

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.

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 simbionte 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 simbionte, 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 biosíntese 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 simbionte 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.

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 simbiontes 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 simbiontes

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 neotropicais 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 simbiontes, enquanto que as formigas *Acromyrmex* spp. e *Atta* spp. coletam material vegetal (Fig. 2; LICHT e BOOMSMA, 2010).

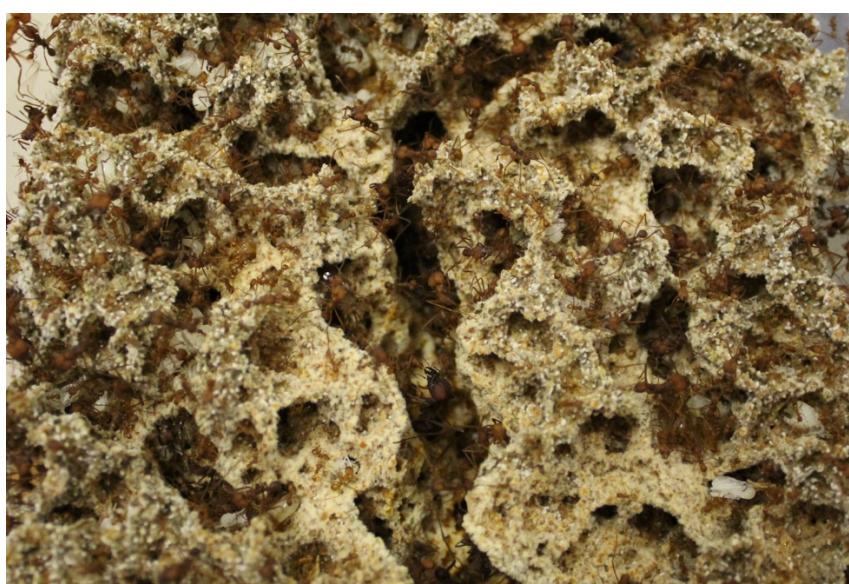


Figura 2. Jardim fúngico cultivado por *Atta sexdens rubropilosa*.

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 simbiontes, 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 defenderam do ataque de fungos patogênicos (CURRIE et al., 1999b). Essas bactérias simbiontes 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 simbiontes (CURRIE et al., 2006). Essas associações com as bactérias são tão específicas, que as formigas são capazes de diferenciar as suas bactérias simbiontes de outras bactérias não simbiontes (POULSEN et al., 2011). Além de protegerem os formigueiros, as bactérias simbiontes 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*.

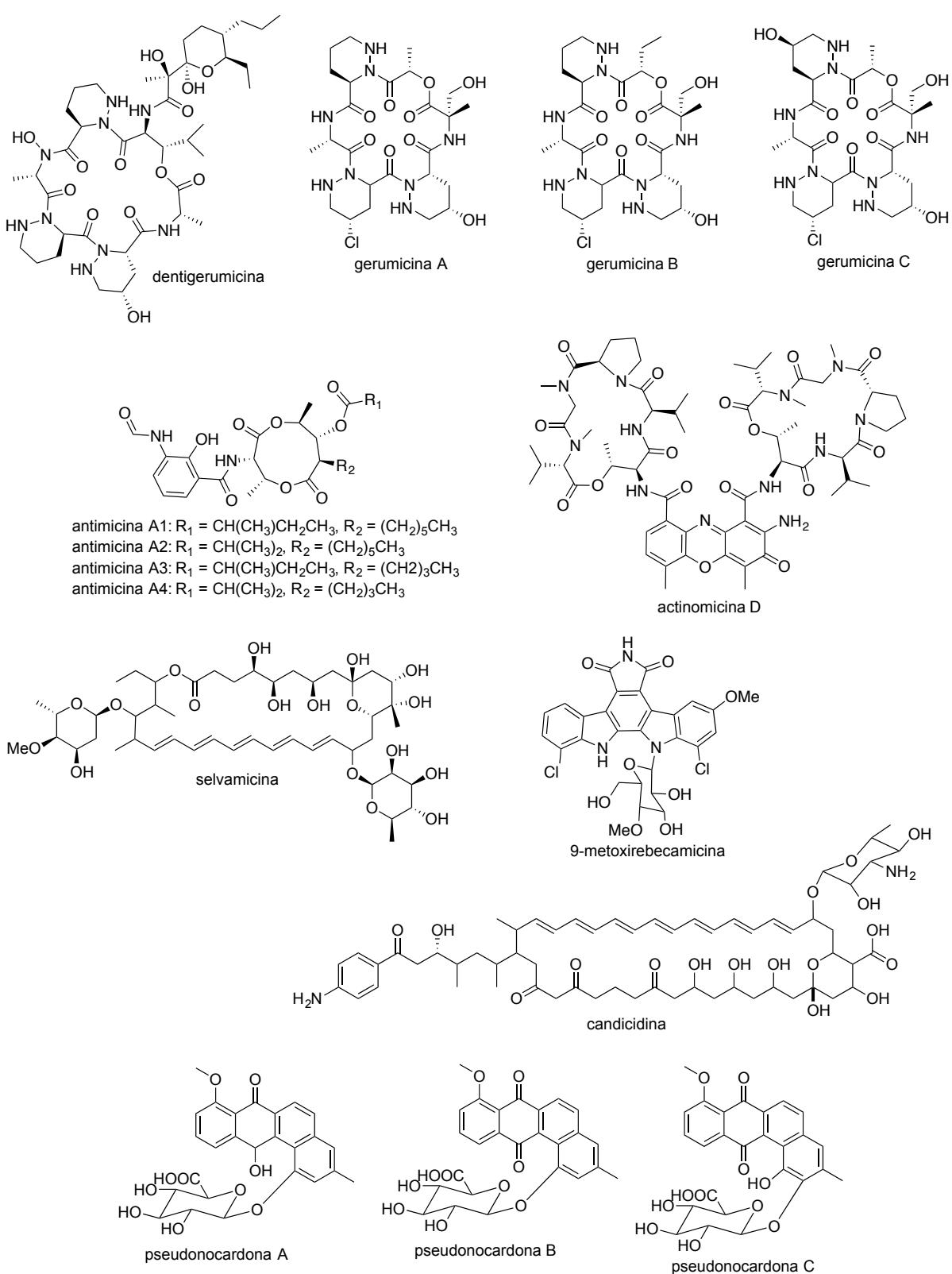


Figura 3. Produtos naturais isolados de bactérias associadas a formigas agricultoras.

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 candicidina (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 simbiontes. 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.

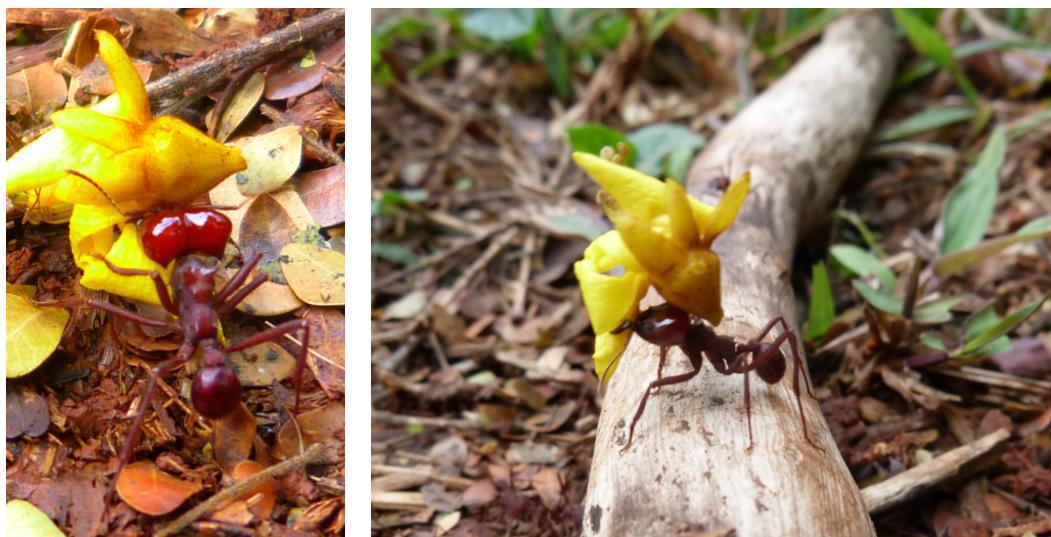


Figura 4. Formigas cortadeiras *Atta laevigata* coletando flores.

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.

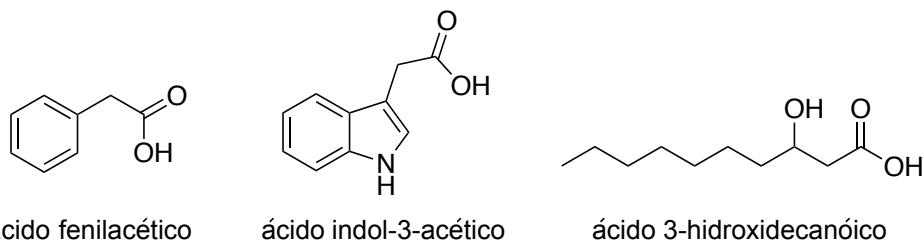


Figura 5. Substâncias presentes nas glândulas metapleurais de formigas cortadeiras.

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-dimetilpirazina, 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*.

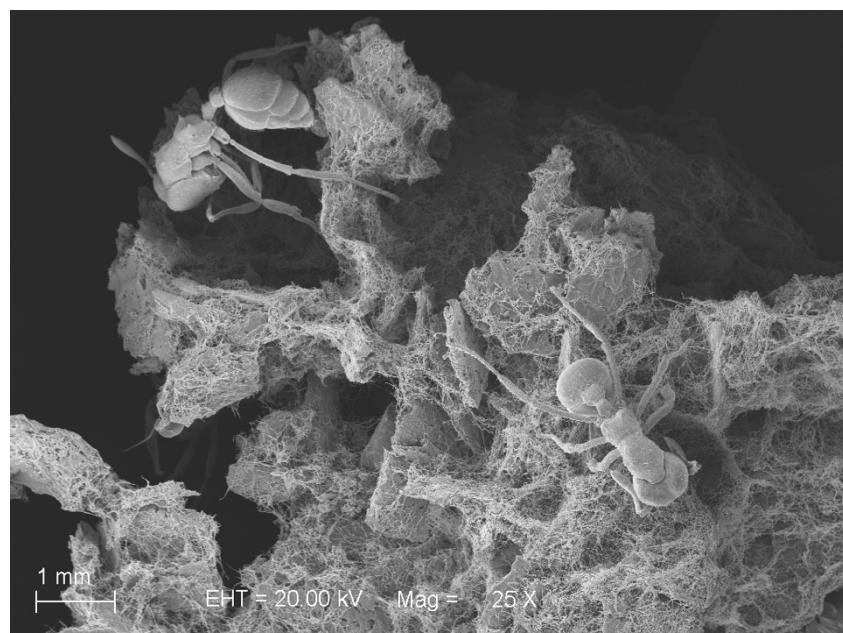


Figura 6. Foto de microscopia eletrônica de varredura de formigas *Atta sexdens rubropilosa* no jardim dos fungos simbiontes.

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 nucléicos (WENCEWICZ, 2016).

Nesse sentido, as bactérias simbiontes 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 ¹³C 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.

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 contribuirem 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.; PITI, 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. at 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 EcologyJournal**, v. 3, p. 1105-1115, 2009.

HAEDER, S.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. Candicidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, 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 tujafilina* 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 echinatior* 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 microfungal 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. Ocurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf- cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, p. 319-323, 2004.

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.

SCHILDKNACHT, 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.; MAYRHOFER, 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. Rebeccamycin Analog Provides Plasmid-Encoded Niche Defense. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, p. 14272-14274, 2015.

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

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

VISSEER, 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.