada em meio BDL (Batata, Dextrose, Extrato de Levedura), (C) 10 dias de crescimento, (D) 20 dias de crescimento no escuro a 28 °C.

6.3 Análise Molecular

Das 49 amostras analisadas 6 foram realizadas a partir de fragmentos congelados. Diante dos resultados obtidos pela extração de rDNA a metodologia utilizada foi eficaz para quantidade e pureza de DNA utilizadas para as técnicas de sequenciamento.

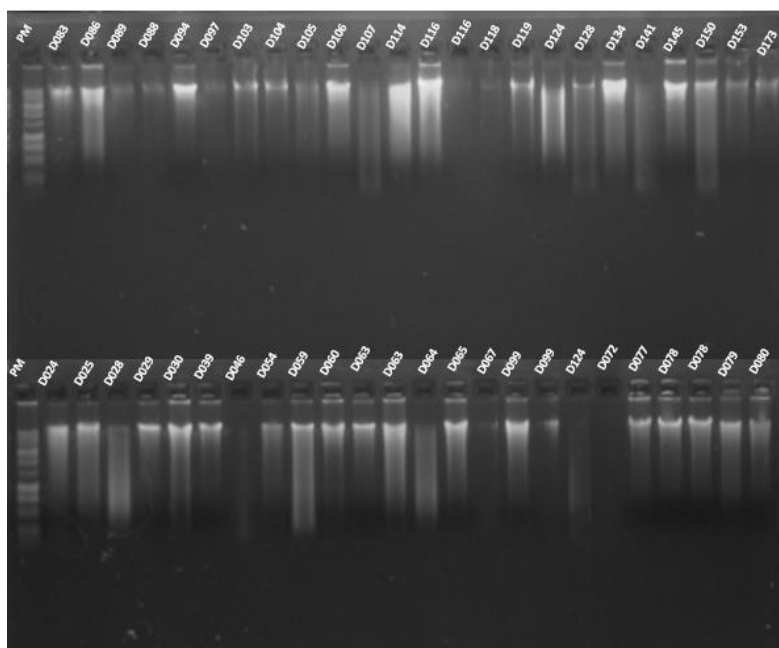


Figura 6. Perfil eletroforético em gel agarose 0,8% corado com gel red da extração de DNA das amostras de Agaricomycetes. Poço 1-Marcador molecular de 1Kb, os seguintes, as demais amostras.

Os iniciadores específicos *Its1* e *Its2* apresentaram um fragmento de aproximadamente 600 pb correspondente a uma região conservada (Figura 6). De acordo com Gardes e Bruns (1993) essa região é utilizada no estudo da sistemática molecular ao nível de espécie e amplamente sequenciada em fungos. Inclusive é considerada o barcode (código de barras de DNA) dos fungos (SCHOCH e col., 2012).

As análises da identificação molecular foram realizadas por comparação das sequências depositadas no GenBank. O resultado do sequenciamento permitiu um alinhamento com as sequências nucleotídicas que corresponde a identificação dos fungos como sendo do grupo Agaricomycetes, com taxa de similaridade acima de 96 %, utilizando a ferramenta BLASTn.

Tabela 4: Lista de espécies de Agaricomycetes isolados e oriundas do GenBank utilizadas na análise molecular para construção das árvores filogenéticas a partir do método de máxima verossimilhança (ML).

Espécie	Origem	Número de acesso no GenBank
<i>Amauroderma aurantiacum</i>	Brasil	J X310840.1
<i>Amauroderma intermedium</i>	Brasil	KR816524.1
<i>Amauroderma intermedium D141</i>	Nova Olinda do Norte/Am	**
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Tailândia	J N116698.1
<i>Coriolopsis rigida</i>	República Checa	J F894112.1
<i>Coriolopsis rigida D172</i>	Novo Aripuanã/Am	**
<i>Coriolopsis caperata</i>	Índia	KF564288.1
<i>Daedalea microsticta</i>	EUA	FJ 403209.1
<i>Daedalea dickinsii</i>	Japão	AB733160.1
<i>Daedaleopsis flavida D080</i>	Parintins/Am	**
<i>Daedaleopsis flavida</i>	Índia	KF425651.1
<i>Favolus aff. tenuiculus D099</i>	Barcelos/Am	**
<i>Favolus emerici</i>	Austrália	KP013055.1
<i>Favolus aff. tenuiculus</i>	Austrália	KP013054.1
<i>Fomitopsis durescens</i>	China	KF937293.1
<i>Fomitopsis durescens D114</i>	Borba/Am	**
<i>Fomitopsis nivosa</i>	Finlândia	KC595918.1
<i>Fomitopsis nivosa D072</i>	Coari/Am	**
<i>Fomitopsis nivosa D119</i>	Borba/Am	**
<i>Fomitopsis palustres</i>	Japão	AB733120.1
<i>Fomitopsis palustres</i>	EUA	KJ 995920.1
<i>Fomitopsis roseoalba D294</i>	Presidente Figueiredo/Am	**
<i>Fomitopsis sp.</i>	Finlândia	KC595911.1
<i>Fomitopsis nivosa</i>	Colômbia	HQ248222.1
<i>Fomitopsis palustres</i>	Japão	AB604156.1
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Rússia	KJ 857264.1
<i>Ganoderma australe</i>	Brasil	J Q514105.1
<i>Ganoderma cupreum</i>	Quênia	J X840346.1
<i>Ganoderma lobatum</i>	China	KF605672.1
<i>Ganoderma mastoporum</i>	China	J X840351.1
<i>Ganoderma orbiforme</i>	Brasil	J X310816.1
<i>Ganoderma orbiforme D103</i>	Barcelos/Am	**
<i>Ganoderma tornatum D089</i>	Parintins/Am	**
<i>Ganoderma cupreum</i>	Austrália	AY569450.1
<i>Ganoderma subfornicatum</i>	França	J X082352.1
<i>Ganoderma tornatum</i>	Brasil	J Q514110.1
<i>Leiotrametes lactinea</i>	Austrália	KP012950.1
<i>Lentinus badius</i>	Tailândia	GU207275.1
<i>Lentinus bertieri</i>	Tailândia	GU207304.1
<i>Lentinus bertieri</i>	Tailândia	GU207307.1
<i>Lentinus crinitus</i>	Rússia	KM411462.1
<i>Lentinus crinitus D069</i>	Coari/Am	**
<i>Lentinus escleropus D039</i>	Coari/Am	**
<i>Lentinus polychrous</i>	EUA	KP283486.1
<i>Lentinus sajorcaju</i>	Austrália	KJ 654474.1

CONTINUA

CONTUNUAÇÃO DA TABELA

<i>Lentinus sajorcaju</i>	EUA	KP283492.1
<i>Lentinus badius</i>	EUA	KP283479.1
<i>Lentinus crinitus</i>	Brasil	J Q955723.1
<i>Lentinus glabratus</i>	Tailândia	GU207250.1
<i>Lenzites elegans D088</i>	Parintins/Am	**
<i>Lenzites elegans D116</i>	Borba/Am	**
<i>Lenzites elegans D105</i>	Barcelos	**
<i>Lenzites elegans</i>	Colômbia	HQ248217.1
<i>Mycobonia flava</i>	EUA	AY513571.1
<i>Perenniporia truncatospora D128</i>	Novo Aripuanã	**
<i>Perenniporia corticola</i>	Tailândia	KC570342.1
<i>Perenniporia subasida</i>	Tailândia	KC570336.1
<i>Perenniporia subtephropora</i>	China	J Q861753.1
<i>Perenniporia tenuis</i>	China	HQ848474.1
<i>Perenniporia tephropora</i>	China	J N048763.1
<i>Perenniporia tephropora D192</i>	Novo Aripuanã	**
<i>Perenniporia truncatospora</i>	China	J N048778.1
<i>Perenniporia corticola</i>	China	HQ848472.1
<i>Pilatoporus ibericus</i>	Islândia	KC595930.1
<i>Pleurotus calypttratus D111</i>	Borba/Am	**
<i>Pleurotus djamor</i>	China	KJ 754108.1
<i>Polyporus coltricioides D040</i>	Manaus/Am	**
<i>Polyporus grammocephalus</i>	Sri Lanka	KP734201.1
<i>Polyporus leprieurii</i>	EUA	AF516567.1
<i>Pseudofavolus cucullatus D122</i>	Borba/Am	**
<i>Pseudofavolus cucullatus</i>	EUA	AF516600.1
<i>Pycnoporus puniceus</i>	Tailândia	FJ 372685.1
<i>Pycnoporus sanguineus D025</i>	Manaus/Am	**
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Tailândia	FJ 372672.1
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	França	AF363769.1
<i>Pycnoporus coccineus</i>	Coreia	KP255840.1
<i>Schizophyllum commune D064</i>	Coari/Am	**
<i>Schizophyllum commune D086</i>	Parintins/Am	**
<i>Sebipora aquosa D107</i>	Borba/Am	**
<i>Sebipora aquosa</i>	Austrália	KJ 654615.1
<i>Stereum annosum</i>	Tunísia	DQ000294.1
<i>Stereum annosum D134</i>	Manicoré/Am	**
<i>Stereum hirsutum</i>	China	FJ 810129.1
<i>Stereum sanguinolentum</i>	China	EU273556.1
<i>Stereum gausapatum</i>	Argentina	KC180755.1
<i>Stereum rugosum</i>	Reino Unido	FN539052.10
<i>Trametes cf. cubensis</i>	China	KC848323.1
<i>Trametes cf. cubensis</i>	Austrália	KJ 654515.1
<i>Trametes elegans</i>	Argentina	KF850160.1
<i>Trametes elegans</i>	EUA	J N164973.1
<i>Trametes elegans 150</i>	Nova Olinda do Norte/Am	**
<i>Trametes elegans D030</i>	Manaus/Am	**
<i>Trametes elegans D078</i>	Parintins/Am	**
<i>Trametes elegans D054</i>	Coari/Am	**
<i>Trametes elegans D079</i>	Parintins/Am	**
<i>Trametes elegans D094</i>	Parintins/Am	**
<i>Trametes hirsuta</i>	Rússia	AB158313.1
<i>Trametes lactinea</i>	França	J X082368

CONTINUA

CONTINUAÇÃO DA TABELA

<i>Trametes manilaensis</i>	China	KC848314.1
<i>Trametes máxima</i>	EUA	J N164957.1
<i>Trametes menziesii</i>	França	J N645085.1
<i>Trametes menziesii</i>	China	KC848289.1
<i>Trametes polyzona</i> D028	Manaus/Am	**
<i>Trametes polyzona</i>	EUA	J N164979.1
<i>Trametes polyzona</i>	Tailândia	KT281117.1
<i>Trametes polyzona</i> D077	Coari/Am	**
<i>Trametes punicea</i> D123	Borba/Am	**
<i>Trametes punicea</i>	Austrália	KP012988.1
<i>Trametes sanguinea</i>	Argentina	KF850156.1
<i>Trametes sanguinea</i>	China	KJ 850206.1
<i>Trametes trogii</i>	Turquia	HM989941.1
<i>Trametes versicolor</i>	Índia	GQ906769.1
<i>Trametes cubensis</i>	Sri Lanka	KP771708.1
<i>Trametes elegans</i> D083	Parintins/Am	**
<i>Trametes elegans</i>	Sri lanka	KP780433.1
<i>Trametes elegans</i> D024	Manaus/Am/Br	**
<i>Trametes elegans</i>	Índia	KP262029.1
<i>Trametes elegans</i> D106	Coari/Am	**
<i>Trametes lactinea</i>	República Checa	HM756193.1
<i>Trametes sanguinea</i>	Austrália	KP012989.1

** Sequencias a serem depositadas no GenBank.

A árvore filogenética foi construída pela análise das regiões *Its*, através do método de máxima verossimilhança (ML) com 1.000 réplicas (*bootstrap*). No intuito de esclarecer o posicionamento filogenético das espécies analisadas nesse trabalho, foram considerados representantes de oito famílias: Polyporaceae, Ganodermataceae, Fomitopsidaceae, Stereaceae, Meruliaceae, Pleurotaceae, Sebipora e Schizophyllaceae. De acordo com Nilsson e col. (2009) as regiões *Its* por possuírem alta variação interespecífica, são as mais popularmente utilizadas para classificar espécies proximamente relacionadas.

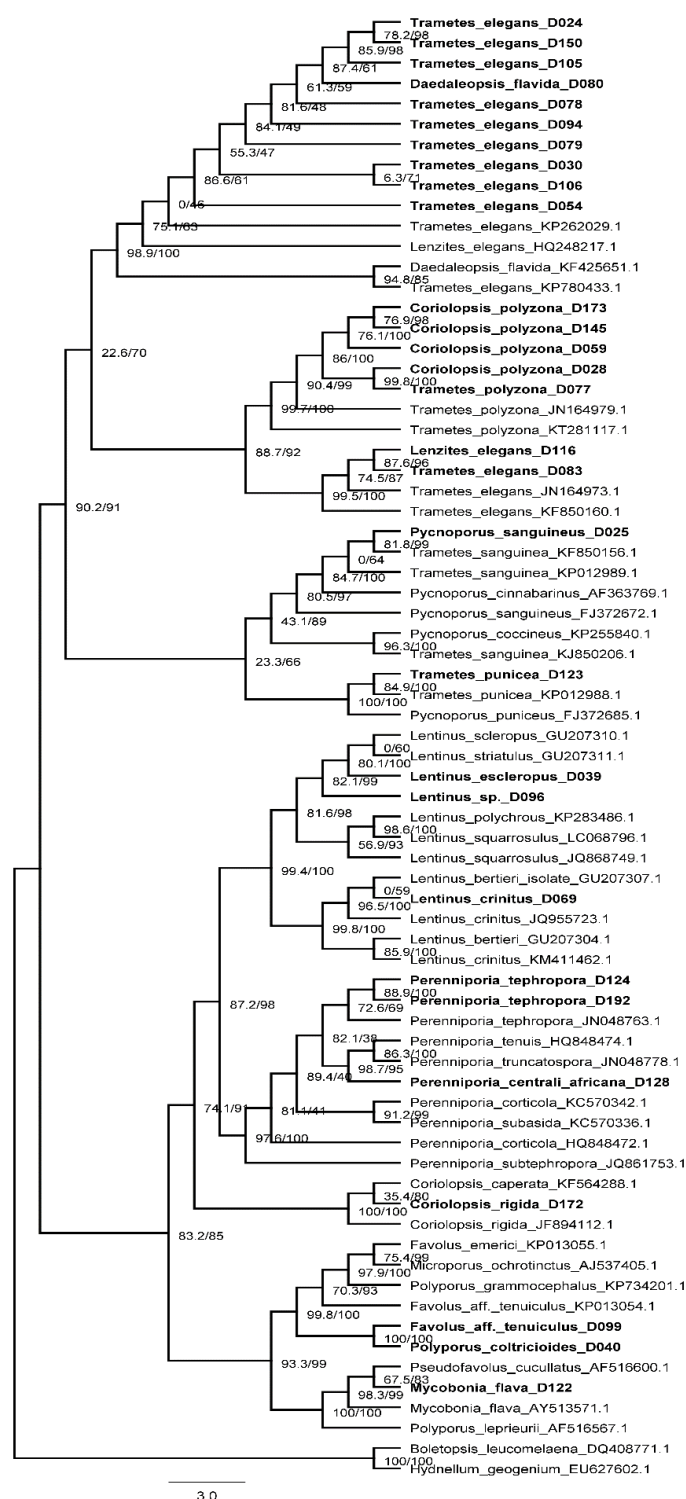


Figura 7: Reconstrução filogenética da família Polyporaceae a partir do alinhamento dos nucleotídeos relativos aos fragmentos da região ITS (rDNA). Valores de *bootstrap* foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (1.000 *bootstrap*). Duas sequências da espécie (*Boletopsis leucomelaena* e *Hydnellum geogenium*) foram utilizadas como grupo externo. Em negrito, apresentam-se as sequências obtidas neste trabalho.

Polyporaceae: a sequência de *Trametes elegans* D024 adquirida neste trabalho se agrupou com a sequência da mesma espécie, com valor estatístico 96% de *bootstrap* (Figura 7). *Trametes elegans* D105 formou clado secundário com a sequência da mesma espécie com suporte de 98% de *bootstrap*. *Daedaleopsis flavida* D080 agrupou com a sequência de *Trametes elegans* D105 com suporte de 61%. Filogeneticamente a relação entre *D. flavida* e *T. elegans* já havia sido observada por Justo e Hibbett (2011) por apresentarem estreita relação taxonômica (GILBERTSON & RYVARDEN, 1987). De acordo com Justo & Hibbett (2011) apresenta basidioma pileado, himenóforo poroso, sistema hifálico trimítico. As demais sequências de *T. elegans* agruparam com a sequência da mesma espécie com suporte acima de 60% de *bootstrap*. *Lenzites elegans* D116 e *Trametes elegans* D083 formaram clados afastados dos demais *T. elegans*, poderia ser explicado por terem sido coletados em municípios diferentes. Esses espécimes agruparam-se com valor de suporte 96% de *bootstrap* e formaram clados secundários com *T. elegans* oriundo do GenBank dando suporte à identificação, e considerando caracteres morfológicos da espécie coletada no Amazonas confirma-se como membros do gênero *Trametes*.

Pycnoporus sanguineus D025 agrupou com *Pycnoporus sanguineus* oriundo do GenBank com valor estatístico de suporte de 99% e *Trametes punicea* D123 com valor estatístico de 100%. *Pycnoporus* é um gênero intimamente relacionado com *Trametes*, sendo morfológicamente semelhante em todos os caracteres, exceto a notável cor vermelho-alaranjado brilhante dos basidiomas (RYVARDEN, 1972). *P. sanguineus* é encontrado em troncos de quase todos os tipos de madeira, sendo comum em locais abertos e ensolarados e facilmente reconhecível pelo basidioma vermelho alaranjado (GILBERTSON & RYVARDEN, 1987, GUGLIOTTA & BONONI 1999), as mesmas características morfológicas ocorrem para *Trametes punicea* diferindo por superfície himenial poróide, poros irregulares, grande por poros maiores em relação a *P. sanguineus* (RYVARDEN, 1972). Sendo assim, considerando os dados morfológicos pode ser confirmada a identificação desses espécimes coletados no estado do Amazonas como *P. sanguineus* e *T. punicea*.

Corioloopsis polyzona D173, D145, D059, D028 e *Trametes polyzona* D077 formaram clados com as sequências da mesma espécie com suporte estatístico acima de 70% de *bootstrap*. Deste modo, analisando as características morfológicas, pode ser confirmada a identificação dos espécimes neste trabalho como *C. polyzona*. De acordo com Ryvarde e Johansen (1980), os basidiósporos desta espécie são oblongos a ligeiramente elipsóides, hialinos, com parede fina e lisa, (4,5-) 5-8,5 × (2-) 2,5-3,5 µm e o tamanho varia consideravelmente dentro de uma coleção. *C. polyzona* apresenta formato do basidioma bastante variável, dimidiado, flabeliforme a reniforme, às vezes reflexo com

uma base efusa. Apresenta muita semelhança com espécimes do antigo *Trametes hirsuta* (Wulf.:Fr.) Pilát, seus basidiomas se tornam ocráceos a castanho escuros após vários anos em coleções. O gênero *Corioloopsis*, às vezes, considerados como pertencentes a *Trametes* (SINGER, 1961).

Lentinus scleropus D039, *Lentinus sp.* D096 e *Lentinus crinitus* D069 formaram clados primários e secundários com as sequências do GenBank apresentando 99 e 100% de suporte de bootstrap respectivamente. Analisando o resultado da consulta ao banco de dados do GenBank através da ferramenta BLASTn, a sequência de *Lentinus scleropus* D039 demonstrou similaridade de 84 % com a sequência *Lentinus striatulus* D096 precedido de baixos valores de *query coverage* (33%). O gênero apresenta-se como de podridão branca, esporos hialinos e lamelas decorrentes (SEELAN, 2015). De acordo com Hibbert e Vilgalys (1993), a maioria das espécies de *Lentinus* forma um grupo polifilético. As análises de dados moleculares dessa espécie nesse estudo ainda são inconclusivas e estudos futuros, com a obtenção de novas sequências serão necessários para a real elucidação do posicionamento filogenético dessa espécie.

Perenniporia tephropora D124 e *Perenniporia tephropora* D192 obtidas neste trabalho agruparam-se com a sequência da mesma espécie, com alto valor estatístico (100% de *bootstrap*). *Perenniporia truncatospora* D128 formou clado secundário com a sequência do GenBank de *Perenniporia truncatospora* JN04878.1, apresentando (95% de *bootstrap*). Relatos de Lin e Cui (2013), confirmam em seu estudo que linhagens de *Perenniporia* apresentam-se monofiléticas suportados com 100% de confiança através de análise Bayesiana e de Parcimônia.

Favolus aff.tenuiculus D099 apresentou formação de clado com *Polyporus coltricioides* D040 suportado com confiança 100% de *bootstrap*, a relação de *Favolus* com *Polyporus* já havia sido observada em estudos por Sotome e col. (2008) as relações entre o gênero *Favolus* e *Polyporus grammacephalus* têm sido sustentados com base nas características taxonômicas.

Mycobonia flava D122 formou clado secundário com a sequência *Mycobonia flava* oriunda do GenBank suportado com confiança de 99% de *bootstrap*. Estudos realizados por Ugeri e Cargas (2010) confirmam a formação de um clado irmão de *Pseudofavolus* com *Mycobonia*, com suportes estatísticos de 99 e 80% de *bootstrap*, respectivamente, através da análise de parcimônia e de verossimilhança.

O grupo representado pela família Ganodermatacea (Figura 8) mostra *Ganoderma tornatum* D089 formando clado com a sequência de *Ganoderma tornatum* do GenBank JQ514110.1 entretanto, com baixo valor de suporte (11%). Essa falta de resolução na análise das árvores filogenéticas podem ser resultado de recente divergência entre as espécies e consequentemente uma separação incompleta

entre as linhagens. As análises de dados moleculares dessa espécie nesse estudo ainda são inconclusivas sendo necessário obtenção de novas sequências que permitirão a elucidação do posicionamento filogenético.

A espécies de *Ganoderma orbiforme* D103 formou clado com as sequências brasileiras do GenBank com alto valor de *bootstrap* 100%. De acordo com Moncalvo e Ryvarden, (1997), o gênero *Ganoderma* é caracterizado por apresentar basidiósporos de parede dupla com vértice truncado e endósporos ornamentados. Espécimes brasileiras de *Ganoderma* formam um grupo monofilético (LIMA-JÚNIOR e col., 2014).

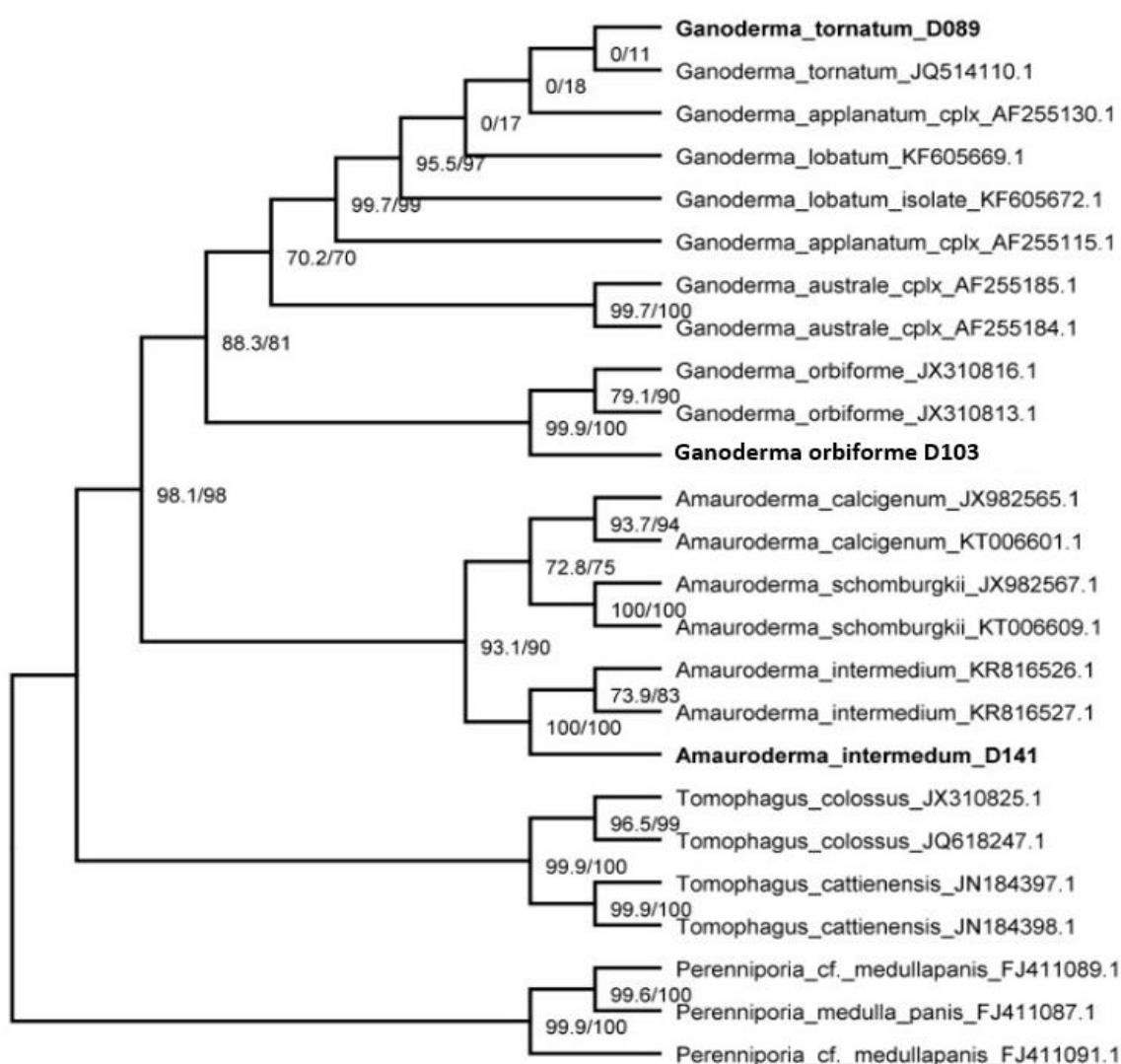


Figura 8: Reconstrução filogenética da família Ganodermataceae a partir do alinhamento dos nucleotídeos relativos aos fragmentos da região ITS (rDNA). Valores de *bootstrap* foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (1000 *bootstrap*). Três sequências da espécie (*Perenniporia medulla-panis*) foram utilizadas como grupo externo. Em negrito, apresentam-se as sequências obtidas neste trabalho.

O sistema hifálico apresentam-se dimítico ou conexões trimítico e grampo de conexão formando hifas generativas. Kim e col. (2007) analisaram a filogenia dos táxons de *Fomitopsis*, mostraram que o gênero é heterogêneo, com três grupos ou ramos. O grupo apresenta espécie tipo do gênero *F. pinicola* também inclui *F. palustres*.

Stereum sanguinolentum D134 (Figura 10) mostrou valor baixo de *bootstrap* (45%) formando clado com *Stereum sanguinolentum* do GenBank. Surgere-se novas análises para elucidar o posicionamento filogenético dessa espécie.

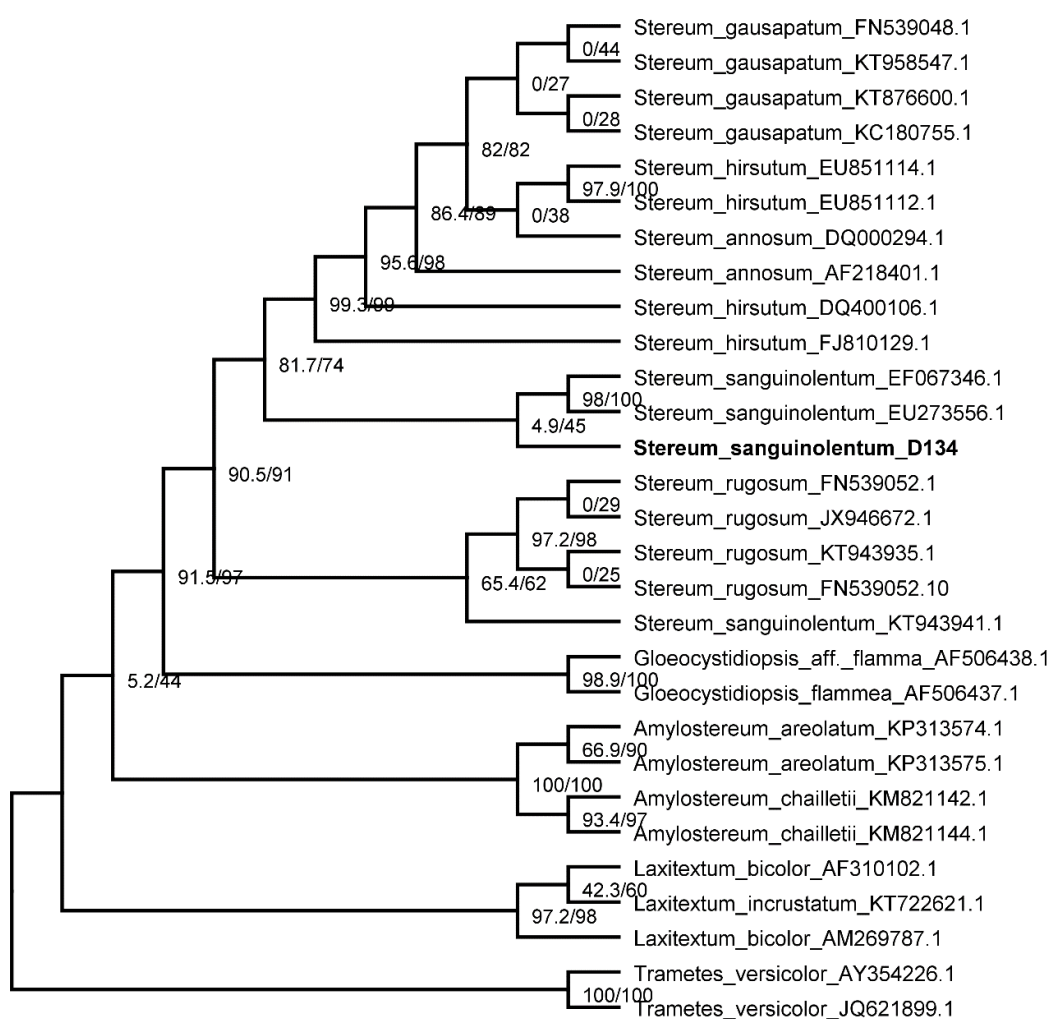


Figura 10: Reconstrução filogenética da família Stereaceae a partir do alinhamento dos nucleotídeos relativos aos fragmentos da região ITS (rDNA). Valores de *bootstrap* foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (1000 *bootstrap*). Duas sequências das espécies (*Laxitextum incrustatum* e *Laxitextum bicolor*) foram utilizadas como grupo externo. Em negrito, apresentam-se as sequências obtidas neste trabalho.

A família Meruliaceae (Figura 11) apresenta as sequências de *Flavodon flavus* D046 e *Flavodon flavus* D118 agruparam-se com a sequência da mesma espécie deste trabalho suportados com alto valor de confiança (100% de *bootstrap*). O BLASTn da sequência demonstrou similaridade de 100% com sequências *Flavodon flavus* do GenBank. Segundo Ryvardeen (1973), *Flavodon flavus* é caracterizada por apresentar cor amarelada, e possuir sistema hifálico monomítico. Sendo assim, considerando os dados morfológicos pode ser confirmada a identificação desses espécimes coletados no estado do Amazonas como *F. flavus*.

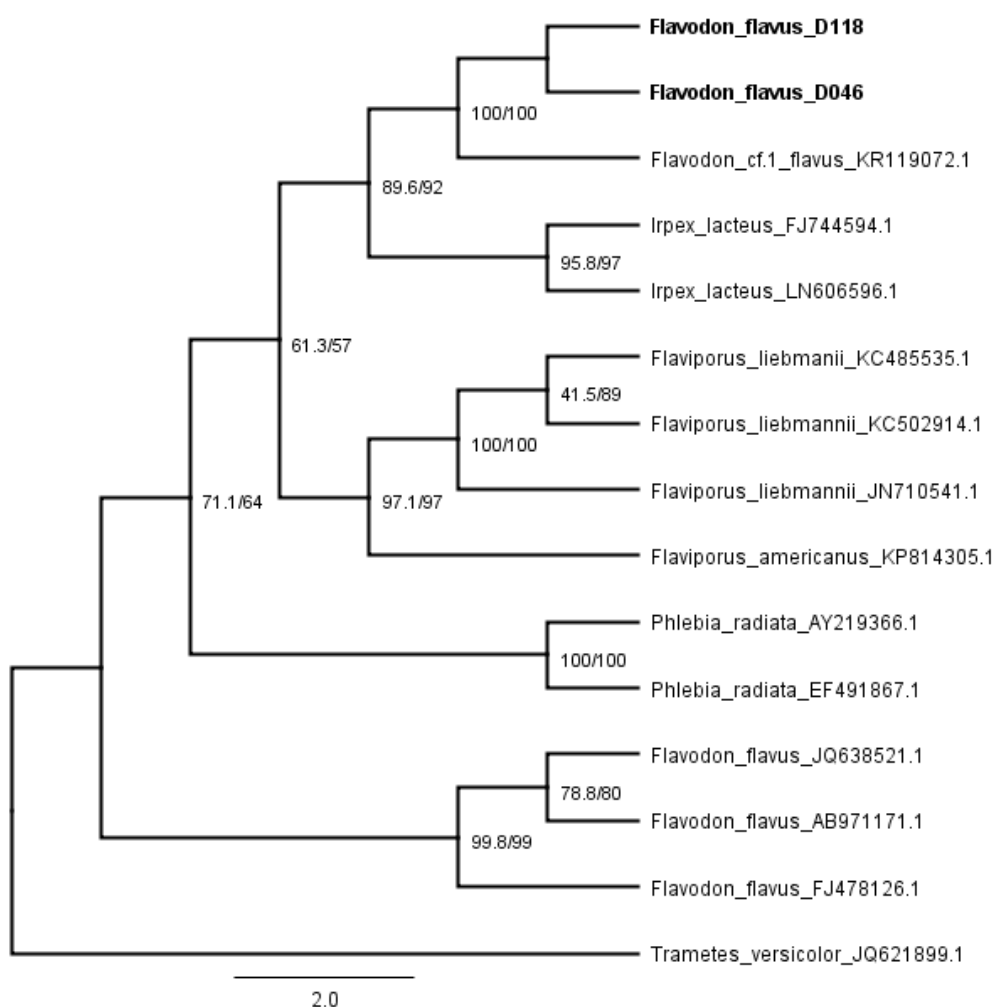


Figura 11: Reconstrução filogenética da família Meruliaceae a partir do alinhamento dos nucleotídeos relativos aos fragmentos da região ITS (rDNA). Valores de *bootstrap* foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (1000 *bootstrap*). Duas sequências da espécie (*Trametes versicolor*) foram utilizadas como grupo externo. Em negrito, apresentam-se as sequências obtidas neste trabalho.

Em *Pleurotaceae* (Figura 12) a sequência de *Pleurotus djamor* D111 apresentou clado secundário com *Pleurotus djamor* KJ754108.1 com valor de 99% de *bootstrap*. Estudo realizado por Imtiaj e col. (2011) usaram sequências que é suportado por análise filogenética, os quais mostraram estirpes de *Pleurotus* coletadas de diferentes ambientes que têm uma pequena variação genética no caso de espécies diferentes. Algumas estirpes pertencentes a mesma espécie mostrou 100% de semelhança, mesmo aqueles coletados em diferentes regiões, sugerindo que os estirpes que foram estudadas poderiam ser distribuídos de um ancestral comum.

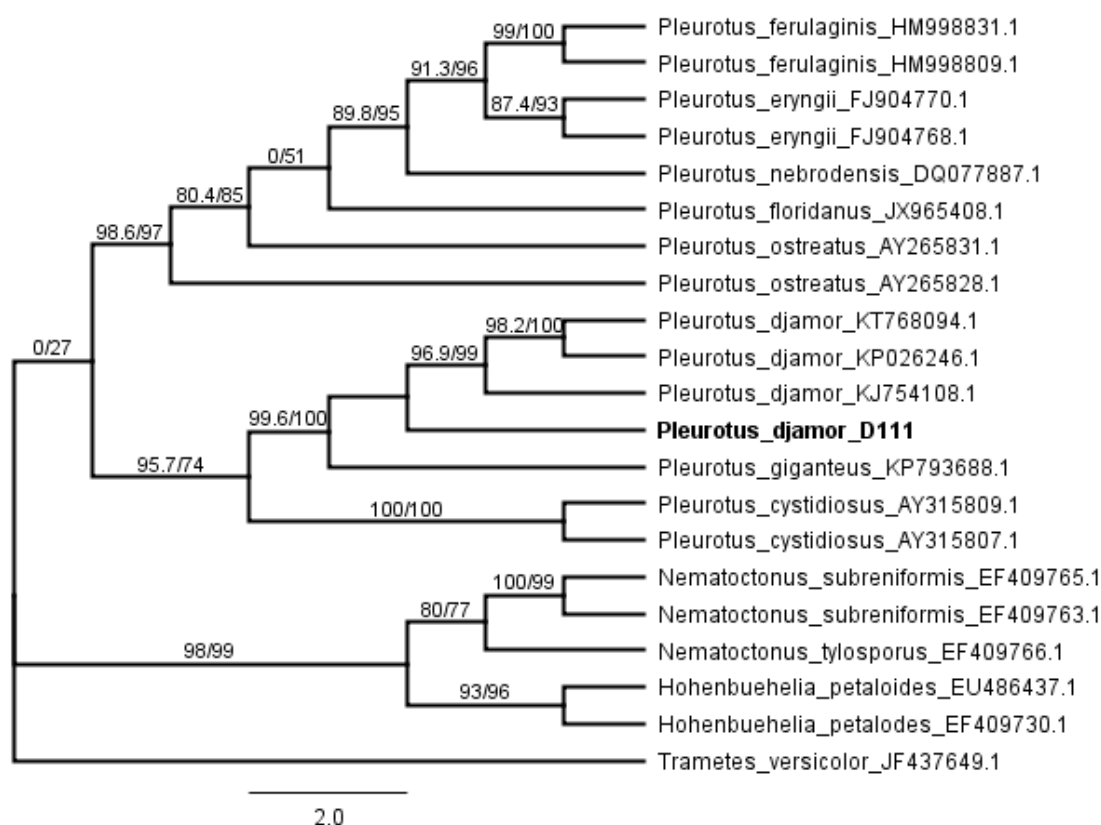


Figura 12: Reconstrução filogenética da família Pleurotaceae a partir do alinhamento dos nucleotídeos relativos aos fragmentos da região ITS (rDNA). Valores de *bootstrap* foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (1000 *bootstrap*). Sequência da espécie de *Trametes versicolor* foi utilizada como grupo externo. Em negrito, apresentam-se as sequências obtidas neste trabalho.

O gênero *Sebipora* (Figura 13) apresenta a sequência da espécie *Sebipora aquosa* D107 que formou clado com *Sebipora aquosa* HQ659240 suportados com valor de confiança 82% de *bootstrap*. *Sebipora* possui hifas monomítica representante dos fungos de podridão branca e espécies com esporos com paredes finas (MIETTINEN e RAJCHENBERG 2012).

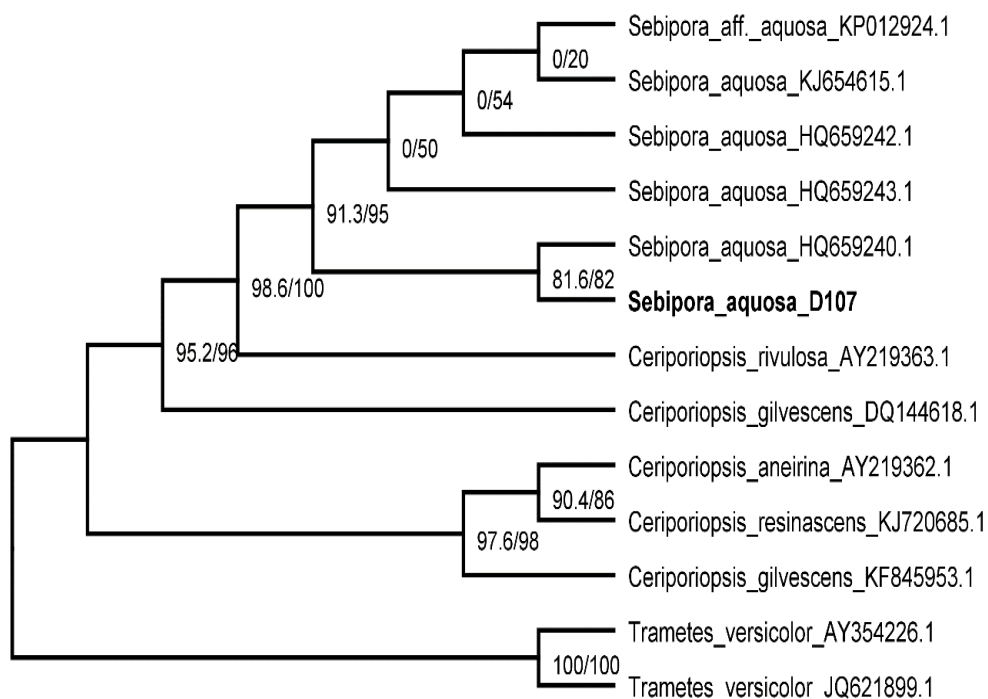


Figura 13: Reconstrução filogenética de *Sebiopora* pertencente a ordem Polyporales a partir do alinhamento dos nucleotídeos relativos aos fragmentos da região *ITS* (rDNA). Valores de *bootstrap* foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança 1000 *bootstrap*). Duas sequências da espécie (*Trametes versicolor*) foram utilizadas como grupo externo. Em negrito, apresentam-se a sequência obtidas neste trabalho.

Schizophyllum (Figura 14) agrupou com a sequência da mesma espécie *Schizophyllum commune* D64 e D86 deste trabalho, suportados com confiança de 99% de *bootstrap*). Nuhu e col. (2010) avaliaram a diversidade genética e exigências físico-químicas para o crescimento vegetativo em diferentes cepas de *Schizophyllum*, e demonstraram que a região *ITS* do rDNA é muito útil para avaliar relações filogenéticas em níveis taxonômicos dos espécimes coletados em várias localidades geográficas.

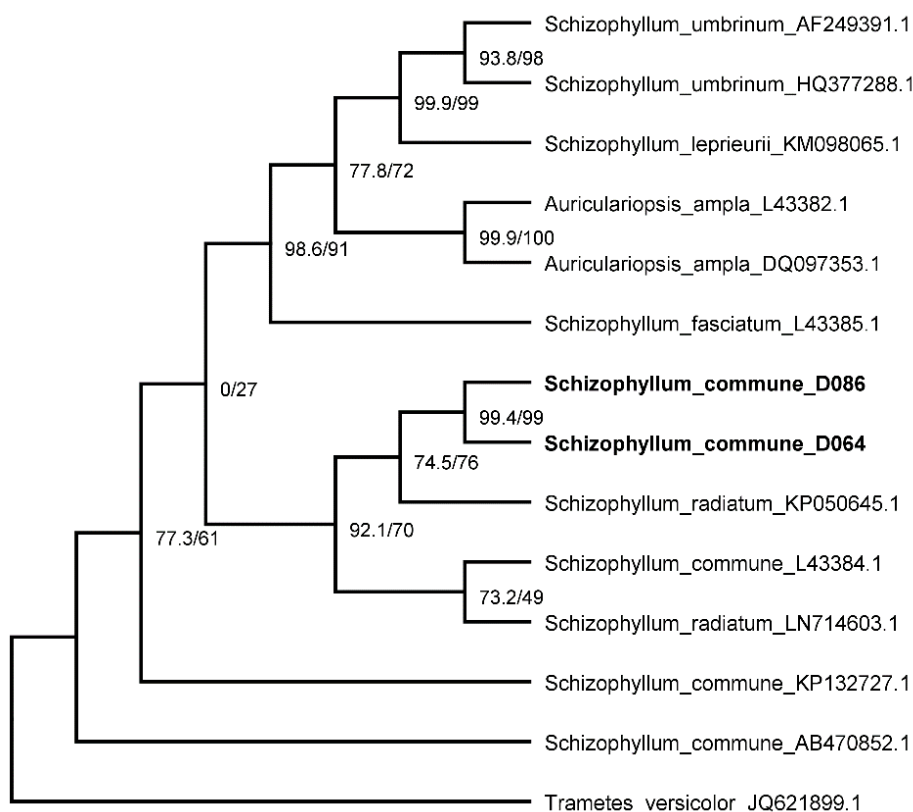


Figura 14: Reconstrução filogenética da família Schizophyllaceae a partir do alinhamento dos nucleotídeos relativos aos fragmentos da região ITS (rDNA). Valores de *bootstrap* foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança (1000 *bootstrap*). Sequência da espécie de *Trametes versicolor* foi utilizada como grupo externo. Em negrito, apresentam-se as sequências obtidas neste trabalho.

6.4 Análise por MALDI-TOF Espectrometria de Massa

Das 43 culturas puras de Agaricomycetes, apenas 26 foram possíveis de submissão à análise IC /MALDI-TOF/MS. A técnica por MALDI-TOF Espectrometria de Massa tornou-se mais recentemente um método popular para a identificação de fungos filamentosos e leveduras (AMIRI-ELIASI e FENSELAU, 2001, VALENTINE, e col., 2002; SU e TSENG, e col., 2007, SANTOS e col., 2009), uma vez que anteriormente eram utilizados apenas para a análise de vírus e bactérias (SHAW e col., 2004). Até o momento existem pouquíssimos trabalhos que relatam o uso do MALDI-TOF na identificação de Agaricomycetes (Basidiomycota).

O dendograma construído a partir do perfil de proteínas ribossomais obtidas por MALDI-TOF/MS dos Agaricomycetes isolados no Estado do Amazonas ficou dividido em 9 ramos com nível

de proximidade variando de pouco mais de 10 a aproximadamente 700, apresentado como grupo externo, *Xylaria* sp. D160 com aproximadamente 900 de distância genética. O que está de acordo com o esperado, uma vez que essa amostra é de um Ascomycetes.

Os espécimes aqui analisados foram somente os que agruparam-se como sendo da mesma espécie.

O dendograma com base nos perfis proteômicos por MALDI-TOF/MS das amostras de Agaricomycetes avaliadas neste estudo está apresentado na Figura 15. Alguns gêneros formados com base na análise filogenética (proteômica) foram semelhantes aos obtidos no dendrograma fenotípico. De acordo com o dendrograma proteômico construído, apresenta-se *Trametes elegans* D088 e *T. elegans* D083; *T. elegans* D079 e *T. elegans* D249; *T. elegans* D094 e *T. elegans* D024; *T. elegans* D078 e *T. elegans* D030 os quais apresentaram as mesmas proteínas ribossomais conforme seus respectivos clados e, portanto, tratar-se da mesma espécie. Esses dados são confirmados através dos caracteres morfológicos e resultados moleculares deste trabalho, esses espécimes formaram clados com valor estatístico acima de 70 % *bootstrap*. De acordo Justo e Hibbett (2011) os *Trametes* apresentam basidioma pileado, himenóforo poroso, sistema hifálico trimítico.

Os demais *Trametes* ficaram agrupado em grupos diferentes o que indica que eles precisam ser novamente avaliados, pois a diferença pode ser apenas a organização dos dados na montagem do dendograma ou diferença na quantidade de amostra analisada.

Fomitopsis durescens D114 e *F. nivosa* D072 formaram clado, embora serem espécies distintas apresentaram as mesmas proteínas ribossomais. Diante dos dados moleculares observados neste trabalho *F. durescens* D114 formou clado com *Fomitopsis durescens* KF937293.1 oriunda do GenBank, enquanto que *F. nivosa* D072 agrupou com a sequência *F. nivosa* D119 da mesma espécie obtida neste trabalho, suportados com 74/74% *bootstrap*. Morfológicamente *F. durescens* apresenta superfície do píleo glabro minuciosamente tomentoso, cor creme pálido lustre; poros circulares a angulares, 4 x 5, enquanto que, *F. nivosa* apresenta poros 6 – 8 por mm; basidiósporos cilíndricos, (6-) 7-9 × 2-3 µm; cistídios 12-15 × 4-5 µm. Gilbertson e Ryvarden (1986), definem *Fomitopsis* como fungos de podridão parda, com uma superfície branca, bronzeado ou rosadas.

Schizophyllum commune D064 e *S. commune* D104 formaram clado os quais apresentaram as mesmas proteínas ribossomais, deste modo, tratar-se da mesma espécie. Esses dados são confirmados através dos caracteres morfológicos e resultados moleculares deste trabalho suportados com confiança (99.4/99 % *bootstrap*). O BLASTn da sequência da região ITS para essa espécie demonstrou similaridade de 99 % com dados do GenBank. Sendo assim, considerando tais dados

pode ser confirmada a identificação desses espécimes coletados no estado do Amazonas como *S. commune*. Nuhu e col. (2010) avaliaram a diversidade genética cepas deste fungo, pois demonstraram que *Its* do rDNA é muito útil para avaliar relações filogenéticas em níveis taxonômicos dos espécimes coletados em várias localidades geográficas.

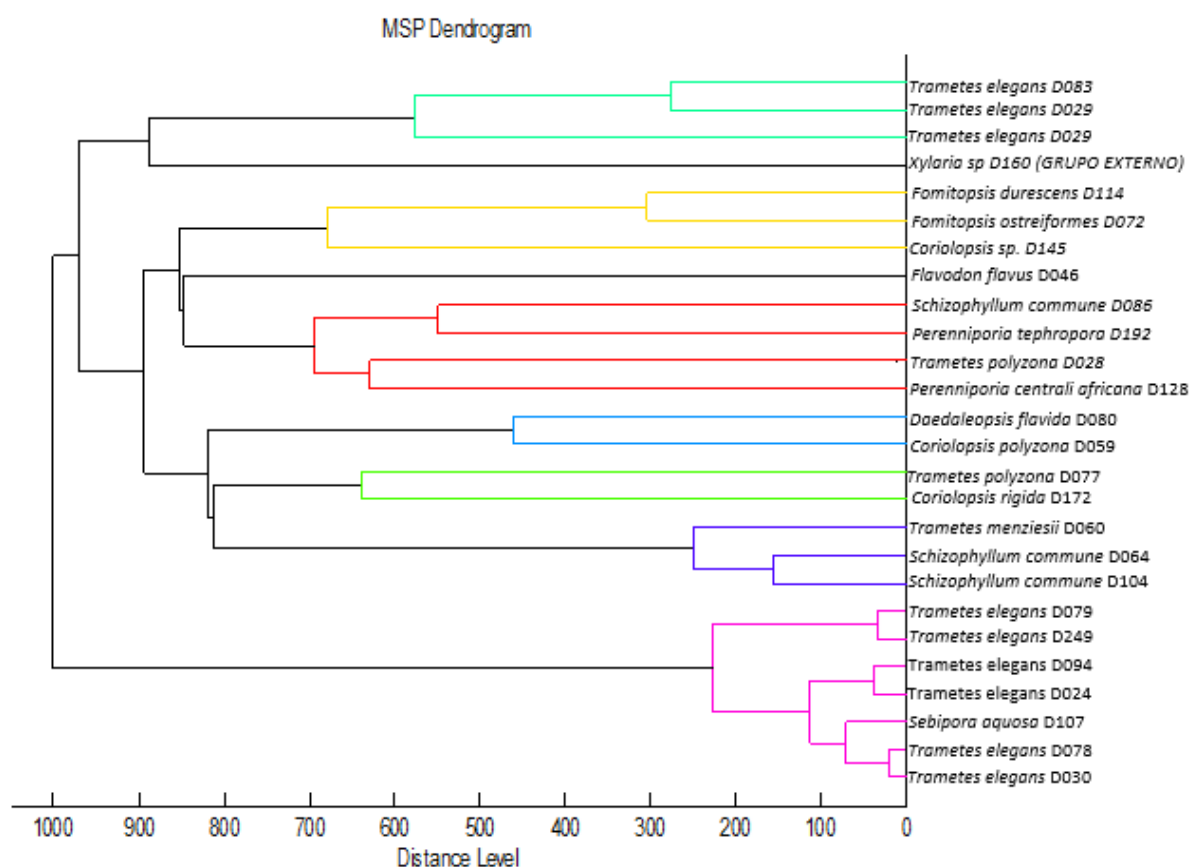


Figura 15: Dendrograma por espectrometria de massa, MALDI-TOF de Agaricomycetes isolados no Estado do Amazonas, adquiridos com uma matriz DHB em escala de massa de peptídeo até m/z 2000.

Diante dos resultados obtidos por meio de dados espectrais foram observados padrões de pico exclusivo para os fungos com similaridade das proteínas ribossomais, o que refere-se a porcentagem de identidade para a quantidade de valores idênticos em massa ou seja exata determinação da massa molecular das referidas proteínas (Figura 16).

Trabalhos utilizando a técnica de MALD-TOF identificaram espécies dos gêneros *Serpula*, *Coniophora* e *Antrodia*, que são representantes de fungos degradadores de madeira na Europa. Experimentos utilizando micélios de Basidiomycetes (três fragmentos de espécies semelhantes que

eram irreconhecíveis por métodos tradicionais) foram submetidos a análise por IC /MALDI-TOF/MS (por exemplo, *S. lacrymans* e *S. himantoides*). A rápida e clara diferenciação foi obtida por padrões de pico exclusivo (SCHMIDT e KALOW, 2005).

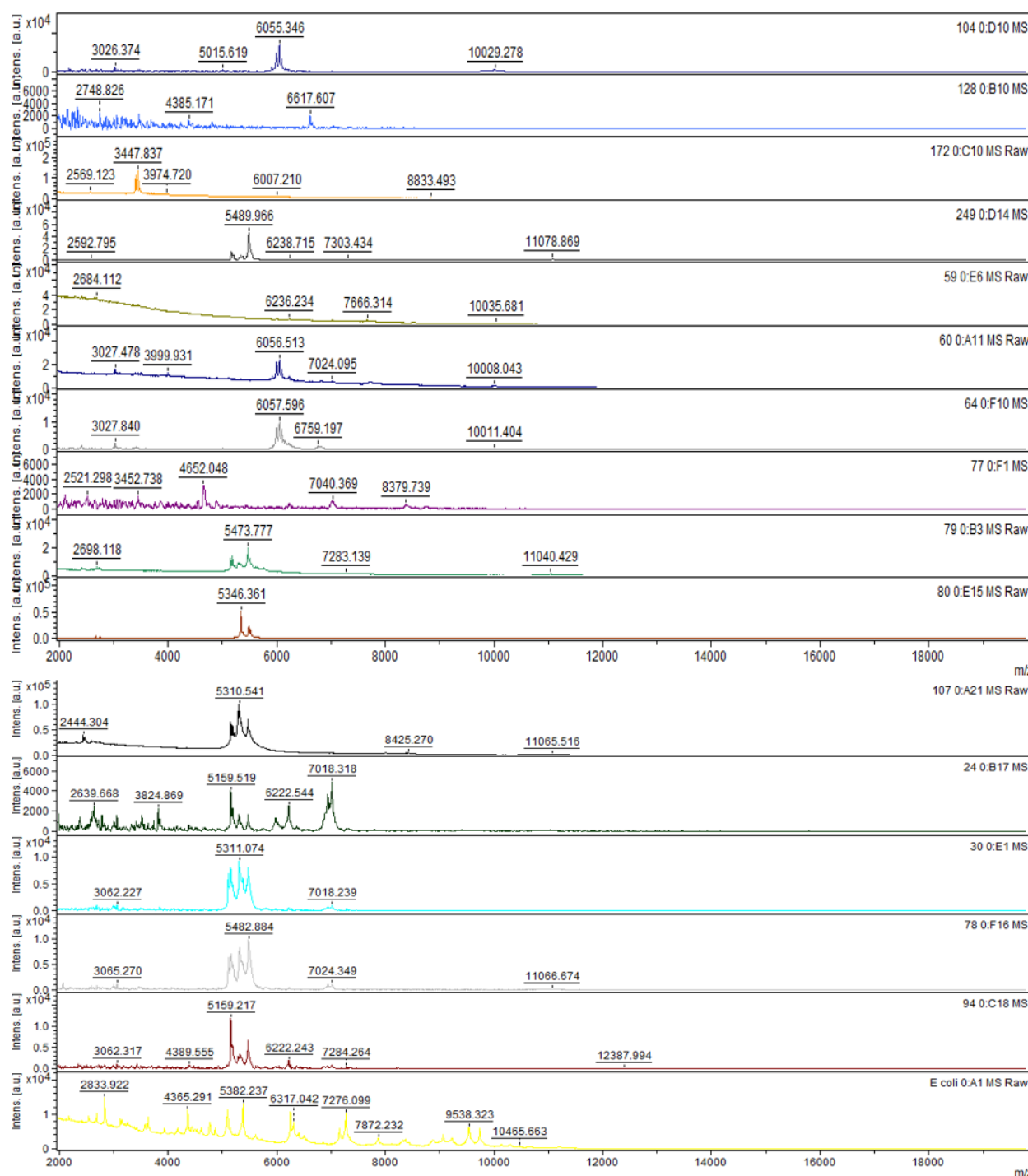


Figura 16: Apresenta os espectros de massa analisados por MALDI-TOF das amostras dos Agaricomycetes. O último espectro de cor amarela indica a amostra controle de *Escherichia coli*.

De acordo com Huckfeldt (2003), os sinais espectrais de células intactas podem ser influenciados pelo fenótipo em Agaricomycetes por diferentes fases em seu ciclo de vida ou seja nos basidiomas, basidiósporos, e pela diferenciação entre superfícies miceliais

Analizando espectros da espécie de *T. elegans* D078 e *T. elegans* D030 tomando como exemplo essas amostras, verificou-se a similaridade por padrões de pico (íons) para essa espécie (Figura 17). Os sinais dos espectros estão associados como já mencionado a numerosos compostos peptídeos/proteínas, esses compostos são de extrema importância para a classificação taxonômica desses organismos.

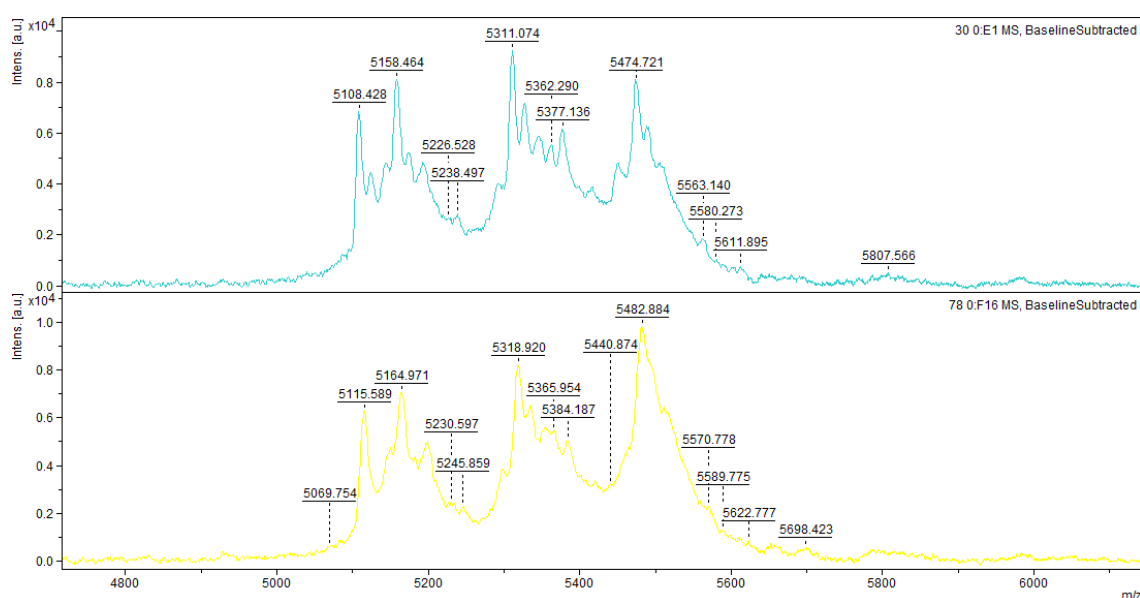


Figura 17: Exemplo de uma análise da espectrometria de massa dos peptídeos que formam uma escala de massa de compostos da espécie *Trametes elegans* D030 com *T. elegans* D078. Os picos (íons) detectados são destacados em azul e amarelo. Considerando que os picos mais elevados indicam a correspondência de posições de pico entre ambas as espécies nos espectros.

Ainda não é conhecida a identidade dos sinais para fungos Agaricomycetes, por não existir pesquisa de banco de dados de sequenciamento de peptídeos desse grupo de fungos, porém o presente estudo demonstra que MALDI-TOF/MS é capaz de diferenciar e agrupar fungos Agaricomycetes.

6.5 Atividades Larvicidas

Dos 66 extratos fúngicos de Agaricomycetes oriundos do micélio, seis apresentaram potencialidade letal contra larvas de 3º estágio de *A. aegypti* (Tabela 7). Nesse estudo os melhores resultados para os extratos do micélio corroboram com a literatura (BUCKER e col., 2013), confirmam ser os extratos oriundos do micélio os que apresentaram resultados mais satisfatórios no combate as larvas de *A. aegypti* em comparação com os extratos aquosos de ambos os fungos *Pycnoporus sanguineus* e *Pestalotiopsis virgulata*. Nesse trabalho apresentado somente 9 % dos extratos testados apresentaram resultados promissores para o controle de larvas de *A. aegypti* (Tabela 6), o que difere dos resultados encontrados por Bucker e col., (2013). Priyanka e col., (2001) constataram que o filtrado da cultura de *Chrysosporium stephensi* apresentou atividade tóxica para as larvas do mosquito de *Anopheles trropicum*.

Thongwat e col. (2015) em seu estudo selecionou quatro gêneros e duas espécies de fungos *Thaeogyroporus porentosus*, *Xylaria nigripes*, *Chlorophyllum* sp e *Steccherinum* sp os resultados apresentaram atividade larvicida contra *A. aegypti* com mortalidade variando de 10% - 70% e 18% - 90% de tempo de exposição de 24 e 48 horas, respectivamente. O extrato bruto em meio aquoso de *Steccherinum* sp, após 48 horas de exposição, não mostrou qualquer atividade larvicida a 1.000 ppm, enquanto que a partir do extrato etanólico, após 24 horas de exposição, apresentou concentração letal 50% e 90% de 203 ppm e 412 ppm, respectivamente, com níveis mais elevados de mortalidade após 48 horas de exposição

El-Sayed e col. (2016) analisaram diferentes extratos de folhas de *Nerium oleander* para avaliar a relação de pós-tratamento de toxicidade utilizando temperatura contra *Culex pipiens*. Mostraram que o extrato éter dietílico foi o que apresentou maior concentração letal, com CL₅₀ de 10500 mg/l. O valor de CL₅₀, a 10 °C foi superior a 35 °C. A CL₅₀ do extrato éter dietílico diminuiu significativamente a duração larval, duração pupal, porcentagem de pupa, longevidade de fêmeas, fecundidade e índice de atividade de oviposição.

Tabela 5: Código e nome científico dos extratos fúngicos promissores para o controle de larvas, selecionados os que apresentaram melhores resultados de mortalidades controle de larvas de *A. aegypti*, utilizados nos bioensaios.

Código	Nome Científico
D025	<i>Pycnoporus sanguineus</i>
D046	<i>Flavodon flavus</i>
D078	<i>Trametes elegans</i>
D080	<i>Daedaleopsis flavida</i>
D103	<i>Ganoderma orbiforme</i>
D119	<i>Fomitopsis nivosa</i>

Outro aspecto avaliado no presente estudo está relacionado ao tempo de maior mortalidade e os valores percentuais da mortalidade das larvas de *A. aegypti*, em diferentes concentrações e extratos de Agaricomycetes, coletados nos municípios do Estado do Amazonas nos intervalos de 24, 48 e 72 horas (Tabela 7). Diante dos resultados dos extratos promissores pode ser observada maior mortalidade na leitura de 24 horas nas diferentes concentrações testadas, demonstrando um efeito residual impactante; nos outros intervalos de tempo a mortalidade foi maior, com exceção do *F. flavus* D046 que produziu uma maior mortalidade em 48 horas com 44 % na concentração de 5.000 ppm.

De acordo com Seleena e Lee (1994) foi analisada a atividade inseticida de um isolado de *Aspergillus niger* da Malásia. Bioensaios mostraram que larvas de *A. egypti* apresentaram maior sensibilidade em relação a *Anopheles maculatus*. *A. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* foram suscetíveis para cultura aquosa de *A. niger* em 72 horas, mas não eficaz para 24 e 48 horas.

Tabela 6. Porcentagens de mortalidade observados nos bioensaios utilizando os extratos miceliais fúngicos contra larvas de *A. aegypti* (cepa Rockefeller).

		Dose/ Leitura: ppm / 24 horas						Dose/ Leitura: ppm / 48 horas						Dose/ Leitura: ppm / 72 horas					
		C	1.000	2.000	3.000	4.000	5.000	C	1.000	2.000	3.000	4.000	5.000	C	1.000	2.000	3.000	4.000	5.000
025	MO%	0,1	6	16,6	34,6	42	56,6	0,2	4	7,2	6	30	6,6	0,3	7,2	26,6	6	17,2	5,2
046	MO%	0,1	28,68	8	15,2	28	30	0,2	2,6	16	39,2	38,6	44	0	4,6	5,2	8,6	6	8,6
078	MO%	0	3,2	42	12	3,2	10,6	0	9,2	10,6	9,2	20,6	8	0,1	28	2,6	7,2	14,6	4
080	MO%	0	15,2	57,2	65,2	47,2	58,6	0,1	14,6	8	28,6	29,2	25,2	0,1	2,7	4,6	3,2	2,7	8,6
103	MO%	0	39,2	42,6	38	40	62	0	0	6	11,2	11,2	21,2	0,1	2,7	4,6	3,2	2,7	8,6
119	MO%	0,1	10,6	27,2	40	43,25	64	0,1	8,6	4,6	8,6	6	8,6	0,1	9,2	8	13,2	16,6	13,2

50 larvas em cada dosagem onde C=controle, MO%= porcentagem de mortalidade.

A maior mortalidade encontrada em 24 horas na concentração de 1.000 ppm ocorreu para o extrato micelial do fungo *G. orbiforme* D103 com mortalidade de 39,2 % (Tabela 7). Na concentração de 2.000 ppm, o maior valor de mortalidade foi obtido para *D. flavida* D080 com 57,2 %, seguida do *G. orbiforme* D103 com 42,6 %. Na concentração de 3.000 ppm a mortalidade continuou crescente (65,2%), seguida de melhor valor de mortalidade do *F. nivosa* D119 com 40 %. Na concentração de 4.000 ppm repetiu-se a melhor mortalidade para *D. flavida* D080 e *F. nivosa* D119 com 47,2 e 43,2 % respectivamente. Na última concentração 5.000 ppm o maior valor de potencialidade letal ocorreu para o *F. nivosa* D119 com 64 % seguido do *G. orbiforme* D103 com 62%, e na sequência o *P. sanguineus* D025 com 56, 6 % de mortalidade.

Os dados aqui apresentados concordam com resultados de Bucker e col. (2013). O extrato micelial acetato-etanólico de *Pycnoporus sanguineus* foi bastante efetivo contra as larvas de 3º estágio de *A. aegypti*, promovendo mortalidade de 98% em 500µg/mL e de até 67% para a metade da concentração, 250µg/mL. O extrato micelial que também apresentou resultado positivo foi obtido a partir do endófito *Pestalotiopsis virgulata*, apresentando maior eficácia do que o fungo Basidiomycetes *P. sanguineus*, com 100% de mortalidade em 500µg/mL e de até 81 % para a metade da concentração, 250µg/mL.

Na Tabela 8 encontram-se as equações das retas de regressão linear e os valores de CL₅₀ e CL₉₀ dos extratos tóxicos para *A. aegypti*.

Dos extratos testados foi verificado quanto a toxicidade frente ao inseto alvo que somente o extrato de *P. sanguineus* D025 apresentou resultado significativo (P<0,05).

A concentração letal dos extratos para matar 50 % e 90 % da população-alvo, para possibilitar a comparação com outros trabalhos, foi adotada como padrão para análise a leitura de 24 horas e

também pelo fato de ser neste tempo observada maior mortalidade. O extrato de *P. sanguineus* D025 foi o mais efetivo entre os estudados, mostrando valor de $CL_{50} = 13,44$ ppm nos testes com *A. aegypti*, porém, nenhum efeito tóxico foi observado nos bioensaios com o extrato *Trametes elegans* D078 com *A. aegypti*.

Os demais extratos não foram possíveis de análise sendo necessário a reavaliação, e aumento do n amostral.

Trabalhos com resultados larvicidas para controle de *A. aegypti* utilizando diferentes plantas, comuns no nordeste do Brasil, apresentaram eficácia contra larvas de terceiro estágio de *A. aegypti* tais como as de *Citrus citratus* ($CL_{50} = 69$ ppm), *Ocimum americanum* ($CL_{50} = 67$ ppm), *Lippia. Sidoides* ($CL_{50} = 63$ ppm) e *Ocimum gratissimum* ($CL_{50} = 60$ ppm) (CAVALCANTI e col., 2004). Outros estudos como o de Singh e col., (1988) mostraram resultados com plantas, o extrato de *Eclipta paniculata* apresentou valores CL_{90} e CL_{50} e 17,2 e 3,3 mg/l, respectivamente eficazes contra *A. Aegypti* e *Anopheles stephensi* no terceiro estágio larval.

Em estudo semelhante, a atividade larvicida foi observada por Silva e col. (2004) em taninos isolados de *Magonia pubescens* (Sapindaceae), sobre *A. aegypti*. El-Sayed e col. (2016) relataram que *Nerium oleander* provoca inibição significativa do crescimento e mortalidade em estádios de desenvolvimento de *A. aegypti*.

Tabela 7: Concentração letal de extratos de fungos encontradas em testes com larvas de *Aedes aegypti*.

Extrato	Espécies	Equação de regressão	CL_{50} (IC 0,05)	CL_{90} (IC 0,05)	N	X ²	t
D025		$Y = (-1,83 + 5) + 2,76 * \text{Log } x$	4,61(3,878-6,127)	13,44(8,849-36,557)	50	0,38	0,13
D046		$Y = (-0,86 + 5) + 0,22 * \text{Log } x$	6014,9(*)	0,24(*)	50	10,49	3,49
D078	<i>Aedes</i>	$Y = (-0,92 + 5) + 0,33 * \text{Log } x$	0	0	50	38,23	12,74
D080	<i>aegypti</i>	$Y = (-0,60 + 5) + 1,39 * \text{Log } x$	2,73(*)	22,60(*)	50	15,25	5,08
D103		$Y = (-0,34 + 5) + 0,49 * \text{Log } x$	5,06(*)	2062,62(*)	50	5,63	1,87
D119		$Y = (-1,02 + 5) + 1,91 * \text{Log } x$	3,45(*)	16,21(*)	50	10,21	3,4

(*) não apresentou significância ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

Graficamente, comparações entre o nível de patogenicidade dos extratos foram realizadas e estão representadas na Figura 18. Os resultados mostram valores de probit de 5,3 na maior concentração testada utilizando o extrato de *P. sanguineus* D025 para o controle de larvas de *A. aegypti*, enquanto o extrato de *F. flavus* D046, nas mesmas condições, apresentaram probit de 4,29. No entanto, na observação seguinte os valores de mortalidades foram semelhantes $P = 5,35$ para os extratos de *P. sanguineus*, *F. flavus* e *T. elegans* no controle de *A. aegypti*, na mesma concentração.

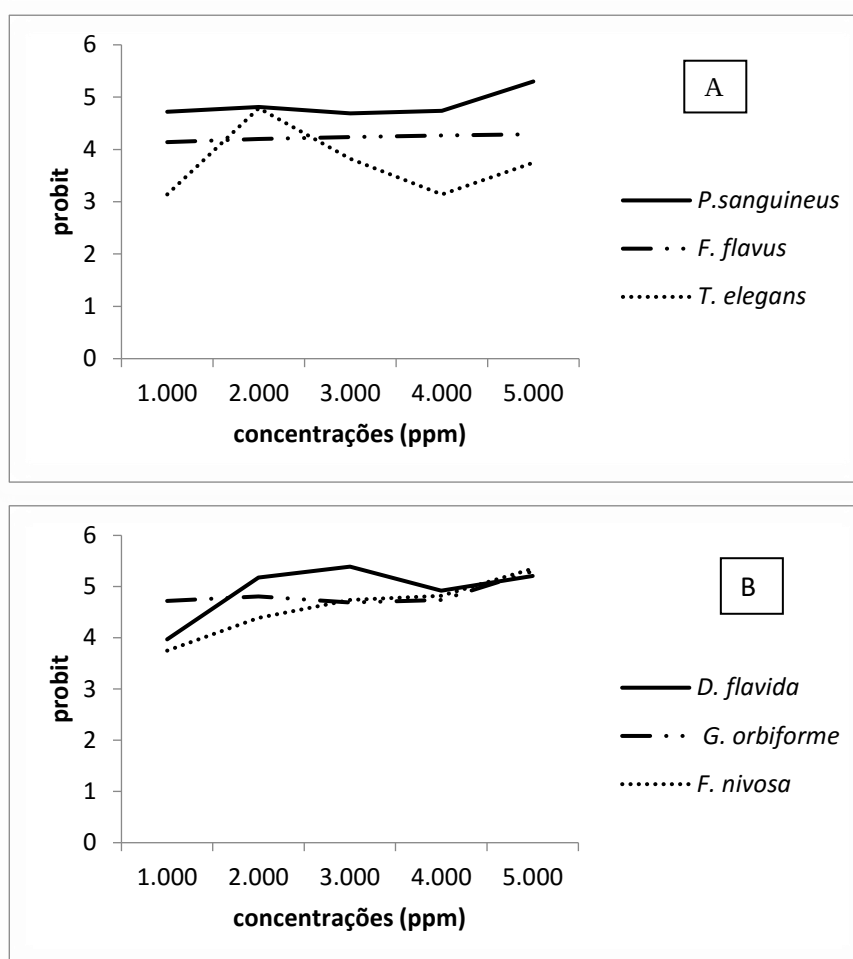


Figura 18: Regressão linear dose-probit da mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* observados em bioensaios com extratos oriundos do micélio de Agaricomycetes sendo A=24 horas de observação e B= 48horas de observação gráficas dos resultados de dose/resposta no intervalo de 24 horas com valores de Probit dos extratos oriundos do micélio de Agaricomycetes contra larvas de 3º estágio de *A. aegypti*.

Kumari e col. (2014) em uma revisão realizada com diferentes micro-organismos de interesse para novos inseticidas, ressaltaram que 700 espécies de fungos são descritas como patógenos para insetos. Esses autores relatam também que metabolitos secundários de *Beauveria* spp atuam como controladores de *A. aegypti* (QUESADA-MORAGA e VEY, 2004, FARIAS e col., 2010). No presente estudo pode-se verificar que o extrato de *P. sanguineus* na concentração de 5.000 ppm, em 24 horas, apresenta mortalidade de 5,3 probit para larvas de *A. aegypti*, o que confere a este fungo, um alto potencial entomopatogênico.

7 CONCLUSÕES

As coletas realizadas nos 12 municípios do Estado do Amazonas foram relevantes no conhecimento sobre a diversidade de fungos Agaricomycetes, com a adição de 26 novos registros para o Estado, 05 para o Brasil e 01 espécie nova para a ciência;

A utilização de ferramentas moleculares apresentou grande importância na confirmação da identificação dos espécimes coletados e posicionamento de gêneros e espécies. Utilizando a técnica MALDI-TOF/MS foi possível diferenciar e agrupar fungos Agaricomycetes;

A atividade larvicida apresentou-se eficaz, seis fungos apresentaram substâncias bioativas com potencialidade letal contra larvas de 3º estágio de *A. aegypti*. O extrato de *P. sanguineus*, apresentou mortalidade de 5,3 probit para larvas de *A. aegypti*, o que confere a este fungo, um alto potencial entomopatogênico. Os demais extratos não foram possíveis de análise sendo necessário para avaliação, e aumento do n amostral.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. AGUIAR, A.; FERRAZ, A. 2007. Fe³⁺ and Cu²⁺ reduction by phenol derivates associated with Azure B degradation in Fenton-like reactions. *Chemosphere*, v. 66, n. 5, p. 947-954.
2. AINSWORTH, A. M. 1993. Isolation Techniques for Basidiomycetes. Technical Information Sheet N. 11. United Kingdom. Published by: UNESCO / WFCC-Education Committee.
3. ALAM, N.; CHA, Y. J.; SHIM, M. J.; LEE, T. S.; LEE, U. Y. 2010. Cultural Conditions for Mycelial Growth and Molecular Phylogenetic Relationship in Different Wild Strains of *Schizophyllum commune*. Department of Biology, University of Incheon, Incheon 406-840, Korea Department of Life Science, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea.
4. ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. 1996. *Introductory Mycology*. 4th ed., John Wiley and Sons, Inc., Nova York, 868p.
5. ALVES, S. B. 1986. *Controle Microbiano de Insetos*. ed., Manole Ltda., São Paulo, 407p.
6. ALVES, S. B. 1998. Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S. B. *Controle Microbiano de Insetos*. 2 ed., Fealq, Piracicaba, 289-381p.
7. AMIRI-ELIASI, B.; FENSELAU, C. 2001. Characterization of protein biomarkers desorbed by MALDI from whole fungal cells. *Anal. Chem.*, v. 73, p. 5228-5231.
8. ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. T. 2002. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: *Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria* / Org. Serafini, L. A.; Barros, N. M. e Azevedo, J. L. EDUCS, Caxias do Sul, 433p.
9. AZEVEDO, J. L. (1999). Botânica: uma ciência básica ou aplicada?. *Virus*, 5000(130000), 3-8.
10. AZEVEDO, J. L., MACCHERONI JÚNIOR, W., ARAÚJO, W. L., PEREIRA, J. O., SERAFINI, L. A., MONTEIRO, N. B., & AZEVEDO, J. L. 2002. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. *Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. Caxias do Sul: EDUCS, 233-268.
11. BALAN, D. S. L.; MONTEIRO, R. T. R. 2001. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. *Journal of Biotechnology*, v. 89, p. 141-145.
12. BARBOSA, M. G. V; FÉ, N. F; ALENCAR, I. C. A; FERNANDEZ, I. C; GIMAQUE, J. B. L; PASTOR, O. F; FÉ, F. A. A; ALECRIM, W. D; GUERRA, M. V. F. 2003. Ocorrência de *Aedes aegypti* em áreas com características rurais dentro do município de Manaus, Amazonas, Brasil (Dados preliminares). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, p. 413.

13. BALDACCHINO, F.; CAPUTO, B.; CHANDRE, F.; DRAGO, A.; DELLA TORRE, A.; MONTARSI, F., RIZZOLI, A. 2015. Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. *Pest management science*, 71(11), 1471-1485.
14. BASEIA, I. G. A. 2007. Sistemática baseada em dados moleculares: suas conseqüências na classificação dos fungos gasteróides. In: BASEIA I. G.; MAIA, L. C.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. (orgs.). *Micologia: avanços no conhecimento*. v. 1, ed., Universitária UFPE, Recife, 202-206p.
15. BASTOS, M. S. 2004. Perfil soro epidemiológico do dengue diagnosticado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (1998-2001). [Dissertação de Mestrado]. Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, RJ.
16. BAWIN, T.; SEYE, F.; BOUKRAA, S.; ZIMMER, J. Y., DELVIGNE, F., & FRANCIS, F. 2015. The fight against mosquitoes (Diptera: Culicidae): diversity of approaches and application of biological control. *Canadian Entomologist*, 147(4), 476-500.
17. BÉRDY, J. 2005. Bioactive microbial metabolites: a personal view. *The journal of antibiotics*, v. 58, p. 1-26.
18. BLACKWELL, M. 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?. *American Journal of Botany*, v. 98, n. 3, p. 426-438.
19. BLANCHETTE, R. A. 1995. Degradation of the lignocellulose complex in wood.
20. BOA, E. 2004. Wild edible fungi. A global overview of their use and importance to people. Rome: FAO, p. 13.
21. BODDY, L.; JONES, T. H. 2008. Interactions between basidiomycota na invertebrates. In: Boddy L, Frankland JC, van West P (eds) *Ecology of saprotrophic basidiomycetes*. Elsevier, Amsterdam, pp 155-179.
22. BOER, W; VAN DER VAL, A. 2008. Interactions between saprotrophic basidiomycetes and bacteria. In: Boddy L, Frankland JC, van West P (eds) *Ecology of saprotrophic basidiomycetes*. Elsevier, Amsterdam, p 143.
23. BONONI, V. L. 1992. Fungos macroscópicos de Rio Branco, Acre, Brasil. *Hoehnea*, n. 19, p. 31-37.
24. BRICKS, L. F. 2004. Vacinas para a dengue: perspectivas. *Pediatria*, v. 26, p. 268-281.
25. BÜCKER, A.; BÜCKER, N. C. F.; SOUZA, A. Q.; GAMA, A. M., RODRIGUES-FILHO, E; COSTA, F. M.; NUNEZ, C. V.; CASTRO E SILVA, A.; TADEI, W. P. 2013. Efeitos larvicida de

extratos de fungos endofíticos e basidiomicetos sobre *Aedes* e larvas *Anopheles* (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 46, n.4.

26. CAMPOS, E. L.; SOTÃO, H. M. P.; CAVALCANTE, M. A. Q.; LUZ, A. B. 2005. Basidiomycetes de manguezais da APA de Algodual – Maiandeuá, Pará, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Ciências Naturais*, Belém, v.1, n.1, p. 141-146.

27. CAPELARI, M.; MAZIERO, R. 1988. Fungos macroscópicos do estado de Rondônia, região dos rios Jaru e Ji-Paraná. *Hoehnea*, v.15, p. 28-36.

28. CARDOSO, D. O. 2014. Potencial e caracterização do isolado de nematoide entomopatogênico LPP35 como agente no controle de formas imaturas de *Aedes aegypti* [dissertation]. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Brazil.

29. CASTELLANI, A. 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42(225), 65-72.

30. CARVALHO, M. R.; BOCKMANN, F. A.; AMORIM, D. S.; BRANDÃO, C. R. F.; VIVO, M.; FIGUEIREDO, J.; BRITSKI, H. A.; PINNA, M. C. C.; MENEZES, N. A.; MARQUES, F. P. L.; PAPAVERO, N.; CANCELLO, E. M.; CRISCI, J. V.; McEACHRAN, J. D.; SCHELLY, R. C.; LUNDBERG, J. G.; GILL, A. C.; BRITZ, R.; WHEELER, Q. D.; STIASSNY, M. L. J.; PARENTI, L. R.; PAGE, L. M.; WHEELER, W. C.; FAIVOVICH, J.; VARI, R. P.; GRANDE, L.; HUMPHRIES, C. J.; DeSALLE, R.; EBACH, M. C.; NELSON, G. J. 2007. Taxonomic Impediment or Impediment to Taxonomy? A Commentary on Systematics and the Cybertaxonomic-Automation Paradigm. *Evolutionary Biology*, v. 34, n. 3, p. 140-143.

31. CAVALCANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M.; LIMA, M. A. A.; SANTANA, E. W. P. 2004. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 99, n. 5, p. 541-544.

32. CAVALCANTI, L. P. D. G.; COELHO, I. C. B.; VILAR, D. C. L. F.; HOLANDA, S. G. S., ESCÓSSIA, K. N. F. D., & SOUZA-SANTOS, R. 2010. Clinical and epidemiological characterization of dengue hemorrhagic fever cases in northeastern, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(4), 355-358.

33. CHATURVEDI, U. C. 2006. The curse of dengue. *Indian Journal Medical Research*, v. 124, p. 467-470.

34. CHEN, W. Q.; HUANG, J. W.; LUO, L. Q.; LUO, S. H.; YANG, H. 2005a. Study of *Ganoderma* polysaccharides modulating the blood sugar and lipid in experimental rats. *Chinese Journal of Gerontology*, v. 25, p. 957-958.

35. CHEN, W. Q.; LUO, S. H.; LL, H. Z. & YANG, H. (2005). [Effects of ganoderma lucidum polysaccharides on serum lipids and lipoperoxidation in experimental hyperlipidemic rats]. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*, 30(17), 1358-1360.
36. CHENG, K. E; LEUNG, P. 2008. "General review of polysaccharopeptides (PSP) from *C. versicolor*: Pharmacological and clinical studies". *Cancer Therapy*, v. 6, p. 117-130.
37. CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. 2000. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, p. 185-189.
38. COMMON, R. S. 1991. The distribution and taxonomic significance of lichenan and isolichenan in the Parmeliaceae (lichenized Ascomycotina), as determined by iodine reactions. I. Introduction and methods. II. The genus *Alectoria* and associated taxa. *Mycotaxon*, v. 41, n. 1, p. 67-112.
39. CONSOLI, R. A. G. B.; MENDES, N. M.; PEREIRA, J. P.; SANTOS, B. DE S.; LAMOUNIER, M. A. 1988. Influência de diversos derivados de vegetais na sobrevida das larvas *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae) em laboratório. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 83, p. 87-93.
40. CONSOLI, R. A. G. B; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. 1994. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. Ed. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
41. COSTA, F. M. 2007. Avaliação da atividade inseticida do regulador de crescimento de insetos diflubenzuron contra *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera, Culicidae), em condições de laboratório. Dissertação de Mestrado. 61p.
42. CUI, J.; GOH, K. K. T.; ARCHER, R. E.; SINGH, H. 2007. "Characterisation and bioactivity of protein-bound polysaccharides from submerged-culture fermentation of *Coriolus versicolor* Wr-74 and ATCC-20545 strains". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 34, n. 5, p. 393-402.
43. DA PAZ, E. S. L., GOMES DA FONSECA, A. P., GUARANÁ, C. F. R., FREITAS, L. R., & PAZ JÚNIOR, F. B. 2010. Isolamento e avaliação da atividade fenoloxidase de *Basidiomycetes* coletados em área de Mata Atlântica-PE. *CIENTEC*, 2, 37-44.
44. DIJKGRAAF, G. J. P.; HUIJUAN, L.; BUSSEY, H. Cell-wall - glucans of *Saccharomyces cerevisiae*. In: VANDAMME E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. 2002. *Biopolymers: Polysaccharides II – Polysaccharides from eukaryotes*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH,. v. 6. p. 179-213. 636 p.

45. DONK, M. A. 1964. A conspectus of the families of Aphyllophorales. *Persoonia*, n. 3, p. 199-324.
46. DOS SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; DACOSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. 2007. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Quim Nova*, 30, 159-170.
47. DUFFY, M. R.; CHEN, T. H.; HANCOCK, W. T.; POWERS, A. M.; KOOL, J. L.; LANCIOTTI, R. S.; PRETRICK, M.; MARFEL, M.; HOLZBAUER, S.; DUBRAY, C.; GUILLAUMOT, L.; GRIGGS, A.; BEL, M.; LAMBERT, A. J.; LAVEN, J.; KOSOY, O.; PANELLA, A.; BIGGERSTAFF, B. J.; FISCHER, M.; HAYES, E. B. 2009. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England Journal of Medicine*, v. 360, p. 2536-2543.
48. DULMAGE, H. T.; YOUSTEN, A. A.; SINGER, S.; LACEY, L. A. 1990. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. UNDP / World Bank / WHO, Steering Committee to Biological Control of Vectors, Geneva. p. 59.
49. DUQUE, J. E. L.; MARTINS, M. F.; ANJOS, A. F.; KUWABARA, E. F.; NAVARRO-SILVA, M. A. 2004. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. *Revista Saúde Pública*, v. 38, p. 842-843.
50. EL-DINE, R. S.; EL-HALAWANY, A. M.; MA, C. M.; HATTORI, M. 2009. Inhibition of the Dimerization and Active Site of HIV-1 Protease by Secondary Metabolites from the Vietnamese Mushroom *Ganoderma colossum*. *Journal of Natural Products*, v. 72, p. 2019-2023.
51. EL-SAYED, S. H.; EL-BASSIONY, G. M. 2016. Larvicidal, biological and genotoxic effects, and temperature-toxicity relationship of some leaf extracts of *Nerium oleander* (Apocynaceae) on *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 10(1), 1.
52. FARIAS, D. F., CAVALHEIRO, M. G., VIANA, M. P., QUEIROZ, V. A., ROCHA-BEZERRA, L. C., VASCONCELOS, I. M., ... & CARVALHO, A. F. 2010. Water extracts of Brazilian leguminous seeds as rich sources of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 82(3), 585-594.
53. FIDALGO, O.; BONONI, V. L. 1989. Guia de coleta, preservação e herborização de material botânico. Instituto de Botânica: São Paulo, (Manual nº 4).
54. FIGUEIREDO, R. M. P. 2008. Caracterização Molecular e Epidemiológica dos Vírus Dengue no Estado do Amazonas, Brasil, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
55. FIGUEIREDO, V. R. 2008. Estudo de fungos Aphyllophorales no sul da Bahia/Ilhéus, BA. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Santa Cruz-UESC.

56. FILIPE, A. F; PINTO, M. R. 1973. Arbovirus studies in Luanda, Angola. 2. Virological and serological studies during an outbreak of dengue-like disease caused by the Chikungunya virus. *Bull World Health Organ.* v. 49, p. 37-40.

57. FLOUDAS, D.; BINDER, M.; RILEY, R.; BARRY, K.; BLANCHETTE, R. A.; HENRISSAT, B.; MARTÍNEZ, A. T.; OTILLAR, R.; SPATAFORA, J. W.; YADAV, J. S.; AERTS, A.; BENOIT, I.; BOYD, A.; CARLSON, A.; COPELAND, A.; COUTINHO, P. M.; DE VRIES, R. P.; FERREIRA, P.; FINDLEY, K.; FOSTER, B.; GASKELL, J.; GLOTZER, D.; GÓRECKI, P.; HEITMAN, J.; HESSE, C.; HORI, C.; IGARASHI, K.; JURGENS, J. A.; KALLEN, N.; KERSTEN, P.; KOHLER, A.; KÜES, U.; KUMAR, T. K. A.; KUO, A.; LABUTTI, K.; LARRONDO, L. F.; LINDQUIST, E.; LING, A.; LOMBARD, V.; LUCAS, S.; LUNDELL, T.; MARTIN, R.; MCCLAUGHLIN, D. J.; MORGENSTERN, I.; MORIN, E.; MURAT, C.; NAGY, L. G.; NOLAN, M.; OHM, R. A.; PATYSHAKULIYEVA, A.; ROKAS, A.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; SABAT, G.; SALAMOV, A.; SAMEJIMA, M.; SCHMUTZ, J.; SLOT, J. C.; JOHN, F. ST.; STENLID, J.; SUN, H.; SUN, S.; SYED, K.; TSANG, A.; WIEBENGA, A. D.; YOUNG, D.; PISABARRO, A.; EASTWOOD, D. C.; MARTIN, F.; CULLEN, D.; GRIGORIEV, I. V.; HIBBETT, D. S. 2012. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*, v. 336, p. 1715-1719.

58. FLOUDAS, D.; HELD, B. W.; RILEY, R.; NAGY, L. G.; KOEHLER, G.; RANDELL, A. S.; YOUNUS, H.; CHOW, J.; CHINIQUEY, J.; LIPZEN, A.; TRITT, A.; SUN, H.; HARIDAS, S.; LABUTTI, K.; OHM, R. A.; KÜES, U.; BLANCHETTE, R. A.; GRIGORIEV, I. V.; MINTO, R. E.; HIBBETT, D. S. 2015. Evolution of novel wood decay mechanisms in Agaricales revealed by the genome sequences of *Fistulina hepatica* and *Cylindrobasidium torrendii*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 76, p. 78-92.

59. FONTES, E. M. G. 1992. Controle Biológico: Um Desafio para o País. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 27, p. 1-4.

60. FOWLER, G. G.; DI ROMAGNANO, L. F. T. 1992. Ecological bases for biological control. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 27, p. 5-13.

61. FOY, B. D.; KOBYLINSKI, K. C.; FOY, J. L. C; BLITVICH, B. J.; DA ROSA, A.T.; HADDOW, A. D.; LANCIOTTI, R. S.; TESH, R. B. 2011. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, p. 880-882.

62. FUNASA, 2003. Plano de Intensificação de ações do controle da malária na Amazônia legal triênio 2000-2002. Brasília, Julho. Disponível em: www.funasa.gov.br. Acesso em: 15 dezembro 2015.

63. FURTADO, J. S. 1965. Relation of microstructures to the taxonomy of the Ganodermoideae (Polyporaceae) with special reference to the structure of the cover of the pilear surface. *Mycologia*, v. 57, n. 4, p 588-611.

64. GARDES, M.; BRUNS, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, v. 2, p. 113-118.
65. GERLACH, A.; DA, C. L.; CAMPOS-SANTANA, M.; GUTJAHR, M.; LOGUERCIO-LEITE, C. 2013. Wood-decaying Agaricomycetes (Basidiomycota, Fungi): new records for the state of Santa Catarina, Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 27, n. 2, p. 460-464.
66. GERMANI, J. C. 1993. Estudos de produção de *Bacillus sphaericus* S2 com matérias-primas regionais e de avaliação da atividade larvicida. Tese de Doutorado. Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 182.
67. GILBERTSON, R. L.; RYVARDEN, L. 1987. North American polyporus, vol. II. *Fungiflora*, Oslo, 438-885.
68. GHOSH, S. K.; DASH, A. P. 2007. Larvivorous fish against malaria vectors: a new outlook. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 101, p. 1063-1064.
69. GHOSH, S. K.; TIWARI, S. N.; SATHYANARAYAN, T. S.; DASH, A. P.; MAGURRAN, A. E. 2006. Experience of larvivorous fish in malaria control over a decade in India and need for study on biodiversity implications, in: 11th International Congress on Parasitology; 6-11; Glasgow, UK. Abstract n. 528.
70. GHOSH, S. K.; TIWARI, S. N.; SATHYANARAYAN, T. S.; SAMPATH, T. R. R.; SHARMA, V. P.; NANDA, N.; JOSHI, J.; ADAK, T.; SUBBARAO, S. K. 2005. Larvivorous fish in wells target the malaria vector sibling species of the *Anopheles culicifacies* complex in villages in Karnataka, India, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 99, p. 101-105.
71. GIBERTONI, T. B. 2008. Polyporoid fungi (Agaricomycetes, Basidiomycota) in the Estação Científica Ferreira Penna (State of Pará, Brazilian Amazonia): diversity and ecological aspects. *Scientifica Acta*, v. 2, n. 2, p.70-74.
72. GIBERTONI, T. B.; SANTOS, P. J. P.; CAVALCANTI, M. A. Q. 2007. Ecological aspects of Aphyllophorales in the Atlantic rain forest in northeast Brazil. *Fungal Diversity*, n. 25, p. 49-67.
73. GIESE, E. C.; COVIZZI, L. G.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. 2004. Influência de tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 26, n. 4, p. 463-470.
74. GILBERTSON, R.L.; RYVARDEN, L. 1986. North American polypores. v. 1, Oslo, Norway: *Fungiflora*. 387p.

75. GOMES, A. S.; SCIAVICO, C. J. S.; EIRAS, A. E. 2006. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, [online]. v. 39, n. 4.
76. GOMES-SILVA, A. L.; GIBERTONI, T. B. 2009a. Revisão do Herbário URM. Novas ocorrências de Aphyllorphorales para a Amazônia brasileira. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 32, n. 3, p. 587-596.
77. GOMES-SILVA, A. L.; GIBERTONI, T. B. 2009b. Checklist of the aphyllorphoraceous fungi (Agaricomycetes) of the Brazilian Amazonia. *Mycotaxon*, v. 108, p. 319-322.
78. GREGORI, A. 2013. Medicinal mushrooms native to Slovenia Zdravilne gobe rastoče v Sloveniji (parte marcada, conselho retirar). *Acta Biologica Slovenica Ljubljana*, v. 56, n. 2, p. 9-22.
79. GUGLIOTA, A. M.; CAPELARI, M. 1998. Taxonomia de Basidiomycetes. In: BONONI, V.L.R. et al *Zigomycetos, Basidiomycetos e Deuteromycetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado de Meio Ambiente.
80. HABIB, M. E. M. 1989. Utilização de bactérias no controle de dípteras de importância médica. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 84, n. 3, p. 31-34.
81. HADDAD, M. L. 1998. Utilização do Polo-PC para análise de Probit. In Alves, S.B. 1998. *Controle Microbiano de Insetos*. 2º ed. Cap. 34. Ed. FEALQ, Piracicaba - São Paulo, 1163p.
82. HAWKSWORTH, D. L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, v. 105, n. 12, p. 1422-1432.
83. HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; HUHNDOERF, S.; JAMES, T.; KIRK, P. M.; LÜCKING, R.; THORSTEN-LUMBSCH, H.; LUTZONI, F.; MATHENY, P. B.; MCLAUGHLIN, D. J.; POWELL, M. J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C. L.; SPATAFORA, J. W.; STALPERS, J. A.; VILGALYS, R.; AIME, M. C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G.L.; CASTLEBURY, L.A.; CROUS, P. W.; DAI, Y. C.; GAMS, W.; GEISER, D. M.; GRIFFITH, G. W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D. L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R.A.; HYDE, K. D.; IRONSIDE, J. E.; KÖLJALG, U.; KURTZMAN, C. P.; LARSSON, K. H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIADLIKOWSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J. M.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASTO, E.; REEB, V.; ROGERS, J.D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J. P.; SCHÜBLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R.G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W. A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.; WHITE, M. M.; WINKA, K.; YAO, Y. J.; ZHANG, N. 2007. A higher level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, v. 111, n. 5, p. 509-547.

84. HIBBETT, D. S.; VILGALYS, R. 1993. Phylogenetic Relationships of *Lentinus* (Basidiomycotina) Inferred from Molecular and Morphological Characters. *Systematic Botany*. Department of Botany, Duke University, Durham, North Carolina, v. 18, n. 3, p. 409-433.
85. HIBBETT, D. S.; BAUER, R.; BINDER, M.; GIACHINI, A. J.; HOSAKA, K.; JUSTO, A.; LARSSON, E.; LARSSON, K. H.; LAWREY, J. D.; MIETTINEN, O.; NAGY, L. G.; NILSSON, R. H.; WEISS, M.; THORN, R. G. 2014. Systematics and Evolution, The Mycota VII Part A. D.J. McLaughlin and J.W. Spatafora (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2nd Edition.
86. HIBBETT, D. S.; OHMAN, A.; GLOTZER, D.; NUHN, M.; KIRK, P.; NILSSON, R. H. 2011. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews*, v. 25, p. 38-47.
87. HOFRICHTER, M.; ZIEGENHAGEN, D.; SORGE, S.; ULLRICH, R.; BUBLITZ, F.; FRITSHE, W. 1999. Degradation of lignite (low-rank coal) by ligninolytic Basidiomycetes and their manganese peroxidase system. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 52, p. 78-84.
88. HOLF, J. A.; KLOPFENSTEIN, N. B.; TONN, J. R.; MCDONALD, G. I.; ZAMBINO, P. J.; ROGERS, J. D.; PEEVER, T. L.; CARRIS, L. M. 2004. Roles of Woody Root-Associated Fungi in Forest Ecosystem, Recent Advances in Fungal Identification. Rocky Mountain Research Station.
89. HORTENCIO, I. B. 2009. Biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por resíduos de petróleo: um estudo com bactérias isoladas de *Eichornia crassipes* na Amazônia. Tese de doutorado. Universidade Federal do Amazonas-Ufam. 185p.
90. HUCKFELDT, T. 2003. O "kologie und Cytologie des Echten Hausschwammes (*Serpula lacrymans*) und anderer Hausfaulepilze. Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt für Forstund Holzwirtschaft, Hamburg. Dissertation 213. 152p.
91. HYDE et al., 2010. K.D. HYDE, A.H. BAHKALI, M.A. Moslem. Fungi-an unusual source for cosmetics. *Fungal Diversity*, 43, pp. 1-9.
92. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia E Estatística. 1990. Geografia do Brasil. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acesso em: 01 abril de 2016.
93. IMTIAJ, A.; LEE, T. S.; OHGA, S. 2011. Sequence variation of *Pleurotus* species collected from Eastern Asia. *Micología Aplicada Internacional*, v. 23, n. 1, pp. 1-10. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=6851611200>. Acesso em: 28 maio de 2016.
94. INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). Monitoramento da floresta amazônica por satélite - 1997 - 2001. Disponível em <http://www.inpe.gov.br>. Acesso em: 03 janeiro de 2016.

95. ISHIKAWA, N. K.; VARGAS-ISLA, R.; CHAVES, R. S.; CABRAL, T. S. 2012. Macrofungos da Amazônia: Importância e Potencialidades. *Ciência & Ambiente*, v. 44, p. 129-139.
96. ITO, H.; SHIMURA, K.; ITOH, H.; KAWADE, M. 2004. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) "Himematsutake" and Its mechanisms in tumor-bearing mice. *Anticancer Research*, v. 17, p. 277-284.
97. IVANISSEVICH, A.; NUSSENZVEIG, M. 1991. Malária: como vai? *Revista Ciência Hoje*, v. 13, n. 76, p.7-14.
98. JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. 1997. Limonoids from *Citrus reticulata* and their moult inhibiting activity in mosquito *Culex quinquefasciatus* larvae. *Phytochemistry*, v. 44, p. 843-846.
99. JESUS, M. A. 1995. Contribution to the knowledge of wood-rotting fungi in Brazil. I. Ocorrence and distribution of fungi on different substrates from the Manaus region, Amazonas state. Paper prepared for the 26 Annual Meeting Helsingér, Denmark, p.1-21.
100. JESUS, M. A. 1996. Contribution to the knowledge of wood-rotting fungi in Brazil. II. Checklist of fungi from Maraca Island, Roraima State. *Mycotaxon*, v. 57, p. 323-328.
101. JESUS, M. A.; RYVARDEN, L. 2010. Studies in neotropical polypores 28. Two new species from Amazonas, Brazil. *Synopsis Fungorum*, v. 27, p. 73-77.
102. JORNAL A CRÍTICA. 2014. Mosquito da dengue está mais forte e resistente à inseticida 12/04/2014, Impresso. Caderno cidades.
103. JUSTO, A.; HIBBETT, D. S. 2011. Phylogenetic classification of *Trametes* (Basidiomycota, Polyporales) based on a five-marker dataset. *Taxon*, 60(6), 1567-1583.
104. KERSTEN, P.; CULLEN, D. 2007. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 44, n. 2, p. 77-97.
105. KHAN, A.; TANIA, M.; LIU, R.; RAHMAN, M. M. 2013. *Herichium erinaceus*: an edible mushroom with medicinal values. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, v. 10, n. 1, p. 1-6.
106. KIM, S.Y.; LEE, J.S.; JUNG, H. S. 2007. *Fomitopsis incarnatus* sp. nov. based on generic evaluation of *Fomitopsis* and *Rhodofomes*. *Mycologia*, v. 99, p. 833-841.
107. KIRK, P.M., CANNON, P.F., MINTER, D.W. & STALPERS 2008. *Dictionary of the Fungi*. 10 ed. CABI Publishing, Surrey. 771pp.

108. KIRSCHBAUM, J. B. 1985. Potential implication of genetic engineering and other biotechnologies to insect control. *Annual Review of Entomology*, v. 30, p. 51-70.
109. KO, K. S.; JUNG, H. S. 1999. Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera. *Antoine van Leeuwenhoek*, v. 75, p. 191-199.
110. KUMARI, B.R; VIJAYABHARATHI, R; SRINIVAS, R, S; GOPALAKRISHNAN, S. 2014. Microbes as interesting source of novel insecticides: A review. *African Journal of Biotechnology*, Vol 13(26) 2582-2592.
111. KUNO, G; CHANG, G, J. 2007. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of Virology*, v. 152, p. 687-696.
112. LAGROTTA, M. T. F. 2006. Geoprocessamento de indicadores entomológicos na identificação de áreas, imóveis e recipientes “chaves” no controle do *Aedes aegypti* [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz.
113. LEE, J. S.; LIM, Y. W. 2010. *Cerrena aurantiopora* sp. nov. (Polyporaceae) from eastern Asia. *Mycologia*, v. 102, p. 211-216.
114. LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: Entwistle, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Coord.) *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice. J. Wiley & Sons, 37-70.
115. LIMA-JÚNIOR; GIBERTONI, C. N.; MALOSSO, T. B. E. 2014. *Revista de Biología Tropical/International Journal of Tropical Biology and Conservation*. Home > Vol 62, No 3. Disponível em: <<http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/12380/14744>>. Acesso 18 abril 2016.
116. LIN, C.; CUI, Z. B. 2013. Morphological and molecular identification of four new resupinate species of *Perenniporia* (Polyporales) from southern China. *The Mycological Society of America, Mycologia*. v. 105, n. 4, p. 945-958
117. LIPSCOMB, D.; PLATNICK, N.; WHEELER, Q. 2003. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 18, n. 2, p. 65-66.
118. MAIA, L. C.; CARVALHO-JUNIOR, A. A. 2010. Os fungos do Brasil. In. Forzza et al, *Catálogo de plantas e fungos do Brasil: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. RJ. v1

119. MARCO-URREA, E.; PÉREZ-TRUJILLO, M.; VICENT, T.; CAMINAL, G. 2009. Ability of white-rot fungi to remove pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, v. 74, p. 765-772.
120. MARKOUK, M.; BEKKOUCHE, K.; LARHSINI, M.; BOUSAID, M.; LAZREK, H. B., JANA, M. 2000. Evaluation of some Moroccan medicinal plant extracts for larvicidal activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, p. 293-297.
121. MATOS, A. J. F. S.; BEZERRA, R. M. F.; DIAS, A. A. 2007. Screening of fungal isolates and properties of *Ganoderma applanatum* intended for olive mill wastewater decolourization and dephenolization. *Letters in Applied Microbiology*, n. 45, p. 270-275.
122. MELACK, J. M. 1984. "Amazon Floodplains Lakes: Shape, Fetch and Stratification". *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, n. 22, p. 1278-1282.
123. MIETTINEN & RAJCHENBERG. 2012 *Sebiopora aquosa* Miettinen, in Miettinen & Rajchenberg, *Mycol. Progr.* 11(1): 144 .
124. MINISTÉRIO DA SAÚDE: Boletim Epidemiológico - Volume 47 - nº 03 - ano 2016 - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2015. <http://portalsaude.saude.gov.br/> Acesso em: 28 maio de 2016.
125. MISATO, T. 1983. Recent status and future aspects of agricultural antibiotics. In "Pesticide chemistry: Human welfare and the Environment" v. 2. Natural products (Eds. J. Miyamoto and P.C. Kearney), Pergmon Press, Oxford, 241-246p.
126. MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. 1990. Antitumour activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 54, p. 2889-2896.
127. MONCALVO, J.M.; WANG, H.F.; WANG, H.H.; HSEU, R.S. 1995c. The use of ribosomal DNA sequence data for species identification and phylogeny in the Ganodermataceae. In: Buchanan PK, Hseu RS and Moncalvo JM ed. *Ganoderma, systematics, phytopathology and pharmacology. Proceedings of Contributed Symposium 59 A,B, 5th International Mycological Congress, Vancouver, August 14-21, 1994. Taipei.* Pp. 31-44.
128. MONCALVO, J. M.; RYVARDEN, L. 1997. A nomenclatural study of the Ganodermataceae. *Donk. Fungiflora, Oslo* 11: 1-114.
129. MOORE, D; FRAZER, L. N. 2002. *Essential fungal genetics*. Springer Science & Business Media.

130. MORGENSTERN, I.; KLOPMAN, S.; HIBBETT, D. S. 2008. Molecular Evolution and Diversity of Lignin Degrading Heme Peroxidases in the Agaricomycetes. *Journal Molecular Evolution*, v. 66, p. 243-257.
131. MOTTA, V. T.; WAGNER, M. B. 2003. *Bioestatística*. Ed. Robe, Caxias do Sul: Educs, São Paulo, 201p.
132. MUSSO, D.; NILLES, E. J., & CAO-LORMEAU, V. M. 2014. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10), O595-O596.
133. NICC-Comunicação e Saúde. 2003. Pesquisadores criticam o uso de produtos químicos no combate à doença. Disponível: www.cpqam.fiocruz.br/nicc/comunic/jc200101.htm. Acesso em: 15 janeiro 2016.
134. NICOLAS, L. 1986. Potentialité de *Bacillus sphaericus* dans la lutte antivectorielle en Afrique tropicale. *Cah ORSTOM, sér Ent Méd Parasitol*, 24, 265-273.
135. NILSSON, R. H.; KRISTIANSSON, E.; RYBERG, M.; HALLENBERG, N.; LARSSON, K. H. 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics*, v. 4, p. 193-201.
136. NOGUEIRA, M. A.; DIAZ, G.; ANDRIOLI, W.; FALCONI, F. A.; STANGARLIN, J. R. 2006. Secondary metabolites from *Diplodia maydis* and *Sclerotium rolfsii* with antibiotic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 14-16.
137. NORONHA, M. C. 2003. *Geoespaço: o espaço geográfico do Amazonas*. Ed. Concorde. Manaus, AM. 256p.
138. NÚÑEZ, M.; RYVARDEN, L. 1995. *Polyporus (Basidiomycotina) and related genera. Synopsis Fungorum 10*. Oslo, Norway: Fungiflora. 85p.
139. NUHU A.; YOUN ,J. C.; MI JA S; TAE, S. L. AND U YOUN LEE. Cultural Conditions for Mycelial Growth and Molecular Phylogenetic Relationship in Different Wild Strains of *Schizophyllum commune*. *Mycobiology. The Korean Society of Mycology*. 38(1) : 17-25.
140. OKINO, L. K.; MACHADO, K. M. G.; FABRIS, C.; BONONI, V. L. R. 2000. Lignolytic activity of tropical rainforest Basidiomycetes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 16, p. 889-893.
141. OKOYE, P. N.; BROOKE, B. D.; KOEKEMOER, L. L.; HUNT, R. H., & COETZEE, M. 2008. Characterisation of DDT, pyrethroid and carbamate resistance in *Anopheles funestus* from

Obuasi, Ghana. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 102(6), 591-598.

142. PAPINUTTI, L.; MOUSO, N.; FORCHIASSIN, F. 2000. Removal and degradation of the fungicide dye malachite green from aqueous solution using the system wheat bran - *Fomes sclerodermeus*. Enzyme and Microbial Technology, v. 39, p. 848-853.

143. PERICH, M. J.; WELLS, C.; BERTSCH, W.; TREDWAY, K. E. 1995. Isolation of the insecticidal components of *Tagetes minuta* (Compositae) against mosquito larvae and adults. Journal of the American Mosquito Control Association, v. 11, p. 307-310.

144. PETRE, C. V.; BALAEŞ, T., & TĂNASE, C. 2014. Lignicolous basidiomycetes as valuable biotechnological agents. Memoirs of the Scientific Sections of the Romanian Academy, 37.

145. PIALOUX, G.; GAUZERE, B. A.; JAUREGUIBERRY, S.; STROBEL, M. 2007. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. The Lancet Infectious Diseases, v. 7, p. 319-327.

146. PINHEIRO, V. C.; TADEI, W. P. 2002. Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae in artificiais containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. Caderno de Saúde Pública, v. 18, p. 1529-1536.

147. PIZARRO, A. P. B.; OLIVEIRA, F. A. M.; PARENTE, J. P.; MELO, M. T. V.; SANTOS, C. E.; LIMA, P. R. 1999. O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas dos mosquitos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 32, p. 1-11.

148. PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. 2002 Microbiology. 5 edn McGraw-Hill. New York, v. 1015.

149. PRIYANKA, J.; SRIVASTAVA, N.; PRAKASH, S. 2001. *Chrysosporium tripicum* efficacy against *Anopheles stephensi* larvae in the laboratory. Journal of the American Mosquito Control Association, v. 17, n. 2, p. 127-130.

150. QUESADA-MORAGA, E.; VEY, A. 2004. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* Mycol Res.;108 (Pt 4):441-52.

151. RAFAEL, M. S., HEREIRA-ROJAS, W. J., ROPER, J. J., NUNOMURA, S. M., & TADEI, W. P. 2008. Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L.(Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. Genetics and molecular research, 7(3), 772-781.

152. RAHUMAN, A. A.; GOPALAKRISHNAN, G.; GHOUSE, B. S.; ARUMUGAM, S.; HIMALAYAN, B. 2000. Effect of *Feronia limonia* on mosquito larvae. Fitoterapia, v. 71, p. 553-555.

153. RAJCHENBERG, M. 2014. Nuclear behavior of the mycelium and the phylogeny of Polypores (Basidiomycota). *Mycologia*, v. 103, n. 4, p. 677-702.
154. RAMOS, M. A., SOUSA, N. R., FRANCO, A. R., COSTA, V., OLIVEIRA, R. S., & CASTRO, P. M. 2013. Effect of diflubenzuron on the development of *Pinus pinaster* seedlings inoculated with the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(1), 582-590.
155. RAYMUNDO, T.; VALENZUELA, R.; GUTIÉRREZ, A.; CORONADO, M. L.; ESQUEDA, M. 2013. Xylophagous Agaricomycetes in the central plains of the Sonoran desert. *Journal Revista Mexicana de Biodiversidad*, v. 84, n. 2. p. 417-424.
156. RICCARDI, C. L.; BASHORE, S. L. 2003. First checklist of macrofungi for the deep woods - all taxa biodiversity inventory, Hocking County, Ohio. *Mycotaxon*, v. 86, p. 210-250.
157. ROSS, G. D.; VĚTVIČKA, V.; YAN, J.; XIA Y.; VĚTVIČKOVÁ, J. 1999. Therapeutic intervention with complement and glucan in cancer (Review). *Immunopharmacology*, v. 42, p. 61-74.
158. RYVARDEN, L. 1972 *Norw. J Bot.* 19: 236
159. RYVARDEN, L. 1973. *Flavodon flavus* (Klotzsch) *Norw. J Bot.* 20 (1): 3.
160. RYVARDEN, L. 1991. Genera of polypores, nomenclature and taxonomy. *Noruega, Oslo. Fungiflora, Synopsis Fungorum*, v. 5, n. 1, p. 363.
161. RYVARDEN, L.; JOAHNSEN, I. 1980. A preliminary polypore flora of East África. *Noruega, Oslo, Fungiflora, Synopsis Fungorum*, 636p.
162. SAMUEL, P. P; TYAGI, B. K. 2006. Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. *Indian Journal Medical Research*, v. 123, p. 615-628.
163. SANTOS, G. M. D.; SANTOS, A. C. M. D. 2005. Sustentabilidade da pesca na Amazônia. *Estudos avançados*, 19(54), 165-182.
164. SANTOS, C.; PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. 2009. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal compilation. The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology*, v. 108, p. 375-385.
165. SCHMIDT, O; KALOW, W. 2005. Differentiation of indoor wood decay fungi with MALDI-TOF mass spectrometry. *Holzforschung* 59:374–7.

166. SCHAFFNER, F.; MEDLOCK, J. M.; BORTEL, W. V. 2013. Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(8), 685-692.
167. SCHMIDT, J. P.; MUELLER, G. M. 2007. An estimate of lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and Conservation*, v. 16, p. 99-111.
168. SCHOCH C.L; SEIFERT K.A; HUHNDOERF S; ROBERT V; SPOUGE JL; LEVESQUE CA; CHEN W. 2012. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 109(16): 6241-6.
169. SELEENA, P.; LEE, H. L. 1994. Insecticidal activity of a Malaysian isolate of *Aspergillus niger*. *ASEAN Journal of Science, Technology and Development*, v. 11, n. 2, p. 47-53.
170. SEELAN, J. S. S., JUSTO, A., NAGY, L. G., GRAND, E. A., REDHEAD, S. A., & HIBBETT, D. 2015. Phylogenetic relationships and morphological evolution in *Lentinus*, *Polyporellus* and *Neofavolus*, emphasizing southeastern Asian taxa. *Mycologia*, 107(3), 460-474.
171. SENNA, A. R., FIGUEIRÓ, R., ANDRADE, L. F., SARDELLA, C. J., GUEDES-SILVA, E., SOUZA-FILHO, J. F., ... & DOCILE, T. N. 2013. A importância e os desafios para o conhecimento e a catalogação da biodiversidade no Brasil. *Acta Scientiae et Technicae*, 1(1).
172. SHAW, E. I.; MOURA, H.; WOOLFITT, A. R.; OSPINA, M.; THOMPSON, H. A.; BARR, J. A. 2004. Identification of biomarkers of whole *Coxiella burnetii* I by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 76, p. 4017-4022.
173. Silva, H. H. G. D., Silva, I. G. D., Santos, R. M. G. D., Rodrigues Filho, E., & Elias, C. N. 2004. Larvicidal activity of tannins isolated of *Magonia pubescens* St. Hil.(Sapindaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37(5), 396-399.
174. SIMPSON, D. I. 1964. Zika virus infection in man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 58, p. 335-338.
175. Singh, P. 1988. Naturally-occurring thiophene derivatives from *Eclipta* species. *Bioact Mol* 7: 179-186.
176. SINGER, R. 1961. The Agaricales (mushrooms) in modern taxonomy. *Lilloa*. 832p.
177. SIOLI, H. 1967. "Studies in Amazonian Waters". *Atas do simpósio sobre a biota amazônica*, n. 3, p. 9-50.
178. SOARES, A. M. S.; SOTÃO, H. M. P., MEDEIROS, P. S.; GIBERTONI, T. B. 2014. Riqueza de fungos poliporoides (Agaricomycetes, Basidiomycota) em uma floresta ombrófia densa no Amapá, Amazônia brasileira. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, n. 35, p. 5-18.

179. SOTÃO, H. M. P.; BONONI, V. L. R.; FIGUEIREDO, T. S. 1991. Basidiomycetes de manguezais da Ilha de Maracá, Amapá, Brasil. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, (série botânica), v. 7, n. 1, p.109-114.
180. SOTÃO, H. M. P.; CAMPOS, E. L.; COSTA, S. P. S. E.; MELO, O. A.; AZEVEDO, J. C. 2002a. Basidiomycetes macroscópicos de manguezais de Bragança, Pará, Brasil. Hoenea, v. 29, n. 3, p. 215-224.
181. SOTÃO, H. M. P.; GUGLIOTTA, A. M.; OLIVEIRA, A. P.; LUZ, A. B.; MELO, O. 2002b. Fungos Poliporóides. In: LISBOA, P.L (org.). Caxiuanã, populações tradicionais, meio físico e diversidade biológica. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, p. 433-444.
182. SOTÃO, H. M. P.; GIBERTONI, T.; MAZIERO, R.; BASEIA, I.; MEDEIROS, P. S.; MARTINS JÚNIOR, A.; CAPELARI, M. 2009. Fungos Macroscópicos da Floresta Nacional de Caxiuanã, Pará, Brasil: Basidiomycota (Agaricomycetes). In: P.L. Lisboa (org.), Caxiuanã: Desafios para a Conservação de uma Floresta Nacional na Amazônia. Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi. p. 395-406.
183. SOTOME, K.; HATTORI, T.; OTA, Y.; TO-ANUN, C.; SALLEH, B.; KAKISHIMA, M. 2008. Phylogenetic relationships of Polyporus and morphologically allied genera. Mycologia, v. 100, p. 603-615.
184. SOUZA, A. D., SOUZA, A. D., ASTOLFI FILHO, S., BELÉM PINHEIRO, M. L., SARQUIS, M. I. D. M., & PEREIRA, J. O. 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. Acta Amazônica, 34(2), 185-195.
185. SOUZA, A. F.; ROSAD, F. R. 2009. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. Revista em Agronegócios e Meio Ambiente, v. 2, n. 1, p. 121-139.
186. STALPERS, J. A.; LOERAKKER, W. M. 1982. *Laetisaria* and *Limonomyces* species (Corticaceae) causing pink diseases in turf grasses. Canadian Journal of Botany, v. 60, p. 537.
187. STAMETS, P. 2002. Novel antimicrobials from mushrooms. Herbal Gram, v. 54, p. 29-33.
188. SU, C. L.; TSENG, W. L. 2007. Gold nanoparticles as assisted matrix for determining neutral small carbohydrates through laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry. Analytical Chemistry, v. 79, p. 1626-1633.
189. TADEI, W. P.; RODRIGUES, I. B.; SANTOS, J. M. M.; RAFAEL, M. S.; PASSOS, R. A.; COSTA, F. M.; PINTO, R. C.; OLIVEIRA, A. E. M. 2007. Entomologia e controle de vetores: o Papel

da entomologia no controle da Malária. Revista Brasileira de Medicina Tropical, v. 40, supl. II. X Reunião Nacional de Pesquisa em Malária.

190. TAUIL, P. L. 2001. Urbanização e ecologia do dengue. Caderno de Saúde Pública, v. 17, p. 99-102.

191. TEIXEIRA, A. R. 1994. Genera of Polyporaceae: na objective approach. Boletim da Chácara Botânica de Itu, v. 1, p. 4-91.

192. THOMPSON, J. D, HIGGINS, D.G, GIBSON, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. 22(22):4673-4680.

193. THONGWAT, D.; PIMOLSRI, U; SOMBOON, P. 2015. Screening for mosquito larvicidal activity of thai mushroom extracts with special reference to steccherinum sp against *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE). Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 46(4), 586.

194. TOMSOVSKY, M. 2008. Molecular phylogeny and taxonomic position of *Trametes cervina* and description of a new genus *Trametopsis*. Jornal Czech Mycology, v. 60, p. 1-11.

195. TOMSOVSKY, M.; KOLARČÍK, M.; PAZOUTOVA, S.; HOMOLKA, L. 2006. Molecular phylogeny of European *Trametes* (Basidiomycetes, Polyporales) species based on LSU and ITS (nrDNA) sequences. Nova Hedwig, v. 82, p. 269-280.

196. TRIFINOPOULOS, J., NGUYEN, L. T., VON HAESELER, A., & MINH, B. Q. 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. Nucleic Acids Research, gkw256.

197. TSAO, R., ROMANCHUK, F. E., PETERSON, C. J., & COATS, J. R. (2002). Plant growth regulatory effect and insecticidal activity of the extracts of the Tree of Heaven (*Ailanthus altissima* L.). BMC ecology, 2(1), 1.

198. VALENTIN, L.; LU-CHAU, T. A.; LOPEZ, C.; FEIJOO, G.; MOREIRA, M. T.; LEMA, J. M. 2007. Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp.” Process Biochemistry, v. 42, n. 4, p. 641-648.

199. VALENTINE, N. B.; WAHL, J. H.; KINGSLEY, M. T.; WAHL, K. L. 2002. Direct surface analysis of fungal species by matrixassisted laser desorption /ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom, v. 16, p. 1352-1357.

200. VAN RIE, J.; MCGAUGHEY, W. H.; JOHNSON, D. E.; BARNETT, B. D.; VAN, M, H. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, v. 247, p. 72-74.
201. VASCONCELOS, P. F. D. C. 2015. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas?. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 6(2), 9-10.
202. WANG, G. J.; HUANG, Y. J.; CHEN, D. H.; LIN, Y. L. 2009. *Ganoderma lucidum* Extract Attenuates the Proliferation of Hepatic Stellate Cells by Blocking the PDGF Receptor. *Phytotherapy Research*, v. 23, p. 833-839.
203. WASSER, S. P.; WEIS, A. L. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: Current perspectives (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 1, p. 31-62.
204. WEAVER, S. C. 2014. Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(6), e 2921.
205. WEBSTER, J.; WEBER, R. 2007. *Introduction to Fungi*. 3 ed., Cambridge University Press, 841p.
206. WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand D, Sninsky J, White T (eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*: 315-322. Academic Press, San Diego, California.
207. WISITRASSAMEEWONGA, K.; KARUNARATHNAA, S. C.; THONGKLANGA, N.; ZHAOC, R.; CALLACD, P.; MOUKHAD, S.; FÉRANDONE, C.; CHUKEATIROTEA, E.; HYDEA, K. D. 2012. *Agaricus subrufescens*: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 19, n. 2, p. 131-146.
208. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 1985. Bioassay method for the titration of *Bacillus sphaericus*: consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. *World Health Organ*, 3, 85-95.
209. XAVIER-SANTOS, S. 2003. Isolamento, identificação e perfil enzimático de fungos decompositores de madeira da Estação Ecológica do Noroeste Paulista – São José do Rio Preto/Mirassol, SP. 2003. 222f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, ênfase em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
210. ZANLUCA, C.; MELO, V. C. A.; MOSIMANN, A. L. P.; SANTOS, G. I. V.; SANTOS, C. N. D.; LUZ, K. 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. v. 110, n. 4.

211. ZHOU, X.; LIN, J.; YIN, Y.; ZHAO, J.; SUN, X.; TANG, K. 2007. Ganodermataceae: natural products and their related pharmacological functions. *The American Journal of Chinese Medicine*, v. 35, p. 559-574.

ANEXO

(Publicação)

Artigo 1

C&A | **Ciência&Ambiente**

O MUNDO INVISÍVEL E DESCONHECIDO DA FLORESTA AMAZÔNICA REINO FUNGI

A maior região de floresta tropical do planeta é a floresta amazônica, da qual 3,7 milhões de quilômetros quadrados estão no Brasil. Ela apresenta em todos os seus aspectos uma magnitude única, com a maior bacia hidrográfica e a região de maior biodiversidade. Por consequência, o Brasil classifica-se como o primeiro em plantas, peixes de água doce e mamíferos, o segundo em anfíbios e vertebrados (excluindo os peixes) e o terceiro em aves. Boa parte dessas espécies habita essa floresta. Entretanto, os mesmos relatórios que divulgam essas estatísticas referem muito pouco a diversidade microbiana – fungos, bactérias e outros seres microscópicos – tanto no que diz respeito ao planeta como um todo, quanto em relação à Amazônia. E ao se levar em consideração a rapidez das alterações ambientais neste bioma, em particular, constata-se urgência de se realizar inventários de sua microbiota para dar conta da diversidade de espécies fúngicas. É obrigação estratégica do governo brasileiro promover um levantamento sistêmico de dados que possa retratar um bem cultural, visando o conhecimento, a exploração e a proteção do acervo de uma região que requer sobretudo um estudo de habitats.

Sandra Zanotto, Maria Dolores Fonseca e João Lúcio Azevedo

Artigo 2

Mycosphere Doi 10.5943/mycosphere/3/4/4

***Cantharellus amazonensis*, a new species from Amazon**

Wartchow F^{1*}, Santos JC² and Fonseca MDP²¹Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Departamento de Sistemática e Ecologia, CEP: 58051-970, João Pessoa, PB, BRAZIL²Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-graduação BIONORTE – Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, CEP: 69077-000, Manaus, AM, BrazilWartchow F, Santos JC, Fonseca MDP 2012 – *Cantharellus amazonensis*, a new species from Amazon. Mycosphere 3(4), 414–418, Doi 10.5943 /mycosphere/3/4/4

Cantharellus amazonensis is described as a new species from the Amazon. It is characterized by the contrasting red pileus with yellow folds and stipe, the basidiospores size and thin-walled pileipellis hyphae. A description, discussion, photograph and line drawings are provided.

Key words – Cantharellaceae – Cantharellales – Neotropic – taxonomy

Article Information

Received 30 May 2012

Accepted 3 July 2012

Published online 10 July 2012

*Corresponding author: Felipe Wartchow – e-mail – fwartchow@yahoo.com.br
