

**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

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 clustres 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 criapútrida 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 *Metarrhizium 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 stablished 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.



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. Exemplares 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).

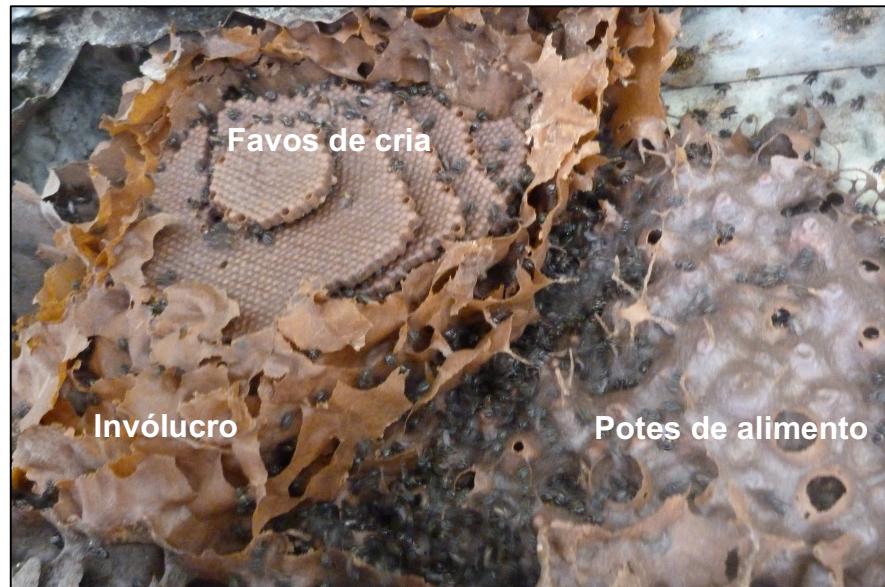


Figura 5. Estrutura do interior da colônia de espécie *Scaptotrigona depilis*. Pode-se notar os favos de cria, invólucro (lamelas) de cerume que circunda os favos de cria e potes de mel e pólen.

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).

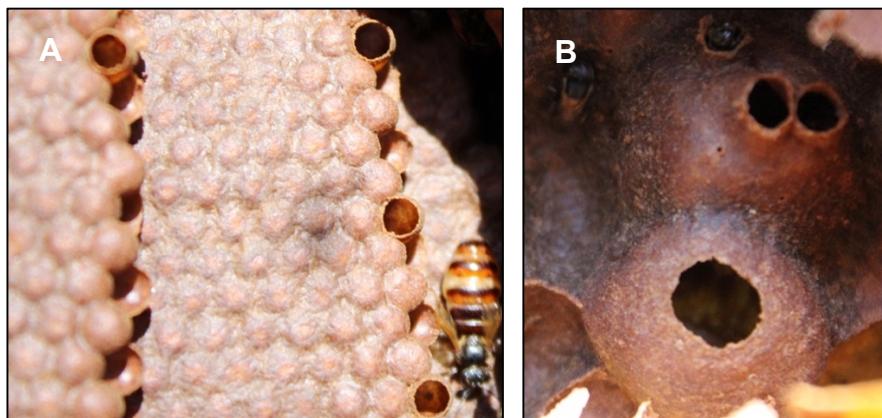


Figura 6. Estruturas construídas por abelhas sem ferrão da espécie *Scaptotrigona depilis* utilizando cerume. A. Células de cria. B. Potes de alimento.

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 simbiontes de *S. depilis* também continuou inexplorada.

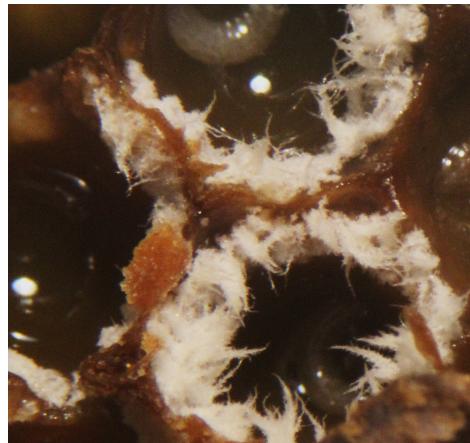


Figura 7. Células de cria abertas para visualização do fungo-alimento das larvas de *Scaptotrigona depilis*.

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 simbiontes 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).

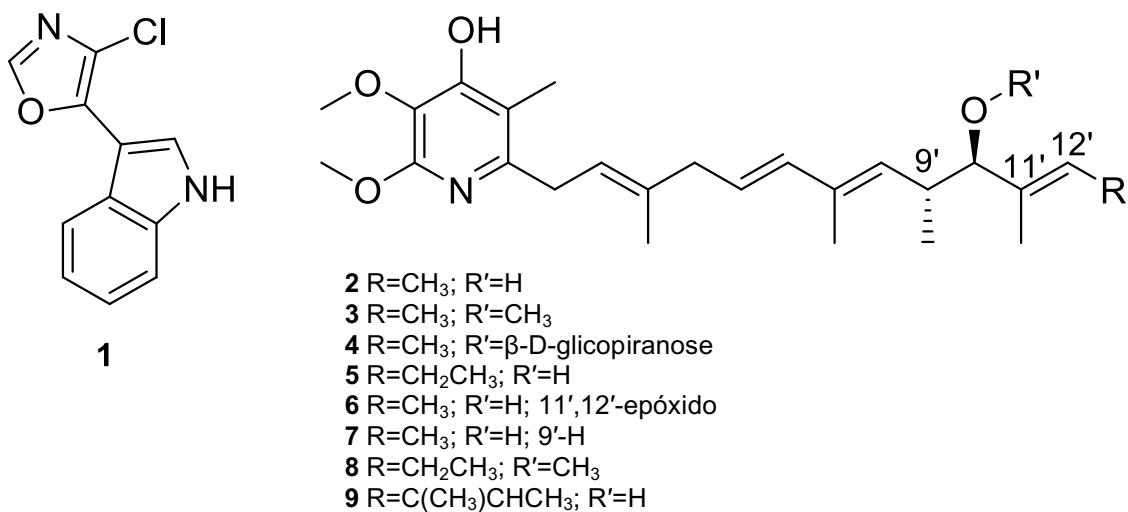


Figura 8. Estrutura química da estreptoclorina (**1**) e estrutura química dos derivados da piericidina (**2-9**) (adaptado de KROISS et al., 2010).

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).

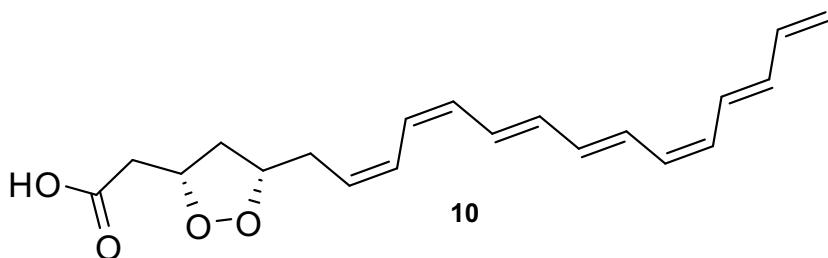


Figura 9. Estrutura química da micangimicina (**10**) (adaptado de SCOTT et al., 2008 e OH et al., 2009).

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 conídios 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 carreados 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 simbiontes 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*.

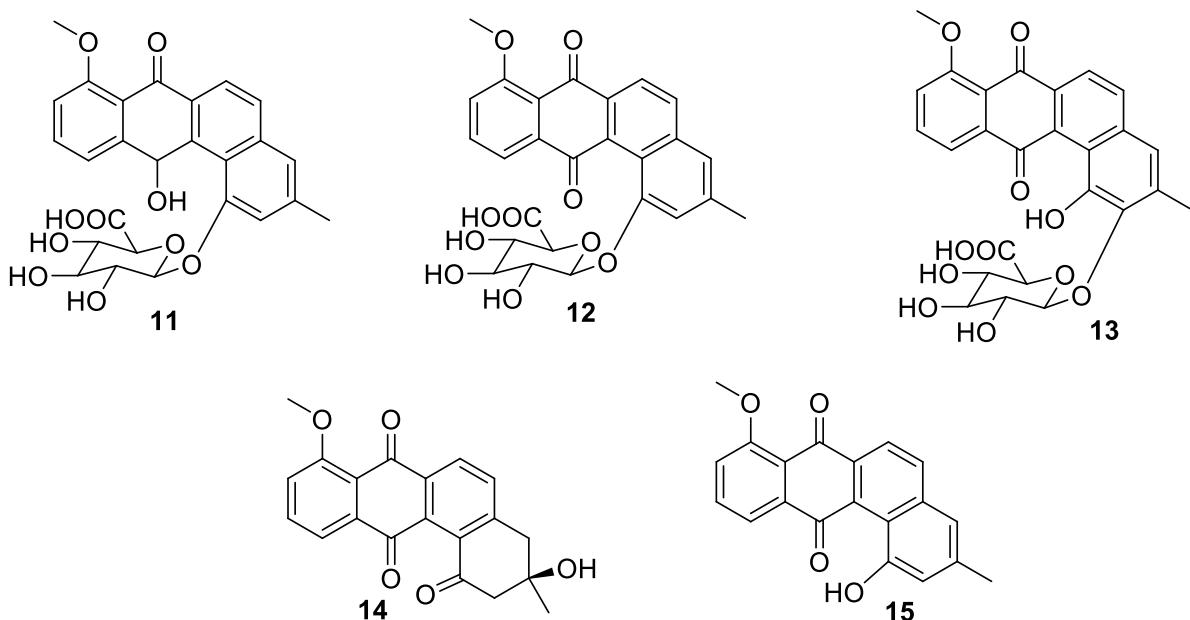


Figura 10. Estruturas químicas de anguciclinas isoladas por Carr e colaboradores (2012).

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.

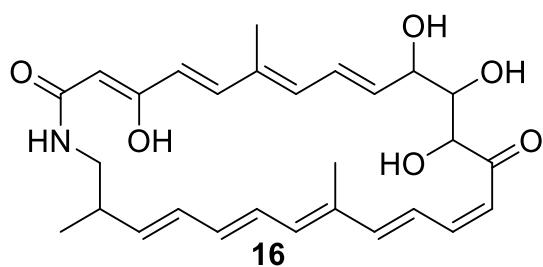


Figura 11. Estrutura química da scelifrolactama (**16**) (adaptado de OH et al., 2011).

Recentemente, Van Arnam 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 µM) que o antifúngico nistatina A₁ (**18**) (MIC = 1 µM), 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.

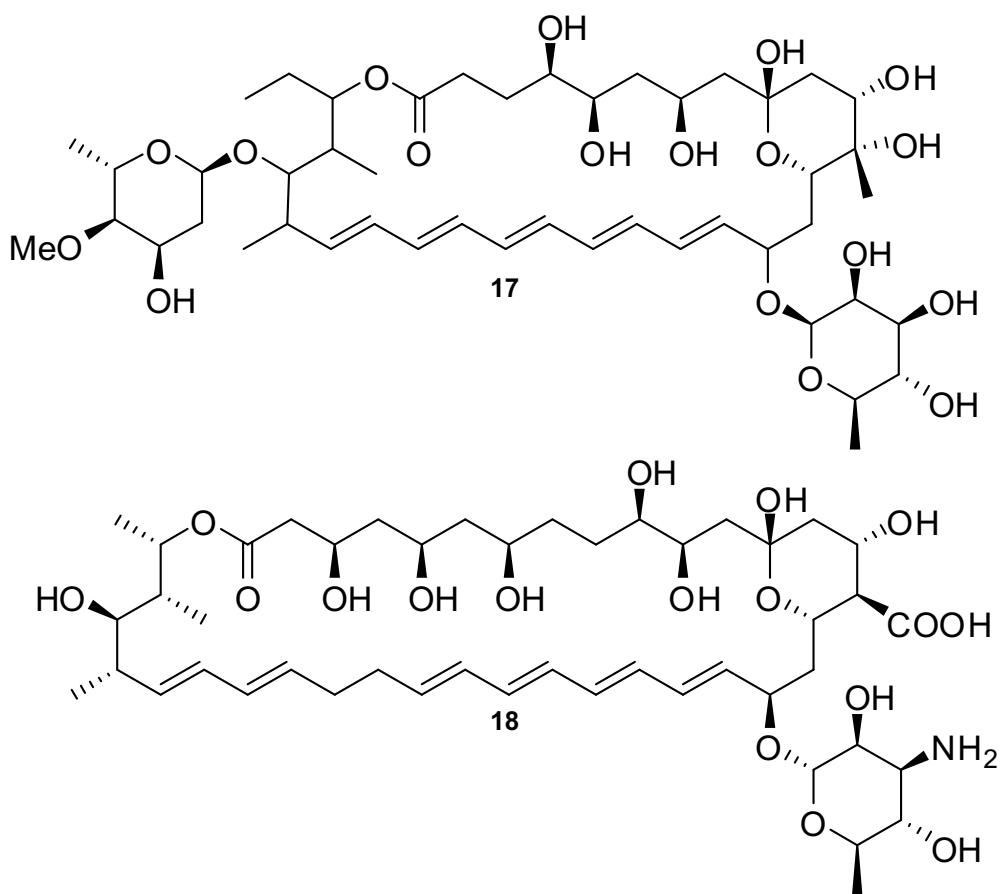


Figura 12. Estruturas químicas da selvamicina (**17**) e da nistatina A₁ (**18**) (adaptado de VAN ARNAM et al., 2016).

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 biosintéticos 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 biosintéticas (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 µM, 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 biosintéticos 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.



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 interfeiou 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 (substrado 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. SDLI1, 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.; COUILAUD, 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.; GARAOVA, 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 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/ies051, 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.; PITTS, 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.; ALTMAYER, 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 fructosederich 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 prokaryotic 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. Ocurrence 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. Selvamicin, 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.

VISSEER, 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.