UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo químico e biológico de micro-organismos associados à
abelha sem ferrão *Scaptotrigona depilis***

Camila Raquel Paludo

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo químico e biológico de micro-organismos associados à
abelha sem ferrão *Scaptotrigona depilis***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.

Orientada: Camila Raquel Paludo

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Coorientador: Prof. Dr. Jon Clardy

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 23/02/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Paludo, Camila Raquel

Estudo químico e biológico de micro-organismos associados à abelha sem ferrão *Scaptotrigona depilis*.
Ribeirão Preto, 2017.

173 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Pupo, Mônica Tallarico

Coorientador: Clardy, Jon

1. Microbiota. 2. Fungo mutualista. 3. Cocultura. 4. Simbiose.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Raquel Paludo

Estudo químico e biológico de micro-organismos associados à abelha sem ferrão

Scaptotrigona depilis

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo
Coorientador: Prof. Dr. Jon Clardy

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

É com imenso amor que dedico essa tese de doutorado à Deus, que me ilumina e fortalece; à Nossa Senhora, Anjos e Santos, que me auxiliam e protegem; à minha família, que amo incondicionalmente e infinitamente; e às abelhas, protagonistas desse trabalho e fonte de inspiração em minha caminhada.

Agradecimentos

Agradeço à Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo a oportunidade de desenvolver um projeto tão fascinante, que me proporcionou momentos profissionais e pessoais gratificantes durante os últimos quatro anos;

Agradeço ao Prof. Dr. Jon Clardy os valiosos ensinamentos que permitiram meu crescimento intelectual. Agradeço também pela coorientação e por disponibilizar seu tempo e dedicação a esse trabalho;

Agradeço ao Prof. Dr. Roberto G. Kolter o acolhimento em seu laboratório na Harvard Medical School. Agradeço pelas discussões científicas que ajudaram na investigação microbiológica desse trabalho e pela orientação no âmbito profissional e pessoal;

Agradeço ao Prof. Dr. Fábio Santos do Nascimento os importantes ensinamentos sobre abelhas nativas;

Agradeço os colegas de laboratório que me proporcionaram momentos de alegria e troca de experiências e aprendizado. Em especial, agradeço ao Eduardo Afonso da Silva Junior, Weilan Gomes da Paixão Melo e Taise Fukuda, esta última a quem tive o prazer de monitorar durante o desenvolvimento de sua iniciação científica (LQMo, FCFRP-USP, Laboratório Profa. Dra. Mônica T. Pupo); Andrés Andrade-Dominguez, Gleb Pishchany, Jorge Rocha e Scott Chimileski (HMS – Laboratório Prof. Dr. Roberto G. Kolter); Emily Mevers, Clarissa Sit, Thomas Wyche e Antonio Ruzzini (HMS – Laboratório Prof. Dr. Jon Clardy);

Agradeço à Dra. Erica Tatiane da Silva o auxílio com as análises estatísticas, carinho e amizade.

Agradeço aos doutores Cristiano Menezes e Ayrton Vollet-Neto os ensinamentos sobre criação *in vitro* de larvas de *Scaptotrigona depilis* e valiosas discussões;

Agradeço aos técnicos de laboratório o auxílio na obtenção de dados experimentais, coleta do material de estudo, dedicação, carinho e amizade. Em especial agradeço à Cláudia C. Macedo, Sidnei Mateus, José Carlos Tomaz, Isabel Cristina C. Turatti, Vinicius Palaretti e Maria Angélica Chellegatti.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) as bolsas de estudo que permitiram o desenvolvimento desse trabalho (Processo de doutorado no Brasil 2012/22487-6 e Processo BEPE 2014/23532-0). Adicionalmente, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Enfim, agradeço todos que colaboraram diretamente e indiretamente para o desenvolvimento e sucesso desse trabalho.

*"Curiosity is a delicate little plant that, aside from stimulation,
stands mainly in need of freedom"*

Albert Einstein

RESUMO

PALUDO, C. R. **Estudo químico e biológico de micro-organismos associados à abelha sem ferrão *Scaptotrigona depilis***. 2017. 173f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Insetos como formigas cortadeiras, cupins e alguns besouros têm sido descritos como agricultores de fungos mutualistas. No entanto, apenas recentemente esse fenômeno foi descrito em abelhas. O objetivo desse trabalho foi estudar os micro-organismos associados à abelha sem ferrão *Scaptotrigona depilis*, a primeira abelha agricultora descrita. Foram isolados 149 micro-organismos a partir de diferentes materiais coletados da colônia, e destes, 28% apresentaram atividade antimicrobiana frente a patógenos humanos. Os micro-organismos *Bacillus* sp. SDLI1, *Candida* sp. SDCP2, *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 e *Monascus ruber* SDCP1, isolados do favo de cria de *S. depilis*, foram selecionados para estudo químico e biológico. Foi demonstrado que o fungo-alimento de *S. depilis* é *Zygosaccharomyces* sp., que produz grande quantidade de adipossomos. Os lipídeos e esteroides estocados nessas organelas citoplasmáticas podem ajudar na nutrição larval, uma vez que *Zygosaccharomyces* sp. é requerido para o desenvolvimento das larvas de *S. depilis*. Em culturas *in vitro* de ovos dessa abelha, verificou-se que ergosterol desempenha papel semelhante ao de *Zygosaccharomyces* sp. para a metamorfose de *S. depilis*, indicando que esse mutualista serve como fonte de esteroides para as larvas. Verificou-se que compostos voláteis produzidos por *Candida* sp. SDCP2 estimulam o crescimento de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1. Análises revelaram que os compostos voláteis majoritários produzidos por *Candida* sp. SDCP2 foram etanol (**C1**) e álcool isoamílico (**C2**), e essas substâncias também foram encontradas nas células de cria dessa abelha. Já o fungo *M. ruber* SDCP1 produz lovastatina (**M6**), um produto natural reconhecido pela inibição da enzima HMG-CoA redutase, essencial para biossíntese de esteroides, e **M6** pode modular o desenvolvimento de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1. *Candida* sp. SDCP2 estimula a produção de monascinol (**M2**) e monascina (**M3**) pelo fungo *M. ruber* SDCP1 em co-cultura. Monascina (**M3**) é ativa frente *Candida* sp. SDCP2, podendo controlar o crescimento dessa levedura, sendo a produção de **M3** aumentada em 57 vezes após sete dias de cocultivo. A investigação química de *Bacillus* sp. SDLI1 revelou que essa bactéria produz sete surfactinas (**B1-B7**) e bacillomicina D (**B8**), que apresentam atividade antifúngica. O cromossomo circular de *Bacillus* sp. SDLI1 possui oito *clusters* biossintéticos para a produção de diferentes classes de antimicrobianos. *Bacillus* sp. SDLI1 também produz o fago SDLI1-1, ativo contra *Paenibacillus larvae*, patógeno causador da cria pútrida americana em *Apis mellifera*. Cultivos de larvas *in vitro* revelaram que *S. depilis* apresenta resistência contra os entomopatógenos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, sendo que *Bacillus* sp. SDLI1 pode desempenhar um papel protetivo para as larvas de *S. depilis* contra o patógeno *P. larvae*. Os resultados sugerem que o ambiente encontrado nas colônias de *S. depilis* favorece o desenvolvimento de uma microbiota especializada. Esses micro-organismos interagem e beneficiam a abelha hospedeira, estabelecendo relações de simbiose que devem ser preservadas para a sobrevivência desse polinizador.

Palavras-chave: Microbiota, Fungo mutualista, Cocultura, Simbiose.

ABSTRACT

PALUDO, C. R. **Chemical and biological study of microorganisms associated with the stingless bee *Scaptotrigona depilis***. 2017. 173p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Some ants, termites and beetles have established mutualistic relationship with fungi that they culture for food. However, just recently a fungus agricultural behavior has been described for bees. The main goal of this study was to investigate the microbiota associated with the stingless bee *Scaptotrigona depilis*, the first fungus-farming bee described. Different materials from *S. depilis* colony were used to isolate 149 microbial strains, and among these microorganisms, 28% showed antimicrobial activity against human pathogens. The microorganisms *Bacillus* sp. SDLI1, *Candida* sp. SDCP2, *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 and *Monascus ruber* SDCP1, isolated from brood cells of *S. depilis*, were selected for further studies. Using different approaches, it was confirmed that *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 is the fungus required for *S. depilis* larval development. This fungus accumulates cytoplasmic lipid droplets that can be a source of sterols and lipids to the larvae. Using *in vitro* eggs culturing, it was verified that ergosterol, the major sterol produced by *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, can stimulates larval metamorphosis, confirming this yeast as an important sterol source. Co-cultures provided information about *Candida* sp. SDCP2 volatile organic compounds (VOCs) production, which stimulates *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 growth. The majoritarian VOCs produced by *Candida* sp. SDCP2 were ethanol (**C1**) and isoamyl alcohol (**C2**), which were also detected in *S. depilis* brood cells. The fungus *M. ruber* SDCP1 produces lovastatin (**M6**), an inhibitor of HMG-CoA reductase, which can modulate *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 pellicle formation and lipids accumulation. *Candida* sp. SDCP2 stimulates the production of monascinol (**M2**) and monascin (**M3**) by *M. ruber* SDCP1 in co-culture. Monascin (**M3**) is active against *Candida* sp. SDCP2 and can control the growth of this yeast, once **M3** biosynthesis increased ~ 57 folds after seven days of co-culturing. *Bacillus* sp. SDLI1 produces seven surfactins (**B1-B7**) and bacillomycin D (**B8**) that presented antifungal activity against pathogenic fungi. This bacterium had its whole-genome sequenced and the circular chromosome harbors biosynthetic gene clusters to produce eight classes of antimicrobial compounds. The phage SDLI1-1, which presented activity against *Paenibacillus larvae*, a pathogen causative of American Foulbrood Disease, was also produced by *Bacillus* sp. SDLI1. *S. depilis* larvae were resistant against *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infections, and *Bacillus* sp. SDLI1 was capable to increase larval survival during *in vitro* culturing with *P. larvae*. The results suggest that the environmental conditions found in *S. depilis* colonies favor the development of a specialized microbiota. These microorganisms interact and produce beneficial factors to its host. These established symbiotic relationships contribute with the homeostasis inside the colony and they must be preserved to safeguard *S. depilis* survival.

Keywords: Microbiota, Mutualistic fungus, Co-culture, Symbiosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de rainha de <i>Scaptotrigona depilis</i>	2
Figura 2. Exemplares de <i>Scaptotrigona depilis</i> na entrada do ninho	3
Figura 3. Célula real de <i>Scaptotrigona depilis</i> (~5,3 mm) comparada com célula de cria para desenvolvimento de operárias ou zangões (~3,0 mm)	3
Figura 4. Abelha forrageira coletando pólen de uma fonte floral e armazenando o alimento em sua corbícula	4
Figura 5. Estrutura do interior da colônia de espécie <i>Scaptotrigona depilis</i> . Pode-se notar os favos de cria, invólucro (lamelas) de cerume que circunda os favos de cria e potes de mel e pólen	5
Figura 6. Estruturas construídas por abelhas sem ferrão da espécie <i>Scaptotrigona depilis</i> utilizando cerume. A. Células de cria. B. Potes de alimento	5
Figura 7. Células de cria abertas para visualização do fungo-alimento das larvas de <i>Scaptotrigona depilis</i>	6
Figura 8. Estrutura química da estreptoclorina (1) e estrutura química dos derivados da piericidina (2-9) (adaptado de KROISS et al., 2010).	8
Figura 9. Estrutura química da micangimicina (10) (adaptado de SCOTT et al., 2008 e OH et al., 2009)	8
Figura 10. Estruturas químicas de anguciclinas isoladas por Carr e colaboradores (2012)	11
Figura 11. Estrutura química da scelifrolactama (16) (adaptado de OH et al., 2011)	11
Figura 12. Estruturas químicas da selvamicina (17) e da nistatina A ₁ (18) (adaptado de VAN ARNAM et al., 2016)	12
Figura 13. Distribuição dos micro-organismos isolados nas diferentes partes da colônia	46
Figura 14. Local de isolamento dos micro-organismos que apresentaram atividade inibitória frente a pelo menos um patógeno humano após 24 horas de contato	48
Figura 15. Local de isolamento dos micro-organismos que mantiveram atividade inibitória frente a pelo menos um patógeno humano após 168 horas de contato	50
Figura 16. Ensaio de inibição em placa frente ao entomopatógeno <i>M. anisopliae</i> 1037 após 14 dias de contato. A. Halo inibitório produzido por metabólitos secretados pela linhagem SDLI1. B. Halo inibitório do controle positivo clotrimazol 100 µg	51
Figura 17. Foto do micro-organismo <i>Pediococcus stilesii</i> SDLI3, isolado do lixo da colônia de <i>S. depilis</i>	52
Figura 18. Foto do micro-organismo <i>Escherichia fergusonii</i> SDA3I2, isolado do corpo de <i>S. depilis</i>	52
Figura 19. Foto do micro-organismo <i>Pantoea eucrina</i> SDCEI1, isolado de amostras do cerume que compõe a estrutura da colônia de <i>S. depilis</i>	53
Figura 20. Foto do micro-organismo <i>Fructobacillus tropaeoli</i> SDMI2, isolado de mel de <i>S. depilis</i>	53
Figura 21. Foto de <i>Bacillus</i> sp. linhagens SDPI3, SDPI5, SDPI6, SDPI9 e SDPI10, SDPQ1-01 e SDPQ1-02, isoladas do pólen, e SDLI1, isolada do intestino larval	54

Figura 22. Levedura <i>Candida</i> sp. SDCP2, isolada de cerume do favo de cria ..	55
Figura 23. A. Processo de isolamento do fungo filamentoso <i>Monascus ruber</i> SDCP1 e da levedura <i>Candida</i> sp. SDCP2 (pontos indicados na figura). B. Fungo <i>M. ruber</i> SDCP1, isolado de cerume do favo de cria	56
Figura 24. Identificação taxonômica do fungo <i>Monascus ruber</i> SDCP1. A. Crescimento em meio MEA, 35 mm; B. Crescimento em meio CYA, 31 mm; C. Crescimento em meio G25N, 22 mm	56
Figure 25. Imagens do fungo que cresce no interior das células de cria de <i>S. depilis</i> logo após a eclosão do ovo. A. MEV imagem mostrando os brotamentos a partir do cerume. B. MEV imagem mostrando o pseudomicélio. C. Imagem do fungo branco que serve como alimento para a larva de <i>S. depilis</i>	57
Figura 26. Árvore filogenética de 18S rRNA, usando os <i>primers</i> NS1 e NS4. Números de acesso no Genbank KX999554, KX999556 e KX999557 (NCBI) ..	58
Figura 27. Géis de agarose (1%) com produtos de PCR para <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1 (Z), fungo coletado diretamente das células de cria (BC), <i>M. ruber</i> SDCP1 (M), <i>Candida</i> sp. SDCP2 (C) e <i>Bacillus</i> sp. SDLI1 (B). A. Produtos de PCR usando <i>primers</i> NL1 e NL4 para região 26S e produtos de PCR usando <i>primers</i> ITS1 e ITS4 para região ITS. B. Produtos de PCR usando <i>primers</i> F27 e R1492 para região 16S. C. Produtos de PCR utilizando <i>primers</i> FMZ e RZ para região 18S específica para <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1 e utilizando <i>primers</i> FMS e RM para região 18S específica de <i>M. ruber</i> SDCP1	59
Figura 28. MEV de uma abelha cuidadora de cria da espécie <i>S. depilis</i> . A. Imagem da abelha. B. Detalhe da presença de pólen na perna traseira da abelha. C. Grãos de pólen contendo estruturas bacilares	60
Figura 29. Genes biossintéticos presentes no cromossomo circular de <i>Bacillus</i> sp. SDLI1, bem como exemplos de estruturas potencialmente produzidas pelos mesmos.....	61
Figura 30. Espectro de RMN de ^1H de fração isolada de <i>Bacillus</i> sp. SDLI1 (CD_3OD , 500 MHz).....	63
Figura 31. Perfil químico da separação de surfactinas produzidas por <i>Bacillus</i> sp. SDLI1. Condições cromatográficas: Coluna C_{18} semipreparativa (Machery-Nagel, Nucleosil 250x10 mm, 120-5 Å), fase móvel isocrática composta por acetonitrila:água (8:2, v/v) acrescida de 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA), vazão da fase móvel de 3 mL/min, detecção por UV-Vis monitorado em 210 e 225 nm, tempo de corrida de 60 min.....	64
Figura 32. Espectro de ESI-MS/MS do lipopeptídeo B1 ($1022 [\text{M}+\text{H}]^+$, 40 eV). ..	65
Figura 33. Espectro de ESI-MS/MS do lipopeptídeo B5 ($1050 [\text{M}+\text{H}]^+$, 40 eV) . ..	66
Figura 34. Esquema de fragmentação dos lipopeptídeos B1 e B5 . Obs. como Leu e Ile apresentam a mesma massa, não é possível diferenciar estes aminoácidos a partir dos dados de MS/MS.....	67
Figura 35. Enzimas e rota biossintética para produção de surfactinas (B1-B7) presente no genoma de <i>Bacillus</i> sp. SDLI1.	68
Figure 36. Halos inibitórios das frações 22 e 23 do extrato em acetato de etila de <i>Bacillus</i> sp. SDLI1 frente ao patógeno <i>C. albicans</i> ATCC MYA – 2876 e do controle positivo clotrimazol 100 µg/mL	69
Figura 37. Perfil químico em LC-MS das frações 22 e 23 do extrato em acetato de etila de <i>Bacillus</i> sp. SDLI1, ambas apresentando o íon de m/z 1071 $[\text{M}-\text{H}]^-$	70

Figure 38. HRESIMS do íon m/z 1073 $[M+H]^+$ obtido da fração 22 do extrato em acetato de etila de <i>Bacillus</i> sp. SDLI1, ativa frente ao patógeno <i>C. albicans</i> ATCC MYA – 2876.....	70
Figure 39. Perfil químico da fração eluída em 85% de metanol, obtida do extrato em acetato de etila de <i>Bacillus</i> sp. SDLI1	71
Figure 40. Perfil químico do fracionamento em HPLC semipreparativa da fração eluída em 85% de metanol, obtida do extrato em acetato de etila de <i>Bacillus</i> sp. SDLI1	71
Figure 41. Espectro de RMN de 1H (CD_3OD , 600 MHz) de bacillomicina D (B8) produzida por <i>Bacillus</i> sp. SDLI1	72
Figure 42. Deslocamentos químicos e correlações hidrogênio-carbono ($gHMBC$) e hidrogênio-hidrogênio ($gTOCSY$) dos aminoácidos e ácido graxo presente na bacillomicina D (B8) produzida por <i>Bacillus</i> sp. SDLI1	73
Figure 43. Enzimas e rota biossintética para produção de bacillomicina D (B8) presente no genoma de <i>Bacillus</i> sp. SDLI1	74
Figure 44. Ensaio de inibição de <i>Bacillus</i> sp. SDLI1 frente a micro-organismos isolados do favo de cria de <i>S. depilis</i> (esquerda) em comparação com o controle positivo clotrimazol 100 $\mu g/mL$ (direita), após 14 dias de cultivo a 30°C. A. Inibição de <i>Candida</i> sp. SDCP2. B. Inibição de <i>M. ruber</i> SDCP1. C. Inibição de <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1	75
Figure 45. Placas formadas pelo fago SDLI1-1 frente ao <i>Bacillus</i> sp. SDPI10..	78
Figure 46. Microscopia eletrônica do fago SDLI1-1	78
Figure 47. Cultivo de <i>M. ruber</i> SDCP1 em meio arroz por 30 dias a 30 °C. A. Controle meio arroz. B. Cultivo de <i>M. ruber</i> SDCP1. C. Perfil químico do extrato em acetato de etila do cultivo de <i>M. ruber</i> SDCP1. Condições: Coluna Gemini 5 μm , C_6 -Fenil 110Å, 250x4,6 mm, com gradiente composto por acetonitrila:água (iniciando com 10% de acetonitrila e atingindo 100% em 20 min, permanecendo 100% de acetonitrila até 30 min, em seguida retornando para 10% gradativamente durante 2 min e permanecendo em 10% de acetonitrila entre 32 min e 37 min) monitoramento a 365 nm.....	80
Figure 48. Perfil químico observado durante o isolamento de metabólitos do extrato em acetato de etila do cultivo de <i>M. ruber</i> SdFCP01 em meio arroz. Condições: Coluna Gemini 5 μm , C_6 -Fenil 110Å, 250x10 mm, gradiente metanol:água, iniciando com 80% de metanol, chegando a 90% de metanol em 10 min e 100% em 12 min, permanecendo em 100% até 15 min e retornando para 80% em 16 min, finalizando a corrida com 20 min, vazão 4 mL/min, 225 nm.....	80
Figure 49. A. Cromatograma e espectro de absorção no ultravioleta do metabólito M2 isolado do cultivo de <i>M. ruber</i> SDCP1 em meio arroz por 30 dias a 30 °C. B. Cromatograma e espectro de absorção no ultravioleta do metabólito M3 isolado do cultivo de <i>M. ruber</i> SDCP1 em meio arroz por 30 dias a 30 °C. Condições: Coluna Gemini 5 μm , C_6 -Fenil 110Å, 250x4,6 mm, com gradiente composto por acetonitrila:água (iniciando com 10% de acetonitrila e atingindo 100% em 20 min, permanecendo 100% de acetonitrila até 30 min, em seguida retornando para 10% gradativamente durante 2 min e permanecendo em 10% de acetonitrila entre 32 min e 37 min).....	81
Figure 50. Estruturas químicas de monascinol (M2) e monascina (M3)	81
Figure 51. Espectros de RMN de 1H ($CDCl_3$, 500 MHz) de metabólitos isolados do extrato em acetato de etila do cultivo em arroz de <i>M. ruber</i> SDCP1. A. Monascinol M2 . B. Monascina M3	82

- Figura 52.** Coculturas desenvolvidas entre *Candida* sp. SDCP2 (C), *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 (Z) e *Monascus ruber* SDCP1 (M), por sete dias, a 30 °C, em três diferentes meios de cultura (Item 3.12.1). Cada meio de cultura foi ajustado para pH 4,5 ou 6,0. A. Cultivos em meio GFAA4,5. B. Cultivos em meio GFAA6. C. Cultivos em meio GF4,5. D. Cultivos em meio GF6. E. Cultivos em meio 30G4,5. F. Cultivos em meio 30G6..... 85
- Figura 53.** Cultivos em meio 30G, pH 6,0 por cinco dias a 30 °C. À esquerda monocultivo de *M. ruber* SDCP1 e à direita cocultura entre *M. ruber* SDCP1 e *Candida* sp. SDCP2 86
- Figura 54.** Análises em LC-MS, operando no modo positivo de análise. A. Padrão de monascinol (**M2**), 1 mg/mL. B. Padrão de monascina (**M3**), 1 mg/mL. C. Monocultura de *M. ruber* SDCP1 no meio GFAA, pH 4,5. D. Cocultura de *M. ruber* SDCP1 e *Candida* sp. SDCP2 em meio GFAA, pH 4,5. Coluna cromatográfica Luna 5 mm C₁₈, 100 x 4,6 mm (Phenomenex). O gradiente de solventes utilizado foi composto por acetonitrila:água acrescidos com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 0,7 mL/min (iniciando com 10% de acetonitrila, mantendo essa porcentagem por 1 min, alcançando 100% de acetonitrila em 18 min, e mantendo essa porcentagem até 23 min), o volume de injeção foi 10 µL 87
- Figura 55.** Análises em LC-MS, operando no modo positivo de análise. A. Monocultura de *M. ruber* SDCP1 no meio 30G, pH 6,0. B. Padrão de lovastatina (**M6**) (Sigma-Aldrich) na concentração de 500 µg/mL. Coluna cromatográfica Luna 5 mm C₁₈, 100 x 4,6 mm (Phenomenex). O gradiente de solventes utilizado foi composto por acetonitrila:água acrescidos com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 0,7 mL/min (iniciando com 10% de acetonitrila, mantendo essa porcentagem por 1 min, alcançando 100% de acetonitrila em 18 min, e mantendo essa porcentagem até 23 min), o volume de injeção foi 10 µL 88
- Figura 56.** Análises de espectrometria de massas em alta resolução do extrato bruto de *M. ruber* SDCP1 em meio 30G, pH 6,0, extraído com acetate de etila. É possível visualizar o íon correspondente à lovastatina protonada, *m/z* 405,2640, bem como o aduto com amônia *m/z* 422,2904 e a lovastatina sodiada *m/z* 427,2458. A estrutura da lovastatina (**M6**) pode ser visualizada à direita..... 88
- Figura 57.** Estruturas químicas do hormônio juvenil III (**19**) e de 20-hidroxiecdisona (**20**) 89
- Figura 58.** Coculturas entre *M. ruber* SDCP1 (M) e *Bacillus* sp. SDLI1 (B) utilizando ou não membranas semipermeáveis em meio PDB, ISP-2 e 30G6 líquido, após sete dias de cultivo a 30 °C 90
- Figura 59.** Análises em HPLC-DAD-MS (modo positivo) de culturas de *M. ruber* SDCP1 e *Bacillus* sp. SDLI1 em meio PDB. A. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon do monascinol (**M2**) *m/z* 361. B. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon da monascina (**M3**) *m/z* 359. C. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon da bacillomicina D (**B8**) *m/z* 1073. D. Cocultura com membrana, buscando pelo íon do monascinol (**M2**) *m/z* 361. E. Cocultura com membrana, buscando pelo íon da monascina (**M3**) *m/z* 359. F. Cocultura com membrana, buscando pelo íon da bacillomicina D (**B8**) *m/z* 1073. G. Monocultura de *M. ruber* SDCP1, buscando pelo íon do monascinol (**M2**) *m/z* 361. H. Monocultura de *M. ruber* SDCP1, buscando pelo íon da monascina

(**M3**) m/z 359. I. Monocultura de *Bacillus* sp. SDLI1, buscando pelo íon da bacillomicina D (**B8**) m/z 1073. Coluna cromatográfica Luna 5 mm C₁₈, 100 x 4,6 mm (Phenomenex). O gradiente de solventes utilizado foi composto por acetonitrila:água acrescidos com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 0,7 mL/min (iniciando com 10% de acetonitrila, mantendo essa porcentagem por 1 min, alcançando 100% de acetonitrila em 18 min, e mantendo essa porcentagem até 23 min), o volume de injeção foi 10 µL..... 91

Figure 60. Análises em LC-DAD-MS (modo positivo) de culturas de *M. ruber* SDCP1 e *Bacillus* sp. SDLI1 em meio ISP-2. A. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon do monascinol (**M2**) m/z 361. B. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon da monascina (**M3**) m/z 359. C. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon da bacillomicina D (**B8**) m/z 1073. D. Cocultura com membrana, buscando pelo íon do monascinol (**M2**) m/z 361. E. Cocultura com membrana, buscando pelo íon da monascina (**M3**) m/z 359. F. Cocultura com membrana, buscando pelo íon da bacillomicina D (**B8**) m/z 1073. G. Monocultura de *M. ruber* SDCP1, buscando pelo íon do monascinol (**M2**) m/z 361. H. Monocultura de *M. ruber* SDCP1, buscando pelo íon da monascina (**M3**) m/z 359. I. Monocultura de *Bacillus* sp. SDLI1, buscando pelo íon da bacillomicina D (**B8**) m/z 1073. Coluna cromatográfica Luna 5 mm C₁₈, 100 x 4,6 mm (Phenomenex). O gradiente de solventes utilizado foi composto por acetonitrila:água acrescidos com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 0,7 mL/min (iniciando com 10% de acetonitrila, mantendo essa porcentagem por 1 min, alcançando 100% de acetonitrila em 18 min, e mantendo essa porcentagem até 23 min), o volume de injeção foi 10 µL. Observação: alguns sinais foram desconsiderados pela comparação do tempo de retenção do metabólito de interesse..... 92

Figure 61. Análises em LC-DAD-MS (modo positivo) de culturas de *M. ruber* SDCP1 e *Bacillus* sp. SDLI1 em meio 30G6. A. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon do monascinol (**M2**) m/z 361. B. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon da monascina (**M3**) m/z 359. C. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon da bacillomicina D (**B8**) m/z 1073. D. Cocultura com membrana, buscando pelo íon do monascinol (**M2**) m/z 361. E. Cocultura com membrana, buscando pelo íon da monascina (**M3**) m/z 359. F. Cocultura com membrana, buscando pelo íon da bacillomicina D (**B8**) m/z 1073. G. Monocultura de *M. ruber* SDCP1, buscando pelo íon do monascinol (**M2**) m/z 361. H. Monocultura de *M. ruber* SDCP1, buscando pelo íon da monascina (**M3**) m/z 359. I. Monocultura de *Bacillus* sp. SDLI1, buscando pelo íon da bacillomicina D (**B8**) m/z 1073. Coluna cromatográfica Luna 5 mm C₁₈, 100 x 4,6 mm (Phenomenex). O gradiente de solventes utilizado foi composto por acetonitrila:água acrescidos com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 0,7 mL/min (iniciando com 10% de acetonitrila, mantendo essa porcentagem por 1 min, alcançando 100% de acetonitrila em 18 min, e mantendo essa porcentagem até 23 min), o volume de injeção foi 10 µL..... 93

Figure 62. Análises em LC-DAD-MS (modo positivo) de culturas de *M. ruber* SDCP1 e *Bacillus* sp. SDLI1 em meio 30G6. A. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon da lovastatina (**M6**) m/z 405. B. Cocultura com membrana, buscando pelo íon da lovastatina (**M6**) m/z 405. C. Monocultura de *M. ruber* SDCP1, buscando pelo íon da lovastatina (**M6**) m/z 405..... 94

Figure 63. Análises em LC-MS (modo positivo) de culturas de *M. ruber* SDCP1 e *Candida* sp. SDCP2 em meio PDB. A. Cocultura, buscando pelo íon

- da monascina (**M3**) m/z 359,1853 $[M+H]^+$. B. Cocultura, buscando pelo íon de monascinol (**M2**) m/z 361,2010 $[M+H]^+$. C. Cultura simples de *M. ruber* SDCP1, buscando pelo íon da monascina (**M3**) m/z 359,1853 $[M+H]^+$. D. Cultura simples de *M. ruber* SDCP1, buscando pelo íon de monascinol (**M2**) m/z 361,2010 $[M+H]^+$. Coluna analítica Luna C₁₈ 5 mm, 100 x 4,6 mm (Phenomenex). O gradiente consistiu em misturas de acetonitrila e água com fluxo de 0,7 mL/min (iniciando-se com 10% de acetonitrila de forma isocrática por 1 min, e alcançando 100% de acetonitrila em 18 min, e permanecendo essa porcentagem até 23 min), volume de injeção 4 μ L. Observação: alguns sinais foram desconsiderados pela comparação do tempo de retenção do metabólito de interesse 95
- Figura 64.** Culturas em meio PDB, 30 °C, 120 rpm após 72 h. A. Monocultura de *Candida* sp. SDCP2. B. Células de *Candida* sp. SDCP2 em cocultura com *M. ruber* SDCP1. Escala 10 μ m 96
- Figura 65.** Cultivos de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em meio 30G6 ágar, 30 °C, após sete dias. A. Cultivo de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 com 20 e 10 μ L de sobrenadante de um cultivo de sete dias de *Candida* sp. SDCP2. B. Cultivo de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 controle..... 97
- Figura 66.** Cultivos de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em meio 30G6 ágar, 30 °C, após três dias. A. Placa de Petri contendo uma cultura de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 após contato com VOCs produzidos por *Candida* sp. SDCP2 (10 dias). B. Placa de Petri contendo uma cultura de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 após contato com VOCs produzidos por *Candida* sp. SDCP2 após sete dias de cultivo. C) Placa de Petri contendo uma cultura de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 após contato com VOCs do meio de cultura 30G6 líquido 97
- Figura 67.** Cultivos de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em meio 30G6 ágar, 30 °C, após cinco dias. A. Placa de Petri contendo cultivo de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em contato com voláteis de uma placa contendo ágar 30G6. B. Placa de Petri contendo cultivo de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em contato com voláteis produzidos por uma cultura de *Candida* sp. SDCP2 98
- Figura 68.** A. Análise por GC-MS do sobrenadante de uma cultura de 10 dias de *Candida* sp. SDCP2 em meio 30G6 líquido, *split* 200, *headspace* 80 °C por 10 min. B. Análise por GC-MS do meio 30G6 líquido, *split* 200, *headspace* 80 °C por 10 min. C. Análise por GC-MS do sobrenadante de uma cultura de 10 dias de *Candida* sp. SDCP2 em meio 30G6 líquido, *split* 5, *headspace* 80 °C por 45 min. D. Análise por GC-MS do meio 30G6 líquido, *split* 5, *headspace* 80 °C for 45 min. E. Identificação de etanol (2.10 min) (**C1**) como VOC majoritário utilizando o banco de dados *NIST MS Search 2.0*. F. Identificação de álcool isoamílico (10.86 min) (**C2**) como segundo VOC mais presente no sobrenadante de de *Candida* sp. SDCP2, segundo *NIST MS Search 2.0* 99
- Figura 69.** Cultivos de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em meio 30G6 ágar, 30 °C, após sete dias. A. Placa de Petri contendo cultivo de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em contato com 10 μ L de etanol (**C1**) (1:1000). B. Placa de Petri contendo cultivo de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em contato com 10 μ L de álcool isoamílico (**C2**) (1:10000). C. Placa de Petri contendo cultivo de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em contato com 10 μ L de sobrenadante de *Candida* sp. SDCP2 (10 dias). D.

Placa de Petri contendo cultivo de <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1 em contato com 10 µL de meio 30G6 líquido.....	100
Figura 70. A. Análise por GC-MS do favo de cria de <i>S. depilis</i> macerado, <i>split</i> 5, <i>headspace</i> 80 °C por 45 min. B. Identificação de etanol (C1) (2.21 min) como VOC majoritário utilizando o banco de dados <i>NIST 11</i> . C. Identificação de álcool isoamílico (C2) (11.20 min), segundo <i>NIST 11</i>	101
Figura 71. Análise por GC-MS do favo de cria de <i>S. depilis</i> macerado, <i>split</i> 5, <i>headspace</i> 80 °C por 45 min. A. Identificação de acetato de etila (21) (6.01 min) utilizando o banco de dados <i>NIST 11</i> . B. Identificação de ácido acético (22) (9.09 min), segundo <i>NIST 11</i>	102
Figura 72. Células de <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1 após 4 dias de cultivo em 200 µL de meio 30G líquido, pH 4,5, sem agitação, 30 °C, inóculo final OD ₆₀₀ 0,1, em placas de 96 poços	103
Figura 73. Células de <i>Zygosaccharomyces</i> sp. crescendo no interior do favo de cria de <i>S. depilis</i>	103
Figura 74. Células de <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1 observadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 2000), objetiva de 60x, após reação com reagente branco de calcoflúor. Células retiradas de uma cultura em meio 15GF líquido, pH 4,5, condição estática, inóculo inicial com OD ₆₀₀ 0,1, cultivo a 30 °C por 10 dias. A. Células observadas sem fluorescência. B. Células observadas com fluorescência	104
Figura 75. A. Formação de película flotante por <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1, em uma cultura de sete dias (5 mL, meio 15GF líquido, pH 4,5, sem agitação, 30 °C, inóculo inicial OD ₆₀₀ 0,1, em placa de seis poços). B. Invasão do ágar por uma colônia de <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1, 10 dias de cultivo em meio ágar 15GF, pH 4,5, 30 °C	104
Figura 76. Ascos de <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1 contendo um ou dois ascósporos. Para estímulo da esporulação utilizou-se meio líquido contendo 30% de glicose 0,5% de extrato de levedura, condição estática, inóculo inicial com OD ₆₀₀ 0,1, cultivo a 30 °C por sete dias	105
Figura 77. Células de <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1 contendo organelas citoplasmáticas observadas em microscópio óptico. Células retiradas de uma cultura em meio 15GF líquido, pH 4,5, condição estática, inóculo inicial com OD ₆₀₀ 0,1, cultivo a 30 °C por 10 dias	105
Figura 78. Células de <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1 observadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 2000), objetiva de 100x, após reação com reagente complexo de filipinas produzido por <i>Streptomyces filipinensis</i> . Células retiradas de uma cultura em meio 15GF líquido, pH 4,5, condição estática, inóculo inicial com OD ₆₀₀ 0,1, cultivo a 30 °C por 10 dias. A. Células observadas sem fluorescência. B. Células observadas com fluorescência	106
Figura 79. Células de <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1 observadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 2000), objetiva de 60x, após reação com reagente vermelho do Nilo. Células retiradas de uma cultura em meio 15GF líquido, pH 4,5, condição estática, inóculo inicial com OD ₆₀₀ 0,1, cultivo a 30 °C por 10 dias. A. Células observadas sem fluorescência. B. Células observadas com fluorescência	106
Figura 80. Células de <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1 observadas em microscópio de fluorescência (Leica SP5), objetiva de 60x, após reação com reagente vermelho do Nilo. A. Células retiradas de uma cultura em meio	

15GF líquido, pH 4,5, condição estática, inóculo inicial com OD ₆₀₀ 0,1, cultivo a 30 °C por sete dias. B. Células de <i>Zygosaccharomyces</i> sp. retiradas diretamente do favo de cria de <i>S. depilis</i>	107
Figura 81. Formação de biofilme por <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1, após sete dias de cultivo em placas de seis poços (5 mL, meio 15GF4,5 líquido, sem agitação, 30 °C, inóculo inicial de OD ₆₀₀ 0,1). A. Controle. B. Cultivo com lovastatina (M6) 50 µg/mL	108
Figura 82. LDs produzidos por <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1 observados em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 2000), objetiva de 60x, após reação com reagente vermelho do Nilo. A. LDs observados sem fluorescência. B. LDs observados com fluorescência	108
Figura 83. Estrutura química de fosfatidiletanolamina (PE) (16:0/16:0) (23)	109
Figura 84. A. Análise por GC-MS de componentes de membrana do fungo <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1. B. Identificação de ergosterol (Z1) (30.58 min) como esteroide majoritário utilizando o banco de dados <i>NIST 11</i> ...	110
Figura 85. Biossíntese de ergosterol (Z1) a partir de HMG-CoA (adaptado de DEWICK, 2009).....	111
Figura 86. Esquema do ciclo de vida da abelha sem ferrão <i>S. depilis</i>	112
Figura 87. Diferentes estágios de desenvolvimento larval durante o experimento de criação <i>in vitro</i> . A. Ovo com 1-2 dias. B. Ovo com 3-4 dias. C. Larva com 1 dia. D. Larva com 3-4 dias (Crescimento de <i>Zygosaccharomyces</i> sp. pode ser observado). E. Larva com 6-10 dias. F. Pré-pupa com 15-18 dias. G. Pupa com 20-25 dias. H. Pupa com 30-34 dias. I. Abelha emergindo com 35-40 dias	113
Figura 88. Gráfico da porcentagem de larvas de <i>S. depilis</i> que completaram metamorfose após consumo de <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1, fungo coletado diretamente do favo de cria, ou que não receberam inoculação microbiana (controle).....	114
Figura 89. Gráfico da porcentagem de larvas de <i>S. depilis</i> que completaram metamorfose após consumo de colesterol 10 µg/mL, ergosterol 100 µg/mL ou que não consumiram esteroides (controle)	115
Figura 90. Via metabólica para produção de 20-hidroxicadisona (20E) a partir de colesterol (Adaptado de HUANG et al., 2008)	116
Figura 91. Comparação das estruturas químicas de ergosterol (Z1), colesterol (24) e 20-hidroxicadisona (20E).....	116
Figura 92. Gráfico da porcentagem de larvas de <i>S. depilis</i> que sobreviveram após inoculação de <i>P. larvae</i> , <i>Bacillus</i> sp. SDL11 e <i>P. larvae</i> , ou que não receberam inoculação microbiana (controle)	118
Figura 93. Gráfico da porcentagem de larvas de <i>S. depilis</i> que completaram metamorfose após inoculação de <i>B. bassiana</i> , <i>Bacillus</i> sp. SDL11 e <i>B. bassiana</i> , ou que não receberam inoculação microbiana (controle).....	118
Figura 94. Gráfico da porcentagem de larvas de <i>S. depilis</i> que completaram metamorfose após inoculação de <i>M. anisopliae</i> , <i>Bacillus</i> sp. SDL11 e <i>M. anisopliae</i> , ou que não receberam inoculação microbiana (controle).....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Halos inibitórios (mm) frente a entomopatógenos de acordo com o tempo de análise	50
Tabela 2. Fórmulas e massas moleculares de surfactinas (B1-B7) isoladas de <i>Bacillus</i> sp. SDLI1	65
Tabela 3. Halos inibitórios (mm) das frações 22 e 23 do extrato em acetato de etila de <i>Bacillus</i> sp. SDLI1 frente ao patógeno <i>C. albicans</i> ATCC MYA - 2876..	70
Tabela 4. Resultado da análise do genoma de <i>Bacillus</i> sp. SDLI1 pelo software PHAST	76
Tabela 5. Fórmulas moleculares, <i>m/z</i> acurada e calculada, com seus respectivos erros em ppm do metabólito M2 , monascinol, e metabólito M3 , monascina	83
Tabela 6. Dados de RMN de ¹ H do metabólito M2 , monascinol, e metabólito M3 , monascina, com respectivas comparações com a literatura.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

15GF	Meio de cultura com 15% de glicose e 15% de frutose
30G6	Meio de cultivo com 30% de glicose
antiSMASH	<i>Antibiotics & Secondary Metabolites Analysis Shell</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas ou <i>Gas-chromatography</i>
cm	Centímetro
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAD	Detector de arranjo de fotodiodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico ou <i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESALQ	Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
eV	Elétrons-volt
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCFRP	Faculdade de Ciências de Ribeirão Preto
FFCLRP	Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
<i>g</i> HMBC	<i>Gradient-Enhanced Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
<i>g</i> HSQC	<i>Gradient-Enhanced Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<i>g</i> TOCSY	<i>Gradient-Enhanced Selective Correlation Spectroscopy</i>
h	Hora
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanesulfônico
HMS	<i>Harvard Medical School</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência ou <i>high performance liquid chromatography</i>
Hz	Hertz
ICBG	<i>International Cooperative Biodiversity Group</i>
ISP-2	Meio de cultura <i>International Streptomyces Project</i> -ISP número 2

<i>J</i>	Constante de acoplamento (em Hz)
Kb	Quilobase
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LDs	Adipossomos, gotas lipídicas citoplasmáticas ou <i>lipid droplets</i>
LMMC	Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal
LQMo	Laboratório de Química de Micro-organismos
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MFC	Concentração fungicida mínima ou <i>minimal fungicide concentration</i>
MIC	Concentração inibitória mínima ou <i>minimal inhibitory concentration</i>
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Na-TFA	Ácido trifluoroacético sodiado
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NOEdiff	<i>Nuclear Overhauser Experiment difference spectrum</i>
NPPNS	Núcleo de Apoio à Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos
NRPS	Peptídeo sintase não ribossomal ou <i>Nonribosomal Peptide Synthetase</i>
OD ₆₀₀	Densidade óptica a 600 nm
PacBio	<i>Pacific Biosciences</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ou <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	Meio de cultura batata, dextrose e ágar ou <i>potato, dextrose and agar</i>
PDB	Meio de cultura batata, dextrose líquido ou <i>potato, dextrose broth</i>
PEG	Polietilenoglicol
PES	Polietersulfona
PHAST	<i>Phage Search Tool</i>
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
ppm	Partes por milhão

PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RAST	<i>Rapid Annotation using Subsystem Technology</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SMRT	<i>Single-molecule Real-time</i>
SPE	Extração em fase sólida ou <i>solid phase extraction</i>
u	Unidade de massa atômica
UFC	Unidades formadoras de colônia
uHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência ou <i>ultra-high performance liquid chromatography</i>
USP	Universidade de São Paulo
VOCs	Compostos orgânicos voláteis ou <i>volatile organic compounds</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar

LISTA DE SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico em ppm
®	Marca Registrada
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	xi
Lista de abreviaturas e siglas	xii
Lista de símbolos	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A espécie de meliponíneo <i>Scaptotrigona depilis</i>	2
1.2 Ecologia química envolvida na relação entre micro-organismos e insetos...	7
1.3 Estratégias na descoberta de novos agentes antimicrobianos	10
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Coleta do material para isolamento microbiano	17
3.2 Isolamento dos micro-organismos associados ao inseto e à colônia	17
3.3 Manutenção dos micro-organismos isolados	19
3.4 Patógenos selecionados para ensaios antimicrobianos	19
3.5 Ensaio de inibição em placa de Petri para seleção de micro-organismos promissores	19
3.6 Extração de DNA e identificação microbiana	21
3.7 Sequenciamento do genoma de <i>Bacillus</i> sp. SDLI1	23
3.8 Produção de fagos pelo <i>Bacillus</i> sp. SDLI1	24
3.9 Isolamento de metabólitos de <i>Bacillus</i> sp. SDLI1	26
3.9.1 Cultivo em escala ampliada 1	26
3.9.2 Cultivo em escala ampliada 2	27
3.10 Isolamento e identificação de metabólitos produzidos por <i>M. ruber</i> SDCP1	28
3.11 Determinação estrutural de metabólitos isolados	29
3.12 Coculturas	30
3.12.1 Culturas mistas em placas de seis poços	30
3.12.2 Coculturas utilizando placas de 24 poços e membranas semipermeáveis	32
3.12.3 Coculturas entre <i>Monascus ruber</i> SDCP1 e <i>Candida</i> sp. SDCP2	33
3.13 Avaliação quantitativa da atividade antifúngica de frações e metabólitos isolados	34
3.13.1 Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração fugicida mínima (MFC) de monascinol (M2) e monascina (M3), produzidos por <i>M. ruber</i> SDCP1	34
3.13.1.1 Micro-organismos	34
3.13.1.2 Reativação dos micro-organismos	34
3.13.1.3 Preparação dos inóculos	34
3.13.1.4 Controles positivos	34
3.13.1.5 Preparação das amostras	35

3.13.1.6 Determinação da concentração fungicida mínima (MFC)	35
3.13.2 Concentração inibitória mínima (MIC) de fração contendo surfactinas (B1-B7) de <i>Bacillus</i> sp. SDLI1	35
3.14 Morfologia celular de <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1 utilizando microscópio de fluorescência	36
3.15 Compostos voláteis produzidos por <i>Candida</i> sp. SDCP2	37
3.16 Análises de VOCs utilizando <i>headspace</i>	38
3.17 Cultivos de <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1 com lovastatina (M6)....	39
3.18 Análise do conteúdo de LDs produzidos por <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1	40
3.19 Extração e análise de esteroides de membrana de <i>Zygosaccharomyces</i> sp.	41
3.20 Análises em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)	41
3.21 Cultivos <i>in vitro</i> de larvas de <i>S. depilis</i>	42
3.21.1 Cultivos com <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1 e <i>Zygosaccharomyces</i> sp. coletado diretamente das células de cria de <i>S. depilis</i>	42
3.21.2 Cultivos com ergosterol e colesterol	43
3.21.3 Cultivos com os entomopatógenos <i>P. larvae</i> , <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i>	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Isolamento microbiano	46
4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana em placa de Petri	48
4.3 Identificação dos micro-organismos isolados	51
4.3.1 Micro-organismos identificados devido ao potencial antimicrobiano	51
4.3.2 Micro-organismos identificados devido o local de isolamento	55
4.4 Sequenciamento do genoma de <i>Bacillus</i> sp. SDLI1	59
4.5 Isolamento de metabólitos de <i>Bacillus</i> sp. SDLI1	62
4.5.1 Cultivo em escala ampliada 1: Uso de resina Sephadex	63
4.5.2 Cultivo em escala ampliada 2: Isolamento guiado pela atividade	69
4.6 Produção de bacteriófago por <i>Bacillus</i> sp. SDLI1	76
4.7 Policetídeos produzidos por <i>M. ruber</i> SDCP1	79
4.8 Coculturas	84
4.8.1 Coculturas em placas de seis poços	84
4.8.2 Coculturas utilizando placas de 24 poços e membranas semipermeáveis	89
4.8.3 Coculturas entre <i>Monascus ruber</i> SDCP1 e <i>Candida</i> sp. SDCP2	95
4.9 Compostos voláteis produzidos por <i>Candida</i> sp. SDCP2	96
4.10 Aspectos biológicos, ecológicos e químicos de <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1	102
4.11 Cultivos <i>in vitro</i> de larvas de <i>S. depilis</i>	111
4.11.1 Cultivos com <i>Zygosaccharomyces</i> sp. SDBC30G1 e <i>Zygosaccharomyces</i> sp. coletado diretamente das células de cria de <i>S. depilis</i>	112
4.11.2 Cultivos com ergosterol e colesterol	114
4.11.3 Cultivos com os entomopatógenos <i>P. larvae</i> , <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i>	117
5. CONCLUSÕES	121

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
ANEXOS	140

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 A espécie de meliponíneo *Scaptotrigona depilis*

Abelhas são importantes polinizadores de plantas nativas e cultivadas no mundo todo. Estima-se que aproximadamente 35% de alimentos de origem vegetal consumidos pelo homem são produzidos exclusivamente através da polinização feita por animais, principalmente por abelhas (KLEIN et al., 2007). Nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, especialmente na América do Sul e América Central, estão distribuídas mais de 300 espécies de abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), conhecidas dessa forma por apresentarem ferrão atrofiado ou vestigial, ou seja, não funcional (NOGUEIRA-NETO, 1997, KERR et al., 1996). Em território brasileiro já foram registradas 244 espécies de abelhas sem ferrão, pertencentes a 29 gêneros. Destas, 20% são endêmicas de regiões específicas do Brasil. Outras 89 espécies estão em processo de descrição (PEDRO, 2014).

As abelhas sem ferrão (Meliponini), que podem também ser conhecidas como nativas, indígenas ou meliponíneos, são altamente sociais (MICHENER, 2000). A eussocialidade caracteriza-se pela divisão de castas, cuidados com a cria e sobreposição de gerações dentro das colônias. Nas colônias de meliponíneos existe uma única rainha (fêmea fecundada), que apresenta ovários bem desenvolvidos e caracteriza-se pelo abdômen distendido, e é responsável pela postura de ovos (Figura 1). As fêmeas da colônia (rainha e operárias) são diploides, originando-se de ovos fecundados, enquanto os machos (zangões) normalmente nascem de ovos não fecundados e são haploides (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Figura 1. Exemplar de rainha de *Scaptotrigona depilis*.

Dentre esses polinizadores, encontra-se a espécie de meliponíneo *Scaptotrigona depilis* (Figura 2), que ocorre naturalmente em estados brasileiros como: Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo (SILVEIRA et al., 2002). Por desenvolver uma estrutura longa e circular na entrada do ninho, essa abelha sem ferrão tem o nome popular de “canudo”.

Figura 2. Exemplos de *Scaptotrigona depilis* na entrada do ninho.

Para formação de uma nova rainha, espécies de meliponíneos como *S. depilis*, que pertencem à tribo Trigonini, constroem células reais (Figura 3). Nesses casos, a célula de cria destinada à produção de uma nova rainha é diferenciada das demais, sendo maior e recebendo maior quantidade de alimento larval (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Figura 3. Célula real de *Scaptotrigona depilis* (~5,3 mm) comparada com célula de cria para desenvolvimento de operárias ou zangões (~3,0 mm).

Os meliponíneos apresentam morfologia, biologia e estilos vida muito variados. Com exceção de três espécies carnívoras (*Trigona hypogea*, *T. crassipes* e *T. necrophaga*), todos os demais meliponíneos utilizam pólen como fonte proteica. O pólen é transportado em estruturas especializadas presentes nas pernas traseiras, conhecidas como corbícula (Figura 4) (NOGUEIRA-NETO, 1997). Como fonte de carboidratos, elas coletam néctar de diferentes fontes florais, e levam para as colônias. Os materiais coletados são armazenados em potes de alimento e fermentados por micro-organismos para produção de pólen e mel, que são utilizados para alimentação da cria e das abelhas adultas (MENEZES et al., 2013).

Figura 4. Abelha forrageira coletando pólen de uma fonte floral e armazenando o alimento em sua corbícula.

As abelhas apresentam mecanismos para manutenção da temperatura e umidade no interior das colônias, o que é essencial para desenvolvimento da cria, fermentação do pólen e do mel e manutenção da saúde da colônia. Em dias frios, a liberação de calor devido ao metabolismo mais acelerado das abelhas ajuda a aquecer os ninhos. Em dias quentes, as abelhas levam mais água para dentro da colônia e fazem fluxos de ar através da vibração de suas asas para diminuição da temperatura. No caso das colônias de *S. depilis*, a temperatura interna próxima às células de cria é mantida na média de 30,53 °C ($\pm 3,1$) (VOLLET-NETO, 2010). Além disso, muitos meliponíneos constroem invólucros de cerume ao redor das células de cria para manter a temperatura dessa região mais controlada (Figura 5).

Figura 5. Estrutura do interior da colônia de espécie *Scaptotrigona depilis*. Pode-se notar os favos de cria, invólucro (lamelas) de cerume que circunda os favos de cria e potes de mel e pólen.

As abelhas forrageiras de meliponíneos coletam material resinoso de plantas (própolis), que juntamente com secreções glandulares e cera, produzem o cerume. Esse material apresenta coloração que pode variar do amarelo até marrom escuro, e é utilizado para construção de diversas estruturas no interior do ninho, como favos de cria e potes de pólen e mel (Figura 6). No entanto, algumas espécies também coletam barro e até excrementos de animais para construir diferentes estruturas de suas colônias (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Figura 6. Estruturas construídas por abelhas sem ferrão da espécie *Scaptotrigona depilis* utilizando cerume. A. Células de cria. B. Potes de alimento.

Não existem trabalhos voltados para o entendimento da ecologia-química envolvendo micro-organismos e a abelha *S. depilis*. Recentemente, Menezes e

colaboradores (2015) descreveram um fenômeno até então desconhecido para a família Apidae, que é o consumo de um fungo essencial para a sobrevivência da cria de *S. depilis*. O fungo, identificado como *Monascus* sp., é consumido no estágio larval e cresce visualmente nas células de cria após a eclosão dos ovos (Figura 7). No entanto, a função desse micro-organismo para as larvas de *S. depilis* permaneceu obscura, apesar dos autores sugerirem que o fungo participasse da defesa das larvas contra patógenos. A presença e papel de outros micro-organismos potencialmente simbiotes de *S. depilis* também continuou inexplorada.

Figura 7. Células de cria abertas para visualização do fungo-alimento das larvas de *Scaptotrigona depilis*.

Com o alarmante declínio da população mundial de abelhas, torna-se evidente a necessidade de estudos envolvendo esses polinizadores e iniciativas para combate de fatores causadores desse fenômeno (POTTS et al., 2016; DICKS et al., 2016). As abelhas sem ferrão sofrem com desmatamento, com a intensificação da agricultura e uso indiscriminado de agrotóxicos, além da presença de abelhas exóticas, como *Apis mellifera*, em regiões tropicais e subtropicais do planeta (NUNES-SILVA et al., 2016). Ainda não existem micro-organismos reconhecidamente patogênicos para abelhas sem ferrão, principalmente devido à falta de trabalhos envolvendo essas abelhas. Em contrapartida, alguns micro-organismos parasitas já foram bem descritos para outras espécies de abelhas, principalmente da espécie *Apis mellifera*, devido ao interesse econômico. Dentre as espécies entomopatogênicas para *A. mellifera* estão fungos *Nosema* spp. e a bactéria *Paenibacillus larvae* (vanENGELSDORP e MEIXNER, 2010). A busca por Nosematidae (Microsporidia: Apansporoblastina) em colônias de abelhas sem ferrão

no Brasil mostrou que esses patógenos não estavam presentes (NUNES-SILVA et al., 2016). Isso indica que meliponíneos podem ter desenvolvido mecanismos de defesa contra esses patógenos e essas formas de defesa podem ser estudadas e empregadas na proteção de abelhas suscetíveis.

Muitas pesquisas precisam ser realizadas para o entendimento de interações entre micro-organismos e abelhas. Micro-organismos entomopatogênicos já descritos para outros insetos podem ser utilizados em ensaios para verificação da capacidade de produção de antimicrobianos por linhagens microbianas isoladas de *S. depilis*. Estudar quimicamente os micro-organismos associados à abelha *S. depilis* e sua colônia, e avaliar a capacidade inibitória desses isolados frente a entomopatógenos, pode facilitar o entendimento da manutenção da saúde da colônia e a obtenção de moléculas com atividade antimicrobiana.

1.2 Ecologia química envolvida na relação entre micro-organismos e insetos

Pouco se conhece sobre a química de micro-organismos associados a insetos. São escassos os grupos de pesquisa que vêm trabalhando para o esclarecimento das interações químicas envolvidas nas relações ecológicas mantidas por esses seres vivos, porém os resultados já obtidos são animadores e estimulantes (POULSEN et al., 2011; KROISS, et al., 2010; SCOTT et al., 2008). A aprovação do primeiro ICBG (*International Cooperative Biodiversity Group*), que estabelece colaboração entre pesquisadores brasileiros e americanos para a pesquisa de interações entre insetos e micro-organismos, demonstra a importância do entendimento ecológico e químico desses sistemas (PUPO et al., 2016).

Vários trabalhos destacam a diversidade química produzida por micro-organismos simbiotes de insetos e indícios coevolutivos importantes. Em um estudo com vespas da espécie *Philanthus triangulum*, foi verificado que as fêmeas dessa espécie mantêm uma relação de mutualismo com uma actinobactéria do gênero *Streptomyces*. Essa actinobactéria permanece em uma glândula antenal das vespas e produz os antibióticos estreptoclorina e oito derivados da piericidina (Figura 8), que protegem os casulos de *P. triangulum* contra patógenos durante o período de incubação (KROISS et al., 2010; KALTENPOTH et al., 2005).

Figura 8. Estrutura química da estreptoclorina (**1**) e estrutura química dos derivados da piericidina (**2-9**) (adaptado de KROISS et al., 2010).

Estudando micro-organismos associados ao besouro *Dendroctonus frontalis*, Scott e colaboradores (2008) verificaram que algumas linhagens de actinobactérias produzem um antifúngico capaz de proteger o fungo *Entomocorticium* sp., que é simbionte desse inseto, contra o fungo *Ophiostoma minus*, que pode prejudicar a relação mutualística. Tal estrutura responsável pela atividade antimicrobiana é um peróxido de polieno, não descrito anteriormente, que foi denominado micangimicina (**10**) (Figura 9).

Figura 9. Estrutura química da micangimicina (**10**) (adaptado de SCOTT et al., 2008 e OH et al., 2009).

De amostras do jardim do fungo-alimento *Leucoagaricus gongylophorus*, associado à espécie de formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*, foram isoladas bactérias do gênero *Burkholderia*. Essas bactérias mostraram-se eficazes na proteção do fungo *L. gongylophorus*, uma vez que apresentaram potente atividade antifúngica contra germinação de conídeos do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* e de outros fungos que ameaçam a saúde da colônia, como o fungo

Escovopsis weberi. A atividade antifúngica foi seletiva contra os fungos patogênicos, pois não houve prejuízo ao simbionte *L. gongylophorus* (SANTOS et al., 2004).

No trabalho de Cafaro e Currie (2005), também envolvendo micro-organismos isolados de formigas, esses autores verificaram que existe um cenário complexo de mutualismo e parasitismo entre esses seres vivos. Nesse estudo foram isoladas 126 linhagens de actinobactérias envolvidas com os jardins do fungo-alimento de formigas do gênero *Acromyrmex*, *Trachymyrmex* e *Apterostigma*. Esses micro-organismos isolados foram separados em três grupos morfológicos distintos, sendo que cada um desses grupos de actinobactérias era específico do gênero de formiga do qual foi isolado, revelando um processo de coevolução importante.

Em outro estudo envolvendo a interação entre formigas e micro-organismos, Little e Currie (2008) verificaram que formigas da espécie *Apterostigma pilosum*, quando acometidas por leveduras negras, têm o jardim do fungo-alimento diminuído. Isso ocorre devido à competição dessas leveduras pelo alimento das actinobactérias do gênero *Pseudonocardia*, que protegem o fungo simbionte das formigas do ataque de fungos parasitas.

De três espécies de cupins, Visser e colaboradores (2012) isolaram 360 actinobactérias e avaliaram a capacidade das mesmas em produzir antifúngicos que poderiam inibir fungos do subgênero *Pseudoxylaria*. Esses fungos são prejudiciais à colônia, uma vez que competem por nutrientes com o fungo *Termitomyces*, que é simbionte dos cupins. Foi verificado que a maioria das actinobactérias isoladas produziram compostos com atividade antifúngica, porém em muitos casos houve inibição tanto do fungo parasita *Pseudoxylaria* como do simbionte *Termitomyces*. A produção de antifúngicos poderia ser direcionada para regiões específicas do cupinzeiro e para explicar esses resultados mais estudos devem ser realizados.

Em muitos casos fica evidenciada a possível transferência horizontal de genes biossintéticos carregados por plasmídeos em bactérias associadas a insetos. Nesses eventos biológicos, *clusters* gênicos responsáveis pela biossíntese de produtos naturais antimicrobianos são encontrados em bactérias associadas a diferentes ninhos de formigas (SIT et al., 2015). Embora a variabilidade estrutural desses produtos naturais possa ser pequena, foi visto que a bactéria simbionte de uma espécie de formiga é capaz de inibir o crescimento de outras bactérias invasoras que podem competir pela simbiose com a formiga hospedeira (VAN

ARNAM et al., 2015). Esses dados mostram a complexidade desses sistemas biológicos.

1.3 Estratégias na descoberta de novos agentes antimicrobianos

A resistência microbiana aos antibióticos e antifúngicos disponíveis na terapêutica é um evento inevitável por uma questão evolutiva dos micro-organismos. Sempre serão necessários novos agentes antimicrobianos, apesar do surgimento de linhagens resistentes ser desacelerado pelo uso adequado dos antimicrobianos disponíveis atualmente. Abordagens envolvendo a busca de novos nichos ecológicos para exploração de substâncias bioativas, o entendimento do papel ecológico dos antimicrobianos produzidos e a ativação de genes silenciados utilizando diferentes técnicas são algumas estratégias que podem ser utilizadas para sanar a necessidade de novos produtos naturais antimicrobianos (KOLTER e van WEZEL, 2016).

Produtos naturais produzidos por micro-organismos constituem uma fonte muito importante de antibióticos. Com a grande necessidade de novos agentes terapêuticos para tratamento de infecções, o estudo de micro-organismos pouco explorados pode acelerar o processo de descoberta de novos antimicrobianos (GUIMARÃES et al., 2010; CLARDY et al., 2009). Praticamente todos os produtos naturais conhecidos atualmente são resultado da interação entre organismos. Essas interações químicas resultam em uma grande diversidade metabólica, sendo que uma considerável parte desses produtos naturais podem apresentar biomacromoléculas específicas como alvos, exibindo atividade relacionada com sua produção (SCHMIDT, 2008).

Quando se estuda a relação de mutualismo entre micro-organismos e insetos, trabalhos na literatura mostram que bactérias simbiotes são capazes de produzir substâncias com atividade antimicrobiana que agem inibindo a proliferação de micro-organismos parasitas (KROISS et al., 2010; SCOTT et al., 2008; SANTOS et al., 2004). Essas substâncias químicas, produzidas na tentativa de combater os micro-organismos entomopatogênicos, também podem apresentar atividade contra patógenos humanos.

No trabalho de Carr e colaboradores (2012) foram isoladas cinco anguciclinas a partir da cultura de uma linhagem de *Pseudonocardia* associada à colônia de

formigas da espécie *Apterostigma dentigerum* (Figura 10). As estruturas **11**, **12** e **13** eram inéditas e as substâncias **14** e **15** apresentaram atividade contra *Bacillus subtilis* e *Plasmodium berghei*.

Figura 10. Estruturas químicas de anguciclinas isoladas por Carr e colaboradores (2012).

Estudando uma espécie de actinobactéria do gênero *Streptomyces*, associado à vespa *Sceliphron caementarium*, Oh e colaboradores (2011) isolaram uma estrutura inédita que denominaram de scelifrolactama (**16**) (Figura 11). Esse produto natural apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* resistente à anfotericina B. Os autores ressaltam que micro-organismos isolados de insetos são uma fonte promissora e ainda pouco explorada de novos produtos naturais.

Figura 11. Estrutura química da scelifrolactama (**16**) (adaptado de OH et al., 2011).

Recentemente, Van Arnem e colaboradores (2016) descreveram um polieno estruturalmente similar com os agentes terapêuticos anfotericina B e nistatina, que

chamaram de selvamicina (**17**) (Figura 12). Esse novo produto natural foi isolado de *Pseudonocardia* sp. associada a uma espécie de formiga do gênero *Apterostigma*. Embora menos ativa frente ao patógeno *Candida albicans* (concentração inibitória mínima, MIC = 23 μ M) que o antifúngico nistatina A₁ (**18**) (MIC = 1 μ M), selvamicina apresentou melhor solubilidade devido a presença de um carboidrato adicional em sua estrutura. Como a solubilidade é um fator limitante para o uso de polienos na terapêutica, esse composto pode ter vantagens farmacocinéticas que possam compensar sua menor atividade antifúngica.

Figura 12. Estruturas químicas da selvamicina (**17**) e da nistatina A₁ (**18**) (adaptado de VAN ARNAM et al., 2016).

No trabalho de Poulsen e colaboradores (2011), envolvendo isolamento de micro-organismos das espécies de vespas *Sceliphron caementarium* e *Chalybion californicum*, foram identificados 11 derivados estruturalmente diferentes. Ensaios de inibição em placa de 15 espécies de *Streptomyces*, selecionadas entre mais de 200

espécies de actinobactérias isoladas, revelaram a capacidade antimicrobiana de substâncias produzidas por esses micro-organismos.

Sabe-se que muito se perde em termos de produção de substâncias ativas quando micro-organismos são cultivados em laboratório. Muitos genes biossintéticos estão silenciados e diferentes estratégias podem ser testadas para a ativação dos mesmos. Trabalhos na literatura mostram que cultivos mistos podem ativar vias metabólicas para produção de antibióticos que não eram detectados em culturas simples, podendo também aumentar a produção do antimicrobiano de interesse, ou então, estimular a produção de derivados desse metabólito devido à ativação de várias vias biossintéticas (PETTIT, 2009).

Um exemplo, em que a técnica de cocultura estimulou a produção metabólica, foi a combinação do fungo marinho *Emericella* sp. com a actinobactéria marinha *Salinispora arenicola*. O perfil químico obtido na cultura mista foi muito diferente do perfil encontrado com a cultura simples, sendo possível o isolamento de dois novos depsipeptídeos cíclicos, as emericellamidas A e B, quando esses micro-organismos foram cultivados em conjunto. As emericellamidas A e B mostraram-se ativas contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, com MIC de 3,8 e 6,0 μ M, respectivamente (OH et al., 2007). No trabalho de Schroeckh e colaboradores (2009), foi verificado que a interação entre os micélios da actinobactéria *Streptomyces hygroscopicus* e do fungo *Aspergillus nidulans* ativou vias metabólicas importantes para a produção de policetídeos fúngicos, que antes disso estavam silenciadas

Utilizando técnicas de cocultura, parte do ambiente natural de competição por espaço e alimento é mimetizada, e aumentam-se as chances de ativação de *clusters* gênicos biossintéticos para a produção de metabólitos ativos (PETTIT, 2009; OH et al., 2007). O estudo de micro-organismos associados a insetos gera informações importantes sobre os processos de coevolução das espécies. Além do entendimento dos processos químicos envolvidos nas relações de parasitismo e mutualismo, esse tipo de abordagem pode fornecer novos agentes antimicrobianos (CLARDY et al., 2009). Aliado a isso, o entendimento biológico e ecológico de colônias de abelhas sem ferrão pode ajudar no desenvolvimento de produtos biotecnológicos e farmacêuticos para o tratamento de doenças que afetam esses polinizadores, além de estimular a preservação desses insetos.

OBJETIVOS

1. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar o papel ecológico, biológico e químico da microbiota associada aos favos de cria da abelha sem ferrão *Scaptotrigona depilis*, e estudar o potencial antimicrobiano de micro-organismos isolados de diferentes locais da colônia desse meliponíneo.

2.2 Objetivos específicos

- ◆ Isolar os micro-organismos cultiváveis encontrados em diferentes materiais presentes nas colônias de *S. depilis*;
- ◆ Avaliar o potencial inibitório dos micro-organismos isolados frente diferentes patógenos humanos e entomopatógenos;
- ◆ Caracterizar os compostos antimicrobianos produzidos pelos micro-organismos mais promissores nos ensaios antimicrobianos, considerando o local de onde foram isolados;
- ◆ Identificar as espécies dos micro-organismos considerados importantes para o sistema ecológico-químico da abelha, através de sequenciamento de regiões conservadas do genoma;
- ◆ Sequenciar o genoma completo de *Bacillus* sp. SDL11, isolado do trato gastrointestinal da larva de *S. depilis*, e identificar os genes biossintéticos de produtos naturais;
- ◆ Desenvolver cultivos mistos entre micro-organismos encontrados nos favos de cria de *S. depilis*;
- ◆ Isolar, cultivar e caracterizar o fungo-alimento de *S. depilis*, desenvolvendo metodologias para compreender seu papel nas colônias dessa abelha sem ferrão;
- ◆ Aplicar técnicas de cultivos *in vitro* das larvas de *S. depilis* para compreender a possível função de micro-organismos isolados do favo de cria dessa abelha.

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e métodos

3.1 Coleta do material para isolamento microbiano

Inicialmente, abelhas adultas, larvas e amostras de favo de cria, entrada, cerume estrutural, própolis, potes de pólen e mel foram coletados de uma colônia de *Scaptotrigona depilis* no dia 10 de abril de 2013. Todo o material foi obtido no laboratório do professor Dr. Fábio Santos do Nascimento, presente no Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP). Posteriormente, novas coletas foram feitas em colônias diferentes de *S. depilis*, também mantidas no mesmo local, para realização de ensaios de cultivo *in vitro* de larvas, e isolamento do fungo-alimento de *S. depilis*.

Para realização desse projeto, foram obtidas autorizações de coleta e transporte de material biológico:

- Autorização SISBIO (coleta e transporte de material de recursos genéticos): nº 46555-5;
- CNPq (Autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético): nº 010936/2014-9;
- Autorização COTEC (Instituto Florestal, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo): COTEC nº 327/2015.

3.2 Isolamento dos micro-organismos associados ao inseto e à colônia

Após a coleta, o material foi processado rapidamente, sob condições assépticas, no Laboratório de Química de Micro-organismos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP (LQMo-FCFRP-USP).

Com intuito de isolar bactérias, foram adotadas as metodologias descritas por Poulsen e Currie (2010) e Poulsen e colaboradores (2011), com adaptações. Abelhas adultas, larvas e amostras da colônia foram transferidas separadamente para tubos eppendorf contendo 750 µL de solução salina (0,9%) estéril. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex por um minuto, para retirada dos micro-organismos presos à cutícula dos insetos e também aos diferentes materiais da colônia. Após esse procedimento, 100 µL de cada solução aquosa foram semeados

separadamente em placas de Petri contendo meio quitina (4 g de quitina; 0,7 g K_2HPO_4 ; 0,3 g KH_2PO_4 ; 0,5 g $MgSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,001 g $ZnSO_4$; 0,001 g $MnCl_2$ e 20 g de ágar por litro de água) (HSU e LOCKWOOD, 1975) acrescido de antifúngicos (cicloheximida 0,05 g/L e nistatina 0,04 g/L) e em meio ISP-2 (4 g de extrato de levedura, 4 g de dextrose, 10 g de extrato de malte e 20 g de ágar para um litro de água) (SHIRLING e GOTTLIEB, 1966), contendo os mesmos antifúngicos. As placas foram cultivadas a 30 °C. Após o crescimento das colônias, as bactérias foram purificadas em meio ISP-2 através de repiques sequenciais.

Para o isolamento de fungos, foi utilizado o método descrito por Poulsen e Currie (2010), com adaptações. A partir das soluções de lavagens de materiais utilizadas para isolamento bacteriano, 100 µL foram semeados em placas de Petri contendo meio PDA, acrescido dos antibacterianos sulfato de estreptomicina e penicilina-G, ambos na concentração de 12,5 g/L. Para purificação das culturas, foram realizadas sementeiras subsequentes em placas de Petri contendo meio PDA.

Adicionalmente, foi realizado um procedimento para isolamento de micro-organismos do interior das larvas e abelhas de *S. depilis*. Para isso, foi utilizada a metodologia de esterilização superficial descrita por Bacon (1990), utilizada para isolamento de micro-organismos endofíticos, com adaptações. As amostras foram submergidas em uma solução alcoólica (etanol a 70%) durante 2,5 minutos; posteriormente permaneceram em solução de hipoclorito de sódio a 5% por 5 minutos; foram transferidas novamente para uma solução alcoólica a 70% durante 1 minuto e finalmente foram lavadas com água esterilizada (PALUDO et al., 2016). Antes da transferência para placas de Petri contendo meio PDA e ISP-2, foram feitas três secções transversais no corpo das larvas e abelhas para exposição dos micro-organismos presentes no interior desses insetos. A água de lavagem final das amostras foi também semeada em placas contendo meio PDA e ISP-2 para confirmar se o processo de esterilização superficial dos insetos foi efetivo.

Foram isolados micro-organismos osmofílicos presentes no favo de cria de *S. depilis*. Para isso, filamentos fúngicos visíveis no interior das células de cria foram transferidos para placas contendo meio 30G6 (30 g de glicose, 3 g de extrato de levedura, 3 g de extrato de malte, 2 g de ágar para 100 mL de água deionizada). Alíquotas do alimento larval também foram inoculadas em placas de Petri contendo esse meio de cultura.

3.3 Manutenção dos micro-organismos isolados

Todas as culturas de bactérias isoladas foram preservadas em meio ISP-2 líquido acrescido de 20% de glicerol, sendo os fungos preservados em meio PDB acrescido de 20% de glicerol. Para linhagens osmofílicas, foram feitos estoques em meio 30G6 líquido com 20% de glicerol. Estoques em glicerol foram armazenados em freezer -80 °C. Adicionalmente, para os fungos e possíveis actinobactérias, foram feitos estoques em óleo mineral, sendo os mesmos estocados a temperatura ambiente.

3.4 Patógenos selecionados para ensaios antimicrobianos

Como ainda não foram descritos patógenos específicos para a espécie *S. depilis*, para realização dos testes de inibição microbiana, foram utilizadas linhagens de micro-organismos sabidamente patogênicas para outros insetos. As espécies entomopatogênicas *Beauveria bassiana* 447 e *Metarhizium anisopliae* 1037 foram disponibilizadas pelo professor Dr. Italo Delalibera Junior (ESALQ - USP). A bactéria *Paenibacillus larvae* ATCC 9545 foi adquirida comercialmente.

Também foram utilizados os micro-organismos patogênicos para humanos, disponíveis comercialmente e que são mantidos no LQMo, FCFRP: *Staphylococcus aureus* ATCC 3538, *S. saprophyticus* ATCC 15305, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 10231. Adicionalmente, para estudos de isolamento biomonitorado, foi utilizado o patógeno humano *Candida albicans* ATCC MYA-2876.

3.5 Ensaio de inibição em placa de Petri para seleção de micro-organismos promissores

Os ensaios de inibição em placa de Petri basearam-se nas metodologias descritas por Ichikawa et al. (1971) e Visser et al. (2012). Para isso, inóculos de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro) das bactérias patogênicas e inóculo de 1×10^6 a 5×10^6 UFC/mL de *C. albicans* ATCC 10231 (Item 3.4) foram preparados em solução salina 0,9%, por meio de comparação da turbidez

com uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5. Posteriormente, 1 mL de cada inóculo dos patógenos foi semeado na superfície de placas de Petri contendo meio ágar ISP-2 com auxílio de uma alça de Drigalski. Em seguida, discos de aproximadamente 6 mm de diâmetro foram retirados de placas de Petri contendo as culturas dos micro-organismos isolados (Item 3.2), que foram cultivados previamente em ágar ISP-2 ou PDA durante sete dias a 30 °C. Esses discos foram transferidos para a superfície das placas de Petri contendo os patógenos recém-semeados. As placas foram mantidas em câmara climática a 30 °C e 60% de umidade, sendo feita a leitura dos halos inibitórios em 12, 24, 48 e 168 horas de incubação. Como controle positivo, foram utilizados discos (6 mm) contendo estreptomicina (300 µg), eritromicina (15 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), ceftazidima (30 µg) e anfotericina B (100 µg).

Micro-organismos que apresentaram halos inibitórios promissores frente ao patógeno humano *C. albicans* ATCC 10231 foram avaliados quanto à capacidade de inibição dos fungos entomopatogênicos (Item 3.4). Para isso, inóculos de $0,5 \times 10^6$ esporos/mL dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram preparados através de contagem em câmara de Neubauer, sendo 1 mL desses inóculos semeados na superfície de placas de Petri grandes (15 cm de diâmetro) contendo 70 mL de meio ágar ISP-2, com auxílio de uma alça de Drigalski. De placas de Petri contendo meio ISP-2 ou PDA e culturas dos micro-organismos isolados da abelha (sete dias de cultivo a 30 °C) foram retirados discos de 6 mm de diâmetro e transferidos para as placas contendo os esporos dos fungos recém-semeados. Como controle positivo, foram utilizados miconazol (50 µg) e clotrimazol (100 µg).

Adicionalmente, foram feitos ensaios inibitórios em placa de Petri entre alguns micro-organismos isolados do favo de cria e larva de *S. depilis*. Para isso, *Bacillus* sp. SDLI1 foi cultivado *overnight* em meio LB (Luria-Bertani, Lennox, Sigma-Aldrich). Após esse período, um inóculo apresentando OD₆₀₀ 0,01 foi preparado e 2 µL transferidos para o centro de placas de Petri médias (8 cm de diâmetro) contendo os meios ISP-2 ou 30G6 ágar (Descrição no item 3.12.1). Antes da transferência do inóculo de *Bacillus* sp. SDLI1 para a superfície das placas contendo meio ágar ISP-2, foram semeados 200 µL de um inóculo de *Candida* sp. SDCP2 (OD₆₀₀ 0,01, preparado a partir de um cultivo em PDA por 48 h) ou 200 µL de um inóculo de *Monascus ruber* SDCP1 (1×10^6 esporos/mL, preparado a partir de um cultivo em PDA por sete dias). Nas placas contendo meio ágar 30G6, foram semeados 200 µL

de um inóculo de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 (OD_{600} 0,01, preparado a partir de um cultivo em ágar 30G6 por 10-15 dias a 30 °C). Como controle positivo, utilizou-se clotrimazol 100 µg.

3.6 Extração de DNA e identificação microbiana

A extração de DNA de micro-organismos isolados e selecionados para identificação da espécie foi feita utilizando o *kit FastDNA SPIN Kit for soil* (MP). Para amplificação de regiões conservadas, visando a identificação desses micro-organismos, as seguintes metodologias para reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) foram utilizadas:

Região 26S

Água ultrapura = 10 µL

Primer NL1 (*forward primer*) (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') (10 µM) = 2 µL

Primer NL4 (*reverse primer*) (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (10 µM) = 2 µL

5 PRIME MasterMix 2.5x = 10 µL

DNA (~10 ng/µL) = 1 µL

Volume final = 25 µL

94 °C/3 min, 30 ciclos de 94 °C/30 s, 61 °C/45 s, 72 °C/1 min e extensão final de 72 °C/10 min, 12 °C/∞

Região ITS

Água ultrapura = 10 µL

Primer ITS1 (*forward primer*) (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') (10 µM) = 2 µL

Primer ITS4 (*reverse primer*) (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (10 µM) = 2 µL

5 PRIME MasterMix 2.5x = 10 µL

DNA (~10 ng/µL) = 1 µL

Volume final = 25 µL

94 °C/2 min, 30 ciclos de 94 °C/35 s, 52 °C/30 s, 72 °C/1 min e extensão final de 72 °C/7 min, 12 °C/∞

Região 18S

Água ultrapura = 10 µL

Primer NS1 (*forward primer*) (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') ou *primer* 18SF (5'-ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG-3') (10 µM) = 2 µL

Primer NS4 (*reverse primer*) (5'-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3') ou *primer* 18SR (5'-CCGATCCCTAGTCGGCATAG-3') (10 µM) = 2 µL

5 PRIME MasterMix 2.5x = 10 µL

DNA (~10 ng/µL) = 1 µL

Volume final = 25 µL

94 °C/3 min, 35 ciclos de 94 °C/30 s, 56 °C/45 s, 72 °C/1 min e extensão final de 72 °C/10 min, 12 °C/∞

Região 16S

Água ultrapura = 10 µL

Primer F27 (*forward primer*) (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (10 µM) = 2 µL

Primer R1492 (*reverse primer*) (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (10 µM) = 2 µL

5 PRIME MasterMix 2.5x = 10 µL

DNA (~10 ng/µL) = 1 µL

Volume final = 25 µL

94 °C/3 min, 30 ciclos de 94 °C/30 s, 54 °C/45 s, 72 °C/1 min e extensão final de 72 °C/10 min, 12 °C/∞

Adicionalmente, a metodologia taxonômica descrita por Hawksworth e Pitt (1983) foi utilizada para confirmação da espécie fúngica *Monascus ruber* SDGP1, que foi isolada do cerume presente no favo de cria de *S. depilis*. Realizou-se o ensaio em triplicata, utilizando três meios de cultivo, durante sete dias a 25 °C. Os meios de cultura utilizados foram o CYA (3 g de NaNO₃; 1 g K₂HPO₄; 0,5 g de KCl; 0,5 g MgSO₄.7H₂O; 0,01 g FeSO₄.7H₂O; 5 de extrato de levedura; 30 g de sacarose; 15 g de ágar; água deionizada para 1 L); o MEA (20 g de extrato de malte; 1 g de peptona; 20 g de glicose; 15 g de ágar; água deionizada para 1 L); e G25N (mesma composição do meio CYA mas com 25% de glicerol).

Para confirmação da espécie do fungo que se desenvolve nas células de cria de *S. depilis*, o mesmo foi coletado de aproximadamente 20 células contendo larvas recém emergidas, o material foi reunido e congelado em nitrogênio líquido. A amostra recebeu 100 µL de tampão de lise (200 mM Tris-HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 1 mM EDTA e 1% SDS), sendo a mistura agitada vigorosamente. A amostra foi submetida a seis ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e incubação a 90°C por 1 min, seguidos de congelamento e incubação a 90 °C por 10 min. O conteúdo do tubo foi centrifugado a 11000 g por 3 min e o sobrenadante foi coletado cuidadosamente. O sobrenadante foi então submetido à purificação do DNA utilizando coluna para purificação de DNA (QIAquick, Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado foi eluído com 50 µL de uma solução Tris-HCl 1 mM, pH 8,5, pré-aquecido a 55 °C.

Foram desenhados *primers* específicos para os fungos *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 e *M. ruber* SDGP1 a partir das sequências obtidas da região 18S amplificada pelo uso dos *primers* NS1 e NS4 (WHITE et al., 1990). Esse procedimento foi realizado para identificação do fungo-alimento de larvas de *S. depilis*. A PCR foi realizada conforme descrito a seguir:

Mon18S

Água ultrapura = 10 µL

Primer FMZ (*forward primer*) (5'-GCATGGAATAATAGAATAGGACG-3') (10 µM) = 2 µL

Primer RM (*reverse primer*) (5'-GGTCATCATAGAAACCCGT-3') (10 µM) = 2 µL

5 PRIME MasterMix 2.5x = 10 µL

DNA (~10 ng/µL) = 1 µL

Volume final = 25 µL

94 °C/3 min, 35 ciclos de 94 °C/30 s, 58 °C/45 s, 72 °C/1min e extensão final de 72 °C/10 min, 12 °C/∞

Zygo18S

Água ultrapura = 10 µL

Primer FMZ (*forward primer*) (5'-GCATGGAATAATAGAATAGGACG-3') (10 µM) = 2 µL

Primer RZ (*reverse primer*) (5'-TGGGTCAGTAAATAAACACCAC-3') (10 µM) = 2 µL

5 PRIME MasterMix 2.5x = 10 µL

DNA (~10 ng/µL) = 1 µL

Volume final = 25 µL

94 °C/3 min, 35 ciclos de 94 °C/30 s, 60 °C/45 s, 72 °C/1 min e extensão final de 72 °C/10 min, 12 °C/∞

A identificação dos micro-organismos *Pediococcus stilesii* SDLI3, *Escherichia fergusonii* SDA3I2, *Pantoea eucrina* SDCEI1 e *Fructobacillus tropaeoli* SDMI2 foi realizada pela empresa Genotyping Biotecnologia. O sequenciamento foi feito em equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Nesses casos, amostras dos micro-organismos foram enviadas à empresa, que procedeu com a extração do DNA, amplificação de regiões conservadas (16S), sequenciamento e edição das sequências obtidas, enviando laudos de identificação microbiana de acordo com o alinhamento das sequências de nucleotídeos obtidas com as sequências de referência depositadas no GenBank® (*National Center for Biotechnology Information* – NCBI).

3.7 Sequenciamento do genoma de *Bacillus* sp. SDLI1

O DNA genômico de *Bacillus* sp. SDLI1 foi extraído com o kit *Wizard® genomic DNA purification* (Promega), utilizando-se um *pellet* obtido a partir de uma monocultura em meio LB líquido, cultivada *overnight* a 30 °C e 120 rpm. Longas sequências de DNA (15-20 kb) foram enviadas ao Centro de Sequenciamento Genômico e Biologia Computacional da Universidade de Duke, Estados Unidos da América. Para esse sequenciamento foram utilizadas duas *SMRT cells* (*single-*

molecule real-time) (EID et al., 2009) sequenciadas no instrumento PacBio RSII (*Pacific Biosciences*). O *Hierarchical Genome Assembly Process* (CHIN et al., 2013) gerou uma sequência de 4.143,589 pb. A inspeção manual, feita pelo pós-doutorando Antonio Ruzzini do laboratório do professor Dr. Jon Clardy (*Harvard Medical School* - HMS), revelou que as sequências terminais estavam degeneradas, e estas foram removidas para gerar um cromossomo circular com 4.134,042 pb, com quantidade G-C de 45,8%. O genoma completo de *Bacillus* sp. SDLI1 foi depositado no GenBank® - NCBI com número de acesso CP013950 (PALUDO et al., 2016). A predição dos genes biossintéticos de *Bacillus* sp. SDLI1 foi feita com auxílio dos softwares RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (AZIZ et al., 2008) e antiSMASH (*Antibiotics & Secondary Metabolites Analysis Shell*) (WEBER et al., 2015) e inspeções manuais utilizando essas informações no *software* Geneious 8.1.7.

3.8 Produção de fagos pelo *Bacillus* sp. SDLI1

O genoma de *Bacillus* sp. SDLI1 (PALUDO et al., 2016) foi analisado pelo *software* PHAST (*Phage Search Tool*) (ZHOU et al., 2011), indicado para identificação da presença de pró-fagos em genomas bacterianos. Essa análise revelou a existência de sete sequências que poderiam originar fagos a partir desse genoma, dentre eles, um fago potencialmente ativo para o patógeno *P. larvae*.

Para estimular a produção de fagos por *Bacillus* sp. SDLI1, essa bactéria foi cultivada *overnight* em meio LB (Miller, Difco) a 200 rpm e 30 °C (1 mL de meio em tubos de 14 mL). Um inóculo dessa pré-cultura foi transferido para 100 mL de LB para obtenção de um inóculo final de OD₆₀₀ 0,05. Após 4 h a 200 rpm e 30 °C (OD₆₀₀ ~ 0,4), foi adicionada mitomicina C (Sigma-Aldrich) em uma concentração final de 0,4 µg/mL (preparada em DMSO). Após lise celular (~2 h), a cultura foi filtrada para esterilização e os fagos foram precipitados com 25 mL de tampão M1 (PEG 6000 30% em 3 M de NaCl). Após 24 h a 4 °C, a solução foi centrifugada por 30 min a 8000 rpm. O precipitado formado a partir de 10 mL foi separado para testes, sendo o mesmo ressuscitado em 500 µL de CaCl₂ 1 mM (Solução de fagos 1). O DNA do *pellet* formado a partir dos 90 mL restantes foi extraído. Para isso, ao mesmo foram adicionados 500 µL de tampão para DNase (Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 2,5 mM, CaCl₂ 0,5 mM, pH 7,6), 7,5 µL de DNase (2 un/µL) e 10 µL de RNase (2 un/µL) (*New*

England Biolabs). Essa mistura foi incubada a 37 °C por 2 h. Após esse período, 50 µL de EDTA (500 mM) e 500 µL de tampão M2 (1% TRITON, Guanidina HCl 500 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 6,8) foram adicionados. A solução foi incubada por 1 h a 65 °C. Então, 2 mL de tampão PB do *kit QIAquick PCR Purification* (Qiagen) foram adicionados e a purificação do DNA procedeu-se de acordo com as especificações desse *kit*. O DNA genômico do fago foi sequenciado utilizando sistema Illumina MiSeq na *MGH sequencing DNA core facility* (Cambridge, MA, USA).

Para o ensaio de inibição frente ao patógeno *P. larvae* ATCC 9545, uma cultura desse micro-organismo em 1 mL (OD_{600} 0,05) de meio MYPGP (10 g de meio Muller Hinton, 15 g de extrato de levedura, 3 g de K_2PO_4 , 2 g de glicose e 1 g de piruvato de sódio para 1 L de água deionizada) foi incubada a 200 rpm, 37 °C por 6 h ($OD_{600} \sim 0,6$). Então, a cultura foi separada em dois tubos contendo 500 µL cada, sendo 5 µL da solução de fagos 1 adicionados no teste (diluição 1:100). Após 16 h de incubação a densidade óptica (600 nm) foi medida. Para verificar o número de unidade formadoras de colônia (UFC) após o cultivo com a solução de fagos 1 (1:10), foram feitas diluições de culturas testes e culturas controles, após 48 h de contato a 200 rpm e 37 °C, sendo as mesmas plaqueadas em meio ágar MYPGP e incubadas a 37 °C por 48 h.

Além do ensaio em meio líquido, a atividade inibitória da solução de fagos 1 também foi avaliada utilizando *soft* ágar (0,7% ágar) frente ao patógeno *P. larvae* ATCC 9545. Nesse protocolo, o inóculo de *P. larvae* ATCC 9545 foi transferido para 5 mL de meio MYPGP contendo 0,7% de ágar (OD_{600} 0,01) que foi vertido em placas médias (8 cm de diâmetro), contendo 20 mL de meio MYPGP com 2% ágar. Após solidificação, 5 µL de diferentes diluições da suspensão de fagos 1 (concentrada e diluída 1:10, 1:100 e 1:1000 em $CaCl_2$ 1 mM) foram aplicados sobre o *soft* ágar e as placas incubadas a 37 °C por 24 e 48 h.

Adicionalmente, o micro-organismo *Bacillus* sp. SDPI10, isolado dos potes de pólen de *S. depilis*, foi utilizado para verificar a formação de placas inibitórias. Esse procedimento é importante para se conhecer quantas unidades de fago ativos são encontrados em 1 mL de cultivo de *Bacillus* sp. SDPI1, nas condições experimentais adotadas. *Bacillus* sp. SDPI10 foi reativado em meio LB líquido por 24 h, a 200 rpm e 30 °C. A partir dessa pré-cultura um inóculo foi transferido para 5 mL de meio LB 0,7% ágar para originar uma densidade óptica final (600 nm) de 0,01, sendo esse meio vertido em placas de Petri contendo 20 mL de meio LB 2% ágar. Por fim, 5 µL

de diferentes diluições da suspensão de fagos 1 (sem diluição, 1:10, 1:100 e 1:1000 em CaCl_2 1 mM) foram transferidos para as placas, que foram incubadas 30 °C por 24 h.

Para análises microscópicas do fago SDLI1-1, isolado de *Bacillus* sp. SDLI1, 5 µL da suspensão de fagos 1 foram adsorvidos por 1 min em uma placa revestida de carbono que foi previamente tratada por 30 segundos com uma descarga luminescente para torná-la mais hidrofílica. O excesso de líquido foi removido com auxílio de um filtro de papel (Whatman #1) e a amostra foi corada com 0,75% de formato de urânio ($\text{UO}_2(\text{CHO}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) por 30 segundos. Após remoção do excesso de corante, a placa foi examinada utilizando o microscópio de transmissão eletrônica JEOL 1200EX e as imagens obtidas com a câmera AMT 2k CCD.

3.9 Isolamento de metabólitos de *Bacillus* sp. SDLI1

3.9.1 Cultivo em escala ampliada 1

A bactéria *Bacillus* sp. SDLI1 foi selecionada para cultivo em escala ampliada visando o isolamento de metabólitos secundários. Para isso, esse micro-organismo foi cultivado por sete dias em meio ágar ISP-2 a 30 °C e, após esse período, dois fragmentos de 6 mm contendo células bacterianas foram retirados com auxílio de um *transfertube* e transferidos para tubos Falcon de 50 mL (12 tubos) contendo 20 mL de meio ISP-2 líquido. Essa bactéria foi então cultivada por 48 h em *shaker* a 120 rpm e 30 °C. Todo o conteúdo dos tubos foi individualmente vertido em frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL de capacidade contendo 150 mL de meio ISP-2 líquido. Foram cultivados 12 Erlenmeyers a 120 rpm e 30 °C, durante sete dias. As culturas foram centrifugadas, e os sobrenadantes de cada cultivo foram reunidos e extraídos com acetato de etila, originando 2,791 g de extrato bruto.

Todo o extrato bruto foi submetido a processo fracionamento utilizando resina Sephadex LH-20, com metanol como eluente. Purificações finais foram realizadas por recristalização e utilizando HPLC na modalidade semipreparativa. A separação final de metabólitos das frações 23-24 (184,6 mg) foi realizada em HPLC reciclante Shimadzu acoplado a bomba modelo LC-6 AD, sistema de controle CBM-20A, detector de índice de refração RID-10A e detector UV/VIS SPD-20A, injetor manual, válvulas de reciclo e suporte de coluna Shimadzu, e software LCsolution.

Neste equipamento, utilizou-se coluna C₁₈ semipreparativa (Machery-Nagel, Nucleosil 250x10 mm, 120-5 Å), fase móvel isocrática composta por acetonitrila:água (8:2, v/v) acrescida de 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). Foram injetados 45 mg das frações 23-24 reunidas (três injeções de 15 mg solubilizados em 200 µL de fase móvel), para isolamento de sete metabólitos. Com tempo de retenção de 15 min foi isolado **B1** (4,5 mg), em 16 min **B2** (1,6 mg), em 20 min **B3** (4,0 mg), em 22 min **B4** (6,2 mg), em 26 min **B5** (19,1 mg), em 30 min **B6** (4,5 mg) e em 34 min **B7** (3,7 mg).

3.9.2 Cultivo em escala ampliada 2

Para um segundo cultivo em escala ampliada de *Bacillus* sp. SDLI1, esse micro-organismo foi cultivado da mesma forma descrita no item 3.9.1, porém aumentando o cultivo para 16 frascos tipo Erlenmeyer. As culturas foram centrifugadas, e os sobrenadantes de cada cultivo foram reunidos e extraídos com acetato de etila, originando 1,892 g de extrato bruto.

Para realização do isolamento guiado pela atividade, 9 mg do extrato bruto foram fracionados utilizando HPLC-DAD (Agilent) 1200 series, empregando um gradiente composto por metanol e água (iniciando com 30% de metanol e permanecendo de forma isocrática até 5 min, alcançando 100% de metanol em 20 min e permanecendo dessa forma até 30 min, retornando para 30% de metanol em 32 min e mantendo essa porcentagem até 40 min para acondicionamento da coluna) com fluxo de 3 mL/min, obtendo-se com isso 30 frações coletadas em intervalos de 1 min (0-30 min de eluição cromatográfica). Para esse fracionamento, foi utilizada a coluna semipreparativa Luna C₁₈ 5 µm, 250x10 mm, Phenomenex. Foram injetados 1,5 mg de extrato por injeção (50 µL). As 30 frações obtidas foram secas utilizando *Speed-vacuum* (Savant, Thermo Scientific).

O ensaio antimicrobiano das frações foi realizado frente ao patógeno *C. albicans* ATCC MYA-2876. O inóculo foi preparado a partir uma monocultura de *C. albicans* ATCC MYA-2876 em meio ágar LB, incubada por 24 h a 37 °C. Para realizar o ensaio antifúngico, foram também utilizadas placas contendo meio ágar LB, em que 200 µL de um inóculo apresentando OD₆₀₀ 0,01 de *C. albicans* ATCC MYA-2876 foi espalhado na superfície de cada placa. As frações foram dissolvidas em 40 µL de uma mistura metanol e água, na proporção 1:1, e 3 µL foram transferidos para

avaliar a atividade. Clotrimazol (Sigma-Aldrich) foi utilizado como controle positivo (100 µg). A leitura dos halos inibitórios foi realizada após 24 h de cultivo. Para confirmação da atividade observada, o experimento foi repetido com frações ativas utilizando a mesma metodologia, mas inoculando 3 e 6 µL de cada fração.

Para otimizar a separação cromatográfica, foram utilizados cartuchos de SPE (C₁₈, 1g, Waters) para realização de um pré-fracionamento de 100 mg de extrato de *Bacillus* sp. SDL11, empregando um gradiente de metanol:água (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 100% de metanol). As frações 50-100% metanol foram analisadas em HPLC-DAD-MS 1200 Series (Agilent Technologies) acoplado ao espectrômetro de massas Quadrupolo 6130 (Agilent Technologies), operando nos modos positivo e negativo de ionização. Foi empregada a coluna cromatográfica Luna 5 mm C₁₈, 100x4,6 mm (Phenomenex). O gradiente de solventes utilizado foi composto por acetonitrila:água acrescidos com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 0,7 mL/min (iniciando com 10% de acetonitrila, mantendo essa porcentagem por 1 min, alcançando 100% de acetonitrila em 18 min, e mantendo essa porcentagem até 23 min), o volume de injeção foi 10 µL. Com isso, a fração obtida com 85% metanol (12,4 mg) foi selecionada para isolamento do metabólito de interesse.

Para o isolamento do metabólito com atividade antifúngica a partir da fração 85% metanol, utilizou-se HPLC-DAD (monitorando em 210 nm) empregando a mesma coluna semipreparativa e equipamento utilizados nessa seção. O gradiente de solvente utilizado consistiu em misturas de metanol:água (0 a 5 min com 80% de metanol de forma isocrática, alcançando 100% de metanol em 20 min e permanecendo nessa porcentagem até 30 min, retornando para 80% de metanol em 32 min, permanecendo dessa forma até 40 min para acondicionamento da coluna) com fluxo de 3 mL/min. Foram injetados 10 mg da fração contendo o metabólito de interesse (quatro injeções de 2,5 mg/injeção solubilizadas em 50 µL de fase móvel inicial), sendo isolado 0,5 mg do composto **B8**, com tempo de retenção de 16 min.

3.10 Isolamento e identificação de metabólitos produzidos por *M. ruber* SDCP1

Para isolamento de metabólitos produzidos por *M. ruber* SDCP1, esse fungo foi cultivado em um Erlenmeyer contendo 90 g de arroz parboilizado hidratado com 120 mL de água, e esterilizado em autoclave. Para a preparação do inóculo, *M. ruber* SDCP1 foi previamente cultivado em meio PDA por sete dias a 30 °C, sendo

três fragmentos de micélio-ágar de 6 mm de diâmetro transferido para o Erlenmeyer contendo o meio arroz. A fermentação ocorreu durante 30 dias a 30 °C, sendo a cultura extraída com solventes de polaridade crescente (hexano, acetato de etila e etanol). Foram obtidos 0,0936 g de extrato utilizando hexano, 0,9392 g de extrato utilizando acetato de etila e 8,9719 g de extrato utilizando etanol como solvente extrativo. O extrato bruto obtido com acetato de etila foi selecionado para isolamento de metabólitos devido seu perfil químico.

Para a separação de metabólitos foram utilizados 135 mg do extrato em acetato de etila de *M. ruber* SDCP1. Para isso, foi empregado HPLC na modalidade semipreparativa, acoplado à duas bombas modelo LC-6AD, sistema de controle CBM-20A, detector DAD SPD-M20A, injetor automático SIL-10AF, forno CTO-20A, coletor automático FCR-10A, todos na marca Shimadzu, e software LabSolution. Foi utilizada a coluna Gemini 5 µm, C₆-Fenil 110Å, 250x10 mm, gradiente metanol:água, iniciando com 80% de metanol, chegando a 90% de metanol em 10 min e 100% de solvente orgânico em 12 min, permanecendo em 100% até 15 min e retornando para 80% de metanol em 16 min, finalizando a separação em 20 min. A vazão foi de 4 mL/min, acompanhando a detecção de metabólitos a 225 nm. Foram isolados 0,7 mg do metabólito **M1** com tempo de retenção de 6 min; 4,3 mg do metabólito **M2** (7,5 min); 10,4 mg do metabólito **M3** (9,0 min); 3,1 mg do metabólito **M4** (10,5 min) e 2,5 mg do metabólito **M5** (16 min).

Para verificação dos perfis químicos de extratos e substâncias isoladas, empregou-se HPLC analítico acoplado a duas bombas modelo Nexera XR LC-20AD, sistema de controle CBM-20A, detectores DAD SPD-M20A e ELSD-LTII, injetor automático Nexera SIL-20A, forno CTO-20A, todo o sistema da marca Shimadzu, e software LabSolution. Utilizou-se coluna Gemini 5 µm, C₆-Fenil 110Å, 250 x 4,6 mm, com gradiente composto por acetonitrila:água (iniciando com 10% de acetonitrila e atingindo 100% em 20 min, permanecendo em 100% de acetonitrila até 30 min, em seguida retornando para 10% gradativamente durante 2 min e permanecendo em 10% de acetonitrila entre 32 min e 37 min).

3.11 Determinação estrutural de metabólitos isolados

Para determinação estrutural de bacillomicina D (**B8**), metabólito isolado de *Bacillus* sp. SDLI1 foi utilizado o equipamento de RMN 600 MHz (Agilent

Technologies). A amostra (0,5 mg de **B8**) foi diluída em 50 µL de CD₃OD e analisada utilizando um tubo de 1,7 mm de diâmetro. Para identificação estrutural de monascinol (**M2**) (4,3 mg) e monascina (**M3**) (10,4 mg), metabólitos isolados de *M. ruber* SDCP1, utilizou-se o equipamento Bruker DRX 500, operando a 500 MHz para ¹H. Essas amostras foram dissolvidas em CDCl₃ e analisadas em tubos convencionais de 5 mm de diâmetro. Para análises de surfactinas (**B1-B7**), produzidas por *Bacillus* sp. SDLI1, utilizou-se este último equipamento, mas as amostras foram dissolvidas em CD₃OD e analisadas em tubos Shigemi. O processamento dos dados foi feito utilizando o software MestReNova 6.0.2.

As análises de espectrometria de massas em alta resolução foram feitas no espectrômetro micrOTOF II-ESI-TOF (Bruker Daltonics®) operando no modo positivo. Para calibração interna utilizou-se solução de Na-TFA (ácido trifluoroacético sódio, 10 mg/mL). Lipopeptídeos isolados de *Bacillus* sp. SDLI1 tiveram suas rotas de fragmentação estudadas nesse mesmo equipamento, com N₂ como gás de colisão, sendo utilizadas energias crescentes de fragmentação (5-50 eV).

3.12 Coculturas

3.12.1 Culturas mistas em placas de seis poços

Para mimetizar o ambiente nutricional encontrado nas células de cria de *S. depilis*, os meios de cultura contendo grande quantidade de carboidratos listados a seguir foram utilizados para realizar culturas mistas entre micro-organismos encontrados nesse ambiente. Os micro-organismos cultivados foram: *Monascus ruber* SDCP1 e *Candida* sp. SDCP2, isolados a partir do cerume presente nas células de cria; e *Zygosacharomyces* sp. SDBC30G1, isolado a partir dos filamentos brancos encontrados na célula de cria após a eclosão dos ovos.

- **Meio 1 (GFAA4,5 ou GFAA6)**

15 g D-(+)-Glicose (Sigma-Aldrich)

15 g D-(-)-Frutose (Sigma-Aldrich)

3 g Extrato de malte (BD)

3 g Extrato de levedura (BD)

0,3 g L-Prolina (Sigma-Aldrich)

0,1 g L-Asparagina (Fisher Scientific)
 2 g Ágar (BD)
 100 mL Água deionizada
 pH 4,5 ou 6,0 (Adição de ácido clorídrico 1N)

- **Meio 2 (15GF4,5 ou 15GF6)**

15 g D-(+)-Glicose (Sigma-Aldrich)
 15 g D-(-)-Frutose (Sigma-Aldrich)
 3 g Extrato de malte (BD)
 3 g Extrato de levedura (BD)
 2 g Ágar (BD)
 100 mL Água deionizada
 pH 4,5 ou 6,0 (Adição de ácido clorídrico 1N)

- **Meio 3 (30G4,5 ou 30G6)**

30 g D-(+)-Glicose (Sigma-Aldrich)
 3 g Extrato de malte (BD)
 3 g Extrato de levedura (BD)
 2 g Ágar (BD)
 100 mL Água deionizada
 pH 4,5 ou 6,0 (Adição de ácido clorídrico 1N) ou sem ajuste de pH (pH 6,3)

Obs: O meio 30G6 foi utilizado para isolamento de micro-organismos osmofílicos do favo de cria de *S. depilis*.

Esses meios de cultura foram transferidos para placas de seis poços (3 mL) e os micro-organismos inoculados em monocultura ou cocultura. *Candida* sp. SDCP2 foi reativada em meio PDB, por 48 h a 120 rpm e 30 °C. Após reativação, um inóculo apresentando OD₆₀₀ 0,01 foi preparado. *Monascus ruber* SDCP1 foi reativado em meio PDA por sete dias a 30 °C. Os esporos desse fungo foram coletados e contados com auxílio de uma Câmara de Neubauer para preparação de um inóculo contendo 10⁶ esporos/mL. *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 foi reativado em meio 30G6 ágar por 10-15 dias a 30 °C. Após esse período, um inóculo com OD₆₀₀ 0,03 foi preparado. Para todos os micro-organismos, 2 µL do

inóculo foram transferidos para os meios de cultura contidos em placas de seis poços.

Para analisar quimicamente os perfis das culturas após sete dias de cultivo, os meios foram coletados e extraídos com 10 mL de acetato de etila em frascos de vidro. Após 24 h de maceração, as soluções foram filtradas e secas em *Speed-vacuum* (Savant, Thermo Scientific). Os extratos foram solubilizados em 1 mL de metanol:água (1:1), filtrados (membrana de PVDF, 0,22 μ m) e analisados em HPLC-DAD-MS 1200 Series (Agilent Technologies) acoplado com espectrômetro de massas Quadrupolo 6130 (Agilent Technologies), operando nos modos positivo e negativo de ionização. Foi empregada a coluna cromatográfica Luna 5 mm C₁₈, 100x4,6 mm (Phenomenex). O gradiente de solventes utilizado foi composto por acetonitrila:água acrescidos com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 0,7 mL/min (iniciando com 10% de acetonitrila, mantendo essa porcentagem por 1 min, alcançando 100% de acetonitrila em 18 min, e mantendo essa porcentagem até 23 min), o volume de injeção foi 10 μ L.

3.12.2 Coculturas utilizando placas de 24 poços e membranas semipermeáveis

Coculturas utilizando placas de 24 poços foram desenvolvidas com os micro-organismos *Bacillus* sp. SDLI1 e *Monascus ruber* SDCP1 com o intuito de verificar a produção de produtos naturais antimicrobianos. Nesses experimentos foram utilizados os meios de cultura ISP-2, PDB e 30G6 líquidos. Para verificar se o estímulo ou inibição da produção de metabólitos era dependente de contato celular, foram empregadas membranas semipermeáveis (Millicell[®], 0,4 μ m, PET, Millipore).

Um inóculo de *Bacillus* sp. SDLI1 (OD₆₀₀ 0,01) foi preparado a partir de uma cultura *overnight* em meio ISP-2 líquido em incubadora com agitação de 120 rpm e 30 °C. Para preparação do inóculo de *M. ruber* SDCP1, o mesmo foi cultivado em meio PDA por sete dias a 30 °C. Os esporos foram coletados com meio PDB e contados com auxílio de Câmara de Neubauer para preparação de um inóculo final contendo 10⁶ esporos/mL.

Os meios de cultura líquidos ISP-2, PDB e 30G6 (1 mL) foram individualmente transferidos para os poços das placas de 24 poços, e as membranas foram inseridas em cada poço. Em seguida, 250 μ L de cada respectivo meio de cultura foram colocados no interior das membranas. Dessa forma, cada

poço continha 1 mL de meio fora da membrana semipermeável e 250 µL do respectivo meio de cultura no interior da membrana. Após esse procedimento, 2 µL do inóculo de *Bacillus* sp. SDLI1 foram transferidos para o interior de cada Millicell® e 2 µL da suspensão de esporos de *M. ruber* SDCP1 foram transferidos para o meio de cultivo contido fora de cada membrana. Como controle, fez-se monocultivos de cada micro-organismo e cocultivos sem as membranas.

Após sete dias de cultivo, 500 µL das culturas foram coletados, filtrados e extraídos utilizando cartuchos de extração em fase sólida (SPE, C₁₈, 50 mg, Waters) utilizando 500 µL de metanol. Os extratos foram filtrados e analisados utilizando LC-MS conforme metodologia descrita no item 3.12.1.

3.12.3 Coculturas entre *Monascus ruber* SDCP1 e *Candida* sp. SDCP2

Os fungos *Monascus ruber* SDCP1 e *Candida* sp. SDCP2 foram reativados em meio PDA a 30 °C por sete dias. Após esse período, dois fragmentos de ágar (aproximadamente 6 mm de diâmetro) contendo células dos fungos foram transferidos para tubos Falcon (capacidade 50 mL) contendo 20 mL de meio PDB, permanecendo em *shaker* a 120 rpm e 30 °C por 48 h. Então, as culturas foram simultaneamente vertidas em frascos tipo Erlenmeyer com 500 mL de capacidade (*Candida* sp. OD₆₀₀ ~1,0) contendo 150 mL de meio PDB. Monoculturas de cada micro-organismo foram desenvolvidas como controles.

Visando analisar os metabólitos secundários produzidos por esses fungos, 10 mL de cada cultura foram coletados diariamente com pipeta estéril, centrifugados e uma alíquota de 1 mL foi extraída utilizando cartuchos de SPE (C₁₈, 50 mg, Waters) usando 1 mL de metanol. Os extratos foram filtrados e 4 µL foram analisados utilizando UPLC 1290 Infinity (Agilent Technologies) acoplado a espectrômetro de massas 6530 ESI-Q-TOF (Agilent Technologies) operando no modo positivo. Para isso utilizou-se uma coluna analítica Luna C₁₈ 5 mm, 100x4,6 mm (Phenomenex). O gradiente consistiu em misturas de acetonitrila e água com fluxo de 0,7 mL/min (iniciando-se com 10% de acetonitrila de forma isocrática por 1 min, e alcançando 100% de acetonitrila em 18 min, e permanecendo essa porcentagem até 23 min).

3.13 Avaliação quantitativa da atividade antifúngica de frações e metabólitos isolados

3.13.1 Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração fungicida mínima (MFC) de monascinol (M2) e monascina (M3), produzidos por *M. ruber* SDCP1

3.13.1.1 Micro-organismos

Para esse experimento, foram utilizadas as linhagens *Candida* sp. SDCP2 e *Candida albicans* ATCC MYA - 2876.

3.13.1.2 Reativação dos micro-organismos

A cultura de *Candida* sp. SDCP2 foi reativada em meio PDA por 48 h a 30 °C e a cultura de *C. albicans* ATCC MYA - 2876 foi reativada em meio LB ágar por 24 h a 37 °C.

3.13.1.3 Preparação dos inóculos

Para *Candida* sp. SDCP2 foi preparado um inóculo inicial apresentando OD₆₀₀ 0,08, e 67 µL deste foram transferidos para 933 µL de meio PDB. Esse volume (1,0 mL) foi transferido para outro tubo contendo 9,0 mL de meio PDB. Após homogeneização em vortex, 2,0 mL dessa solução foram transferidos para 10 mL de meio PDB. Finalmente, 20 µL eram pipetados em cada poço de uma placa de 96 poços já contendo o controle positivo e metabólitos a serem testados nas concentrações desejadas. O mesmo procedimento foi feito para *C. albicans* ATCC MYA - 2876 utilizando meio LB líquido.

3.13.1.4 Controles positivos

Para a linhagem *Candida* sp. SDCP2 foi utilizado o controle positivo cicloheximida (Sigma-Aldrich) e para *C. albicans* ATCC MYA - 2876, clotrimazol (Sigma-Aldrich). Para preparar as soluções dos controles positivos, 3,2 mg de cada antifúngico foram dissolvidos em 500 µL de DMSO. Então, 16 µL foram transferidos

para 144 μL de meio PDB ou LB. As soluções foram homogeneizadas e 80 μL foram transferidos para o primeiro poço da placa de 96 poços que já continha 80 μL de meio de cultura, sendo realizada a diluição seriada.

3.13.1.5 Preparação das amostras

- ✓ Preparação da solução 1:

A quantidade de 0,5 mg de cada metabólito foi pesada e dissolvida em 62,5 μL de DMSO (concentração final = 8000 $\mu\text{g/mL}$).

- ✓ Preparação da solução de trabalho:

Uma alíquota de 10 μL da solução 1 foi transferida para 70 μL de meio de cultura. A solução foi homogeneizada e os 80 μL foram transferidos para o primeiro poço correspondente ao teste para prosseguimento da diluição seriada. Para a diluição seriada, cada poço já continha 80 μL de meio de cultura. Após isso, 20 μL de cada inóculo foi acrescentado ao poço (volume final = 100 μL), sendo testadas as concentrações de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39 e 0,19 $\mu\text{g/mL}$.

A placa contendo *C. albicans* ATCC MYA - 2876 foi mantida a 37 °C por 24 h, e a placa contendo *Candida* sp. SDCP2 foi incubada a 30 °C por 48 h. O experimento foi realizado em duplicata.

3.13.1.6 Determinação da concentração fungicida mínima (MFC)

Após o período de incubação descrito acima, uma alíquota de cada poço foi removida com auxílio de palitos de madeira esterilizados e semeada em placas de Petri contendo meio de cultura apropriado. As placas foram incubadas por 48 h ou 24 h, a 30 °C ou 37 °C para *Candida* sp. SDCP2 e *C. albicans* ATCC MYA - 2876, respectivamente. Após esse período, procedeu-se com a leitura visual do crescimento fúngico. Os resultados foram mensurados pela presença ou ausência de crescimento microbiano.

3.13.2 Concentração inibitória mínima (MIC) de fração contendo surfactinas (B1-B7) de *Bacillus* sp. SDLI1

A avaliação da atividade antifúngica de uma fração contendo uma mistura de surfactinas (**B1-B7**) produzidas por *Bacillus* sp. SDLI1 foi avaliada utilizando a mesma metodologia descrita para avaliação da atividade de metabólitos isolados de *M. ruber* SDCP1 no item 3.13.1. No entanto, foi utilizado o patógeno *C. albicans* ATCC 10231 e o controle positivo foi miconazol.

3.14 Morfologia celular de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 utilizando microscópio de fluorescência

As análises de microscopia de fluorescência foram realizadas no Departamento de Microbiologia e Imunobiologia na *Harvard Medical School* (HMS), utilizando o microscópio Nikon Eclipse 2000 acoplado a X-Cite series 120Q, com objetivas de 60x e 100x, sendo as imagens capturadas com uma câmera Hamamatsu Orca-ER.

Para visualização de acúmulo de quitina em pseudohifas septadas em *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 foi utilizado o corante branco de calcoflúor (*Calcofluor White*, Molecular Probes). Para isso, 5 µL de branco de calcoflúor (5 mM) foram misturados com 1 mL de PBS, sendo 10 µL dessa solução transferidos para lâminas de vidro contendo células de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 (cultivado por sete dias a 30 °C em meio 15GF líquido com pH 4,5, condição estática, inóculo inicial com OD₆₀₀ 0,1). Para coloração, essas lâminas foram incubadas por 10 min protegidas da luz, para posterior análise.

Para visualização de acúmulo de esteroides nas células de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, foi utilizado o corante complexo de filipinas (*Filipin complex* de *Streptomyces filipinensis*, Sigma-Aldrich). Foram utilizados 2,5 µL de uma solução da mistura de filipinas a 2,5 mg/mL em DMSO, que foram homogeneizadas em 500 µL de uma suspensão de células de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 (cultura de 10 dias em 1 mL de meio 15GF líquido, pH 4,5, condição estática, 30 °C, inóculo inicial com OD₆₀₀ 0,1). Essa mistura foi incubada por 30 min em banho de gelo, as células foram centrifugadas e lavadas uma vez com PBS para visualização em microscópio de fluorescência (SOUZA et al., 2011).

A coloração de organelas citoplasmáticas de acúmulo de lipídeos, também chamadas de adipossomos ou no termo em inglês *lipid droplets* (LDs), em *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 foi feita de acordo com a metodologia descrita

por Hoiczky e colaboradores (2009). Células fixadas em lâminas de vidro a 40 °C foram coradas por 30 min com 50 µL de vermelho do Nilo (*Nile Red*, Sigma-Aldrich) solubilizado em etanol (10 µg/mL) em ambiente escuro. Após esse período, as células foram lavadas rapidamente para retirada do excesso de corante e observadas em microscópio de fluorescência. As células de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 foram retiradas da mesma cultura utilizada para análise de esteroides.

Em um segundo momento, foram feitas novas análises de LDs, para comparação das células cultivadas em laboratório com as células de *Zygosaccharomyces* sp. presentes no favo de cria de *S. depilis*. Para isso, utilizou-se o microscópio Leica SP5 no Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal, na FMRP-USP (LMMC, FAPESP 2004/08868-0). As células observadas foram obtidas de uma cultura de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em meio 15GF líquido (pH 4,5, 30 °C, sete dias de cultivo, sem agitação, inóculo inicial com OD₆₀₀ 0,1), e também de células coletadas diretamente do favo de cria de uma colônia de *S. depilis*, sendo as mesmas coradas com vermelho do Nilo como descrito acima.

3.15 Compostos voláteis produzidos por *Candida* sp. SDCP2

Resultados de experimentos de cocultivo indicaram que a levedura *Candida* sp. SDCP2 poderia estimular o crescimento do fungo-alimento *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1. Com o intuito de observar se esse estímulo poderia ser causado pela produção de compostos orgânicos voláteis (*Volatiles Organic Compounds* - VOCs), monoculturas de *Candida* sp. SDCP2 foram desenvolvidas em 100 mL de meio 30G líquido, em frascos tipo Erlenmeyer com 500 mL de capacidade, condição estática, a 30 °C, com inóculo inicial apresentando OD₆₀₀ 0,002, por sete ou 10 dias. Após esses períodos, as culturas foram centrifugadas por 10 min a 6000 rpm (4 °C) e esterilizadas por filtração (0,22 µm, PES, Thermo Scientific).

Para testar a hipótese de que VOCs produzidos por *Candida* sp. SDCP2 poderiam estimular o crescimento de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, foi utilizada a metodologia descrita por Bruce e colaboradores (2003), com modificações. Uma alíquota de 3 mL de cada sobrenadante condicionado por *Candida* sp. SDCP2 foi transferida para placa de Petri pequenas (10x35 mm). Em outras placas de Petri com as mesmas dimensões contendo 3 mL de meio 30G6 ágar, foram semeados 25 µL de um inóculo (OD₆₀₀ 0,02) de *Zygosaccharomyces* sp.

SDBC30G1. Esse inóculo foi preparado a partir de uma cultura de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 feita em 2 mL de meio 30G6 líquido, a 200 rpm e 30 °C por 24 h (iniciada de uma placa contendo *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 cultivado em 30G6 ágar por 10-15 dias). As placas contendo inóculos de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em meio ágar 30G6 foram colocadas sobre as placas contendo os sobrenadantes com VOCs de *Candida* sp. SDCP2, sendo as mesmas seladas com parafilme e acondicionadas no interior de sacos plásticos, sendo incubadas a 30 °C. Após 3-5 dias, o crescimento de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 que teve contato com VOCs de *Candida* sp. SDCP2 foi comparado com o crescimento desse fungo em contato com VOCs de 3 mL de meio 30G líquido, utilizado como controle negativo.

Outro experimento para testar se VOCs produzidos pela linhagem SDCP2 poderiam estimular o crescimento de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 foi feito. Para isso, 10 µL de um inóculo de *Candida* sp. SDCP2 apresentando OD₆₀₀ 0,1 foi colocado no centro de uma placa contendo meio 30G6 ágar. Sobre esta, uma placa de Petri contendo 25 µL de um inóculo semeado (OD₆₀₀ 0,1) de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 foi acondicionada. Essas placas foram seladas e incubadas conforme descrito anteriormente. Nesse experimento, o intuito era testar se *Candida* sp. SDCP2 poderia estimular o crescimento de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 enquanto liberava gradativamente VOCs durante seu desenvolvimento.

Para testar a capacidade de alguns VOCs em estimular o crescimento de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, 25 µL de um inóculo dessa levedura (OD₆₀₀ 0,1) foram semeados na superfície de placas de Petri pequenas (10x35 mm), sendo 10 µL de etanol (diluído 1:1000 em água deionizada estéril) e 10 µL de álcool isoamílico (diluído 1:10000 em água deionizada estéril) transferidos para o centro dessas placas. Como controles, foram utilizados 10 µL de sobrenadante de 10 dias de cultivo de *Candida* sp. SDCP2 e 10 µL de meio 30G6 líquido.

3.16 Análises de VOCs utilizando *headspace*

Para análises dos voláteis presentes no sobrenadante de *Candida* sp. SDCP2 foi adotada a técnica de *headspace*. Tais análises foram realizadas na *Small Molecules Mass Spectrometry Facility* (HMS) utilizando o equipamento de cromatografia gasosa Agilent 6890 GC e o injetor automático CTC CombiPAL. Para

isso, a coluna DB-624UI (30 m x 0,32 mm x 1,80 μ m) foi utilizada, com fluxo de 2,3 mL/min, temperatura de injeção de 220 °C, interface a 220 °C, fonte de ionização a 200 °C, buscando por massas entre m/z 10 a 500. O gradiente de temperatura utilizado foi 30 °C por 6 min, aumentando 10 °C/min até 150 °C, depois 50 °C/min até 250 °C, permanecendo 250 °C por 15 min. Duas taxas de *split* e método de *headspace* foram usados. Na primeira metodologia aplicada, o *split* foi 200 e o *headspace* 80 °C por 10 min; e na segunda, o *split* foi 5 e o *headspace* 80 °C por 45 min.

As análises de VOCs presentes nas células de cria de *S. depilis* foram realizadas no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), FCFRP-USP, utilizando o cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2010 Plus e o auto injetor AOC 5000 com uma seringa de 2,5 mL para o *headspace*. A coluna ZB-624 (30 m x 0,32 mm x 1,80 μ m) foi utilizada, com um fluxo de 2,68 mL/min, temperatura de injeção de 260 °C, interface a 220 °C, fonte de ionização a 200 °C, buscando por massas entre m/z 10-200. O programa de temperatura utilizado foi o mesmo feitos para VOCs de *Candida* sp. SDCP2. O *split* foi 5 e o método de *headspace* foi 80 °C por 45 min.

3.17 Cultivos de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 com lovastatina (M6)

Análises de extratos de *M. ruber* SDCP1 mostraram a produção de lovastatina (M6). Visando a verificação do poder modulatório de lovastatina (M6) no crescimento e acúmulo de LDs por *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, desenvolveu-se culturas dessa levedura com esse produto natural (M6). *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 foi cultivado por 10-15 dias em 30G6 ágar a 30 °C. Para formação de biofilme (células flotantes), um inóculo final com OD₆₀₀ 0,1 de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 foi cultivado em placas de seis poços contendo 5 mL/poço de meio 15GF4,5 líquido. Lovastatina (M6), obtida comercialmente (Sigma-Aldrich), foi utilizada na concentração de 50 μ g/mL. As culturas permaneceram incubadas por sete dias a 30 °C. Após esse período as películas foram coletadas com auxílio de palitos de madeira esterilizados, e suspendidas em 30 mL de tampão A (20 mM de tricina e 250 mM de sacarose, pH 7,8), sendo a OD₆₀₀ do controle (cultivo sem lovastatina) e do teste ajustadas para OD₆₀₀ 7,5. O procedimento descrito por Ding et al. (2013) foi seguido até a obtenção de solução contendo LDs. Basicamente, 0,2

mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) foi adicionado na suspensão de células em 30 mL de tampão A, que foi incubada por 20 min em gelo. Após esse período, as células foram rompidas utilizando pressão em uma *French press* (1500 bar). Os homogenatos foram centrifugados a 3000 g por 10 min a 4 °C e os sobrenadantes foram coletados e separados em alíquotas de 10 mL em tubos Falcon de 15 mL. Foram então adicionados 3 mL de tampão B (20 mM de HEPES, 100 mM de KCl e 2 mM de $MgCl_2$, pH 7,4). Para separação dos LDs, essas soluções foram centrifugadas a 10500 g por 1 h. Os LDs foram então cuidadosamente coletados e estocados a -80 °C até a extração.

Para a análise lipidômica, 250 µL de LDs do teste e do controle foram extraídos com 750 µL de uma mistura clorofórmio:metanol (2:1). Essas misturas foram agitadas em vórtex por 2 min, incubadas em gelo por 30 min e centrifugadas por 3 min a 13000 rpm. As fases orgânicas (fase inferior contendo clorofórmio) foram coletadas para análises lipidômicas.

3.18 Análise do conteúdo de LDs produzidos por *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1

A análise lipidômica completa de LDs produzidos por *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 foi realizada na *Small Molecules Mass Spectrometry Facility* (HMS), adotando a metodologia descrita por Saghatelian e colaboradores (2004). As análises foram feitas em uHPLC Ultimate 300 acoplado ao espectrômetro de massas Thermo q-Exactive. Nessa metodologia, os espectros de MS/MS dos lipídeos presentes na amostra são comparados com os obtidos de padrões de lipídeos, para suprimir erros. As amostras foram analisadas no modo positivo e negativo de análise separadamente, utilizando uma coluna Biobond (Dikma Technologies) C_4 (5 µm, 4,6x50 mm) com a pré-coluna C_4 , 2 µm fundida, 2x20 mm. O solvente A foi 95:5 água:metanol com 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formato de amônio, e o solvente B foi 60:35:5 isopropanol:metanol:água com 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formato de amônio. O mesmo gradiente foi utilizado para os dois modos de análise. O gradiente consistiu em 0% B até 5 min, mudando para 20% B em 5.1 min, aumentando de forma linear de 20% B a 100% B entre 5.1 min e 45 min, mantendo 100% B entre 45.1 min e 53 min, e retornando para 0% B em 53.1 min e mantendo 0% B entre 53.1 min e 60 min para condicionamento da coluna. O fluxo foi mantido

a 0,1 mL/min entre 0 e 5 min devido o aumento da pressão ocasionado pela injeção da amostra em clorofórmio. O fluxo foi de 0,4 mL/min entre 5.1 min e 45 min, e 0,5 mL/min entre 45.1 min e 60 min. O volume de injeção foi de 10-30 µL. As voltagens utilizadas no capilar, *fragmentor* e *skimmer* foram de 3,5 kV, 100 V e 60 V, respectivamente. A temperatura do gás de nebulização foi 350 °C, com fluxo de 10 L/min e pressão de nebulização de 45 psi. Os dados foram coletados no intervalo de *m/z* 100-1500 Da. Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do *software* Thermo Lipidsearch 4.2.

3.19 Extração e análise de esteroides de membrana de *Zygosaccharomyces* sp.

Para extração de esteroides de membrana de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, esse micro-organismo foi cultivado em meio 30G6 por 15 dias a 29 °C. Após coleta das células, as mesmas foram lavadas por duas vezes com água deionizada estéril, e padronizadas para uma OD₆₀₀ 32. Da suspensão de células, 250 µL foram extraídos com 750 µL de uma mistura clorofórmio:metanol (2:1). Essa mistura foi agitada em vórtex por 2 min, incubada em gelo por 30 min e centrifugada por 3 min a 13000 rpm. A fase orgânica (fase inferior contendo clorofórmio) foi coletada para análise em GC-MS. As análises foram feitas no NPPNS-FCFRP-USP utilizando o cromatógrafo a gás Shimadzu QP-2010. A coluna Rtx-5MS (RESTEK) (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) foi utilizada, com um fluxo de 1,50 mL/min, temperatura de injeção de 260 °C, interface a 300 °C, fonte de ionização a 250 °C, modo *splitless*. O gradiente de temperatura utilizado foi 60 °C por 4 min, aumentando 10 °C/min até 300 °C, permanecendo 300 °C por 20 min.

3.20 Análises em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura EVO 50 Zeiss, Cambridge (UK), disponível no departamento de Química da FFCLRP – USP. As amostras foram previamente fixadas por um banho de plasma de ouro de 250 segundos em alto vácuo e em atmosfera de argônio utilizando metalizador SCD 050 Sputter Coater

Bal-Tec, Fürtentum Liechtenstein. No caso da abelha, foram necessários 400 segundos de banho de plasma de ouro.

3.21 Cultivos *in vitro* de larvas de *S. depilis*

Os ensaios de criação *in vitro* das larvas de *S. depilis* foram feitos no LQMo, com material coletado de colônias mantidas no laboratório do Prof. Dr. Fábio S. Nascimento, na FFCLRP-USP, utilizando a metodologia descrita Menezes et al. (2015), com modificações. Para realização desses ensaios, foram utilizadas pelo menos três colônias diferentes de *S. depilis*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, utilizando-se 16 larvas por tratamento.

Para verificar se a diferença entre os testes e os controles era estatisticamente significativa ($p < 0,05$), empregou-se o teste Cochran-Mantel-Haenszel, utilizando o software XLSTAT, versão 2016.

3.21.1 Cultivos com *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 e *Zygosaccharomyces* sp. coletado diretamente das células de cria de *S. depilis*

Alimento larval foi coletado com auxílio de pipeta a partir de células de cria de *S. depilis* contendo ovos. Através de inoculação em meio 30G6, verificou-se que antes dos ovos eclodirem, o crescimento de *Zygosaccharomyces* sp. não era observado. No entanto, um procedimento de esterilização por frio e calor ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min seguido de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 min) foi aplicado para diminuir a chance de contaminantes. Então, 33 μL desse alimento larval foram transferidos para poços de uma placa de 96 poços. Ovos de *S. depilis* foram cuidadosamente transferidos para o interior desses poços, permanecendo nas mesmas posições que se encontravam no favo de cria, favorecendo com isso a eclosão. Essas placas foram incubadas sem tampa no interior de placas maiores (14x18 cm) contendo 30 mL de água deionizada estéril, para manter a umidade, sendo as placas maiores tampadas e incubadas a $29\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após 3-4 dias os ovos eclodiam, sendo então inoculados os micro-organismos a serem testados. Inóculos de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 foram preparados utilizando o meio 30G6 líquido a partir de placas de Petri contendo essa levedura previamente cultivada em ágar 30G6 cultivadas durante 10-15 dias, a $29\text{ }^{\circ}\text{C}$. Diferentes inóculos foram testados, e os melhores resultados foram obtidos com um

inóculo apresentando OD₆₀₀ 45. A transferência de 1 µL dessa suspensão de células para cada poço contendo larva representava um inóculo final de aproximadamente 1x10⁶ UFC/mL. Diferentes inóculos do fungo coletado diretamente das células de cria de *S. depilis* também foram testados, sendo utilizados como controle positivo. Notou-se que o fungo coletado do ambiente natural crescia mais rapidamente e apresentava maior viabilidade celular quando comparado com *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 cultivado em laboratório. Com isso, utilizou-se o inóculo apresentando OD₆₀₀ 38, do qual 1 µL também originava um inóculo final contendo aproximadamente 1x10⁶ UFC/mL. Para controle negativo, foram utilizadas larvas sem inoculação de fungo e com 1 µL de meio 30G6 líquido. As placas foram mantidas em estufa a 29 °C e o desenvolvimento larval foi monitorado até a ocorrência de metamorfose.

3.21.2 Cultivos com ergosterol e colesterol

Com o intuito de verificar se *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 seria fonte de esteroides para larvas de *S. depilis*, foram feitos cultivos de larvas *in vitro* na presença de ergosterol e colesterol e ausência desse fungo. Para isso, adotou-se a metodologia descrita no item 3.21.1, em que a inoculação de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 foi substituída por soluções de ergosterol ou colesterol dissolvidos em acetato de etila. Primeiramente, foram preparadas soluções estoque de cada esteroide (padrões Sigma-Aldrich) na concentração de 5 mg/mL. Foram testadas as concentrações finais de 10, 50 e 100 µg/mL de ergosterol e 10 µg/mL de colesterol no alimento larval. Tanto no controle positivo (desenvolvimento larval com inoculação do fungo coletado diretamente do favo de cria, OD₆₀₀ 38), como no controle negativo (sem inoculação de fungo ou esteroide), foram acrescentados 2% de acetato de etila, que foi a maior quantidade de solvente acrescentada ao alimento larval nos tratamentos com esteroides.

3.21.3 Cultivos com os entomopatógenos *P. larvae*, *B. bassiana* e *M. anisopliae*

Para verificar se o desenvolvimento larval de *S. depilis* seria prejudicado por infecções causadas pelos entopatógenos *P. larvae* ATCC 9545, *B. bassiana* 447 e *M. anisopliae* 1037, também foram realizados ensaios de cultivo *in vitro* de larvas.

Os experimentos foram realizados de forma similar à descrita no item 3.21.1. No entanto, em nenhum cultivo o alimento larval passou por processo de esterilização e o experimento iniciou-se com a transferência de larvas recém emergidas, e não ovos. Com isso, o fungo-alimento era naturalmente transferido com as larvas, não sendo necessária a recontaminação.

Para os experimentos com *P. larvae* ATCC 9545, o patógeno foi cultivado em placas de Petri contendo meio MYPGP ágar, a 29 °C por 10 dias para obtenção de esporos. Após esse período, o material foi raspado com auxílio de uma alça estéril e misturado a 200 µL de meio MYPGP líquido, sendo a densidade ótica ajustada para OD₆₀₀ 0,5 (aproximadamente 5x10⁶ UFC/mL). Foi utilizado 1 µL desse inóculo em cada poço contendo larvas, correspondendo a cerca de 5000 UFC por larva. As larvas sem inoculação do patógeno receberam 1 µL de meio MYPGP líquido como controle negativo. O desenvolvimento larval foi acompanhado até o décimo dia.

Os fungos entomopatogênicos, *B. bassiana* 447 e *M. anisopliae* 1037 foram cultivados por nove dias em meio PDA a 29 °C, sendo os esporos raspados com 3 mL de meio PDB acrescido de 20% glicerol. Os esporos foram contados em câmara de Neubauer para padronização de inóculos contendo aproximadamente 1x10⁶ esporos/mL. Destas suspensões, 1 µL foi transferido para poços contendo larvas, correspondendo a aproximadamente 1000 esporos por larva. Nos cultivos de larvas controle, 1 µL de meio PDB acrescido de 20% glicerol foi transferido para eliminar a interferência do meio na sobrevivência larval. Os esporos coletados em PDB acrescido de 20% glicerol foram transferidos para criotubos e congelados em freezer a -80 °C. O desenvolvimento larval foi acompanhado até a fase pupal.

Adicionalmente, para verificar se *Bacillus* sp. SDLI1, isolado do interior da larva de *S. depilis*, teria algum efeito protetivo, foram feitos cultivos de larvas com cada patógeno na presença desse simbionte. Para isso, *Bacillus* sp. SDLI1 foi cultivado por 24 h em meio LB líquido, a 200 rpm e 30 °C. Após a reativação, foi preparado um inóculo com OD₆₀₀ 0,01 e 1 µL foi transferido para poços contendo larvas e o inóculo dos patógenos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

4.1 Isolamento microbiano

Foram isoladas 149 linhagens microbianas de diferentes locais da colônia de *S. depilis*. Os resultados de distribuição de micro-organismos isolados dos diferentes locais da colônia estão representados na figura 13.

Figura 13. Distribuição dos micro-organismos isolados nas diferentes partes da colônia.

É interessante notar que o maior número de micro-organismos isolados foi da estrutura de cera e resinas que compõem a entrada da colônia (26 micro-organismos, somando 17,4% dos isolados). Isso possivelmente deve-se ao fato que este é o local de primeiro contato das abelhas forrageiras que chegam do campo trazendo alimento e outros materiais úteis para a colônia. Possivelmente, este também é o local de entrada de micro-organismos invasores presentes nos materiais vegetais visitados por essas abelhas. Destes, 46,1% foram isolados utilizando o meio PDA acrescido de antibacterianos (Item 3.2 da metodologia), meio que beneficiaria o isolamento de fungos. Os outros 53,8% foram isolados em meio quitina ou ISP-2, e como foram acrescentados antifúngicos nesses meios de cultura, possivelmente a maioria de isolados consistiu em linhagens bacterianas. É importante destacar que a utilização de meios de cultura suplementados com

antifúngicos ou antibacterianos favorece o isolamento de forma mais seletiva. No entanto, existem micro-organismos resistentes aos antimicrobianos utilizados.

O segundo local de onde foram isolados grande número de micro-organismos foi o pólen, com 24 micro-organismos, totalizando 16,1% dos isolados. Esse material, que é fonte de proteínas, passa por processo fermentativo antes de ser utilizado para alimentação das abelhas e larvas (MENEZES et al., 2013). Possivelmente, os micro-organismos isolados a partir desse material fazem parte da microbiota fermentativa. A maioria das linhagens (87,5%) foi isolada utilizando meios quitina ou ISP-2 acrescidos de antifúngicos, indicando que são bactérias.

O terceiro material com maior número de isolados foi o cerume, com 13,4% do total de isolados. O cerume é uma mistura de cera e resinas vegetais utilizado para construir diferentes estruturas da colônia (NOGUEIRA-NETO, 1997). Em seguida, com 11,4% dos isolados está a própolis, que é constituído basicamente por resinas de plantas que as abelhas utilizam para vedação da colônia. A própolis ou geoprópolis (própolis misturada com outros materiais como o barro) inibe a presença de invasores no interior da colônia e pode apresentar atividades biológicas (NOGUEIRA-NETO, 1997, SANCHES, 2014). Em quinto lugar, com 10,7% dos isolados está o lixo da colônia. O lixo é um acúmulo de detritos, restos de insetos e material rejeitado pelas abelhas que fica depositado em uma região específica do ninho. No lixo podem estar presentes micro-organismos invasores.

Juntos, os materiais da entrada, pólen, cerume, própolis e lixo da colônia representaram 69,1% do total de micro-organismos isolados. O mel, abelhas seccionadas, abelhas lavadas e materiais das células de cria apresentaram número similar de micro-organismos isolados. É importante destacar que o mel de abelhas sem ferrão apresenta altas concentrações de açúcares, chegando a 75% de carboidratos totais, além de ter pH ácido (pH 3,15 a 4,66) (SOUZA et al., 2006). Esse é um ambiente inóspito, e apenas micro-organismos extremófilos como os xerófilos (suportam ambientes com altas concentrações de açúcares ou outros solutos não iônicos) conseguem sobreviver a essas condições (STEVENSON et al., 2015). Das linhagens isoladas do mel de *S. depilis*, 90% foram isoladas em meio quitina e ISP-2. De abelhas esterilizadas superficialmente (Item 3.2 da metodologia) foi isolada apenas um micro-organismo utilizando meio ISP-2. Da larva esterilizada superficialmente foram isoladas duas linhagens, uma em ISP-2 (SDLI1) e uma em meio PDA (SDLP1).

No total, foram isoladas 43, 54 e 52 linhagens utilizando meio quitina, ISP-2 e PDA, respectivamente (Algumas linhagens são apresentadas no Anexo 1). Através de observações de similaridade morfológicas, notou-se que alguns micro-organismos possivelmente foram isolados em mais de uma amostra da colônia e também em mais de um meio de cultura utilizado. No entanto, não foi possível identificar por sequenciamento genético todas as linhagens microbianas isoladas para confirmar o múltiplo isolamento.

4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana em placa de Petri

Os micro-organismos isolados foram avaliados para verificação da capacidade de produção de metabólitos com atividade antimicrobiana frente aos sete patógenos humanos descritos no item 3.4 da metodologia. Este ensaio foi utilizado como triagem para seleção dos micro-organismos a serem estudados mais extensivamente. Entre os micro-organismos testados, 42 apresentaram atividade antimicrobiana, após 24 horas de incubação, frente pelo menos um destes patógenos (Figura 14). Destes, apenas 21,4% (9 linhagens) foram isolados utilizando meio PDA com antibacterianos, o restante foi isolado em meio quitina ou ISP-2.

Figura 14. Local de isolamento dos micro-organismos que apresentaram atividade inibitória frente a pelo menos um patógeno humano após 24 horas de contato.

O local da colônia que apresentou maior número de micro-organismos ativos frente aos patógenos humanos testados foi o pólen (26,2%). Destes, 91% apresentaram halos inibitórios maiores que 10 mm. O segundo local de onde foram isolados mais micro-organismos com atividade inibitória foi a entrada da colônia, o que pode indicar que neste local existe uma microbiota responsável por controlar o influxo de micro-organismos invasores. No entanto, mais de 50% destes micro-organismos (57,1%) apresentaram halos inibitórios menores que 10 mm, sugerindo uma menor capacidade de inibição. As dimensões dos halos inibitórios estão descritas no anexo 1.

É importante ressaltar que o tamanho do halo inibitório não necessariamente significa uma maior ou menor atividade, uma vez que existem muitas limitações inerentes a esse tipo de ensaio. Um halo inibitório maior pode indicar uma maior difusão do antimicrobiano no meio de cultura, ou seja, uma maior hidrofiliabilidade da molécula ativa. Estruturas mais apolares podem apresentar maior dificuldade de difusão no ágar, o que pode prejudicar o tamanho do halo visualizado.

Para aumentar a chance de encontrar moléculas bioativas promissoras, foi realizada uma leitura dos halos inibitórios após sete dias de contato com os patógenos. Nesse tempo, poderia haver uma diminuição do tamanho dos halos observados em 24 h de contato, ou até mesmo o aparecimento de populações do patógeno resistentes ao antimicrobiano produzido pelo micro-organismo isolado de *S. depilis*. Essas características foram consideradas fatores negativos, que influenciaram a escolha do micro-organismo a ser estudado.

Dos 42 micro-organismos que apresentaram atividade após 24 h de contato contra os patógenos, apenas 20 ainda apresentaram atividade após 168 h (Figura 15). Os micro-organismos ativos isolados da própolis e das abelhas seccionadas não sustentaram a atividade após sete dias. O maior número de isolados ativos, que continuaram apresentando atividade após esse tempo, ainda foram micro-organismos isolados do pólen (35%).

Figura 15. Local de isolamento dos micro-organismos que mantiveram atividade inibitória frente a pelo menos um patógeno humano após 168 horas de contato.

As linhagens SDPI6, SDPI5 e SDPI3, isoladas do pólen, e SDLI1, isolada do intestino larval, apresentaram atividades interessantes frente ao patógeno *C. albicans* ATCC 10231 após 168 h de cultivo. As linhagens SDPI6 e SDLI1 inclusive apresentaram halos inibitórios maiores após sete dias de contato do que após 24 h (Anexo 2). Essas quatro linhagens foram então selecionadas para ensaio de inibição frente aos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* (Tabela 1).

Tabela 1. Halos inibitórios (mm) frente a entomopatógenos de acordo com o tempo de análise.

Micro-organismos	<i>B. bassiana</i> 447		<i>M. anisopliae</i> 1037	
	48 horas	168 horas	48 horas	168 horas
SDPI6	35	50	55	57
SDPI5	40	55	55	61
SDPI3	30	40	55	56
SDLI1	29	35	45	46
Miconazol 50 µg	20	18	-	-
Clotrimazol 100 µg	x	x	27	26

- Não foi ativo x Não foi testado

Os micro-organismos testados apresentaram interessante potencial inibitório frente aos fungos patogênicos de insetos. Um exemplo foi o halo de inibição desenvolvido pela linhagem SDLI1, isolada do interior da larva, frente ao patógeno *M. anisopliae*, que pode ser evidenciado na figura 16.

Figura 16. Ensaio de inibição em placa frente ao entomopatôgeno *M. anisopliae* 1037 após 14 dias de contato. A. Halo inibitório produzido por metabólitos secretados pela linhagem SDLI1. B. Halo inibitório do controle positivo clotrimazol 100 µg.

4.3 Identificação dos micro-organismos isolados

A priorização da identificação de micro-organismos isolados de *S. depilis* se deu pela capacidade de inibição dos patógenos testados e também pelo local da colônia de onde as linhagens foram isoladas. No total, foram identificados 16 micro-organismos.

4.3.1 Micro-organismos identificados devido ao potencial antimicrobiano

O micro-organismo *Pediococcus stilesii* SDLI3 (Figura 17), foi identificado com 98% de similaridade com essa espécie de acordo com alinhamento da sequência obtida com sequências depositadas no Genbank. Essa bactéria, que foi isolada do lixo da colônia, é um coco Gram-positivo que apresentou atividade frente a sete micro-organismos patogênicos testados (Anexo 1). Espécies pertencentes ao gênero *Pediococcus* são homofermentativas e capazes de produzir ácido lático a partir de glicose, sendo encontradas em plantas, alimentos e bebidas como o vinho (YOUNG-RAN et al., 2013; PFANNEBECKER e FRÖHLICH, 2008; FRANS et al., 2006).

Figura 17. Foto do micro-organismo *Pediococcus stilesii* SDLI3, isolado do lixo da colônia de *S. depilis*.

O micro-organismo *Escherichia fergusonii* SDA3I2 (Figura 18), identificado com 98% de similaridade com essa espécie de acordo com o Genbank, foi isolado do corpo da abelha e apresentou-se ativo frente a sete micro-organismos patogênicos avaliados (Anexo 1). Essa espécie apresenta linhagens capazes de degradar hidrocarbonetos, sendo estudada para biorremediação de solos contaminados (PASUMARTHI et al., 2013; SRIRAM et al., 2011). A presença de hidrocarbonetos e ceras produzidas pelas abelhas, pode estar relacionada com o isolamento desse micro-organismo do corpo da abelha *S. depilis*. Talvez a bactéria *Escherichia fergusonii* SDA3I2 possa desempenhar um papel na degradação de hidrocarbonetos na colônia dessa abelha.

Figura 18. Foto do micro-organismo *Escherichia fergusonii* SDA3I2, isolado do corpo de *S. depilis*.

A bactéria *Pantoea eucrina* SDCEI1 (98% de similaridade com a espécie de acordo com o Genbank) (Figura 19), foi isolada de amostras do cerume estrutural da colônia (lamelas), foi ativo frente a cinco dos sete patógenos humanos testados na triagem em placa de Petri (Anexo 1). O gênero *Pantoea* é amplo e compreende tanto micro-organismos de vida livre quanto associados a hospedeiros, sendo que os

mesmos podem ser patogênicos ou não. Espécies do gênero *Pantoea* já foram isoladas parasitando insetos (NADARASAH e STAVRINIDES, 2014).

Figura 19. Foto do micro-organismo *Pantoea eucrina* SDCE11, isolado de amostras do cerume que compõe a estrutura da colônia de *S. depilis*.

O micro-organismo *Fructobacillus tropaeoli* SDMI2 (Figura 20), identificado com 98% de similaridade com a espécie no Genbank, foi isolado do mel de *S. depilis*, e apresentou atividade frente a todos os patógenos humanos testados conforme mostrado no anexo 1. Essa bactéria fermentativa é capaz de produzir ácido láctico a partir de carboidratos. Classificada como frutofílica, a mesma prefere se desenvolver em frutose ao invés de glicose. Espécies do gênero *Fructobacillus* já foram encontradas no trato gastrointestinal de insetos que consomem fontes de frutose (ENDO, 2012). A espécie *Fructobacillus tropaeoli* foi descrita em 2011 por Endo e colaboradores, sendo isolada da flor de *Tropaeolum majus* na África do Sul. Tal espécie também foi isolada de amostras de cacau (SNAUWAERT et al., 2012), porém esta é a primeira vez que a atividade antimicrobiana desse micro-organismo é relatada.

Figura 20. Foto do micro-organismo *Fructobacillus tropaeoli* SDMI2, isolado de mel de *S. depilis*.

Alguns trabalhos apontam o valor medicinal do mel de abelhas sem ferrão, dentre elas a atividade antimicrobiana (RAO et al., 2016). Nishio e colaboradores (2016) descreveram a atividade antimicrobiana de mel produzido por duas espécies de *Scaptotrigona* (*S. bipunctata* e *S. postica*). Analisando células bacterianas utilizando MEV, esses autores descreveram que no tratamento com o mel de *S. bipunctata* houve inibição da divisão celular e no teste com mel de *S. postica* ocorreu lise de células de *S. aureus* resistente à meticilina.

Os micro-organismos isolados do pólen foram muito ativos frente aos patógenos humanos testados (Anexos 1 e 2). Foram selecionadas sete linhagens isoladas do pólen (SDPI3, SDPI5, SDPI6, SDPI9, SDPI10, SDPQ1-01 e SDPQ1-02) para identificação. Todas as espécies foram identificadas como *Bacillus* sp. com 99% de similaridade com o gênero de acordo com o Genbank. A linhagem SDLI1, que foi isolada do intestino larval e apresentou atividade inibitória frente a patógenos humanos e entomopatógenos, também foi identificada como *Bacillus* sp. (99% de similaridade) (Figura 21).

Figura 21. Foto de *Bacillus* sp. linhagens SDPI3, SDPI5, SDPI6, SDPI9 e SDPI10, SDPQ1-01 e SDPQ1-02, isoladas do pólen, e SDLI1, isolada do intestino larval.

Bactérias do gênero *Bacillus* parecem ser simbiotes de abelhas e estudos apontam um processo coevolutivo. A partir de tecido abdominal da abelha extinta *Proplebeia dominicana*, que estava preservada em fragmentos de âmbar com mais de 20 milhões de anos, foi isolado DNA de *Bacillus* sp., mostrando que essa associação pode ser antiga (CANO et al., 1994; CANO e BORUCKI, 1995). Apesar de ser um estudo controverso e dividir opiniões no meio científico, esse trabalho mostra a importância de se entender a associação entre abelhas e bactérias do

gênero *Bacillus*. Esse gênero bacteriano é bastante encontrado em associação com abelhas sem ferrão, sendo isolados das células de cria, mel e pólen. Tais micro-organismos podem estar envolvidos na secreção de enzimas que degradam nutrientes do pólen para torná-lo mais nutritivo para estas abelhas, além de produzirem metabólitos secundários com atividade antimicrobiana (GILLIAM et al., 1990). Essas bactérias também estão associadas às abelhas do gênero *Apis* (GILLIAM, 1997).

4.3.2 Micro-organismos identificados devido o local de isolamento

Alguns micro-organismos não demonstraram capacidade inibitória frente aos patógenos humanos testados, porém, foram selecionados para identificação devido o interesse ecológico. Um deles foi a linhagem SDCP2, identificada como *Candida* sp. (99% de similaridade) (Figura 22). Este micro-organismo foi isolado de cerume presente nas células de cria. Através do sequenciamento e comparação dos dados com sequências depositadas no GenBank, foi possível perceber alta similaridade com *C. apicola*. É importante destacar que a linhagem *Candida* sp. SDLP1 foi isolada do interior da larva de *S. depilis*, indicando que esse gênero de levedura também pode colonizar o trato gastrointestinal da abelha no estágio larval.

Figura 22. Levedura *Candida* sp. SDCP2, isolada de cerume do favo de cria.

As leveduras são encontradas em associação com abelhas sem ferrão, especialmente os gêneros *Candida* e *Starmerella* (MENEZES et al., 2013; ROSA et al., 2003; GILLIAM, 1979b). Esses micro-organismos parecem desempenhar funções importantes para a colônia, como secreção de enzimas que metabolizam nutrientes no pólen armazenado, auxiliando na conservação e tornando este alimento mais nutritivo para as abelhas (MENEZES et al., 2013).

Juntamente com *Candida* sp. SDCP2, foi isolada do cerume presente no favo de cria a linhagem SDCP1 (Figura 23 A), que apresentou pequena atividade antimicrobiana frente ao patógeno *S. aureus* (Anexo 1). No entanto, por ser isolada de material presente no favo de cria de *S. depilis*, esse micro-organismo também foi selecionado para identificação da espécie, sendo caracterizado como *Monascus* sp. (100% de similaridade com o gênero) (Figura 23 B) através do sequenciamento da região 18S. A partir desse sequenciamento genético e comparação dos dados com o GenBank (NCBI) não foi possível a diferenciação entre as espécies *M. ruber*, *M. pilosus*, *M. purpureus* e *M. fuliginosus*. No entanto, através de uma metodologia taxonômica descrita por Hawksworth e Pitt (1983), fez-se a confirmação da espécie como *M. ruber* SDCP1.

Figura 23. A. Processo de isolamento do fungo filamentoso *Monascus ruber* SDCP1 e da levedura *Candida* sp. SDCP2 (pontos indicados na figura). B. Fungo *M. ruber* SDCP1, isolado de cerume do favo de cria.

Através do acompanhamento do crescimento fúngico em diferentes meios de cultura definiu-se essa espécie de *Monascus*. O ensaio foi realizado em triplicata, utilizando três meios de cultura diferentes, conforme descrito no item 3.6 da metodologia (Figura 24).

Figura 24. Identificação taxonômica do fungo *Monascus ruber* SDCP1. A. Crescimento em meio MEA, 35 mm; B. Crescimento em meio CYA, 31 mm; C. Crescimento em meio G25N, 22 mm.

Menezes e colaboradores (2015) descreveram a primeira evidência de comportamento parecido com agricultura microbiana em abelhas. Os pesquisadores perceberam que as larvas de *S. depilis* se alimentavam de um fungo presente no interior das células de cria. Larvas que não consumiam o fungo não completavam a metamorfose. Nesse trabalho, o fungo *Monascus* sp. foi identificado como o fungo-alimento, sendo isolado em meio de cultura Malte. Esses resultados corroboraram com o isolamento de *M. ruber* SDGP1 a partir de curume presente no favo de cria de *S. depilis*.

Através de imagens obtidas por MEV, foi possível visualizar as células microbianas do fungo-alimento que crescem a partir do cerume e em direção ao lúmen do favo de cria de *S. depilis* (Figura 25).

Figure 25. Imagens do fungo que cresce no interior das células de cria de *S. depilis* logo após a eclosão do ovo. A. MEV imagem mostrando os brotamentos a partir do cerume. B. MEV imagem mostrando o pseudomicélio. C. Imagem do fungo branco que serve como alimento para a larva de *S. depilis*.

Quando o material fúngico foi coletado cuidadosamente do interior das células de cria de *S. depilis* e semeado em placas de Petri contendo meios de cultura como PDA e ISP-2, nenhum crescimento microbiano foi observado. Esse fato indicou que a identificação do fungo-alimento por Menezes et al. (2015) poderia estar equivocada, uma vez que *M. ruber* SDCP1 facilmente se desenvolve nesses meios de cultura. Várias tentativas de isolamento microbiano foram feitas, até que com o uso de meio com alta concentração de glicose (meio 30G6) a linhagem SDBC30G1 foi isolada. Esse micro-organismo, posteriormente identificado como *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 pelo sequenciamento da região 18S, é osmofílico e necessita de um ambiente com alta concentração de carboidratos para se desenvolver, condição encontrada no alimento larval presente no interior dos favos de cria (HARTFELDER e ENGELS, 1989).

Com o intuito de avaliar se o fungo-alimento das larvas de *S. depilis* realmente tratava-se de *Zygosaccharomyces* sp., foi feito o isolamento do DNA de células microbianas coletadas diretamente do interior do favo de cria da abelha estudada, sendo sequenciada a região 18S. Esse resultado mostrou que a região 18S do DNA do fungo do ambiente era 100% similar ao de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, e apenas 89% similar ao de *M. ruber* SDCP1 (Sequências depositadas no Genbank com número de acesso KX999554, KX999556 e KX999557) (Figura 26).

Figura 26. Árvore filogenética de 18S rRNA, usando os *primers* NS1 e NS4. Números de acesso no Genbank KX999554, KX999556 e KX999557 (NCBI).

Nesses experimentos, verificou-se não haver DNA de *Candida* sp. SDCP2 na amostra de DNA do fungo ambiental devido ao tamanho dos *amplicons* da região do ITS e D1/D2 (26S) (Figura 27 A). Também foi verificada a ausência de DNA bacteriano nessa amostra, não havendo amplificação utilizando *primers* para região 16S (Figura 27 B). Para a confirmação da identidade do micro-organismo alimento das larvas, foram desenhados *primers* para amplificação de regiões específicas do

18S de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 e *M. ruber* SDCP1 (Item 3.6 da metodologia). Com isso, confirmou-se que o fungo-alimento de larvas da abelha sem ferrão *S. depilis* trata-se de *Zygosaccharomyces* sp., corrigindo a primeira proposição feita por Menezes e colaboradores (2015) (Figura 27 C). Possivelmente, isso ocorreu devido à contaminação de fragmentos de cerume no momento do isolamento, e também ao uso de meio de cultura não favorável para o desenvolvimento dessa levedura no trabalho anterior.

Figura 27. Géis de agarose (1%) com produtos de PCR para *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 (Z), fungo coletado diretamente das células de cria (BC), *M. ruber* SDCP1 (M), *Candida* sp. SDCP2 (C) e *Bacillus* sp. SDLI1 (B). A. Produtos de PCR usando *primers* NL1 e NL4 para região 26S e produtos de PCR usando *primers* ITS1 e ITS4 para região ITS. B. Produtos de PCR usando *primers* F27 e R1492 para região 16S. C. Produtos de PCR utilizando *primers* FMZ e RZ para região 18S específica para *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 e utilizando *primers* FMS e RM para região 18S específica de *M. ruber* SDCP1.

A identificação correta do micro-organismo alimento de *S. depilis* é extremamente importante para a comunidade científica que trabalha com abelhas. Esse tipo de sistema pode ocorrer em outras espécies, uma vez que *Zygosaccharomyces* spp. têm sido encontrados em outras colônias de abelhas (ČADEŽ et al., 2015; BRYSC-HERZBERG, 2004). Estudos envolvendo a simbiose entre fungos e abelhas podem ajudar a entender a biologia desses insetos e os impactos que o uso de fungicidas utilizados nas lavouras podem causar a esses polinizadores.

4.4 Sequenciamento do genoma de *Bacillus* sp. SDLI1

A bactéria *Bacillus* sp. SDL11 foi isolada do trato gastrointestinal de uma larva de *S. depilis* e apresentou atividade inibitória frente a fungos e bactérias patogênicas. Acredita-se que esse micro-organismo provenha do pólen, uma vez sete diferentes linhagens de *Bacillus* sp. foram isoladas do pólen, e as abelhas cuidadoras de cria (*nurse bees*) preparam o alimento larval a partir de pólen e mel, misturados com secreções glandulares (MICHENER, 2000). Para se entender melhor essa transferência microbiana, fez-se imagens de MEV de uma abelha cuidadora de cria (Figura 28).

Figura 28. MEV de uma abelha cuidadora de cria da espécie *S. depilis*. A. Imagem da abelha. B. Detalhe da presença de pólen na perna traseira da abelha. C. Grãos de pólen contendo estruturas bacilares.

Quando se analisa uma abelha *S. depilis*, é possível notar grande quantidade de pêlos recobrendo seu corpo, o que gera vantagens no momento de coleta de alimento, principalmente pólen. A abelha analisada realizava funções de cuidados com a cria e produção de alimento larval. A mesma apresentava fragmentos de pólen nas pernas, possivelmente adquiridos no momento de manipulação desse material para produção de alimento larval. Verificou-se que a microbiota presente nos potes de pólen pode ser transferida para o alimento das larvas. Na figura 28 C, nota-se estruturas bacilares que podem corresponder a *Bacillus* spp., indicando que essas bactérias presentes nos potes de pólen podem ser transferidas para o alimento das larvas. A acidez e grande quantidade de carboidratos do alimento larval

o tornam um ambiente inóspito para grande parte dos micro-organismos, mas os esporos de *Bacillus* spp. podem sobreviver a condições drásticas (WELLS-BENNIK et al., 2016).

Diante das características e potencialidade de *Bacillus* sp. SDLI1, decidiu-se que o genoma dessa bactéria fosse sequenciado e estudado. O cromossomo circular, que apresenta 4,13 Mb (Figura 29), codifica oito *clusters* gênicos biossintéticos para produção de metabólitos secundários. A predição dos genes biossintéticos de *Bacillus* sp. SDLI1 foi feita com auxílio dos *softwares* RAST (AZIZ et al., 2008) e antiSMASH (WEBER et al., 2015) e inspeções manuais. Os *clusters* gênicos biossintéticos encontrados apresentam alta similaridade (mais de 80%) para produção de fengicina, bacillomicina, bacillaeno, macrolactina, bacilisina, bacilibactina e difficidina.

Figura 29. Genes biossintéticos presentes no cromossomo circular de *Bacillus* sp. SDLI1, bem como exemplos de estruturas potencialmente produzidas pelos mesmos.

Os policetídeos bacillaeno, inibidor da síntese proteica em procariotos (PATEL et al., 1995); macrolactina, inibidor da enzima bacteriana peptídeo deformilase (YOO et al., 2006); e difficidina; também inibidor da síntese proteica bacteriana (ZWEERINK e EDISON, 1987), mostram o potencial antibacteriano dessa linhagem. Produtos naturais produzidos por enzimas peptídeo sintases não ribossomais (NRPS), como os lipopeptídeos cíclicos surfactina, bacillomicina e fengicina, apresentam atividade antimicrobiana reconhecida contra fungos (TANAKA et al., 2014; KAUR et al., 2016; FARZANEH et al., 2016) e bactérias (MORA et al., 2015), principalmente pela característica anfifílica e capacidade de formar poros em membranas biológicas (PATEL et al., 2015; INÈS e DHOUHA, 2015). Surfactinas são estruturas importantes para *Bacillus* spp., pois funcionam como sinalizadores celulares para produção de matrix extracelular, que está diretamente relacionada com a motilidade bacteriana (LÓPES e KOLTER, 2010). Os peptídeos bacilisina, inibidor da síntese de glicosamina, componente da parede celular de fungos e bactérias (KENIG e ABRAHAM, 1976); e o sideróforo bacillibactina (MIETHKE et al., 2006), reforçam o potencial de inibição microbiana de *Bacillus* sp. SDLI1. Essas estruturas químicas, quando produzidas, podem garantir a sobrevivência da bactéria produtora e proteger a colônia de *S. depilis* contra micro-organismos invasores.

Análises de genes conservados para a caracterização dessa espécie de *Bacillus* (*dnaJ*, *rpoB*, *gyrA* e *recA*) revelaram que *Bacillus* sp. SDLI1 é membro do grupo de *B. subtilis*. Uma comparação do genoma da linhagem SDLI1 com linhagens bacterianas desse grupo mostrou que *Bacillus* sp. SDLI1 é próximo de *B. siamensis* KCTC 13613^T (82.7%, Genbank número AJVF00000000.1) e *B. siamensis* XY10 (82.6%, Genbank número LAGT00000000.1), baseado em análises *in silico* (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013).

4.5 Isolamento de metabólitos de *Bacillus* sp. SDLI1

Bacillus sp. SDLI1 foi selecionado para estudos químicos por apresentar interessante atividade antimicrobiana (Anexos 1 e 2). A análise do genoma confirmou a capacidade dessa bactéria em produzir produtos naturais bioativos. Adicionalmente, o isolamento dessa linhagem do trato gastrointestinal da larva indicou uma possível associação simbiótica de *Bacillus* sp. SDLI1 e *S. depilis*, e o estudo químico dessa bactéria poderia ajudar no entendimento dessa associação.

4.5.1 Cultivo em escala ampliada 1: Uso de resina Sephadex

O extrato em acetato de etila, obtido no primeiro cultivo em escala ampliada de *Bacillus* sp. SDLI1 (2,791 g) foi fracionado em coluna aberta contendo resina Sephadex LH-20, utilizando metanol como eluente, para ao final, originar 10 diferentes frações.

Em uma dessas 10 frações, foi obtido um precipitado (184,6 mg), que foi lavado com metanol gelado e analisado por RMN (Figura 30) e espectrometria de massas. Verificou-se então se tratar de uma mistura de lipopeptídeos da família das surfactinas (ROMANO et al., 2013). Tal fração apresentou atividade antifúngica frente ao patógeno humano *C. albicans* ATCC 10231, com concentração inibitória mínima (MIC) de 50 µg/mL, enquanto que o MIC do antifúngico miconazol foi de 16 µg/mL.

Figura 30. Espectro de RMN de ¹H de fração isolada de *Bacillus* sp. SDLI1 (CD₃OD, 500 MHz).

O espectro de RMN de ¹H dessa amostra é complexo devido à sobreposição dos sinais dos hidrogênios metilênicos e metílicos. Observam-se deslocamentos químicos típicos de hidrogênios alfa de aminoácidos (δ_H 5,30-4,00) e da cadeia alquílica longa (δ_H 1,40-0,80).

Visando o isolamento dessas surfactinas, essa fração foi purificada em HPLC na modalidade semipreparativa. O perfil cromatográfico observado e as condições utilizadas no isolamento estão descritos na figura 31.

Figura 31. Perfil químico da separação de surfactinas produzidas por *Bacillus* sp. SDLI1. Condições cromatográficas: Coluna C₁₈ semipreparativa (Machery-Nagel, Nucleosil 250x10 mm, 120-5 Å), fase móvel isocrática composta por acetonitrila:água (8:2, v/v) acrescida de 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA), vazão da fase móvel de 3 mL/min, detecção por UV-Vis monitorado em 210 e 225 nm, tempo de corrida de 60 min.

Após o isolamento em HPLC, as sete bandas cromatográficas coletadas foram submetidas a análises espectroscópicas e espectrométricas, comprovando se tratar de lipodepsipeptídeos semelhantes. Na tabela 2 são apresentadas as massas moleculares em alta resolução, assim como as fórmulas moleculares das estruturas isoladas.

É preciso destacar também a presença de bandas cromatográficas isoladas em tempos de retenção distintos e que apresentaram a mesma massa e fórmula molecular (Tabela 2). Isso foi observado nos lipodepsipeptídeos **B1** e **B3** (m/z 1022 $[M+H]^+$), lipodepsipeptídeos **B4** e **B6** (m/z 1036 $[M+H]^+$) e lipodepsipeptídeos **B5** e **B7** (m/z 1050 $[M+H]^+$). A presença de isômeros é bastante comum em surfactinas (PHATAK et al., 2014). Esses lipodepsipeptídeos frequentemente são isolados em misturas complexas, sendo caracterizados com o auxílio de técnicas espectrométricas (MS/MS) (HUI et al., 2001). Os espectros de massas em alta resolução dos lipodepsipeptídeos isolados estão no anexo 3.

Tabela 2. Fórmulas e massas moleculares de surfactinas (**B1-B7**) isoladas de *Bacillus* sp. SDLI1.

Surfactina	Fórmula molecular	Massa encontrada	Massa calculada	Erro (ppm)
B1	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022,6744 [M+H] ⁺	1022,6748 [M+H] ⁺	0,4
B2	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008,6588 [M+H] ⁺	1008,6591 [M+H] ⁺	0,4
B3	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022,6744 [M+H] ⁺	1022,6748 [M+H] ⁺	0,4
B4	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1058,6721 [M+Na] ⁺	1058,6724 [M+Na] ⁺	0,3
B5	C ₅₄ H ₉₅ N ₇ O ₁₃	1050,7061 [M+H] ⁺	1050,7061 [M+H] ⁺	0,0
B6	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1036,6906 [M+H] ⁺	1036,6904 [M+H] ⁺	0,2
B7	C ₅₄ H ₉₅ N ₇ O ₁₃	1072,6880 [M+Na] ⁺	1072,6880 [M+Na] ⁺	0,0

Determinou-se a sequência de aminoácidos das surfactinas **B1** e **B5** utilizando espectrometria de massas sequencial. Nas figuras 32 e 33 estão apresentados os espectros de MS/MS dessas moléculas protonadas. Para a fragmentação, utilizou-se N₂ como gás de colisão, sendo os espectros apresentados na energia de 40 eV.

Figura 32. Espectro de ESI-MS/MS do lipopeptídeo **B1** (1022 [M+H]⁺, 40 eV).

Figura 33. Espectro de ESI-MS/MS do lipopeptídeo **B5** (1050 $[M+H]^+$, 40 eV).

Os perfis de fragmentação dessas substâncias são muito semelhantes aos das surfactinas descritas por Korenblum e colaboradores (2012). Diante disso, a sequência dos aminoácidos e as rotas de fragmentação dos lipopeptídeos **B1** (1022,6744 $[M+H]^+$) e **B5** (1050,7061 $[M+H]^+$) foram propostas (Figura 34).

De acordo com a literatura, nota-se que há duas rotas de fragmentação (A e B) concomitantes, sendo o pico base o íon m/z 685, correspondente à sequência Leu/Ile-Leu/Ile-Val-Asp-Leu/Ile-Leu/Ile nos lipopeptídeos **B1** (1022,6744 $[M+H]^+$) e **B5** (1050,7061 $[M+H]^+$), após a perda da porção lipídica juntamente com ácido glutâmico (Mecanismo A) (KORENBLUM et al., 2012).

O íon de m/z 441 é correspondente à sequência peptídica Leu/Ile-Leu/Ile-Val-Asp. Este íon pode ser formado a partir do íon de m/z 685. Por sua vez, o íon de m/z 441 pode originar o íon de m/z 227, que corresponde a duas leucinas ou isoleucinas. Isso ocorre para **B1** e **B5** através do mecanismo A proposto.

Figura 34. Esquema de fragmentação dos lipopeptídeos **B1** e **B5**. Obs. como Leu e Ile apresentam a mesma massa, não é possível diferenciar estes aminoácidos a partir dos dados de MS/MS.

Já no mecanismo B, observa-se a perda subsequente de aminoácidos, com permanência da porção lipídica (Ácido graxo-Glu). Com isso, observa-se duas perdas consecutivas de 113 u (2 Leu/Ile), perda de 115 u (Asp), perda de 99 u (Val) e duas perdas de 113 u (2 Leu/Ile) no caso dos lipodepsipeptídeos **B1** e **B5**, confirmando a sequência.

Analisando o conjunto gênico responsável pela biossíntese de surfactinas em *Bacillus* sp. SDLI1, verificou-se que todas as surfactinas isoladas apresentam a mesma cadeia peptídica que corresponde a L-Glu-L-Leu-L/D-Leu-L-Val-L-Asp-L/D-Leu-L-Leu, e se diferem pela composição da cadeia lipídica (Figura 35).

Figura 35. Enzimas e rota biossintética para produção de surfactinas (B1-B7) presente no genoma de *Bacillus* sp. SDLI1.

4.5.2 Cultivo em escala ampliada 2: Isolamento guiado pela atividade

O cultivo em escala ampliada 2 foi realizado para emprego da metodologia de isolamento guiado pela atividade e, com isso, otimizar a obtenção de metabólitos antifúngicos. No entanto, algo inusitado aconteceu quando se analisou o extrato utilizando LC-MS, em que não foram detectadas as surfactinas produzidas em grande quantidade no primeiro cultivo (Item 4.5.1). Isso pode ter acontecido devido a mudanças sutis na composição do meio de cultura, temperatura, umidade e tempo de estocagem do micro-organismo. Esses fatores podem alterar a regulação gênica, interferindo na produção de surfactinas nesse cultivo. Por exemplo, em uma colônia de *B. subtilis* existem diferentes subpopulações que desempenham papéis específicos dentro colônia, e isso é gerido pela fosforilação de reguladores que alteram a expressão gênica. Dentre essas subpopulações existem os produtores de surfactinas (LÓPES e KOLTER, 2010). Provavelmente, no segundo cultivo de *Bacillus* sp. SDLI1, a sinalização celular foi alterada e a quantidade de células produtoras de surfactinas diminuiu consideravelmente.

Para verificar qual metabólito antifúngico estaria sendo expresso no segundo cultivo em escala ampliada de *Bacillus* sp. SDLI1, utilizou-se uma metodologia de fracionamento e isolamento guiado pela atividade frente ao patógeno *C. albicans* ATCC MYA - 2876 (Item 3.9.2 da metodologia). A atividade antimicrobiana apresentada pelas frações 22 e 23 do extrato em acetato de etila podem ser visualizadas na figura 36. Os halos inibitórios foram medidos e descritos na tabela 3.

Figure 36. Halos inibitórios das frações 22 e 23 do extrato em acetato de etila de *Bacillus* sp. SDLI1 frente ao patógeno *C. albicans* ATCC MYA – 2876 e do controle positivo clotrimazol 100 µg/mL.

Tabela 3. Halos inibitórios (mm) das frações 22 e 23 do extrato em acetato de etila de *Bacillus* sp. SDLI1 frente ao patógeno *C. albicans* ATCC MYA - 2876.

Fração (3 µL)	24 h	48 h
22	13	13
23	12	12
Clotrimazol (100 µg/mL)	15	15

Quando essas frações foram analisadas por LC-MS, verificou-se que nas duas frações havia um sinal correspondente a um produto natural com m/z 1071 $[M-H]^-$ (Figura 37).

Figura 37. Perfil químico em LC-MS das frações 22 e 23 do extrato em acetato de etila de *Bacillus* sp. SDLI1, ambas apresentando o íon de m/z 1071 $[M-H]^-$.

Com análises de espectrometria de massas em alta resolução, verificou-se que esse íon apresentava provável fórmula molecular $C_{51}H_{80}N_{10}O_{15}$ (m/z encontrado 1073,5885 $[M+H]^+$; m/z calculado 1073,5877 $[M+H]^+$, erro 0,7 ppm) (Figura 38). Buscas no banco de dados AntiBase não indicaram candidatos para esta fórmula molecular, sugerindo se tratar de um novo produto natural.

Figure 38. HRESIMS do íon m/z 1073 $[M+H]^+$ obtido da fração 22 do extrato em acetato de etila de *Bacillus* sp. SDLI1, ativa frente ao patógeno *C. albicans* ATCC MYA – 2876.

Para otimizar o isolamento, optou-se por um fracionamento prévio utilizando cartucho de SPE. A fração eluída com 85% de metanol (12,4 mg) foi elegida para o isolamento utilizando HPLC semipreparativa (Figura 39), após análises por LC-MS.

Figure 39. Perfil químico da fração eluída em 85% de metanol, obtida do extrato em acetato de etila de *Bacillus* sp. SDLI1.

Dessa fração, 10 mg foram utilizados para o isolamento de 0,5 mg (Fração 16) do metabólito de interesse (**B8**). O perfil químico obtido durante o isolamento pode ser visualizado na figura 40.

Figure 40. Perfil químico do fracionamento em HPLC semipreparativa da fração eluída em 85% de metanol, obtida do extrato em acetato de etila de *Bacillus* sp. SDLI1.

A amostra isolada foi analisada por métodos de RMN uni e bidimensionais, e foram identificados os aminoácidos presentes em **B8**, bem como o ácido graxo *anteiso*-hexadecanóico. Apesar de não ser possível determinar a sequência de aminoácidos desse lipopeptídeo através de RMN, os dados adquiridos foram condizentes com os aminoácidos e ácido graxo presentes no lipopeptídeo *anteiso*-C₁₇ bacillomicina D (**B8**) (Asn-Tyr-Asn-Pro-Glu-Ser-Thr-3-amino-14-metil ácido hexadecanóico). Essa estrutura já havia sido descrita por Tanaka et al. (2014), produzida pela linhagem *Bacillus amyloliquefaciens* SD-32, isolada de solo, e cujo metabólitos apresentaram-se ativos frente ao fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea*. O espectro de RMN de ¹H de **B8** pode ser visualizado na figura 41.

Figure 41. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 600 MHz) de bacillomicina D (**B8**) produzida por *Bacillus* sp. SDLI1.

O espectro de RMN de ^1H de bacillomicina D é complexo e mostra vários sinais característicos de estruturas lipopeptídicas. Apresenta sobreposições de sinais de hidrogênios metilênicos da cadeia alifática do ácido hexadecanóico em δ_{H} 1,29. A presença de *anteiso*- C_{17} ácido graxo foi confirmada pelos sinais triplete ($J = 7,2$) e duplete ($J = 6,4$) em δ_{H} 0,88 (Detalhe na figura 41). No caso de um *iso*- C_{17} ácido graxo, seria visualizado apenas um duplete correspondente aos seis hidrogênios das metilas terminais. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios alfa de aminoácidos são bem característicos com δ_{H} 4,90-4,26. Os espectros de *g*HSQC, *g*HMBC e *g*TOCSY de bacillomicina D estão no anexo 4. Determinou-se todos os aminoácidos presentes nesse lipopeptídeo, mas não foi possível concluir a sequência de aminoácidos na cadeia peptídica cíclica com os dados de RMN obtidos (Figura 42).

Figure 42. Deslocamentos químicos e correlações hidrogênio-carbono (gHMBC) e hidrogênio-hidrogênio (gTOCSY) dos aminoácidos e ácido graxo presente na bacillomicina D (**B8**) produzida por *Bacillus* sp. SDLI1.

Com auxílio dos *softwares* RAST e antiSMASH para predição das enzimas presentes no *cluster* gênico biossintético de bacillomicina D (**B8**), foi possível determinar a sequência de aminoácidos presentes na estrutura e prever a configuração absoluta de quatro deles. Em algumas posições existem epimerases que podem fazer a conversão de um aminoácido L para um D, mas a reação de epimerização pode ou não acontecer, não sendo possível a predição nesses casos (Figura 43). No entanto, no trabalho descrito por Tanaka et al. (2014), as epimerizações desses aminoácidos foram observadas.

Figura 43. Enzimas e rota biossintética para produção de bacillomicina D (**B8**) presente no genoma de *Bacillus* sp. SDLI1.

A biossíntese de produtos naturais antimicrobianos por *Bacillus* sp. SDLI1 indica uma vantagem para o hospedeiro *S. depilis* nessa relação de simbiose.

Bacillus sp. SDLI1 pode proteger a abelha, nesse caso em especial, a larva de onde foi isolado, contra micro-organismos invasores que poderiam prejudicar o desenvolvimento larval.

Apesar de *Bacillus* sp. SDLI1 apresentar importante atividade antifúngica frente aos patógenos humanos e entomopatógenos (Descrita no item 4.2), essa bactéria mostra-se mais inócua frente aos fungos presentes no favo de cria de *S. depilis* (Figura 44). Provavelmente, isso ocorreu devido a possíveis mecanismos de resistência desses fungos frente aos antimicrobianos produzidos por *Bacillus* sp. SDLI1. Essa resistência pode indicar um processo coevolutivo.

Figure 44. Ensaio de inibição de *Bacillus* sp. SDLI1 frente a micro-organismos isolados do favo de cria de *S. depilis* (esquerda) em comparação com o controle positivo clotrimazol 100 µg/mL (direita), após 14 dias de cultivo a 30°C. A. Inibição de *Candida* sp. SDCP2. B. Inibição de *M. ruber* SDCP1. C. Inibição de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1.

É possível visualizar que *Bacillus* sp. SDLI1 não inibiu o crescimento de *Candida* sp. SDCP2 (Figura 44 A), enquanto o controle positivo apresentou halo de 42 mm. Houve mudança fenotípica de *M. ruber* SDCP1 (Figura 44 B), mas a inibição não foi efetiva e o fungo pôde ainda se desenvolver. Esse efeito fraco de inibição

pode controlar o crescimento exacerbado de *M. ruber* SDCP1 no favo de cria. O halo inibitório apresentado pelo clotrimazol (100 µg) foi de 26 mm. *Bacillus* sp. SDLI1 inibiu fracamente o crescimento de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1. Em contrapartida, o controle positivo foi extremamente ativo, inibindo totalmente o crescimento do fungo-alimento de *S. depilis* (Figura 44 C).

Além de mostrar que os antimicrobianos produzidos por *Bacillus* sp. SDLI1 não apresentam um efeito inibitório pronunciado frente aos fungos residentes do favo de cria, esse experimento destacou o efeito inibitório de agentes antifúngicos como o clotrimazol. Esse fato indica que os fungos associados à abelha *S. depilis* podem sofrer com o uso pesticidas com atividade antifúngica na agricultura, uma vez que azóis são amplamente utilizados contra fitopatógenos, permanecendo ativos no ambiente por meses após a aplicação (HOF, 2001).

4.6 Produção de bacteriófago por *Bacillus* sp. SDLI1

Através do uso de *software* PHAST, foi verificada a presença de sete possíveis pró-fagos no genoma de *Bacillus* sp. SDLI1 (Tabela 4). Pró-fago é o material genético de um fago integrado ao genoma bacteriano e capaz de expressar componentes de um fago a partir de estímulos específicos.

Tabela 4. Resultado da análise do genoma de *Bacillus* sp. SDLI1 pelo *software* PHAST.

REGION	REGION_LENGTH	COMPLETENESS	SCORE	#CDS	REGION_POSITION	POSSIBLE PHAGE	GC_PERCENTAGE	DETAIL
1	76.4Kb	incomplete	40	116	20-76502	PHAGE_Bacill_SPB c2_NC_001884,	39.60%	Detail
2	36.6Kb	incomplete	60	29	153952-190642	PHAGE_Bacill_phil 05_NC_004167,	36.80%	Detail
3	18.5Kb	incomplete	30	13	494076-512611	PHAGE_Megavi_ch iliensis_NC_016072,	45.79%	Detail
4	32.8Kb	intact	110	49	966595-999471	PHAGE_Brevib_Os ris_NC_028969,	46.64%	Detail
5	64.2Kb	intact	150	51	1345792-1410030	PHAGE_Paenib_Xe nia_NC_028837,	43.80%	Detail
6	16.7Kb	incomplete	40	20	2909770-2926505	PHAGE_Ectoca_sili culosus_virus_1_NC46.27% _002687,		Detail
7	113.2Kb	incomplete	60	136	4019134-4132387	PHAGE_Bacill_SPB c2_NC_001884,	36.40%	Detail

Bacteriófagos ou fagos são vírus que infectam bactérias. Eles são a forma de vida mais abundante no planeta e apresentam importante potencial biotecnológico e terapêutico (BRÜSSOW e HENDRIX, 2002). Desde seu descobrimento a cerca de

100 anos, os fagos ajudaram no desenvolvimento de conhecimento biotecnológico relacionado com a transcrição e tradução do DNA, evolução bacteriana, descoberta de novas tecnologias e técnicas na biologia moderna como o sistema CRISPR-Cas (SALMOND e FINERAN, 2015).

Esses vírus bacterianos podem apresentar dois ciclos de vida diferentes. Em um ciclo lítico, os fagos replicam-se dentro da célula bacteriana infectada e geram múltiplas réplicas do fago, ocasionando a lise celular. Já no caso de fagos temperados ou lisogênicos, o material genético da partícula viral se insere no genoma bacteriano e permanece em latência, se replicando juntamente com o material genético do hospedeiro. Assim que recebe um estímulo ele pode se tornar lítico e liberar novas partículas do fago (FEINER et al., 2015). A aplicação de bacteriófagos como agentes antimicrobianos é bastante promissora, porém ainda pouco explorada. O uso intensivo de antibióticos, aliado a poucos estudos envolvendo o uso racional de fagos na terapêutica, dificultou o desenvolvimento dessa potencialidade (PIRES et al., 2016).

No caso dos pró-fagos presentes no genoma de *Bacillus* sp. SDLI1, apenas dois estavam preditos como completos, ou seja, com potencial de serem expressos. O pró-fago número 5 na tabela 4 apresentou maior similaridade com o material genético do fago Xenia (GenBank # NC_028837), capaz de infectar *Paenibacillus larvae*, o patógeno causador da doença da cria pútrida americana (*American Foulbrood Disease* - AFB), uma infecção muito prejudicial para abelhas *Apis mellifera* (TSOURKAS et al., 2015).

Com a intenção de investigar se *Bacillus* sp. SDLI1 possuía algum pró-fago ativo para produção de fagos líticos para *P. larvae*, foi utilizado o indutor mitomicina C. Após a indução, o DNA do fago produzido foi purificado e sequenciado. Esse fago, nomeado SDLI1-1, foi testado frente ao patógeno *P. larvae* ATCC 9545 e algumas linhagens de *Bacillus*, isoladas do pólen de *S. depilis*.

Foi verificado que o fago SDLI1-1 foi lítico para *P. larvae* ATCC 9545 diminuindo a densidade óptica de cultivos líquidos quando comparado com controles. Essa atividade foi confirmada pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Em meio MYPGP líquido, verificou-se que a cultura de *P. larvae* ATCC 9545 cultivada com o fago SDLI1-1 (2% v/v) apresentou OD₆₀₀ 3,4, enquanto a cultura controle apresentou OD₆₀₀ 4,3 após 16 h de incubação. Em outro experimento, um cultivo de *P. larvae* ATCC 9545 cultivado com fago SDLI1-1 (10%)

apresentou $1,23 \times 10^4$ UFC/mL, enquanto o controle apresentava $7,3 \times 10^8$ UFC/mL após 48 h de incubação, diminuindo pela metade o número de UFC.

No entanto, não foi possível visualizar placas formadas pela atividade do fago SDLI1-1 frente ao patógeno *P. larvae* ATCC 9545 usando a metodologia de *soft* ágar. Para contar o número de placas formadas por esse fago, utilizou-se a bactéria *Bacillus* sp. SDPI10, isolada do pólen de *S. depilis*, e também sensível a esse fago. O número de placas formadas foi 1×10^4 placas/mL (Figura 45). O fago produzido pela linhagem SDLI1 apresentou 36,6 Kb, e se trata do pró-fago número 2 da tabela 4, indicado pelo *software* PHAST como incompleto. Essa ferramenta também indicou uma maior similaridade com o fago phi105 (GenBank # NC_004167). No entanto, quando se compara as sequências gênicas desses dois fagos, verifica-se apenas 1% de similaridade. O fago SDLI1-1 ainda não foi descrito na literatura.

Figura 45. Placas formadas pelo fago SDLI1-1 frente ao *Bacillus* sp. SDPI10.

Análises microscópicas do fago SDLI1-1 mostraram que o mesmo apresenta aproximadamente 40 nm de diâmetro e cabeça (capsídeo) icosaédrica (Figura 46). Apresenta cauda curta e se enquadra na família *Podoviridae* pelas características observadas (ACKERMANN, 2009).

Figura 46. Microscopia eletrônica do fago SDLI1-1.

Algumas tentativas de se usar fagos no combate a infecções causadas por *P. larvae* já foram testadas. Ghorbani-Nezami e colaboradores (2015) avaliaram a capacidade de tratamento e prevenção de diferentes fagos frente a esse patógeno. Esses autores descreveram que os fagos usados de maneira profilática aumentaram a taxa de sobrevivência de larvas expostas a esporos de *P. larvae*. Os fagos aparentemente não apresentaram efeitos deletérios aos insetos. A presença de *Bacillus* sp. SDLI1, produtor do fago SDLI1-1, pode indicar uma vantagem para a larvas de *S. depilis*, protegendo-as contra infecções causadas por *P. larvae*. Esse micro-organismo pode ser explorado como um probiótico para a prevenção e/ou tratamento de AFB em trabalhos futuros. Esses resultados demonstram a importância biotecnológica de estudos envolvendo micro-organismos associados a insetos.

4.7 Policetídeos produzidos por *M. ruber* SDCP1

O gênero *Monascus* é conhecido pela produção de policetídeos que apresentam pigmentação amarela, alaranjada e vermelha, sendo que muitos desses compostos apresentam propriedade anticolesterolêmica (JUZLOVÁ et al., 1996), citotóxica (SU et al., 2005), anti-inflamatória (AKIHISA et al., 2005) e antimicrobiana (WANG et al., 2002). Arroz fermentado por fungos filamentosos do gênero *Monascus* é muito utilizado na medicina tradicional chinesa, e estudos sugerem a melhora da circulação sanguínea das pessoas que consomem esse produto. Isso se deve, principalmente, pela produção de metabólitos pertencentes à classe do policetídeo lovastatina (ou monacolina K), que apresenta atividade anticolesterolêmica reconhecida (MA et al., 2000).

M. ruber SDCP1 foi cultivado em meio arroz para obtenção de metabólitos secundários, em condições semelhantes àsquelas tradicionais chinesas (Figura 47).

Figura 47. Cultivo de *M. ruber* SDCP1 em meio arroz por 30 dias a 30 °C. A. Controle meio arroz. B. Cultivo de *M. ruber* SDCP1. C. Perfil químico do extrato em acetato de etila do cultivo de *M. ruber* SDCP1. Condições: Coluna Gemini 5 μ m, C₆-Fenil 110Å, 250x4,6 mm, com gradiente composto por acetonitrila:água (iniciando com 10% de acetonitrila e atingindo 100% em 20 min, permanecendo 100% de acetonitrila até 30 min, em seguida retornando para 10% gradativamente durante 2 min e permanecendo em 10% de acetonitrila entre 32 min e 37 min) monitoramento a 365 nm.

Foram utilizados 135 mg de extrato em acetato de etila de *M. ruber* SDCP1 (rendimento total do extrato 939,2 mg) para isolamento de cinco metabólitos utilizando HPLC na modalidade semipreparativa (Figura 48).

Figura 48. Perfil químico observado durante o isolamento de metabólitos do extrato em acetato de etila do cultivo de *M. ruber* SdFCP01 em meio arroz. Condições: Coluna Gemini 5 μ m, C₆-Fenil 110Å, 250x10 mm, gradiente metanol:água, iniciando com 80% de metanol, chegando a 90% de metanol em 10 min e 100% em 12 min, permanecendo em 100% até 15 min e retornando para 80% em 16 min, finalizando a corrida com 20 min, vazão 4 mL/min, 225 nm.

Foram isolados 0,7 mg do metabólito **M1**; 4,3 mg do metabólito **M2**; 10,4 mg do metabólito **M3**; 3,1 mg do metabólito **M4** e 2,5 mg do metabólito **M5**. Porém, somente os dois metabólitos majoritários (**M2** e **M3**) apresentavam um grau de pureza necessário para a determinação estrutural utilizando técnicas espectroscópicas (Figura 49).

Figura 49. A. Cromatograma e espectro de absorção no ultravioleta do metabólito **M2** isolado do cultivo de *M. ruber* SDCP1 em meio arroz por 30 dias a 30 °C. B. Cromatograma e espectro de absorção no ultravioleta do metabólito **M3** isolado do cultivo de *M. ruber* SDCP1 em meio arroz por 30 dias a 30 °C. Condições: Coluna Gemini 5 µm, C₆-Fenil 110Å, 250x4,6 mm, com gradiente composto por acetonitrila:água (iniciando com 10% de acetonitrila e atingindo 100% em 20 min, permanecendo 100% de acetonitrila até 30 min, em seguida retornando para 10% gradativamente durante 2 min e permanecendo em 10% de acetonitrila entre 32 min e 37 min).

O metabólito **M2** trata-se do policetídeo monascinol e o metabólito **M3** trata-se do análogo monascina, oxidado na posição 16 (Figura 50).

Figura 50. Estruturas químicas de monascinol (**M2**) e monascina (**M3**).

Os espectros de RMN de ¹H dos metabólitos monascinol e monascina são apresentados na figura 51. Os dados espectroscópicos são semelhantes aos descritos na literatura para **M2** e **M3** (LI et al., 2013; HSU et al, 2010).

Figura 51. Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de metabólitos isolados do extrato em acetato de etila do cultivo em arroz de *M. ruber* SDCP1. A. Monascinol **M2**. B. Monascina **M3**.

A determinação estrutural de tais metabólitos foi feita através de análises espectrométricas (Tabela 5) e espectroscópicas (Tabela 6). Os espectros de RMN 1D e 2D e de massas em alta resolução de monascinol (**M2**) e de monascina (**M3**) estão nos anexos 5 e 6.

Tabela 5. Fórmulas moleculares, m/z acurada e calculada, com seus respectivos erros em ppm do metabólito **M2**, monascinol, e metabólito **M3**, monascina.

Metabólito	Fórmula molecular	m/z acurada	m/z calculada	Erro (ppm)
Monascinol	$C_{21}H_{28}O_5$	361,2016 $[M+H]^+$	361,2010 $[M+H]^+$	1,6
Monascina	$C_{21}H_{26}O_5$	359,1848 $[M+H]^+$	359,1853 $[M+H]^+$	1,4

Tabela 6. Dados de RMN de 1H do metabólito **M2**, monascinol, e metabólito **M3**, monascina, com respectivas comparações com a literatura.

Posição	Monascinol (M2) δ_H (ppm), J (Hz) $CDCl_3$, 500 MHz	Monascinol δ_H (ppm), J (Hz) $CDCl_3$, 600 MHz (LI et al., 2013)	Monascina (M3) δ_H (ppm), J (Hz) $CDCl_3$, 500 MHz	Monascina δ_H (ppm), J (Hz) $CDCl_3$, 200 MHz (HSU et al., 2010)
1	1,87 (3H, dd, $J = 6,9, 1,3$)	1,85 (3H, dd, $J = 6,6, 1,2$)	1,87 (3H, d, $J = 6,8$)	1,84 (3H, d, $J = 6,0$)
2	6,50 (1H, dq, $J = 15,2, 6,9$)	6,47 (1H, dt, $J = 15,0, 6,6$)	6,50 (1H, dq, $J = 15,1, 6,8$)	6,47 (1H, dt, $J = 15,4, 6,0$)
3	5,89 (1H, ddl, $J = 15,2, 1,3$)	5,88 (1H, dd, $J = 15,0, 1,2$)	5,90 (1H, dl, $J = 15,1$)	5,85 (1H, d, $J = 15,4$)
5	5,28 (1H, s)	5,28 (1H, d, $J = 3,6$)	5,27 (1H, s)	5,26 (1H, s)
7	2,73 (1H, dd, $J = 17,6, 4,0$), 2,57 (1H, dd, $J = 17,6, 11,7$)	2,72 (1H, dd, $J = 18,0, 3,6$) 2,56 (1H, dd, $J = 18,0, 12,0$)	2,67 (1H, dd, $J = 17,5, 4,1$), 2,43 (1H, dd, $J = 17,5, 11,5$)	2,99 (1H, m), 2,64 (1H, m)
8	3,03 (1H, ddd, $J = 12,9, 11,7$, 4,0)	3,00 (1H, td, $J = 12,0, 4,2$)	3,23 (1H, ddd, 13,2, 11,5, 4,1)	3,14 (1H, m)
12	5,05 (1H, dl, $J = 12,6$), 4,70 (1H, dl, $J = 12,6$)	5,01 (1H, dd, $J = 12,6, 1,2$) 4,69 (1H, d, $J = 12,0$)	5,06 (1H, d, $J = 12,5$), 4,71 (1H, d, $J = 12,5$)	5,02 (1H, d, $J = 12,6$), 4,67 (1H, d, $J = 12,6$)
13	1,42 (3H, s)	1,40 (3H, s)	1,44 (3H, s)	1,43 (3H, s)
15	2,74 (1H, dd, $J = 12,9, 3,1$)	2,73 (1H, dd, $J = 13,2, 3,0$)	3,66 (1H, d, $J = 13,2$)	3,64 (1H, d, $J = 9,0$)
16	4,20 (1H, m)	4,16 (1H, dt, $J = 9,0, 3,6$)	-	-
17	1,55 (3H, m), 1,32 (5H, m)	1,54 (2H, m)	3,01 (1H, dt, $J = 18,0, 7,3$) 2,60 (1H, dt, $J = 18,0, 7,3$),	2,70 (1H, m), 2,49 (1H, m)
18	1,55 (3H, m)	1,54 (1H, m), 1,31 (1H, m)	1,62 (2H, qui, $J = 7,2$)	1,61 (2H, m)
19	1,32 (5H, m)	1,31 (2H, m)	1,30 (4H, m)	1,30 (4H, m)
20	1,32 (5H, m)	1,31 (2H, m)	1,30 (4H, m)	1,30 (4H, m)
21	0,90 (3H, t, $J = 6,4$)	0,89 (3H, t, $J = 6,6$)	0,89 (3H, t, $J = 6,7$)	0,88 (3H, t, $J = 6,6$)

As configurações relativas foram determinadas através de experimentos de NOEdiff (*Nuclear Overhauser Experiment difference spectrum*) com irradiação de H-8 em **M2** e **M3** (Anexos 5 e 6). Nesses experimentos, foi confirmada a configuração já relatada na literatura (CHEN et al., 1971; WHALLEY et al., 1976). Com a irradiação de H-8 em monascinol (**M2**), foi verificado efeito nuclear *Overhauser* em H-16, mostrando que os mesmos estão na mesma face, corroborando com a configuração proposta para H-15.

De acordo com a literatura, o policetídeo monascinol (**M2**), ou monascuspiloina, apresenta propriedades anticancerígenas frente ao câncer de próstata (CHEN et al., 2012; CHIU et al., 2013). Já o metabólito oxidado monascina (**M3**) é capaz de induzir a lipólise (JOU et al., 2010), apresenta efeitos anti-inflamatórios e imunomodulatórios (HSU et al., 2013), além de efeitos antidiabéticos (LEE et al., 2013). Sobrenadantes de culturas de *Monascus* sp. também apresentaram atividade antifúngica (WANG et al., 2002).

4.8 Coculturas

4.8.1 Coculturas em placas de seis poços

De acordo com Hartfelder e Engels (1989), L-prolina é o aminoácido livre encontrado em maior quantidade no alimento larval de *S. depilis*. O alimento larval desse moliponíneo contém 25,95 µmol/mL de prolina (38,6%), 6,92 µmol/mL de lisina (10,3%), 6,72 µmol/mL de asparagina (10,0%), 3,47 µmol/mL de alanina (5,2%) e 3,19 µmol/mL de ácido glutâmico (4,7%).

Bogdanov et al. (1996) descreveram que a quantidade dos carboidratos glicose e frutose no mel é equivalente, sendo aproximadamente 30% cada. O mel chega a apresentar 75% de açúcares, sendo os majoritários glicose, frutose e maltose. Usando essas informações, foram desenvolvidos diferentes meios de cultura com o intuito de mimetizar o ambiente encontrado nas células de cria de *S. depilis* (Item 3.12.1 da metodologia).

Alguns resultados de cocultivos realizados entre os micro-organismos *M. ruber* SDGP1, *Candida* sp. SDGP2 e *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, isolados de células de cria de *S. depilis*, podem ser visualizados na figura 52.

Figura 52. Coculturas desenvolvidas entre *Candida* sp. SDCP2 (C), *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 (Z) e *Monascus ruber* SDCP1 (M), por sete dias, a 30 °C, em três diferentes meios de cultura (Item 3.12.1). Cada meio de cultura foi ajustado para pH 4,5 ou 6,0. A. Cultivos em meio GFAA4,5. B. Cultivos em meio GFAA6. C. Cultivos em meio GF4,5. D. Cultivos em meio GF6. E. Cultivos em meio 30G4,5. F. Cultivos em meio 30G6.

Com esses cultivos, evidenciou-se que *Candida* sp. SDCP2 estimulou o crescimento de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 (Figuras 52 B, D, E e F). Nota-se também que *M. ruber* SDCP1 produz mais pigmentos amarelo-alaranjados em cocultura com *Candida* sp. SDCP2, principalmente nos meios contendo frutose (Figuras 52 A, B, C e D). Esse estímulo não foi evidenciado nos cocultivos de *M. ruber* SDCP1 e *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, mostrando certo grau de especificidade.

Zygosaccharomyces sp. SDBC30G1 se desenvolveu melhor em meios com pH 4,5 (Figuras 52 A, C e E) quando comparado aos mesmos meios com pH 6,0 (Figuras 52 B, D e F). O pH do alimento larval de *S. depilis* é aproximadamente 3, e isso pode ajudar a explicar essa maior facilidade de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 se desenvolver em ambiente ácido.

Com o objetivo de verificar se o estímulo causado por *Candida* sp. SDCP2 sobre o crescimento de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 devia-se à acidificação do meio de cultura, foram desenvolvidas culturas com esses micro-organismos nas quais o pH dos meios de cultura foi medido após o desenvolvimento microbiano. *Candida* sp. SDCP2 foi capaz de acidificar os meios de cultura de pH 6,0 para pH 4,0 a 5,0, o que pode estimular o crescimento de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1. No entanto, outros experimentos com sobrenadantes de culturas de *Candida* sp. SDCP2 mostraram que compostos orgânicos voláteis (VOCs) produzidos por essa levedura também poderiam gerar um estímulo de crescimento em *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 (Item 4.10).

Foi verificado que a presença de *Candida* sp. SDCP2 também estimulava o crescimento de *M. ruber* SDCP1 (Figura 53). Para mostrar com mais detalhes esse estímulo, um vídeo da cultura durante seus primeiros cinco dias foi preparado pelo pós-doutorando Scott Chimileski (Laboratório Prof. Dr. Roberto G. Kolter, HMS) e pode ser acessado pelo link <https://youtu.be/21-0--QRsng>.

Figura 53. Cultivos em meio 30G, pH 6,0 por cinco dias a 30 °C. À esquerda monocultivo de *M. ruber* SDCP1 e à direita cocultura entre *M. ruber* SDCP1 e *Candida* sp. SDCP2.

A produção de pigmentos por *M. ruber* SDCP1 na presença de *Candida* sp. SDCP2 foi estudada. Ao analisar os extratos preparados a partir dos cultivos feitos em meio 15GFAA com pH 4,5 por LC-MS, observou-se que houve um estímulo para a produção de monascinol (**M2**) e monascina (**M3**) nas coculturas entre *M. ruber* SDCP1 e *Candida* sp. SDCP2 (Figura 54). A detecção de **M2** aumentou aproximadamente 30% e de monascina (**M3**) duplicou na cocultura (Figuras 54 C e D).

Figura 54. Análises em LC-MS, operando no modo positivo de análise. A. Padrão de monascinol (**M2**), 1 mg/mL. B. Padrão de monascina (**M3**), 1 mg/mL. C. Monocultura de *M. ruber* SDCP1 no meio GFAA, pH 4,5. D. Cocultura de *M. ruber* SDCP1 e *Candida* sp. SDCP2 em meio GFAA, pH 4,5. Coluna cromatográfica Luna 5 mm C₁₈, 100 x 4,6 mm (Phenomenex). O gradiente de solventes utilizado foi composto por acetonitrila:água acrescidos com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 0,7 mL/min (iniciando com 10% de acetonitrila, mantendo essa porcentagem por 1 min, alcançando 100% de acetonitrila em 18 min, e mantendo essa porcentagem até 23 min), o volume de injeção foi 10 µL.

Outro dado interessante, verificado nas culturas de *M. ruber* SDCP1, foi a produção de lovastatina (**M6**) no meio de cultura 30G, pH 6,0 ou 4,5. A comparação do tempo de retenção do extrato de *M. ruber* SDCP1 com um padrão de lovastatina (Sigma-Aldrich) (Figura 55) e análises de massas em alta resolução confirmaram a presença majoritária de lovastatina nesses extratos (Figura 56).

Figura 55. Análises em LC-MS, operando no modo positivo de análise. A. Monocultura de *M. ruber* SDCP1 no meio 30G, pH 6,0. B. Padrão de lovastatina (**M6**) (Sigma-Aldrich) na concentração de 500 µg/mL. Coluna cromatográfica Luna 5 mm C₁₈, 100 x 4,6 mm (Phenomenex). O gradiente de solventes utilizado foi composto por acetonitrila:água acrescidos com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 0,7 mL/min (iniciando com 10% de acetonitrila, mantendo essa porcentagem por 1 min, alcançando 100% de acetonitrila em 18 min, e mantendo essa porcentagem até 23 min), o volume de injeção foi 10 µL.

A análise de massas em alta resolução do extrato de *M. ruber* SDCP1 em meio contendo 30% de glicose, mostrou íon majoritário com m/z 405,2640 [M+H]⁺ (C₂₄H₃₇O₅ 405,2636 [M+H]⁺, erro 1,1 ppm) (Figura 56).

Figura 56. Análises de espectrometria de massas em alta resolução do extrato bruto de *M. ruber* SDCP1 em meio 30G, pH 6,0, extraído com acetate de etila. É possível visualizar o íon correspondente à lovastatina protonada, m/z 405,2640, bem como o aduto com amônia m/z 422,2904 e a lovastatina sodiada m/z 427,2458. A estrutura da lovastatina (**M6**) pode ser visualizada à direita.

Lovastatina (**M6**) é um produto natural utilizado como fármaco pela inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), que catalisa a etapa chave para produção de mevalonato, precursor de esteroides (STANCU e SIMA, 2001). Lovastatina pode ter um importante efeito para a abelha *S. depilis*, uma vez que o hormônio juvenil (JH) (**19**) e a 20-hidroxiecdisona (20E) (**20**) (Figura 57), dois importantes hormônios para o desenvolvimento larval, têm o

mevalonato como precursor de suas biossínteses. Insetos podem biossintetizar JH a partir de farnesol em uma glândula chamada *corporum allatum*, presente na cabeça do inseto (BELLÉS et al., 2005). No entanto, artrópodes em geral não apresentam o aparato genético para biossintetizar esteroides *de novo* e necessitam obter colesterol da dieta, para posterior produção de 20E (**20**) no interior de glândulas protorácicas (HUANG et al., 2008).

Figura 57. Estruturas químicas do hormônio juvenil III (**19**) e de 20-hidroxiecdisona (**20**).

Em experimentos com *Locusta migratoria migratorioides*, Debernard e colaboradores (1994) injetaram o inibidor de HMG-CoA redutase fluvastatina no abdômen desse artrópode e observaram que a biossíntese de JH (**19**) na glândula *corporum allatum* foi totalmente inibida na concentração de 100 µg de fluvastatina. Esse dado demonstra que inibidores da enzima HMG-CoA redutase podem ter um efeito *in vivo* em artrópodes.

4.8.2 Coculturas utilizando placas de 24 poços e membranas semipermeáveis

Através de técnicas de cocultivo, vias metabólicas para a produção de antimicrobianos podem ser ativadas, um antibiótico pode ser produzido em maior quantidade e/ou análogos de um produto natural ativo podem passar a ser produzidos (PETTIT, 2009; OH et al, 2007). O desenvolvimento de coculturas entre micro-organismos associados a insetos é também uma oportunidade de se compreender melhor o que ocorre no ambiente natural, em que os membros da microbiota estabelecem competições por alimento e espaço.

Como visto no item 4.5.2, o fungo *M. ruber* SDCP1 foi o mais afetado pela presença de *Bacillus* sp. SDLI1 em cocultura em meio sólido e para se entender melhor a interação entre esses dois micro-organismos, foram realizados diferentes cocultivos. Fungos do gênero *Monascus* são conhecidos pela produção de produtos

naturais com interessantes atividades biológicas, como antiolesterolêmica (JUZLOVÁ et al., 1996), citotóxica (SU et al., 2005), anti-inflamatória (AKIHISA et al., 2005) e antimicrobiana (WANG et al., 2002). Bactérias do gênero *Bacillus* também são reconhecidamente produtoras de compostos bioativos e são frequentemente encontradas em colônias de abelhas (WANG et al., 2015; SINACORI et al., 2014; GILLIAM, 1997; GILLIAM et al., 1990; GILLIAM, 1979a).

Nos experimentos de cocultivo entre *M. ruber* SDCP1 e *Bacillus* sp. SDLI1 foram monitoradas as produções de bacillomicina D (**B8**), produzida por *Bacillus* sp. SDLI1 (Descrição no item 4.5.2), e monascinol (**M2**) e monascina (**M3**), metabólitos de *M. ruber* SDCP1 (Descrição no item 4.7), em culturas simples e mistas utilizando três meios de cultura diferentes, com ou sem o emprego de membrana semipermeável (Figura 58).

Figura 58. Coculturas entre *M. ruber* SDCP1 (M) e *Bacillus* sp. SDLI1 (B) utilizando ou não membranas semipermeáveis em meio PDB, ISP-2 e 30G6 líquido, após sete dias de cultivo a 30 °C.

Em meio PDB, foi observado que *M. ruber* SDCP1 inibe a produção de bacillomicina D (**B8**), possivelmente pela inibição do crescimento de *Bacillus* sp. SDLI1. Essa modulação ocorreu tanto na cocultura com a utilização de Millicell® (Figura 59 F) quanto na cocultura sem a membrana semipermeável (Figura 59 C). Em cultura simples, *Bacillus* sp. SDLI1 produziu o lipopeptídeo (Figura 59 I).

Figura 59. Análises em HPLC-DAD-MS (modo positivo) de culturas de *M. ruber* SDGP1 e *Bacillus* sp. SDLI1 em meio PDB. A. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon do monascinol (**M2**) m/z 361. B. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon da monascina (**M3**) m/z 359. C. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon da bacillomicina D (**B8**) m/z 1073. D. Cocultura com membrana, buscando pelo íon do monascinol (**M2**) m/z 361. E. Cocultura com membrana, buscando pelo íon da monascina (**M3**) m/z 359. F. Cocultura com membrana, buscando pelo íon da bacillomicina D (**B8**) m/z 1073. G. Monocultura de *M. ruber* SDGP1, buscando pelo íon do monascinol (**M2**) m/z 361. H. Monocultura de *M. ruber* SDGP1, buscando pelo íon da monascina (**M3**) m/z 359. I. Monocultura de *Bacillus* sp. SDLI1, buscando pelo íon da bacillomicina D (**B8**) m/z 1073. Coluna cromatográfica Luna 5 mm C_{18} , 100 x 4,6 mm (Phenomenex). O gradiente de solventes utilizado foi composto por acetonitrila:água acrescidos com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 0,7 mL/min (iniciando com 10% de acetonitrila, mantendo essa porcentagem por 1 min, alcançando 100% de acetonitrila em 18 min, e mantendo essa porcentagem até 23 min), o volume de injeção foi 10 μ L.

No experimento utilizando meio ISP-2 líquido, a produção de monascinol (**M2**) e monascina (**M3**) foi inibida na presença de *Bacillus* sp. SDLI1 em cocultura sem separação da membrana (Figuras 60 A e B). Já na cocultura com a presença da membrana semipermeável, **M2** e **M3** foram detectados (Figuras 60 D e E). *Bacillus* sp. SDLI1 produziu bacillomicina D (**B8**) em todas as condições (Figuras 60 C, F e I).

Figure 60. Análises em LC-DAD-MS (modo positivo) de culturas de *M. ruber* SDGP1 e *Bacillus* sp. SDLI1 em meio ISP-2. A. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon do monascinol (**M2**) m/z 361. B. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon da monascina (**M3**) m/z 359. C. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon da bacillomicina D (**B8**) m/z 1073. D. Cocultura com membrana, buscando pelo íon do monascinol (**M2**) m/z 361. E. Cocultura com membrana, buscando pelo íon da monascina (**M3**) m/z 359. F. Cocultura com membrana, buscando pelo íon da bacillomicina D (**B8**) m/z 1073. G. Monocultura de *M. ruber* SDGP1, buscando pelo íon do monascinol (**M2**) m/z 361. H. Monocultura de *M. ruber* SDGP1, buscando pelo íon da monascina (**M3**) m/z 359. I. Monocultura de *Bacillus* sp. SDLI1, buscando pelo íon da bacillomicina D (**B8**) m/z 1073. Coluna cromatográfica Luna 5 mm C_{18} , 100 x 4,6 mm (Phenomenex). O gradiente de solventes utilizado foi composto por acetonitrila:água acrescidos com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 0,7 mL/min (iniciando com 10% de acetonitrila, mantendo essa porcentagem por 1 min, alcançando 100% de acetonitrila em 18 min, e mantendo essa porcentagem até 23 min), o volume de injeção foi 10 μ L. Observação: alguns sinais foram desconsiderados pela comparação do tempo de retenção do metabólito de interesse.

Nas culturas em meio com alta concentração de glicose (30G6), *M. ruber* SDGP1 produziu monascinol (**M2**) em maior quantidade na cocultura utilizando Millicell® (Figura 61 D). Monascina (**M3**) foi detectada em pequena quantidade somente do cocultivo com uso da membrana semipermeável (Figura 61 E). A produção de **B8** aumentou na cocultura usando membrana semipermeável (Figura 61 F).

Figura 61. Análises em LC-DAD-MS (modo positivo) de culturas de *M. ruber* SDCP1 e *Bacillus* sp. SDLI1 em meio 30G6. A. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon do monascinol (**M2**) m/z 361. B. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon da monascina (**M3**) m/z 359. C. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon da bacillomicina D (**B8**) m/z 1073. D. Cocultura com membrana, buscando pelo íon do monascinol (**M2**) m/z 361. E. Cocultura com membrana, buscando pelo íon da monascina (**M3**) m/z 359. F. Cocultura com membrana, buscando pelo íon da bacillomicina D (**B8**) m/z 1073. G. Monocultura de *M. ruber* SDCP1, buscando pelo íon do monascinol (**M2**) m/z 361. H. Monocultura de *M. ruber* SDCP1, buscando pelo íon da monascina (**M3**) m/z 359. I. Monocultura de *Bacillus* sp. SDLI1, buscando pelo íon da bacillomicina D (**B8**) m/z 1073. Coluna cromatográfica Luna 5 mm C₁₈, 100 x 4,6 mm (Phenomenex). O gradiente de solventes utilizado foi composto por acetonitrila:água acrescidos com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 0,7 mL/min (iniciando com 10% de acetonitrila, mantendo essa porcentagem por 1 min, alcançando 100% de acetonitrila em 18 min, e mantendo essa porcentagem até 23 min), o volume de injeção foi 10 μ L.

Esses experimentos mostraram o quão importante a condição de cultivo é para a produção de metabólitos secundários. A presença de outro micro-organismo, o contato celular e o meio de cultura exerceram grandes influências na produção dos produtos naturais monitorados.

Nota-se que o meio de cultura com maior rendimento de produção de bacillomicina D (**B8**) foi o ISP-2, especialmente na monocultura de *Bacillus* sp. SDLI1. Já para a produção de monascinol (**M2**) e monascina (**M3**), os policetídeos

análogos produzidos por *M. ruber* SDCP1, o melhor meio foi o PDB, sendo essa produção aumentada ligeiramente em cocultura com *Bacillus* sp. SDLI1. O contato celular parece ser importante para a inibição de *M. ruber* SDCP1 por *Bacillus* sp. SDLI1 nos meios ISP-2 e 30G6.

Como visto no item 4.8.1, *M. ruber* SDCP1 produz lovastatina (**M6**) no meio ágar 30G6. Esse produto natural também foi monitorado no meio 30G6 líquido em cocultivos com *Bacillus* sp. SDLI1 (Figura 62). Foi observado que, no cocultivo sem uso da membrana, a produção de **M6** foi totalmente inibida. Em contrapartida, no cocultivo com separação das linhagens pela membrana semipermeável, a produção de lovastatina (**M6**) foi similar a observada no controle de *M. ruber* SDCP1.

Figura 62. Análises em LC-DAD-MS (modo positivo) de culturas de *M. ruber* SDCP1 e *Bacillus* sp. SDLI1 em meio 30G6. A. Cocultura sem membrana, buscando pelo íon da lovastatina (**M6**) m/z 405. B. Cocultura com membrana, buscando pelo íon da lovastatina (**M6**) m/z 405. C. Monocultura de *M. ruber* SDCP1, buscando pelo íon da lovastatina (**M6**) m/z 405.

Com esses resultados, pode-se concluir que o uso da membrana semipermeável possibilitou que os dois micro-organismos se desenvolvessem e produzissem seus metabólitos de forma mais efetiva. Já em cultivos com contato celular, o micro-organismo que cresceu mais rapidamente ou que se adequou melhor ao meio utilizado se sobressaiu e controlou o crescimento do concorrente. Isso demonstra que a adaptação rápida ao ambiente favorece a sobrevivência em um habitat multiespécie.

4.8.3 Coculturas entre *Monascus ruber* SDCP1 e *Candida* sp. SDCP2

Em culturas em meio sólido descritas no item 4.8.1, foi verificado que *Candida* sp. SDCP2 estimulava a produção de monascinol (**M2**) e monascina (**M3**) por *M. ruber* SDCP1. Com isso, decidiu-se monitorar a produção desses metabólitos em coculturas em meio líquido. O meio escolhido foi PDB, uma vez que se verificou que

nesse meio de cultura a produção desses metabólitos era maior (Descrição no item 4.8.2).

Monitorando o sobrenadante das culturas diariamente, constatou-se que os policetídeos eram detectados mais precocemente na cocultura quando comparado à cultura simples de *M. ruber* SDCP1. Em cocultura, esses metabólitos foram detectados no segundo dia, e em monocultura, somente no terceiro dia.

Apesar de monascinol (**M2**) ser o produto natural majoritário no extrato do sétimo dia de cocultivo, através de análises por LC-MS pode-se mensurar que a produção de **M2** aumentou aproximadamente 3 vezes comparado com o extrato da monocultura de *M. ruber* SDCP1. No entanto, a detecção de monascina (**M3**) aumentou aproximadamente 57 vezes na cocultura (Figura 63).

Figura 63. Análises em LC-MS (modo positivo) de culturas de *M. ruber* SDCP1 e *Candida* sp. SDCP2 em meio PDB. A. Cocultura, buscando pelo íon da monascina (**M3**) m/z 359,1853 $[M+H]^+$. B. Cocultura, buscando pelo íon de monascinol (**M2**) m/z 361,2010 $[M+H]^+$. C. Cultura simples de *M. ruber* SDCP1, buscando pelo íon da monascina (**M3**) m/z 359,1853 $[M+H]^+$. D. Cultura simples de *M. ruber* SDCP1, buscando pelo íon de monascinol (**M2**) m/z 361,2010 $[M+H]^+$. Coluna analítica Luna C₁₈ 5 mm, 100 x 4,6 mm (Phenomenex). O gradiente consistiu em misturas de acetonitrila e água com fluxo de 0,7 mL/min (iniciando-se com 10% de acetonitrila de forma isocrática por 1 min, e alcançando 100% de acetonitrila em 18 min, e permanecendo essa porcentagem até 23 min), volume de injeção 4 μ L. Observação: alguns sinais foram desconsiderados pela comparação do tempo de retenção do metabólito de interesse.

A atividade antifúngica de **M2** e **M3** foi avaliada. Monascinol (**M2**) não foi ativo frente a *Candida* sp. SDCP2 ou contra *C. albicans* ATCC MYA-2876 até a maior concentração testada (400 μ g/mL). Em contrapartida, monascina (**M3**) apresentou moderada atividade seletiva contra *Candida* sp. SDCP2, com MIC de 50 μ g/mL e

MFC de 100 µg/mL. O controle positivo cicloheximida apresentou MIC e MFC de 8 µg/mL frente a *Candida* sp. SDCP2.

Em cocultura, *M. ruber* SDCP1 começou a produzir **M2** e **M3** no segundo dia de cultivo e já ao terceiro dia, as células de *Candida* sp. SDCP2 apresentam baixa viabilidade, como mostrado na figura 64. De acordo com os dados obtidos no ensaio antifúngico e análises dos cultivos por LC-MS, essa baixa viabilidade celular é correlacionada com a presença de níveis tóxicos de monascina no meio de cultivo. Esse resultado indica que *M. ruber* SDCP1 é capaz de modular o crescimento de *Candida* sp. SDCP2, controlando a proliferação desse micro-organismo.

Figura 64. Culturas em meio PDB, 30 °C, 120 rpm após 72 h. A. Monocultura de *Candida* sp. SDCP2. B. Células de *Candida* sp. SDCP2 em cocultura com *M. ruber* SDCP1. Escala 10 µm.

4.9 Compostos voláteis produzidos por *Candida* sp. SDCP2

Em estudos preliminares, surgiram evidências de que *Candida* sp. SDCP2 estimulava o crescimento de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 (Item 4.8.1). Quando o sobrenadante de um cultivo líquido de *Candida* sp. SDCP2 foi adicionado a uma cultura de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em placa de Petri contendo meio 30G6 ágar, foi observado que o estímulo de crescimento ocorria em toda placa, e não somente onde o sobrenadante era adicionado, indicando a possibilidade de participação de VOCs nesse estímulo (Figura 65).

Figura 65. Cultivos de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em meio 30G6 ágar, 30 °C, após sete dias. A. Cultivo de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 com 20 e 10 µL de sobrenadante de um cultivo de sete dias de *Candida* sp. SDPC2. B. Cultivo de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 controle.

Para confirmação da participação de VOCs produzidos por *Candida* sp. SDPC2 no estímulo de crescimento de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, foi utilizada uma metodologia descrita por Bruce e colaboradores (2003), com adaptações. Nesse protocolo, uma placa contendo sobrenadante de *Candida* sp. SDPC2 foi selada a uma placa de Petri contendo um inóculo *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em meio 30G6 ágar, sem haver contato físico entre o sobrenadante e o cultivo da levedura. Dessa forma, foi possível visualizar que VOCs eram responsáveis pelo estímulo. Foi verificado também que o sobrenadante de *Candida* sp. SDPC2 obtido do cultivo de 10 dias estimulava mais o crescimento de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 que o sobrenadante de sete dias (Figura 66).

Figura 66. Cultivos de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em meio 30G6 ágar, 30 °C, após três dias. A. Placa de Petri contendo uma cultura de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 após contato com VOCs produzidos por *Candida* sp. SDPC2 (10 dias). B. Placa de Petri contendo uma cultura de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 após contato com VOCs produzidos por *Candida* sp. SDPC2 após sete dias de cultivo. C) Placa de Petri contendo uma cultura de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 após contato com VOCs do meio de cultura 30G6 líquido.

Outro experimento foi realizado para confirmação dos resultados. Desta vez, o sobrenadante de *Candida* sp. SDCP2 foi substituído por uma cultura dessa levedura, que se desenvolveu concomitantemente abaixo de uma placa contendo *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 no meio 30G, pH 6,0 (Figura 67). O estímulo foi novamente verificado.

Figura 67. Cultivos de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em meio 30G6 ágar, 30 °C, após cinco dias. A. Placa de Petri contendo cultivo de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em contato com voláteis de uma placa contendo ágar 30G6. B. Placa de Petri contendo cultivo de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em contato com voláteis produzidos por uma cultura de *Candida* sp. SDCP2.

Para identificar as substâncias voláteis produzidas por *Candida* sp. SDCP2, o sobrenadante mais ativo (10 dias de cultivo) foi analisado por GC-MS utilizando a técnica de *headspace*. Foram detectados dois VOCs majoritários usando o procedimento descrito no item 3.17 da metodologia. Etanol (**C1**) (2.10 min) foi o VOC majoritário, seguido de álcool isoamílico (**C2**) (10.86 min) (Figura 68).

Figura 68. A. Análise por GC-MS do sobrenadante de uma cultura de 10 dias de *Candida* sp. SDCP2 em meio 30G6 líquido, *split* 200, *headspace* 80 °C por 10 min. B. Análise por GC-MS do meio 30G6 líquido, *split* 200, *headspace* 80 °C por 10 min. C. Análise por GC-MS do sobrenadante de uma cultura de 10 dias de *Candida* sp. SDCP2 em meio 30G6 líquido, *split* 5, *headspace* 80 °C por 45 min. D. Análise por GC-MS do meio 30G6 líquido, *split* 5, *headspace* 80 °C por 45 min. E. Identificação de etanol (2.10 min) (C1) como VOC majoritário utilizando o banco de dados NIST MS Search 2.0. F. Identificação de álcool isoamílico (10.86 min) (C2) como segundo VOC mais presente no sobrenadante de *Candida* sp. SDCP2, segundo NIST MS Search 2.0.

Na tentativa de verificar se esses álcoois poderiam ter o mesmo efeito sobre o crescimento de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 como o observado para o sobrenadante de *Candida* sp. SDCP2, foram feitos cultivos de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 com alíquotas desses álcoois (Item 3.16 da metodologia) (Figura 69). Foi visto que esses álcoois, nas concentrações testadas, estimularam o crescimento de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 de forma semelhante à observada com o sobrenadante de *Candida* sp. SDCP2. Porém, podem haver outros VOCs envolvidos e que estão em menor quantidade no sobrenadante ativo.

Figura 69. Cultivos de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em meio 30G6 ágar, 30 °C, após sete dias. A. Placa de Petri contendo cultivo de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em contato com 10 µL de etanol (**C1**) (1:1000). B. Placa de Petri contendo cultivo de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em contato com 10 µL de álcool isoamílico (**C2**) (1:10000). C. Placa de Petri contendo cultivo de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em contato com 10 µL de sobrenadante de *Candida* sp. SDCP2 (10 dias). D. Placa de Petri contendo cultivo de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 em contato com 10 µL de meio 30G6 líquido.

Alguns álcoois são capazes de modular o crescimento e a morfologia de leveduras. Por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* secreta álcoois aromáticos envolvidos em *quorum-sensing*, e que são capazes de estimular a filamentação dessa levedura. Esse fenômeno é dependente da densidade celular e também da disponibilidade de fontes de nitrogênio (CHEN e FINK, 2006). Existem alguns trabalhos envolvendo a participação de etanol no estímulo de crescimento de fungos. Pentland (1967) descreveu, pela primeira vez, a possível participação de etanol no efeito estimulatório de *Aureobasidium pullulans* sobre o crescimento do basidiomiceto *Armillaria mellea*. Em outro trabalho, o fungo *Boletus virigatus* produziu etanol que foi capaz de estimular o crescimento dos fungos patogênicos *Phytophthora cinnamomi* e *Fomes annosus* (KRUPA e NYLUND, 1972).

Para verificar se os VOCs (**C1** e **C2**) presentes nos cultivos de *Candida* sp. SDCP2 também estariam presentes no favo de cria de *S. depilis*, esse material foi analisado por GC-MS. É importante lembrar que *Candida* sp. SDCP2 foi isolada do

cerume presente no favo de cria da abelha estudada. As análises mostraram que etanol (**C1**) é o VOC majoritário encontrado nas células de cria, e álcool isolamílico (**C2**) também foi detectado (Figura 70).

Figura 70. A. Análise por GC-MS do favo de cria de *S. depilis* macerado, *split* 5, *headspace* 80 °C por 45 min. B. Identificação de etanol (**C1**) (2.21 min) como VOC majoritário utilizando o banco de dados *NIST 11*. C. Identificação de álcool isoamílico (**C2**) (11.20 min), segundo *NIST 11*.

Nas condições analíticas utilizadas, etanol (**C1**) (2.21 min) é o VOC majoritário no favo de cria de *S. depilis*, seguido de acetato de etila (**21**) (6.01 min) e ácido acético (**22**) (9.09 min) (Figura 71). É importante destacar que o pólen utilizado para preparação do alimento larval passa por um processo de fermentação ácida antes de ser utilizado pelas abelhas cuidadoras de cria (MENEZES et al., 2013). Isso confere acidez também ao alimento larval, cujo pH fica próximo de pH 3,0. A produção de etanol também pode ocorrer no pólen, uma vez que leveduras do gênero *Candida* ou *Starmerella* são encontrados como micro-organismos fermentadores nos potes de pólen de diferentes abelhas sem ferrão (GILLIAM, 1979b). A presença de etanol e ácido acético, juntamente com o ambiente ácido

presente no alimento larval, facilmente produz acetato de etila, que aparentemente não ocasiona efeitos deletérios às larvas de *S. depilis*.

Figura 71. Análise por GC-MS do favo de cria de *S. depilis* macerado, *split* 5, *headspace* 80 °C por 45 min. A. Identificação de acetato de etila (**21**) (6.01 min) utilizando o banco de dados *NIST* 11. B. Identificação de ácido acético (**22**) (9.09 min), segundo *NIST* 11.

A presença de VOCs estimulatórios no interior da célula de cria, bem como a alta pressão osmótica e acidez do alimento larval, faz com que esse ambiente seja propício para o desenvolvimento de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1. É nas células de cria que essa levedura encontra as condições necessárias para se desenvolver. Dessa forma, *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 encontrou um local onde poderia manter uma relação de mutualismo com larvas de *S. depilis*, que utilizam essa levedura como alimento.

4.10 Aspectos biológicos, ecológicos e químicos de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1

Zygosaccharomyces sp. SDBC30G1, o fungo-alimento de larvas de *S. depilis*, foi estudado para observação de características morfológicas, de esporulação, de flotação e de invasão de ágar. A primeira observação foi evidenciar que *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 é capaz de formar longas pseudohifas em condições laboratoriais (Figura 72).

Figura 72. Células de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 após 4 dias de cultivo em 200 µL de meio 30G líquido, pH 4,5, sem agitação, 30 °C, inóculo final OD₆₀₀ 0,1, em placas de 96 poços.

Essas características também foram observadas no ambiente natural de crescimento, ou seja, nas células de cria de *S. depilis* (Figura 73). É importante salientar que a formação de longas pseudohifas não é algo comum para o gênero *Zygosaccharomyces* (JAMES e STRATFORD, 2011), e a linhagem SDBC30G provavelmente trata-se de uma nova espécie com características peculiares.

Figura 73. Células de *Zygosaccharomyces* sp. crescendo no interior do favo de cria de *S. depilis*.

Quando as células foram coradas com corante fluorescente branco de calcoflúor, que sinaliza acúmulo de quitina presente em grande quantidade nos septos, foi observado que essas longas pseudohifas são realmente pouco septadas (Figura 74).

Figura 74. Células de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 observadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 2000), objetiva de 60x, após reação com reagente branco de calcoflúor. Células retiradas de uma cultura em meio 15GF líquido, pH 4,5, condição estática, inóculo inicial com OD₆₀₀ 0,1, cultivo a 30 °C por 10 dias. A. Células observadas sem fluorescência. B. Células observadas com fluorescência.

Essa levedura é capaz de formar película ou biofilme. Essa característica é conferida pela expressão de proteínas de membrana da família *FLO11* (WATANABE et al., 2013). Essas proteínas estão também envolvidas na capacidade de invasão do ágar, importante na busca de nutrientes. Tanto flotação como invasão do ágar podem ser vantagens para essa levedura no interior do favo de cria, uma vez que a mesma precisa passar a barreira de cerume para crescer em direção ao interior da célula de cria e desenvolver células flotantes para se tornar mais disponível para a alimentação da larva. A flotação pode ser visualizada na figura 75 A, e também em um vídeo capturado pelo pós-doutorando Scott Chimileski e que pode ser acessado em <https://youtu.be/vEgWaWWGayk>. A invasão do ágar pode ser visualizada na figura 75 B.

Figura 75. A. Formação de película flotante por *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, em uma cultura de sete dias (5 mL, meio 15GF líquido, pH 4,5, sem agitação, 30 °C, inóculo inicial OD₆₀₀ 0,1, em placa de seis poços). B. Invasão do ágar por uma colônia de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, 10 dias de cultivo em meio ágar 15GF, pH 4,5, 30 °C.

Zygosaccharomyces sp. SDBC30G1 também forma ascos esferoidais, predominantemente contendo um ascósporo, raramente contendo dois ascósporos (Figura 76). A esporulação pode ser uma vantagem para propagação de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 nas colônias de *S. depilis*. No entanto, a esporulação normalmente acontece em ambiente com escassez de nutrientes, principalmente de nitrogênio, e provavelmente esse fungo não deve esporular no momento da propagação na célula de cria, que é um ambiente rico em nutrientes.

Figura 76. Ascospores de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 contendo um ou dois ascósporos. Para estímulo da esporulação utilizou-se meio líquido contendo 30% de glicose 0,5% de extrato de levedura, condição estática, inóculo inicial com OD₆₀₀ 0,1, cultivo a 30 °C por sete dias.

Durante a visualização das células de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 utilizando microscópio óptico com contraste de fases, observou-se o acúmulo de organelas citoplasmáticas por essa levedura (Figura 77).

Figura 77. Células de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 contendo organelas citoplasmáticas observadas em microscópio óptico. Células retiradas de uma cultura em meio 15GF líquido, pH 4,5, condição estática, inóculo inicial com OD₆₀₀ 0,1, cultivo a 30 °C por 10 dias.

Para compreender melhor a composição dessas organelas citoplasmáticas, e o conteúdo das mesmas, foram feitas análises de microscopia de fluorescência com o corante “complexo de filipinas” de *Streptomyces filipinensis* (Figura 78).

Figura 78. Células de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 observadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 2000), objetiva de 100x, após reação com reagente complexo de filipinas produzido por *Streptomyces filipinensis*. Células retiradas de uma cultura em meio 15GF líquido, pH 4,5, condição estática, inóculo inicial com OD₆₀₀ 0,1, cultivo a 30 °C por 10 dias. A. Células observadas sem fluorescência. B. Células observadas com fluorescência.

Não foi observada a marcação fluorescente das organelas citoplasmáticas com o reagente complexo de filipinas. Houve apenas coloração de esteroides presentes nas membranas de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, provavelmente pela baixa penetração do corante no interior das células dessa levedura. No entanto, com a coloração com vermelho do Nilo, foi verificado que essas organelas citoplasmáticas eram, na verdade, organelas de acúmulo de gordura ou adipossomos (*Lipid droplets* - LDs) (Figura 79).

Figura 79. Células de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 observadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 2000), objetiva de 60x, após reação com reagente vermelho do Nilo. Células retiradas de uma cultura em meio 15GF líquido, pH 4,5, condição estática, inóculo inicial com OD₆₀₀ 0,1, cultivo a 30 °C por 10 dias. A. Células observadas sem fluorescência. B. Células observadas com fluorescência.

Para identificar se essas organelas também estavam presentes no ambiente natural de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, foram coletadas células desse micro-organismo diretamente do favo de cria de *S. depilis*. Esse material passou pelo mesmo procedimento de coloração e observação sob fluorescência (Figura 80). Com isso, verificou-se que o fungo-alimento de *S. depilis* também acumula LDs em condições ambientais.

Figura 80. Células de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 observadas em microscópio de fluorescência (Leica SP5), objetiva de 60x, após reação com reagente vermelho do Nilo. A. Células retiradas de uma cultura em meio 15GF líquido, pH 4,5, condição estática, inóculo inicial com OD₆₀₀ 0,1, cultivo a 30 °C por sete dias. B. Células de *Zygosaccharomyces* sp. retiradas diretamente do favo de cria de *S. depilis*.

LDs são organelas que funcionam como reserva de lipídeos e esteróis. Os LDs são liberados pelo retículo endoplasmático, sendo envoltos por uma monocamada lipídica (WILFLING et al., 2014). Como o micro-organismo *M. ruber* SDGP1 produz lovastatina (**M6**), que pode interferir na biossíntese de esteroides, desenvolveu-se um cultivo de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 com **M6** para ver o efeito sobre o acúmulo de LDs. Embora a ação de lovastatina seja a inibição da enzima HMG-CoA redutase, que catalisa a produção de mevalonato, existem alguns trabalhos relatando que **M6** também interfere no metabolismo de ácidos graxos de forma indireta (WILLIAMS et al., 1994; RISÉ et al., 1997).

A primeira observação foi que, com a presença de lovastatina (**M6**) a formação de película flotante era prejudicada em comparação com o controle (Figura 81).

Figura 81. Formação de biofilme por *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, após sete dias de cultivo em placas de seis poços (5 mL, meio 15GF4,5 líquido, sem agitação, 30 °C, inóculo inicial de OD₆₀₀ 0,1). A. Controle. B. Cultivo com lovastatina (**M6**) 50 µg/mL.

Os LDs foram então isolados do teste e do controle (Item 3.17 da metodologia) para posterior análise lipidômica (Item 3.18 da metodologia) (Figura 82).

Figura 82. LDs produzidos por *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 observados em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 2000), objetiva de 60x, após reação com reagente vermelho do Nilo. A. LDs observados sem fluorescência. B. LDs observados com fluorescência.

A análise lipidômica indicou que a quantidade de lipídeos neutros como os triacilgliceróis (TG) e diacilgliceróis (DG) não foi afetada pela presença de lovastatina (**M6**) no meio. Foram detectados 59 TG e 22 DG no modo positivo de análise, e apenas um TG teve a detecção aumentada e três TG diminuíram de forma mais pronunciada no teste, em comparação com o controle. A detecção de nenhum DG foi significativamente afetada pelo uso de lovastatina. Foi detectado o éster de zimosterol com ácido linoleico (18:2) nos LDs de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 (Anexo 7). Não houve mudança significativa na detecção desse esteroide entre o teste e o controle, indicando que a biossíntese desse intermediário via biossintética de ergosterol não foi afetada pela concentração de lovastatina

utilizada (50 µg/mL) e/ou que *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 tenha mecanismos de resistência a **M6**.

Curiosamente, a abundância de lipídeos polares diminuiu no teste (modo negativo de análise). Dos 173 lipídeos identificados, 119 (68,8%) foram detectados em menor quantidade na presença de **M6** (Anexo 8). Por exemplo, das 37 fosfatidiletanolaminas (PE), 29 foram detectadas em menor quantidade no teste (Figura 83).

Figura 83. Estrutura química de fosfatidiletanolamina (PE) (16:0/16:0) (**23**).

Esses resultados indicam que lovastatina (**M6**) pode interferir indiretamente na composição da membrana de LDs nas concentrações testadas. Isso pode indicar que a composição da membrana plasmática fúngica também pode ser alterada na presença desse produto natural, o que pode ter interferido na flotação. No entanto, estudos mais aprofundados devem ser feitos para se compreender melhor esses resultados.

Quando os esteroides de membrana de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G foram extraídos e analisados por GC-MS (Item 3.19 da metodologia), ergosterol (**Z1**) foi o esteroide majoritário encontrado (30.5 min) (Figura 84). Também foram detectados ácidos graxos (19-25 min).

Figura 84. A. Análise por GC-MS de componentes de membrana do fungo *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1. B. Identificação de ergosterol (**Z1**) (30.58 min) como esteroide majoritário utilizando o banco de dados *NIST 11*.

A biossíntese de ergosterol (**Z1**) em leveduras envolve intermediários como lanosterol, zimosterol e fecosterol (DEWICK, 2009) (Figura 85). Ao se alimentarem de células de *Zygosaccharomyces* sp., as larvas de *S. depilis* ingerem esses esteroides e os lipídeos produzidos por essa levedura. Dessa forma, as larvas podem se beneficiar dessas substâncias como substratos para produção de componentes de membranas celulares, além de hormônios como a 20-hidroxiecdisona (20E).

Figura 85. Biossíntese de ergosterol (**Z1**) a partir de HMG-CoA (adaptado de DEWICK, 2009).

4.11 Cultivos *in vitro* de larvas de *S. depilis*

De forma geral, o ciclo de vida da abelha sem ferrão *S. depilis* é similar ao de outras abelhas eusociais. No entanto, a proliferação do fungo *Zygosaccharomyces* sp. no favo de cria, que serve de alimento para as larvas recém emergidas, é uma característica peculiar. As abelhas cuidadoras de cria misturam pólen fermentado e mel, juntamente com secreções glandulares, e produzem o alimento larval. Esse alimento é depositado no interior de células de cria, que são estruturas feitas com cerume. Após o depósito do alimento larval, a abelha rainha deposita um ovo em cada célula, que pode originar uma fêmea caso esteja fecundado, ou um macho, caso o ovo não seja fecundado. Após a eclosão desses ovos, torna-se visível o pseudomicélio formado pelo fungo-alimento *Zygosaccharomyces* sp. Então, a larva

começa a fazer movimentos circulares para se alimentar desse micro-organismo e do alimento larval, para prosseguimento da metamorfose (MENEZES et al., 2015) (Figura 86). O crescimento de fungo-alimento não é um fenômeno exclusivo de *S. depilis*, e foi também reportado em outras espécies de meliponíneos, como *Tetragona clavipes* e *Melipona flavolineata*. Porém, nesses casos os micro-organismos que servem como alimento ainda não foram estudados (MENEZES et al., 2013).

Figura 86. Esquema do ciclo de vida da abelha sem ferrão *S. depilis*.

4.11.1 Cultivos com *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 e *Zygosaccharomyces* sp. coletado diretamente das células de cria de *S. depilis*

Para testar se a linhagem *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, cultivada em condições laboratoriais, tinha a mesma capacidade de estimular a metamorfose das larvas de *S. depilis* como o fungo coletado diretamente das células de cria dessa abelha (MENEZES et al., 2015), foram feitas criações *in vitro* das larvas (Item 3.21.1). Para isso, ovos de *S. depilis* foram transferidos para placas de 96 poços contendo alimento larval e, após eclosão dos ovos, um inóculo de

Zygosaccharomyces sp. SDBC30G1 foi transferido para as larvas do teste. Como controle positivo utilizou-se um inóculo do fungo coletado diretamente do favo de cria da abelha e, como controle negativo, utilizou-se o meio de cultura 30G6, que foi usado para preparação dos inóculos. Os diferentes estágios de desenvolvimento larval podem ser observados na figura 87.

Figura 87. Diferentes estágios de desenvolvimento larval durante o experimento de criação *in vitro*. A. Ovo com 1-2 dias. B. Ovo com 3-4 dias. C. Larva com 1 dia. D. Larva com 3-4 dias (Crescimento de *Zygosaccharomyces* sp. pode ser observado). E. Larva com 6-10 dias. F. Pré-pupa com 15-18 dias. G. Pupa com 20-25 dias. H. Pupa com 30-34 dias. I. Abelha emergindo com 35-40 dias.

Os resultados mostraram que a porcentagem de morfogênese do teste, com *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, e do controle positivo, com fungo coletado diretamente do favo de cria da abelha, foi a mesma (70,8%) na média de três experimentos diferentes. Já a taxa de desenvolvimento das larvas que não se alimentaram do fungo *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 e do fungo ambiental foi muito baixa (6,25%). No controle, a maioria das larvas permaneceu no estágio larval e após algumas semanas elas morreram (Figura 88 e anexo 9).

Figura 88. Gráfico da porcentagem de larvas de *S. depilis* que completaram metamorfose após consumo de fungo coletado diretamente do favo de cria, *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, ou que não receberam inoculação microbiana (controle).

A diferença entre a morfogênese do controle e das larvas alimentadas com o fungo ambiental e o laboratorial foi estatisticamente significativa (Cochran-Mantel-Haenszel, valor de $p < 0,0001$). Portanto, esse experimento de criação *in vitro* de larvas permitiu confirmar a importância do consumo de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 para o desenvolvimento larval. Como essa levedura acumula uma quantidade considerável de LDs em seu citoplasma, pode ser que seja uma fonte de lipídeos e também esteoides para o inseto. Insetos não produzem esteroides *de novo*, mas necessitam do hormônio 20E (20) para realização da metamorfose, e essa relação mutualística abelha-fungo pode ter se estabelecido pela necessidade de uma fonte de esteroides pela abelha. Uma vez que o ambiente do favo de cria é propício para propagação de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, essa simbiose provavelmente se estabeleceu durante o processo coevolutivo entre esses organismos.

4.11.2 Cultivos com ergosterol e colesterol

Com base nas evidências obtidas, uma importante hipótese para a contribuição de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 para o desenvolvimento larval seria o fornecimento de esteroides que poderiam participar de vias metabólicas para a produção do hormônio 20-hidroxiecdisona (20E), envolvido no estímulo de genes relacionados com a morfogênese (LI e WHITE, 2003). Como insetos não apresentam aparatos genéticos para a biossíntese de esteroides *de novo*, os

mesmos devem consumir esteroides da dieta para produção de ecdisteroides (HUANG et al., 2008).

Diante dessa hipótese, decidiu-se realizar experimentos de criação *in vitro* de larvas na presença de esteroides adicionados ao alimento larval. Foram avaliados colesterol, já reconhecido como precursor de 20E (**20**), e ergosterol (**Z1**), esteroide mais abundante nas células de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1, conforme já discutido no item 4.10.

Os resultados obtidos nos testes com colesterol na concentração de 10 µg/mL e ergosterol a 100 µg/mL são apresentados na figura 89 (Anexo 10).

Figura 89. Gráfico da porcentagem de larvas de *S. depilis* que completaram metamorfose após consumo de colesterol 10 µg/mL, ergosterol 100 µg/mL ou que não consumiram esteroides (controle).

A diferença entre a morfogênese do controle (8,3%) (larvas que não receberam fungo ou esteroides) e das larvas que consumiram alimento larval contendo os esteroides (colesterol 58,3% e ergosterol 64,6%) foi estatisticamente significativa (Cochran-Mantel-Haenszel, valor de $p < 0,0001$). O experimento demonstrou que os esteroides testados são capazes de induzir a metamorfose de forma similar à apresentada por *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1. Esses resultados sugerem que esse fungo osmofílico é uma fonte essencial de esteroides para as larvas. Possivelmente, os esteroides consumidos são utilizados por *S. depilis* para produção do hormônio 20E, envolvido no estímulo de genes relacionados com a metamorfose, uma vez que as larvas que não consumiram o fungo ou os esteroides não se desenvolveram de forma efetiva.

Como a quantidade de alimento larval utilizada para o desenvolvimento de *S. depilis* foi de 33 μL , as larvas realizaram metamorfose consumindo apenas 0,33 μg de colesterol e 3,3 μg de ergosterol. Nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de ergosterol, as larvas apresentaram taxa média de morfogênese de 37,5%. Provavelmente, devido a maior dificuldade de metabolização de ergosterol, esse esteroide precisou ser consumido em maior quantidade para apresentar efeito semelhante ao do colesterol e ao do fungo-alimento (70,8%) (Anexo 10). Na figura 90, encontra-se representada, de forma resumida, a via de metabolização de colesterol para a formação de 20E em *Drosophila*.

Figura 90. Via metabólica para produção de 20-hidroxicdisona (20E) a partir de colesterol (Adaptado de HUANG et al., 2008).

É importante destacar que a produção de 20E a partir de ergosterol não é algo estudado, mas é perfeitamente possível dado a similaridade estrutural entre ergosterol (**Z1**) e colesterol (**24**) (Figura 91). Quando se analisa as figuras 90 e 91, nota-se que para a produção de 20E a partir de ergosterol, seria necessário apenas uma etapa extra envolvendo a desmetilação de C-24. A presença de instauração entre C-22 e C-23 não seria problema e até facilitaria a hidroxilação de C-22 para formação de 20E (Figura 91). Em trabalhos pioneiros, verificou-se que insetos são capazes de catalisar a reação de desmetilação na posição C-24 em ergosterol, originando esteroides semelhantes ao colesterol (BECK e KAPADIA, 1957; CLARK e BLOCH, 1959).

Figura 91. Comparação das estruturas químicas de ergosterol (**Z1**), colesterol (**24**) e 20-hidroxicdisona (20E).

A utilização de esteroides fúngicos por insetos em vias de produção de ecdisteroides é algo não elucidado. O consumo de fungos por diferentes insetos, como formigas, cupins, besouros e agora abelhas, pode ser algo muito mais complexo do que se pensou inicialmente. Esses micro-organismos podem também fornecer esteroides que atuam como precursores hormonais.

4.11.3 Cultivos com os entomopatógenos *P. larvae*, *B. bassiana* e *M. anisopliae*

Como já discutido, os fungos entopatogênicos *B. bassiana* 447 e *M. anisopliae* 1037 foram utilizados em ensaios como indicadores do potencial inibitório de *Bacillus* spp. isolados do pólen e da larva de *S. depilis*. A bactéria *P. larvae* ATCC 9545 foi utilizada para avaliação da infectividade do fago SDLI1-1, produzido por *Bacillus* sp. SDLI1 (isolado da larva). Esses patógenos não são descritos como agentes causadores de infecções para *S. depilis*. Porém, como não há relatos de espécies patogênicas para essa abelha, os mesmos foram utilizados nesse estudo.

Para se compreender melhor a patogenicidade desses micro-organismos para a abelha sem ferrão *S. depilis*, decidiu-se realizar novos cultivos *in vitro* de larvas, inoculando esses patógenos no alimento larval, e monitorando o desenvolvimento do inseto. O estágio larval é um período crucial para o inseto e a presença de um patógeno no interior da célula de cria, como por exemplo a bactéria *P. larvae*, pode ocasionar a morte precoce da abelha (GENERSCH et al., 2006). O experimento de criação *in vitro* de larvas de *S. depilis* com os entopatógenos está descrito no item 3.21.3 da metodologia. De maneira geral, o procedimento iniciou-se com a transferência de larvas recém emergidas e não ovos, como no experimento anterior (Item 4.11.1). Dessa forma, o fungo-alimento era naturalmente transferido juntamente com a larva, não sendo necessária a recontaminação.

Foi observado que larvas contaminadas com *P. larvae* se desenvolveram de forma similar ao controle sem o patógeno (Figura 92 e anexo 11). A média de sobrevivência larval em 10 dias de acompanhamento foi de 79,2% sem o patógeno e de 64,6% com o patógeno (Cochran-Mantel-Haenszel, valor de $p > 0,05$). No cultivo de larvas infectadas com esporos de *P. larvae* ATCC 9545 na presença de *Bacillus* sp. SDLI1, a média de sobrevivência foi maior (93,7%). Nesse caso, a diferença entre as larvas infectadas com o patógeno na ausência e na presença de *Bacillus* sp. SDLI1 foi estatisticamente significativa (Cochran-Mantel-Haenszel, valor de p

<0,001). Esse resultado indica que a presença de *Bacillus* sp. SDLI1 favoreceu a sobrevivência das larvas, provavelmente por mecanismos de proteção como produção de agentes antimicrobianos e/ou fago lítico para *P. larvae* ATCC 9545.

Figura 92. Gráfico da porcentagem de larvas de *S. depilis* que sobreviveram após inoculação de *P. larvae*, *Bacillus* sp. SDLI1 e *P. larvae*, ou que não receberam inoculação microbiana (controle).

No experimento com *B. bassiana* 447, a taxa de larvas que sobreviveram e entraram na fase pupal na presença desse fungo entomopatogênico foi de 79,2% (Anexo 12). A sobrevivência não mudou consideravelmente com a presença de *Bacillus* sp. SDLI1 (75%) (Cochran-Mantel-Haenszel, valor de $p > 0,05$) (Figura 93).

Figura 93. Gráfico da porcentagem de larvas de *S. depilis* que completaram metamorfose após inoculação de *B. bassiana*, *Bacillus* sp. SDLI1 e *B. bassiana*, ou que não receberam inoculação microbiana (controle).

O mesmo foi observado no experimento com *M. anisopliae* 1037 (Anexo 12). Com esse entomopatôgeno, a porcentagem de larvas que entraram na fase pupal foi de 75%. As larvas cultivadas com esse fungo e *Bacillus* sp. SDLI1 entraram na fase pupal com a porcentagem de 81,25% (Cochran-Mantel-Haenszel, valor de $p > 0,05$). Nesses ensaios, a taxa de sobrevivência de larvas controle foi de 79,2% e não foi estatisticamente diferente com relação aos tratamentos (Cochran-Mantel-Haenszel, valor de $p > 0,05$) (Figura 94).

Figura 94. Gráfico da porcentagem de larvas de *S. depilis* que completaram metamorfose após inoculação de *M. anisopliae*, *Bacillus* sp. SDLI1 e *M. anisopliae*, ou que não receberam inoculação microbiana (controle).

Os resultados dos ensaios de criação *in vitro* de larvas com fungos entomopatogênicos indicaram que esses micro-organismos não são efetivos para infectarem larvas de *S. depilis* e/ou que existem mecanismos de proteção das larvas contra esses entomopatógenos. As características do alimento larval, como baixo pH, alta pressão osmótica e presença de etanol, ácido acético e acetato de etila fazem com que esse ambiente seja inóspito para a maioria dos micro-organismos. A colonização de micro-organismos como *Bacillus* spp. no pólen pode originar um substrato com vários agentes antimicrobianos que, ao serem transferidos para o alimento larval, auxiliam na prevenção da proliferação de micro-organismos indesejados. Adicionalmente, a ocorrência natural de *Bacillus* spp. como membro da microbiota intestinal da larva, também pode proteger o inseto nesse período de desenvolvimento. No caso do tratamento com o patógeno *P. larvae* ATCC 9545, tornou-se evidente que a presença de *Bacillus* sp. SDLI1 pode beneficiar as larvas de *S. depilis* contra infecções causadas por micro-organismos invasores.

Todos os resultados aqui discutidos mostram a importância da preservação da microbiota simbiote de insetos. O uso indiscriminado de defensivos agrícolas com atividade antimicrobiana pode interferir nesse ecossistema e ocasionar sérios danos à sobrevivência das abelhas. Os meliponíneos são importantes polinizadores no Brasil. Esses insetos participam da produção agrícola de algodão, café, laranja, morango, tomate e diversas outras culturas (GIANNINI et al., 2015). Sem as abelhas sem ferrão, a produção desses alimentos serão seriamente afetadas. O impacto causado pelo declínio de polinizadores torna-se cada vez mais evidente e alarmante, e iniciativas para resguardar a sobrevivência desses insetos se fazem urgentes (POTTS et al., 2016; DICKS et al., 2016).

CONCLUSÕES

5. Conclusões

A abelha sem ferrão *S. depilis* está associada a uma microbiota especializada que participa do ciclo de vida desse inseto. Nesse trabalho, foram isolados micro-organismos de diferentes locais da colônia de *S. depilis*, como estrutura da entrada, própolis, cerume estrutural e do favo de cria, pólen, mel, lixo, alimento larval, e corpo do inseto na fase larval e adulta. Em um primeiro momento, foi avaliada a capacidade inibitória dos 149 isolados frente a diferentes patógenos, para a priorização de linhagens para investigação química e biológica. Foi verificado que a maioria dos micro-organismos que apresentaram atividade inibitória foram isolados do pólen. A identificação microbiana, feita pelo sequenciamento genômico de regiões conservadas, mostrou que sete desses isolados pertenciam ao gênero *Bacillus*. A utilização de pólen para a preparação do alimento larval pode contaminá-lo com essa microbiota.

Foi isolada a bactéria *Bacillus* sp. SDLI1 do trato gastrointestinal de uma larva de *S. depilis* e esse micro-organismo mostrou interessante potencial inibitório frente a patógenos humanos e entomopatógenos. O sequenciamento do genoma completo de *Bacillus* sp. SDLI1, evidenciou que essa bactéria apresenta oito *clusters* gênicos biossintéticos para a produção de diferentes classes de antimicrobianos. Com a investigação química dessa linhagem bacteriana, foram isolados oito cicloheptapeptídeos com atividade antifúngica. Além disso, essa bactéria produz o fago SDLI1-1, inédito na literatura e capaz de infectar *P. larvae*, o agente causador da cria pútrida americana. Em cultivos *in vitro* de larvas, *Bacillus* sp. SDLI1 mostrou-se eficaz na proteção de *S. depilis* contra infecção causada por *P. larvae* ATCC 9545. Esses resultados mostram a capacidade protetiva de *Bacillus* sp. SDLI1 para larvas de *S. depilis*.

Através da utilização de meios de cultura que se assemelham com as condições de osmolaridade encontradas no alimento larval de *S. depilis*, isolou-se o fungo osmofílico *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1. Com o uso de técnicas microbiológicas, biologia molecular e cultivo *in vitro* de larvas, verificou-se que *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 é o fungo mutualista de larvas de *S. depilis*. Essa informação corrige dados publicados na literatura, em que *Monascus* sp. foi apontado como o fungo-alimento das larvas de *S. depilis*.

Zygosaccharomyces sp. SDBC30G1 desempenha papel fundamental nas células de cria de *S. depilis*, sendo requerido para o desenvolvimento larval. Esse micro-organismo acumula grande quantidade de LDs em seu citoplasma e pode servir como fonte de esteroides e lipídeos para o inseto em desenvolvimento. Em cultivos *in vitro* de larvas, a inoculação de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 foi substituída por soluções de ergosterol e colesterol. Nesses experimentos observou-se que esses esteroides auxiliam a metamorfose larval. Com isso, confirmou-se a hipótese de que *Zygosaccharomyces* sp. é uma fonte importante de esteroides para as larvas possivelmente produzirem ecdisteroides.

M. ruber SDCP1, fungo isolado do cerume presente nas células de cria de *S. depilis*, produz lovastatina, um inibidor enzimático que interfere na via biossintética de esteroides. Como *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 acumula lipídeos e esteroides em LDs, foi feito cultivo dessa levedura na presença de lovastatina a 50 µg/mL. Esse produto natural interferiu na flotação e formação de biofilme por *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 e a análise lipidômica mostrou uma diminuição na detecção de lipídeos polares nos LDs. Isso mostra que lovastatina pode ter um efeito indireto na composição lipídica de membranas, apesar da concentração testada não ter interferido na detecção de um éster de zimosterol.

Zygosaccharomyces sp. SDBC30G1 tem seu crescimento estimulado por álcoois secretados por *Candida* sp. SDCP2, levedura também isolada do cerume do favo de cria de *S. depilis*. Esses VOCs são produzidos por *Candida* sp. SDCP2 em condições laboratoriais e estão presentes no favo de cria dessa abelha, o que indica que esse processo ocorre na natureza. A presença de condições favoráveis de osmolaridade, baixo pH e presença de compostos voláteis estimulatórios no interior da célula de cria fez com que *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 se estabelecesse nesse ambiente.

Em cocultura com *Candida* sp. SDCP2, o fungo filamentoso *M. ruber* SDCP1 produz maiores quantidades do policetídeo monascina, tóxico para *Candida* sp. SDCP2 na concentração de 50 µg/mL. Esses dados sugerem que *M. ruber* SDCP1 pode controlar o crescimento dessa levedura em cocultura. A utilização da técnica de cultivo misto indicou possíveis funções ecológicas dos micro-organismos isolados. Utilizando coculturas em meio sólido e líquido, empregando ou não membranas semipermeáveis, foi verificada a resposta de diferentes linhagens

isoladas do favo de cria da abelha, sendo possível monitorar o estímulo ou inibição de crescimento e biossíntese de metabólitos de interesse.

Em cultivos *in vitro* de larvas de *S. depilis* foi observado que os patógenos *B. bassiana* e *M. anisopliae* não causam infecções significativas para essas larvas. Provavelmente, mecanismos de controle como baixo pH, alta pressão osmótica, presença de álcoois no alimento larval podem inibir a proliferação e sobrevivência dos patógenos nesse ambiente. Além disso, a presença de antimicrobianos produzidos pela microbiota do pólen (substrato do alimento larval) ou pela microbiota intestinal da larva podem ajudar na inibição desses patógenos.

De uma forma geral, esse trabalho descreve a interessante associação entre abelha e micro-organismos, investigando mais detalhadamente o primeiro relato de agricultura no interior de uma colônia de abelha. O pioneirismo na investigação química e biológica de *Bacillus* spp., isolado de abelhas, bem como o sequenciamento genômico da linhagem *Bacillus* sp. SDL11, associada à larva de um meliponíneo, também ressalta a contribuição do trabalho para a área de insetos sociais. A verificação de relações simbióticas entre *S. depilis* e micro-organismos isolados do favo de cria contribui para o planejamento de novos estudos envolvendo abelhas sem ferrão e destaca a importância da preservação da microbiota associada a esses polinizadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

ACKERMANN, H.-W. Phage Classification and Characterization. In: CLOKIE, M. R. J.; KROPINSKI, A. M. (Ed.) **Bacteriophages Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions**, Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC, 2009, 313 p.

AKIHISA, T.; TOKUDA, H.; YASUKAWA, K.; UKITA, M.; KIYOTA, A.; SAKAMOTO, N.; SUZUKI, T.; TANABE, N.; NISHINO, H. Azaphilones, furanoisophthalides, and amino acids from the extracts of *Monascus pilosus*-fermented rice (Red-Mold Rice) and their chemopreventive effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 562-565, 2005.

AZIZ, R.K.; BARTELS, D.; BEST, A.A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R.A.; FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E.M.; KUBAL, M.; MEYER, F.; OLSEN, G.J.; OLSON, R.; OSTERMAN, A.L.; OVERBEEK, R.A.; MCNEIL, L.K.; PAARMANN, D.; PACZIAN, T.; PARRELLO, B.; PUSCH, G.D.; REICH, C.; STEVENS, R.; VASSIEVA, O.; VONSTEIN, V.; WILKE, A.; ZAGNITKO, O.; The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, v. 9, p. 1-15, 2008.

BACON, C. W. **Isolation of biotechnological organisms from nature**. New York: McGraw Hill, 1990, p. 259-282.

BECK, S. D.; KAPADIA, G. G. Insect nutrition and metabolism of sterols. **Science**, v. 126, p. 258-259, 1957.

BELLÉS, X.; MARTÍN, D.; PIULACHS, M.-D. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 181-99, 2005.

BOGDANOV, S.; VIT, P.; KILCHENMANN, V. Sugar profiles and conductivity of stingless bee honeys from Venezuela. **Apidologie**, v. 27, p. 445-450, 1996.

BRUCE, A.; STEWART, D.; VERRALL, S.; WHEATLEY, R. E. Effect of volatiles from bacteria and yeast on the growth and pigmentation of sapstain fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p. 101-108, 2003.

BRÜSSOW, H.; HENDRIX, R. W. Phage genomics: Small is beautiful. **Cell**, v. 108, p. 13-16, 2002.

BRYSCH-HERZBERG, M. Ecology of yeasts in plant-bumblebee mutualism in Central Europe. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 50, p. 87-100, 2004.

ČADEŽ, N.; FÜLÖP, L.; DLAUCHY, D.; PÉTER, G. *Zygosaccharomyces favi* sp. nov., an obligate osmophilic yeast species from bee bread and honey. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 107, p. 645-654, 2015.

CAFARO, M. J.; CURRIE, C. R. Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 441-446, 2005.

CANO, R. J.; BORUCKI, M. K. Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. **Science**, v. 268, p. 1060-1064, 1995.

CANO, R. J.; BORUCKI, M. K.; HIGBY-SCHWEITZER, M.; POINAR, H. N.; POINAR, G. O.; POLLARD, K. J. *Bacillus* DNA in fossil bees: an ancient symbiosis? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2164-2167, 1994.

CARR, G.; DERBYSHIRE, E. R.; CALDERA, E.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Antibiotic and antimalarial quinones from fungus-growing ant-associated *Pseudonocardia* sp. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 1806-1809, 2012.

CHEN, F. C.; MANCHAND, P.S.; WHALLEY, W. B. The chemistry of fungi. Part LXIV. The Structure of monascin: the relative stereochemistry of the azaphilones. **Journal of the Chemical Society C: Organic articles**, p. 1577-1579, 1971.

CHEN, H.; FINK, G. R. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. **Genes & Development**, v. 20, p. 1150-1161, 2006.

CHEN, R.-J.; HUNG, C.-M.; CHEN Y.-L.; WU, M.-D.; YUAN, G.-F.; WANG, Y.-J. Monascuspiloin induces apoptosis and autophagic cell death in human prostate cancer cells via the Akt and AMPK signaling pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7185-7193, 2012.

CHIN, C.-S.; ALEXANDER, D. H.; MARKS, P.; KLAMMER, A. A.; DRAKE, J.; HEINER, C.; CLUM, A.; COPELAND, A.; HUDDLESTON, J.; EICHLER, E. E.; TURNER, S. W.; KORLACH, J. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. **Nature Methods**, v. 10, p. 563-569, 2013.

CHIU, H-W.; CHEN, M-H.; FANG, W-H.; HUNG, C-M.; CHEN, Y-L.; WU, M-D.; YUAN, G-F.; WU, M-J.; WANG, Y-J. Preventive effects of *Monascus* on androgen-related diseases: androgenetic alopecia, benign prostatic hyperplasia, and prostate cancer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 4379-4386, 2013.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M. A.; CURRIE, C.R. The nature history of antibiotics. **Current Biology**, v. 19, p. R437-R441, 2009.

CLARK, A. J.; BLOCH, K. Conversion of ergosterol to 22-dehydrocholesterol in *Blattella germanica*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 234, p. 2589-2594, 1959.

DEBERNARD, S.; ROSSIGNOL, F.; COUILLAUD, F. The HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin inhibits insect juvenile hormone biosynthesis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 95, p. 92-98, 1994.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. Chichester: John Wiley & Sons, UK, 3 ed., 2009, 539 p.

DICKS, L. V.; VIANA, B.; BOMMARCO, R.; BROSI, B.; ARIZMENDI, M. C.; CUNNINGHAM, S. A.; GALETTO, L.; HILL, R.; LOPES, A. V.; PIRES, C.; TAKI, H.; POTTS, S. G. Ten policies for pollinators. **Science**, v. 354, p. 975-976, 2016.

DING, Y.; ZHANG, S.; YANG, L.; NA, H.; ZHANG, P.; ZHANG, H.; WANG, Y.; CHEN, Y.; YU, J.; HUO, C.; XU, S.; GARAIOVA, M.; CONG, Y.; LIU, P. Isolating lipid droplets from multiple species. **Nature Protocols**, v. 8, p. 43-51, 2013.

ENDO, A.; IRISAWA, T.; FUTAGAWA-ENDO, Y.; SONOMOTO, K.; ITOH, K.; TAKANO, K.; OKADA, S.; DICKS, L. M. T. *Fructobacillus tropaeoli* sp. nov., a fructophilic lactic acid bacterium isolated from a flower. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 898-902, 2011.

FARZANEH, M.; SHI, Z.-Q.; AHMADZADEH, M.; HU, L.-B.; GHASSEMPOUR, A. Inhibition of the *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B1 contamination on pistachio nut by fengycin and surfactin-producing *Bacillus subtilis* UTBSP1. **The Plant Pathology Journal**, v. 32, p. 209-215, 2016.

FEINER, R.; ARGOV, T.; RABINOVICH, L.; SIGAL, N.; BOROVOK, I.; HERSKOVITS, A. A. A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 641-650, 2015.

FRANZ, C. M. A. P.; VANCANNEYT, M.; VANDEMEULEBROECKE, K.; WACHTER, M. D.; CLEENWERCK, I.; HOSTE, B.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H.; SWINGS, J. *Pediococcus stilesii* sp. nov., isolated from maize grains. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 329-333, 2006.

GHORBANI-NEZAMI, S.; LEBLANC, L.; YOST, D. G; AMY, O. S. Phage therapy is effective in protecting honeybee larvae from American Foulbrood Disease. **Journal of Insect Science**, DOI: 10.1093/jisesa/iev051, 2015.

GIANNINI, T. C.; BOFF, S.; CORDEIRO, G. D.; CARTOLANO Jr., E. A.; VEIGA, A. K.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. **Apidologie**, v. 46, p. 209-223, 2015.

GILLIAM, M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. **FEMS Microbiology Letters**, v. 155, p. 1-10, 1997.

GILLIAM, M. Microbiology of pollen and bee bread: The genus *Bacillus*. **Apidologie**, v. 10, p. 269-274, 1979a.

GILLIAM, M. Microbiology of pollen and bee bread: The yeasts. **Apidologie**, v. 10, p. 43-53, 1979b.

GILLIAM, M.; ROUBIK, D. W.; LORENZ, B. J. Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. **Apidologie**, v. 21, p. 89-97, 1990.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.

HARTFELDER, K.; ENGELS, W. The composition of larval food in stingless bees: evaluating nutritional balance by chemosystematic methods. **Insect Sociaux**, v. 36, p. 1-14, 1989.

HAWKSWORTH, D. L.; PITT, J. I. A new taxonomy for *Monascus* species based on cultural and microscopical characters. **Australian Journal of Botany**, v. 31., p. 51-61, 1983.

HOF, H. Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2987-2990, 2001.

HOICZYK, E.; RING, M. W.; MCHUGH, C. A.; SCHWÄR, G.; BODE, E.; KRUG, D.; ALTMEYER, M. O.; LU, J. Z, BODE, H. B. Lipid body formation plays a central role in cell fate determination during developmental differentiation of *Myxococcus xanthus*. **Molecular Microbiology**, v. 74, p. 497-517, 2009.

HSU, L-C.; LIANG, Y-H.; HSU, Y-W.; KUO, Y-H.; PAN, T-M. Anti-inflammatory properties of yellow and orange pigments from *Monascus purpureus* NTU 568. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 2796–2802, 2013.

HSU, S. C.; LOCKWOOD, J. L. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. **Applied Microbiology**, v. 29, p. 422-426, 1975.

HSU, Y-W.; HSU, L-C.; LIANG, Y-H.; KUO, Y-H.; PAN, T-M. Monaphilones A-C, three new antiproliferative azaphilone derivatives from *Monascus purpureus* NTU 568. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8211-8216, 2010.

HUANG, X.; WARREN, J. T.; GILBERT, L. I. New players in the regulation of ecdysone biosynthesis. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 35, p. 1-10, 2008.

HUI, N.; SERANI, L.; LAPRÉVOTE, O. Structural investigation of cyclic peptidolipids from *Bacillus subtilis* by high-energy tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, p. 203-209, 2001.

ICHIKAWA, T.; DATE, M.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of Kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiologica**, v.16, p. 218-224, 1971.

INÈS, M.; DHOUHA, G. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. **Peptides**, v. 71, p. 100-112, 2015.

JAMES, S. A.; STRATFORD, M. *Zygosaccharomyces* Barker (1901). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Ed.) **The yeasts, a taxonomic study**, Elsevier, 5 ed., vol. 2, 2011, p. 937-947.

JOU, P-C.; HO, B-Y.; HSU, Y-W.; PAN, T-M. The effect of *Monascus* secondary polyketide metabolites, monascin and ankaflavin, on adipogenesis and lipolysis activity in 3T3-L1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 12703-12709, 2010.

JUZLOVÁ, P.; MARTÍNKOVÁ, L.; KREN, V. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. **Journal of Industrial Microbiology**, v.16, p. 163-170, 1996.

KALTENPOTH, M.; GÖTTLER, W.; HERZNER, G.; STROHM, E. Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. **Current Biology**, v. 15, p. 475-479, 2005.

KAUR, P. K.; JOSHI, N.; SINGH, I. P.; SAINI, H. S. Identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus vallismortis* R2 and their antifungal activity against *Alternaria alternata*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, p. 139-152, 2016.

KENIG, M.; ABRAHAM, E. P. Antimicrobial activities and antagonists of bacilysin and anticapsin. **Journal of General Microbiology**, v. 94, p. 37-45, 1976.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação**. Belo Horizonte, MG: Acangaú, 1996, 154 p.

KLEIN, A. M.; VAISSIÈRE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 274, p. 303-313, 2007.

KOLTER, R.; VAN WEZEL, G. P. Goodbye to brute force in antibiotic discovery? **Nature Microbiology**, DOI: 10.1038/nmicrobiol.2015.20, 2016.

KORENBLUM, E.; ARAUJO, L. V.; GUIMARÃES, C. R.; SOUZA, L. M.; SASSAKI, G.; ABREU, F.; NITSCHKE, M.; LINS, U.; FREIRE, D. M. G.; BARRETO-BERGTER, E.; SELDIN, L. Purification and characterization of a surfactin-like molecule produced by *Bacillus* sp. H2O-1 and its antagonistic effect against sulfate reducing bacteria. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 252, 2012.

KROISS, J.; KALTENPOTH, M.; SCHNEIDER, B.; SCHWINGER, M-G, HERTWECK, C.; MADDULA, R. K.; STROHM, E.; ŠVATOS, A. Symbiotic Streptomyces provide antibiotic combination prophylaxis for wasp offspring. **Nature Chemical Biology**, v. 6, p. 261-263, 2010.

KRUPA, S.; NYLUND, J.-E. Studies on ectomycorrhizae of pine. III Growth inhibition of two root pathogenic fungi by volatile organic constituents of ectomycorrhizal root systems of *Pinus sylvestris* L. **European Journal of Forest Pathology**, v. 2, p. 88-94, 1972.

LEE, B.-H.; HSU, W.-H.; HUANG, T.; CHANG, Y.-Y.; HSU, Y.-W.; PAN, T.-M. Monascin improves diabetes and dyslipidemia by regulating PPAR γ and inhibiting lipogenesis in fructose-rich diet-induced C57BL/6 mice. **Food & Function**, v. 4, p. 950-959, 2013.

LI, X.; LIU, C.; DUAN, Z.; GUO, S. HMG-CoA reductase inhibitors from *Monascus*-fermented rice. **Journal of Chemistry**, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/872056>, 2013.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. **Ecology**, v. 89, p. 1216-1222, 2008.

LI, T.-R.; WHITE, K. P. Tissue-specific gene expression and ecdysone-regulated genomic networks in *Drosophila*. **Developmental Cell**, v. 5, p. 59-72, 2003.

LÓPEZ, D.; KOLTER, R. Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, p. 134-149, 2010.

MA, J.; LI, Y.; YE, Q.; LI, J.; HUA, Y.; JU, D.; ZHANG, D.; COOPER, R.; CHANG, M. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5220-5225, 2000.

MENEZES, C.; VOLLET-NETO, A.; CONTRERA, F. A. F. L.; VENTURIERI, G. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The Role of Useful microorganisms to stingless bees and stingless beekeeping. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. (Ed.) **Pot-Honey: A legacy of stingless bees**. New York: Springer Science+Business Media, 2013, p. 153-171.

MENEZES, C.; VOLLET-NETO, A.; MARSAIOLI, A. J.; ZAMPIERI, D. FONTOURA, I. C.; LUCHESSI, A. D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. **Current Biology**, v. 25, p. 2851-2855, 2015.

MICHENER, C. D. **The Bees of the World**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, USA, 2 ed., 2000, 913 p.

MIETHKE, M.; KLOTZ, O.; LINNE, U.; MAY, J. J.; BECKERING, C. L.; MARAHIEL, M. A. Ferri-bacillibactin uptake and hydrolysis in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 61, p. 1413-1427, 2006.

MORA, I.; CABREFIGA, J.; MONTESINOS, E. Cyclic lipopeptide biosynthetic genes and products, and inhibitory activity of plant-associated *Bacillus* against phytopathogenic bacteria. **Plos One**, 10(5):e0127738, 2015.

NADARASAH, G.; STAVRINIDES, J. Quantitative evaluation of the host-colonizing capabilities of the enteric bacterium *Pantoea* using plant and insect hosts. **Microbiology**, v. 160, p. 602-615, 2014.

NISHIO, E. K.; RIBEIRO, J. M.; OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE, C. G. T. J.; PRONI, E. A.; KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G. Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. **Scientific Reports**, DOI: 10.1038/srep21641, 2016.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997, 445 p.

NUNES-SILVA, P.; PIOT, N.; MEEUS, I.; BLOCHTEIN, B.; SMAGGHE, G. Absence of Leishmaniinae and Nosematidae in stingless bees. **Scientific Reports**, DOI: 10.1038/srep32547, 2016.

OH, D-C.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Induced production of Emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp. in competing coculture. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 515-520, 2007.

OH, D-C.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Sceliphrolactam, a polyene macrocyclic lactam from a wasp-associated *Streptomyces* sp. **Organic Letters**, v. 13, p. 752-755, 2011.

OH, D-C.; SCOTT, J. J.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Mycangimycin, a polyene peroxide from a mutualist *Streptomyces* sp. **Organic Letters**, v. 11, p. 633-636, 2009.

PALUDO, C. R.; RUZZINI, A. C.; SILVA-JUNIOR, E. A.; PISHCHANY, G.; CURRIE, C. R.; NASCIMENTO, F. N.; KOLTER, R. G.; CLARDY, J.; PUPO, M. T. Whole-Genome Sequence of *Bacillus* sp. SDLI1, Isolated from the Social Bee *Scaptotrigona depilis*. **Genome Announcements**, v. 4, e00174-16, 2016.

PASUMARTHI, R.; CHANDRASEKARAN, S.; MUTNURI, S. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia fergusonii* isolated from the Goan coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 76, p. 276-282, 2013.

PATEL, P. S.; HUANG, S.; FISHER, S.; PIRNIK, D.; AKLONIS, C.; DEAN, L.; MEYERS, E.; FERNANDES, P.; MAYERL, F. Bacillaene, a novel inhibitor of procaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, p. 997-1003, 1995.

PATEL, S.; AHMED, S.; ESWARI, J. S. Therapeutic cyclic lipopeptides mining from microbes: latest strides and hurdles. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 1177-1193, 2015.

PEDRO, S.R.M. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, p. 348-354, 2014.

PENTLAND, G. D. Ethanol produced by *Aureobasidium pullulans* and its effect on the growth of *Armillaria mellea*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 13, p. 1631-1639, 1967.

PETTIT, R. K. Mixed fermentation for natural product drug discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, p. 19-25, 2009.

PFANNEBECKER, J.; FRÖHLICH, J. Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of pediococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 288-296, 2008.

PHATAK, K. V.; BOSE, A.; KEHARIA, H. Characterization of novel lipopeptides produced by *Bacillus tequilensis* P15 using liquid chromatography coupled Electron Spray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC–ESI–MS/MS). **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 20, p. 133–143, 2014.

PIRES, D. P.; CLETO, S.; SILLANKORVA, S.; AZEREDO, J.; LU, T. K. Genetically engineered phages: a review of advances over the last decade. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, p. 523-543, 2016.

POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.; NGO, H. T.; AIZEN, M. A.; BIESMEIJER, J. C.; BREEZE, T. D.; DICKS, L. V.; GARIBALDI, L. A.; HILL, R.; SETTELE, J.; VANBERGEN, A. J. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, v. 540, p. 220-229, 2016.

POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Symbiont interactions in a tripartite mutualism: exploring the presence and impact of antagonism between two fungus-growing ant mutualists. **Plos One**, v. 5, p. 1-14, 2010.

POULSEN, M.; OH, D-C.; CLARDY, J. CURRIE, C. R. Chemical analyses of wasp-associated *Streptomyces* bacteria reveal a prolific potential for natural products discovery. **Plos One**, v. 6, p. 1-8, 2011.

PUPO, M. T.; CURRIE, C. R., CLARDY, J. Microbial symbionts of insects are the focus of the first International Cooperative Biodiversity Group (ICBG) in Brazil. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 393-401, 2016.

RAO, P. V.; KRISHNANA, K. T.; SALLEHB, N.; GANC, S. H. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 657–664, 2016.

RISÉ, P.; COLOMBO, C.; GALLI, C. Effects of simvastatin on the metabolism of polyunsaturated fatty acids and on glycerolipid, cholesterol, and de novo lipid synthesis in THP-1 cells. **The Journal of Lipid Research**, v. 38, p. 1299-1307, 1997.

ROMANO, A.; VITULLO, D.; SENATORE, M.; LIMA, G.; LANZOTTI, V. Antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO5A. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 2019-2025, 2013.

ROSA, C. A.; LACHANCE, M. A.; SILVA, J. O. C.; TEIXEIRA, A. C. P.; MARINI, M. M., ANTONINI, Y.; MARTINS, R. P. Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 271-275, 2003.

SAGHATELIAN, A.; TRAUGER, S. A.; WANT, E. J.; HAWKINS, E. G.; SIUZDAK, G.; CRAVATT, B. F. Assignment of endogenous substrates to enzymes by global metabolite profiling. **Biochemistry**, v. 43, p. 14332-14339, 2004.

SALMOND, G. P. C.; FINERAN, P. C. A century of the phage: past, present and future. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 777-86, 2015.

SANCHES, M. A. **Ação da própolis de *Scaptotrigona aff. postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) em diferentes linhagens de células tumorais**. 2014, 76f. Tese de doutorado apresentada à Universidade de Viçosa, Viçosa, MG, 2014.

SANTOS, A. V.; DILLON, R. J.; DILLON, V. M.; REYNOLDS, S. E.; SAMUELS, R. I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, p. 319-323, 2004.

SCHMIDT, E. W. Trading molecules and tracking targets in symbiotic interactions. **Nature Chemical Biology**, v. 4, p. 466-473, 2008.

SCOTT, J. J.; OH, D.-C.; YUCEER, M. C.; KLEPZIG, K. D.; CLARDY, J.; CURRIE, C. R. Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. **Science**, v. 322, p. 63, 2008.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, p. 313-340, 1966.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte, 2002, 253 p.

SINACORI, M.; FRANCESCA, N.; ALFONZO, A.; CRUCIATA, M.; SANNINO, C.; SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Cultivable microorganisms associated with honeys of different geographical and botanical origin. **Food Microbiology**, v. 38, p. 284-294, 2014.

SIT, C. S.; RUZZINI, A. C.; VAN ARNAM, E. B.; RAMADHAR, T. R.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Variable genetic architectures produce virtually identical molecules in bacterial symbionts of fungus-growing ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, p. 13150-13154, 2015.

SNAUWAERT, I.; PAPALEXANDRATOU, Z.; VUYST, L. D.; VANDAMME, P. Characterization of strains of *Weissella fabalis* sp. nov. and *Fructobacillus tropaeoli* from spontaneous cocoa bean fermentations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 1709-1716, 2013.

SOUZA, C. M.; SCHWABE, T. M. E.; PICHLER, H.; PLOIER, B.; LEITNER, E.; GUAN, X. L.; WENK, M. R.; RIEZMAN, I.; RIEZMAN, H. A stable yeast strain efficiently producing cholesterol instead of ergosterol is functional for tryptophan uptake, but not weak organic acid resistance. **Metabolic Engineering**, v. 13, p. 555-569, 2011.

SRIRAM, M. I.; GAYATHIRI, S.; GNANASELVI, U.; JENIFER, P. S.; RAJ, S. M.; GURUNATHAN, S. Novel lipopeptide biosurfactant produced by hydrocarbon

degrading and heavy metal tolerant bacterium *Escherichia fergusonii* KLU01 as a potential tool for bioremediation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9291-9295, 2011.

STANCU, C.; SIMA, A. Statins: mechanism of action and effects. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 5, p. 378-387, 2001.

STEVENSON, A.; CRAY, J. A.; WILLIAMS, J. P.; SANTOS, R.; SAHAY, R.; NEUENKIRCHEN, N.; MCCLURE, C. D.; GRANT, I. R. HOUGHTON, J. D. R.; QUINN, J. P.; TIMSON, D. J.; PATIL, S. V.; SINGHAL, R. S.; ANTÓN, J.; DIJKSTERHUIS, J.; HOCKING, A. D.; LIEVENS, B.; RANGEL, D. E. N.; VOYTEK, M. A.; GUNDE-CIMERMAN, N.; OREN, A.; TIMMIS, K. N.; MCGENITY, T. J.; HALLSWORTH, J. E. Is there a common water-activity limit for the three domains of life? **The ISME Journal**, v. 9, p. 1333-1351, 2015.

SU, N-W.; LIN, Y-L.; LEE, M-H.; HO, C-Y. Ankaflavin from *Monascus*-fermented red rice exhibits selective cytotoxic effect and induces cell death on Hep G2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1949-1954, 2005.

TANAKA, K.; ISHIHARA, A.; NAKAJIMA, H. Isolation of *anteiso*-C₁₇, *iso*-C₁₇, *iso*-C₁₆, and *iso*-C₁₅ Bacillomycin D from *Bacillus amyloliquefaciens* SD-32 and Their Antifungal Activities Against Plant Pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 1469-1476, 2014.

TSOURKAS, P. K.; YOST, D. G.; KROHN, A.; LEBLANC, L.; ZHANG, A.; STAMEREILERS, C.; AMY, P. S. Complete genome sequences of nine phages capable of infecting *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease in honeybees. **Genome Announcements**, v. 3, p. e01120-15. 2015.

VAN ARNAM, E. B.; RUZZINI, A. C.; SIT, C. S.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. A. Rebeccamycin analog provides plasmid-encoded niche defense. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, p. 14272-14274, 2015.

VAN ARNAM, E. B.; RUZZINI, A. C.; SIT, C. S.; HORN, H.; PINTO-TOMÁS, A. A.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Selvamycin, an atypical antifungal polyene from two alternative genomic contexts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, p. 12940-12945, 2016.

VANENGELSDORP, D.; MEIXNER, M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. S80-S95, 2010.

VISSER, A. A.; NOBRE, T.; CURRIE, C. R.; AENEN, D. K.; POULSEN, M. Exploring the potential for actinobacteria as defensive symbionts in fungus-growing termites. **Microbial Ecology**, v. 63, p. 975-985, 2012.

VOLLET-NETO, A. **Biologia térmica de *Scaptotrigona depilis* (Apidae, Meliponini): adaptações para lidar com altas temperaturas**. 2010, 97f. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2010.

WANG, M.; ZHAO, W.-Z.; XU, H.; WANG, Z.-W.; HE, S.-Y. *Bacillus* in the guts of honey bees (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae) mediate changes in amylase values. **European Journal of Entomology**, v. 112, p. 619-624, 2015.

WANG, S.-L.; YEN, Y.-H.; TSIAO, W.-J.; CHANG, W.-T.; WANG, C.-L. Production of antimicrobial compounds by *Monascus purpureus* CCRC31499 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 337-344, 2002.

WATANABE, J.; UEHARA, K.; MOGI, Y. Adaptation of the osmotolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* to an osmotic environment through copy number amplification of FLO11D. **Genetics**, v. 195, p. 393-405, 2013.

WEBER, T.; BLIN, K.; DUDDELA, S.; KRUG, D.; KIM, H. U.; BRUCCOLERI, R.; LEE, S. Y.; FISCHBACH, M. A. MÜLLER, R.; WOHLLEBEN, W.; BREITLING, R.; TAKANO, E.; MEDEMA, M. H. antiSMASH 3.0 - a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. W237-W243, 2015.

WELLS-BENNIK, M. H. J.; EIJLANDER, R. T.; DEN BESTEN, H. M. W.; BERENDSEN, E. M.; WARDA, A. K.; KRAWCZYK, A. O.; GROOT, M. N. N.; XIAO, Y.; ZWIETERING, M. H.; KUIPERS, O. P.; ABEE, T. Bacterial spores in food: survival, emergence, and outgrowth. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 7, p. 457-82, 2016.

WHALLEY, W. B.; FERGUSON, G.; MARSH, W. C.; RESTIVO, R. J. The chemistry of fungi. Part LXVIII. The absolute configuration of (+)-sclerotiorin and of the azaphilones. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 1366-1369, 1976.

WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.;

GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.) **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990, p. 315-322.

WILFLING, F.; HAAS, J. T.; WALTHER, T. C.; FARESE JR, R. V. Lipid droplet biogenesis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 29, p. 39-45, 2014.

WILLIAMS, M. L.; MENON, G. K.; HANLEY, K. P. HMG-CoA reductase inhibitors perturb fatty acid metabolism and induce peroxisomes in keratinocytes. **The Journal of Lipid Research**, v. 33, p. 93-208, 1992.

YOO, J.-S.; ZHENG, C.-J.; LEE, S.; KWAKB, J.-H.; KIM, W.-G. Macrolactin N, a new peptide deformylase inhibitor produced by *Bacillus subtilis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 4889-4892, 2006.

YOUNG-RAN, S.; JEONG, D-Y.; CHA, Y-S.; BAIK, S-H. Exopolysaccharide produced by *Pediococcus acidilactici* M76 isolated from the Korean traditional rice wine, Makgeolli. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 681-688, 2013.

ZHOU, Y.; LIANG, Y.; LYNCH, K.; DENNIS, J. J.; WISHART, D. S. PHAST: A fast phage search tool. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. W347-W352, 2011.

ZWEERINK, M. M.; EDISON, A. Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. III. mode of action of difficidin. **The Journal of Antibiotics**, v. XL, p. 1692-1697, 1987.

ANEXOS

Anexo 1. Halos inibitórios (mm) frente à patógenos humanos, desenvolvidos por 42 micro-organismos associados à *S. depilis*, após 24 horas de contato. Em vermelho estão destacados os 29 micro-organismos que apresentaram halos inibitórios superiores a 10 mm.

Micro-organismos	<i>S. aureus</i> ATCC 3538	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>P. mirabilis</i> ATCC 29906	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
<i>Pantoea eucrina</i> SDCEI1*	-	12	14	13	-	13	9
<i>Bacillus</i> sp. SDPI10	14	9	9	12	-	-	-
<i>Fructobacillus tropaeoli</i> SDMI2	9	7	9	15	10	11	7
<i>Pediococcus stilesii</i> SDLI3	12	11	12	12	10	8	9
SDPRI2	-	8	7	7	-	7	7
<i>Bacillus</i> sp. SDPI6	26	15	17	20	-	13	16
SDPI12	10	-	-	-	-	-	-
SDMI1	7	10	13	11	-	9	9
SDPI7	11	-	-	-	-	-	-
SDLP2	-	-	-	15	-	-	-
SDLI2	-	8	8	8	-	-	-
SDA3I4	-	11	12	12	-	7	8
<i>Escherichia fergusonii</i> SDA3I2	9	12	13	13	9	7	11
SDA3I1	-	10	10	12	9	10	9
SDEI3	-	15	13	10	-	-	-
SDA1I1	-	10	11	9	-	-	7
<i>Bacillus</i> sp. SDPI5	26	13	15	17	-	12	14
SDPI4	16	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. SDPI3	20	14	11	15	-	13	15
<i>Bacillus</i> sp. SDPI9	17	-	8	11	-	-	-
<i>Monascus ruber</i> SDCP1	11	-	-	-	-	-	-
SDCEI5	-	-	8	8	-	7	-
SDLQ3	-	7	7	9	-	7	-
<i>Bacillus</i> sp. SDPQ1-01	20	-	-	-	-	-	-
SDLQ2	-	7	7	10	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. SDPQ1-02	16	-	-	-	-	-	-
SDCEP3-02	-	-	-	-	15	-	-
SDASP2	-	-	8	-	-	-	-
SDEP14	-	-	-	10	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. SDLI1	19	15	11	17	-	16	15
SDASP3	16	-	-	-	-	-	-
SDEQ5	-	-	-	-	8	-	-
SDMQ2	10	-	-	-	7	-	-
SDPQ4	11	7	-	7	-	-	-
SDEP5	-	-	-	-	11	-	-
SDEP6	12	-	-	-	9	-	-
SDPRP7	-	-	-	10	-	-	-
SDCEQ1	7	7	-	12	7	-	-
SDEQ1	-	-	-	7	7	-	-
SDEQ6	7	-	-	-	-	-	7
SDMQ4-02	-	12	-	-	-	-	8
SDCEQ2	11	8	7	-	-	7	9

Estreptomicina 300 µg	23	17	22	15	x	24	x
Eritromicina 15 µg	21	-	x	x	x	x	x
Cloranfenicol 30 µg	32	25	10	25	-	20	x
Ciprofloxacina 5 µg	x	x	20	22	12	28	x
Ceftazidima 30 µg	x	x	x	x	22	x	x
Anfotericina B 100 µg	x	x	x	x	x	x	12

- Não foi ativo x Não foi avaliado

*Codificação dos micro-organismos isolados: Espécie da abelha (SD = *Scaptotrigona depilis*); Local de isolamento (CE = cerume estrutural; P = pólen; M = mel; L = lixo; PR = própolis; E = entrada da colônia; A3 = mix de três abelhas vortexadas; A1 = uma abelha vortexada; C = cerume do favo de cria; AS = abelha seccionadas; L = larva esterilizada). Meio de cultura utilizado para o isolamento (P = PDA; I = ISP-2; Q = Quitina). Sequência de isolamento (1, 2, 3...). Micro-organismos que foram repurificados (-01, -02).

Anexo 2. Halos inibitórios (mm) frente à patógenos humanos, desenvolvidos por 20 micro-organismos associados à *S. depilis*, após 168 horas de contato. Em vermelho estão destacados os 15 micro-organismos que apresentaram halos inibitórios superiores a 10 mm.

Micro-organismos	<i>S. aureus</i> ATCC 3538	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>P. mirabilis</i> ATCC 29906	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
<i>Pantoea eucrina</i> SDCEI1*	-	-	-	13	-	12	9
<i>Bacillus</i> sp. SDPI10	21	-	-	-	-	-	-
<i>Fructobacillus tropaeoli</i> SDMI2	-	7	-	15	-	-	-
<i>Pediococcus stilesii</i> SDLI3	11	11	-	12	-	8	7
<i>Bacillus</i> sp. SDPI6	33	10	22	-	-	16	30
SDMI1	-	9	-	-	-	-	8
SDLI2	-	-	-	8	-	-	-
SDA3I4	-	11	-	11	-	-	-
<i>Escherichia fergusonii</i> SDA3I2	-	11	-	14	-	-	11
SDA3I1	-	10	-	-	-	-	-
SDEI3	-	30	-	12	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. SDPI5	35	13	-	17	-	13	14
<i>Bacillus</i> sp. SDPI3	20	14	15	14	-	13	15
<i>Bacillus</i> sp. SDPI9	18	-	-	-	-	-	-
<i>Monascus ruber</i> SDCP1	20	-	-	-	-	-	-
SDLQ3	-	-	-	10	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. SDPQ1-01	21	-	-	-	-	-	-
SDLQ2	-	-	-	10	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. SDPQ1-02	17	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. SDLI1	21	20	15	17	-	-	22

- Não foi ativo

*Codificação dos micro-organismos isolados: Espécie da abelha (SD = *Scaptotrigona depilis*); Local de isolamento (CE = cerume estrutural; P = pólen; M = mel; L = lixo; E = entrada da colônia; A3 = mix de três abelhas vortexadas; A1 = uma abelha vortexada; C = cerume do favo de cria; L = larva esterilizada). Meio de cultura utilizado para o isolamento (P = PDA; I = ISP-2; Q = Quitina). Sequência de isolamento (1, 2, 3...). Micro-organismos que foram repurificados (-01, -02).

Anexo 3. Espectros de massas em alta resolução de surfactinas (**B1-B7**) isoladas de *Bacillus* sp. SDL11.

HRESIMS de surfactina **B1**.

HRESIMS de surfactina **B2**.

HRESIMS de surfactina **B3**.

HRESIMS de surfactina **B4**.

HRESIMS de surfactina **B5**.

HRESIMS de surfactina **B6**.

HRESIMS de surfactina **B7**.

Anexo 4. Dados espectroscópicos de bacillomicina D (**B8**), produzida por *Bacillus* sp. SDLI1.

Mapa de contornos de gHSQC de **B8** (CD₃OD, 600 MHz).

Mapa de contornos de gHMBC de **B8** (CD₃OD, 600 MHz).

Mapa de contornos de $g\text{TOCSY}$ de **B8** (CD_3OD , 600 MHz).

Anexo 5. Dados espectroscópicos e espectrométricos de monascinol (**M2**), produzido por *M. ruber* SDCP1.

Mapa de contornos de gHMQC de **M2** (CDCl₃, 500 MHz).

Mapa de contornos de gHMBC de **M2** (CDCl₃, 500 MHz).

HRESIMS de **M2**.

Experimento de NOEdiff com irradiação de H-8 (δ_H 3,03) em **M2**.

Anexo 6. Dados espectroscópicos e espectrométricos de monascina (**M3**), produzida por *M. ruber* SDCP1.

Mapa de contornos de gHMQC de **M3** (CDCl_3 , 500 MHz).

Mapa de contornos de gHMBC de **M3** (CDCl_3 , 500 MHz).

HRESIMS de **M3**.

Experimento de NOEdiff com irradiação de H-8 (δ_{H} 3,23) em **M3**.

Anexo 7. Resultado da análise lipidômica de LDs isolados de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 no controle (C) e cultivo com lovastatina (**M6**) 50 µg/mL (LOV). Análises feitas por LC-MS no modo positivo. Em azul estão destacados os lipídeos que foram diminuídos no teste (mínimo 5 vezes de diferença) e em vermelho estão marcados os lipídeos que tiveram detecção aumentada no cultivo com **M6** (mínimo 5 vezes de diferença).

Lipídeo	Classe	Ácido graxo	Área [C]	Área [Lov]
TG(18:2/14:1/18:2)	TG	18:2/14:1/18:2	1.78E+07	1.33E+06
SM(d44:8)	SM	d44:8	5.23E+05	1.12E+05
TG(8:0/10:0/10:0)	TG	8:0/10:0/10:0	1.62E+06	5.32E+05
TG(18:0/16:0/16:1)	TG	18:0/16:0/16:1	1.08E+09	4.66E+08
TG(16:0/14:0/18:1)	TG	16:0/14:0/18:1	1.43E+08	8.22E+07
TG(17:4/16:1/18:2)	TG	17:4/16:1/18:2	2.95E+08	2.12E+08
So(d24:0)	So	d24:0	2.38E+07	1.90E+07
DG(18:1/18:1)	DG	18:1/18:1	1.52E+09	1.22E+09
PE(16:0/16:1)	PE	16:0/16:1	2.56E+08	2.07E+08
DG(16:0p)	DG	16:0p	2.48E+07	2.13E+07
TG(18:1/18:1/18:2)	TG	18:1/18:1/18:2	1.64E+07	1.42E+07
TG(17:4/18:2/18:2)	TG	17:4/18:2/18:2	1.54E+09	1.35E+09
PC(37:3)	PC	37:03:00	9.22E+06	8.16E+06
PC(40:2)	PC	40:02:00	1.01E+07	9.03E+06
DG(42:1p)	DG	42:1p	1.40E+07	1.27E+07
DG(18:1/18:2)	DG	18:1/18:2	3.26E+09	2.94E+09
PC(52:10)	PC	52:10:00	3.78E+06	3.41E+06
PC(36:0)	PC	36:00:00	1.22E+08	1.11E+08
PE(18:0p)	PE	18:0p	4.72E+06	4.34E+06
MG(18:1)	MG	18:01	9.15E+06	8.45E+06
DG(16:1/18:2)	DG	16:1/18:2	8.69E+08	8.16E+08
TG(18:1/18:2/18:2)	TG	18:1/18:2/18:2	5.11E+10	4.80E+10
ZyE(18:2)	ZyE	18:02	1.39E+08	1.31E+08
TG(26:0/18:0/18:1)	TG	26:0/18:0/18:1	1.36E+09	1.28E+09
TG(58:1)	TG	58:01:00	5.65E+08	5.36E+08
PE(18:1/18:1)	PE	18:1/18:1	2.13E+08	2.03E+08
TG(16:1/17:2/18:2)	TG	16:1/17:2/18:2	1.22E+07	1.20E+07
PE(19:1/16:0)	PE	19:1/16:0	1.95E+07	1.92E+07
PC(51:9)	PC	51:09:00	2.48E+07	2.45E+07
DG(18:1/12:0)	DG	18:1/12:0	2.68E+07	2.66E+07
PC(18:1/24:1)	PC	18:1/24:1	1.49E+07	1.47E+07
PC(22:2)	PC	22:02	3.35E+06	3.34E+06
DG(34:1p)	DG	34:1p	4.44E+06	4.43E+06
PC(44:2)	PC	44:02:00	2.28E+08	2.29E+08
LdMePE(16:1)	LdMePE	16:01	1.50E+07	1.51E+07
PE(30:0)	PE	30:00:00	1.48E+07	1.49E+07
LdMePE(18:1)	LdMePE	18:01	7.18E+06	7.25E+06
PG(16:0/16:1)	PG	16:0/16:1	9.08E+06	9.18E+06
Cer(d20:0/26:0)	Cer	d20:0/26:0	3.48E+07	3.52E+07
dMePE(36:2)	dMePE	36:02:00	5.29E+07	5.36E+07

MG(16:0)	MG	16:00	8.81E+06	8.95E+06
PI(36:4)	PI	36:04:00	6.67E+06	6.78E+06
PC(17:1/18:2)	PC	17:1/18:2	6.02E+07	6.15E+07
MG(18:0)	MG	18:00	1.60E+07	1.63E+07
PG(16:1/14:0)	PG	16:1/14:0	2.68E+06	2.74E+06
PC(18:1/24:0)	PC	18:1/24:0	6.75E+07	6.91E+07
PC(53:12)	PC	53:12:00	5.68E+06	5.81E+06
PC(38:1)	PC	38:01:00	1.48E+07	1.51E+07
LPC(24:0)	LPC	24:00:00	3.97E+06	4.08E+06
TG(18:2/17:2/18:2)	TG	18:2/17:2/18:2	1.02E+09	1.05E+09
LPC(18:0)	LPC	18:00	1.72E+08	1.77E+08
LdMePE(18:2)	LdMePE	18:02	5.24E+06	5.42E+06
PC(40:1)	PC	40:01:00	1.53E+07	1.58E+07
TG(16:0/16:0/18:1)	TG	16:0/16:0/18:1	1.31E+09	1.35E+09
So(d24:0)	So	d24:0	5.00E+07	5.18E+07
So(d20:0)	So	d20:0	7.13E+06	7.39E+06
LPC(20:3)	LPC	20:03	5.44E+07	5.64E+07
TG(26:0/16:0/18:1)	TG	26:0/16:0/18:1	2.38E+09	2.47E+09
TG(18:1/18:1/18:2)	TG	18:1/18:1/18:2	3.10E+10	3.22E+10
PC(35:2)	PC	35:02:00	4.48E+07	4.66E+07
TG(16:1/16:1/18:1)	TG	16:1/16:1/18:1	6.64E+09	6.92E+09
TG(16:0/18:1/18:1)	TG	16:0/18:1/18:1	3.00E+10	3.13E+10
PC(35:4)	PC	35:04:00	1.92E+07	2.01E+07
dMePE(36:3)	dMePE	36:03:00	1.76E+08	1.84E+08
PC(20:3/14:1)	PC	20:3/14:1	4.57E+07	4.78E+07
PC(16:0/18:1)	PC	16:0/18:1	1.73E+09	1.82E+09
PE(18:1/18:2)	PE	18:1/18:2	9.28E+08	9.77E+08
DG(26:0/18:1)	DG	26:0/18:1	5.96E+07	6.27E+07
DG(16:1/18:1)	DG	16:1/18:1	4.85E+09	5.10E+09
PI(18:0/18:1)	PI	18:0/18:1	1.22E+07	1.28E+07
PE(17:1/16:0)	PE	17:1/16:0	8.22E+07	8.68E+07
PE(16:1/18:2)	PE	16:1/18:2	3.15E+08	3.33E+08
PE(30:2)	PE	30:02:00	3.34E+06	3.53E+06
dMePE(18:2/18:2)	dMePE	18:2/18:2	1.05E+08	1.11E+08
PC(44:1)	PC	44:01:00	2.66E+08	2.82E+08
PC(30:3)	PC	30:03:00	4.28E+06	4.53E+06
DG(16:0/18:1)	DG	16:0/18:1	3.33E+09	3.52E+09
dMePE(34:2)	dMePE	34:02:00	1.94E+08	2.06E+08
So(d24:0)	So	d24:0	1.07E+07	1.14E+07
PE(16:1/18:1)	PE	16:1/18:1	1.05E+09	1.12E+09
PC(18:1/18:1)	PC	18:1/18:1	5.45E+09	5.79E+09
PE(18:2/18:2)	PE	18:2/18:2	3.99E+08	4.28E+08
dMePE(32:2)	dMePE	32:02:00	1.94E+07	2.08E+07
PE(32:0)	PE	32:00:00	3.31E+08	3.55E+08
dMePE(34:3)	dMePE	34:03:00	1.20E+08	1.29E+08

TG(16:1/18:1/18:2)	TG	16:1/18:1/18:2	3.90E+10	4.19E+10
LPC(18:2)	LPC	18:02	1.12E+09	1.21E+09
PC(18:0/18:1)	PC	18:0/18:1	1.64E+09	1.77E+09
PE(14:0/20:4)	PE	14:0/20:4	3.04E+06	3.27E+06
PC(38:3)	PC	38:03:00	4.18E+08	4.50E+08
TG(18:2/18:2/18:2)	TG	18:2/18:2/18:2	1.32E+10	1.42E+10
LPC(16:1)	LPC	16:01	4.76E+07	5.13E+07
PC(20:2/18:2)	PC	20:2/18:2	1.49E+07	1.60E+07
PC(18:1/18:2)	PC	18:1/18:2	1.31E+10	1.41E+10
PE(30:1)	PE	30:01:00	3.02E+07	3.26E+07
TG(16:1/16:1/18:2)	TG	16:1/16:1/18:2	5.78E+09	6.23E+09
So(d20:0)	So	d20:0	2.88E+07	3.11E+07
PC(30:2)	PC	30:02:00	1.09E+08	1.17E+08
PC(28:2)	PC	28:02:00	1.06E+07	1.14E+07
TG(16:1/14:0/18:1)	TG	16:1/14:0/18:1	8.78E+08	9.50E+08
PC(32:3)	PC	32:03:00	1.00E+08	1.08E+08
PI(18:1/18:2)	PI	18:1/18:2	2.95E+07	3.20E+07
PG(16:1/18:1)	PG	16:1/18:1	2.03E+07	2.20E+07
PG(16:1/16:1)	PG	16:1/16:1	4.16E+06	4.51E+06
PC(33:3)	PC	33:03:00	2.14E+06	2.32E+06
PC(18:2/18:2)	PC	18:2/18:2	1.10E+10	1.19E+10
LPC(20:2)	LPC	20:02	8.60E+06	9.34E+06
PI(16:0/18:2)	PI	16:0/18:2	1.56E+08	1.69E+08
PE(16:1/16:1)	PE	16:1/16:1	1.12E+08	1.22E+08
DG(16:1/16:1)	DG	16:1/16:1	1.46E+08	1.59E+08
LPC(12:0)	LPC	12:00	5.57E+06	6.06E+06
PC(18:0)	PC	18:00	2.65E+06	2.88E+06
PE(16:0/18:1)	PE	16:0/18:1	1.20E+08	1.30E+08
PC(40:10)	PC	40:10:00	6.86E+06	7.48E+06
So(d20:0)	So	d20:0	4.50E+06	4.92E+06
PE(17:1/18:1)	PE	17:1/18:1	3.62E+07	3.96E+07
DG(54:6)	DG	54:06:00	9.16E+07	1.00E+08
PC(28:1)	PC	28:01:00	2.44E+07	2.68E+07
PC(38:2)	PC	38:02:00	2.46E+08	2.69E+08
PE(17:1/16:1)	PE	17:1/16:1	2.83E+07	3.10E+07
PC(30:1)	PC	30:01:00	8.62E+07	9.46E+07
PC(20:5/18:2)	PC	20:5/18:2	1.58E+09	1.73E+09
PC(16:1/18:2)	PC	16:1/18:2	5.84E+09	6.42E+09
TG(16:1/12:0/18:2)	TG	16:1/12:0/18:2	1.57E+08	1.74E+08
TG(26:0/18:1/18:1)	TG	26:0/18:1/18:1	3.19E+09	3.52E+09
PI(16:0/18:1)	PI	16:0/18:1	5.51E+08	6.08E+08
TG(16:1/16:2/18:2)	TG	16:1/16:2/18:2	5.40E+08	5.97E+08
TG(16:0/8:0/18:1)	TG	16:0/8:0/18:1	1.86E+07	2.05E+07
PC(34:4)	PC	34:04:00	2.09E+08	2.31E+08
DG(12:0/18:2)	DG	12:0/18:2	9.67E+06	1.07E+07

LPC(18:0)	LPC	18:00	7.45E+06	8.25E+06
PC(16:1/18:1)	PC	16:1/18:1	6.56E+09	7.27E+09
PI(34:3)	PI	34:03:00	1.43E+07	1.58E+07
PE(31:1)	PE	31:01:00	5.94E+06	6.59E+06
DG(56:5)	DG	56:05:00	5.64E+08	6.27E+08
LPC(16:0)	LPC	16:00	1.68E+08	1.87E+08
TG(18:0/18:1/18:2)	TG	18:0/18:1/18:2	1.85E+10	2.07E+10
TG(18:1/12:0/18:2)	TG	18:1/12:0/18:2	1.39E+09	1.55E+09
PC(16:0/16:1)	PC	16:0/16:1	2.68E+08	3.00E+08
TG(16:1/12:0/18:1)	TG	16:1/12:0/18:1	1.97E+08	2.22E+08
TG(16:1/17:1/18:2)	TG	16:1/17:1/18:2	6.38E+07	7.16E+07
DG(18:1/24:0)	DG	18:1/24:0	3.12E+07	3.51E+07
TG(16:1/18:2/18:2)	TG	16:1/18:2/18:2	1.62E+10	1.82E+10
DG(54:5)	DG	54:05:00	2.78E+07	3.14E+07
TG(16:0/18:1/18:2)	TG	16:0/18:1/18:2	1.25E+07	1.42E+07
TG(16:1/10:0/18:1)	TG	16:1/10:0/18:1	4.17E+07	4.72E+07
LPC(20:1)	LPC	20:01	2.70E+07	3.07E+07
PC(16:1/16:1)	PC	16:1/16:1	6.90E+08	7.85E+08
PC(32:2)	PC	32:02:00	3.63E+07	4.14E+07
TG(8:0/10:0/10:0)	TG	8:0/10:0/10:0	8.78E+06	1.00E+07
TG(16:2/18:2/18:2)	TG	16:2/18:2/18:2	8.84E+08	1.01E+09
DG(56:7)	DG	56:07:00	7.25E+08	8.28E+08
TG(16:0/18:1/18:3)	TG	16:0/18:1/18:3	2.90E+07	3.33E+07
TG(18:1/17:1/18:2)	TG	18:1/17:1/18:2	1.84E+08	2.12E+08
TG(16:0/10:0/18:1)	TG	16:0/10:0/18:1	2.38E+07	2.74E+07
LPC(26:0)	LPC	26:00:00	3.36E+07	3.88E+07
DG(26:0/18:2)	DG	26:0/18:2	3.35E+07	3.87E+07
TG(12:0/18:2/18:2)	TG	12:0/18:2/18:2	4.42E+08	5.12E+08
TG(16:0/16:1/18:1)	TG	16:0/16:1/18:1	3.22E+09	3.75E+09
TG(8:0/8:0/8:0)	TG	8:0/8:0/8:0	1.66E+07	1.93E+07
LPC(14:1)	LPC	14:01	3.46E+06	4.06E+06
PC(33:3)	PC	33:03:00	3.01E+07	3.53E+07
So(d22:0)	So	d22:0	2.47E+07	2.92E+07
TG(18:2/17:1/18:2)	TG	18:2/17:1/18:2	9.02E+07	1.07E+08
TG(16:0/18:1/18:1)	TG	16:0/18:1/18:1	3.01E+07	3.58E+07
TG(10:0/18:2/18:2)	TG	10:0/18:2/18:2	3.38E+07	4.07E+07
PE(18:0/18:1)	PE	18:0/18:1	5.74E+06	6.92E+06
PI(18:1/18:1)	PI	18:1/18:1	2.38E+07	2.89E+07
TG(18:1/18:1/18:2)	TG	18:1/18:1/18:2	2.95E+08	3.60E+08
TG(16:1/18:1/18:3)	TG	16:1/18:1/18:3	1.78E+07	2.18E+07
PC(18:0)	PC	18:00	1.81E+06	2.24E+06
TG(15:0/16:1/18:2)	TG	15:0/16:1/18:2	8.29E+06	1.03E+07
TG(12:0/12:0/12:0)	TG	12:0/12:0/12:0	1.14E+07	1.41E+07
DG(18:0/18:1)	DG	18:0/18:1	3.79E+08	4.70E+08
LPC(16:2)	LPC	16:02	1.31E+07	1.63E+07

PC(35:1)	PC	35:01:00	7.38E+06	9.18E+06
TG(70:2)	TG	70:02:00	2.03E+07	2.54E+07
TG(16:2/14:1/18:2)	TG	16:2/14:1/18:2	1.23E+07	1.54E+07
PG(16:0/18:1)	PG	16:0/18:1	2.67E+07	3.38E+07
DG(24:0/18:2)	DG	24:0/18:2	6.89E+06	8.75E+06
TG(26:0/16:1/18:1)	TG	26:0/16:1/18:1	2.54E+09	3.37E+09
LPC(28:3)	LPC	28:03:00	3.08E+06	4.15E+06
TG(18:1/18:2/18:2)	TG	18:1/18:2/18:2	3.00E+07	4.10E+07
TG(18:1/18:1/18:2)	TG	18:1/18:1/18:2	8.01E+06	1.17E+07
DG(16:1/18:1)	DG	16:1/18:1	5.18E+07	7.79E+07
DG(18:1/14:0)	DG	18:1/14:0	1.07E+08	1.61E+08
TG(8:0/8:0/10:0)	TG	8:0/8:0/10:0	2.06E+07	3.18E+07
TG(16:1/17:1/18:2)	TG	16:1/17:1/18:2	2.02E+06	3.30E+06
TG(16:0/18:1/18:2)	TG	16:0/18:1/18:2	4.24E+10	7.17E+10
TG(16:0/18:1/18:2)	TG	16:0/18:1/18:2	7.65E+07	1.35E+08
TG(16:0/12:0/18:1)	TG	16:0/12:0/18:1	4.07E+07	7.21E+07
dMePE(36:1)	dMePE	36:01:00	3.43E+06	6.21E+06
TG(16:1/17:1/18:1)	TG	16:1/17:1/18:1	3.75E+07	8.35E+07
PC(36:3)	PC	36:03:00	2.77E+03	5.54E+05
TG(16:0/18:1/18:2)	TG	16:0/18:1/18:2	1.63E+04	1.29E+07

Abreviações = Cer: ceramidas; DG: diacilglicerol; dMePE: *N,N*-dimetilfosfatidiletanolamina; LdMePE: liso-*N,N*-dimetilfosfatidiletanolamina; LPC: lisofosfatidilcolina; MG: monoacilglicerol; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol; SM: esfingomielina; So: esfingosina; TG: triacilglicerol; ZyE: éster de zimosterol

Anexo 8. Resultado da análise lipidômica de LDs isolados de *Zygosaccharomyces* sp. SDBC30G1 no controle (C) e cultivo com lovastatina (**M6**) 50 µg/mL (LOV). Análises feitas por LC-MS no modo negativo. Em azul estão destacados os lipídeos que foram diminuídos no teste (mínimo 5 vezes de diferença).

Lipídeo	Classe	Ácido graxo	Área [C]	Área [Lov]
CL(23:4/24:1/16:1/18:1)	CL	23:4/24:1/16:1/18:1	1.15E+07	7.92E+04
PE(16:1/14:1)	PE	16:1/14:1	7.96E+06	9.37E+04
PG(17:1/16:1)	PG	17:1/16:1	5.99E+06	1.22E+05
PEt(18:0/16:0)	PEt	18:0/16:0	9.95E+06	2.24E+05
PE(17:1/14:0)	PE	17:1/14:0	1.69E+07	4.27E+05
PG(19:1/18:1)	PG	19:1/18:1	5.54E+06	1.45E+05
PG(16:0/14:0)	PG	16:0/14:0	5.90E+06	1.69E+05
LPE(18:4)	LPE	18:04	3.22E+06	1.04E+05
CL(81:9)	CL	81:09:00	1.72E+07	6.49E+05
PE(19:1/18:1)	PE	19:1/18:1	1.21E+07	6.30E+05
PG(17:1/18:1)	PG	17:1/18:1	1.19E+07	6.85E+05
PEt(18:1/18:1)	PEt	18:1/18:1	1.77E+07	1.09E+06
dMePE(17:0/18:1)	dMePE	17:0/18:1	7.54E+06	4.91E+05
PG(16:1/16:1)	PG	16:1/16:1	3.29E+07	2.16E+06
PEt(18:2/18:2)	PEt	18:2/18:2	6.69E+06	4.62E+05
PS(16:1/16:1)	PS	16:1/16:1	7.70E+06	5.47E+05
PE(35:3)	PE	35:03:00	9.96E+06	7.14E+05
PG(16:1/14:0)	PG	16:1/14:0	1.48E+07	1.07E+06
PEt(18:1/18:2)	PEt	18:1/18:2	8.75E+06	6.84E+05
PE(16:1/14:0)	PE	16:1/14:0	9.46E+07	7.52E+06
PG(16:0/16:1)	PG	16:0/16:1	9.11E+07	7.34E+06
PA(16:1/18:2)	PA	16:1/18:2	7.55E+06	6.49E+05
PS(18:1/18:2)	PS	18:1/18:2	1.41E+07	1.22E+06
PS(36:6)	PS	36:06:00	1.36E+07	1.18E+06
PG(18:1/18:1)	PG	18:1/18:1	5.16E+07	4.59E+06
PG(19:1/16:0)	PG	19:1/16:0	1.30E+07	1.16E+06
PG(18:1/18:3)	PG	18:1/18:3	9.85E+06	8.86E+05
OAHFA(32:1)	OAHFA	32:01:00	2.38E+07	2.39E+06
CL(23:5/24:1/20:3/18:2)	CL	23:5/24:1/20:3/18:2	2.80E+07	2.89E+06
PE(16:0/16:0)	PE	16:0/16:0	1.12E+07	1.22E+06
PG(18:1/18:2)	PG	18:1/18:2	1.99E+07	2.17E+06
PG(17:1/16:0)	PG	17:1/16:0	2.85E+07	3.15E+06
PE(16:0/14:0)	PE	16:0/14:0	3.76E+07	4.21E+06
PG(18:2/18:2)	PG	18:2/18:2	9.08E+06	1.06E+06
PS(36:4)	PS	36:04:00	1.48E+07	1.74E+06
PG(16:1/18:2)	PG	16:1/18:2	1.35E+07	1.63E+06
PG(16:0/18:2)	PG	16:0/18:2	1.53E+08	1.90E+07
LPE(20:5)	LPE	20:05	1.14E+07	1.48E+06
dMePE(16:1/16:1)	dMePE	16:1/16:1	1.16E+07	1.51E+06
PEt(16:1/14:1)	PEt	16:1/14:1	1.58E+07	2.11E+06
dMePE(16:0/18:1)	dMePE	16:0/18:1	1.53E+07	2.04E+06

PC(18:0/18:1)	PC	18:0/18:1	3.63E+07	5.23E+06
PE(35:4)	PE	35:04:00	1.01E+07	1.47E+06
PEt(16:1/14:0)	PEt	16:1/14:0	2.23E+07	3.28E+06
PG(16:0/18:1)	PG	16:0/18:1	2.21E+08	3.29E+07
PC(16:0/18:1)	PC	16:0/18:1	2.20E+07	3.29E+06
PI(38:7)	PI	38:07:00	8.58E+06	1.30E+06
PE(16:2/18:2)	PE	16:2/18:2	9.76E+06	1.55E+06
LPC(18:1)	LPC	18:01	1.31E+07	2.13E+06
CL(85:9)	CL	85:09:00	2.01E+07	3.32E+06
dMePE(16:1/18:1)	dMePE	16:1/18:1	1.49E+08	2.52E+07
PA(16:0/16:1)	PA	16:0/16:1	2.05E+07	3.51E+06
PS(16:0/18:1)	PS	16:0/18:1	6.70E+07	1.15E+07
dMePE(18:0/18:1)	dMePE	18:0/18:1	1.87E+07	3.20E+06
LPA(16:1)	LPA	16:01	4.12E+07	7.08E+06
LPA(20:4)	LPA	20:04	2.46E+07	4.23E+06
PS(16:1/18:2)	PS	16:1/18:2	6.46E+07	1.12E+07
PS(16:1/18:1)	PS	16:1/18:1	6.23E+08	1.12E+08
PMe(15:1/16:1)	PMe	15:1/16:1	3.85E+07	7.07E+06
LPA(18:1)	LPA	18:01	6.99E+07	1.29E+07
PEt(18:4/16:1)	PEt	18:4/16:1	2.33E+07	4.34E+06
PA(18:0/18:1)	PA	18:0/18:1	3.50E+07	6.62E+06
OAHFA(18:1/18:1)	OAHFA	18:1/18:1	4.44E+07	8.51E+06
PA(16:0/18:1)	PA	16:0/18:1	3.88E+08	7.44E+07
LdMePE(19:2)	LdMePE	19:02	2.23E+07	4.32E+06
PEt(16:1/16:2)	PEt	16:1/16:2	6.52E+07	1.28E+07
PA(16:1/18:2)	PA	16:1/18:2	2.17E+08	4.29E+07
PEt(16:1/16:2)	PEt	16:1/16:2	2.17E+08	4.27E+07
PAF(16:0)	PAF	16:00	2.66E+08	5.26E+07
PA(16:0/18:1)	PA	16:0/18:1	2.58E+07	5.12E+06
PA(18:1/18:2)	PA	18:1/18:2	2.98E+08	5.93E+07
PS(16:1/20:4)	PS	16:1/20:4	1.22E+08	2.45E+07
LPE(18:1)	LPE	18:01	1.16E+07	2.37E+06
dMePE(17:1/18:2)	dMePE	17:1/18:2	3.49E+07	7.16E+06
LPE(18:4)	LPE	18:04	1.39E+07	2.87E+06
PA(18:0/18:1)	PA	18:0/18:1	2.20E+07	4.54E+06
PEt(16:2/18:2)	PEt	16:2/18:2	1.44E+08	2.99E+07
PMe(18:2/17:2)	PMe	18:2/17:2	1.44E+08	2.99E+07
PE(37:3)	PE	37:03:00	2.12E+07	4.43E+06
PEt(16:1/16:1)	PEt	16:1/16:1	9.60E+08	2.02E+08
dMePE(35:3)	dMePE	35:03:00	2.12E+07	4.47E+06
dMePE(18:1/18:1)	dMePE	18:1/18:1	2.66E+07	5.63E+06
LPA(20:5)	LPA	20:05	5.07E+07	1.08E+07
dMePE(16:1/18:2)	dMePE	16:1/18:2	8.94E+07	1.93E+07
PA(16:1/18:2)	PA	16:1/18:2	5.84E+07	1.30E+07
LPE(18:2)	LPE	18:02	8.02E+06	1.80E+06

PEt(16:1/18:1)	PEt	16:1/18:1	9.59E+07	2.15E+07
PE(35:2)	PE	35:02:00	4.75E+07	1.08E+07
PMe(17:1/18:1)	PMe	17:1/18:1	9.42E+07	2.16E+07
LPI(18:3)	LPI	18:03	6.67E+06	1.53E+06
Cer(d20:0/26:0)	Cer	d20:0/26:0	1.33E+08	3.11E+07
PS(36:2)	PS	36:02:00	3.73E+07	8.75E+06
OAHA(36:3)	OAHA	36:03:00	3.18E+08	7.49E+07
PC(16:1/18:2)	PC	16:1/18:2	7.76E+07	1.83E+07
LPE(18:1)	LPE	18:01	2.77E+07	6.63E+06
dMePE(19:1/18:1)	dMePE	19:1/18:1	1.58E+07	3.81E+06
PEt(16:2/18:2)	PEt	16:2/18:2	3.62E+07	8.86E+06
PMe(37:6)	PMe	37:06:00	8.60E+06	2.10E+06
PI(18:4/18:2)	PI	18:4/18:2	1.90E+07	4.77E+06
PEt(16:1/16:1)	PEt	16:1/16:1	7.49E+07	1.89E+07
PA(18:1/18:2)	PA	18:1/18:2	4.74E+07	1.20E+07
PI(18:1/20:5)	PI	18:1/20:5	2.92E+07	7.40E+06
PI(16:1/16:1)	PI	16:1/16:1	1.64E+07	4.16E+06
PC(16:1/18:1)	PC	16:1/18:1	7.04E+07	1.81E+07
PE(37:4)	PE	37:04:00	9.88E+06	2.54E+06
PI(18:0/18:2)	PI	18:0/18:2	1.57E+08	4.10E+07
LPA(16:0)	LPA	16:00	1.32E+07	3.46E+06
PEt(16:0/16:1)	PEt	16:0/16:1	3.64E+08	9.56E+07
PMe(18:2/17:2)	PMe	18:2/17:2	6.38E+07	1.70E+07
LPE(16:1)	LPE	16:01	6.48E+06	1.74E+06
PI(16:1/18:2)	PI	16:1/18:2	1.21E+08	3.27E+07
PI(18:1/20:4)	PI	18:1/20:4	2.63E+07	7.09E+06
PEt(16:2/18:2)	PEt	16:2/18:2	6.39E+07	1.73E+07
PMe(35:6)	PMe	35:06:00	2.24E+07	6.12E+06
PI(14:0/20:4)	PI	14:0/20:4	1.22E+07	3.39E+06
OAHA(36:1)	OAHA	36:01:00	6.28E+08	1.75E+08
PC(18:1/18:1)	PC	18:1/18:1	4.79E+07	1.34E+07
LPA(18:0)	LPA	18:00	1.53E+07	4.37E+06
PI(18:2/18:2)	PI	18:2/18:2	5.72E+07	1.67E+07
PI(18:1/14:0)	PI	18:1/14:0	8.06E+07	2.46E+07
MGDG(39:7)	MGDG	39:07:00	6.53E+07	2.00E+07
PA(18:1/18:2)	PA	18:1/18:2	7.73E+07	2.36E+07
PEt(18:4/16:1)	PEt	18:4/16:1	1.63E+07	5.03E+06
PEt(16:1/18:2)	PEt	16:1/18:2	7.73E+07	2.41E+07
PI(16:0/18:1)	PI	16:0/18:1	2.83E+09	8.89E+08
PC(18:2/18:2)	PC	18:2/18:2	9.99E+07	3.15E+07
dMePE(18:1/18:2)	dMePE	18:1/18:2	6.96E+07	2.19E+07
PI(18:4/18:1)	PI	18:4/18:1	1.66E+08	5.23E+07
dMePE(18:2/18:2)	dMePE	18:2/18:2	7.13E+07	2.27E+07
LdMePE(18:2)	LdMePE	18:02	2.35E+07	7.54E+06
PMe(19:3/18:2)	PMe	19:3/18:2	3.25E+07	1.04E+07

LPA(20:5)	LPA	20:05	1.79E+07	5.76E+06
PC(18:1/18:2)	PC	18:1/18:2	9.31E+07	3.00E+07
PEt(16:1/18:1)	PEt	16:1/18:1	4.38E+07	1.42E+07
PS(38:3)	PS	38:03:00	7.48E+07	2.42E+07
CL(18:2/18:1/18:2/18:1)	CL	18:2/18:1/18:2/18:1	1.44E+08	4.74E+07
LPE(16:0)	LPE	16:00	1.38E+07	4.61E+06
dMePE(19:2/18:2)	dMePE	19:2/18:2	4.31E+07	1.46E+07
CL(18:2/16:1/18:1/16:1)	CL	18:2/16:1/18:1/16:1	1.25E+07	4.32E+06
CL(18:2/18:1/20:4/18:2)	CL	18:2/18:1/20:4/18:2	4.60E+07	1.62E+07
dMePE(18:1/19:2)	dMePE	18:1/19:2	3.60E+07	1.29E+07
CL(18:2/18:1/16:1/18:1)	CL	18:2/18:1/16:1/18:1	9.82E+07	3.55E+07
CL(20:5/18:1/18:2/18:2)	CL	20:5/18:1/18:2/18:2	2.05E+07	7.45E+06
OAHFA(38:4)	OAHFA	38:04:00	3.00E+07	1.09E+07
PMe(37:4)	PMe	37:04:00	3.25E+07	1.18E+07
CL(18:2/16:1/18:1/18:2)	CL	18:2/16:1/18:1/18:2	5.16E+07	1.92E+07
CL(20:5/16:1/18:1/18:2)	CL	20:5/16:1/18:1/18:2	1.60E+07	6.01E+06
LPI(20:4)	LPI	20:04	2.26E+07	8.63E+06
PI(18:1/18:3)	PI	18:1/18:3	3.62E+08	1.38E+08
LPI(18:3)	LPI	18:03	2.66E+07	1.03E+07
PMe(37:6)	PMe	37:06:00	2.20E+07	8.61E+06
PIP(54:4)	PIP	54:04:00	1.42E+07	5.59E+06
CL(18:2/18:1/18:2/18:2)	CL	18:2/18:1/18:2/18:2	6.94E+07	2.74E+07
PS(18:0/22:6)	PS	18:0/22:6	3.04E+07	1.20E+07
OAHFA(38:2)	OAHFA	38:02:00	5.51E+07	2.21E+07
PI(16:0/16:0)	PI	16:0/16:0	6.80E+06	2.75E+06
PIP(54:5)	PIP	54:05:00	1.27E+07	5.34E+06
PS(18:0/20:4)	PS	18:0/20:4	1.35E+07	5.98E+06
PE(16:0/22:6)	PE	16:0/22:6	1.98E+07	1.05E+07
CL(18:2/18:2/18:2/18:2)	CL	18:2/18:2/18:2/18:2	2.74E+07	1.52E+07
Cer(d18:1/24:1)	Cer	d18:1/24:1	1.69E+07	9.41E+06
OAHFA(18:1/16:0)	OAHFA	18:1/16:0	1.98E+07	1.11E+07
PI(20:3/20:4)	PI	20:3/20:4	8.04E+06	4.86E+06
OAHFA(16:0/18:0)	OAHFA	16:0/18:0	2.96E+07	1.81E+07
OAHFA(18:0/18:0)	OAHFA	18:0/18:0	2.40E+07	1.67E+07
Cer(d18:1/22:0)	Cer	d18:1/22:0	3.62E+07	2.59E+07
PI(18:0/20:4)	PI	18:0/20:4	5.62E+07	4.46E+07
Cer(d18:1/24:0)	Cer	d18:1/24:0	5.12E+07	4.25E+07
LPA(16:0)	LPA	16:00	1.69E+07	1.41E+07
PIP(18:0e)	PIP	18:0e	6.98E+06	6.61E+06
LPA(18:0)	LPA	18:00	2.05E+07	2.01E+07
LPS(18:0)	LPS	18:00	7.49E+06	1.02E+07
LPI(18:0)	LPI	18:00	2.46E+06	3.57E+06

Abreviações = Cer: ceramidas; CL: cardiolipinas; dMePE: *N,N*-dimetil fosfatidiletanolamina; LdMePE: liso-*N,N*-dimetil fosfatidiletanolamina; LPA: liso ácido fosfatídico; LPC: lisofosfatidilcolina; LPE: lisofosfatidiletanolamina; LPI: lisofosfatidilinositol; MGDG: monogalactosildiacilglicerol; OAHFA: (O-acil)- ω- hidroxi ácido graxo; PA: ácido fosfatídico; PAF: 1-octadecil-2-acetil-sn-glicerol-3-fosfocolina (*Platelet-activating factor*); PE: fosfatidiletanolamina; PET: fosfatidiletanol; PG: fosfatidilglicerol; PI: fosfatidilinositol; PIP: fosfato de fosfatidilinositol; PMe: fosfatidilmetanol; PS: fosfatidilserina

Experimento 2

Fungo favo (13/16) SDBC30G1 (9/16) Controle (0/16)

Experimento 3

Fungo favo (12/16) SDBC30G1 (15/16) Controle (2/16)

Anexo 10. Experimento de criação *in vitro* de larvas de *S. depilis* com os esteroides colesterol (10 µg/mL) e ergosterol (100, 50 e 10 µg/mL). Como controle negativo, as larvas não receberam esteroides ou fungo-alimento, e para acompanhar a taxa de metamorfose, fez-se controle positivo com a inoculação do fungo coletado diretamente do favo de cria da abelha.

Controle = 1 (2/16), 2 (2/16) e 3 (0/16)

Fungo favo = 1 (13/16), 2 (12/16), 3 (9/16)

Colesterol 10 µg/mL = 1 (11/16), 2 (11/16) e 3 (6/16)

Ergosterol 10 $\mu\text{g/mL}$ = 1 (5/16), 2 (7/16) e 3 (6/16); Ergosterol 50 $\mu\text{g/mL}$ = 1 (7/16), 2 (6/16), 3 (5/16)

Ergosterol 100 $\mu\text{g/mL}$ = 1 (12/16), 2 (11/16) e 3 (8/16)

Anexo 11. Experimentos de criação *in vitro* de larvas de *S. depilis* com o patógeno *P. larvae* ATCC 9545.

Controle = 1 (11/16), 2 (12/16) e 3 (15/16)

P. larvae = 1 (9/16), 2 (12/16) e 3 (10/16)

Teste com *P. larvae* e *Bacillus* sp. SDLI1
Teste = 1 (14/16), 2 (15/16) e 3 (16/16)

Anexo 12. Experimento de criação *in vitro* de larvas de *S. depilis* com *B. bassiana* 447 e *M. anisopliae* 1037.

Controle = 1 (10/16), 2 (14/16) e 3 (14/16)

B. bassiana = 1 (11/16), 2 (12/16) e 3 (15/16) *B. bassiana* e SDLI1 = 1 (13/16), 2 (11/16) e 3 (12/16)

M. anisopliae = 1 (14/16), 2 (8/16) e 3 (14/16) *M. anisopliae* e SDLI1 = 1 (15/16) 2 (11/16) e 3 (13/16)