UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Bactérias simbiotes associadas à abelha sem ferrão
***Melipona scutellaris* como fontes de produtos naturais bioativos**

Carla Menegatti

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Bactérias simbiotes associadas à abelha sem ferrão
***Melipona scutellaris* como fontes de produtos naturais bioativos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientada: Carla Menegatti

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 21/09/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

RESUMO

MENEGATTI, C. **Bactérias simbiotes associadas à abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* como fontes de produtos naturais bioativos**. 2016. 155f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Os produtos naturais desempenham fundamental importância na descoberta de novos fármacos. Muitos destes fármacos originaram-se de produtos naturais microbianos o que demonstra uma extrema eficiência na habilidade dos micro-organismos de sintetizar substâncias químicas com elevado potencial biológico. Sabe-se que os insetos sociais estão sujeitos a condições climáticas e populacionais que aumentam sua susceptibilidade a parasitas. Assim, estes insetos desenvolveram um mecanismo de defesa evolutivo que consiste na associação simbiótica a bactérias capazes de biossintetizar produtos antimicrobianos contra os patógenos. Dispondo dessas informações, o presente trabalho contribuiu com o estudo dos produtos naturais biossintetizados pela bactéria *Paenibacillus polymyxa* ALLI-03-01, provável simbiote da espécie de abelha sem ferrão *Melipona scutellaris*. Os micro-organismos foram isolados de colônias mantidas no Departamento de Biologia da FFCLRP-USP. Todas as linhagens foram testadas contra dois fungos entomopatogênicos - *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*; os que apresentaram atividade antifúngica tiveram seus extratos em acetato de etila e metanol preparados e foram avaliados em ensaios antiparasitários contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania donovani*. A bactéria ALLI-03-01, isolada do alimento larval, foi escolhida para os estudos químicos, pois apresentou satisfatória atividade antifúngica e proeminente atividade antiparasitária. Este micro-organismo foi identificado pelo sequenciamento do gene 16S rRNA como sendo a bactéria *Paenibacillus polymyxa*, conhecida pela alta capacidade de produção de metabólitos secundários. Para conhecer seu metabolismo, esta bactéria foi cultivada em meio ISP-2 ágar e líquido e do extrato em acetato de etila do cultivo fermentativo de *P. polymyxa* ALLI-03-01 foi isolado o ácido L-3-fenil lático. As atividades antifúngicas dos padrões comerciais dos ácidos D-(+)- e L-(-)- 3-fenil lático foram testadas frente ao fungo entomopatogênico *B. bassiana* e apenas o enantiômero L apresentou atividade antifúngica. Do extrato em metanol do cultivo em meio sólido do mesmo micro-organismo foram identificados em mistura, principalmente por MALDI-TOF MS/MS, nove diferentes ciclolipopeptídeos, da classe das Fusaricidinas. As fusaricidinas são conhecidas por apresentarem alta atividade antimicrobiana, que foi comprovada quando duas frações compostas por diferentes fusaricidinas foram testadas frente ao fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e contra a bactéria patogênica *Paenibacillus larvae*. As frações apresentaram resultados satisfatórios de inibição contra ambos os patógenos, dessa maneira as fusaricidinas e a produção seletiva do ácido L-3-fenil lático por esta bactéria podem ser vias de proteção da colônia, evitando que patógenos destruam-na e permitindo o desenvolvimento sadio de larvas. Sendo assim, este trabalho relata pela primeira vez a possível relação simbiótica existente entre o micro-organismo *Paenibacillus polymyxa* ALLI-03-01 e a colônia de abelhas *Melipona scutellaris*, bem como a produção por este micro-organismo de compostos com alta atividade antimicrobiana que podem exercer o controle de parasitas dentro da colônia, estabelecendo assim, uma possível relação ecológica entre o micro-organismo destacado e as abelhas *Melipona scutellaris*.

Palavras-chave: micro-organismo simbiote, insetos sociais, *Paenibacillus polymyxa* ALLI-03-01, ácido-L-3-fenil lático, fusaricidinas, atividade antimicrobiana

ABSTRACT

MENEGATTI, C. **Bacterial symbionts associated with the stingless bee *Melipona scutellaris* as sources of bioactive natural products.** 2016. 155f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Natural products play an important role in drug discovery. Several drugs have been discovered or developed from microbial natural products hits and leads showing a great efficiency of microorganisms to synthesize compounds with high biological potential. It is known that social insects are subjected to climate and population conditions that increase their susceptibility to parasites. Therefore, these insects have developed an evolutionary defense mechanism consisting in symbiotic association with bacteria capable of biosynthesize antimicrobial products against pathogens. In this context, this study contributed to the knowledge of natural products biosynthesized by the bacterium *Paenibacillus polymyxa* ALLI-03-01, a probable symbiont of the stingless bee *Melipona scutellaris*. Microorganisms were isolated from colonies maintained at the Department of Biology of FFCLRP-USP. All strains were tested against two entomopathogenic fungi - *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*; strains that showed antifungal activity had their ethyl acetate and methanol extracts prepared and evaluated against the parasites *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani*. The bacterium ALLI-03-01, isolated from larval food, was selected for chemical studies, due to its satisfactory antifungal activity and outstanding antiparasitic activity. This microorganism was identified by gene 16S rRNA sequencing as *Paenibacillus polymyxa*, a bacterium recognized for its ability of biosynthesize secondary metabolites. This bacterium was cultivated in ISP-2 agar and liquid medium and from the ethyl acetate extract of *P. polymyxa* ALLI-03-01 cultivated in liquid medium L-3-phenyllactic acid was isolated. The antifungal activity of commercial standards of D-(+)- and L-(-)-phenyllactic acid were tested against entomopathogenic fungus *B. bassiana* and only the L enantiomer presented antifungal activity. Nine cyclo lipodepsipeptides known as fusaricidins were identified in mixture using MALDI-TOF-MS/MS from the methanol extract of ALLI-03-01. The fusaricidins are recognized for their high antimicrobial activity, which was confirmed when two fractions composed by different fusaricidins were tested against the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*. The fractions showed satisfactory inhibition against both pathogens. Therefore, fusaricidins and selective production of L-3-phenyllactic acid by the bacterium may be colony protection resources, preventing the action of pathogens and allowing healthy larvae development. Therefore, this study reports for the first time a possible symbiotic relationship between *Paenibacillus polymyxa* ALLI-03-01 and the colony of *M. scutellaris* bees, as well as production of compounds with high antimicrobial activity by this microorganism that might act as parasite control agents within the colony, establishing a possible ecological relationship between the bacterium and *M. scutellaris* bees.

Keywords: symbiont microorganism, social insects, *Paenibacillus polymyxa* ALLI-03-01, L-3-phenyllactic acid, fusaricidins, antimicrobial activity

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais, micro-organismos e simbiose

Os produtos naturais continuam a desempenhar um papel altamente significativo na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (Newman e Cragg, 2016). Em sua recente revisão acerca dos fármacos derivados de produtos naturais, Newman e Cragg enfatizam que

... muitos fármacos e / ou protótipos baseados em produtos naturais são, na verdade, produzidos por micro-organismos ou por interações microbianas com os 'hospedeiros dos quais foram isolados', e, portanto, a pesquisa nesta área de produtos naturais deve ser significativamente expandida.

De fato, a literatura relata um número considerável de produtos naturais bioativos isolados de micro-organismos endofíticos (Gunatilaka, 2006; Borges *et al.*, 2009), simbiontes de plantas, e de micro-organismos marinhos, associados a esponjas e algas, entre outros (Piel, 2006; Taylor *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2010).

Micro-organismos são profícuos produtores de substâncias químicas com importantes aplicações na indústria farmacêutica, usadas como fármacos ou como estruturas-modelo para o planejamento e desenvolvimento de fármacos. Diversos antibióticos, anticancerígenos, imunossuppressores e agentes redutores do colesterol sanguíneo, entre outros, têm suas origens em produtos naturais microbianos. Os micro-organismos apresentam, portanto, uma surpreendente capacidade de produzir substâncias químicas com elevada potência biológica (Lopes *et al.*, 2011). Acredita-se que, diferentemente dos metabólitos primários, os produtos naturais são produzidos por razões fisiológicas específicas, sociais ou predatórias, estando, portanto, relacionados com a ecologia dos organismos produtores (O'Brien e Wright, 2011)

Em um ecossistema os organismos estão constantemente interagindo entre si; e estas relações podem ser intraespecíficas ou interespecíficas. Em função dos tipos de dependência que os organismos mantêm entre si, e se há prejuízo ou benefício para os organismos envolvidos, estas relações ainda são subdivididas em harmônicas e desarmônicas. Nas relações harmônicas não existe prejuízo para nenhuma das espécies envolvidas e pelo menos uma delas é beneficiada; enquanto nas desarmônicas ocorre prejuízo de uma das espécies e benefício da outra. A simbiose é uma associação íntima entre dois ou mais organismos de diferentes espécies, em geral de longa duração, frequentemente encontrada nas comunidades terrestres e aquáticas, com papel fundamental no surgimento das principais formas de vida na Terra e na geração de diversidade biológica (Moran, 2006; Martin e Schwab, 2013).

Muitos micro-organismos se tornaram dependentes de seus hospedeiros para a sobrevivência. Por outro lado, os compostos bioativos produzidos pelos micro-organismos podem ser usados como agentes de defesa pelos hospedeiros. Como resultado, plantas, animais e humanos tem se envolvido em complexas interações com micro-organismos durante sua evolução (Moran, 2006). Assim, é muito provável que os produtos naturais sejam resultados das interações entre organismos entre si e destes com o ambiente, e que desempenhem funções precisas e definidas nestas associações simbióticas, representando uma das vantagens adaptativas e evolutivas para os organismos produtores.

A grande maioria dos trabalhos envolvendo micro-organismos simbiontes, como os associados a plantas e organismos marinhos, é conduzida seguindo as estratégias experimentais tradicionais da química de produtos naturais, isto é, envolvendo o isolamento da linhagem microbiana de seu habitat, o cultivo em laboratório e a triagem dos extratos obtidos em diferentes ensaios biológicos para o isolamento e identificação dos produtos naturais bioativos. Esta abordagem permite a identificação de produtos naturais ativos, objeto da bioprospecção, porém não fornece respostas para a difícil questão que envolve as razões pelas quais os produtos naturais são biossintetizados. Trabalhos mais recentes têm sido direcionados para se determinar a função real destes produtos naturais para o micro-organismo produtor (Conti *et al.*, 2012). Exemplos elegantes da determinação da função ecológica de produtos naturais microbianos incluem estudos realizados com micro-organismos associados a insetos.

1.2 Produtos naturais de micro-organismos associados a insetos

Insetos compreendem um dos filos de animais mais abundantes e complexos e estabelecem diversas relações com micro-organismos. Acredita-se que insetos sociais sejam predispostos a uma alta pressão parasitária (Cameron R. Currie, *comunicação pessoal*). Estes insetos são geneticamente homogêneos, vivem em altas densidades populacionais, em condições de clima quente e úmido, o que aumenta a susceptibilidade aos parasitas. De fato, alguns trabalhos mostram que insetos sociais são frequentemente atacados por micro-organismos patogênicos. Abelhas melíferas são atacadas por diversos patógenos, incluindo a bactéria *Paenibacillus larvae* (Vanengelsdorp e Meixner, 2010). Alguns insetos sociais, como as formigas agricultoras e abelhas, mantêm ainda fontes de alimentos ricas em nutrientes dentro dos ninhos (ex.: jardim de fungo no caso de formigas e mel no caso de abelhas), as quais são também suscetíveis ao ataque de micro-organismos (Currie, Scott, *et al.*, 1999).

Portanto, estes insetos não somente precisam se defender dos patógenos, mas também necessitam proteger suas fontes de alimento do ataque de micro-organismos. Uma das estratégias de defesa adquirida durante a evolução dos insetos foi a associação simbiótica a bactérias capazes de biossintetizar produtos naturais antibióticos e antifúngicos contra os patógenos. Desta forma, insetos sociais são organismos modelo fascinantes para a pesquisa em ecologia química.

As formigas cortadeiras (Attini: Formicidae) se destacam como um exemplo interessante de interação simbiótica com micro-organismos (fungos e actinobactérias), representando um dos sistemas biológicos mais complexos na natureza e que já está melhor descrito. Estas formigas coevoluíram em um mutualismo de cerca de 50 milhões de anos com fungos basidiomicetos Lepiotaceae (Agaricales: Basidiomycotina), que são cultivados em jardins como fonte de alimento para os insetos, representando um dos poucos exemplos de animais agricultores na natureza (Currie, Scott, *et al.*, 1999). Porém, fungos filamentosos parasitas do gênero *Escovopsis* podem comprometer a viabilidade dos ninhos de formigas, devido ao efeito tóxico frente aos basidiomicetos usados como alimento. Como forma de proteção, as formigas desenvolveram estruturas especializadas em seu corpo para abrigar actinobactérias, principalmente dos gêneros *Pseudonocardia* e *Streptomyces*, responsáveis pela produção de antimicrobianos que controlam a infecção por *Escovopsis* sp., protegendo a fonte de alimento (Currie, Mueller, *et al.*, 1999; Currie, Scott, *et al.*, 1999).

Das culturas laboratoriais de *Pseudonocardia* spp. foi obtido o depsipeptídeo cíclico dentigerumicina (**1**), responsável pela inibição do fungo parasita *Escovopsis* sp. e de outros fungos patogênicos, mas sem toxicidade ao fungo basidiomiceto usado para alimentação das formigas *Apterostigma dentigerum* (Oh *et al.*, 2009). Formigas cortadeiras *Acromyrmex echinator* também estabelecem relação simbiótica com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* e com actinobactérias dos gêneros *Pseudonocardia* e *Streptomyces*. Antimicinas A1-A4 (**2-5**), valinomicina (**6**) e actinomicinas D (**7**) e X2 (**8**) (Fig. 1) foram identificadas de espécies *Streptomyces* em associação com as formigas cortadeiras e possuem atividade antibiótica relacionada com a proteção das formigas contra patógenos (Schoenian *et al.*, 2011). Outra espécie de formiga cortadeira, *Acromyrmex octospinosus*, também possui relação simbiótica com fungos do gênero *Leucoagaricus*, cultivado nos ninhos como fonte de alimento, e com actinobactérias do gênero *Streptomyces*. Diversas espécies *Streptomyces* spp. produziram o antibiótico macrolídeo, candicinina D (**9**) (Fig. 1), que, juntamente com outros antibióticos produzidos por essas actinobactérias, deve auxiliar no combate aos fungos patogênicos que possam causar morte de fungos *Leucoagaricus* sp (Haeder *et al.*, 2009).

Figura 1. Produtos naturais microbianos envolvidos na simbiose de formigas com actinobactérias.

Vespas também estabelecem relações simbióticas com micro-organismos. *Streptomyces* sp., isolado da vespa *Sceliphron caementarium*, produz o polieno macrocíclico esclifolactama substância com atividade antifúngica frente a *Candida albicans* resistente a anfotericina B (Oh *et al.*, 2011).

Os exemplos apresentados ilustram a nova diversidade química que pode ser descoberta com o estudo de micro-organismos simbiotes de insetos. Ainda, este estudo pode esclarecer as funções dos Produtos Naturais na mediação das interações entre os insetos e micro-organismos simbiotes e patogênicos, através de bioensaios antimicrobianos (especialmente interações antagônicas aos pares, descrita em material e métodos), contribuindo para a área de ecologia química. Como resultado da função ecológica destes PNs, e de se esperar que os mesmos também possam apresentar aplicações farmacêuticas e/ou agroquímicas. Portanto, em estudos com este enfoque, é importante que os PNs isolados e identificados também sejam submetidos a ensaios biológicos e farmacológicos, podendo-se antever uma possível contribuição para a área de química medicinal.

1.3 A espécie de abelha sem ferrão *Melipona scutellaris*

As abelhas sem ferrão exercem importante papel ecológico como polinizadores de espécies vegetais e possuem potencial para uso na polinização de culturas agrícolas (De Araujo Alves, 2010).

Entre as abelhas sem ferrão, a espécie *Melipona scutellaris*, popularmente conhecida como “uruçu verdadeira”, “uruçu do Nordeste”, ou “uruçu-do-campo” (Figura 2), se destaca por ser endêmica do nordeste do Brasil. É encontrada nos estados do nordeste brasileiro, ocorrendo da Bahia ao Rio Grande do Norte, particularmente zonas de transição entre a Mata Atlântica e a Caatinga (Viana *et al.*, 2013). No Departamento de Biologia da FFCLRP-USP são mantidas colônias desta abelha para as pesquisas em ecologia química e comportamental de insetos sociais realizadas sob coordenação do Prof. Dr. Fabio S. do Nascimento.

Melipona scutellaris faz parte do grupo de espécies de *Melipona* com tamanho corporal relativamente grande (entre 10 e 13 mm de comprimento total) que, em geral, correspondem às abelhas com largura do tórax acima de 3 mm ou massa corporal acima de 60 mg (Silva *et al.*, 2011). Populações dessa abelha diminuíram substancialmente como consequência da atividade humana, assim estudos sobre esta espécie são importantes para a sua manutenção (Sousa *et al.*, 2013).

Não há descrição de um patógeno natural as colônias de *M. scutellaris*, porém recentemente foi descrito que em experimentos *in vitro* o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* foi virulento as abelhas urucu, sendo capaz de matá-las nas menores concentrações testadas (De Jesus Conceição *et al.*, 2014).

Figura 2. Colônia de abelhas *Melipona scutellaris*. (Colônias mantidas no DB-FFCLRP-USP).

1.4 Relação fungos – insetos

O cultivo de fungos como forma de alimento é um comportamento que tem evoluído de forma independente em alguns insetos como formigas, besouros e cupins e permitiu que muitas espécies desses insetos se tornassem ecologicamente importantes e amplamente distribuídas (Aylward *et al.*, 2014). A Figura 3, exemplifica de maneira simplificada a relação simbiótica de insetos com micro-organismos e o cultivo de fungos (Ramadhar *et al.*, 2014). Não há nada descrito na literatura sobre a manutenção de fungos pelas abelhas *Melipona scutellaris* em suas colônias; porém recentemente uma nova espécie de fungo obrigatoriamente osmofílico, o *Zygosaccharomyces favi* sp. foi identificado, isolado de colônias de *Apis mellífera* (Čadež *et al.*, 2015). Sabe-se que as abelhas da espécie *Apis mellífera* introduzem fungos nas suas colônias que provavelmente servem de nutriente para as larvas da abelha (Gilliam, 1997). Em relação à tribo Meliponini, está descrita uma relação entre a abelha *Melipona quadrifasciata* e alguns *Bacillus* onde se observou que houve morte de toda as abelhas após a adição de estreptomicina à colônia (Machado, 1971).

Figura 3. Interações simbióticas dentro de um sistema agrícola de insetos. As setas indicam benefício e as barras supressão. Figura adaptada de (Ramadhar *et al.*, 2014) .

O primeiro relato de abelha sem ferrão que depende de fungo para sobreviver ocorreu em 2015 e descreve que a abelha *Scaptotrigona depilis* cultiva o fungo filamentosso *Monascus* sp. como forma de alimento. Tal fato foi evidenciado quando foi adicionado alimento larval esterilizado, livre de fungos, para algumas larvas. Foi constatado que estas larvas apresentaram características de putrefação e não conseguiram se desenvolver adequadamente, enquanto larvas que se alimentaram do fungo, se desenvolveram sadiamente (Menezes *et al.*, 2015).

As leveduras negras são outros micro-organismos que foram descritos como possíveis simbiontes em ninhos de formigas (Little e Currie, 2007). Sabe-se que essas leveduras adquirem nutrientes das formigas e suprimem o crescimento bacteriano, dessa maneira elas

comprometem o ninho das formigas, deixando-os mais susceptíveis a ação do fungo patogênico (Little e Currie, 2008). Há poucos estudos acerca da relação dessas leveduras com insetos, tampouco com abelhas, e de metabólitos ativos isolados produzidos por essas leveduras. Na literatura são encontrados alguns estudos de compostos bioativos isolados de leveduras negras associadas com plantas (Xu *et al.*, 2011; Cook *et al.*, 2013; El-Elimat *et al.*, 2013).

Considerando a escassez de estudos acerca da microbiota associada a abelhas sem ferrão e seu potencial para a produção de metabólitos secundários, esse trabalho direcionou esforços ao conhecimento dos micro-organismos associados à abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* e o entendimento da possível relação simbiótica inseto-micro-organismo mediada por produtos naturais.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

No total foram isolados 81 micro-organismos sendo que destes, 64 foram testados em ensaio de inibição frente aos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. As bactérias que foram capazes de inibir os fungos muito provavelmente produzem compostos que podem inibir outras células eucarióticas, assim os extratos dos micro-organismos mais promissores foram testados frente aos parasitas *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania donovani*. Após essas triagens biológicas, a bactéria ALLI-03-01 foi escolhida para prosseguir com os estudos químicos, pois ela apresentou inibição moderada dos fungos e alta porcentagem de inibição dos parasitas.

A bactéria selecionada para estudo ALLI-03-01 foi identificada como *Paenibacillus polymyxa* que é, segundo a literatura, uma espécie com alto potencial de produção de metabólitos secundários ativos. Não há descrição da relação dela com as abelhas *Melipona scutellaris*, tampouco de produtos ativos produzidos quando em contato com a abelha.

Cultivos fermentativos mistos foram realizados com esta bactéria e os entomopatógenos, e os seus extratos também apresentaram acentuada atividade de inibição dos parasitas. Os extratos dos cultivos simples dos fungos entomopatogênicos também foram testados frente aos parasitas e apresentaram baixa porcentagem de inibição, porém como não foi possível o isolamento e identificação de compostos destes cultivos. Ainda não se pode afirmar se a alta inibição causada pelos extratos de cultivo misto é devido à indução de produção de compostos pela bactéria *Paenibacillus polymyxa* ALLI-03-01 quando em contato com os fungos ou se houve sinergismo de ação dos compostos produzidos por ambos.

Para entender o metabolismo da bactéria selecionada para estudos químicos, o seu extrato em acetato do cultivo fermentativo simples foi purificado. Deste extrato foi isolado o ácido 3-fenil-lático que possui conhecida atividade antifúngica e até então não havia sido isolado da bactéria *Paenibacillus polymyxa*. A configuração absoluta deste composto foi determinada por cromatografia quiral como ácido L-(-)-3-fenil-lático. Diferentes concentrações de padrões comerciais dos compostos ácidos D-(+)- e L-(-)-3-fenil-lático foram testados frente ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* e apenas o enantiômero L apresentou atividade antifúngica. Este resultado é significativamente importante visto que a produção seletiva do ácido L-(-)-3-fenil-lático pela bactéria *Paenibacillus polymyxa* ALLI-03-01 sugere que a colônia de abelhas *Melipona scutellaris* pode se beneficiar desta bactéria

para se proteger de patógenos. Já há na literatura dados que comprovam a virulência do fungo *Beauveria bassiana* contra as colônias de abelhas estudadas neste trabalho.

O extrato em metanol do cultivo em meio sólido da bactéria *Paenibacillus polymyxa* ALLI-03-01 apresentou acentuada porcentagem de inibição do parasita *Leishmania donovani*. Nove diferentes lipodepsipeptídeos cíclicos foram identificados em mistura a partir deste extrato; estes, conhecidos como fusaricidinas já são descritos por apresentarem alta atividade antimicrobiana, principalmente antifúngica. Duas das frações obtidas que contêm diferentes fusaricidinas em mistura foram testadas frente ao fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e a bactéria patogênica *Paenibacillus larvae*, que é conhecida por devastar colônias de abelhas *Apis mellifera*. Foi constatada a atividade antifúngica destes compostos pela formação de halos de inibição contra o fungo entomopatogênico testado e também elevada atividade antibacteriana com a formação de halos de inibição de até 25 mm. Novamente a colônia de abelhas pode se beneficiar desta bactéria para se proteger de possíveis patógenos com os compostos produzidos. Em relação à atividade antiparasitária, não há descrição na literatura de testes destes compostos frente a *T. cruzi* ou mesmo a *L. donovani*. Como a fração bruta apresentou elevada atividade leishmanicida é de se esperar que as frações purificadas possam apresentar resultados interessantes.

A bactéria em questão foi isolada do alimento larval que fica situado dentro do favo de cria e se trata de uma região que necessita de total controle de patógenos para garantir o desenvolvimento sadio das larvas. Para confirmação da relação simbiótica da bactéria *Paenibacillus polymyxa* ALLI-03-01 com as abelhas *Melipona scutellaris* seria necessário estudar um número maior de colônias e também a investigação de um patógeno natural a essas colônias. Entretanto após a análise das atividades biológicas dos compostos isolados e identificados, este trabalho sugere que há uma relação ecológica estabelecida entre o micro-organismo *Paenibacillus polymyxa* ALLI-03-01 com as abelhas *Melipona scutellaris*.

Este estudo relata pela primeira vez, o isolamento e identificação de compostos de micro-organismo associado às abelhas *Melipona scutellaris*. Além da relação ecológica traçada, este trabalho demonstra que é possível encontrar candidatos a fármacos a partir da investigação de micro-organismos associados a insetos. Estes estudos podem identificar compostos já conhecidos, como as fusaricidinas, mas abordados frente a outras atividades biológicas, que até então não foram investigadas podendo representar possíveis candidatos a protótipos leishmanicidas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AYLWARD, F. O.; SUEN, G.; BIEDERMANN, P. H.; ADAMS, A. S.; SCOTT, J. J.; MALFATTI, S. A.; RAFFA, K. F. Convergent bacterial microbiotas in the fungal agricultural systems of insects. **MBio**, v. 5, n. 6, p. e02077-14, 2014.
- BACON, C. W.; LABEDA, D. Isolation, culture and maintenance of endophytic fungi on grasses. **Isolation of Biotechnological Organisms from Nature**, p. 259-282, 1990.
- BEIMS, H.; WITTMANN, J.; BUNK, B.; SPRÖER, C.; ROHDE, C.; GÜNTHER, G.; STEINERT, M. *Paenibacillus larvae*-directed bacteriophage HB10c2 and its application in American foulbrood-affected honey bee larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 16, p. 5411-5419, 2015.
- BIONDA, N.; FLEEMAN, R. M.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; RODRIGUEZ, M. C.; REFFUVEILLE, F.; SHAW, L. N.; CUDIC, P. Identification of novel cyclic lipopeptides from a positional scanning combinatorial library with enhanced antibacterial and antibiofilm activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 108, p. 354-363, 2016.
- BORGES, W. D. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; & PUPO, M. T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, n. 12, p. 1137-1163, 2009.
- BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C.; LA FLAMME, A. C.; VAN VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592-2597, 1996.
- 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, n. 3, p. 645-654, 2015.
- CHOI, S.-K.; PARK, S.-Y.; KIM, R.; LEE, C.-H.; KIM, J. F.; PARK, S.-H. Identification and functional analysis of the fusaricidin biosynthetic gene of *Paenibacillus polymyxa* E681. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 365, n. 1, p. 89-95, 2008.
- CONTI, R.; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbioses como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 43-47, 2012.
- COOK, D.; BEAULIEU, W. T.; MOTT, I. W.; RIET-CORREA, F.; GARDNER, D. R.; GRUM, D.; MARCOLONGO-PEREIRA, C. Production of the alkaloid swainsonine by a fungal endosymbiont of the Ascomycete order Chaetothyriales in the host *Ipomoea carnea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 16, p. 3797-3803, 2013.
- CORTÉS-ZAVALA, O.; LÓPEZ-MALO, A.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.; GARCÍA, H. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 173, p. 30-35, 2014.

- CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 14, p. 7998-8002, 1999.
- CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, v. 398, n. 6729, p. 701-704, 1999.
- DE ALMEIDA VAUCHER, R.; GIONGO, J. L.; BOLZAN, L. P.; CÔRREA, M. S.; FAUSTO, V. P.; DOS SANTOS ALVES, C. F.; MOREIRA, A. P. Antimicrobial activity of nanostructured Amazonian oils against *Paenibacillus* species and their toxicity on larvae and adult worker bees. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 18, n. 2, p. 205-210, 2015.
- DE ARAUJO ALVES, D. **Estratégias reprodutivas em *Melipona*, com ênfase em pequenas populações de *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini)**. 2010. Universidade de São Paulo
- DE JESUS CONCEIÇÃO, P.; DE LYRA NEVES, C. M.; DA SILVA SODRÉ, G.; DE CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, A. V.; RIBEIRO, G. S.; DE CAMPOS PEREIRA, R. Susceptibility of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) worker bees to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Sociobiology**, v. 61, n. 2, p. 184-188, 2014.
- DENG, Y.; LU, Z.; BI, H.; LU, F.; ZHANG, C.; BIE, X. Isolation and characterization of peptide antibiotics LI-F04 and polymyxin B 6 produced by *Paenibacillus polymyxa* strain JSa-9. **Peptides**, v. 32, n. 9, p. 1917-1923, 2011.
- DENG, Y.; LU, Z.; LU, F.; ZHANG, C.; WANG, Y.; ZHAO, H.; BIE, X. Identification of LI-F type antibiotics and di-n-butyl phthalate produced by *Paenibacillus polymyxa*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, n. 3, p. 175-182, 2011.
- EL-ELIMAT, T.; FIGUEROA, M.; RAJA, H. A.; GRAF, T. N.; ADCOCK, A. F.; KROLL, D. J.; OBERLIES, N. H. Benzoquinones and terphenyl compounds as phosphodiesterase-4B inhibitors from a fungus of the order Chaetothyriales (MSX 47445). **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 3, p. 382-387, 2013.
- EVIDENTE, A.; IACOBELLIS, N. S.; SCOPA, A.; SURICO, G. Isolation of β -phenyllactic acid related compounds from *Pseudomonas syringae*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 5, p. 1491-1497, 1990.
- FANALI, S.; CAMERA, E. Use of methylamino- β -cyclodextrin in capillary electrophoresis. Resolution of acidic and basic enantiomers. **Chromatographia**, v. 43, n. 5-6, p. 247-253, 1996.
- FERREIRA, R. S.; DESSOY, M. A.; PAULI, I.; SOUZA, M. L.; KROGH, R.; SALES, A. I.; ANDRICOPULO, A. D. Synthesis, Biological Evaluation, and Structure-Activity Relationships of Potent Noncovalent and Nonpeptidic Cruzain Inhibitors as Anti-*Trypanosoma cruzi* Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2380-2392, 2014.

- GILLIAM, M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. **FEMS Microbiology Letters**, v. 155, n. 1, p. 1-10, 1997.
- GUNATILAKA, A. A. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509-26, 2006.
- GUPTA, S.; NISHI. Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. **Indian Journal of Medical Research**, v. 133, n. 1, p. 27-39, 2011.
- HAEDER, S.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. Candicidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 12, p. 4742-4746, 2009.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, p.95-98, 1999.
- HARTFELDER, K.; ENGELS, W. The composition of larval food in stingless bees: evaluating nutritional balance by chemosystematic methods. **Insectes Sociaux**, v. 36, n. 1, p. 1-14, 1989.
- HAYDAK, M. H. Larval food and development of castes in the honeybee. **Journal of Economic Entomology**, v. 36, n. 5, p. 778-792, 1943.
- IOSET, J.-R.; BRUN, R.; WENZLER, T.; KAISER, M.; YARDLEY, V. Drug Screening for Kinetoplastids Diseases. **A Training Manual for Screening in Neglected Diseases**, 2009.
- KAJIMURA, Y.; KANEDA, M. Fusaricidin A, a New Depsipeptide Antibiotic Produced by *Bacillus polymyxa* KT-8 Taxonomy, Fermentation, Isolation, Structure Elucidation and Biological Activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 49, n. 2, p. 129-135, 1996.
- KAJIMURA, Y., & KANEDA, M. Fusaricidins B, C and D, New Depsipeptide Antibiotics Produced by *Bacillus Polymyxa* KT-8: Isolation, Structure Elucidation and Biological Activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 50, n. 3, p. 220-228, 1997.
- LAL, S.; TABACCHIONI, S. Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 2-10, 2009.
- LANE, D. 16S/23S rRNA sequencing. In 'Nucleic acid techniques in bacterial systematics'. (Eds E Stackebrandt, M Goodfellow) p. 115–175: John Wiley and Sons: Chichester, UK 1991.
- LAVERMICOCCA, P.; VALERIO, F.; VISCONTI, A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 634-640, 2003.
- LI, J.; JENSEN, S. E. Nonribosomal biosynthesis of fusaricidins by *Paenibacillus polymyxa* PKB1 involves direct activation of a D-amino acid. **Chemistry & Biology**, v. 15, n. 2, p. 118-127, 2008.

- LI, S. Q.; ZHANG, R. F.; WANG, Y.; ZHANG, N.; SHAO, J. H.; QIU, M. H.; SHEN, Q. R. Promoter analysis and transcription regulation of fus gene cluster responsible for fusaricidin synthesis of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 21, p. 9479-9489, 2013.
- LITTLE, A. E.; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant–microbe symbiosis. **Biology Letters**, v. 3, n. 5, p. 501-504, 2007.
- LITTLE, A. E.; CURRIE, C. R. Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. **Ecology**, v. 89, n. 5, p. 1216-1222, 2008.
- LIU, Z.; FAN, L.; ZHANG, D.; LI, Y. Antifungal depsipeptide compounds from *Paenibacillus polymyxa* HY96-2. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 3, p. 496-497, 2011.
- LOPES, A. A.; GUIMARAES, D. O.; PUPO, M. T. Quando os microorganismos salvam vidas. **Ciência Hoje**, v. 286, p. 6, 2011.
- MACHADO, J. Simbiose entre as abelhas sociais brasileiras (Meliponinae, Apidae) e uma espécie de bactéria. **Ciencia e Cultura**, v. 23, n. 5, p. 625-633, 1971.
- MARTIN, B. D.; SCHWAB, E. Current usage of symbiosis and associated terminology. **International Journal of Biology**, v. 5, n. 1, p. 32, 2013.
- MASSARO, C. F.; SHELLEY, D.; HEARD, T. A.; BROOKS, P. In vitro antibacterial phenolic extracts from “sugarbag” pot-honeys of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 50, p. 12209-12217, 2014.
- MENEZES, C.; BONETTI, A. M.; AMARAL, I. M. R.; KERR, W. E. Alimentação larval de *Melipona* (Hymenoptera, Apidae): estudo individual das células de cria. **Bioscience Journal**, v. 23, 2007.
- 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, n. 21, p. 2851-2855, 2015.
- MIKUS, J.; STEVERDING, D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue®. **Parasitology International**, v. 48, n. 3, p. 265-269, 2000.
- MORAN, N. A. Symbiosis. **Current Biology**, v. 16, p. 7, 2006.
- MOUSA, W. K.; SHEARER, C. R.; LIMAY-RIOS, V.; ZHOU, T.; RAIZADA, M. N. Bacterial endophytes from wild maize suppress *Fusarium graminearum* in modern maize and inhibit mycotoxin accumulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015.
- NARDI, A.; ELISEEV, A.; BOČEK, P.; FANALI, S. Use of charged and neutral cyclodextrins in capillary zone electrophoresis: enantiomeric resolution of some 2-hydroxy acids. **Journal of Chromatography A**, v. 638, n. 2, p. 247-253, 1993.

- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-61, 2016.
- OH, D.-C.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 6, p. 391-393, 2009.
- 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, n. 4, p. 752-755, 2011.
- OLIVEIRA, P.; BROSNAN, B.; JACOB, F.; FUREY, A.; COFFEY, A.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part II: Substrate impact and mycotoxin reduction. **Food Control**, v. 51, p. 444-452, 2015.
- O'BRIEN, J.; WRIGHT, G. D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 552-558, 2011.
- PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; NAGAMOTO, N. S.; BACCI JR, M. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, n. 4, p. 517-526, 2008.
- PAIZS, B.; SUHAI, S. Fragmentation pathways of protonated peptides. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 4, p. 508-548, 2005.
- PIEL, J. Bacterial symbionts: prospects for the sustainable production of invertebrate-derived pharmaceuticals. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 39-50, 2006.
- 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, n. 1, p. e8748, 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, n. 2, p. e16763, 2011.
- PU, X.; CHEN, F.; YANG, Y.; QU, X.; ZHANG, G.; LUO, Y. Isolation and characterization of *Paenibacillus polymyxa* LY214, a camptothecin-producing endophytic bacterium from *Camptotheca acuminata*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, n. 8, p. 1197-1202, 2015.
- RAMADHAR, T. R.; BEEMELMANN, C.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Bacterial symbionts in agricultural systems provide a strategic source for antibiotic discovery. **The Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 1, p. 53-58, 2014.
- RAZA, W.; MAKEEN, K.; WANG, Y.; XU, Y.; QIRONG, S. Optimization, purification, characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by *Paenibacillus polymyxa* SQR-21. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6095-6103, 2011.

- RAZA, W.; YANG, W.; SHEN, Q. *Paenibacillus polymyxa*: antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment. **Journal of Plant Pathology**, p. 419-430, 2008.
- RAZA, W.; YANG, X.; WU, H.; WANG, Y.; XU, Y.; SHEN, Q. Isolation and characterisation of fusaricidin-type compound-producing strain of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 active against *Fusarium oxysporum* f. sp. *neovium*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 125, n. 3, p. 471-483, 2009.
- SAMPAIO, J. P.; GADANHO, M.; SANTOS, S.; DUARTE, F. L.; PAIS, C.; FONSECA, A.; FELL, J. W. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 687-697, 2001.
- SATOW, M.; ATTILI-ANGELIS, D.; DE HOOG, G.; ANGELIS, D.; VICENTE, V. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 157-163, 2008.
- SCHOENIAN, I.; SPITELLER, M.; GHASTE, M.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 5, p. 1955-1960, 2011.
- SHIMONY, O.; JAFFE, C. L. Rapid fluorescent assay for screening drugs on *Leishmania* amastigotes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n. 2, p. 196-200, 2008.
- SILVA, M. D.; RAMALHO, M.; ROSA, J. F. Why do the stingless bee *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae) forage at high relative air humidity? **Iheringia. Série Zoologia**, v. 101, n. 1-2, p. 131-137, 2011.
- SOUSA, C. S. D.; SERRÃO, J. E.; BONETTI, A. M.; AMARAL, I. M. R.; KERR, W. E.; MARANHÃO, A. Q.; UEIRA-VIEIRA, C. Insights into the *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) fat body transcriptome. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 2, p. 292-297, 2013.
- TAKEDA, Y.; FUJITA, T.; SHINGU, T.; OGIMI, C. Studies on the bacterial gall of *Myrica rubra*. Isolation of a new (7, 0)-metacyclophan from the gall and DL-. BETA.-phenyllactic acid from the culture of gall-forming bacteria. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 6, p. 2569-2573, 1987.
- TAYLOR, M. W.; RADAX, R.; STEGER, D.; WAGNER, M. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 2, p. 295-347, 2007.
- TEKEWE, A.; SINGH, S.; SINGH, M.; MOHAN, U.; BANERJEE, U. Development and validation of HPLC method for the resolution of drug intermediates: dl-3-Phenyllactic acid, dl-O-acetyl-3-phenyllactic acid and ($\pm$)-mexiletine acetamide enantiomers. **Talanta**, v. 75, n. 1, p. 239-245, 2008.
- THOMAS, T. R. A.; KAVLEKAR, D. P.; LOKABHARATHI, P. A. Marine drugs from sponge-microbe association-A review. **Marine Drugs**, v. 8, n. 4, p. 1417-1468, 2010.

- VALAN ARASU, M.; JUNG, M. W.; ILAVENIL, S.; JANE, M.; KIM, D. H.; LEE, K. D.; LIM, Y. C. Isolation and characterization of antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* KCC-10 from forage silage with potential beneficial properties. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 5, p. 1172-1185, 2013.
- 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.
- VATER, J., NIU, B.; DIETEL, K.; BORRISS, R. Characterization of Novel Fusaricidins Produced by *Paenibacillus polymyxa*-M1 Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v. 26, n. 9, p. 1548-1558, 2015.
- VIANA, J.; FRANCISCO, A.; CARVALHO, C.; WALDSCHMIDT, A. Genetic variability in *Melipona scutellaris* from Recôncavo, Bahia, Brazil. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 12, n. 3, p. 3444, 2013.
- WU, X. C.; QIAN, C. D.; FANG, H. H.; WEN, Y. P.; ZHOU, J. Y.; ZHAN, Z. J.; GAO, H. Paenimacrolidin, a novel macrolide antibiotic from *Paenibacillus* sp. F6-B70 active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 491-502, 2011.
- XIE, N.-Z.; LI, J.-X.; SONG, L.-F.; HOU, J.-F.; GUO, L.; DU, Q.-S.; HUANG, R.-B. Genome sequence of type strain *Paenibacillus polymyxa* DSM 365, a highly efficient producer of optically active (R, R)-2, 3-butanediol. **Journal of Biotechnology**, v. 195, p. 72-73, 2015.
- XU, D.; ONDEYKA, J.; HARRIS, G. H.; ZINK, D.; KAHN, J. N.; WANG, H.; SZEWCZAK, A. A. Isolation, structure, and biological activities of fellutamides C and D from an undescribed *Metulocladosporiella* (Chaetothyriales) using the genome-wide *Candida albicans* fitness test. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 8, p. 1721-1730, 2011.
- XU, J.; ZHAO, W.; NING, Y.; BASHARI, M.; CHEN, Y.; JIN, Z.; XU, X. Enantiomer separation of phenyllactic acid by HPLC with Hp- β -cyclodextrin as chiral mobile phase additive. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 76, n. 3-4, p. 461-465, 2013.