UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Produtos naturais de micro-organismos associados aos ninhos
da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa***

Eduardo Afonso da Silva Junior

**Ribeirão Preto
2017**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Produtos naturais de micro-organismos associados aos ninhos
da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa***

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.

Orientado: Eduardo Afonso da Silva Junior

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 24/03/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2017

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

Silva Junior, Eduardo Afonso da

Produtos naturais de micro-organismos associados aos ninhos da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*. Ribeirão Preto, 2017. 136 p.; 30cm.

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

Orientadora: Pupo, Mônica Tallarico.

Coorientador: Clardy, Jon.

1. Simbiose. 2. Formigas cortadeiras. 3. Bactérias.
4. Ecologia química.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Eduardo Afonso da Silva Junior

Produtos naturais de micro-organismos associados aos ninhos da formiga cortadeira

Atta sedens rubropilosa

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**Dedico esse trabalho às pessoas que utilizam a ciência como ferramenta para
descobrir os segredos do cosmos e que utilizam esse conhecimento
para a construção de um mundo melhor.**

Agradecimentos

Aos meus pais e minha irmã por sempre terem me apoiado e incentivado a realizar meus sonhos.

À minha esposa por ter me ajudado e incentivado a fazer o melhor!

À prof. Dr. Mônica Pupo por ter me orientado, pelas oportunidades e pela confiança.

Aos companheiros do LQMo pelo companheirismo e ensinamentos.

Ao prof. Dr. Jon Clardy pela co-orientação e ensinamentos.

Aos pesquisadores do laboratório do professor Clardy pelos ensinamentos e por terem me ajudado durante meu estágio sauduíche.

Ao prof. Dr. Roberto Kolter e pesquisadores de seu laboratório pelos ensinamentos e pelo apoio durante meu estágio sauduíche.

Ao prof. Dr. Fábio Nascimento e seus orientandos pelos ensinamentos e colaboração.

Aos profs. Drs. Noberto Lopes e Ricardo Vessecchi pelas conversas e ensinamentos sobre espectrometria de massas.

Aos técnicos José Carlos Tomaz, Izabel Cristina Turatti e Jacqueline Nakau por terem me auxiliado com os espectrômetros de massas.

Ao técnico Vinicius Palaretti pela aquisição dos espectros de RMN.

Aos professores que contribuíram com minha formação acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP pela oportunidade de realizar o doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas concedidas (2012/24204-1 e BEPE 2014/24330-2) e pelo financiamento do projeto de auxílio regular à pesquisa (2013/04092-7) e do projeto temático FAPESP-NIH/FIC (2013/50954-0).

À CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

"Few are those who see with their own eyes and feel with their own hearts."

Albert Einstein

Resumo

SILVA-JUNIOR, E. A. **Produtos naturais de micro-organismos associados aos ninhos da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa***. 2017. 136f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

As formigas cortadeiras coletam material vegetal para cultivar um fungo simbiote utilizado como fonte de alimento. Colônias de formigas agricultoras podem ser atacadas por micro-organismos invasores e, para proteção do ninho, as formigas se associaram com bactérias produtoras de antibióticos. O objetivo desse trabalho foi estudar os produtos naturais produzidos por micro-organismos associados aos ninhos da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*. Formigas e amostras dos jardins foram lavadas com solução aquosa estéril e bactérias dos gêneros *Serratia*, *Pseudonocardia* e *Burkholderia* foram isoladas em meio ágar ISP-2 e quitina. A bactéria *Serratia marcescens* 3B2 produz as substâncias 3-etil-2,5-dimetil-pirazina e 2,5-dimetil-pirazina, que são componentes do feromônio de trilha das formigas *Atta sexdens rubropilosa*, e ácido indol-3-acético e ácido fenilacético, que são encontrados nas glândulas metapleurais dessas formigas. O genoma dessa bactéria foi sequenciado e os antibióticos andrimide, oocidina e serratamolide foram identificados por *genome mining* e desreplicação dos extratos. Os estudos biossintéticos da 3-etil-2,5-dimetil-pirazina e 2,5-dimetil-pirazina utilizando precursores isotopicamente marcados revelaram que o aminoácido L-treonina é precursor biossintético dessas substâncias. Bactérias *Pseudonocardia* spp., isoladas das formigas e jardins do fungo simbiote, inibiram o crescimento do fungo *Escovopsis* sp., que é parasita dos jardins cultivados pelas formigas. O extrato em acetato de etila da bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 foi submetido ao isolamento monitorado pela atividade antifúngica, o que levou a identificação do ácido indol-3-acético como responsável pela inibição observada. O ácido indol-3-acético inibiu seletivamente o crescimento de esporos de cinco linhagens de *Escovopsis* spp. e não foi ativo contra o fungo cultivado como alimento pelas formigas, *Leucoagaricus gongylophorus*. O genoma da bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 foi sequenciado e a biossíntese do ácido indol-3-acético foi determinada como dependente do aminoácido L-triptofano. A bactéria *Burkholderia* sp. JB2, isolada do jardim fúngico, produz o antibiótico tropolone, que apresenta elevada atividade inibitória frente ao fungo *Escovopsis* sp. devido a privação de ferro. Análises de microscopia eletrônica de varredura revelaram que os jardins do fungo simbiote estão encobertos por uma camada resistente a água, que aparenta estar relacionada com a proteção dos jardins. O fungo entomopatogênico *Aspergillus nomius* ASR3 foi isolado de uma rainha morta de *Atta sexdens rubropilosa* e as aflatoxinas B1 e G1 foram produzidas por esse fungo em condições laboratoriais e na formiga de onde foi isolado. Os resultados obtidos destacam a importância de metabólitos produzidos pela microbiota bacteriana para a defesa e comunicação das formigas. O conhecimento gerado pode servir de inspiração no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e formas de controle das formigas cortadeiras que sejam menos prejudiciais ao meio ambiente.

Palavras-chave: Simbiose; Formigas cortadeiras; Bactérias; Ecologia química.

ABSTRACT

SILVA-JUNIOR, E. A. **Natural products from microorganisms associated with nests of the leaf-cutter ant *Atta sexdens rubropilosa***. 2017. 136p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Leaf-cutter ants collect plant material to cultivate their food source, a symbiotic fungus. Their colonies can be attacked by invading microorganisms and the ants have associated with protective antibiotic-producing bacteria. This work aimed to study the natural products produced by microorganisms associated with nests of the leaf-cutter ant *Atta sexdens rubropilosa*. Ants and fungal garden samples were washed with sterile aqueous solution and bacteria of the genera *Serratia*, *Pseudonocardia* and *Burkholderia* were isolated using ISP-2 and chitin agar plates. *Serratia marcescens* 3B2 produces 3-ethyl-2,5-dimethyl-pyrazine and 2,5-dimethyl-pyrazine, which are components of the ant trail pheromone, and the components of the metapleural glands secretions indole-3-acetic acid and phenylacetic acid were also produced by this strain. *Serratia marcescens* 3B2 genome was sequenced and the production of the antibiotics andrimid, oocydin A and serratamolide were identified by genome mining and dereplication of the crude extracts. Isotope labeling experiments have revealed that the amino acid L-threonine is the biosynthetic precursor of 2,5-dimethylpyrazine and 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine. *Pseudonocardia* spp., isolated from the ants and fungal garden, inhibited the growth of the fungus *Escovopsis* sp., a specialized fungal garden parasite. A bioassay-guided isolation of the *Pseudonocardia* sp. 1B7 ethyl acetate extract revealed indole-3-acetic acid as the active compound. This natural product selectively inhibited the spores growth of five *Escovopsis* spp. strains and it was not active against the fungal cultivar *Leucoagaricus gongylophorus*. Isotope feeding experiments and whole-genome sequencing of *Pseudonocardia* sp. 1B7 indicated that indole-3-acetic acid is biosynthesized by L-tryptophan dependent pathway. *Burkholderia* sp. JB2 was isolated from the fungal garden and it produces the antibiotic tropolone, which inhibits the *Escovopsis* sp. growth by iron privation. The fungal gardens produce a water-resistant layer that seems to be related to the garden protection, as evidenced by scanning electron microscopy analysis. The entomopathogenic fungus *Aspergillus nomius* ASR3 was isolated from a dead *Atta sexdens rubropilosa* queen and the aflatoxins B1 and G1 were produced by this fungus in laboratory and natural conditions. The results highlight the importance of bacterial microbiota for the defense and communication of *Atta sexdens rubropilosa*. These results could contribute for future development of new therapeutic strategies and environmentally friendly techniques to control leaf-cutter ants.

Keywords: Symbiosis; Leaf-cutter ants; Bacteria; Chemical ecology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografia de um líquen, exemplo de simbiose entre fungos e algas.	2
Figura 2. Jardim fúngico cultivado por <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	3
Figura 3. Produtos naturais isolados de bactérias associadas a formigas agricultoras.	5
Figura 4. Formigas cortadeiras <i>Atta laevigata</i> coletando flores.	7
Figura 5. Substâncias presentes nas glândulas metapleurais de formigas cortadeiras.	8
Figura 6. Foto de microscopia eletrônica de varredura de formigas <i>Atta sexdens rubropilosa</i> no jardim dos fungos simbiotes.	10
Figura 7. Isolamento das substâncias produzidas pela bactéria <i>S. marcescens</i> 3B2. * Substâncias identificadas por RMN e HR-ESI-MS.	22
Figura 8. Fotos do segundo dia dos ensaios de antagonismo das bactérias isoladas do formigueiro frente aos patógenos humanos <i>P. mirabilis</i> ATCC 29906, em A, <i>S. aureus</i> ATCC 3538, em B, e <i>C. albicans</i> ATCC 10231, em C. As setas vermelhas estão indicando os maiores halos de inibição de cada placa.	35
Figura 9. Fotos do ensaio de antagonismo do <i>Escovopsis</i> sp. ST041014-01 e: A – <i>Burkholderia</i> sp JB9, B - miconazol 50 µg e C - controle contendo apenas o fungo <i>Escovopsis</i> sp. ST041014-01 no meio ágar ISP-2.	36
Figura 10. <i>Serratia marcescens</i> 3B2 cultivada em meio ágar ISP-2.	37
Figura 11. Substâncias produzidas pela bactéria <i>Serratia marcescens</i> 3B2.	37
Figura 12. Análises de GC-MS dos voláteis produzidos pela bactéria <i>S. marcescens</i> 3B2 cultivada em meio ágar ISP-2, em A, e controle do meio ágar ISP-2 em B. Modo de injeção Splitless 1min, temperatura de injeção de 250 °C, temperatura inicial da coluna de 50 °C, hold time 5 min, aquecimento de 3 °C por min até 180 °C, hold time 10 min.	37
Figura 13. Espectros de EI-MS das substâncias 1, 2, 3, e 4 obtidos nas análises por GC-MS.	38
Figura 14. Proposta do mecanismo de fragmentação das substâncias 2, 3, e 4 formando o pico base de <i>m/z</i> 122.	39
Figura 15. Espectros de EI-MS da substância 1 obtidos nas análises por GC-MS, em A, e espectro da 3-metoxi-2,5-dimetil-pirazina disponível no banco de dados Wiley7.	40
Figura 16. Espectros de EI-MS da 3-isopentil-2,5-dimetil-pirazina e 3-pentil-2,5-dimetil-pirazina presentes no banco de dados WILEY7.	40
Figura 17. Dados de RMN da substância 4.	42
Figura 18. Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) da substância 4.	43
Figura 19. Mapa de contorno de gHSQC (600 MHz, CDCl ₃) da substância 4.	43
Figura 20. Mapa de contorno de gHMBC (600 MHz, CDCl ₃) da substância 4.	44
Figura 21. Mapa de contorno de gCOSY (600 MHz, CDCl ₃) da substância 4.	44
Figura 22. Análise da substância 4 por HR-ESI-MS operado no modo positivo.	45
Figura 23. Análises de GC-MS dos voláteis produzidos pela bactéria <i>Serratia marcescens</i> 3B2 cultivada em meio ágar ISP-2 em A e substância 4 em B.	45
Figura 24. Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) da substância 7.	46
Figura 25. Análises de GC-MS mostrando a diferença dos voláteis produzidos pela bactéria <i>Serratia marcescens</i> 3B2 cultivada em meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose e sem a adição de aminoácidos, em A, e em meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose e com 1,5% de L-treonina, em B.	47

- Figura 26.** Análises de GC-MS dos compostos voláteis produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada em meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose e 2% de L-treonina, em A, substâncias voláteis presentes em cinco glândulas de veneno de *Atta sexdens rubropilosa*, em B, e substâncias voláteis presentes em cinco abdomens de *Atta sexdens rubropilosa*, em C. O retângulo azul destaca os picos da substância **5** e o vermelho destaca os picos da substância **6**. 48
- Figura 27.** Espectros de massas dos íons presentes em 7,5 min dos cromatogramas da figura 26, mostrando a presença do íon molecular da pirazina **5** com m/z 108. Bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada em meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose e 2% de L-treonina, em A, substâncias voláteis presentes em cinco glândulas de veneno isoladas de abdomens de *Atta sexdens rubropilosa*, em B, e substâncias voláteis presentes em cinco abdomens de *Atta sexdens rubropilosa*, em C. 48
- Figura 28.** Espectros de massas dos íons presentes em 15,4 min dos cromatogramas da figura 26, mostrando a presença do íon molecular da pirazina **6** com m/z 136. Bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada em meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose e 2% de L-treonina, em A, substâncias voláteis presentes em cinco glândulas de veneno isoladas de abdomens de *Atta sexdens rubropilosa*, em B, e substâncias voláteis presentes em cinco abdomens de *Atta sexdens rubropilosa*, em C. 48
- Figura 29.** Análises de GC-MS dos voláteis produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada em meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose e diferentes concentrações do aminoácido L-treonina: 0% em A; 0,5% em B; 1,0% em C; 1,5% em D; 2,0% em E. O retângulo azul destaca os picos da substância **5** e o vermelho destaca os picos da substância **6**. 49
- Figura 30.** Espectros de massas dos íons presentes em 7,5 min dos cromatogramas da figura 29, mostrando a presença do íon molecular da pirazina **5** com m/z 108 em C, D e E. Controle do meio sem L-treonina em A; 0,5% de L-treonina em B; 1,0% de L-treonina em C; 1,5% de L-treonina em D; 2,0 % de L-treonina em E. 49
- Figura 31.** Espectros de massas dos íons presentes em 15,4 min dos cromatogramas da figura 29, mostrando a presença do íon molecular da pirazina **6** com m/z 136 em C, D e E. Controle do meio sem L-treonina em A; 0,5% de L-treonina em B; 1,0% de L-treonina em C; 1,5% de L-treonina em D; 2,0 % de L-treonina em E. 50
- Figura 32.** Análises de GC-MS dos voláteis produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada em meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose e com os aminoácidos L-treonina, L-valina, L-serina e L-alanina: controle do meio sem aminoácidos em A; 1,5% de L-treonina em B; 2,0% de L-treonina em C; 1,5% de L-valina em D; 1,5% de L-serina em E; 1,5% de L-alanina em F. O retângulo azul destaca os picos da substância **5** e o vermelho destaca os picos da substância **6**. 50
- Figura 33.** Espectros de massas dos íons presentes em 7,5 min dos cromatogramas da figura 32, mostrando a presença do íon molecular da pirazina **5** com m/z 108 em B e C. Controle do meio sem aminoácidos em A; 1,5% de L-treonina em B; 2,0% de L-treonina em C; 1,5% de L-valina em D; 1,5% de L-serina em E; 1,5% de L-alanina em F. 50
- Figura 34.** Espectros de massas dos íons presentes em 15,4 min dos cromatogramas da figura 32, mostrando a presença do íon molecular da pirazina **6** com m/z 136

- em B e C. Controle do meio sem aminoácidos em A; 1,5% de L-treonina em B; 2,0% de L-treonina em C; 1,5% de L-valina em D; 1,5% de L-serina em E; 1,5% de L-alanina em F. 51
- Figura 35.** Cromossomo circular de *Serratia marcescens* 3B2 com os *clusters* biossintéticos identificados pelo antiSMASH destacados em azul. 51
- Figura 36.** Análise do genoma da bactéria *Serratia marcescens* 3B2 pelo antiSMASH. 52
- Figura 37.** Estruturas químicas dos compostos produzidos pelos *clusters* mais similares aos *clusters* codificados no genoma da bactéria *Serratia marcescens* 3B2, conforme descrito na tabela 8. 53
- Figura 38.** Proposta da fragmentação da oocidina A (**8**) sodiada em ESI-MS/MS. . 55
- Figura 39.** Espectros de MS/MS da oocidina A (**8**) sodiada. As análises foram realizadas em ESI-Q-TOF Agilent 6530 utilizando nitrogênio como gás de colisão nas energias de 10, 20 e 30 eV. 55
- Figura 40.** Proposta da fragmentação da andrimide (**9**) protonada em ESI-MS/MS. 56
- Figura 41.** Espectros de MS/MS da andrimide (**9**) protonada. As análises foram realizadas em ESI-Q-TOF Agilent 6530 utilizando nitrogênio como gás de colisão nas energias de 10, 20 e 30 eV. 56
- Figura 42.** Proposta da fragmentação da serratamolide (**10**) protonada em ESI-MS/MS. 57
- Figura 43.** Espectros de MS/MS da serratamolide (**10**) protonada. As análises foram realizadas em ESI-Q-TOF Agilent 6530 utilizando nitrogênio como gás de colisão nas energias de 10, 20 e 30 eV. 57
- Figura 44.** Espectro de RMN de ^1H da substância **10** (300 MHz, CD_3OD). 58
- Figura 45.** Rota biossintética do antibiótico oocidina (**8**) (MATTILA et al., 2012). 59
- Figura 46.** Rota biossintética do antibiótico andrimide (**9**) (JIN et al., 2006). 59
- Figura 47.** Biossíntese da serratamolide pela bactéria *Serratia marcescens* adaptada de Li e colaboradores (2005). 60
- Figura 48.** Análises em LC-HR-MS dos extratos da bactéria *Serratia marcescens* 3B2 com as massas em alta resolução das substâncias **1** - **12** extraídas. Os isômeros **2** e **3** coeluíram no método utilizado. Coluna Phenomenex LC Kinetex 2,6 μm EVO C18 (100 X 2,1 mm), fase móvel composta por misturas de CH_3CN e H_2O contendo 0,1% de ácido fórmico e vazão de 0,3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O método cromatográfico iniciou com 10% de CH_3CN e 90% de H_2O durante 1 min, seguido por um gradiente linear até atingir 100% de CH_3CN em 15 min e foi mantido durante 1,5 minutos a 100% de CH_3CN 61
- Figura 49.** Análises de GC-MS dos compostos voláteis produzidos pelas bactérias *Serratia marcescens* 3B2 em A; ASLIM1 em B; ASLIM7 em C; ASLIM5 em D; ASLIM6 em E; ASLI3 em F; AS1GV1B1 em G e ASLP2 em H cultivadas em meio ágar ISP-2. Os picos referentes as pirazinas **1**, **2**, **3** e **4** estão destacados. Modo de injeção Splitless 1min, temperatura de injeção de 250 $^{\circ}\text{C}$, temperatura inicial da coluna de 50 $^{\circ}\text{C}$, *hold time* 5 min, aquecimento de 3 $^{\circ}\text{C}$ por min até 180 $^{\circ}\text{C}$, *hold time* 10 min. 62
- Figura 50.** Análises de GC-MS dos voláteis produzidos pelas bactérias *Serratia marcescens* 3B2 em A; ASLIM1 em B; ASLIM7 em C; ASLIM5 em D; ASLIM6 em E; ASLI3 em F; AS1GV1B1 em G; e ASLP2 em H cultivadas em meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose e 1,5% de L-treonina. O retângulo azul destaca os picos da pirazina **5** e o vermelho destaca os picos da pirazina **6**. Modo de injeção Splitless 1min, temperatura de injeção de 250 $^{\circ}\text{C}$, temperatura inicial

- da coluna de 50 °C, *hold time* 5 min, aquecimento de 3 °C por min até 180 °C, *hold time* 10 min. 63
- Figura 51.** Análises de GC-MS dos compostos voláteis produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de alanina em A e controle do meio em B. O retângulo azul destaca os picos da pirazina **5** e o vermelho destaca os picos da pirazina **6**. 65
- Figura 52.** Espectros de massas dos íons presentes em 7,5 min dos cromatogramas da figura 51, mostrando a presença do íon molecular da pirazina **5** com m/z 108 em A. Bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de alanina em A e controle do meio em B. 65
- Figura 53.** Espectros de massas dos íons presentes em 15,4 min dos cromatogramas da figura 51, mostrando a presença do íon molecular da pirazina **6** com m/z 136 em A. Bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de alanina em A e controle do meio em B. 65
- Figura 54.** Análises em LC-orbitrap do extrato da bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina com a massa da pirazina **5** extraída em A e pirazina **6** extraída em B. 66
- Figura 55.** Espectros de massas em alta resolução da pirazina **5** (M+H com m/z 109,07625) em A da pirazina **6** (M+H com m/z 137,10717) em B produzidas pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina. 66
- Figura 56.** Análises de GC-MS dos compostos voláteis produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 0,5% de L-alanina e 1,5% de L-treonina não marcada em A e mesmo meio com 1,5% de L-[U-¹³C, ¹⁵N]-treonina em B. O retângulo azul destaca os picos da pirazina **5** e o vermelho destaca os picos da pirazina **6**. 67
- Figura 57.** Espectros de massas da pirazina **5**, em 7,5 min dos cromatogramas da figura 56, produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 0,5% de L-alanina e 1,5% de L-treonina não marcada (íon molecular com m/z 108) em A e mesmo meio com 1,5% de L-[U-¹³C, ¹⁵N]-treonina (íon molecular com m/z 116) em B. 68
- Figura 58.** Espectros de massas da pirazina **6**, em 15,4 min dos cromatogramas da figura 56, produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 0,5% de L-alanina e 1,5% de L-treonina não marcada (íon molecular com m/z 136) em A e mesmo meio com 1,5% de L-[U-¹³C, ¹⁵N]-treonina (íon molecular com m/z 144) em B. 68
- Figura 59.** Espectros de massas em alta resolução da pirazina **5** produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 0,5% de L-alanina e 1,5% de L-treonina não marcada em A e mesmo meio com 1,5% de L-[U-¹³C, ¹⁵N]-treonina em B. C₆H₉N₂ com m/z 109,076, C₃¹³C₃H₉N¹⁵N com m/z 113,083 e ¹³C₆H₉¹⁵N₂ com m/z 117,090. 69
- Figura 60.** Espectros de massas em alta resolução da pirazina **6** produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 0,5% de L-alanina e 1,5% de L-treonina não marcada em A e mesmo meio com 1,5% de L-[U-¹³C, ¹⁵N]-treonina em B. C₈H₁₃N₂ com m/z 137,107, C₅¹³C₃H₁₃N¹⁵N com m/z 141,114 e C₂¹³C₆H₁₃¹⁵N₂ com m/z 145,121. 70

- Figura 61.** Proposta de fragmentação da pirazina **6** em GC-MS. 70
- Figura 62.** Análises de GC-MS dos compostos voláteis produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina, 0,5% de L-alanina e 0,15% de acetato de sódio não marcado em A e mesmo meio com 0,15% de U-¹³C-acetato de sódio em B. O retângulo azul destaca os picos da pirazina **5** e o vermelho destaca os picos da pirazina **6**. 71
- Figura 63.** Espectros de massas da pirazina **5**, em 7,5 min dos cromatogramas da figura 62, produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina, 0,5% de L-alanina e 0,15% de acetato de sódio não marcado (íon molecular com m/z 108) em A e mesmo meio com 0,15% de U-¹³C-acetato de sódio (íon molecular com m/z 108) em B. 71
- Figura 64.** Espectros de massas da pirazina **6**, em 15,4 min dos cromatogramas da figura 62, produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina, 0,5% de L-alanina e 0,15% de acetato de sódio não marcado (íon molecular com m/z 136) em A e mesmo meio com 0,15% de U-¹³C-acetato de sódio (íon molecular com m/z 138) em B. 72
- Figura 65.** Espectros de massas em alta resolução da pirazina **5** produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina, 0,5% de L-alanina e 0,15% de acetato de sódio não marcado em A e mesmo meio com 0,15% de U-¹³C-acetato de sódio em B. C₆H₉N₂ com m/z 109,076. 72
- Figura 66.** Espectros de massas em alta resolução da pirazina **6** produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina, 0,5% de L-alanina e 0,15% de acetato de sódio não marcado em A e mesmo meio com 0,15% de U-¹³C-acetato de sódio em B. C₈H₁₃N₂ com m/z 137,107 e C₆¹³C₂H₁₃N₂ com m/z 139,113. 73
- Figura 67.** Análises de GC-MS dos compostos voláteis produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada em A e mesmo meio com 0,5% de ¹⁵N-L-alanina em B. O retângulo azul destaca os picos da pirazina **5** e o vermelho destaca os picos da pirazina **6**. 74
- Figura 68.** Espectros de massas da pirazina **5**, em 7,5 min dos cromatogramas da figura 67, produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada (íon molecular com m/z 108) em A e mesmo meio com 0,5% de ¹⁵N-L-alanina (íon molecular com m/z 108) em B. 74
- Figura 69.** Espectros de massas da pirazina **6**, em 15,4 min dos cromatogramas da figura 67, produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada (íon molecular com m/z 136) em A e mesmo meio com 0,5% de ¹⁵N-L-alanina (íon molecular com m/z 136) em B. 75
- Figura 70.** Espectros de massas em alta resolução da pirazina **5** produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada em A e mesmo meio com 0,5% de ¹⁵N-L-alanina em B. C₆H₉N₂ com m/z 109,076. 75
- Figura 71.** Espectros de massas em alta resolução da pirazina **6** produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com

- 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada em A e mesmo meio com 0,5% de ^{15}N -L-alanina em B. $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_2$ com m/z 137,107. 76
- Figura 72.** Análises de GC-MS dos compostos voláteis produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada em A e mesmo meio com 0,5% de $3\text{-}^{13}\text{C}$ -L-alanina em B. O retângulo azul destaca os picos da pirazina **5** e o vermelho destaca os picos da pirazina **6**. 76
- Figura 73.** Espectros de massas da pirazina **5**, em 7,5 min dos cromatogramas da figura 72, produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada (íon molecular com m/z 108) em A e mesmo meio com 0,5% de $3\text{-}^{13}\text{C}$ -L-alanina (íon molecular com m/z 108) em B. 77
- Figura 74.** Espectros de massas da pirazina **6**, em 15,4 min dos cromatogramas da figura 72, produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada (íon molecular com m/z 136) em A e mesmo meio com 0,5% de $3\text{-}^{13}\text{C}$ -L-alanina (íon molecular com m/z 136) em B. 77
- Figura 75.** Espectros de massas em alta resolução da pirazina **5** produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada em A e mesmo meio com 0,5% de $3\text{-}^{13}\text{C}$ -L-alanina em B. $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_2$ com m/z 109,076. .. 78
- Figura 76.** Espectros de massas em alta resolução da pirazina **6** produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada em A e mesmo meio com 0,5% de $3\text{-}^{13}\text{C}$ -L-alanina em B. $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_2$ com m/z 137,107 e $\text{C}_7^{13}\text{CH}_{13}\text{N}_2$ com m/z 138,110. 79
- Figura 77.** Espectros de massas em alta resolução da pirazina **6** produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina, 24,4 μM de L-alanina não marcada e 24,4 μM de acetato de sódio não marcado em A, mesmo meio com 24,4 μM de L-alanina não marcada e 24,4 μM $\text{U-}^{13}\text{C}$ -acetato de sódio em B e mesmo meio com 24,4 μM de $3\text{-}^{13}\text{C}$ -L-alanina e 24,4 μM de acetato de sódio não marcado em C. $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_2$ com m/z 137,107, $\text{C}_7^{13}\text{CH}_{13}\text{N}_2$ com m/z 138,110 e $\text{C}_6^{13}\text{C}_2\text{H}_{13}\text{N}_2$ com m/z 139,113. 80
- Figura 78.** Incorporação de L-[$\text{U-}^{13}\text{C}$, ^{15}N]-treonina e $\text{U-}^{13}\text{C}$ -acetato de sódio nas estruturas químicas das pirazinas **5** e **6**. 81
- Figura 79.** Proposta de biossíntese das pirazinas **5** e **6**. 82
- Figura 80.** *Pseudonocardia* sp. 1B7 cultivada em meio ágar ISP-2. 84
- Figura 81.** Foto macroscópica (A) e de microscopia eletrônica de varredura (B) mostrando a ausência de actinobactérias no exoesqueleto de *Atta sexdens rubropilosa*. Inibição do crescimento do fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 pela bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 (C). 85
- Figura 82.** Ensaio de inibição entre *Pseudonocardia* sp. 1B7 e *Escovopsis* sp. ST041014-1 (A, C, E) e controle de crescimento do fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 (B, D, F). Os ensaios foram realizados durante 7 (A e B), 14 (C e D) e 21 (E e F) dias. 85
- Figura 83.** Cromatograma em HPLC semi-preparativo do extrato bruto em acetato de etila da bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7, com o pico do IAA (**12**) destacado pela seta vermelha. Coluna Phenomenex Luna 5 μm C_{18} , 250 X 10,00 mm, fase móvel composta por misturas de CH_3CN e H_2O contendo 0,1% de ácido fórmico e vazão

- de 3 mL.min⁻¹. O método de HPLC iniciou-se com fase isocrática de 10% de CH₃CN durante 5 min, seguido por gradiente linear de 10-65% de CH₃CN durante 5-35 min, de 35 a 38 min foi aplicado gradiente linear de 65-100% de CH₃CN, que foi seguido pela fase isocrática 100% de CH₃CN durante 38 a 40 min. 86
- Figura 84.** Ensaio antifúngico líquido das frações 1 a 5 do extrato bruto em acetato de etila da bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 a 100 µg/mL contra esporos do fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1. O corante AlamarBlue foi adicionado em cada poço para verificar o crescimento do fungo. O controle de crescimento do fungo *Escovopsis* sp. (A) continha a mesma quantidade de MeOH usado nos testes. A fração 3 inibiu o crescimento do fungo *Escovopsis* sp., em D, de forma similar ao antifúngico cicloheximida a 0,39 µg/mL, que foi utilizado como controle positivo, em G..... 87
- Figura 85.** Espectro de RMN de ¹H da fração 3 do extrato bruto em acetato de etila da bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 (600 MHz, CD₃OD)..... 87
- Figura 86.** Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (12) em diferentes concentrações contra esporos do fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 após seis dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna..... 89
- Figura 87.** Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (12) em diferentes concentrações contra células do micélio do fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 após seis dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna. 89
- Figura 88.** Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (12) em diferentes concentrações contra esporos do fungo *Escovopsis* sp. WM151001-4 após quatro dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna..... 89
- Figura 89.** Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (12) em diferentes concentrações contra células do micélio do fungo *Escovopsis* sp. WM151001-4 após quatro dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna. 90
- Figure 90.** Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (12) em diferentes concentrações contra esporos do fungo *Escovopsis* sp. LK150120-01 após quatro dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna..... 90
- Figura 91.** Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (12) em diferentes concentrações contra células do micélio do fungo *Escovopsis* sp. LK150120-01 após quatro dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna. 90
- Figura 92.** Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (12) em diferentes concentrações contra esporos do fungo *Escovopsis* sp. CC150618-02 após onze dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna. Houve pouco crescimento do fungo na concentração de 6,25 µg/mL de IAA..... 91
- Figura 93.** Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (12) em diferentes concentrações contra células do micélio do fungo *Escovopsis* sp. CC150618-02 após onze dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna. Houve pouco crescimento do fungo na concentração de 6,25 µg/mL de IAA. 91
- Figura 94.** Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (12) em diferentes concentrações contra esporos do fungo *Escovopsis* sp. AB150620-3 após quatro

dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.....	91
Figura 95. Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (12) em diferentes concentrações contra células do micélio do fungo <i>Escovopsis</i> sp. AB150620-3 após quatro dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.....	92
Figura 96. Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (12) em diferentes concentrações contra o fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> CC30329-01 após 24 dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.....	92
Figura 97. Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (12) em diferentes concentrações contra células do fungo <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 após 2 dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.....	92
Figura 98. Ensaio de inibição entre as diferentes linhagens de <i>Pseudonocardia</i> sp. contra o fungo <i>Escovopsis</i> sp. ST041014-1 em ágar ISP-2. As bactérias foram cultivadas durante 21 dias e, em seguida, os esporos do fungo foram inoculados nas placas. Esses ensaios foram realizados em duplicata e a leitura foi realizada após quatro dias de incubação. *A bactéria <i>Pseudonocardia</i> sp. ASC65 foi isolada de jardins de uma colônia do campus da USP e não cresceu de forma satisfatória durante o experimento.	94
Figura 99. Análises em LC-HR-MS dos extratos das bactérias <i>Pseudonocardia</i> spp. com a massa do IAA extraída. Coluna Phenomenex LC Kinetex 2,6 µm EVO C18 (100 X 2,1 mm), fase móvel composta por misturas de CH ₃ CN e H ₂ O contendo 0,1% de ácido fórmico e vazão de 0,3 mL.min ⁻¹ . O método cromatográfico iniciou com 10% de CH ₃ CN e 90% de H ₂ O durante 1 min, seguido por um gradiente linear até atingir 100% de CH ₃ CN em 15 min e foi mantido durante 1,5 minutos a 100% de CH ₃ CN.	95
Figura 100. Espectros de massas de alta resolução do IAA (12) produzido pela bactéria <i>Pseudonocardia</i> sp. 1B7 cultivada em meio ágar ISP-2 suplementado (A) ou não (B) com o aminoácido marcado ¹⁵ N-L-Triptofano.	96
Figura 101. Proposta biossintética do IAA pela bactéria <i>Pseudonocardia</i> sp. 1B7..	96
Figura 102. Sequências gênicas obtidas a partir do <i>assembly</i> do genoma da bactéria <i>Pseudonocardia</i> sp. 1B7. As setas vermelhas indicam os <i>clusters</i> de genes biossintéticos encontrados pelo antiSMASH.	98
Figura 103. Análise do genoma da bactéria <i>Pseudonocardia</i> sp. 1B7 por antiSMASH.	99
Figura 104. Estruturas químicas dos compostos codificados pelos <i>clusters</i> biossintéticos mais similares aos <i>clusters</i> biossintéticos codificados no genoma da bactéria <i>Pseudonocardia</i> sp. 1B7, conforme descrito na tabela 15.....	100
Figura 105. <i>Burkholderia</i> sp. JB2 cultivada em meio ágar ISP-2.	101
Figura 106. Cromatogramas em 225 nm do extrato bruto em acetato de etila do cultivo a bactéria <i>Burkholderia</i> sp. JB2 em A, da substância precipitada em B e do controle do meio ISP-2 em C. Coluna Phenomenex C6-Fenil 5 µm (250 X 4,60 mm) e uma vazão de 0,8 mL.min ⁻¹ . O gradiente iniciou com 10% de metanol atingindo 100% em 20 min, permanecendo na mesma proporção até 30 min, em seguida voltou para 10% de metanol em 32 min e permaneceu nessa proporção até 37 min.	102
Figura 107. Espectro de RMN de ¹ H da substância 14 (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6).	103
Figura 108. Espectro de RMN de ¹ H da substância 14 (500 MHz, CDCl ₃).	103

Figura 109. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 14 (125 MHz, CDCl_3).....	104
Figura 110. Espectro de DEPT 135 da substância 14 (125 MHz, CDCl_3).....	104
Figura 111. Espectros de HR-ESI-MS no modo positivo da substância 14	105
Figura 112. Ensaio de inibição entre <i>Burkholderia</i> sp. JB2 e <i>Escovopsis</i> sp. ST041014-1 em ágar ISP-2 suplementado (B) ou não (A) com 1 mM de FeCl_3	105
Figura 113. Estrutura química do tropolone (13) em A e estrutura do precipitado (14), obtida por cristalografia de raios-X, mostrando três íons tropolones quelados com um átomo central de metal, em B.	106
Figura 114. Ensaio de inibição das frações do extrato bruto em acetato de etila da bactéria <i>Burkholderia</i> sp. JB2 contra o fungo <i>Escovopsis</i> sp. ST041014-1 em ágar ISP-2. É possível observar a atividade mais acentuada da fração 1 pela presença do halo de inibição.	106
Figura 115. Cromatogramas em 254 nm das frações 1, 2, 3, 4 e 5 do extrato bruto em acetato de etila da bactéria <i>Burkholderia</i> sp. JB2 obtidos por LC-DAD-MS. O pico referente ao tropolone está destacado com uma seta vermelha.	106
Figura 116. Cromatograma obtido por LC-DAD-MS a 254 nm da fração 1 do extrato bruto em acetato de etila da bactéria <i>Burkholderia</i> sp. JB2 (A) e cromatograma do íon tropolone extraído em (B), comprovando a presença dessa substância na fração ativa.....	107
Figura 117. Ensaio de inibição do tropolone (13) em diferentes concentrações contra esporos do fungo <i>Escovopsis</i> sp. ST041014-1 após seis dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.....	109
Figura 118. Ensaio de inibição do ácido fenilacético (11) em diferentes concentrações contra esporos do fungo <i>Escovopsis</i> sp. ST041014-1 após seis dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.	109
Figura 119. Ensaio de inibição do tropolone (13) em diferentes concentrações contra o fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> CC30329-01 após 24 dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.	109
Figura 120. Ensaio de inibição do ácido fenilacético (11) em diferentes concentrações contra o fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> CC30329-01 após 24 dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.	110
Figura 121. Biossíntese da substância tropolone pela bactéria <i>P. gallaeciensis</i> DSM17395 (THIEL et al., 2010).....	110
Figura 122. Foto de microscopia eletrônica de varredura de uma folha mantida no jardim dos fungos simbiotes de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> , A, e sua ampliação mostrando um estômato encoberto por uma película, B. As setas vermelhas destacam fissuras presentes na amostra.	112
Figura 123. Foto de microscopia eletrônica de varredura do jardim dos fungos simbiotes de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> , A, e ampliação, B, com setas azuis destacando formas que podem ser bactérias e/ou leveduras. As estruturas destacadas por setas azuis possuem tamanhos de 977.7 nm - 1.896 μm . As setas vermelhas destacam fissuras presentes na amostra.....	112
Figura 124. Foto de microscopia eletrônica de varredura do líquido produzido pelo jardim de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> adicionado na superfície de uma folha, A, e sua ampliação mostrando um estômato encoberto pela película formada, B.	112
Figura 125. Foto de microscopia eletrônica de varredura do jardim dos fungos simbiotes de attine basal coletada no parque estadual de Vassununga -SP, em A, e ampliação, em B, com a seta vermelha destacando a espessura da camada, 1,75 μm	113

- Figura 126.** Foto de microscopia eletrônica de varredura do jardim dos fungos simbiotes de *Atta laevigata*, em A, e *Acromyrmex* sp., em B, ambas amostras foram coletadas no campus da USP de Ribeirão Preto..... 113
- Figura 127.** Foto de fragmento de jardim dos fungos simbiotes de *Atta sexdens rubropilosa* com gotinhas de água em sua superfície mostrando a impermeabilidade em A. Em B a água foi corada com o corante rezazurina para facilitar a visualização das gotinhas na superfície dos jardins..... 113
- Figura 128.** Foto de microscopia eletrônica de varredura do jardim dos fungos simbiotes de *Atta sexdens rubropilosa* lavados com água, mostrando que a camada não foi solubilizada..... 114
- Figura 129.** Foto de microscopia eletrônica de varredura do jardim dos fungos simbiotes de *Atta sexdens rubropilosa* lavados com hexano (A), acetato de etila (B), metanol (C) e água (D). As camadas aparentam estar intactas em A e D, enquanto que foram alteradas em B e C. 114
- Figura 130.** Foto de microscopia eletrônica de varredura do jardim dos fungos simbiotes de *Atta sexdens rubropilosa*, A, e ampliação, B, com setas azuis destacando formas que podem ser bactérias e/ou leveduras. As setas vermelhas destacam fissuras presentes na amostra. 115
- Figura 131.** Foto de microscopia eletrônica de varredura de jardins transportado por duas rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* em A e C, e ampliações em B e D evidenciando a presença da camada envolvendo o jardim. 115
- Figura 132.** Fotos da rainha de *A. sexdens*, em A, e *A. nomius* ASR3 isolado dessa formiga, em B..... 116
- Figura 133.** Aflatoxinas B1 (15) e G1 (16) produzidas pelo fungo *A. nomius* ASR3. 116
- Figura 134.** Espectros de HR-ESI-MS dos extratos em acetato de etila da rainha de *A. sexdens* morta (A), do cultivo do fungo *A. nomius* ASR3 em meio PDA (B) e do controle contendo apenas o meio PDA (C). As setas vermelhas estão indicando os sinais referentes às aflatoxinas..... 118
- Figura 135.** Espectro de ESI-MS/MS do íon m/z 313 referente à aflatoxina B1 protonada, obtido em micrOTOF Q II operado no modo positivo com energia de colisão variando de 5 a 40 eV..... 119
- Figura 136.** Espectro de ESI-MS/MS do íon m/z 329 referente à aflatoxina G1 protonada, obtido em micrOTOF Q II operado no modo positivo com energia de colisão variando de 5 a 40 eV..... 119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Códigos e locais de onde as bactérias da colônia 1 foram isoladas.	31
Tabela 2. Códigos e locais de onde as bactérias da colônia 2 foram isoladas.	32
Tabela 3. Códigos e locais de onde as bactérias da colônia 3 foram isoladas.	32
Tabela 4. Identificação dos micro-organismos isolados e simimilidade das sequencias amplificadas com sequencias conhecidas.	33
Tabela 5. Resultados dos ensaios de antagonismo em placa das bactérias simbiontes frente às bactérias patogênicas <i>P. mirabilis</i> ATCC 29906, <i>S. aureus</i> ATCC 3538 e à levedura patogênica <i>C. albicans</i> ATCC 10231.	34
Tabela 6. Resultados dos ensaios de antagonismo em placa das bactérias isoladas do jardim frente ao fungo <i>Escovopsis</i> sp. ST041014-01*.	35
Tabela 7. Dados de RMN da substância 4 (CDCl ₃ , 500 MHz).	42
Tabela 8. <i>Clusters</i> biossintéticos presentes no genoma da bactéria <i>Serratia marcescens</i> 3B2 encontrados pelo antiSMASH e similaridades com os clusters já descritos na literatura.	52
Tabela 9. Dados de LC-HR-MS das substâncias produzidas por <i>S. marcescens</i> 3B2.	61
Tabela 10. Intensidades relativas dos isótopos da pirazina 5 protonada nas análises dos experimentos de marcação isotópica em LC-orbitrap.	83
Tabela 11. Intensidades relativas dos isótopos da pirazina 6 protonada nas análises dos experimentos de marcação isotópica em LC-orbitrap.	83
Tabela 12. Atividade do IAA frente a esporos e micélio dos fungos <i>Escovopsis</i> spp. isolados a partir de cinco colônias de formigas cortadeiras.	88
Tabela 13. Linhagens de <i>Pseudonocardia</i> spp. isoladas de colônias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	93
Tabela 14. Detecção por LC-HR-MS do IAA (12) produzido pelas diferentes linhagens de <i>Pseudonocardia</i> sp. no ensaio de antagonismo frente ao fungo <i>Escovopsis</i> sp. ST041014-1.	94
Tabela 15. <i>Clusters</i> biossintéticos presentes no genoma da bactéria <i>Pseudonocardia</i> sp. 1B7 encontrados pelo antiSMASH e similaridades com os clusters já descritos.	98
Tabela 16. Principais íons observados nos espectros de HRESIMS do extrato em acetato de etila do fungo <i>A. nomius</i> ASR3 cultivado no meio PDA.	117
Tabela 17. Principais íons observados nos espectros de HRESIMS do extrato em acetato de etila da rainha de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> infestada com o fungo <i>A. nomius</i> ASR3.	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American type culture collection</i>
CDCl_3	clorofórmio deuterado
<i>d</i>	dublete
DCM	diclorometano
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
$\text{DMSO-}d_6$	dimetilsulfóxido deuterado
δ	deslocamento químico (em ppm)
EI	ionização por impacto de elétrons
ESI	ionização por eletrospray
ESI-MS/MS	espectrometria de massas sequencial acoplada a fonte de ionização por eletrospray
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
GC-MS	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
<i>g</i> COSY	correlation spectroscopy
<i>g</i> HMBC	heteronuclear multiple bond coherence
<i>g</i> HSQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HRESIMS	espectrometria de massas em alta resolução
<i>J</i>	constante de acoplamento (em Hz)
LC-MS	cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas
LQMo	Laboratório de Química de Micro-organismos
<i>m</i>	múltiplo
MeOH	metanol
MEV	microscopia eletrônica de varredura
μg	micrograma
μL	microlitro
RMN de ^1H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C	ressonância magnética nuclear de carbono
rpm	rotações por minuto
<i>s</i>	singleto
UV	ultravioleta

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas e siglas	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Simbiose	2
1.2 Formigas agricultoras e micro-organismos simbioses	3
1.3 Formigas cortadeiras	6
1.4 <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	8
1.5 Necessidade de novos antibióticos	10
1.6 <i>Genome mining</i> e desreplicação aplicados para identificação de moléculas bioativas	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Meios de cultivos, reagentes e solventes	16
3.2 Equipamentos, vidrarias e outros materiais	16
3.3 Coleta das formigas e isolamento dos micro-organismos	17
3.4 Preservação e identificação dos micro-organismos isolados	18
3.5 Ensaio preliminares de antagonismo	19
3.6 Ensaio antimicrobianos entre <i>Pseudonocardia</i> spp. e <i>Escovopsis</i> spp.	20
3.7 Cultivos da bactéria <i>Serratia marcescens</i> 3B2	21
3.8 Isolamento e identificação de substâncias produzidas pela bactéria <i>Serratia marcescens</i> 3B2	21
3.9 Experimentos de marcação isotópica para o estudo da biossíntese de voláteis produzidos pela bactéria <i>Serratia marcescens</i> 3B2	23
3.10 Cultivo em escala ampliada de <i>Pseudonocardia</i> sp. 1B7 e isolamento das substâncias ativas	24
3.11 Cultivo da bactéria <i>Burkholderia</i> sp. JB2 e identificação da substância ativa	25
3.12 Sequenciamento dos genomas das bactérias <i>Serratia marcescens</i> 3B2 e <i>Pseudonocardia</i> sp. 1B7	26
3.13 Ensaio de inibição das substâncias ácido fenilacético (11), ácido indol-3-acético (12) e tropolone (13) frente aos fungos <i>Escovopsis</i> , <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> e <i>Candida albicans</i>	26
3.14 Estudo químico do fungo <i>Aspergillus nomius</i> ASR3	27
3.15 Procedimentos gerais para as análises por espectrometria de massas	27
3.16 Análises de voláteis por GC-MS	29
3.17 Análises de microscopia eletrônica de varredura	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Micro-organismos isolados	31

4.2 Ensaaios preliminares de inibição de patógenos.....	33
4.3 Bactérias priorizadas para estudo químico.....	36
4.4 <i>Serratia marcescens</i> 3B2.....	36
4.5 Estudo biossintético das pirazinas 4 e 5 produzidas pela bactéria <i>Serratia marcescens</i> 3B2.....	64
4.6 <i>Pseudonocardia</i> sp. 1B7.....	84
4.7 <i>Burkholderia</i> sp. JB2.....	101
4.8 Análise dos jardins fúngicos por microscopia eletrônica de varredura.....	110
4.9 Aflatoxinas produzidas pelo fungo entomopatogênico <i>Aspergillus nomius</i> ASR3.....	115
5. CONCLUSÕES.....	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123

Introdução

1. Introdução

1.1 Simbiose

Durante milhares de anos de evolução os seres vivos associaram-se para garantir vantagens de sobrevivência. Essas interações são conhecidas como simbiose (NUTTALL, 1923), e, em alguns casos, são tão importantes que os organismos não conseguem viver separados, como ocorre com as algas e fungos presentes nos líquens (Fig. 1; GRUBE et al., 2009; SPRIBILLE et al., 2016).

Figura 1. Fotografia de um líquen, exemplo de simbiose entre fungos e algas.

Vários animais e plantas se associaram a micro-organismos que, geralmente, fornecem nutrientes ou proteção para seus hospedeiros (CRAWFORD e CLARDY, 2011). As algas marinhas *Pseudo-nitzschia multiseries* fornecem nutrientes para bactérias *Sulfitobacter* spp. que, em contrapartida, estimulam o crescimento das algas pela produção da auxina vegetal ácido indol-3-acético (AMIN et al., 2015). Já as vespas *Philanthus triangulum* estão associadas com bactérias do gênero *Streptomyces*, que são produtoras de antibióticos importantes para protegem as larvas desses insetos (KROISS et al., 2010). Um outro exemplo de simbiose ocorre com os besouros *Dendroctonus frontalis* que estão associados com bactérias *Streptomyces thermosacchari* produtoras do antifúngico micangimicina, que apresenta atividade frente ao fungo *Ophiostoma minus*, prejudicial aos besouros (SCOTT et al., 2008).

Assim como os humanos, alguns insetos desenvolverem a capacidade realizar agricultura. Algumas espécies de cupins, besouros e formigas são capazes de fornecer alimento e proteção para fungos simbiotes cultivados como fonte de

alimento (MUELLER et al., 2005). Um outro exemplo ocorre em colônias de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona depilis*. As larvas dessas abelhas se alimentam de um fungo que cresce no interior das células de cria e é fundamental para o desenvolvimento larval (MENEZES et al., 2015). Os fungos cultivados pelos insetos são uma fonte rica de nutrientes e podem ser atacados por micro-organismos invasores. Em contrapartida, os insetos agricultores se associaram com bactérias produtoras de antibióticos para proteger suas colônias (VISSER et al., 2012; CALDERA e CURRIE, 2012).

1.2 Formigas agricultoras e micro-organismos simbiotes

Um grupo especial de formigas (tribo Attini) cultiva fungos como fonte de alimento por aproximadamente 50 milhões de anos. Existem cerca de 300 espécies de formigas Attini que estão distribuídas principalmente nas regiões neotropicas do continente americano (SCHULTZ e BRADY, 2008; JEŠOVNIK et al., 2016). Inicialmente essas formigas forneciam uma grande variedade de material orgânico para os fungos que elas cultivavam como alimento e, com o passar do tempo, algumas espécies foram se especializando no tipo de material coletado. Formigas do gênero *Apterostigma*, por exemplo, coletam fezes de insetos para cultivar os fungos simbiotes, enquanto que as formigas *Acromyrmex* spp. e *Atta* spp. coletam material vegetal (Fig. 2; LICHT e BOOMSMA, 2010).

Figura 2. Jardim fúngico cultivado por *Atta sexdens rubropilosa*.

Os jardins fúngicos cultivados pelas formigas são ricos em nutrientes e podem ser atacados por fungos invasores, como fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Escovopsis* (PAGNOCCA et al., 2012). Fungos do gênero *Escovopsis* co-evoluíram juntamente com as formigas agricultoras e se especializaram em parasitar os jardins cultivados pelas formigas. Os fungos *Escovopsis* spp. atacam e consomem os jardins, diminuindo a sobrevivência e taxa de reprodução das formigas, podendo levar os formigueiros à morte (CURRIE et al., 1999a). Esses fungos parasitas secretam substâncias que paralisam o crescimento dos micélios dos fungos simbioss, mas as substâncias responsáveis por essa atividade ainda não foram identificadas (REYNOLDS e CURRIE, 2004).

Ao longo da evolução, as formigas se associaram com bactérias para se defenderem do ataque de fungos patogênicos (CURRIE et al., 1999b). Essas bactérias simbioss produzem antibióticos que inibem o crescimento dos parasitas e estão presentes nos jardins e nas superfícies corporais das formigas, principalmente nas formigas cuidadoras dos jardins (CURRIE et al., 2003a). A presença dessas bactérias é de grande importância para as formigas, pois os formigueiros se tornam mais susceptíveis aos ataques dos fungos parasitas quando essas bactérias são removidas das superfícies corporais das formigas (CURRIE et al., 2003b).

As formigas agricultoras, de forma geral, adaptaram seus exoesqueletos para abrigar e alimentar as bactérias simbioss (CURRIE et al., 2006). Essas associações com as bactérias são tão específicas, que as formigas são capazes de diferenciar as suas bactérias simbioss de outras bactérias não simbioss (POULSEN et al., 2011). Além de protegerem os formigueiros, as bactérias simbioss necessitam combater bactérias invasoras que potencialmente poderiam competir pelos benefícios garantidos pelas formigas. Van Arnam e colaboradores (2015) verificaram que bactérias *Pseudonocardia* spp. isoladas de formigas agricultoras *Apterostigma dentigerum* produzem antibióticos, como a 9-metoxirebecamicina (Fig. 3), que inibem o crescimento de outras bactérias do gênero *Pseudonocardia*.

Figura 3. Produtos naturais isolados de bactérias associadas a formigas agricultoras.

Existem poucos trabalhos que identificaram as substâncias produzidas pelas bactérias que vivem em associação às formigas da tribo Attini (Fig. 3). A substância dentigerumicina foi o primeiro exemplo relatado, sendo produzida pela bactéria *Pseudonocardia* sp., associada a espécie *Apterostigma dentigerum*, e inibiu de forma seletiva o crescimento do fungo *Escovopsis* (OH et al., 2009). As substâncias gerumicinas A, B e C, selvamicina e pseudonocardonas A, B e C também foram produzidas por *Pseudonocardia* sp. isolada de formigas agricultoras do gênero *Apterostigma* (SIT et al., 2015; VAN ARNAM et al., 2016; CARR et al., 2012). As formigas agricultoras também podem se associar a bactérias do gênero *Streptomyces* (SEIPKE et al., 2011). Essas bactérias produzem uma série de substâncias que podem proteger colônias das formigas cortadeiras *Acromyrmex octospinosus*, como as antimicinas A1-A4, a actinomicina D e a candidicina (SEIPKE et al., 2011; SCHOENIAN et al., 2011; HAEDER et al., 2009).

As bactérias também são importantes para proteger as formigas contra fungos entomopatogênicos. A remoção das bactérias da superfície corporal das formigas, através da aplicação de agentes antibacterianos, levou a uma maior taxa de mortalidade das formigas devido à infecção por entomopatógenos (MATTOSO et al., 2011). Fungos entomopatogênicos são encontrados próximos aos ninhos de formigas cortadeiras, mas dificilmente causam infecções, o que indica que existem sistemas de proteção muito eficazes (HUGHES et al., 2004). Diferentes fungos e leveduras não patogênicos também podem ser encontrados nos formigueiros, podendo desempenhar papel de proteção contra o ataque de parasitas (RODRIGUES et al., 2009; LITTLE e CURRIE, 2007; FREINKMAN et al., 2009).

1.3 Formigas cortadeiras

Entre 8 e 12 milhões de anos atrás, algumas espécies de formigas passaram a fornecer material vegetal fresco para seus fungos simbiotes. Essas formigas ficaram conhecidas como formigas cortadeiras (Fig. 4) e são formadas principalmente pelos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (SCHULTZ e BRADY, 2008). As formigas cortadeiras são consideradas como os maiores herbívoros das Américas e são essenciais para a manutenção do equilíbrio natural das florestas, sendo essenciais para o ciclo de matéria orgânica nos solos (WEBER, 1966). Além da importância ecológica, essas

formigas também podem coletar os vegetais cultivados pelos homens, o que pode gerar prejuízos à agricultura.

Figura 4. Formigas cortadeiras *Atta laevigata* coletando flores.

As formigas cortadeiras se alimentam do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* que elas cultivam em jardins presentes em câmaras subterrâneas de seus formigueiros (LICHT et al., 2014). Esses insetos também desenvolveram estratégias para defenderem suas colônias contra micro-organismos invasores. Uma estratégia importante é a constante limpeza de suas colônias, em que as formigas retiram sujeiras e materiais infectados por outros micro-organismos, e depositam esses materiais fora dos formigueiros ou em câmaras subterrâneas contendo o lixo (CURRIE e STUART, 2001; LITTLE et al., 2006).

As formigas possuem glândulas metapleurais desenvolvidas para produzir secreções com atividade antibióticas, que contém, por exemplo, ácido fenilacético, ácido indol-3-acético e ácido 3-hidroxidecanóico (Fig. 5; SCHILDKNECHT e KOOBL, 1971; NASCIMENTO et al., 1996; YEK et al., 2012). As secreções das glândulas metapleurais podem ser coletadas pelas patas dianteiras das formigas *Atta* spp. e, em seguida, são aplicadas especificamente nas regiões infectadas dos jardins (FERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2015). Ainda não se sabe como as formigas produzem ou adquirem as substâncias encontradas no interior das glândulas metapleurais.

Figura 5. Substâncias presentes nas glândulas metapleurais de formigas cortadeiras.

Esses mecanismos se mostraram eficientes para a eliminação de micro-organismos invasores, como o fungo *Trichoderma viride*, mas não foram eficientes para eliminar fungos do gênero *Escovopsis*, que são parasitas específicos dos jardins (CURRIE e STUART, 2001). Mesmo as formigas apresentando vários mecanismos de defesa, os fungos *Escovopsis* spp. se adaptaram a essas defesas dos formigueiros e conseguem infectar os jardins do fungo alimento das formigas (GERARDO et al., 2006).

As bactérias produtoras de antibióticos também são uma importante forma de defesa para essas formigas agricultoras. Algumas espécies de *Acromyrmex* possuem o tórax encoberto por actinobactérias. Schoenian e colaboradores (2011) mostraram que bactérias *Streptomyces* spp. produziram o antibiótico valinomicina nos corpos de *Acromyrmex echinatior* e essas substâncias inibiram o fungo *Escovopsis*. Ao contrário de formigas cortadeiras *Acromyrmex* spp., as formigas do gênero *Atta* não possuem actinobactérias na superfície de seus exoesqueletos. Existem poucos relatos na literatura de *Pseudonocardia* spp. isoladas de formigas do gênero *Atta* e, nesses trabalhos, poucas unidades formadoras de colônias bacterianas foram isoladas de cada formiga (CAFARO et al., 2011; MARSH et al., 2013). Dessa forma, a simbiose entre formigas *Atta* spp. e as bactérias protetoras *Pseudonocardia* spp. permanece pouco compreendida e os dados da literatura indicam que as formigas podem estar perdendo a simbiose com essas actinobactérias protetoras.

1.4 *Atta sexdens rubropilosa*

A formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* (Fig. 6), ou “saúva limão”, é conhecida por ser prejudicial à agricultura do estado de São Paulo e do Brasil (MARICONI, 1964; ZANETTI et al., 2004). Isso ocorre pois, durante a noite, milhares de formigas saem para coletar material vegetal, que pode ser coletado em florestas e

também em plantações. As formigas *Atta sexdens rubropilosa* utilizam compostos orgânicos para coordenar o forrageamento, como a substância 3-etil-2,5-dimetil-pirazina, que é o principal componente do feromônio de trilha (CROSS et al., 1979). Essa pirazina também está presente no feromônio de trilha das formigas cortadeiras *Atta cephalotes* (EVERSHED et al., 1983) e *Acromyrmex octospinosus* (CROSS et al., 1982) e, apesar da importância ecológica, pouco se sabe como as formigas produzem essa substância.

Existem várias pesquisas com intuito de combater as formigas cortadeiras e reduzir os danos causados nas plantações (MARICONI, 1964; ZANETTI et al., 2004). Uma forma de combater esses insetos é através de aplicações de agrotóxicos diretamente nas entradas das colônias ou pela utilização de iscas contendo agrotóxicos (ZANETTI et al., 2004; ZANETTI et al., 2014). Esses métodos não são muito eficientes, uma vez que não são capazes de eliminar a formiga rainha, que fica protegida no interior dos jardins do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*.

As formigas cortadeiras *Atta* spp. possuem glândulas metapleurais mais desenvolvidas que outras formigas agricultoras e, nessas glândulas, existem compostos que são utilizados para proteção química da colônia. Essas secreções foram eficazes para combater fungos entomopatogênicos, mas foram menos ativas contra os fungos do gênero *Escovopsis* (YEK et al., 2012; FERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2015). Mesmo não possuindo as bactérias *Pseudonocardia* spp. no exoesqueleto, e as secreções glandulares não sendo tão eficazes contra os fungos *Escovopsis* spp., as colônias de *Atta* spp. conseguem ser saudáveis e manter um grande número de indivíduos. Esses dados indicam que essas formigas cortadeiras podem utilizar mecanismos de defesas ainda não conhecidos. O estudo desses mecanismos de defesas pode servir como fonte de inspiração para o desenvolvimento de novos tratamentos antimicrobianos.

Bactérias *Burkholderia* spp. foram isoladas de jardins de *A. sexdens rubropilosa* e apresentaram elevada atividade inibitória aos fungos invasores *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e também frente a *Escovopsis weberi* (SANTOS et al., 2004). A presença de bactérias produtoras de antibióticos nos jardins pode proteger diretamente o alimento das formigas contra o ataque de micro-organismos invasores e pode explicar a ausência de linhagens de *Pseudonocardia* na superfície das formigas. Os antibióticos produzidos pelas bactérias *Burkholderia* spp., isoladas dos

jardins, ainda não foram descritos na literatura e podem desempenhar um papel crucial na proteção de colônias de *A. sexdens rubropilosa*.

Figura 6. Foto de microscopia eletrônica de varredura de formigas *Atta sexdens rubropilosa* no jardim dos fungos simbiotes.

Outros fungos e leveduras também foram isolados de ninhos de *Atta sexdens rubropilosa*, sendo que alguns deles pertencem a novas espécies, o que indica que existe uma variedade de micro-organismos associados a essas formigas (CARREIRO et al., 1997; CARREIRO et al., 2004; RODRIGUES et al., 2005). A diversidade microbiana presente nas colônias dessas formigas pode ser uma fonte promissora para a descoberta de novos produtos naturais. Dessa forma, é de grande importância realizar estudos para identificar as substâncias produzidas por esses micro-organismos e para entender as funções ecológicas dos produtos naturais produzidos por essa microbiota.

1.5 Necessidade de novos antibióticos

Existe um alarmante problema envolvendo a resistência aos antimicrobianos utilizados no combate de infecções bacterianas e fúngicas. As bactérias, por exemplo, tendem naturalmente a se tornarem resistentes, uma vez que utilizam antibióticos para defesa e comunicação no ambiente onde vivem (World Health Organization, 2014). A produção e utilização de antibióticos por micro-organismos durante milhares

de anos resultou no aparecimento de genes de resistência a antibióticos, que já existiam antes mesmo do uso de antibióticos pelos humanos (D’COSTA et al., 2011). O uso indiscriminado de antibióticos colaborou com a aceleração desse processo natural e na seleção de cepas resistentes, contribuindo assim para crise de antibióticos que estamos vivendo (KOLTER e WEZEL 2016).

A resistência bacteriana aos antibióticos vem sendo observada desde a utilização da penicilina até aos antibióticos introduzidos recentemente no mercado (HÖGBERG et al., 2010). As bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina e *Enterococcus* resistentes a vancomicina e cepas de bactérias gram-negativas como *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* estão entre as bactérias mais problemáticas no cenário mundial (VENTOLA, 2015).

Na busca de novos antibióticos, a prospecção de produtos naturais se destaca (NEWMAN e CRAGG, 2016). Os produtos naturais foram selecionados durante milhares de anos de evolução e são promissores para a descoberta e planejamento de novos fármacos. As bactérias, por exemplo, precisam se defender de outros micro-organismos e uma das formas de defesa é a produção de substâncias com atividades antibióticas (SILVER, 2008). As substâncias antibióticas produzidas por bactérias apresentam os mais diversos mecanismos de ação, como, por exemplo, a inibição da síntese de parede celular, da produção de proteínas e da produção de ácidos nucleicos (WENCEWICZ, 2016).

Nesse sentido, as bactérias simbiotes de formigas agricultoras se destacam como promissoras para a produção de antibióticos. Essas bactérias, juntamente com as substâncias antibióticas que elas produzem, foram selecionadas durante a evolução das formigas agricultoras e necessitam ser efetivas para o combate dos micro-organismos invasores.

1.6 Genome mining e desreplicação aplicados para identificação de moléculas bioativas

O crescente avanço tecnológico possibilitou o surgimento de técnicas que permitem o sequenciamento rápido de genomas. O sequenciamento por PacBio (*Pacific Biosciences*) utilizando a técnica de SMRT (*single-molecule real-time cell technology*), por exemplo, permite a geração de *reads* longos que facilitam e agilizam

a montagem dos genomas (EID et al., 2009). Junto com o crescente número de genomas sequenciados, novas ferramentas para análise das informações genéticas estão sendo criadas e aperfeiçoadas. A plataforma antiSMASH (*antibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell*) se destaca na área de produtos naturais, uma vez que identifica *clusters* de genes biossintéticos presentes nos genomas que estão sendo estudados e compara os *clusters* gênicos encontrados com os descritos na literatura (BLIN et al., 2013). A plataforma RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) também pode ser utilizada para identificar os genes e suas funções enzimáticas descritas (AZIZ et al., 2008). A união dos dados gerados pelo antiSMASH e RAST permite analisar detalhadamente os genes que codificam as enzimas presentes nos clusters biossintéticos encontrados.

As informações codificadas no genoma podem ser estudadas mais facilmente e estão sendo incorporadas cada vez mais nos trabalhos envolvendo produtos naturais (SIT et al., 2015; DUNCAN et al., 2015; DEJONG et al., 2016). As propostas de biossíntese geradas pelas análises dos genomas podem ser comprovadas, por exemplo, pela inativação de genes responsáveis pela produção de enzimas envolvidas com a biossíntese das substâncias que estão sendo estudadas. Uma outra forma de estudar a biossíntese proposta pelas análises dos genomas se dá pela utilização de precursores biossintéticos marcados (VIZCAINO e CRAWFORD, 2015). Os precursores mais utilizados são os isotopicamente marcados, como glicose, acetato e aminoácidos marcados com ^{13}C ou deutério (LOPES et al., 2013; MAHMUD, 2007).

A espectrometria de massas vem sendo utilizada como uma ferramenta valiosa de desreplicação. Essa técnica permite identificar de forma rápida os produtos naturais conhecidos e os ainda não descritos que estão codificados em genes presentes nos genomas bacterianos. Johnston e colaboradores (2015) utilizaram LC-MS/MS para identificar novos peptídeos não ribossomais e policetídeos que foram preditos a partir de análises de genomas bacterianos. Um novo lantipeptídeo também foi descoberto utilizando a união de espectrometria de massas e *genome mining* (MOHIMANI et al., 2014). Dessa forma, pode-se notar que a combinação de *genome mining* e espectrometria de massas é uma ferramenta útil para a desreplicação de extratos bacterianos e para a descoberta de novos produtos naturais.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Estudar os produtos naturais produzidos por micro-organismos associados aos ninhos da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar bactérias de colônias da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*;
- Selecionar as bactérias mais promissoras para o isolamento de substâncias com atividade antimicrobiana;
- Identificar as substâncias ativas frente a fungos do gênero *Escovopsis*;
- Verificar se os micro-organismos isolados produzem substâncias envolvidas com a ecologia química das formigas;
- Sequenciar os genomas das bactérias *Serratia marcescens* 3B2 e *Pseudonocardia* sp. 1B7 e estudar o potencial biossintético;
- Estudar a biossíntese de pirazinas produzidas pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2.

Material e métodos

3. Material e métodos

3.1 Meios de cultivos, reagentes e solventes

Meios de cultivo: ISP-2 (0,4% de glicose, 1% de extrato de malte e 0,4% de extrato de levedura) suplementado ou não com 2% de ágar. Ágar quitina (0,4% quitina; 0,07% K_2HPO_4 ; 0,03% KH_2PO_4 ; 0,0001% $ZnSO_4$; 0,0001% $MnCl_2$ e 2% ágar). Meio PDA (*Potato dextrose agar*, HiMedia). Meio M9 (20 mL de M9 5X, 2mL de glicose 20%, 0,2 mL de $MgSO_4$ 1M, 10 μ L de $CaCl_2$ 1M e adicionar água deionizada até atingir o volume final de 100 mL) suplementado ou não com 2% de ágar. A solução salina M9 5X continha :3,39% de Na_2HPO_4 ; 1,5% KH_2PO_4 ; 0,25% NaCl; 0,5% NH_4Cl em H_2O MilliQ.

Reagentes: glicose (Synth), extrato de malte (Fluka), extrato de levedura (HiMedia), ágar (KASVI), $MgSO_4$ (Sigma-Aldrich), $CaCl_2$ (Synth), Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich), KH_2PO_4 (Vetec), NaCl (Synth), NH_4Cl (Synty), cicloheximida (Fluka), nistatina (Sigma-Aldrich), L-treonina (Sigma-Aldrich), L-alanina (Sigma-Aldrich), L-serina (Sigma-Aldrich), L-valina (Sigma-Aldrich), L-[U- ^{13}C , ^{15}N]-treonina (Sigma-Aldrich), 3- ^{13}C -L-alanina (Sigma-Aldrich), ^{15}N -L-alanina (Sigma-Aldrich) e U- ^{13}C -acetato de sódio (Sigma-Aldrich).

Solventes: metanol grau HPLC (Merck), acetonitrila grau HPLC (Merck), acetato de etila PA (Synth), acetato de etila grau HPLC (Tedia e Merck), hexano grau HPLC (Burdick & Jackson), diclorometano grau HPLC (Merck), isopropanol grau HPLC (Merck), acetona grau HPLC (Merck), DMSO (Sigma-Aldrich ou Mallinckrodt), clorofórmio e metanol deuterados (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.).

3.2 Equipamentos, vidrarias e outros materiais

Equipamentos: HPLC analítico SHIMADZU modelo Nexera XR acoplado com DGU-20A_{3R}, CBM-20A, SPD-M20A, CTO-20A e ELSD-LTII. HPLC semi-preparativo Agilent 1100 Series. LC-DAD Agilent Technologies 1200 Series acoplado com o detector de massas Agilent 6130 Quadrupole Technologies. UPLC Agilent 1290 Infinity acoplado com o espectrômetro de massas ESI-Q-TOF Agilent 6530. Espectrômetro de massas micrOTOF Q II - ESI-TOF Mass Spectrometer, Bruker Daltonics. GC-MS Shimadzu GC-2010 Plus. Fibra de SPME (polidimetilsiloxano) e

Holder da Sigma-Aldrich. Purificador de água Milli-Q Millipore. Balanças analíticas Gehaka BG 400 e Mettler Toledo Excellence. Shaker Innova® 44 - New Brunswick Scientific. Rotaevaporador Büchi RII e sistema resfriador de água Büchi Recirculating Chiller B-740. Câmara de extração em fase sólida Supelco Visiprep™ DL. Espectrômetros de RMN: Bruker® DRX-500 MHz, Bruker® DRX-400 MHz e Varian VNMRS 600 MHz.

Vidrarias e outros materiais: tubos de RMN Norell Standard Series 5mm NMR tubes (Sigma-Aldrich), Erlenmeyers de 250 mL e 500 mL (Pyrex); kitassatos (Pyrex); béqueres (Pyrex e Vidrolabor); Filtros estéreis de 0,2 µm; cartuchos de extração em fase sólida Discovery® DSC-18 SPE e Fisher Brand SPE.

3.3 Coleta e isolamento dos micro-organismos

As bactérias foram isoladas de três colônias de *Atta sexdens rubropilosa* coletadas no campus da USP de Ribeirão Preto e mantidas no laboratório do Dr. Fábio Santos do Nascimento, localizado no Departamento de Biologia da FFCLRP-USP. A colônia 1 (C sexdens 1) iniciou-se com uma rainha fecundada, coletada logo após o voo nupcial. As colônias 2 (LK141129-01) e 3 (LK141127-01) foram coletadas no campus da USP de Ribeirão Preto e tinham cerca de 2 a 3 meses de idade no momento das coletas. Foram obtidas as seguintes autorizações de coleta e transporte de material biológico: SISBIO - autorização de coleta e transporte de material de recursos genéticos: nº 46555-5; CNPq - autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético: nº 010936/2014-9; COTEC - autorização do Instituto Florestal, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo: COTEC nº 327/2015.

Em geral, as bactérias foram isoladas empregando a metodologia adaptada de Poulsen e Currie (2010) e Marsh e colaboradores (2013). As formigas ou pequenos pedaços de jardim (aproximadamente 0,5 cm³) foram assepticamente coletados e transferidos para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL contendo 750 µL de solução aquosa estéril de NaCl (0,9%) ou 1 mL de água Milli-Q. Os tubos foram agitados durante 30-60s e 100 µL destas suspensões foram inoculados em placas de Petri contendo aproximadamente 25 mL de ágar ISP-2 e ágar quitina, ambos suplementados com os antifúngicos nistatina (0,04 g/L) e cicloheximida (0,05 g/L). As

placas foram incubadas a 30 °C e as colônias bacterianas foram coletadas e isoladas em placas de Petri contendo meio de ágar ISP-2.

As bactérias também foram isoladas de formigas esterilizadas superficialmente. Para isso, adaptamos uma metodologia já utilizada por nosso grupo para isolar bactérias do interior de larvas das abelhas sem ferrão *Scaptotrigona depilis* (PALUDO et al., 2016). De uma forma geral, formigas da colônia 2 foram coletadas com pinças estéreis e mantidas durante 2 minutos em etanol 70%, seguido por imersão em hipoclorito de sódio 5% durante 1 minuto, em seguida, foram mantidas em etanol 70% durante 1 minuto e, por fim, foram lavadas com água estéril. Após a esterilização superficial, as formigas foram divididas em cabeça, tórax e abdômen e essas partes foram trituradas e transferidas para placas contendo meio ágar ISP-2 suplementado com antifúngicos nistatina (0,04 g/L) e ciclohexamida (0,05 g/L). Após crescimento bacteriano, as colônias foram isoladas em outras placas contendo meio de ágar ISP-2. Além disso, as glândulas de veneno foram coletadas de três abdomens de formigas esterilizadas superficialmente e foram transferidas para placas de petri contendo o meio ágar ISP-2.

O fungo ASR3 foi isolado a partir de uma rainha de *Atta sexdens rubropilosa* que foi coletada após o vôo nupcial para formar uma nova colônia em condições laboratoriais, mas morreu e seu corpo foi infestado por um fungo verde. Uma pequena quantidade de esporos foi coletada do corpo da formiga e o fungo foi isolado em placas de Petri contendo o meio PDA, que foram mantidas em estufa a 30 °C.

3.4 Preservação e identificação dos micro-organismos isolados

Os micro-organismos isolados foram estocados de acordo com técnicas empregadas no LQMo, para mantê-los viáveis o maior tempo possível. De maneira geral, células bacterianas e esporos dos fungos foram transferidos para criotubos contendo os meios ISP-2, para bactérias, e PDB, para fungos, ambos suplementados com 20% de glicerol e foram preservados em freezer a -80 °C. Os fungos também foram preservados em óleo mineral à temperatura ambiente de aproximadamente 24 °C. Para isso, foram cultivados em frascos de penicilina contendo o meio ágar PDA e, após o crescimento desses micro-organismos, foi adicionado óleo mineral estéril nos frascos, que foram lacrados e estocados.

Os micro-organismos foram identificados pelo sequenciamento de regiões do RNA ribossomal. Os primers universais 27F e 1492R foram utilizados para amplificar as regiões do 16S rRNA bacteriano e os primers ITS1 e ITS4 foram utilizados para amplificar a região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) fúngico. Os produtos das reações de PCR foram sequenciados por Sanger e as sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas no GenBank.

3.5 Ensaios preliminares de antagonismo

Os ensaios de antagonismo entre as bactérias isoladas e micro-organismos patogênicos foram realizados para selecionar as bactérias mais promissoras para o isolamento de antibióticos. Essa metodologia foi realizada em três etapas e foram utilizados os patógenos para humanos *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Staphylococcus aureus* ATCC 3538 e *Candida albicans* ATCC 10231 e dos jardins fúngicos *Escovopsis* sp. ST041014-01.

Primeiramente, as bactérias isoladas foram reativadas em meio ISP-2 líquido. Para isso, 150 µL dos estoques em glicerol desses micro-organismos foram transferidos para tubos Falcon de 15 mL contendo 5 mL de meio ISP-2. Os tubos contendo as bactérias foram mantidos em incubadora a 200 rpm e 30 °C por 48 horas, enquanto que os tubos contendo as actinobactérias foram agitados por 96 horas. Após essa etapa, 100 µL do caldo do cultivo foram transferidos para placas contendo o meio ágar ISP-2. As placas contendo as bactérias foram mantidas em estufa a 30 °C por sete dias e as placas contendo as actinobactérias foram mantidas por 14 dias.

As bactérias patogênicas foram reativadas em meio Mueller Hinton líquido por 24 horas a 37 °C. Em seguida, as bactérias foram repicadas em meio ágar Mueller Hinton e as placas foram mantidas em estufa por 24 horas. Após essa etapa, uma pequena quantidade das bactérias patogênicas foi suspendida em tubos de ensaio de vidro contendo 10 mL da solução salina estéril de NaCl 0,9 % até atingir a escala de 0,5 de Mc Farland. Por fim, um mililitro dessa suspensão de células foi semeado em placas de Petri grandes (140 mm) contendo o meio ágar ISP-2, que foram utilizadas para realizar os ensaios.

O fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 foi cultivado em placas de Petri contendo o meio PDA por um período de 14 dias em estufa a 30 °C. Em seguida, os esporos foram coletados e suspensos em água destilada estéril até atingir a concentração

de $0,5 \times 10^6$, de acordo com as contagens realizadas em câmara de Neubauer. Após essa etapa, 0,3 mL da suspensão de esporos de *Escovopsis* sp. foram transferidos para placas de Petri médias (80 mm) contendo aproximadamente 25 mL do meio ágar ISP-2. A cepa do fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 foi isolada de uma colônia de *Atta sexdens rubropilosa* coletada no Panamá e foi fornecida pelo professor Dr. Cameron Currie, da Universidade de Wisconsin - Madison, EUA.

Após essas etapas, discos de ágar de aproximadamente 6 mm de diâmetro foram retirados das placas contendo os cultivos das bactérias isoladas e foram transferidos de maneira uniforme nas placas de Petri contendo os micro-organismos patogênicos. Os fármacos antibióticos estreptomicina 300 µg, anfotericina B 100 µg e miconazol 50 µg impregnados em discos de papel foram utilizados como controles positivos. Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos após os crescimentos dos patógenos utilizados.

3.6 Ensaios antimicrobianos entre *Pseudonocardia* spp. e *Escovopsis* spp.

Os ensaios de inibição de crescimento foram realizados em pares e iniciaram com a inoculação de 5 µL dos estoques de esporos da bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 em placas de Petri de 150 mm contendo 25 mL de meio de ágar ISP-2. As placas foram incubadas a 30 °C durante 7, 14 e 21 dias. Após esses períodos, 5 µL dos estoques de esporos de *Escovopsis* sp. ST041014-1 foram inoculados a 30 mm de distância a partir do centro das colônias de *Pseudonocardia*. As placas foram incubadas nas mesmas condições durante três dias adicionais e os diâmetros das colônias de *Escovopsis* sp. foram monitorados e comparados com os controles. Os ensaios foram realizados em triplicata e basearam-se na metodologia de Sit e colaboradores (2015).

Os ensaios de inibição também foram realizados com sete linhagens adicionais de *Pseudonocardia* spp., que foram isoladas das colônias “2” e “3” de *Atta sexdens rubropilosa* pela pós-doutoranda Weilan G. P. de Melo (Proc. FAPESP 2015/01001-6), que realiza suas pesquisas no âmbito do projeto temático ICBG FAPESP/FIC-NIH (2013/50954-0). As bactérias foram pré-cultivadas individualmente nas extremidades dos poços de placas de 12 poços, contendo 3 mL de ágar ISP-2 em cada poço, durante 21 dias a 30 °C. Em seguida, 1,5 µL dos estoques dos esporos de *Escovopsis* sp. ST041014-1 foram inoculados no meio de cada um dos poços. As placas foram

mantidas a 30 °C e o crescimento fúngico foi monitorado. Este ensaio foi realizado em duplicata e os meios de cultivos de cada poço foram extraídos para a análise química. Para isso, 10 plugues foram recolhidos de cada poço e extraídos com 3 mL de acetato de etila. O solvente orgânico foi recolhido e evaporado em SeedVac. Os extratos foram dissolvidos com 200 µL de metanol e 4 µL foram injetados em UPLC Agilent 1290 Infinity acoplado com espectrômetro de massas Agilent 6530 ESI-Q-TOF, que foi operado no modo positivo.

3.7 Cultivos da bactéria *Serratia marcescens* 3B2

A bactéria foi primeiramente reativada inoculando 100 µL dos estoques em tubos falcon de 15 mL contendo 5 mL de meio líquido M9 ou ISP-2, e os tubos foram mantidos em shaker a 200 rpm e 30 °C durante 24 horas. Em seguida, foi adicionado glicerol estéril nos meios de cultivo até atingir a concentração de 20% e aliquotas de aproximadamente 1 mL foram transferidas para criotubos que foram mantidos a -80 °C. Dessa forma, foram obtidos maior número de estoques contendo quantidade similar de células bacterianas.

Alíquotas de 100 µL desses estoques foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar ISP2 ou M9. Esses meios também foram suplementados com outras substâncias, como os aminoácidos L-treonina, L-alanina, L-serina e L-valina, em concentrações que variaram entre 0,15% - 2% conforme especificado nos resultados (item 4). Os aminoácidos e outros compostos adicionados nesses meios de cultivo foram solubilizados em água Milli-Q e as soluções foram esterilizadas por filtração, em filtros estéreis de 0,2 µm, antes de serem adicionados nos meios.

3.8 Isolamento e identificação de substâncias produzidas pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2

A bactéria *Serratia marcescens* 3B2 foi cultivada em 12 placas de Petri grandes (150 mm) contendo aproximadamente 100 mL do meio ágar ISP-2 em cada placa. As placas foram mantidas em estufa durante 14 dias a 30 °C. Após esse período, o ágar contendo a cultura bacteriana foi coletado e extraído com 1,2 L de acetato de etila. O solvente foi evaporado em rotaevaporador a aproximadamente 40 °C, fornecendo 807,84 mg de extrato bruto. O extrato foi fracionado em 66 frações em uma coluna

(59 X 4,5 cm) preenchida com a resina Sephadex LH 20 e eluída com metanol. As frações foram analisadas em cromatografia de camada delgada de fase normal, composta por misturas de hexano e acetato de etila, e foram reunidas em 9 frações (Fig. 7). A fração 3B2F8L (substância **7**; 7,78 mg) apresentou cristais que foram lavados com metanol gelado e, em seguida, analisados por RMN de ^1H e HR-ESI-MS.

Figura 7. Isolamento das substâncias produzidas pela bactéria *S. marcescens* 3B2.
* Substâncias identificadas por RMN e HR-ESI-MS.

A fração 2 (3B2F2L; 181,84 mg) apresentou a formação de precipitado branco que foi lavado com metanol gelado. Essa fração foi fracionada utilizando cartucho de SPE Strata contendo 2 g da fase estacionária C_{18} (55 μm , 70A). Para isso, foi adicionado 1 mL de metanol na amostra e, após a dissolução da mesma, foram adicionados 10 mL de água e essa solução foi eluída no cartucho. Em seguida, o cartucho foi eluído por cinco vezes com 10 mL de misturas de metanol e água com polaridade decrescente, iniciando com 100% de água e aumentando a quantidade de metanol em 20% até atingir 100% de metanol. As frações obtidas foram secas e a fração 3B2F2LD (substância **10**; 65,5 mg) foi analisada por RMN e HR-ESI-MS.

Novos cultivos foram realizados com o objetivo de isolar compostos voláteis. A bactéria *S. marcescens* 3B2 foi cultivada em 20 placas de 150 mm contendo 100 mL de meio ágar ISP-2 durante 14 dias a 30 °C. Em seguida, o ágar foi fragmentado e extraído com diclorometano. O solvente foi filtrado e evaporado em rotaevaporador rendendo 1,1083 g de extrato bruto, que foi fracionado utilizando cartuchos de fase

normal Fisher Brand SPE contendo 2 g de sílica. O extrato foi solubilizado em hexano e aplicado nos cartuchos que foram eluídos com 20 mL de 100% de hexano, 80% de hexano e 20% de acetato de etila, 60% de hexano e 40% de acetato de etila, 40% de hexano e 60% de acetato de etila, 20% de hexano e 80% de acetato de etila, 100% de acetato de etila, 50% de acetato de etila e 50% de metanol, e, por fim, 100% de metanol. A fração em 80% de hexano e 20% de acetato de etila (198,7 mg) foi fracionada em HPLC semi-preparativo utilizando a coluna Phenomenex LUNA 5µm Silica, 100 Å, 250 x 10 mm, e fase móvel isocrática composta pela mistura de 98% hexano e 2% de isopropanol. Foram isolados 3,8 mg da substância **4**, que foi analisada por RMN de ^1H e espectrometria de massas de alta resolução.

3.9 Experimentos de marcação isotópica para o estudo da biossíntese de voláteis produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2

Os experimentos de marcação isotópica foram realizados em frascos de 10 mL de GC-MS contendo 2 mL do meio ágar M9 suplementado com 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina. Os precursores isotopicamente marcados foram dissolvidos em água Milli-Q e esterilizados por filtração em filtros estéreis de 0,2 µm. Como controle, a bactéria foi cultivada no meio contendo a mesma quantidade de precursores não marcados. Foram utilizados os precursores isotopicamente marcados: 1,5% de L-[U- ^{13}C , ^{15}N]-treonina, 0,5% de 3- ^{13}C -L-alanina, 0,5% de ^{15}N -L-alanina e 0,15% de U- ^{13}C -acetato de sódio. Alíquotas de 100 µL dos estoques de *S. marcescens* 3B2 (20% de glicerol em M9 acondicionado em freezer) foram inoculados em cada frasco, que foram lacrados e mantidos em estufa durante três dias a 30 °C. Em seguida, os frascos foram aquecidos em banho maria a 40 °C, os voláteis foram extraídos utilizando fibra de polidimetilsiloxano exposta no interior dos frascos durante 60 minutos e os voláteis foram analisados em GC-MS (item 3.16). Por fim, os meios de cultivo foram extraídos com 2 mL diclorometano, os extratos foram secos, ressuspensos em 200 µL de metanol e analisados por LC-orbitrap (item 3.15).

3.10 Cultivo em escala ampliada de *Pseudonocardia* sp. 1B7 e isolamento das substâncias ativas

A bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 (100 µL do estoque de esporos) foi inicialmente cultivada em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio líquido ISP-2, que foram agitados em Shaker a 200 rpm durante 14 dias a 30 °C. Subsequentemente, alíquotas de 1 mL dessa cultura foram espalhadas sobre 29 placas de Petri de 150x15 mm contendo 100 mL de ágar ISP-2. As placas foram incubadas a 30 °C durante 21 dias, e o meio de cultivo foi extraído com acetato de etila durante 24 horas. O extrato foi seco a vácuo e foi fracionado utilizando HPLC semi-preparativo e uma coluna Phenomenex Luna 5 µm C₁₈, 250 X 10 mm, eluída com um gradiente de acetonitrila e água, ambos com 0,1% de ácido fórmico. O método de HPLC iniciou-se com fase isocrática de 10% de CH₃CN durante 5 min, seguido por gradiente linear de 10-65% de CH₃CN durante 5-35 min, de 35 a 38 min foi aplicado gradiente linear de 65-100% de CH₃CN, que foi seguido pela fase isocrática 100% de CH₃CN durante 38 a 40 min. Por fim, a coluna foi recondicionada utilizando gradiente linear de 100% a 10% de CH₃CN durante 40-42 min e pela fase isocrática de 10% de CH₃CN durante 42-50 min. As frações foram coletadas e reunidas em cinco frações de acordo com o perfil químico. Em seguida, essas frações foram secas e submetidas ao ensaio antifúngico em meio líquido frente ao fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1. A fração 3 foi ativa e os espectros de LC-HR-MS e RMN de ¹H dessa fração indicaram que o composto principal era o ácido indol-3-acético (IAA; **12**). O rendimento de IAA foi de aproximadamente 2,6 mg/L de ágar ISP-2.

O ensaio antifúngico líquido foi adaptado de Sit e colaboradores (2015) e foi realizado para guiar o isolamento do composto ativo. Para isso, foram utilizadas placas de 96 poços contendo 180 µL do meio PDB em cada poço e esporos do fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 na concentração final de 3 x 10⁵ esporos/mL. As frações do extrato bruto em acetato de etila da bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 foram avaliadas nas concentrações finais de 100, 50 e 25 µg/mL. O agente antifúngico cicloheximida foi utilizado como controle positivo. As placas foram mantidas a 30 °C durante três dias e, em seguida, 20 µL do revelador alamarBlue (Thermo Fisher) foram adicionados em cada poço. As placas foram incubadas *overnight* e a viabilidade das células foi monitorada pela alteração da cor do revelador nos testes e controles.

3.11 Cultivo da bactéria *Burkholderia* sp. JB2 e identificação da substância ativa

A bactéria *Burkholderia* sp. JB2 foi cultivada por 14 dias em 50 placas de Petri grandes (150 mm) contendo 100 mL de meio ágar ISP-2. As placas foram mantidas em estufa a 30 °C e, em seguida, os meios de cultivo dessas placas foram fragmentados e extraídos com acetato de etila. O extrato foi levado ao rotaevaporador a aproximadamente 40 °C, onde ocorreu a formação de um precipitado vermelho durante a evaporação do solvente. O precipitado foi lavado com hexano, acetato de etila, acetonitrila e metanol, todos mantidos previamente no congelador. Dessa forma, foram obtidos 17,94 mg de precipitado. A substância precipitada (**14**) foi analisada por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas de alta resolução. Em seguida, esta substância foi cristalizada em clorofórmio e a estrutura cristalina foi identificada por meio de difração de raios-X pelo Dr. Timothy Ramadhar, pós-doutorando do laboratório do professor Dr. Jon Clardy da Harvard Medical School.

Um novo cultivo foi realizado utilizando um tempo menor de incubação e o extrato foi submetido ao fracionamento monitorado pela atividade para isolar as substâncias com atividades antifúngicas. Para isso, a bactéria *Burkholderia* sp. JB2 foi reativada inoculando 100 µL do estoque em tubos Falcon de 15 mL contendo 5 mL de ISP-2. Os tubos foram agitados a 200 rpm durante 24 horas a 30 °C. Uma alíquota de 200 µL desta cultura foi inoculada em placas de Petri de 150 mm de contendo 100 mL de ágar ISP-2. As placas foram incubadas a 30 °C durante sete dias, e os meios de cultura foram fragmentados e extraídos com acetato de etila. O extrato bruto (144,3 mg) foi primeiramente dissolvido em 2 mL de uma solução aquosa contendo 25% de metanol e foi fracionado em cinco frações utilizando um cartucho Phenomenex de fase reversa de contendo 1 g de resina C18. Para isso, o extrato bruto já dissolvido em 25% de metanol foi adicionado ao cartucho e eluído por cinco vezes com 10 mL de gradiente constituído por misturas de metanol e água. O gradiente iniciou com 25% de metanol e a quantidade de solvente orgânico foi aumentando em 25% até atingir 100%. Por fim, o cartucho foi lavado com 10 mL de acetona. Dessa forma, cinco frações foram recolhidas: JB2-EtOAc 1 (27,9mg), JB2-EtOAc 2 (18,6 mg), JB2-EtOAc 3 (8,1 mg), JB2-EtOAc 4 (43,2 mg) e JB2-EtOAc 5 (3,3 mg).

Para avaliação da atividade antifúngica, as frações foram diluídas em metanol a 10 mg/mL e 5 µL de cada uma dessas soluções foram aplicados em uma placa de 150 mm contendo ágar ISP-2 misturados com esporos do fungo *Escovopsis* sp.

ST041014-1. Além disso, estas frações foram diluídas em metanol até a concentração final de 0,1 mg/mL e analisadas por LC-MS (item 3.15).

3.12 Sequenciamento dos genomas das bactérias *Serratia marcescens* 3B2 e *Pseudonocardia* sp. 1B7

A bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 (100 µL do estoque de esporos em glicerol) foi inicialmente cultivada em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL do meio líquido ISP-2, que foram agitados em Shaker a 200 rpm durante 14 dias a 30 °C. A bactéria *Serratia marcescens* sp. 3B2 (100 µL do estoque em glicerol) foi cultivada em Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio LB durante aproximadamente 15 horas a 30 °C e 200 rpm. Após esses períodos, as células bacterianas foram centrifugadas e extraídas utilizando a metodologia empregada por Sit e colaboradores (2015). Os genomas foram sequenciados utilizando a tecnologia PacBio *single-molecule real-time cell technology* (SMRT; EID et al., 2009) e os genomas foram organizados utilizando o *Hierarchical Genome Assembly Process* (CHIN et al., 2013). Os genomas sequenciados foram submetidos à plataforma online antiSMASH (BLIN et al., 2013; <http://antismash.secondarymetabolites.org>), a fim de identificar os *clusters* de genes biossintéticos de produtos naturais, e RAST (AZIZ et al., 2008), para anotar os genes conhecidos. O programa Geneious 8.1.6 foi utilizado para analisar os genomas e os dados gerados pelo antiSMASH e RAST. Os sequenciamentos, montagens e análises dos genomas foram realizados com o auxílio do Dr. Antonio Ruzzini, pós-doutorando do laboratório do professor Dr. Jon Clardy da Harvard Medical School.

3.13 Ensaio de inibição das substâncias ácido fenilacético (11), ácido indol-3-acético (12) e tropolone (13) frente aos fungos *Escovopsis*, *Leucoagaricus gongylophorus* e *Candida albicans*

A inibição do crescimento dos fungos *Escovopsis* sp. ST041014-1, *Escovopsis* sp. WM151001-4, *Escovopsis* sp. LK150120-01, *Escovopsis* sp. AB150620-3, *Escovopsis* sp. CC150618-02, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Leucoagaricus gongylophorus* CC30329-01 foi avaliada utilizando as substâncias ácido fenilacético (11), ácido indol-3-acético (12) e tropolone (13). Primeiramente, essas substâncias

foram dissolvidas em DMSO e foram misturadas com o meio PDA, a aproximadamente 55 °C, até atingir as concentrações finais de 100,00; 50,00; 25,00; 12,50; 6,25; 3,12 e 1,56 µg/mL. Em seguida, 3 mL do meio contendo essas substâncias foram adicionados em cada poço das placas de cultivo de 12 poços. Finalmente, 1,5 µL de suspensão aquosa contendo esporos ou células de micélio dos fungos *Escovopsis* spp., ou 1,5 µL de suspensão aquosa contendo células da levedura *Candida albicans*, ou um fragmento de aproximadamente 0,8 mm de diâmetro de ágar PDA contendo micélio de *Leucoagaricus gongylophorus* foram inoculados no centro de cada poço. As placas foram incubadas a 30 °C e o crescimento dos fungos foi monitorado e comparado com os controles contendo apenas DMSO no meio. Os resultados foram registrados através de fotografias.

3.14 Estudo químico do fungo *Aspergillus nomius* ASR3

Esporos do fungo *Aspergillus nomius* ASR3 foram reativados em placas de Petri de 80 mm contendo 25 mL do meio PDA. As placas de cultivo e controle do meio PDA foram mantidas em estufa por 14 dias a 30 °C. Após esse período, o meio de cultivo de cada placa foi coletado e extraído com 60 mL de acetato de etila. Por fim, os solventes foram filtrados e evaporados em rotaevaporador fornecendo os extratos brutos em acetato de etila. Os extratos foram diluídos na mistura de 1:1 de metanol e água até atingir a concentração de 100 µg/mL e foram analisados por infusão direta em espectrômetro de massas.

3.15 Procedimentos gerais para as análises por espectrometria de massas

Os extratos foram diluídos em metanol ou em misturas de metanol e água, e foram filtrados utilizando filtro de membrana de PVDF (*Polyvinylidene fluoride*) de 0,2 µm. As análises em baixa resolução foram realizadas no equipamento LC-DAD Agilent Technologies 1200 Series acoplado com o detector de massas Agilent 6130 Quadrupole Technologies. O gradiente de acetonitrila (CH₃CN) e H₂O contendo ambos 0,1% de ácido fórmico foi utilizado com o de fluxo de 0,7 mL/min em uma coluna Phenomenex Luna 5 µm C18(2) 100 X 4,6 mm. O volume de injeção foi de 10 µL e o método cromatográfico começou com 10% de CH₃CN durante 1 min, seguido

por um gradiente linear até atingir 100% de CH₃CN em 18 minutos e foi mantido durante 5 minutos a 100% de CH₃CN.

As amostras previamente analisadas por LC-MS em baixa resolução foram adicionalmente diluídas numa razão de 1:10 com metanol grau de pureza LC-MS e foram analisadas em espectrômetro de massas de alta resolução. As análises de LC-MS em alta resolução foram realizadas por injeção de 4 µL das amostras no UPLC Agilent 1290 Infinity acoplado com o espectrômetro de massas ESI-Q-TOF Agilent 6530, que foi operado no modo positivo. Foi utilizado um gradiente de CH₃CN e H₂O contendo ambos 0,1% de ácido fórmico, o fluxo de 0,3 mL/min em uma coluna Phenomenex LC Kinetex 2,6 µm EVO C18 100 X 2,1 mm. O método cromatográfico começou com 10% de CH₃CN durante 1 min, seguido por um gradiente linear até atingir 100% de CH₃CN em 15 min e foi mantido durante 1,5 minutos a 100% de CH₃CN. As análises de MS/MS foram realizadas utilizando nitrogênio como gás de colisão e energias colisionais de 10, 20 e 30 eV.

As análises de LC-MS dos extratos obtidos nos experimentos de marcação isotópica com a bactéria *Serratia marcescens* 3B2 (item 3.9) foram analisados em UHPLC Accela (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA) acoplado com o espectrômetro de massas ExactiveTM Plus Orbitrap (Thermo Scientific). A coluna Kinetex C₁₈ (150 x 2.10 mm, 1,7 µm) foi eluída com um fluxo de 0,4 mL/min de fase móvel composta por misturas de acetonitrila (CH₃CN) e água, ambos contendo 0.1% de ácido fórmico. O método iniciou com 5% de CH₃CN e atingiu 50% de CH₃CN em 15 min, permanecendo em fase isocrática de 50% de CH₃CN até 20 min, seguido pelo gradiente de 50% de CH₃CN em 20 minutos até 100% de CH₃CN em 30 min, permanecendo em 100% até 35 min, em seguida, o gradiente retornou para 5% de CH₃CN de 35-40 min. As amostras foram analisadas em modo positivo, *mass range* de 100 a 1500 Da, temperatura do capilar de 320 °C e voltagem do spray de 3.6 kV.

A substância **4** e os extratos brutos do fungo *A. nomius* ASR3 foram analisados por infusão direta no espectrômetro de massas “microTOF Q II -ESI-TOF Mass Spectrometer” (Bruker Daltonics). As análises foram realizadas no modo positivo e os espectros de ESI-MS/MS foram obtidos por meio da colisão dos íons selecionados com o gás N₂. A solução de ácido trifluoracético sodiado (TFA-Na) a 10 mg.mL⁻¹ foi utilizada para calibração interna, as energias de colisão variaram entre 5 a 50 eV, a voltagem do capilar foi de 3,5 kV e a temperatura de secagem foi de 180 °C.

3.16 Análises de voláteis por GC-MS

As substâncias voláteis produzidas pelas bactérias selecionadas para as análises por GC-MS foram adsorvidas utilizando fibra de SPME de polidimetilsiloxano (100 μm) exposta nas placas de cultivo por 60 minutos. Os voláteis presentes nos abdomens e glândulas de veneno das formigas também foram analisados. Para isso, abdômens de cinco formigas *Atta sexdens rubropilosa* foram dissecados, as glândulas de veneno foram coletadas e transferidas para um vial de 1,5 mL contendo insert de 250 μL . Os abdomens de cinco formigas também foram transferidos para um vial de 1,5 mL contendo insert de 250 μL e foram, adicionalmente, triturados utilizando uma pipeta de 200 μL . Os vials foram aquecidos em banho maria a 60 °C e os voláteis foram extraídos utilizando fibra de polidimetilsiloxano (100 μm) exposta no interior dos inserts durante 60 minutos.

As análises dos voláteis foram realizadas utilizando GC-MS da Shimadzu, modelo GC-2010 Plus, e a coluna DB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 μm). As análises foram realizadas no modo de injeção Splitless 1 min, temperatura de injeção de 250 °C, temperatura inicial da coluna de 50 °C, *hold time* de 5 min, aquecimento de 3 °C por min até 180 °C, e, por fim, a temperatura foi mantida a 180 °C durante 10 min. Foi utilizado o modo *scan*, o hélio como gás de arraste, faixa de detecção de *m/z* 40-500, temperatura da interface de 260 °C e temperatura da fonte de ionização de 250 °C. As estruturas químicas das substâncias voláteis foram propostas utilizando os bancos de dados Wiley 7, NIST 08, NIST 08s e FFNSC 1.3.

3.17 Análises de microscopia eletrônica de varredura

As análises de microscopia eletrônica de varredura, ou MEV, foram realizadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura EVO 50 Zeiss, Cambridge (UK), presente no Departamento de Química da FFCLRP – USP. As amostras foram previamente fixadas por um banho de plasma de ouro de aproximadamente 250 segundos em alto vácuo e em atmosfera de argônio utilizando metalizador SCD 050 Sputter Coater Bal-Tec, Fürtentum Liechtenstein. As formigas rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* foram coletadas durante a revoada no campus da USP de Ribeirão Preto e foram mantidas em tubos falcon estéreis até a liberação dos fragmentos de jardins carregados por elas, que foram coletados e analisados por MEV.

Resultados e discussão

4 Resultados e discussão

4.1 Micro-organismos isolados

Os isolamentos realizados focaram na obtenção de bactérias associadas às colônias da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*. As bactérias simbiotes de formigas agricultoras produzem antibióticos importantes para a proteção das colônias desses insetos contra patógenos e são uma fonte de produtos naturais ainda pouco explorada (OH et al., 2009). As bactérias foram isoladas de amostras coletadas de três colônias de *Atta sexdens rubropilosa* utilizando técnicas de lavagem empregadas na literatura (POULSEN e CURRIE, 2010; MARSH et al., 2013). Da colônia 1, foram isoladas 22 bactérias dos corpos das formigas, nove do jardim dos fungos simbiotes e sete do lixo do formigueiro (Tab. 1).

Tabela 1. Códigos e locais de onde as bactérias da colônia 1 foram isoladas.

Formigas	Jardim do fungo simbiote	Lixo do formigueiro
1B1	JB1	LLB2
1B2	JB2	LLB4
1B3	JB3	LLB5
1B4	JB4	LLB6
1B5	JB5	LLB7
1B6	JB6	LLB8
1B7	JB7	LLB9
3B1	JB8	
3B2	JB9	
3B4		
3B5		
3B6		
3B7		
3B8		
3B9		
3B10		
3B11		
3B12		
3B13		
3B14		
3B15		
3B16		

Novos procedimentos foram realizados com o objetivo de isolar bactérias potencialmente simbiotes das formigas e jardins e verificar se o isolamento de

bactérias seriam reprodutíveis. Da colônia 2 foram isoladas 15 bactérias, sendo 13 das formigas e 2 dos jardins (Tab. 2). Da colônia 3 foram isoladas 6 bactérias, sendo 4 das formigas e 2 dos jardins (Tab. 3). Dessa forma, ao todo foram isoladas 59 bactérias. O fungo *Aspergillus nomius* ASR3 foi isolado a partir de uma rainha de *Atta sexdens rubropilosa* que estava morta e infestada por esse micro-organismo (Fig. 132).

Tabela 2. Códigos e locais de onde as bactérias da colônia 2 foram isoladas.

Formigas	Jardim do fungo simbiote
ASLFLB1	ASL17
ASLFLB2	ASLP2
ASLIL1 (cabeça estéril)	
ASLIL2 (abdômen estéril)	
ASLIM1 (cabeça estéril)	
ASLIM2 (abdômen estéril)	
ASLIM7 (tórax estéril)	
ASLIM3 (cabeça estéril)	
ASLIM4 (tórax estéril)	
ASLIM5 (abdômen estéril)	
ASLIM6 (abdômen estéril)	
ASLI3 (larva estéril)	
AS1GV1 (glândula veneno de formiga estéril)	

Tabela 3. Códigos e locais de onde as bactérias da colônia 3 foram isoladas.

Formigas	Jardim do fungo simbiote
ASL6	ASL1
ASL7	ASL24
ASL22	
ASL23	

Foram selecionadas algumas linhagens de bactérias para identificação pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. Essa seleção foi baseada principalmente nos resultados dos ensaios de inibição frente a patógenos (descrito no item 4.2), isto é, as linhagens ativas foram priorizadas para identificação e estudos posteriores. Os resultados do sequenciamento e identificação dos micro-organismos selecionados para identificação podem ser visualizados na tabela 4. O gene 16S rRNA foi selecionado para sequenciamento pois é essencial para divisão celular bacteriana e é conservado entre bactérias das mesmas espécies, o que permite a identificação a partir da comparação com sequências já depositadas em bancos de dados (FOX et al., 1980; WOESE, et al., 1990), como o Genbank.

Tabela 4. Identificação dos micro-organismos isolados e simimilaridade das sequencias amplificadas com sequencias conhecidas.

Micro-organismo	Local de onde foi isolado	% de similaridade
<i>Serratia marcescens</i> 3B2	Formigas	99% com <i>Serratia marcescens</i>
<i>Serratia marcescens</i> 3B4	Formigas	100% com <i>Serratia marcescens</i>
<i>Pseudonocardia</i> sp. 1B7	Formigas	98% com <i>Pseudonocardia endophytica</i>
<i>Pseudonocardia</i> sp. ASL17	Jardim	98% com <i>Pseudonocardia endophytica</i>
<i>Pseudonocardia</i> sp. ASL1	Jardim	98% com <i>Pseudonocardia parietis</i>
<i>Pseudonocardia</i> sp. ASL24	Jardim	98% com <i>Pseudonocardia parietis</i>
<i>Pseudonocardia</i> sp. ASL6	Formigas	98% com <i>Pseudonocardia parietis</i>
<i>Pseudonocardia</i> sp. ASL7	Formigas	98% com <i>Pseudonocardia parietis</i>
<i>Pseudonocardia</i> sp. ASL22	Formigas	98% com <i>Pseudonocardia parietis</i>
<i>Pseudonocardia</i> sp. ASL23	Formigas	98% com <i>Pseudonocardia parietis</i>
<i>Burkholderia</i> sp. JB1	Jardim	99% com <i>Burkholderia plantarii</i>
<i>Burkholderia</i> sp. JB2	Jardim	99% com <i>Burkholderia glumae</i>
<i>Burkholderia</i> sp. JB3	Jardim	99% com <i>Burkholderia plantarii</i>
<i>Burkholderia</i> sp. JB4	Jardim	99% com <i>Burkholderia plantarii</i>
<i>Burkholderia</i> sp. JB5	Jardim	99% com <i>Burkholderia plantarii</i>
<i>Burkholderia</i> sp. JB7	Jardim	99% com <i>Burkholderia plantarii</i>
<i>Burkholderia</i> sp. JB8	Jardim	99% com <i>Burkholderia plantarii</i>
<i>Burkholderia</i> sp. JB9	Jardim	99% com <i>Burkholderia plantarii</i>
<i>Aspergillus nomius</i> ASR3	Rainha de A. <i>sexdens</i> morta	99% com <i>Aspergillus nomius</i>

As bactérias do gênero *Burkholderia* foram isoladas apenas do jardim fúngico da colônia 1, enquanto que as bactérias *S. marcescens* foram isoladas das formigas. As bactérias do gênero *Pseudonocardia* estavam presentes tanto nos jardins, quanto nas formigas coletadas de colônias distintas.

4.2 Ensaios preliminares de inibição de patógenos

As bactérias isoladas da colônia 1 foram submetidas a ensaios preliminares de antagonismo para verificar se seriam capazes de produzir substâncias com atividade antibiótica. Para isso, foram utilizados os patógenos humanos *P. mirabilis* ATCC

29906, *S. aureus* ATCC 3538 e *C. albicans* ATCC 10231 e dos jardins fúngicos *Escovopsis* sp. ST041014-01 (item 3.5).

Os micro-organismos patogênicos utilizados foram inibidos pelas bactérias isoladas da colônia 1 (fig. 8 e 9). Conforme pode-se observar na tabela 5, apenas a bactéria 3B5 foi capaz de inibir o crescimento da bactéria patogênica *P. mirabilis* ATCC 29906. As bactérias 3B5, JB1, JB2, JB3, JB4, JB5, JB6, JB7, JB8, JB9, LLB4 inibiram o crescimento do patógeno *S. aureus* ATCC 3538. O crescimento da levedura *C. albicans* ATCC 10231 foi inibido pelas bactérias JB1, JB2, JB4, JB5, JB6, JB7, JB8, JB9 (Tab. 5).

Tabela 5. Resultados dos ensaios de antagonismo em placa das bactérias simbiotes frente às bactérias patogênicas *P. mirabilis* ATCC 29906, *S. aureus* ATCC 3538 e à levedura patogênica *C. albicans* ATCC 10231.

Bactéria	Halos de inibição (mm)	
	24 horas	48 horas
<i>P. mirabilis</i> ATCC 29906		
3B5	14	14
Estreptomicina 300 µg	15	15
<i>S. aureus</i> ATCC 3538		
3B5	11	10
<i>Burkholderia</i> sp. JB1	26	27
<i>Burkholderia</i> sp. JB2	18	20
<i>Burkholderia</i> sp. JB3	15	14
<i>Burkholderia</i> sp. JB4	13	12
<i>Burkholderia</i> sp. JB5	12	12
<i>Burkholderia</i> sp. JB6	12	13
<i>Burkholderia</i> sp. JB7	14	14
<i>Burkholderia</i> sp. JB8	14	14
<i>Burkholderia</i> sp. JB9	12	11
LLB4	12	12
Estreptomicina 300 µg	23	22
<i>C. albicans</i> ATCC 10231		
<i>Burkholderia</i> sp. JB1	18	18
<i>Burkholderia</i> sp. JB2	12	14
<i>Burkholderia</i> sp. JB4	0	12
<i>Burkholderia</i> sp. JB5	0	18
<i>Burkholderia</i> sp. JB6	0	24
<i>Burkholderia</i> sp. JB7	12	0
<i>Burkholderia</i> sp. JB8	12	10
<i>Burkholderia</i> sp. JB9	0	11
Anfotericina B 100 µg	12	11

As bactérias isoladas dos jardins do fungo simbiote apresentaram atividade inibitória frente ao fungo *Escovopsis* sp. ST041014-01 (Tab. 6). Conforme pode-se observar na figura 9A, os halos de inibição dessas bactérias possuem uma região sem o crescimento de micélio (1), outra com apenas crescimento de micélio (2) e outra contendo micélio e esporos de coloração diferente do controle (3). A bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 possui crescimento lento e não foi capaz de inibir o fungo *Escovopsis* sp. ST041014-01 nesses ensaios preliminares, porém foi capaz de inibir o fungo *Escovopsis* sp. em ensaios mais elaborados que foram realizados posteriormente (Fig. 82).

Figura 8. Fotos do segundo dia dos ensaios de antagonismo das bactérias isoladas do formigueiro frente aos patógenos humanos *P. mirabilis* ATCC 29906, em A, *S. aureus* ATCC 3538, em B, e *C. albicans* ATCC 10231, em C. As setas vermelhas estão indicando os maiores halos de inibição de cada placa.

Tabela 6. Resultados dos ensaios de antagonismo em placa das bactérias isoladas do jardim frente ao fungo *Escovopsis* sp. ST041014-01*.

Bactéria	Halos de inibição (mm)	
	120 horas	168 horas
<i>Burkholderia</i> sp. JB1	43	43
<i>Burkholderia</i> sp. JB2	80	80
<i>Burkholderia</i> sp. JB3	43	42
<i>Burkholderia</i> sp. JB4	51	47
<i>Burkholderia</i> sp. JB5	80	80
<i>Burkholderia</i> sp. JB7	50	49
<i>Burkholderia</i> sp. JB8	80	80
<i>Burkholderia</i> sp. JB9	42	42
Miconazol 50 µg	40	40

* Não foi possível realizar o ensaio com a bactéria JB6, pois a mesma não cresceu na placa onde foi reativada. As bactérias que apresentaram halo de inibição de 80 mm inibiram o crescimento do fungo *Escovopsis* sp. ST041014-01 em toda a placa ou houve o crescimento de pequenas colônias do fungo que não possibilitaram a medida do halo.

Figura 9. Fotos do ensaio de antagonismo do *Escovopsis* sp. ST041014-01 e: A – *Burkholderia*. sp JB9, B - miconazol 50 µg e C - controle contendo apenas o fungo *Escovopsis* sp. ST041014-01 no meio ágar ISP-2.

4.3 Bactérias priorizadas para estudo químico

As bactérias *Pseudonocardia* sp. 1B7, e *Burkholderia* sp. JB2 inibiram o crescimento do fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 e foram selecionadas para o isolamento das substâncias com atividade antimicrobiana. Além disso, a bactéria *Serratia marcescens* 3B2 apresentou um odor característico devido a produção de compostos voláteis e também foi selecionada para o estudo químico. Posteriormente, novos isolamentos bacterianos foram realizados com amostras das colônias 2 e 3, e as bactérias isoladas também foram estudadas com o objetivo de verificar se os resultados obtidos com as bactérias da colônia 1 seriam reprodutíveis.

4.4 *Serratia marcescens* 3B2

A bactéria *Serratia marcescens* 3B2 (Fig. 10), isolada das formigas, foi selecionada para o estudo químico por produzir compostos voláteis. Essa bactéria foi considerada potencialmente importante para as formigas, uma vez que bactérias produtoras de compostos voláteis podem biossintetizar feromônios utilizados por insetos, estabelecendo uma relação simbiótica (DILLON et al., 2000; WADAKATSUMATA et al., 2015). A bactéria *S. marcescens* 3B2 foi cultivada em meio ágar ISP-2, os voláteis produzidos foram adsorvidos em fibra de SPME de polidimetilsiloxano e analisados por GC-MS. As análises iniciais por GC-MS, juntamente com buscas dos espectros nos bancos de dados WILEY7 e NIST08, indicaram que essa bactéria produz majoritariamente as pirazinas **1**, **2**, **3** e **4** (Fig. 11 a 16), que são semelhantes as pirazinas 2,5-dimetilpirazina (**5**) e 3-etil-2,5-dimetilpirazina (**6**), utilizadas pelas formigas como feromônio de trilha (SCHOETERS e

BILLEN, 1990; MORGAN et al., 2006). A produção de **1**, **2**, **3** e **4** levou à hipótese de que a bactéria *S. marcescens* 3B2 poderia produzir as pirazinas **5** e **6**, que são utilizadas pelas formigas *Atta sexdens rubropilosa* como feromônio de trilha.

Figura 10. *Serratia marcescens* 3B2 cultivada em meio ágar ISP-2.

Figura 11. Substâncias produzidas pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2.

Figura 12. Análises de GC-MS dos voláteis produzidos pela bactéria *S. marcescens* 3B2 cultivada em meio ágar ISP-2, em A, e controle do meio ágar ISP-2 em B. Modo de injeção Splitless 1min, temperatura de injeção de 250 °C, temperatura inicial da coluna de 50 °C, hold time 5 min, aquecimento de 3 °C por min até 180 °C, hold time 10 min.

Figura 13. Espectros de EI-MS das substâncias **1**, **2**, **3**, e **4** obtidos nas análises por GC-MS.

Figura 14. Proposta do mecanismo de fragmentação das substâncias **2**, **3**, e **4** formando o pico base de m/z 122.

As substâncias **2**, **3** e **4** apresentaram uma fragmentação característica nas análises de GC-MS, formando o ion de m/z 122 como pico base nos espectros de EI-MS (Fig. 13 e 14). A estrutura da substância **1** foi proposta como 3-metoxi-2,5-dimetilpirazina pela comparação do espectro de EI-MS com os espectros dos bancos de dados Wiley 7 (Fig. 15) e pelas análises de massas em alta resolução (Fig. 48 e Tab. 9). As pirazinas **2** e **3** apresentaram espectros muito similares de EI-MS, o que indica que são isômeros (Fig. 13). As buscas nos bancos de dados WILEY7 e NIST08 indicaram que o espectro de EI-MS da pirazina **2** apresenta elevada similaridade, índice de similaridade de 98, com a substância 3-isopentil-2,5-dimetil-pirazina. O espectro de EI-MS da pirazina **3** apresenta maior similaridade, índice de similaridade de 98, com os espectros da 3-pentil-2,5-dimetil-pirazina (Fig. 16). As análises de massas em alta resolução comprovaram a presença de pirazinas com fórmula molecular $C_{11}H_{18}N_2$, corroborando com os resultados obtidos pelo GC-MS. Dessa forma, as estruturas das pirazinas **2** e **3** foram identificadas conforme descrito na figura 11.

Figura 15. Espectros de EI-MS da substância **1** obtidos nas análises por GC-MS, em A, e espectro da 3-metoxi-2,5-dimetil-pirazina disponível no banco de dados Wiley7.

Figura 16. Espectros de EI-MS da 3-isopentil-2,5-dimetil-pirazina e 3-pentil-2,5-dimetil-pirazina presentes no banco de dados WILEY7.

A pirazina **4** foi isolada de cultivos da bactéria *Serratia marcescens* 3B2 em meio ágar ISP-2 e sua estrutura foi determinada utilizando ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas de alta resolução. A fórmula molecular foi determinada como $C_{12}H_{20}N_2$ (massa acurada m/z 193,1694; massa calculada m/z

193,1699; erro 2,58 ppm) pelas análises de espectrometria de massas em alta resolução (Fig. 22). O espectro de RMN de ^1H apresenta um singlete em δ 8,15, que integra para um hidrogênio, e dois singletos em δ 2,48 e δ 2,52, que são sinais característicos de hidrogênios de metilas ligadas ao anel aromático de 3-alkil-2,5-dimetil-pirazinas (Fig. 18; DOSSEY et al., 2009; SHOWALTER et al., 2010).

As correlações observadas no gHSQC indicam que o hidrogênio aromático em δ 8,15 está ligado ao carbono em δ 140,0 e os hidrogênios das metilas em δ 2,48 e δ 2,52, estão respectivamente ligados aos carbonos em δ 20,6 e δ 20,7 (Fig. 19 e Tab. 7). Os hidrogênios da metila em δ 2,52 correlacionam com os carbonos em δ 148,4 e δ 155,4 no gHMBC, enquanto que os hidrogênios da metila em δ 2,48 correlacionam com os carbonos em δ 150,2 e δ 140,0 (Fig. 20 e Tab. 7). Ainda no mapa de contorno de gHMBC, o hidrogênio em δ 8,15 correlaciona com os carbonos em δ 148,4 e δ 150,2 e apresenta uma correlação fraca com o carbono em δ 155,4, indicando esse hidrogênio está na posição 6 do anel, enquanto que as metilas estão nas posições 2 e 5, e o grupo alquila na posição 3 (Tab. 7 e Fig 17). Os hidrogênios em δ 2,79 e 2,72 correspondem aos hidrogênios metilênicos do carbono diretamente ligado ao anel pirazina e estão mais desblindados devido ao efeito anisotrópico do anel aromático. A metila em δ 0,95 se desdobra em dubleto ($J=6,08$), o que indica que está vizinha a um hidrogênio metínico. As correlações do gCOSY indicam que a metila em δ 0,95 está vizinha ao hidrogênio metínico em δ 1,66 (Fig. 21 e Tab. 7). A metila em δ 0,89 se desdobra em tripleto ($J=7,47$), indicando que está vizinha a dois hidrogênios.

Os hidrogênios metilênicos em δ 1,43 (m) e δ 1,45 (m) apresentam correlações no gCOSY com os hidrogênios ligados na posição 1' e 3' da cadeia alquílica, o que indica que estão na posição 2' da cadeia. Os hidrogênios metilênicos em δ 1,39 e δ 1,25 apresentam correlações com os hidrogênios da metila em 5' (δ 0,89), indicando que estão na posição 4' da cadeia alquílica da substância **4**. As correlações do gHSQC (Fig. 19) permitiram atribuir os sinais dos hidrogênios aos respectivos carbonos (Fig. 17 e Tab. 7). As correlações no gHMBC podem ser visualizadas na figura 20 e tabela 7.

A união dos dados de RMN e HR-ESI-MS permitiu a determinação da estrutura química da substância **4** como 3-(3-metil-pentil)-2,5-dimetil-pirazina (Fig. 17). A estrutura dessa pirazina parece ser nova na literatura e as informações geradas pelas

análises de RMN e HR-ESI-MS corroboram com a estrutura de 3-alkil-2,5-dimetilpirazina, previamente proposta utilizando dados de GC-MS (Fig. 14 e 23).

Figura 17. Dados de RMN da substância **4**.

Tabela 7. Dados de RMN da substância **4** (CDCl₃, 500 MHz).

Posição	δ ¹³ C*	¹ H δ (m; <i>J</i> em Hz)	H $\rightarrow$ C gHMBC
2	148,4	-	-
3	155,4	-	-
5	150,2	-	-
6	140,0	8,15 (1H; s)	150,2; 148,4; 155,4
2-Me	20,7	2,52 (3H; s)	148,4; 155,4
5-Me	20,6	2,48 (3H; s)	150,2; 140,0
1'	32,5	2,79 (1H; <i>m</i>)	155,4; 148,4; 35,0
		2,72 (1H; <i>m</i>)	155,4; 148,4; 35,0
2'	28,9	1,45 (1H; <i>m</i>)	-
		1,43 (1H; <i>m</i>)	-
3'	35,0	1,66 (1H; <i>m</i>)	18,6; 28,9; 155,4
3'-Me	18,6	0,95 (3H; <i>d</i> ; <i>J</i> =6,08)	28,9; 35,0
4'	28,9	1,39 (1H; <i>m</i>)	35,0
		1,25 (1H; <i>m</i>)	35,0
5'	10,9	0,89 (3H; <i>t</i> ; <i>J</i> =7,47)	28,9; 35,0

* Valores obtidos indiretamente através dos espectros de gHMBC e gHSQC.

Figura 18. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da substância 4.

Figura 19. Mapa de contorno de gHSQC (600 MHz, CDCl_3) da substância 4.

Figura 20. Mapa de contorno de gHMBC (600 MHz, CDCl₃) da substância **4**.

Figura 21. Mapa de contorno de gCOSY (600 MHz, CDCl₃) da substância **4**.

Figura 22. Análise da substância **4** por HR-ESI-MS operado no modo positivo.

Figura 23. Análises de GC-MS dos voláteis produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada em meio ágar ISP-2 em A e substância **4** em B.

A substância **7** foi isolada do cultivo da bactéria 3B2 em meio ágar ISP-2 conforme especificado na figura 7. O espectro de RMN de ^1H apresentou apenas dois sinais de hidrogênios aromáticos, que são condizentes com a simetria presente na

estrutura química da substância **7** ou fenazina (Fig. 24; ANGERMAN e DANYLUK, 1972). As análises por espectrometria de massas em alta resolução confirmaram a estrutura desse produto natural que possui fórmula molecular $C_{12}H_8N_2$ (m/z 181,0763; erro 0,66 ppm; Tab. 9).

Figura 24. Espectro de RMN de 1H (500 MHz, CD_3OD) da substância **7**.

A bactéria *Serratia marcescens* 3B2 foi cultivada em meio de composição química definida, contendo possíveis precursores das pirazinas **5** e **6**, na tentativa de estimular a produção dessas substâncias, que são utilizadas pelas formigas como feromônio de trilha. Para isso, foi utilizado o meio ágar M9 suplementado com glicose e com as substâncias acetato de sódio, propionato de sódio, L-alanina e L-treonina. As pirazinas **5** e **6** foram detectadas apenas quando a bactéria *S. marcescens* 3B2 foi cultivada em meio de ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose e 1,5% de L-treonina (Fig. 25, 29D, 30D e 31D). Esse resultado inicial indicou que a elevada concentração de L-treonina estimula a bactéria a iniciar a biossíntese das pirazinas **5** e **6**, e que o aminoácido L-treonina pode ser precursor biossintético dessas substâncias. É importante dizer que as estruturas das pirazinas **5** e **6** foram confirmadas pela comparação dos tempos de retenção e espectros de EI-MS das pirazinas presentes nas glândulas de feromônio das formigas *Atta sexdens*.

rubropilosa (Fig. 26, 27 e 28), que possui composição química bem definida (CROSS et al., 1979), por comparação com os espectros dos bancos de dados WILEY7 e NIST08 e pelas análises de espectrometria de massas em alta resolução (Fig. 48 e Tab. 9).

As glândulas de veneno de *Atta sexdens* produzem e armazenam o feromônio de trilha, que é composto majoritariamente por 3-etil-2,5-dimetil-pirazina (**6**), enquanto que a 2,5-dimetil-pirazina (**5**) está presente em menor quantidade (SCHOETERS e BILLEN, 1990; MORGAN et al., 2006). Abdômens de cinco formigas *Atta sexdens rubropilosa* foram dissecados e as glândulas de veneno foram coletadas e transferidas para vials que foram aquecidos a 60 °C, sendo os voláteis adsorvidos em uma fibra de SPME (item 3.15) e analisados por GC-MS (Fig. 26B). Conforme o esperado, as glândulas de veneno apresentaram majoritariamente a 3-etil-2,5-dimetil-pirazina (**6**). O mesmo procedimento de extração e análise foi realizado com cinco abdomens de *Atta sexdens rubropilosa* que foram previamente triturados no interior de um vial de GC-MS (Fig. 26C). Surpreendentemente, os abdomens apresentaram elevada quantidade de 2,5-dimetil-pirazina (**5**), o que indica que essa substância está sendo produzida e armazenada em alguma outra região dos abdomens das formigas. Ainda não é conhecido como as formigas biossintetizam ou adquirem as pirazinas utilizadas como feromônio de trilha.

Figura 25. Análises de GC-MS mostrando a diferença dos voláteis produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada em meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose e sem a adição de aminoácidos, em A, e em meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose e com 1,5% de L-treonina, em B.

Figura 26. Análises de GC-MS dos compostos voláteis produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada em meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose e 2% de L-treonina, em A, substâncias voláteis presentes em cinco glândulas de veneno de *Atta sexdens rubropilosa*, em B, e substâncias voláteis presentes em cinco abdomens de *Atta sexdens rubropilosa*, em C. O retângulo azul destaca os picos da substância 5 e o vermelho destaca os picos da substância 6.

Figura 27. Espectros de massas dos íons presentes em 7,5 min dos cromatogramas da figura 26, mostrando a presença do íon molecular da pirazina 5 com m/z 108. Bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada em meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose e 2% de L-treonina, em A, substâncias voláteis presentes em cinco glândulas de veneno isoladas de abdomens de *Atta sexdens rubropilosa*, em B, e substâncias voláteis presentes em cinco abdomens de *Atta sexdens rubropilosa*, em C.

Figura 28. Espectros de massas dos íons presentes em 15,4 min dos cromatogramas da figura 26, mostrando a presença do íon molecular da pirazina 6 com m/z 136. Bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada em meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose e 2% de L-treonina, em A, substâncias voláteis presentes em cinco glândulas de veneno isoladas de abdomens de *Atta sexdens rubropilosa*, em B, e substâncias voláteis presentes em cinco abdomens de *Atta sexdens rubropilosa*, em C.

Novos experimentos foram realizados com a bactéria *S. marcescens* 3B2 para verificar a produção das pirazinas **5** e **6** em diferentes concentrações do aminoácido L-treonina. A bactéria foi cultivada em meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose e L-treonina nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%. Os compostos voláteis desses cultivos foram analisados por GC-MS e as substâncias **5** e **6** foram detectadas nos cultivos contendo concentrações iguais ou superiores a 1,0% de L-treonina (Fig. 29, 30 e 31). A bactéria *S. marcescens* 3B2 também foi cultivada em meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose e 1,5% dos aminoácidos L-alanina, L-serina e L-valina para verificar a especificidade da L-treonina em induzir a biossíntese das pirazinas utilizadas como feromônio de trilha. As pirazinas **5** e **6** não foram detectadas nesses cultivos (Fig. 32, 33 e 34), demonstrando a especificidade do aminoácido L-treonina em estimular a biossíntese dessas substâncias.

Figura 29. Análises de GC-MS dos voláteis produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada em meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose e diferentes concentrações do aminoácido L-treonina: 0% em A; 0,5% em B; 1,0% em C; 1,5% em D; 2,0% em E. O retângulo azul destaca os picos da substância **5** e o vermelho destaca os picos da substância **6**.

A	40	44		68	77		96	104		133	151
B	40	44	57	61	68	75	87	96	104	133	151
C	42		57	68	77		96	108		133	151
D	42							108			
E	43	52		67		81	96	104		133	151
	42							108			
	44	52		67		81	96	104		133	151

Figura 30. Espectros de massas dos íons presentes em 7,5 min dos cromatogramas da figura 29, mostrando a presença do íon molecular da pirazina **5** com m/z 108 em C, D e E. Controle do meio sem L-treonina em A; 0,5% de L-treonina em B; 1,0% de L-treonina em C; 1,5% de L-treonina em D; 2,0 % de L-treonina em E.

Figura 31. Espectros de massas dos íons presentes em 15,4 min dos cromatogramas da figura 29, mostrando a presença do íon molecular da pirazina **6** com m/z 136 em C, D e E. Controle do meio sem L-treonina em A; 0,5% de L-treonina em B; 1,0% de L-treonina em C; 1,5% de L-treonina em D; 2,0 % de L-treonina em E.

Figura 32. Análises de GC-MS dos voláteis produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada em meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose e com os aminoácidos L-treonina, L-valina, L-serina e L-alanina: controle do meio sem aminoácidos em A; 1,5% de L-treonina em B; 2,0% de L-treonina em C; 1,5% de L-valina em D; 1,5% de L-serina em E; 1,5% de L-alanina em F. O retângulo azul destaca os picos da substância **5** e o vermelho destaca os picos da substância **6**.

Figura 33. Espectros de massas dos íons presentes em 7,5 min dos cromatogramas da figura 32, mostrando a presença do íon molecular da pirazina **5** com m/z 108 em B e C. Controle do meio sem aminoácidos em A; 1,5% de L-treonina em B; 2,0% de L-treonina em C; 1,5% de L-valina em D; 1,5% de L-serina em E; 1,5% de L-alanina em F.

Figura 34. Espectros de massas dos íons presentes em 15,4 min dos cromatogramas da figura 32, mostrando a presença do íon molecular da pirazina **6** com m/z 136 em B e C. Controle do meio sem aminoácidos em A; 1,5% de L-treonina em B; 2,0% de L-treonina em C; 1,5% de L-valina em D; 1,5% de L-serina em E; 1,5% de L-alanina em F.

O genoma da bactéria *Serratia marcescens* 3B2 foi sequenciado e analisado utilizando ferramentas de bioinformática para identificar seu potencial biossintético. As análises do genoma utilizando antiSMASH revelaram a presença de nove *clusters* biossintéticos (Fig. 35 e 36). Porém o *cluster* biossintético das pirazinas não foi encontrado, uma vez que ainda não foi descrito na literatura. Os *clusters* de genes biossintéticos de produtos naturais encontrados pelo antiSMASH, assim como as porcentagens de similaridades com os *clusters* mais similares descritos na literatura estão presentes na tabela 8. As estruturas químicas dos metabólitos produzidos pelos *clusters* gênicos mais similares aos *clusters* codificados no genoma da bactéria *Serratia marcescens* 3B2 podem ser visualizados na figura 37.

Figura 35. Cromossomo circular de *Serratia marcescens* 3B2 com os *clusters* biossintéticos identificados pelo antiSMASH destacados em azul.

Tabela 8. Clusters biossintéticos presentes no genoma da bactéria *Serratia marcescens* 3B2 encontrados pelo antiSMASH e similaridades com os clusters já descritos na literatura.

Cluster	Tipo	Cluster mais similar	Similaridade
1	T2PKS	-	-
2	Phenazina-NRPS	Piocianina	28%
3	NRPS	Enterobactina	12%
4	T1PKS	Taxlllaides	4%
5	Phosphonato	-	-
6	NRPS-outroKS-transATPKS	Oocidina A	91%
7	NRPS	Microcina	20%
8	NRPS	-	-
9	NRPS-arilpolieno	Andrimide	90%

anti SMASH antibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell
Version 3.0.5

Select Gene Cluster:
Overview 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Identified secondary metabolite clusters

Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster	MIBiG BGC-ID
The following clusters are from record serratia_genome:					
Cluster 1	T2pks	119762	160940	-	-
Cluster 2	Phenazine-Nrps	429218	483068	Pyocyanine_biosynthetic_gene_cluster (28% of genes show similarity)	BGC0000936_c1
Cluster 3	Nrps	646958	726429	Enterobactin_biosynthetic_gene_cluster (12% of genes show similarity)	BGC0000343_c1
Cluster 4	T1pks	2240064	2285346	Taxllaid_biosynthetic_gene_cluster (4% of genes show similarity)	BGC0001133_c1
Cluster 5	Phosphonate	2323007	2382934	-	-
Cluster 6	Nrps-Otherks-Transatpks	3589801	3720664	Oocydin_A_biosynthetic_gene_cluster (91% of genes show similarity)	BGC0001032_c1
Cluster 7	Nrps	3779126	3827077	Microcin_H47_biosynthetic_gene_cluster (20% of genes show similarity)	BGC0000587_c1
Cluster 8	Nrps	4399742	4445555	-	-
Cluster 9	Nrps-Arylpolyene	4452165	4509935	Andrimid_biosynthetic_gene_cluster (90% of genes show similarity)	BGC0000956_c1

Figura 36. Análise do genoma da bactéria *Serratia marcescens* 3B2 pelo antiSMASH.

Figura 37. Estruturas químicas dos compostos produzidos pelos clusters mais similares aos *clusters* codificados no genoma da bactéria *Serratia marcescens* 3B2, conforme descrito na tabela 8.

A combinação de *genome mining* e análise do extrato da cultura de *S. marcescens* 3B2 por HR-ESI-MS permitiu a identificação de outros metabólitos secundários bioativos produzidos por essa bactéria. As análises de bioinformática possibilitaram a detecção de *clusters* biossintéticos potencialmente envolvidos com a produção dos antibióticos oocidina A (**8**), andrimide (**9**) e serratamolide (**10**). A produção destes compostos foi confirmada por análises de espectrometria de massas em alta resolução do extrato da cultura bacteriana e pelo estudo da fragmentação dos íons formados em ESI-MS/MS utilizando nitrogênio como gás de colisão nas energias de 10, 20 e 30 eV (Tab. 9 e Fig. 38 - 43). As configurações relativas das substâncias **8**, **9** e **10** produzidas pela bactéria *S. marcescens* 3B2 não foram determinadas, mas foram propostas com base nos relatos prévios da literatura (STROBEL et al., 1999; FREDENHAGEN et al., 1987; DWIVEDI et al., 2008).

A substância **8** foi detectada predominantemente sodiada. O íon da substância sodiada de m/z 493,16 sofre eliminação do grupo aciloxi com a formação de ligação dupla no íon de m/z 433,14 (Fig. 38 e 39). O íon de m/z 433,14 pode fragmentar pelas vias “a” e “b” presentes na figura 38. Na rota “a” ocorre eliminação de H_2O e CO , com

formação do íon de m/z 371,14. Enquanto que na rota “b” ocorre eliminação do grupo $C_5H_8O_2$ e a formação do íon de m/z 333,09.

A substância **9** protonada (m/z 480,24) fragmentou formando o íon acílio de m/z 268,13 que é o pico base na energia de 10 eV (Fig. 41). Esse íon pode fragmentar pelas vias “a” e “b” descritas na figura 40. Na via “a” ocorre a ruptura de ligação amida e formação do íon acílio de m/z 121,06, que é o pico base nos espectros de ESI-MS/MS adquiridos em energias superiores, 20 e 30 eV. Na via “b” o íon acílio de m/z 268,12 elimina C_2H_2O e forma o íon de m/z 226,12 que possui um carbocátion secundário, que pode ser estabilizado pelo par de elétrons do nitrogênio vizinho. O íon de m/z 226,12 também pode fragmentar e formar o íon acílio de m/z 121,06.

O produto natural serratamolide (**10**) também foi produzido pela bactéria e foi detectado durante as análises utilizando espectrometria de massas. O *cluster* biossintético dessa substância não está presente no banco de dados do antiSMASH e foi encontrado manualmente no genoma da bactéria *S. marcescens* 3B2 utilizando os dados obtidos pelo RAST e dados da literatura (Fig. 47; Li et al., 2005). A serratamolide protonada, de m/z 515, pode eliminar H_2O e formar o íon de m/z 497,32, ou também pode fragmentar próximo ao eixo de simetria e formar o íon de m/z 276,18 (Fig. 42 e 43). O íon de m/z 276,18 elimina H_2O e forma o íon acílio de m/z 258,17, que após outra eliminação de H_2O , forma o íon de m/z 240,16. O íon acílio de m/z 240,16 elimina CO e forma íon de m/z 212,17, que, por sua vez, pode fragmentar e formar o íon acílio de m/z 153,13, que é estabilizado pelo par de elétrons da dupla ligação vicinal. Além da identificação por espectrometria de massas, a serratamolide foi isolada dos cultivos da bactéria *Serratia marcescens* 3B2 em ágar ISP-2 e o espectro de RMN de 1H pode ser visualizado na figura 44.

Figura 38. Proposta da fragmentação da oocidina A (8) sodiada em ESI-MS/MS.

Figura 39. Espectros de MS/MS da oocidina A (8) sodiada. As análises foram realizadas em ESI-Q-TOF Agilent 6530 utilizando nitrogênio como gás de colisão nas energias de 10, 20 e 30 eV.

Figura 40. Proposta da fragmentação da andrimide (9) protonada em ESI-MS/MS.

Figura 41. Espectros de MS/MS da andrimide (9) protonada. As análises foram realizadas em ESI-Q-TOF Agilent 6530 utilizando nitrogênio como gás de colisão nas energias de 10, 20 e 30 eV.

Figura 42. Proposta da fragmentação da serratamolide (**10**) protonada em ESI-MS/MS.

Figura 43. Espectros de MS/MS da serratamolide (**10**) protonada. As análises foram realizadas em ESI-Q-TOF Agilent 6530 utilizando nitrogênio como gás de colisão nas energias de 10, 20 e 30 eV.

Figura 44. Espectro de RMN de ^1H da substância **10** (300 MHz, CD_3OD).

As vias biossintéticas dos antibióticos oocidina (**8**) e andrimide (**9**) já foram estabelecidas na literatura e podem ser observadas nas figuras 45 e 46. O antibiótico oocidina (**8**) foi previamente isolado da bactéria epifítica *Serratia marcescens* MSU97 e apresentou elevada atividade inibitória frente a oomicetos fitopatogênicos (STROBEL et al., 1999). O antibiótico andrimide (**9**) foi isolado pela primeira vez da bactéria endossimbiótica *Enterobacter* sp., que foi isolada do interior dos ovos do inseto *Nilaparvata lugens* (FREDENHAGEN et al., 1987). A serratomolide (**10**) é um biosurfactante comumente produzido por bactérias *Serratia marcescens*, e apresenta atividade antibacteriana e citotóxica frente a células cancerígenas (ESCOBAR-DÍAZ et al., 2005; DWIVEDI et al., 2008). As substâncias **8**, **9** e **10** também podem auxiliar na proteção das colônias de *Atta sexdens rubropilosa* contra micro-organismos invasores, assim como ocorre com as substâncias produzidas por actinobactérias simbiotes de formigas agricultoras basais (OH et al., 2009).

Figura 45. Rota biossintética do antibiótico oocidina (**8**) (MATTILA et al., 2012).

Figura 46. Rota biossintética do antibiótico andrimide (**9**) (JIN et al., 2006).

As substâncias ácido fenilacético (**11** ou PAA, Fig. 11) e ácido indol-3-acético (**12** ou IAA) também foram identificadas a partir das análises de espectrometria de massas em alta resolução (Tab. 9 e Fig. 48). Esses produtos naturais também são produzidos pelas formigas *Atta sexdens rubropilosa*, sendo encontrados nas secreções das glândulas metapleurais das formigas, que são utilizadas como defesa contra patógenos (NASCIMENTO et al., 1996). Vale a pena destacar que o ácido indol-3-acético (**12**) foi detectado por LC-MS somente quando a bactéria foi cultivada

em meio ágar ISP-2 suplementado com 100 µg/mL de ácido fenilacético (**11**) ou do aminoácido L-fenilalanina. Novos estudos precisam ser realizados para identificar o mecanismo em que o ácido fenilacético e a L-fenilalanina estimulam a biossíntese do ácido indol-3-acético pela bactéria *S.marcescens* 3B2.

O ácido 3-hidroxydecanoico, que também está presente nas secreções das glândulas metapleurais das formigas *Atta sexdens rubropilosa*, não foi detectado nos cultivos da bactéria *S. marcescens* 3B2. Contudo, o ácido 3-hidroxydecanoico é precursor biossintético do antibiótico serratamolide (**10**, Fig. 47). Dessa forma, a bactéria *S. marcescens* 3B2 produz os principais componentes das secreções produzidas pelas glândulas metapleurais das formigas de onde foram isoladas, que são o ácido fenilacético (**11**) e ácido indol-3-acético (**12**), e o ácido 3-hidroxydecanoico está presente na estrutura química da serratamolide (**10**).

Figura 47. Biossíntese da serratamolide pela bactéria *Serratia marcescens* adaptada de Li e colaboradores (2005).

Os dados obtidos nas análises de espectrometria de massas de alta resolução, que foram utilizados na identificação das substâncias **1** a **12**, estão descritos na tabela 9. Na figura 48 podem ser visualizados os picos referentes às substâncias **1** a **12** extraídas das análises realizadas em LC-HR-ESI-MS.

Tabela 9. Dados de LC-HR-MS das substâncias produzidas por *S. marcescens* 3B2.

Substância	<i>m/z</i> M+H	Tempo de retenção	Formula molecular	Erro (ppm)
1	139,0866	4,33	C ₇ H ₁₀ N ₂ O	1,5
2	179,1543	7,64	C ₁₁ H ₁₈ N ₂	0,43
3	179,1543	7,64	C ₁₁ H ₁₈ N ₂	0,43
4	193,1700	8,67	C ₁₂ H ₂₀ N ₂	0,08
5	109,0764	1,96	C ₆ H ₈ N ₂	1,58
6	137,1073	3,62	C ₈ H ₁₂ N ₂	1,81
7	181,0763	6,61	C ₁₂ H ₈ N ₂	0,66
8	471,1780	7,56	C ₂₃ H ₃₁ ClO ₈	0,07
9	480,2488	8,30	C ₂₇ H ₃₃ N ₃ O ₅	1,42
10	515,3326	9,59	C ₂₆ H ₄₆ N ₂ O ₈	0,05
11	137,0598	4,63	C ₈ H ₈ O ₂	0,13
12	176,0706	5,0	C ₁₀ H ₉ NO ₂	1,09

Figura 48. Análises em LC-HR-MS dos extratos da bactéria *Serratia marcescens* 3B2 com as massas em alta resolução das substâncias **1** - **12** extraídas. Os isômeros **2** e **3** coeluíram no método utilizado. Coluna Phenomenex LC Kinetex 2,6 μ m EVO C18 (100 X 2,1 mm), fase móvel composta por misturas de CH₃CN e H₂O contendo 0,1% de ácido fórmico e vazão de 0,3 mL.min⁻¹. O método cromatográfico iniciou com 10% de CH₃CN e 90% de H₂O durante 1 min, seguido por um gradiente linear até atingir 100% de CH₃CN em 15 min e foi mantido durante 1,5 minutos a 100% de CH₃CN.

Um novo isolamento de bactérias foi realizado utilizando a colônia 2 de *Atta sexdens rubropilosa*, que foi coletada no campus da USP de Ribeirão Preto (item 4.1). As colônias bacterianas foram selecionadas de acordo com características morfológicas e a produção de pirazinas foi avaliada por GC-MS. As bactérias ASLIM1, ASLIM7, ASLIM5 e ASLIM6 foram isoladas de formigas esterilizadas superficialmente e a bactéria ASLI3 foi isolada de uma larva esterilizada superficialmente. A bactéria ASLP2 foi isolada do jardim cultivado pelas formigas e a bactéria AS1GV1B1 foi isolada do interior da glândula de veneno. Essas linhagens adicionais de bactérias se assemelham morfológicamente com a bactéria *S. marcescens* 3B2 e produzem as mesmas pirazinas majoritárias (**1**, **2**, **3** e **4**) produzidas pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 em meio ágar ISP-2 (Fig. 49).

Figura 49. Análises de GC-MS dos compostos voláteis produzidos pelas bactérias *Serratia marcescens* 3B2 em A; ASLIM1 em B; ASLIM7 em C; ASLIM5 em D; ASLIM6 em E; ASLI3 em F; AS1GV1B1 em G e ASLP2 em H cultivadas em meio ágar ISP-2. Os picos referentes as pirazinas **1**, **2**, **3** e **4** estão destacados. Modo de injeção Splitless 1min, temperatura de injeção de 250 °C, temperatura inicial da coluna de 50 °C, *hold time* 5 min, aquecimento de 3 °C por min até 180 °C, *hold time* 10 min.

As bactérias ASLIM1, ASLIM7, ASLIM5, ASLIM6, ASLI3, AS1GV1B1 e ASLP2 também produziram as pirazinas **5** e **6** quando cultivadas em meio M9 suplementado com 0,2% de glicose e 1,5% de L-treonina (Fig. 50). Esse é o primeiro relato de bactérias isoladas de formigas produzirem os mesmos compostos utilizados pelas

formigas como feromônio de trilha (**5** e **6**) e como defesa química (**11** e **12**). Ainda não está claro se as formigas utilizam os compostos produzidos pelas bactérias ou se esses insetos seriam capazes de produzir as substâncias utilizadas como defesa e feromônio de trilha. Alguns insetos utilizam compostos produzidos por bactérias simbiotes como feromônios, como no caso da barata *Blattella germanica* (WADAKATSUMATA et al., 2015) e do gafanhoto *Schistocerca gregaria* (DILLON et al., 2000). Em outro caso, os percevejos *Thasus neocalifornicus* parecem utilizar os compostos produzidos por bactérias endossimbiotes que vivem dentro de suas glândulas odoríferas, uma vez que o tratamento desses insetos com antibióticos resultou na redução das bactérias presentes nas glândulas odoríferas e na produção do feromônio de alarme (BECERRA et al., 2015).

Figura 50. Análises de GC-MS dos voláteis produzidos pelas bactérias *Serratia marcescens* 3B2 em A; ASLIM1 em B; ASLIM7 em C; ASLIM5 em D; ASLIM6 em E; ASLI3 em F; AS1GV1B1 em G; e ASLP2 em H cultivadas em meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose e 1,5% de L-treonina. O retângulo azul destaca os picos da pirazina **5** e o vermelho destaca os picos da pirazina **6**. Modo de injeção Splitless 1min, temperatura de injeção de 250 °C, temperatura inicial da coluna de 50 °C, hold time 5 min, aquecimento de 3 °C por min até 180 °C, hold time 10 min.

Outras bactérias do gênero *Serratia* são conhecidas por serem endossimbiotes, como a bactéria *Serratia symbiotica*, que vive no interior de afídeos, também conhecido como pulgões. Essas bactérias *Serratia symbiotica* produzem nutrientes essenciais para seus hospedeiros, como a vitamina B2 (MANZANO-MARÍN

e LATORRE, 2014). Os resultados obtidos indicam que as linhagens de *Serratia marcescens* isoladas são simbiontes das formigas *Atta sexdens rubropilosa* e são capazes de produzir substâncias idênticas às utilizadas pelas formigas para comunicação e defesa química, além de produzirem compostos com atividade antimicrobiana (8, 9 e 10).

4.5 Estudo biossintético das pirazinas 5 e 6 produzidas pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2

As pirazinas 5 e 6 foram selecionadas para estudos de biossíntese devido a relevância ecológica, como feromônio de trilha de formigas, e devido a biossíntese de pirazinas ter sido pouco investigada. A bactéria *S. marcescens* 3B2 foi cultivada juntamente com precursores isotopicamente marcados e as análises de incorporação foram realizadas utilizando GC-MS e LC-orbitrap (item 3.9). Os cultivos foram realizados de forma miniaturizada com o objetivo de utilizar uma quantidade reduzida de precursores isotopicamente marcados. Para isso, foram utilizados frascos de GC-MS de 10 mL contendo 2 mL de meio de cultivo.

Primeiramente, a bactéria foi cultivada no meio M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina. O aminoácido L-alanina foi adicionado uma vez que poderia ser precursor do anel 2,5-dimetilpirazínico. Um inóculo de 100 µL dos estoques (20% de glicerol em M9 acondicionado em freezer) foi adicionado em cada frasco contendo o meio de cultivo, e um frasco sem a bactéria foi utilizado como controle do meio. Os frascos foram lacrados e mantidos em estufa a 30 °C durante três dias. Em seguida, foram aquecidos a 40 °C em banho maria, a fibra de polidimetilsiloxano foi exposta no interior dos frascos durante 60 minutos e os voláteis foram analisados por GC-MS e LC-orbitrap. Conforme pode ser visualizado nas análises por GC-MS (fig. 51, 52 e 53) e LC-orbitrap (Fig. 54 e 55), as pirazinas 5 e 6 foram produzidas pela bactéria *S. marcescens* 3B2, mas não foram detectadas no controle do meio. Essas condições de cultivo e análises foram utilizadas nos estudos de biossíntese das pirazinas.

Figura 51. Análises de GC-MS dos compostos voláteis produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de alanina em A e controle do meio em B. O retângulo azul destaca os picos da pirazina **5** e o vermelho destaca os picos da pirazina **6**.

Figura 52. Espectros de massas dos íons presentes em 7,5 min dos cromatogramas da figura 51, mostrando a presença do íon molecular da pirazina **5** com m/z 108 em A. Bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de alanina em A e controle do meio em B.

Figura 53. Espectros de massas dos íons presentes em 15,4 min dos cromatogramas da figura 51, mostrando a presença do íon molecular da pirazina **6** com m/z 136 em A. Bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de alanina em A e controle do meio em B.

Figura 54. Análises em LC-orbitrap do extrato da bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina com a massa da pirazina **5** extraída em A e pirazina **6** extraída em B.

Figura 55. Espectros de massas em alta resolução da pirazina **5** (M+H com m/z 109,07625) em A da pirazina **6** (M+H com m/z 137,10717) em B produzidas pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina.

Após a definição das condições de cultivo para o estudo de biossíntese, a bactéria *Serratia marcescens* 3B2 foi cultivada com o aminoácido L-treonina uniformemente marcado (L-[U- ^{13}C , ^{15}N]-treonina). Esse aminoácido estimulou a

biossíntese das pirazinas **5** e **6** (item 4.4), e foi considerado como possível precursor biossintético dessas substâncias. Para isso, a L-treonina (1,5%) não marcada foi trocada pelo aminoácido L-treonina isotopicamente marcado (L-[U- ^{13}C , ^{15}N]-treonina), sendo adicionado no meio de cultivo selecionado. O controle foi realizado nas mesmas condições, mas com L-treonina não marcada. Os voláteis foram analisados por GC-MS, os cultivos foram extraídos com diclorometano e os extratos foram analisados por LC-orbitrap. Ocorreu a incorporação de oito unidades de massa nas estruturas químicas das pirazinas **5** e **6**, conforme evidenciado pelas análises por GC-MS (Fig. 56, 57 e 58) e LC-orbitrap (Fig. 59 e 60). A fragmentação das pirazinas no GC-MS também foi muito informativa sobre os locais das incorporações (Fig. 61). A substância **6**, por exemplo, elimina o grupo etila presente no carbono C3 e forma o íon de m/z 108. Quando a bactéria foi cultivada com L-treonina marcada, ocorreu a formação do íon com m/z 116, indicando que, assim como na substância **5**, toda marcação ocorreu no anel 2,5-dimetilpirazinico. Também foram detectados íons referentes a incorporação de apenas uma unidade de L-[U- ^{13}C , ^{15}N]-treonina nas estruturas das pirazinas **5** ($\text{C}_3^{13}\text{C}_3\text{H}_9\text{N}^{15}\text{N}$) e **6** ($\text{C}_5^{13}\text{C}_3\text{H}_{13}\text{N}^{15}\text{N}$) (Fig 59 e 60; Tab. 10 e 11). Esses resultados indicam que a bactéria *S. marcescens* 3B2 também utiliza L-treonina endógena na produção dessas pirazinas.

Figura 56. Análises de GC-MS dos compostos voláteis produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 0,5% de L-alanina e 1,5% de L-treonina não marcada em A e mesmo meio com 1,5% de L-[U- ^{13}C , ^{15}N]-treonina em B. O retângulo azul destaca os picos da pirazina **5** e o vermelho destaca os picos da pirazina **6**.

Figura 57. Espectros de massas da pirazina 5, em 7,5 min dos cromatogramas da figura 56, produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 0,5% de L-alanina e 1,5% de L-treonina não marcada (íon molecular com m/z 108) em A e mesmo meio com 1,5% de L-[U- ^{13}C , ^{15}N]-treonina (íon molecular com m/z 116) em B.

Figura 58. Espectros de massas da pirazina 6, em 15,4 min dos cromatogramas da figura 56, produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 0,5% de L-alanina e 1,5% de L-treonina não marcada (íon molecular com m/z 136) em A e mesmo meio com 1,5% de L-[U- ^{13}C , ^{15}N]-treonina (íon molecular com m/z 144) em B.

2 #357-362 RT: 3.70-3.75 AV: 4 NL: 6.02E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1500.00]

3 #358 RT: 3.73 AV: 1 NL: 4.62E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1500.00]

Figura 59. Espectros de massas em alta resolução da pirazina **5** produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 0,5% de L-alanina e 1,5% de L-treonina não marcada em A e mesmo meio com 1,5% de L-[U- ^{13}C , ^{15}N]-treonina em B. $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_2$ com m/z 109,076, $\text{C}_3^{13}\text{C}_3\text{H}_9\text{N}^{15}\text{N}$ com m/z 113,083 e $^{13}\text{C}_6\text{H}_9^{15}\text{N}_2$ com m/z 117,090.

Figura 60. Espectros de massas em alta resolução da pirazina **6** produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 0,5% de L-alanina e 1,5% de L-treonina não marcada em A e mesmo meio com 1,5% de L-[U- ^{13}C , ^{15}N]-treonina em B. $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_2$ com m/z 137,107, $\text{C}_5^{13}\text{C}_3\text{H}_{13}\text{N}^{15}\text{N}$ com m/z 141,114 e $\text{C}_2^{13}\text{C}_6\text{H}_{13}^{15}\text{N}_2$ com m/z 145,121.

Figura 61. Proposta de fragmentação da pirazina **6** em GC-MS.

Em seguida, a bactéria foi cultivada no meio suplementado com 0,15% de acetato de sódio uniformemente marcado com ^{13}C (U- ^{13}C -acetato de sódio). Como controle, a bactéria foi cultivada nas mesmas condições e com 0,15% de acetato de sódio não marcado. Conforme pode ser observado nos espectros de massas (Fig. 63 a 66), não ocorreu marcação isotópica na substância **5**, enquanto que ocorreu o

acréscimo de duas unidades de massa na substância **6**, condizente com a incorporação de uma molécula de U- ^{13}C -acetato de sódio. O espectro de massas dessa pirazina, obtido por análises em GC-MS, apresentou o íon fragmento de m/z 108, o que indica que o acetato de sódio marcado foi incorporado no grupo etila da pirazina **6**.

Figura 62. Análises de GC-MS dos compostos voláteis produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina, 0,5% de L-alanina e 0,15% de acetato de sódio não marcado em A e mesmo meio com 0,15% de U- ^{13}C -acetato de sódio em B. O retângulo azul destaca os picos da pirazina **5** e o vermelho destaca os picos da pirazina **6**.

Figura 63. Espectros de massas da pirazina **5**, em 7,5 min dos cromatogramas da figura 62, produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina, 0,5% de L-alanina e 0,15% de acetato de sódio não marcado (íon molecular com m/z 108) em A e mesmo meio com 0,15% de U- ^{13}C -acetato de sódio (íon molecular com m/z 108) em B.

Figura 64. Espectros de massas da pirazina **6**, em 15,4 min dos cromatogramas da figura 62, produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina, 0,5% de L-alanina e 0,15% de acetato de sódio não marcado (íon molecular com m/z 136) em A e mesmo meio com 0,15% de U- ^{13}C -acetato de sódio (íon molecular com m/z 138) em B.

Figura 65. Espectros de massas em alta resolução da pirazina **5** produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina, 0,5% de L-alanina e 0,15% de acetato de sódio não marcado em A e mesmo meio com 0,15% de U- ^{13}C -acetato de sódio em B. $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_2$ com m/z 109,076.

Figura 66. Espectros de massas em alta resolução da pirazina **6** produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina, 0,5% de L-alanina e 0,15% de acetato de sódio não marcado em A e mesmo meio com 0,15% de U- ^{13}C -acetato de sódio em B. $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_2$ com m/z 137,107 e $\text{C}_6^{13}\text{C}_2\text{H}_{13}\text{N}_2$ com m/z 139,113.

Os aminoácidos 3- ^{13}C -L-alanina e ^{15}N -L-alanina também foram utilizados nos cultivos da bactéria *S. marcescens* 3B2, sendo adicionados na concentração de 0,5% no meio de cultivo. O controle foi realizado com o meio contendo L-alanina isotopicamente não marcada. Os dados obtidos pelas análises por espectrometria de massas (Fig. 67 a 76) indicaram que não houve incorporação de ^{15}N -L-alanina e ocorreu uma pequena incorporação de 3- ^{13}C -L-alanina no grupo etila da pirazina **6**. A incorporação da alanina foi evidenciada pelo aumento da intensidade relativa do íon equivalente ao isótopo $\text{C}_7^{13}\text{CH}_{13}\text{N}_2$ (m/z 138,11047) no espectro de massas de alta resolução (Fig. 76), quando comparado com o controle (Tab. 11). A substância **6** apresentou íon fragmento de m/z 108 no espectro de GC-MS (Fig. 74), indicando que a incorporação ocorreu no grupo etila. Provavelmente a incorporação de L-alanina no grupo etila da pirazina **6** ocorreu devido a metabolização desse aminoácido em

acetato, que foi posteriormente incorporado na pirazina **6**. A alanina pode ser metabolizada em acetato por uma reação de transaminação seguida por descarboxilação (NELSON e COX, 2004).

Para verificar a seletividade da bactéria *Serratia marcescens* 3B2 em incorporar L-alanina ou acetato no grupo etil da substância **6**, a bactéria foi cultivada em meio contendo a mesma quantidade (24,4 μM) de 3- ^{13}C -L-alanina e acetato de sódio não marcado e também no meio contendo a mesma quantidade (24,4 μM) de L-alanina não marcada e U- ^{13}C -acetato de sódio (Fig. 77). O controle foi realizado nas mesmas condições e utilizando precursores isotopicamente não marcados. A intensidade relativa do íon correspondente a incorporação de L-alanina marcada foi de 11,4%, enquanto que o de acetato marcado foi de 52,99% (Tab. 11). Esses resultados evidenciam a preferência da incorporação de acetato no grupo etila da pirazina **6**, e corroboram com a proposta de que a L-alanina origina o grupo etila devido a metabolização desse aminoácido em acetato.

Figura 67. Análises de GC-MS dos compostos voláteis produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada em A e mesmo meio com 0,5% de ^{15}N -L-alanina em B. O retângulo azul destaca os picos da pirazina **5** e o vermelho destaca os picos da pirazina **6**.

Figura 68. Espectros de massas da pirazina **5**, em 7,5 min dos cromatogramas da figura 67, produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada (íon molecular com m/z 108) em A e mesmo meio com 0,5% de ^{15}N -L-alanina (íon molecular com m/z 108) em B.

Figura 69. Espectros de massas da pirazina **6**, em 15,4 min dos cromatogramas da figura 67, produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada (íon molecular com m/z 136) em A e mesmo meio com 0,5% de ^{15}N -L-alanina (íon molecular com m/z 136) em B.

Figura 70. Espectros de massas em alta resolução da pirazina **5** produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada em A e mesmo meio com 0,5% de ^{15}N -L-alanina em B. $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_2$ com m/z 109,076.

Figura 71. Espectros de massas em alta resolução da pirazina **6** produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada em A e mesmo meio com 0,5% de ^{15}N -L-alanina em B. $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_2$ com m/z 137,107.

Figura 72. Análises de GC-MS dos compostos voláteis produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada em A e mesmo meio com 0,5% de $3\text{-}^{13}\text{C}$ -L-alanina em B. O retângulo azul destaca os picos da pirazina **5** e o vermelho destaca os picos da pirazina **6**.

Figura 73. Espectros de massas da pirazina **5**, em 7,5 min dos cromatogramas da figura 72, produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada (íon molecular com m/z 108) em A e mesmo meio com 0,5% de $3\text{-}^{13}\text{C}$ -L-alanina (íon molecular com m/z 108) em B.

Figura 74. Espectros de massas da pirazina **6**, em 15,4 min dos cromatogramas da figura 72, produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada (íon molecular com m/z 136) em A e mesmo meio com 0,5% de $3\text{-}^{13}\text{C}$ -L-alanina (íon molecular com m/z 136) em B.

Figura 75. Espectros de massas em alta resolução da pirazina **5** produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada em A e mesmo meio com 0,5% de 3-¹³C-L-alanina em B. C₆H₉N₂ com *m/z* 109,076.

Figura 76. Espectros de massas em alta resolução da pirazina **6** produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina e 0,5% de L-alanina não marcada em A e mesmo meio com 0,5% de 3-¹³C-L-alanina em B. C₈H₁₃N₂ com m/z 137,107 e C₇¹³CH₁₃N₂ com m/z 138,110.

Figura 77. Espectros de massas em alta resolução da pirazina **6** produzida pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 cultivada no meio ágar M9 suplementado com 0,2% de glicose, 1,5% de L-treonina, 24,4 μM de L-alanina não marcada e 24,4 μM de acetato de sódio não marcado em A, mesmo meio com 24,4 μM de L-alanina não marcada e 24,4 μM $\text{U-}^{13}\text{C}$ -acetato de sódio em B e mesmo meio com 24,4 μM de $3\text{-}^{13}\text{C}$ -L-alanina e 24,4 μM de acetato de sódio não marcado em C. $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_2$ com m/z 137,107, $\text{C}_7^{13}\text{CH}_{13}\text{N}_2$ com m/z 138,110 e $\text{C}_6^{13}\text{C}_2\text{H}_{13}\text{N}_2$ com m/z 139,113.

Os resultados dos estudos de marcação isotópica evidenciaram que o anel 2,5-dimetil-pirazínico é formado a partir de duas unidades de L-treonina, uma vez que ocorreu a incorporação de seis átomos marcados com ^{13}C e dois com ^{15}N provenientes de duas moléculas de L-[$\text{U-}^{13}\text{C}$, ^{15}N]-treonina. A incorporação de apenas

uma unidade de L-treonina marcada no anel 2,5-dimetil-pirazínico de **5** e **6** indica que, apesar desse aminoácido estimular a produção dessas pirazinas pela bactéria *S. marcescens* 3B2, a L-treonina produzida endogenamente pela bactéria também pode ser utilizada na biossíntese das substâncias **5** e **6**. O grupo etila da pirazina **6** é formado a partir de uma unidade de acetato, uma vez que foram incorporados dois átomos marcados com ^{13}C provenientes do precursor U- ^{13}C - acetato de sódio (Fig. 78). As intensidades relativas dos íons isotopicamente marcados podem ser visualizadas nas tabelas 10 e 11.

Figura 78. Incorporação de L-[U- ^{13}C , ^{15}N]-treonina e U- ^{13}C -acetato de sódio nas estruturas químicas das pirazinas **5** e **6**.

A união dos dados sobre a marcação isotópica possibilitou a proposição da biossíntese das pirazinas **5** e **6** a partir de L-treonina e acetato (Fig 79). Inicialmente, a hidroxila em C-3 do aminoácido L-treonina é oxidada em cetona, que é seguida por reação de descarboxilação e formação de 1-aminopropan-2-ona. A condensação de duas unidades de 1-aminopropan-2-ona seguido por eliminação de água forma a 2,5-dimetil-1,4-dihidropirazina, que é oxidada no anel resultando na formação de **5**. A pirazina **6** pode ser formada pela mesma via com a adição de uma unidade de acetato na posição C3 do anel 2,5-dimetil-1,4-dihidropirazínico. Nesse caso, a carbonila resultante da incorporação do acetato é reduzida a hidroxila, que é eliminada na forma de água. A ligação dupla formada pode migrar para o anel, resultando na aromatização e formação da pirazina **6**.

A substância 1-aminopropan-2-ona pode ser produzida a partir do catabolismo da L-treonina por *Serratia marcescens* (KOMATSUBARA et al., 1978). A formação de **5** pode ser catalisada pela enzima aminoacetona oxidase, que foi descrita recentemente a partir da bactéria *Streptococcus oligofermentans*, presente na microbiota oral de humanos (MOLLA et al., 2014). Os resultados permitiram avançar

Tabela 10. Intensidades relativas dos isótopos da pirazina **5** protonada nas análises dos experimentos de marcação isotópica em LC-orbitrap.

	Intensidades relativas dos íons (%)			
	$C_6H_9N_2$	$C_5^{13}CH_9N_2$	$C_4^{13}C_2H_9N_2$	$^{13}C_6H_9^{15}N_2$
L-treonina	100,00	6,84	0	0
L-[U- ^{13}C , ^{15}N]-treonina	0	0	0	100,00
acetato de sódio	100,00	6,58	0	0
U- ^{13}C - acetato de sódio	100,00	6,94	0	0
L-alanina	100,00	6,73	0	0
3- ^{13}C -L-alanina	100,00	8,66	0	0
^{15}N -L-alanina	100,00	6,88	0	0
24,4 μM de L-alanina e 24,4 μM de acetato de sódio	100,00	6,60	0	0
24,4 μM de 3- ^{13}C -L- alanina e 24,4 μM de acetato de sódio	100,00	7,44	0	0
24,4 μM de L-alanina e 24,4 μM de U- ^{13}C - acetato de sódio	100,00	6,61	0	0

Tabela 11. Intensidades relativas dos isótopos da pirazina **6** protonada nas análises dos experimentos de marcação isotópica em LC-orbitrap.

	Intensidades relativas dos íons (%)			
	$C_8H_{13}N_2$	$C_7^{13}CH_{13}N_2$	$C_6^{13}C_2H_{13}N_2$	$C_2^{13}C_6H_{13}^{15}N_2$
L-treonina	100,00	8,85	0	0
L-[U- ^{13}C , ^{15}N]-treonina	0	0	0	100,00
acetato de sódio	100,00	8,79	0	0
U- ^{13}C - acetato de sódio	100,00	9,61	29,36	0
L-alanina	100,00	8,77	0	0
3- ^{13}C -L-alanina	100,00	18,67	0	0
^{15}N -L-alanina	100,00	8,93	0	0
24,4 μM de L-alanina e 24,4 μM de acetato de sódio	100,00	8,67	0	0
24,4 μM de 3- ^{13}C -L- alanina e 24,4 μM de acetato de sódio	100,00	11,40	0	0
24,4 μM de L-alanina e 24,4 μM de U- ^{13}C - acetato de sódio	100,00	8,24	52,99	0

4.6 *Pseudonocardia* sp. 1B7

A bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 (Fig. 80), isolada das formigas, apresentou efeito inibitório sobre o crescimento do fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 (Fig. 81C). A atividade antifúngica dessa bactéria foi avaliada novamente utilizando uma versão modificada da metodologia utilizada por Sit e colaboradores (2015), com o intuito de verificar se a atividade inibitória seria reprodutível e identificar o período de maior inibição. Inicialmente a bactéria foi inoculada no centro de placas de Petri contendo o meio ágar ISP-2, as quais foram incubadas durante 7, 14, e 21 dias. Em seguida, esporos do fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 foram inoculados nessas placas a 30 mm do centro das colônias bacterianas e o crescimento desse fungo foi observado durante 4 dias e comparado com o crescimento do controle. A bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 não inibiu o fungo *Escovopsis* após 7 dias de incubação; inibição parcial foi observada após 14 dias, enquanto que a inibição completa ocorreu após 21 dias (Fig. 82). A fim de isolar o composto ativo responsável pela atividade antifúngica, a bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 foi cultivada em escala ampliada em meio ágar ISP-2, durante 21 dias e, em seguida, a cultura foi extraída com acetato de etila. O extrato bruto foi fracionado em cinco frações utilizando HPLC semi-preparativo acoplado a uma coluna de fase reversa C₁₈ (Fig. 83).

Figura 80. *Pseudonocardia* sp. 1B7 cultivada em meio ágar ISP-2.

Figura 81. Foto macroscópica (A) e de microscopia eletrônica de varredura (B) mostrando a ausência de actinobactérias no exoesqueleto de *Atta sexdens rubropilosa*. Inibição do crescimento do fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 pela bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 (C).

Figura 82. Ensaio de inibição entre *Pseudonocardia* sp. 1B7 e *Escovopsis* sp. ST041014-1 (A, C, E) e controle de crescimento do fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 (B, D, F). Os ensaios foram realizados durante 7 (A e B), 14 (C e D) e 21 (E e F) dias.

A atividade antifúngica das frações foi avaliada contra o fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 (Fig. 84). A fração 3, coletada entre 25-26 min, apresentou atividade e foi submetida a análises químicas utilizando RMN de ^1H e LC-HR-MS. O espectro de RMN de ^1H (Fig. 85) apresenta dois dubletos e dois tripletos desblindados característicos de anéis aromáticos *orto*-dissubstituído (δ 6,75-7,75), um singlete também na região dos hidrogênios aromáticos (δ 7,14) e um singlete referente a hidrogênios metilênicos em δ 3,64. Nas análises de espectrometria de massas de alta resolução (Fig. 100), foi detectada a presença de um pico com m/z 176.0706 com provável fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2^+$, erro 1,09 ppm. Estes dados são consistentes com o produto natural ácido indol-3-acético, substância **12** ou IAA, (Fig. 83), que é uma auxina vegetal previamente detectada em secreções de glândulas metapleurais de formigas cortadeiras (NASCIMENTO et al., 1996; YEK et al, 2012; FERNÁNDEZ-MARIN et al., 2015) e também detectado nas culturas de *S. marcescens* 3B2 (item 4.4). A estrutura desse composto foi confirmada por comparação do tempo de retenção e da massa em alta resolução de um padrão Sigma-Aldrich de ácido indol-3-acético, que foi analisado utilizando o mesmo método cromatográfico (Fig. 99).

Figura 83. Cromatograma em HPLC semi-preparativo do extrato bruto em acetato de etila da bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7, com o pico do IAA (**12**) destacado pela seta vermelha. Coluna Phenomenex Luna 5 μm C_{18} , 250 X 10,00 mm, fase móvel composta por misturas de CH_3CN e H_2O contendo 0,1% de ácido fórmico e vazão de $3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O método de HPLC iniciou-se com fase isocrática de 10% de CH_3CN durante 5 min, seguido por gradiente linear de 10-65% de CH_3CN durante 5-35 min, de 35 a 38 min foi aplicado gradiente linear de 65-100% de CH_3CN , que foi seguido pela fase isocrática 100% de CH_3CN durante 38 a 40 min.

Figura 84. Ensaio antifúngico líquido das frações 1 a 5 do extrato bruto em acetato de etila da bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 a 100 µg/mL contra esporos do fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1. O corante AlamarBlue foi adicionado em cada poço para verificar o crescimento do fungo. O controle de crescimento do fungo *Escovopsis* sp. (A) continha a mesma quantidade de MeOH usado nos testes. A fração 3 inibiu o crescimento do fungo *Escovopsis* sp., em D, de forma similar ao antifúngico cicloheximida a 0,39 µg/mL, que foi utilizado como controle positivo, em G.

Figura 85. Espectro de RMN de ^1H da fração 3 do extrato bruto em acetato de etila da bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 (600 MHz, CD_3OD).

A atividade antifúngica do padrão de ácido indol-3-acético (Sigma-Aldrich) foi avaliada contra esporos e micélio de diferentes linhagens do fungo *Escovopsis* sp. isolados de colônias de formigas agricultoras: *Escovopsis* sp. ST041014-1, *Escovopsis* sp. WM151001-4, *Escovopsis* sp. LK150120-01, *Escovopsis* sp. AB150620-3 e *Escovopsis* sp. CC150618-02 (item 3.13). Os resultados dos ensaios estão descritos na tabela 12 e podem ser visualizados nas figuras 86 a 95. É importante mencionar que as linhagens dos fungos *Escovopsis* spp. apresentaram tempo de crescimento distintos e, por isso, as leituras dos ensaios foram realizadas em tempos diferentes. De uma forma geral, o IAA (**12**) inibiu completamente o crescimento de esporos de *Escovopsis* spp., com concentrações inibitórias mínimas (MICs) que variaram entre 12,5 a 25,0 µg/mL. As células dos micélios de *Escovopsis* spp. foram menos sensíveis do que os esporos, e apresentaram MICs que variaram entre 12,5 a 100,0 µg/mL. O crescimento do cultivar de *Atta sexdens rubropilosa*, *Leucoagaricus gongylophorus* CC30329-01, e da levedura patogênica *Candida albicans* ATCC 10231 não foram inibidos pelo IAA (**12**; Fig. 96 e 97). Esses resultados indicam que o IAA inibe seletivamente o crescimento dos fungos do gênero *Escovopsis*.

Tabela 12. Atividade do IAA frente a esporos e micélio dos fungos *Escovopsis* spp. isolados a partir de cinco colônias de formigas cortadeiras.

Linhagem de <i>Escovopsis</i>	Colônia de Formiga da qual foi isolado	CIM (µg.mL ⁻¹)	
		Esporos	Micélio
ST041014-1	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	25,0	25,0
WM151001-4	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	25,0	50,0
LK150120-01	<i>Atta laevigata</i>	12,5	100,0
CC150618-02	<i>Acromyrmex</i> sp.	12,5	12,5
AB150620-3	<i>Trachymyrmex</i> sp.	25,0	50,0

Figura 86. Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (**12**) em diferentes concentrações contra esporos do fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 após seis dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.

Figura 87. Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (**12**) em diferentes concentrações contra células do micélio do fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 após seis dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.

Figura 88. Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (**12**) em diferentes concentrações contra esporos do fungo *Escovopsis* sp. WM151001-4 após quatro dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.

Figura 89. Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (**12**) em diferentes concentrações contra células do micélio do fungo *Escovopsis* sp. WM151001-4 após quatro dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.

Figure 90. Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (**12**) em diferentes concentrações contra esporos do fungo *Escovopsis* sp. LK150120-01 após quatro dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.

Figura 91. Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (**12**) em diferentes concentrações contra células do micélio do fungo *Escovopsis* sp. LK150120-01 após quatro dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.

Figura 92. Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (**12**) em diferentes concentrações contra esporos do fungo *Escovopsis* sp. CC150618-02 após onze dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna. Houve pouco crescimento do fungo na concentração de 6,25 µg/mL de IAA.

Figura 93. Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (**12**) em diferentes concentrações contra células do micélio do fungo *Escovopsis* sp. CC150618-02 após onze dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna. Houve pouco crescimento do fungo na concentração de 6,25 µg/mL de IAA.

Figura 94. Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (**12**) em diferentes concentrações contra esporos do fungo *Escovopsis* sp. AB150620-3 após quatro dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.

Figura 95. Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (12) em diferentes concentrações contra células do micélio do fungo *Escovopsis* sp. AB150620-3 após quatro dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.

Figura 96. Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (12) em diferentes concentrações contra o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* CC30329-01 após 24 dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.

Figura 97. Ensaio de inibição do ácido indol-3-acético (12) em diferentes concentrações contra células do fungo *Candida albicans* ATCC 10231 após 2 dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.

A simbiose entre formigas do gênero *Atta* e actinobactérias não está completamente entendida, uma vez que essas formigas não têm actinobactérias na superfície de seus exoesqueletos (Fig. 81A e B). Desse modo, novos experimentos foram realizados para verificar se outras colônias de *Atta sexdens rubropilosa* também estão associadas com as bactérias *Pseudonocardia* spp. e para verificar se estas bactérias também produzem o ácido indol-3-acético (**12**). A pós-doutoranda Weilan G. P. de Melo, que realiza suas pesquisas no âmbito do projeto temático ICBG FAPESP/FIC-NIH (2013/50954-0), isolou sete linhagens de *Pseudonocardia* de outras duas colônias de *Atta sexdens rubropilosa* (tabela 13).

Tabela 13. Linhagens de *Pseudonocardia* spp. isoladas de colônias de *Atta sexdens rubropilosa*.

Linhagem da Bactéria	Identificação	Colônia	Material de origem
1B7	<i>Pseudonocardia</i> sp.	Laboratório 1	Formigas
ASL17	<i>Pseudonocardia</i> sp.	Laboratório 2	Jardim
ASL1	<i>Pseudonocardia</i> sp.	Laboratório 3	Jardim
ASL6	<i>Pseudonocardia</i> sp.	Laboratório 3	Formigas
ASL7	<i>Pseudonocardia</i> sp.	Laboratório 3	Formigas
ASL22	<i>Pseudonocardia</i> sp.	Laboratório 3	Formigas
ASL23	<i>Pseudonocardia</i> sp.	Laboratório 3	Formigas
ASL24	<i>Pseudonocardia</i> sp.	Laboratório 3	Jardim

Esses novos isolados de *Pseudonocardia* spp. também inibiram o crescimento do fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 nos ensaios realizados em placas de 12 poços (Fig.98). Os meios de cultura de cada poço contendo as actinobactérias foram extraídos individualmente com acetato de etila e os extratos foram analisados por cromatografia líquida acoplada com espectrômetro de massas de alta resolução. O ácido indol-3-acético (**12**) foi detectado nos extratos de todos os poços que continham as colônias de *Pseudonocardia* spp., mas não no controle do meio (Tab. 14 e Fig. 99).

Figura 98. Ensaio de inibição entre as diferentes linhagens de *Pseudonocardia* sp. contra o fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 em ágar ISP-2. As bactérias foram cultivadas durante 21 dias e, em seguida, os esporos do fungo foram inoculados nas placas. Esses ensaios foram realizados em duplicata e a leitura foi realizada após quatro dias de incubação. *A bactéria *Pseudonocardia* sp. ASC65 foi isolada de jardins de uma colônia do campus da USP e não cresceu de forma satisfatória durante o experimento.

Tabela 14. Detecção por LC-HR-MS do IAA (**12**) produzido pelas diferentes linhagens de *Pseudonocardia* sp. no ensaio de antagonismo frente ao fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1.

Bactéria	IAA (12)
1B7	+
ASL1	+
ASL6	+
ASL7	+
ASL17	+
ASL22	+
ASL23	+
ASL24	+

Figura 99. Análises em LC-HR-MS dos extratos das bactérias *Pseudonocardia* spp. com a massa do IAA extraída. Coluna Phenomenex LC Kinetex 2,6 μm EVO C18 (100 X 2,1 mm), fase móvel composta por misturas de CH_3CN e H_2O contendo 0,1% de ácido fórmico e vazão de 0,3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O método cromatográfico iniciou com 10% de CH_3CN e 90% de H_2O durante 1 min, seguido por um gradiente linear até atingir 100% de CH_3CN em 15 min e foi mantido durante 1,5 minutos a 100% de CH_3CN .

O ácido indol-3-acético (**12**) pode ser biossintetizado por vias dependentes ou independentes do aminoácido triptofano (SPAEPEN et al., 2007). Para averiguar a via operante em *Pseudonocardia* sp. 1B7, a bactéria foi cultivada em ágar ISP-2 suplementado com 0,15% de ^{15}N -L-triptofano, com o objetivo de verificar se esse aminoácido seria incorporado ou não na estrutura de ácido indol-3-acético. A análise por LC-MS do extrato em acetato de etila desse cultivo mostrou incorporação maior que 90% de triptofano marcado na estrutura de ácido indol-3-acético (Fig. 100A), conforme evidenciado pelas intensidades dos picos presentes no espectro de massas referente ao IAA marcado (m/z 177,0677) e não marcado (m/z 176,0706). Esse resultado indica que a bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 utiliza a via dependente de triptofano para biosintetizar essa auxina vegetal.

Figura 100. Espectros de massas de alta resolução do IAA (12) produzido pela bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 cultivada em meio ágar ISP-2 suplementado (A) ou não (B) com o aminoácido marcado ^{15}N -L-Triptofano.

Adicionalmente, o genoma da bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 foi sequenciado, gerando dois *contigs*, sendo um de 5,448,579 pares de base e outro de 2,291,181 pares de base (Fig. 102). As sequências foram submetidas às plataformas online RAST e antiSMASH. A busca por genes potencialmente envolvidos na biossíntese do ácido indol-3-acético, revelou a presença de apenas um gene que codifica um transportador de auxina. Esse gene é importante para exportar o ácido indol-3-acético para o ambiente extracelular (SAIER, 2000). Tal gene está agrupado com outros genes potencialmente envolvidos com a biossíntese do ácido indol-3-acético pela via dependente de triptofano, como aminotransferase e descarboxilase. Esses resultados corroboram com os dados de incorporação isotópica, indicando que a bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 produz ácido indol-3-acético utilizando o aminoácido L-triptofano como precursor (Fig. 101).

Figura 101. Proposta biossintética do IAA pela bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7.

O IAA é uma das auxinas vegetais mais conhecidas e modula diversas relações simbióticas. Esse produto natural é produzido por certas bactérias para estimular o

crescimento de seus hospedeiros, como ocorre com bactérias que estabelecem simbiose com plantas e algas diatomáceas (PERSELLO-CARTIEAUX et al., 2003; CHALUPOWICZ et al., 2006; AMIN et al., 2015). O IAA é também um dos componentes das secreções das glândulas metapleurais, utilizadas pelas formigas agricultoras para controlar a saúde de suas colônias (NASCIMENTO et al., 1996; YEK et al., 2012; FERNÁNDEZ-MARIN et al., 2015). Essa substância foi previamente detectada nas glândulas metapleurais das formigas cortadeiras *Acromyrmex* sp., *Acromyrmex octospinosus*, *Acromyrmex subterraneus* e *Atta sexdens* por outros pesquisadores (SCHILDKNECHT e KOOBL, 1971; NASCIMENTO et al., 1996, ORTIUS-LECHNER et al., 2000). As formigas *Atta sexdens*, por exemplo, contêm cerca de 0,01 a 0,1 µg de IAA dentro de cada glândula metapleural (SCHILDKNECHT e KOOB, 1971) e aproximadamente 7,4 µg de IAA por grama de jardim de fungos (SCHILDKNECHT et al., 1973). O IAA sozinho, ou em combinação com outros metabólitos presentes dentro das secreções das glândulas metapleurais, pode aumentar o crescimento do fungo cultivado pelas formigas (SCHILDKNECHT et al., 1973).

Não há informações, ao nosso conhecimento, sobre como as formigas biossintetizam ou adquirem o IAA. Os resultados obtidos permitem sugerir que as formigas *Atta sexdens rubropilosa* poderiam utilizar o IAA produzido pelas bactérias do gênero *Pseudonocardia*, que foram isoladas das formigas e jardins. Por outro lado, as bactérias *Pseudonocardia* spp. que produzem IAA podem ser uma fonte adicional de defesa para as colônias dessas formigas cortadeiras. As bactérias *Pseudonocardia* spp. isoladas dos jardins, por exemplo, podem inibir diretamente o crescimento dos fungos parasitas *Escovopsis* spp. presentes nos jardins. Os resultados obtidos são inéditos em relação à produção de IAA por bactérias simbiotes de *Atta sexdens rubropilosa*.

Além do *cluster* gênico biossintético do IAA, as análises do genoma da bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 revelaram a presença de outros 14 *clusters* biossintéticos (Fig. 102 e 103; e Tab 15). As similaridades dos *clusters* biossintéticos presentes no genoma da bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 com os descritos na literatura são relativamente baixas, o que indica que podem produzir metabólitos ainda não descritos na literatura. As estruturas dos produtos naturais codificados pelos *clusters* biossintéticos similares aos preditos para bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 estão presentes na figura 104. Esses dados indicam que a bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7

possui um potencial para produzir metabólitos com estruturas químicas diversas, porém não foi possível identificar nenhum desses metabólitos nas condições de cultivo e análises empregadas. Isso significa que a biossíntese dos produtos naturais codificados no genoma da bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 pode ser ativada em condições específicas, como, por exemplo, durante a associação com as formigas.

Tabela 15. Clusters biossintéticos presentes no genoma da bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 encontrados pelo antiSMASH e similaridades com os clusters já descritos.

Cluster	Tipo	Cluster mais similar	Similaridade
1	Bacteriocina	-	-
2	Ectoína	Ectoína	50%
3	NRPS	Coelibactina	27%
4	Oligossacarídeo	-	-
5	T3PKS	Alquil-O-dihidrogeranil-metoxihidroquinonas	42%
6	NRPS	Coelibactina	81%
7	Terpeno	Sioxantina	60%
8	Terpeno	Hopeno	46%
9	Bacteriocina	-	-
10	Outro	-	-
11	Terpeno	SF2575	4%
12	NRPS	Fuscachelina	55%
13	Outro-T1PKS	RK-682	36%
14	T2PKS	Rishirilide B	39%

Figura 102. Sequências gênicas obtidas a partir do *assembly* do genoma da bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7. As setas vermelhas indicam os *clusters* de genes biossintéticos encontrados pelo antiSMASH.

<div> <div>antiSMASH</div> <div>antibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell</div> <div>Version 3.0.5</div> <div> </div> </div>					
Select Gene Cluster: Overview 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14					
Identified secondary metabolite clusters					
Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster	MIBiG BGC-ID
The following clusters are from record unitig_5quiver:					
Cluster 1	Bacteriocin	966823	978178	-	-
Cluster 2	Ectoine	1483452	1493844	Ectoine_biosynthetic_gene_cluster (50% of genes show similarity)	BGC0000853_c1
Cluster 3	Nrps	1935220	1997749	Coelibactin_biosynthetic_gene_cluster (27% of genes show similarity)	BGC0000324_c1
Cluster 4	Oligosaccharide	2247841	2277696	-	-
Cluster 5	T3pks	4520151	4561197	Alkyl-O-Dihydrogeranyl-Methoxyhydroquinones_biosynthetic_gene (42% of genes show similarity)	BGC0001077_c1
Cluster 6	Nrps	4963710	5017532	Coelibactin_biosynthetic_gene_cluster (81% of genes show similarity)	BGC0000324_c1
Cluster 7	Terpene	5220668	5241681	Sioxanthin_biosynthetic_gene_cluster (60% of genes show similarity)	BGC0001087_c4
The following clusters are from record unitig_0quiver:					
Cluster 8	Terpene	244883	271737	Hopene_biosynthetic_gene_cluster (46% of genes show similarity)	BGC0000663_c1
Cluster 9	Bacteriocin	480979	492259	-	-
Cluster 10	Other	487752	532338	-	-
Cluster 11	Terpene	793220	814422	SF2575_biosynthetic_gene_cluster (4% of genes show similarity)	BGC0000269_c1
Cluster 12	Nrps	1221823	1291227	Fuscachelin_biosynthetic_gene_cluster (55% of genes show similarity)	BGC0000359_c1
Cluster 13	Otherks-T1pks	1317882	1372120	RK-682_biosynthetic_gene_cluster (36% of genes show similarity)	BGC0000140_c1
Cluster 14	T2pks	1640781	1683332	Rishirilide_B_biosynthetic_gene_cluster (39% of genes show similarity)	BGC0001179_c1

Figura 103. Análise do genoma da bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7 por antiSMASH.

Figura 104. Estruturas químicas dos compostos codificados pelos clusters biossintéticos mais similares aos *clusters* biossintéticos codificados no genoma da bactéria *Pseudonocardia* sp. 1B7, conforme descrito na tabela 15.

4.7 *Burkholderia* sp. JB2

A bactéria *Burkholderia* sp. JB2 (Fig. 105) foi isolada a partir dos jardins cultivados pelas formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* e mostrou elevado efeito antagonista contra o fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 (Fig. 112A). Devido a grande atividade inibitória ao patógeno dos jardins, essa bactéria foi selecionada para estudos químicos com o objetivo de identificar os compostos ativos. A bactéria foi cultivada em meio de ágar ISP-2 durante 14 dias, as culturas das placas foram extraídas com acetato de etila e observou-se a precipitação de um sólido vermelho durante a concentração do extrato (Fig. 106; item 3.11).

Figura 105. *Burkholderia* sp. JB2 cultivada em meio ágar ISP-2.

O espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ da substância precipitada (**14**) apresentou apenas três sinais, um tripleto em δ 7,75 e dubleto em δ 7,42, ambos integrando para dois hidrogênios, e um tripleto em δ 7,29, integrando para um hidrogênio (Fig. 107). Na tentativa de melhorar a resolução dos sinais de hidrogênios, a amostra foi dissolvida em CDCl_3 , mas a quantidade e qualidade das informações obtidas não melhorou (Fig. 108). Os deslocamentos químicos e multiplicidades dos sinais de hidrogênios aliados à cor da amostra, sugeriram a presença de metal complexado à estrutura.

Os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT indicaram a presença de três carbonos metínicos em δ 140,3, δ 127,6 e δ 125,8, e um carbono não hydrogenado em δ 178,0 (Fig. 109 e 110). Os espectros de RMN apresentarem poucos sinais, indicando que a substância precipitada possivelmente apresentaria estrutura molecular pequena e de baixa massa molecular. O espectro de massas em alta resolução apresentou picos

com massa superior ao esperado pelos dados de RMN (m/z 413,0586 e m/z 442,0109; Fig. 111), o que indicou que a substância podia ter um centro de simetria. Esta substância foi cristalizada em clorofórmio e a estrutura cristalina foi identificada por meio de difração de raios-X pelo pós-doutorando Timothy Ramadhar (Harvard Medical School) como três íons tropolones (**13**) quelados com um átomo central de alumínio ou de ferro (**14**; Fig. 113B). O complexo com alumínio apresenta a massa acurada em alta resolução de m/z 413,0586 (M+Na teórico: 413,0582 erro 0,97 ppm) enquanto que o complexo com ferro apresenta a massa acurada em alta resolução de m/z 442,0109 (M+Na teórico: 442,0116, erro 1.58 ppm; Fig. 111).

Figura 106. Cromatogramas em 225 nm do extrato bruto em acetato de etila do cultivo a bactéria *Burkholderia* sp. JB2 em A, da substância precipitada em B e do controle do meio ISP-2 em C. Coluna Phenomenex C6-Fenil 5 μ m (250 X 4,60 mm) e uma vazão de 0,8 mL.min⁻¹. O gradiente iniciou com 10% de metanol atingindo 100% em 20 min, permanecendo na mesma proporção até 30 min, em seguida voltou para 10% de metanol em 32 min e permaneceu nessa proporção até 37 min.

Figura 107. Espectro de RMN de ^1H da substância **14** (500 MHz, DMSO-d_6).

Figura 108. Espectro de RMN de ^1H da substância **14** (500 MHz, CDCl_3).

Figura 109. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **14** (125 MHz, CDCl_3).

Figura 110. Espectro de DEPT 135 da substância **14** (125 MHz, CDCl_3).

Figura 111. Espectros de HR-ESI-MS no modo positivo da substância **14**.

A bactéria foi cultivada novamente sob as mesmas condições durante sete dias na tentativa de evitar a formação do precipitado e identificar a substância ativa. O meio de cultivo das placas foi extraído com acetato de etila e o extrato foi submetido ao fracionamento monitorado pela atividade antifúngica. O extrato em acetato de etila (144,3 mg) foi fracionado em cinco frações (item 3.11). As atividades das frações foram avaliadas contra o fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 e a fração 1 (27,9 mg) foi a mais ativa (Fig. 114). Todas as frações foram analisadas utilizando LC-MS e o composto tropolone (**13**) foi encontrado predominantemente na fração 1, que foi a mais ativa (Fig. 115 e 116).

O efeito inibitório de *Burkholderia* sp. JB2 contra *Escovopsis* sp. ST041014-1 foi reduzido quando o meio de cultivo foi suplementado com 1 mM de FeCl_3 , indicando que a inibição deve ocorrer por privação de ferro (Fig. 112). Os cristais formados por três íons tropolones quelados com um átomo central de ferro corroboram que este composto pode sequestrar o ferro do meio de cultivo.

Figura 112. Ensaio de inibição entre *Burkholderia* sp. JB2 e *Escovopsis* sp. ST041014-1 em ágar ISP-2 suplementado (B) ou não (A) com 1 mM de FeCl_3 .

Figura 113. Estrutura química do tropolone (**13**) em A e estrutura do precipitado (**14**), obtida por cristalografia de raios-X, mostrando três íons tropolones quelados com um átomo central de metal, em B.

Figura 114. Ensaio de inibição das frações do extrato bruto em acetato de etila da bactéria *Burkholderia* sp. JB2 contra o fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 em ágar ISP-2. É possível observar a atividade mais acentuada da fração 1 pela presença do halo de inibição.

Figura 115. Cromatogramas em 254 nm das frações 1, 2, 3, 4 e 5 do extrato bruto em acetato de etila da bactéria *Burkholderia* sp. JB2 obtidos por LC-DAD-MS. O pico referente ao tropolone está destacado com uma seta vermelha.

Figura 116. Cromatograma obtido por LC-DAD-MS a 254 nm da fração 1 do extrato bruto em acetato de etila da bactéria *Burkholderia* sp. JB2 (A) e cromatograma do íon tropolone extraído em (B), comprovando a presença dessa substância na fração ativa.

A atividade antifúngica do tropolone foi quantificada frente ao fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 e foi comparada com a atividade do ácido fenilacético e ácido indol-3-acético, que estão presentes nas secreções antimicrobianas produzidas pelas glândulas metapleurais das formigas e também foram produzidos por *S. marcescens* 3B2 (**11 e 12**) e *Pseudonocardia* sp. 1B7 (**12**). Os ensaios antifúngicos mostraram que o tropolone (**13**) foi o composto bacteriano mais ativo contra *Escovopsis*, com CIM de 6,25 µg/mL, ou 51,1 µM (Fig. 117), em comparação com o ácido fenilacético (**11**, PAA), que não foi ativo (Fig. 118) e ao ácido indol-3-acético (**12**, IAA), que apresentou CIM de 25,00 µg/mL, ou 142,7 µM (Fig. 86). O composto tropolone (**13**) também foi ativo contra o fungo cultivar com CIM de 12,5 µg/mL, ou 102,2 µM (Fig. 119), enquanto que o PAA e o IAA não foram ativos (Fig. 120 e 96). Este resultado indica que tropolone inibe o fungo *Escovopsis* e também pode causar danos para o fungo cultivado pelas formigas.

A capacidade de sequestrar metais confere atividade antibiótica ao tropolone, uma vez que metais como o ferro são essenciais para a homeostase celular e funcionam como cofatores enzimáticos. O tropolone já demonstrou atividade contra fungos fitopatogênicos como, por exemplo, *Pythium aphanidermatum*, *Thanatephorus cucumeris*, *Fusarium solani*, *Fusarium roseum*, *Botryotinia fuckeliana*, *Phomopsis obscurans*, *Colletotrichum orbiculare*, *Colletotrichum lagenarium* e *Helminthosporium cynodontis* (LINDBERG, 1981; MORITA et al., 2003). Também apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* (TRUST et al., 1975; LINDBERG e LARKIN, 1980) e foi capaz de induzir apoptose em células de leucemia (LI et al., 2016). Recentemente foi descrito que o tropolone e substâncias análogas são capazes de reduzir a resistência de bactérias ao antibiótico tetraciclina, pela inibição da bomba de efluxo de tetraciclina (STONE et al., 2016).

As formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* possuem alta concentração de ácido fenilacético em suas glândulas metapleurais, estima-se que essa substância compõe cerca de 57,3 % dos compostos presentes nas secreções dessas glândulas (NASCIMENTO et al., 1996). Fernández-Marín e colaboradores (2015) relataram que as formigas do gênero *Atta*, inclusive *Atta sexdens*, adicionam ácido fenilacético em áreas infectadas de seus jardins para prevenir o crescimento do fungo *Escovopsis*. No mesmo estudo, os autores descrevem que o ácido fenilacético foi pouco ativo contra *Escovopsis* sp., apresentando IC₅₀ de cerca de 373,6 µg/mL. Foi sugerido que, apesar da baixa atividade, várias formigas podem adicionar PAA nos locais infectados até atingir a concentração necessária para eliminar o fungo invasor.

É interessante observar que o ácido fenilacético já foi descrito como precursor biossintético do tropolone e estimulou a produção do tropolone pela bactéria *Burkholderia plantarii* (Fig. 121; THIEL et al., 2010; WANG et al., 2016). Eventualmente, a bactéria *Burkholderia* sp. presente nos jardins fúngicos poderia utilizar o PAA depositado pelas formigas *Atta sexdens rubropilosa* apenas nas regiões do cultivar infectadas por *Escovopsis*. Desta forma ocorreria a biossíntese localizada do antifúngico tropolone pela bactéria *Burkholderia* sp., o que não comprometeria a viabilidade do fungo cultivar *Leucoagaricus gongylophorus* em outras áreas.

Bactérias *Burkholderia* sp. foram isoladas de jardins de *Atta sexdens rubropilosa* e descritas como uma forma de defesa das colônias, uma vez que essas bactérias inibiram o crescimento de fungos entomopatogênicos e patogênicos dos jardins (SANTOS et al., 2004). Agora ficou demonstrado que a bactéria *Burkholderia* sp. JB2, isolada dos jardins de *Atta sexdens rubropilosa*, inibe o crescimento do fungo patogênico dos jardins *Escovopsis* pela produção do antibiótico tropolone.

O fato da atividade antifúngica do tropolone ser inibida na presença de ferro revela uma possível estratégia de controle das formigas cortadeiras que eventualmente utilizam esse produto natural como forma de defesa. A utilização de iscas com defensivos agrícolas ou agrotóxicos poderia ser substituída por iscas suplementadas com ferro. A presença excessiva de ferro iria bloquear um dos mecanismos de defesa das colônias e os fungos parasitas poderiam crescer mais facilmente, o que levaria a um prejuízo ou morte das colônias de formigas cortadeiras. Dessa forma, o estudo da ecologia química que ocorre nas colônias de *Atta sexdens rubropilosa* revelou uma possível forma de defesa das formigas. Esse conhecimento

pode ser utilizado no futuro para o desenvolvimento de sistemas de controles menos prejudiciais ao meio ambiente, uma vez que poderia contribuir para a redução no uso de agrotóxicos.

Figura 117. Ensaio de inibição do tropolone (**13**) em diferentes concentrações contra esporos do fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 após seis dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.

Figura 118. Ensaio de inibição do ácido fenilacético (**11**) em diferentes concentrações contra esporos do fungo *Escovopsis* sp. ST041014-1 após seis dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.

Figura 119. Ensaio de inibição do tropolone (**13**) em diferentes concentrações contra o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* CC30329-01 após 24 dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.

Figura 120. Ensaio de inibição do ácido fenilacético (**11**) em diferentes concentrações contra o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* CC30329-01 após 24 dias de incubação. As concentrações foram avaliadas em triplicata em cada coluna.

Figura 121. Biossíntese da substância tropolone pela bactéria *P. gallaeciensis* DSM17395 (THIEL et al., 2010).

4.8 Análise dos jardins fúngicos por microscopia eletrônica de varredura

A presença de bactérias dos gêneros *Pseudonocardia* e *Burkholderia* nos jardins foi comprovada, mas a distribuição desses micro-organismos nos jardins ainda permanece desconhecida. Na tentativa de verificar a distribuição de bactérias nos jardins fúngicos, amostras de jardins de *Atta sexdens rubropilosa* foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As células bacterianas não foram visualizadas na superfície das amostras analisadas por MEV, uma vez que encontrou-se uma camada que envolve os jardins fúngicos. Pode-se observar essas estruturas

nas figuras 122, 123, 125 e 126. Nessas figuras, é possível evidenciar fissuras que, possivelmente, ocorreram devido à desidratação em alto vácuo durante o preparo das amostras.

Na figura 122 visualiza-se estômatos de um pedaço de folha que estão parcialmente ou totalmente encobertos por uma película. Para investigar a origem dessa película, gotículas que são normalmente produzidas pelo jardim foram coletadas e cerca de 5 μ L foram adicionados na superfície de uma folha de roseira, que foi posteriormente analisada por MEV (Fig. 124). O líquido produzido pelo jardim causou o mesmo efeito de encobrimento dos estômatos observado na figura 122.

Nas figuras 123B e 130B, estão evidenciadas estruturas que, devido ao tamanho (977.7 nm - 1.896 μ m) e forma, podem ser bactérias e/ou leveduras no interior do jardim. Essa camada também foi observada em fragmentos de jardins transportados pelas rainhas de *Atta sexdens rubropilosa*, que são utilizados para formar uma nova colônia (Fig. 131). As análises dos jardins transportados pelas rainhas indicaram que as camadas estão presentes nos jardins desde o início das colônias.

Verificou-se que os jardins de *Atta sexdens rubropilosa* são impermeáveis à água e permeáveis aos solventes orgânicos hexano, acetato de etila e metanol. Fragmentos de jardins lavados individualmente com 1 mL de cada um desses solventes foram analisados por MEV. As análises mostraram que as camadas permaneceram quando os jardins foram lavados com água e hexano, porém, foram solubilizadas quando lavadas com acetato de etila e metanol (Fig. 128 e 129). A composição química assim como a função dessa camada ainda não foi descrita. O fato dessas camadas serem encontradas em todos os jardins analisados indica que essas estruturas podem desempenhar um papel importante na manutenção da homeostase desses jardins, como, por exemplo a proteção dos jardins e seus micro-organismos simbiotes.

Os jardins e a camada foram impermeáveis a água (Fig. 127, 128 e 129), o que indica que essa camada pode estar envolvida com a proteção contra desidratação em períodos de seca e também proteger os jardins contra destruição pela água, que pode ocorrer, por exemplo, durante o período chuvoso. Vale a pena ressaltar que o jardim pode ser impermeável a água devido a tensão superficial desse solvente. Contudo, foi demonstrado que a camada não foi solubilizada com água, o que indica que essa estrutura também pode contribuir com a impermeabilização dos jardins.

Figura 122. Foto de microscopia eletrônica de varredura de uma folha mantida no jardim dos fungos simbiotes de *Atta sexdens rubropilosa*, A, e sua ampliação mostrando um estômato encoberto por uma película, B. As setas vermelhas destacam fissuras presentes na amostra.

Figura 123. Foto de microscopia eletrônica de varredura do jardim dos fungos simbiotes de *Atta sexdens rubropilosa*, A, e ampliação, B, com setas azuis destacando formas que podem ser bactérias e/ou leveduras. As estruturas destacadas por setas azuis possuem tamanhos de 977.7 nm - 1.896 µm. As setas vermelhas destacam fissuras presentes na amostra.

Figura 124. Foto de microscopia eletrônica de varredura do líquido produzido pelo jardim de *Atta sexdens rubropilosa* adicionado na superfície de uma folha, A, e sua ampliação mostrando um estômato encoberto pela película formada, B.

Figura 125. Foto de microscopia eletrônica de varredura do jardim dos fungos simbiotes de attine basal coletada no parque estadual de Vassununga -SP, em A, e ampliação, em B, com a seta vermelha destacando a espessura da camada, 1,75 μm .

Figura 126. Foto de microscopia eletrônica de varredura do jardim dos fungos simbiotes de *Atta laevigata*, em A, e *Acromyrmex* sp., em B, ambas amostras foram coletadas no campus da USP de Ribeirão Preto.

Figura 127. Foto de fragmento de jardim dos fungos simbiotes de *Atta sexdens rubropilosa* com gotinhas de água em sua superfície mostrando a impermeabilidade em A. Em B a água foi corada com o corante rezazurina para facilitar a visualização das gotinhas na superfície dos jardins.

Figura 128. Foto de microscopia eletrônica de varredura do jardim dos fungos simbiotes de *Atta sexdens rubropilosa* lavados com água, mostrando que a camada não foi solubilizada.

Figura 129. Foto de microscopia eletrônica de varredura do jardim dos fungos simbiotes de *Atta sexdens rubropilosa* lavados com hexano (A), acetato de etila (B), metanol (C) e água (D). As camadas aparentam estar intactas em A e D, enquanto que foram alteradas em B e C.

Figura 130. Foto de microscopia eletrônica de varredura do jardim dos fungos simbiotes de *Atta sexdens rubropilosa*, A, e ampliação, B, com setas azuis destacando formas que podem ser bactérias e/ou leveduras. As setas vermelhas destacam fissuras presentes na amostra.

Figura 131. Foto de microscopia eletrônica de varredura de jardins transportado por duas rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* em A e C, e ampliações em B e D evidenciando a presença da camada envolvendo o jardim.

4.9 Aflatoxinas produzidas pelo fungo *Aspergillus nomius* ASR3

O fungo *Aspergillus nomius* ASR3 foi isolado de uma rainha de *Atta sexdens rubropilosa* que estava morta (Fig. 132; item 3.3). Fungos dessa espécie já foram

descritos como patogênicos para insetos como as formigas cortadeiras *Acromyrmex echinator* (POULSEN et al., 2006). O fungo *Aspergillus nomius* também está presente em colônias de cupins como um micro-organismo saprófito e pode tornar-se patogênico caso a colônia desses insetos sofra algum tipo de estresse, como a infecção por outros micro-organismos patogênicos (CHOUVENC et al., 2012).

Figura 132. Fotos da rainha de *A. sexdens*, em A, e *A. nomius* ASR3 isolado dessa formiga, em B.

Apesar das interações biológicas desse fungo com insetos já serem conhecidas, as substâncias produzidas pelo fungo *Aspergillus nomius* no momento da infecção ainda não foram descritas. Diante disso, os extratos em acetato de etila do fungo cultivado em meio PDA por 14 dias a 30 °C e da rainha de onde esse fungo foi isolado foram analisados por HR-ESI-MS na tentativa de identificar as substâncias presentes. Conforme pode-se visualizar na figura 134, os íons de m/z 335,05 e m/z 351,04 estão presentes nos espectros do extrato em acetato de etila do fungo e da rainha morta. As massas de alta resolução (Tab. 16 e 17) e as fragmentações em fase gasosa (Fig. 135 e 136) são condizentes com as estruturas das aflatoxinas B1 (**15**) e G1 (**16**) (figura 133; CAVALIERE et al., 2007; SIRHAN et al., 2013; TÓTH et al., 2013).

Figura 133. Aflatoxinas B1 (**15**) e G1 (**16**) produzidas pelo fungo *A. nomius* ASR3.

As aflatoxinas são micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* e são tóxicas para seres humanos, animais e insetos (KIRK, 1971; GACEM e HADJ-KHELIL, 2016). As aflatoxinas B1 e G1 já foram identificadas em cultivos de *A. nomius*, e são conhecidas pela elevada toxicidade (CALDERARI et al., 2013; BARANYI et al., 2016). As aflatoxinas são um grande problema em contaminações de cereais por fungos *Aspergillus* spp., uma vez que esses fungos produzem aflatoxinas durante a ploriferação, e os alimentos contaminados são considerados impróprios para consumo (BARANYI et al., 2016; AL-TAHER et al., 2017).

Apesar do conhecimento sobre a produção e toxicidade de aflatoxinas, pouco se sabe sobre as funções ecológicas desses produtos naturais produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*. Essas micotoxinas foram produzidas pelo fungo *A. nomius* ASR3 em condições laboratoriais e na rainha de *Atta sexdens rubropilosa* que estava morta. Diante disso, é possível que as aflatoxinas B1 e G1 estejam envolvidas na virulência dos fungos entomopatogênicos da espécie *Aspergillus nomius*.

Tabela 16. Principais íons observados nos espectros de HRESIMS do extrato em acetato de etila do fungo *A. nomius* ASR3 cultivado no meio PDA.*

Substância	Formula molecular	m/z obtida	m/z calc.	Erro (ppm)
Aflatoxina B1	$C_{17}H_{13}O_6^+$	313,0712	313,0707	1,59
Aflatoxina B1	$C_{17}H_{12}O_6Na^+$	335,0532	335,0526	1,79
Aflatoxina G1	$C_{17}H_{13}O_7^+$	329,0661	329,0656	1,52
Aflatoxina G1	$C_{17}H_{12}O_7Na^+$	351,0451	351,0475	6,84

* Os íons referentes às aflatoxinas protonadas foram observados após a adição de uma pequena quantidade de ácido fórmico na amostra que foi analisada.

Tabela 17. Principais íons observados nos espectros de HRESIMS do extrato em acetato de etila da rainha de *Atta sexdens rubropilosa* infestada com o fungo *A. nomius* ASR3.*

Substância	Formula molecular	m/z obtida	m/z calc.	Erro (ppm)
Aflatoxina B1	$C_{17}H_{13}O_6^+$	313,0711	313,0707	1,27
Aflatoxina B1	$C_{17}H_{12}O_6Na^+$	335,0530	335,0526	1,19
Aflatoxina G1	$C_{17}H_{13}O_7^+$	329,0658	329,0656	0,61
Aflatoxina G1	$C_{17}H_{12}O_7Na^+$	351,0454	351,0475	5,98

* Os íons referentes às aflatoxinas protonadas foram observados após a adição de uma pequena quantidade de ácido fórmico na amostra que foi analisada.

Figura 134. Espectros de HR-ESI-MS dos extratos em acetato de etila da rainha de *A. sexdens* morta (A), do cultivo do fungo *A. nomius* ASR3 em meio PDA (B) e do controle contendo apenas o meio PDA (C). As setas vermelhas estão indicando os sinais referentes às aflatoxinas.

Figura 136. Espectro de ESI-MS/MS do íon m/z 329 referente à aflatoxina G1 protonada, obtido em micrOTOF Q II operado no modo positivo com energia de colisão variando de 5 a 40 eV.

Conclusões

5 Conclusões

Os estudos químicos das bactérias isoladas de colônias de *Atta sexdens rubropilosa* forneceram informações sobre compostos potencialmente envolvidos na interação entre formigas e bactérias. A bactéria *Serratia marcescens* 3B2 produziu as mesmas substâncias utilizadas pelas formigas como componentes do ferômonio de trilha e de secreções das glândulas metapleurais dessas formigas. As pirazinas **5** e **6** foram produzidas apenas na presença de L-treonina, e os estudos de marcação isotópica indicaram que esse aminoácido é precursor biossintético dessas substâncias. Os antibióticos oocidina, andrimide e serratamolide (**8**, **9** e **10**) também foram produzidos pela bactéria *Serratia marcescens* 3B2 e podem auxiliar na proteção das colônias de formigas cortadeiras contra o ataque de patógenos.

Bactérias do gênero *Pseudonocardia* foram isoladas do corpo e jardim fúngico. A ausência de *Pseudonocardia* spp. no exoesqueleto das formigas, juntamente com o baixo número de colônias obtido em cada isolamento, indicam que essas bactérias não são componentes majoritárias da microbiota das formigas *Atta sexdens rubropilosa*. As linhagens de *Pseudonocardia* sp. foram capazes de inibir o crescimento de fungos do gênero *Escovopsis*. devido a produção de ácido indol-3-acético (**12**). Esses resultados indicam que as bactérias *Pseudonocardia* também podem ser importantes para a manutenção da homeostase das colônias dessas formigas cortadeiras.

O crescimento do fungo *Escovopsis* sp. também foi inibido por bactérias *Burkholderia* sp., que foram isoladas dos jardins. O isolamento de bactérias produtoras de antibióticos a partir de amostras de jardins fúngicos é interessante, uma vez que mostra que existem bactérias que podem inibir diretamente o crescimento patógenos nos alimentos das formigas. A atividade antifúngica da linhagem *Burkholderia* sp. JB2 foi atribuída a substância tropolone (**13**) e a atividade desse produto natural foi inibida na presença de ferro. Esse resultado pode ser explorado para o desenvolvimento de métodos de controle de formigas cortadeiras utilizando ferro para desestabilizar uma possível forma de defesa das colônias de *Atta sexdens rubropilosa*. Além disso, foi verificado por MEV que os jardins cultivados pelas formigas possuem uma camada impermeável a água que pode ser uma defesa adicional das colônias.

O fungo *Aspergillus nomius* ASR3 foi isolado de uma rainha morta de *Atta sexdens rubropilosa* e produziu as aflatoxinas B1 (**15**) e G1 (**16**) em condições laboratoriais e na formiga de onde foi isolado. Esses resultados indicam possíveis funções ecológicas das aflatoxinas, que podem ser importantes para a patogenicidade de *Aspergillus nomius* ASR3 frente a essas formigas cortadeiras.

A caracterização estrutural e funcional dos compostos produzidos pelas linhagens bacterianas estudadas sugere que a microbiota associada a *Atta sexdens rubropilosa* pode participar efetivamente da manutenção da saúde da colônia. As bactérias podem produzir compostos bioativos, além de eventualmente contribuírem em funções específicas das formigas, como demonstrado pela produção de componentes dos feromônios de trilha e secreções das glândulas metapleurais. Os resultados obtidos permitiram, portanto, avançar no conhecimento das relações simbióticas entre micro-organismos e formigas da tribo Attini.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- AL-TAHER, F.; CAPPOZZO, J.; ZWEIGENBAUM, J.; LEE, H. J.; JACKSON, L.; RYU, D. Detection and quantitation of mycotoxins in infant cereals in the U.S. market by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. **Food Control**, v. 72, p. 27-35, 2017.
- AMIN, S. A.; HMELO, L. R.; TOL, H. M.; DURHAM, B. P.; CARLSON, L. T.; HEAL, K. R.; MORALES, R. L.; BERTHIAUME, C. T.; PARKER, M. S.; DJUNAEDI, B.; INGALLS, A. E.; PARSEK, M. R.; MORAN, M. A.; ARMBRUST, E. V. Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. **Nature**, p. 98-101, v. 522, 2015.
- ANGERMAN, N. S.; DANYLUK, S. S. A study of the 220 MHz proton resonance spectra for a series of biologically important acridine-type heterocycles. **Organic Magnetic Resonance**, v. 4, p. 895-906, 1972.
- 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.
- BARANYI, N.; KOCSUBÉ, S.; VARGA, J. Aflatoxins: climate change and biodegradation. **Current Opinion in Food Science**, doi:10.1016/j.cofs.2015.09.002, 2016.
- BECERRA, J. X.; VENABLE, G. X.; SAEIDI, V. Wolbachia-Free Heteropterans Do Not Produce Defensive Chemicals or Alarm Pheromones. **Journal of Chemical Ecology**, v. 41, p. 593-601, 2015.
- BLIN, K.; MEDEMA, M.H.; KAZEMPOUR, D.; FISCHBACH, M.A.; BREITLING, R.; TAKANO, E.; WEBE, T. antiSMASH 2.0-a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 204-212, 2013.
- CAFARO, M. J.; POULSEN, M.; LITTLE, A. E. F.; PRICE, S. L.; GERARDO, N. M.; WONG, B.; STUART, A. E.; LARGET, B.; ABBOT, P.; CURRIE, C. R. Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 278, p. 1814-1822, 2011.

CALDERA, E. J.; CURRIE, C. R. The Population Structure of Antibiotic-Producing Bacterial Symbionts of *Apterostigma dentigerum* Ants: Impacts of Coevolution and Multipartite Symbiosis. **The American Naturalist**, v. 180, n. 5, 2012.

CALDERARI, T. O.; IAMANAKA, B. T.; FRISVAD, J. C.; PITT, J. I.; SARTORI, D.; PEREIRA, J. L.; FUNGARO, M. H. P.; TANIWAKI, M. H. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in brazil nuts: From rainforest to consumer. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p. 267-272, 2013.

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.

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI-JR, M.; LACHANCE, M. A.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; RUIVO, C. C. C.; ROSA, C. A. *Sympodiomyces attinorum* sp. nov., a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1891-1894, 2004.

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; BACCI-JR, M.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O. A. Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 71, p. 243-248, 1997.

CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; GUARINO, C.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Determination of aflatoxins in olive oil by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 596, p. 141 – 148, 2007.

CHALUPOWICZ, L.; BARASH, I.; SCHWARTZ, M.; ALONI, R.; MANULIS, S. Comparative anatomy of gall development on *Gypsophila paniculata* induced by bacteria with different mechanisms of pathogenicity. **Planta**, v. 224, p. 429-437, 2006.

CHIN C.S., et al. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long read SMRT sequencing data. **Nature Methods**, p. 563-569, v. 10, 2013.

CHOUVENC, T.; EFSTATHION, C.A.; ELLIOTT, M.L.; SU, N.Y. Resource competition between two fungal parasites in subterranean termites. **Naturwissenschaften**, v. 99, p. 949- 58, 2012.

CRAWFORD, J. M.; CLARDY, J. Bacterial symbionts and natural products. **Chemical Communications**, v. 47, p. 7559 - 7566, 2011.

CROSS, J. H.; BYLER, R. C.; RAVID, U.; SILVERSTEIN, R. M.; ROBINSON, S. W.; BAKER, P. M.; OLIVEIRA, J. S.; JUTSUM, A. R.; CHERRETT, M. The major component of the trail pheromone of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa* forel, 3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine. **Journal of Chemical Ecology**, v. 5, p. 187-203, 1979.

CROSS, J. H.; WEST, J. R.; SILVERSTEIN, R. M.; JUTSUM, A. R.; CHERRETT, J. M. Trail pheromone of the leaf-cutting ant, *Acromyrmex octospinosus* (Reich), (Formicidae: Myrmicinae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 8, p. 1119-1124, 1982.

CURRIE, C. R.; BOT, A. N. M.; BOOMSMA, J. J. Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. **OIKOS**, v.101, p. 91-102, 2003b.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 7998-8002, 1999a.

CURRIE, C. R.; POULSEN, M.; MENDENHALL, J.; BOOMSMA, J. J.; BILLEN, J. Coevolved Crypts and Exocrine Glands Support Mutualistic Bacteria in Fungus-Growing Ants. **Science**, v. 311, p. 81-83, 2006.

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, p. 701-505, 1999b.

CURRIE, C. R.; WONG, B.; STUART, A. E.; SCHULTZ, T. R.; REHNER, S. A.; MUELLER, U. G.; SUNG, G. H.; SPATAFORA, J. W.; STRAUS, N. A. Ancient Tripartite Coevolution in the Attine Ant-Microbe Symbiosis. **Science**, v. 299, p. 386-388, 2003a.

CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings of The Royal Society B**, v. 268, p. 1033-1039, 2001.

D'COSTA, V. M.; KING, C. E.; KALAN, L.; MORAR, M.; SUNG, W. W. L.; SCHWARZ, C.; FROESE, D.; ZAZULA, G.; CALMELS, F.; DEBRUYNE, R.; GOLDING, G. B.; HENDRIK N. POINAR, H. N.; WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, p. 457-461, 2011.

DEJONG, C. A.; CHEN, G. M.; LI, H.; JOHNSTON, C. W.; EDWARDS, M. R.; REES, P. N.; SKINNIDER, M. A.; WEBSTER, A. L. H.; MAGARVEY, N. A. Polyketide and nonribosomal peptide retro-biosynthesis and global gene cluster matching. **Nature Chemical Biology**, doi:10.1038/nchembio.2188, 2016.

DILLON, R. J.; VENNARD, C. T.; A. K. CHARNLEY Exploitation of gut bacteria in the locust. **Nature**, v. 403, p. 851, 2000.

DOSSEY, A. T.; GOTTARDO, M.; WHITAKER, J. M.; ROUSH, W. R.; EDISON, A. S. Alkyldimethylpyrazines in the Defensive Spray of *Phyllium westwoodii*: A First for Order Phasmatodea. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, p. 861-870, 2009.

DUNCAN, K. R.; CRÜSEMANN, M.; LECHNER, A.; SARKAR, A.; LI, J.; ZIEMERT, N.; WANG, M.; BANDEIRA, N.; MOORE, B. S.; DORRESTEIN, P. C.; JENSEN, P. R. Molecular Networking and Pattern-Based Genome Mining Improves Discovery of Biosynthetic Gene Clusters and their Products from *Salinispora* Species. **Chemistry & Biology**, v. 22, p. 460-471, 2015.

DWIVEDI, D.; JANSEN, R.; MOLINARI, G.; NIMTZ, M.; JOHRI, B.N.; WRAY, V. Antimycobacterial Serratamolides and Diacyl Peptoglucosamine Derivatives from *Serratia* sp. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 637-641, 2008.

EID, J. et al., Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. **Science**, p. 133-138, v. 323, 2009.

ESCOBAR-DÍAZ, E.; LÓPEZ-MARTÍN, E.M; CERRO, M.H.; PUIG-KROGER, A.; SOTO-CERRATO, V.; MONTANER, B.; GIRALT, E.; GARCÍA-MARCO, J.A.; PÉREZ-TOMÁS, R.; GARCIA-PARDO, A. AT514, a cyclic depsipeptide from *Serratia marcescens*, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells: interference with the Akt/NF- κ B survival pathway. **Leukemia**, v. 19, p. 572–579, 2005.

EVERSHED, R. P.; MORGAN, E. D. The amounts of trail pheromone substances in the venom of workers of four species of attine ants. **Insect Biochemistry**, v. 13, p. 469-474, 1983.

FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; NASH, D. R.; HIGGINBOTHAM, S.; ESTRADA, C.; VAN ZWEDEN, J. S.; D'ETTORRE, P.; WCISLO, W. T.; BOOMSMA, J. J. Functional role of phenylacetic acid from metapleural gland secretions in controlling fungal pathogens in evolutionarily derived leaf-cutting ants. **Proceedings of The Royal Society B**, v. 282, 2015.

FOX, G. E.; STACKEBRANDT, E.; HESPELL, R. B.; GIBSON, J.; MANILOFF, J.; DYER, T. A.; WOLFE, R.S.; BALCH, W. E.; TANNER, R. S.; MAGRUM, L. J.; ZABLEN, L. B.; BLAKEMORE, R.; GUPTA, R.; BONEN, L.; LEWIS, B. J.; STAHL, D. A.; LUEHRSEN, K. R. CHEN, K. N.; WOESE, C. R. The phylogeny of prokaryotes. **Science**, v. 209, p. 457-463, 1980.

FREDENHAGEN, A.; TAMURA, S.Y.; KENNY, P.T.M.; KOMURA, H.; NAYA, Y.; NAKANISHI, K.; NISHIYAMA, K.; SUGIURA, M.; KITA, H. Andrimid, a New Peptide Antibiotic Produced by an Intracellular Bacterial Symbiont Isolated from a Brown Planthopper. **Journal of American Chemical Society**, v. 109, p. 4409-4411, 1987.

FREINKMAN, E.; OH, D. C.; SCOTT, J. J.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Bionectriol A, a polyketide glycoside from the fungus *Bionectria* sp. associated with the fungus-growing ant, *Apterostigma dentigerum*. **Tetrahedron Letters**, v. 50, p. 6834-6837, 2009.

GACEM, M. A.; HADJ-KHELIL, A. O. E. Toxicology, biosynthesis, bio-control of aflatoxin and new methods of detection. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, p. 808-814, 2016.

GERARDO, N. M.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R. Complex host-pathogen coevolution in the *Apterostigma* fungus-growing ant-microbe symbiosis. **BMC Evolutionary Biology**, v. 6, p. 1471-2148, 2006.

GRUBE, M.; CARDINALE, M.; CASTRO-JR, J. V.; MÜLLER, H.; BERG, G. Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, v. 3, p. 1105-1115, 2009.

HAEDER, S.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. Candididin-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, p. 4742-4746, 2009.

HÖGBERG, L. D.; HEDDINI, A.; CARS, O. The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, p. 509-515, 2010.

HUGHES, W. O. H.; THOMSEN, L.; EILENBER, J.; BOOMSMA, J. J. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 46-53, 2004.

JEŠOVNIK, A.; GONZÁLEZ, V. L.; SCHULTZ, T. R. Phylogenomics and Divergence Dating of Fungus-Farming Ants (Hymenoptera: Formicidae) of the Genera *Sericomyrmex* and *Apterostigma*. **Plos One**, DOI: 10.1371/journal.pone.0151059, 2016.

JIN, M.; FISCHBACH, M. A.; CLARDY, J. A Biosynthetic Gene Cluster for the Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitor Andrimid. **Journal of the American Chemical Society** v. 128, p. 10660–10661, 2006.

JOHNSTON, C. W.; SKINNIDER, M. A.; WYATT, M. A.; LI, X.; RANIERI, M. R. M.; YANG, L.; ZECHEL, D. L.; MA, B.; MAGARVEY, N. A. An automated Genomes-to-Natural Products platform (GNP) for the discovery of modular natural products. **Nature Communications**, DOI: 10.1038/ncomms9421, 2015.

KIRK, H. D. Effect of aflatoxin B1 on development of *Drosophila melanogaster* (Diptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 18, p. 313 – 315, 1971.

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

KOMATSUBARA, S.; MURATA, K.; KISUMI, M.; CHIBATA, I. Threonine Degradation by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 135, p. 318-323, 1978.

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

LI, H.; TANIKAWA, T.; SATO, Y.; NAKAGAWA, Y.; MATSUYAMA, T. *Serratia marcescens* Gene Required for Surfactant Serrawettin W1 Production Encodes Putative Aminolipid Synthetase Belonging to Nonribosomal Peptide Synthetase Family. **Microbiology Immunology**, v. 49, p. 303-310, 2005.

LI, J.; FALCONE, E. R.; HOLSTEIN, S. A.; ANDERSON, A. C.; WRIGHT, D. L.; WIEMER, A. J. Novel substituted tropolones promote potent and selective caspase-dependent leukemia cell apoptosis. **Pharmacological Research**, v. 113, p. 438-448, 2016.

LICHT, H. H. F.; BOOMSMA, J. J. Forage collection, substrate preparation, and diet

composition in fungus-growing ants. **Ecological Entomology**, v. 35, p. 259-269, 2010.

LICHT, H. H.; BOOMSMA, J. J.; TUNLID, A. Symbiotic adaptations in the fungal cultivar of leaf-cutting ants. **Nature Communications**, v. 5, n. 5675, 2014.

LINDBERG, G. D. An antibiotic lethal to fungi, **Plant Disease**, v. 65, p. 680-683, 1981.

LINDBERG, G. D.; LARKIN, J. M. Production of tropolone by a *Pseudomonas*. **Journal of Natural Products**, v. 43, p. 592-594, 1980.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. **Biology Letters**, v. 3, p. 501-504, 2007.

LITTLE, A. E. F.; MURAKAMI, T.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R. Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. **Biology Letters**, v. 2, p. 12-16, 2006.

LOPES, A. A.; PINA, E. S.; SILVA, D. B.; PEREIRA, A. M. S.; SILVA, M. F. G. F.; COSTA, F. B.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T. A biosynthetic pathway of sesquiterpene lactones in *Smallanthus sonchifolius* and their localization in leaf tissues by MALDI imaging. **Chemical Communications**, v. 49, p. 9989-9991, 2013.

MAHMUD, T. Isotope tracer investigations of natural products biosynthesis: the discovery of novel metabolic pathways. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, v. 50, p. 1039-1051, 2007.

MANZANO-MARÍN, A.; LATORRE, A. Settling Down: The Genome of *Serratia symbiotica* from the Aphid *Cinara tujaefilina* Zooms in on the Process of Accommodation to a Cooperative Intracellular Life. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, p. 1683-1698, 2014.

MARSH S.E.; POULSEN M.; GOROSITO N.B.; PINTO-TOMÁS A.; MASIULIONIS V.E.; CURRIE C.R. Association between *Pseudonocardia* symbionts and *Atta* leaf-cutting ants suggested by improved isolation methods. **International Microbiology**, v. 16, p. 17-25, 2013.

MATILLA, M. A.; STÖCKMANN, H.; FINIAN J. LEEPER, AND GEORGE P. C.

SALMOND. Bacterial Biosynthetic Gene Clusters Encoding the Anti-cancer Haterumalide Class of Molecules. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 287, p. 39125-39138, 2012.

MARICONI, F. A. M. Trabalhos experimentais de combate à "saúva limão" ou "saúva comum" *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 21, p. 279-307, 1964.

MATTOSO, T. C.; MOREIRA, D. D. O.; SAMUELS, R. I. Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* protect workers from attack by entomopathogenic fungi. **Biology Letters**, v. 8, p. 461-464, 2012.

MEIRELLES, L. A.; SOLOMON, S. E.; BACCI-JR, M.; WRIGHT, A. M.; MUELLER, U. G.; RODRIGUES, A. Shared *Escovopsis* parasites between leaf-cutting and non-leaf-cutting ants in the higher attine fungus-growing ant symbiosis. **Royal Society Open Science**, v. 2, p 1-11, 2015.

MENEZES, C.; VOLLET-NETO, V.; 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. 1-5, 2015.

MOHIMANI, H.; KERSTEN, R. D.; LIU, W. T.; WANG, M.; PURVINE, S. O.; WU, S.; BREWER, H. M.; PASA-TOLIC, L.; BANDEIRA, N.; MOORE, B. S.; PEVZNER, P. A.; DORRESTEIN, P. C. Automated Genome Mining of Ribosomal Peptide Natural Products. **ACS Chemical Biology**, v. 9, p. 1545-1551, 2014.

MOLLA, G.; NARDINI, M.; MOTTA, P.; D'ARRIGO, P.; PANZERI, W.; POLLEGIONI, L. Aminoacetone oxidase from *Streptococcus oligofermentans* belongs to a new three-domain family of bacterial flavoproteins. **Biochemical Journal**, v. 464, p. 387-399, 2014.

MORGAN, E. D.; KEEGANS, S. J.; TITS, J.; WENSELEERS, T.; BILLEN, J. Preferences and differences in the trail pheromone of the leaf-cutting ant *Atta sexdens sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). **European Journal of Entomology**, v. 103, p. 553-558, 2006.

MORITA, Y.; MATSUMURA, E.; OKABE, T.; SHIBATA, M.; SUGIURA, M.; OHE, T.; TSUJIBO, H.; ISHIDA, N.; INAMORI, Y. Biological Activity of Tropolone. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 1487-1490, 2003.

MUELLER, U. G.; GERARDO, N.; AANEN, D. K.; SIX, D. L.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture in insects. **Annual Review Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 36, p. 563-595, 2005.

NASCIMENTO, R. R.; SCHOETERS, E.; MORGAN, E. D.; BILLEN, J.; STRADLING, D. J. Chemistry of metapleural gland secretions of three attine ants, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes*, and *Acromyrmex octospinosus* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE). **Journal of Chemical Ecology**, v. 22, p. 987-1000, 1996.

NELSON D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, ed. W. H. Freeman & Company, 4th ed., 2004, cap. 16, p. 602.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.

NUTTALL, G. H. F. Symbiosis in Animals and Plants. **Nature**, v. 112, p. 657-660, 1923.

OH, D. C.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 391-393, 2009.

ORTIUS-LECHNER, D.; MAILE, R.; MORGAN, E. D.; BOOMSMA, J. J. Metapleural gland secretion of the leaf-cutter ant *Acromyrmex octospinosus*: new compounds and their functional significance. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p.1667-1683, 2000.

PAGNOCCA, F. C.; MASIULIONIS, V. E.; RODRIGUES, A. Specialized Fungal Parasites and Opportunistic Fungi in Gardens of Attine Ants. **Psyche**, v. 2012, doi:10.1155/2012/905109, 2012.

PALUDO, C. R.; RUZZINI, A. C.; SILVA-JUNIOR, E. A.; PISHCHANY, G.; CURRIE, C. R.; NASCIMENTO, F. S.; 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.

PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant–rhizobacteria interactions. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 189-199, 2003.

POULSEN, M.; MAYNARD, J.; ROLAND, D. L.; CURRIE, C. R. The role of symbiont genetic distance and potential adaptability in host preference towards

Pseudonocardia symbionts in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Journal of Insect Science**, v. 11, p. 1-12, 2011.

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.; HUGHES, W.O.H.; BOOMSMA J.J. Differential resistance and the importance of antibiotic production in *Acromyrmex echinator* leaf-cutting ant castes towards the entomopathogenic fungus *Aspergillus nomius*. **Insectes Sociaux**. v. 53, p. 1-7, 2006.

REYNOLDS H. T.; CURRIE C. R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. **Mycologia**, v.96, p. 955-959, 2004.

RODRIGUES, A.; CABLE, R. N.; MUELLER, U. G.; BACCI-JR, M.; PAGNOCCA, F. C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungi garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, p. 331-342, 2009.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F.C.; BACCI-Jr, M.; HEBLING, M.J.A.; BUENO, O.C.; PFENNING, L.H. Variability of Non-Mutualistic Filamentous Fungi Associated with *Atta sexdens rubropilosa* Nests. **Folia Microbiologica**. v. 50, p. 421-425, 2005.

SAIER, M. H. Families of transmembrane transporters selective for amino acids and their derivatives. **Microbiology**, v. 146, p. 1775-1795, 2000.

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

SCHILDKNECHT, H.; REED, P. B.; REED, F. D.; KOOB, K. Auxin activity in the symbiosis of leaf-cutting ants and their fungus. **Insect Biochemistry**, v. 3, p. 439-442, 1973.

SIRHAN, A.Y.; TAN, G.H.; WONG, R.C.S. Determination of aflatoxins in food using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry (LC-ESI-QTOF-MS/MS). **Food Control**, v. 31, p. 35-44, 2013.

SCHILDKNECHT, H.; KOOBL, K. Myrmicacin, The First Insect Herbicide. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 10, p. 124-125, 1971.

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, p. 1955-1960, 2011.

SCHOETERS, E.; BILLEN, J. Morphology of the venom gland in relation to worker size in leaf-cutting ants (formicidae, Attini). **Insectes Sociaux**, v. 6, p. 249-252, 1990.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 5435-5440, 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.

SEIPKE, R. F.; BARKE, J.; BREARLEY, C.; HILL, L.; YU, D. W.; GOSS, R. J. M.; HUTCHINGS, M. I. A Single *Streptomyces* Symbiont Makes Multiple Antifungals to Support the Fungus Farming Ant *Acromyrmex octospinosus*. **Plos One**, v. 6, p. 1-8, 2011.

SHOWALTER, D. N.; TROYER, E. J.; AKLU, M.; JANG, E. B.; SIDERHURST, M. S. Alkylpyrazines: alarm pheromone components of the little fire ant, *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera, Formicidae). **Insectes Sociaux**, v. 57, p. 223–232, 2010.

SILVER, L. L. Are natural products still the best source for antibacterial discovery? The bacterial entry factor. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 3, p. 487-500, 2008.

SIT, C. S.; RUZZINI, A. C.; ARNAM, E. B. V.; 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.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, p. 425-448, 2007.

SPRIBILLE, T.; TUOVINEN, V.; RESL, P.; VANDERPOOL, D.; WOLINSKI, H.; AIME, M.C.; SCHNEIDER, K.; STABENTHEINER, E.; TOOME-HELLER, M.; THOR, G.; MAYRHOFFER, H.; JOHANNESSON, H.; MCCUTCHEON, J.P. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. **Science**, 10.1126/science.aaf8287, 2016.

SROBEL, G.; LI, J.Y.; SUGAWARA, F.; KOSHINO, H.; HARPER, J.; HESS, W. M. Oocydin A, a chlorinated macrocyclic lactone with potent anti-oomycete activity from *Serratia marcescens*. **Microbiology**, v. 145, p. 3557 - 3564, 1999.

STONE, L. K.; BAYM, M.; LIEBERMAN, T. D.; CHAIT, R.; CLARDY, J.; KISHONY, R. Compounds that select against the tetracycline-resistance efflux pump. **Nature Chemical Biology**, DOI: 10.1038/NCHEMBIO.2176, 2016.

THIEL, V.; BRINKHOFF, T.; DICKSCHAT, J. S.; WICKEL, S.; GRUNENBERG, J.; WAGNER-DÖBLER, I.; SIMON, M.; SCHULZ, S. Identification and biosynthesis of tropone derivatives and sulfur volatiles produced by bacteria of the marine *Roseobacter* clade. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 8, p. 234–246, 2010.

TÓTH, K.; NAGY, L.; MÁNDI, A.; KUKI, Á.; MÉZES, M.; ZSUGA, M.; KÉKI, S. Collision-induced dissociation of aflatoxins. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 27, p. 553–559, 2013.

TRUST, T. J. Antibacterial Activity of Tropolone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 7, p. 500-506, 1975.

VAN ARNAM, E. B.; RUZZINI, A. C.; SIT, C. S.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. A. Rebecamycin Analog Provides Plasmid-Encoded Niche Defense. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, p. 14272-14274, 2015.

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

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, p. 277-283, 2015.

VISSER, A. A.; NOBRE, T.; C. R. CURRIE; AANEN, D. K.; POULSEN, M. Exploring the Potential for Actinobacteria as Defensive Symbionts in Fungus-Growing Termites. **Microbial Ecology**, v. 63, p. 975-985, 2012.

VIZCAINO, M. I.; CRAWFORD, J. M. The colibactin warhead crosslinks DNA. **Nature Chemistry**, v. 7, p. 411-417, 2015.

WADA-KATSUMATA, A.; ZUREK, L.; NALYANYA, G.; ROELOFS, W. L.; ZHANG, A.; SCHAL, C. Gut bacteria mediate aggregation in the German cockroach. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, p. 15678-15683, 2015.

WANG, M.; TACHIBANA, S.; MURAI, Y.; LI, L.; LAU, S.Y.L.; CAO, M.; ZHU, G.; HASHIMOTO, M.; HASHIDOKO, Y. Indole-3-Acetic Acid Produced by *Burkholderia heleia* Acts as a Phenylacetic Acid Antagonist to Disrupt Tropolone Biosynthesis in *Burkholderia plantarii*. **Scientific Reports**, DOI: 10.1038/srep22596, 2016.

WEBER, N. A. Fungus-Growing Ants. **Science**, v. 153, p.587-604, 1966.

WENCEWICZ, T. A. New Antibiotics from Nature's Chemical Inventory. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.09.014>, 2016.

World Health Organization; **Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance**. 2014.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

YEK, S. H.; NASH, D. R.; JENSEN, A. B.; BOOMSMA, J. J. Regulation and specificity of antifungal metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 279, 4215-4222, 2012.

ZANETTI, R.; DIAS, N.; REIS, M.; SOUZA-SILVA, A.; MOURA, M. A. Eficiência de iscas granuladas (sulfluramida 0,3%) no controle de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 878-882, 2004.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; SANTOS, J. C.; WILLIAN SILVA, W. L. P.; RIBEIRO, G. T.; LEMES, P. G. An Overview of Integrated Management of Leaf-Cutting Ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian Forest Plantations. **Forests**, v. 5, p. 439-454, 2014.