



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Produtos naturais envolvidos na simbiose entre *Streptomyces* spp. e insetos sociais

Carla Menegatti

**Ribeirão Preto
2021**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Produtos naturais envolvidos na simbiose entre *Streptomyces* spp. e insetos sociais

Carla Menegatti

**Ribeirão Preto
2021**

CARLA MENEGATTI

Produtos naturais envolvidos na simbiose entre *Streptomyces* spp. e insetos sociais

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 22/02/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Menegatti, Carla

Produtos naturais envolvidos na simbiose entre *Streptomyces* spp. e insetos sociais. Ribeirão Preto, 2021.

108 p.; 30 cm.

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

Orientadora: Pupo, Mônica Tallarico

1. *Streptomyces* sp. 2. *Acromyrmex* sp. 3. *Melipona scutellaris* 4. atividade antimicrobiana

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carla Menegatti

Produtos naturais envolvidos na simbiose entre *Streptomyces* spp. e insetos sociais

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meu pais, Maria Ester e José Carlos por não medirem esforços para que eu realize meus sonhos. Aos meus irmãos, Renato e Fernanda pelo carinho e proteção e aos meus sobrinhos Maria Júlia, Arthur e José Augusto por trazerem leveza e significado a vida.

À Profa. Dra. Mônica T. Pupo pela oportunidade de trabalhar em seu renomado grupo de pesquisa. Por toda ajuda durante esses anos, e por ter tido uma conduta exemplar durante a pandemia de COVID-19, priorizando nosso bem estar e sendo muito compreensiva. E claro, pelo exemplo de profissionalismo, ética e representatividade feminina na ciência.

À técnica Claudia Macedo, pela parceria incomparável, acolhimento e solicitude. Por me ajudar em várias tarefas, desde laboratoriais até burocráticas, as quais sequer eram suas funções.

Ao LQMo e agregados por tornarem essa jornada mais leve e divertida.

Aos meus queridos 'filhos' de iniciação científica, Vitor e Gabi, por toda troca e aprendizado. Fico muito feliz de ter participado, pelo menos que um pouco, do crescimento de vocês e sempre celebrarei com muito orgulho suas conquistas.

Aos técnicos, Vinicius Palaretti e José Carlos Tomaz que contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Tim S. Bugni por permitir o estágio sanduíche em seu laboratório na School of Pharmacy, University of Wisconsin-Madison-EUA. Ao Prof. Dr. Jon Clardy da Harvard Medical School, por ter financiado parcialmente dois congressos internacionais nos EUA.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (nº processo 2016/15576-3) e pelo financiamento deste projeto e ao Projeto Temático FAPESP-NIH/FIC 2013/50954-0. À CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche no exterior concedida (PDSE - 88881.189175/2018-01) e ao CNPq (nº processo 140213/2017-1). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

EPÍGRAFE

“I am among those who think that science has great beauty.”

Marie Curie

RESUMO

MENEGATTI, C. **Produtos naturais envolvidos na simbiose entre *Streptomyces* spp. e insetos sociais**. 2021. 108f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Os produtos naturais de micro-organismos desempenham um importante papel na descoberta de novos compostos bioativos. Insetos e micro-organismos estão envolvidos em complexas interações simbióticas e muitos compostos naturais inéditos e bioativos têm sido identificados destas relações. Sabe-se que os insetos sociais estão sujeitos a condições climáticas e populacionais que aumentam sua susceptibilidade a parasitas. Assim umas das estratégias de defesa adquirida durante a evolução dos insetos foi a associação simbiótica a bactérias capazes de biossintetizar compostos antimicrobianos contra patógenos. Este trabalho estudou os produtos naturais biossintetizados por bactérias associadas a formigas do gênero *Acromyrmex* (tribo Attini) e as abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris* (tribo Meliponini). Após ensaios de triagem biológica, quatro actinobactérias ativas contra os entomopatógenos - linhagens de fungos *Escovopsis* – quando associadas a formigas – e ao patógeno *Paenibacillus larvae* – quando em associação com as abelhas – foram quimicamente estudadas através de métodos cromatográficos, espectroscópicos e espectrométricos. Os respectivos extratos foram preparados e ensaiados contra os parasitas *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* e *L. infantum*. A partir dos resultados dos ensaios de triagem biológica, a actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG 328 foi selecionada para os estudos químicos, pois foi capaz de inibir duas linhagens do fungo *Escovopsis* e seu extrato em acetato de etila apresentou boa inibição frente aos parasitas *T. cruzi* e *L. donovani*. Do extrato em acetato de etila de ICBG 328 foram isolados seis policetídeos análogos conhecidos como cromomicinas (**22**, **23**, **24**, **25**, **26** e **27**). Três destes compostos apresentaram alta atividade leishmanicida. A actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG 197 foi ativa contra cinco linhagens do fungo *Escovopsis* e seu extrato em acetona apresentou 94% de inibição contra o parasita *L. donovani*. Do extrato em acetona do micro-organismo ICBG 197 foi isolada a nistatina (**28**). A nistatina apresentou atividade antifúngica contra duas linhagens do fungo *Escovopsis*, mostrando assim um possível papel ecológico que o micro-organismo ICBG 197 exerce em associação com formigas do gênero *Acromyrmex*, podendo auxiliar na proteção dos ninhos. *Streptomyces* sp. ICBG 171 também apresentou bons resultados contra os parasitas e do seu extrato em acetona foram isolados os compostos nigericina (**29**), elaiofilina (**30**), 11-O-metil-elaiofilina (**31**) e 11,11-O,O-dimetil-elaiofilina (**32**). O composto **29** apresenta atividade contra o fungo *Escovopsis* e **29**, **30**, **31** e **32** são conhecidos pela alta atividade antiparasitária exercida. Da associação com a abelha sem ferrão *Melipona scutellaris*, a actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG1318 produziu dois ciclodepsipeptídeos inéditos, denominados meliponamicina A (**33**) e meliponamicina B (**34**), que foram altamente ativos contra o patógeno *P. larvae* e apresentaram atividade contra os patógenos humanos *S. aureus* e *L. infantum*. Dessa maneira, este trabalho relata o isolamento e identificação de diversos compostos possivelmente envolvidos na mediação das interações simbióticas entre bactérias e insetos sociais, bem como seus potenciais leishmanicidas. Destaca-se ainda a actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG 1318 que provavelmente impacta positivamente o ambiente natural das abelhas *M. scutellaris* pela capacidade de biossintetizar as meliponamicinas bioativas.

Palavras-chave: *Streptomyces* sp., *Acromyrmex* sp., *Melipona scutellaris*, atividade antimicrobiana

ABSTRACT

MENEGATTI, C. **Natural products involved in the symbiosis between *Streptomyces* spp. and social insects.** 2021. 108f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Microbial natural products play an important role in the discovery of new bioactive compounds. Insects and microorganisms are involved in complex symbiotic interactions and many novel and bioactive natural compounds have been identified in these relationships. Social insects are subjected to climatic and population conditions that increase their susceptibility to parasites. Thus, one of the defense strategies acquired during the evolution of insects was the symbiotic association with bacteria capable of biosynthesizing antimicrobial compounds against pathogens. This work studied the natural products biosynthesized by bacteria associated with leaf-cutter ants *Acromyrmex* sp. and the stingless bee *Melipona scutellaris*. Biological screenings against entomopathogens led to the selection of four actinobacteria associated with ants, active against the fungus *Escovopsis*, and another strain associated with bees, active against the bacteria *Paenibacillus larvae*, to be chemically studied using chromatographic, spectroscopic, and spectrometric methods. The extracts were prepared and tested against the parasites *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* and *L. infantum*. The actinobacterium *Streptomyces* sp. ICBG 328 inhibited two *Escovopsis* strains and its ethyl acetate extract displayed good inhibition against the parasites *T. cruzi* and *L. donovani*. Six analogous polyketides known as chromomycins (**22**, **23**, **24**, **25**, **26** and **27**) were isolated from the ethyl acetate extract of *Streptomyces* sp. ICBG 328, and three of them showed high leishmanicidal activity. The actinobacterium *Streptomyces* sp. ICBG 197 was active against five *Escovopsis* strains and its acetone extract showed 94% inhibition against the parasite *L. donovani*. Nystatin was isolated from its extract (**28**) and showed antifungal activity against two *Escovopsis* strains, suggesting a possible defensive role of *Streptomyces* ICBG 197 in the ecological association with *Acromyrmex* ants. *Streptomyces* sp. ICBG 171 also showed activity against parasites, and the compounds nigericin (**29**), elaiophylin (**30**), 11-O-methylelaiophylin (**31**) and 11,11-O, O-dimethylelaiophylin (**32**) were isolated from its acetone extract. Compound **29** is active against the fungus *Escovopsis* and **29**, **30**, **31** and **32** are known for their high antiparasitic activity. The actinobacteria *Streptomyces* ICBG1318 was isolated from the stingless bee *Melipona scutellaris* and produced two novel cyclodepsipeptides, named as meliponamycin A (**33**) and meliponamycin B (**34**), which were highly active against the entomopathogen *P. larvae* and showed activity against the human pathogens *S. aureus* and *L. infantum*. Thus, this work reports the isolation and identification of several compounds possibly involved in the mediation of symbiotic interactions between bacteria and social insects, as well as their leishmanicidal potential. The actinobacteria *Streptomyces* sp. ICBG 1318 may positively impact *M. scutellaris* natural environment by the ability of biosynthesize novel and bioactive meliponamycins .

Keywords: *Streptomyces* sp., *Acromyrmex* sp., *Melipona scutellaris*, antimicrobial activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas dos produtos naturais taxol (produto natural de origem vegetal), rapamicina e penicilina (produtos naturais de origem microbiana).	2
Figura 2. Alguns produtos naturais microbianos envolvidos na simbiose de formigas com actinobactérias.	8
Figura 3. Produtos naturais microbianos envolvidos na associação de abelhas com bactérias.	10
Figura 4. Fluxograma do fracionamento do extrato em AcOEt de ICBG 328 e isolamento dos compostos 22-27	20
Figura 5. Fluxograma do fracionamento do extrato em acetona de ICBG 197 e isolamento do composto 28	21
Figura 6. Fluxograma do fracionamento do extrato em acetona de ICBG 171 e isolamento dos compostos 29-32	22
Figura 7. Diagrama do fracionamento do extrato em AcOEt de ICBG 1318 e isolamento dos compostos 33 e 34	23
Figura 8. <i>Streptomyces</i> sp. ICBG328	30
Figura 9. Atividade antifúngica exibida em halo de inibição do extrato bruto em acetato de etila de <i>Streptomyces</i> sp. ICBG 328 frente a <i>Escovopsis</i> AB1506201-3 ESCO e de sua fração 75% metanol obtida por SPE.	30
Figura 10. Cromatograma da fração 75% MeOH do extrato em acetato de etila do cultivo em ISP-2 ágar de ICBG 328. Detecção em UV a 278 nm.	31
Figura 11. Cromatograma observado durante o isolamento de metabólitos da fração 75% MeOH. Detecção em UV a 278 nm.	31
Figura 12. Estrutura química da cromomicina A3 (23).	32
Figura 13. Estruturas químicas das cromoses B dos compostos 24 e 25	35
Figura 14. Estruturas químicas dos compostos 22, 23, 24, 25, 26 e 27	36
Figura 15. Cromatograma da fração 100% MeOH do extrato em acetona do cultivo em YPM de ICBG 197. Detecção em UV a 270 nm.	39
Figura 16. Cromatograma obtido durante o isolamento de metabólitos da fração 100% MeOH. Detecção UV a 270 nm.	40
Figura 17. Estrutura química da nistatina (28).	40

Figura 18. Atividade antifúngica do composto 28 , exibida em halo de inibição, frente aos fungos entomopatogênicos <i>Escovopsis</i> – A- AB1506201-3 ESCO e B- EM150618-2 2/2 ACRO. Controle positivo: anfotericina B.	43
Figura 19. Cromatograma obtido durante o isolamento de metabólitos da sub-fração 1. Detecção ELSD.	44
Figura 20. Estrutura química da nigericina (29).....	45
Figura 21. Cromatograma obtido durante o isolamento de metabólitos da sub-fração 2 - clorofórmio. Detecção UV 250nm.	47
Figura 22. Estruturas químicas dos compostos 30 -elaiofilina 31 - 11-O-metilelaiofilina e 32 -11,11-O,O-dimetilelaiofilina	47
Figura 23. <i>Streptomyces</i> sp. ICBG1318	49
Figura 24. Halo de inibição desenvolvido por <i>Streptomyces</i> sp. ICBG 1318 contra o patógeno <i>P. larvae</i>	49
Figura 25. Halo de inibição desenvolvido por A -extrato bruto do cultivo em ISP-2 ágar de ICBG 1318 e B -frações obtidas por SPE do extrato em AcOEt contra o patógeno <i>P. larvae</i> . .	49
Figura 26. Cromatograma observado obtido durante o isolamento de metabólitos da fração MeOH 100%. Detecção em UV a 200 nm.	50
Figura 27. Fragmento hexapeptídico cíclico dos compostos 33 e 34	52
Figura 28. Estruturas planares e correlações observadas por gHMBC (H-C) para os compostos 33 e 34	54
Figura 29. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C das unidades policetílicas de compostos similares a 33 e 34 (dados obtidos em CDCl ₃).....	55
Figura 30. Estruturas químicas dos compostos inéditos meliponamicina A (33) e meliponamicina B (34), isolados de <i>Streptomyces</i> sp. ICBG 1310 associado às abelhas sem ferrão <i>M. scutellaris</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Actinobactérias selecionadas e informações sobre hospedeiros e local da coleta...27	27
Tabela 2. Atividade antifúngica apresentada por 4 actinobactérias associadas às formigas do gênero <i>Acromyrmex</i> e às abelhas <i>M. scutellaris</i>28	28
Tabela 3. Resultados de inibição (%) dos extratos em acetato de etila (20 µg/mL) das actinobactérias selecionadas frente às formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> e promastigotas de <i>L. donovani</i>29	29
Tabela 4. Dados de RMN de ¹ H (500 MHz) e RMN de ¹³ C em (CD ₃) ₂ SO da cromomicina A3 (23)32	32
Tabela 5. IC ₅₀ (µM) para os compostos 22, 23, 24 e 25 frente a amastigotas do parasita <i>L. donovani</i> e citotoxicidade em macrófagos humanos THP-137	37
Tabela 6. Dados de RMN de ¹ H (500 MHz) e RMN de ¹³ C em CD ₃ OD da nistatina (28).....41	41
Tabela 7. Dados de RMN de ¹ H (500 MHz) e RMN de ¹³ C (125 MHz) em C ₆ D ₆ da nigericina (29)45	45
Tabela 8. Dados de RMN 1D e 2D (500 MHz, CDCl ₃) para os compostos 33 e 34.....50	50
Tabela 9. Atividade dos compostos 33 e 34 contra amastigotas intracelulares de <i>L. infantum</i> e células THP-1.57	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
BuOH	Butanol
CDCL ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
(CD ₃) ₂ SO	Dimetilsufóxido deuterado
C ₆ D ₆	Benzeno deuterado
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EtOH	Etanol
ESI-MS	<i>Eletrospray Ionization – Mass Spectrometry</i>
FeSO ₄	Sulfato de Ferro
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HPLC-DAD-ELSD	<i>High Performace Liquid Chromatography – Diode Array Detection</i>
HR-ESI-MS	<i>High Resolution – Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
ISP-2	<i>International Streptomyces Project-Medium 2</i>
KH ₂ PO ₄	Fosfato Monopotássico
K ₂ HPO ₄	Fosfato de Potássio Dibásico
LC-MS	<i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>
MeOH	Metanol
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
MnCl ₂	Cloreto de Manganês
ORFs	<i>Open Reading Frames</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PNs	Produtos Naturais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

rRNA	<i>ribosomal Ribonucleic Acid</i>
rpm	Rotação por minuto
SPE	<i>Solid-Phase Extraction</i>
TFA	<i>Trifluoroacetic Acid</i>
UV	Ultravioleta
ZnSO ₄	Sulfato de Zinco

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto 23	76
APÊNDICE B - Espectro de gHSQC (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto 23	76
APÊNDICE C - Espectro de gHMBC (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto 23	77
APÊNDICE D - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto 23	77
APÊNDICE E - Espectro de DEPT (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto 23	78
APÊNDICE F - Espectro de TOCSY 1D (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) composto 23 (irradiação em δ_{H} 3,77).....	78
APÊNDICE G - Espectro de TOCSY 1D (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) composto 23 (irradiação em δ_{H} 5,42).....	78
APÊNDICE H - Espectro de TOCSY 1D (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) composto 23 (irradiação em δ_{H} 1,22).....	79
APÊNDICE I - Espectro de HR-ESI-MS do composto 23 $[\text{M-H}]^-$	79
APÊNDICE J - Espectro de HR-ESI-MS do composto 24 $[\text{M-H}]^-$	79
APÊNDICE K - Espectro de HR-ESI-MS do composto 25 $[\text{M-H}]^-$	80
APÊNDICE L - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto 24	80
APÊNDICE M - Espectro de gHMBC (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto 24	81
APÊNDICE N - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto 25	81
APÊNDICE O - Espectro de gHMBC (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto 25	82
APÊNDICE P - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto 22	82
APÊNDICE Q - Espectro de gHMBC (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto 22	83
APÊNDICE R - Espectro de HR-ESI-MS do composto 22 $[\text{M-H}]^-$	83
APÊNDICE S - Espectro de HR-ESI-MS do composto 26 $[\text{M-H}]^-$	84
APÊNDICE T - Espectro de HR-ESI-MS do composto 27 $[\text{M-H}]^-$	84
APÊNDICE U - Cromatograma da fração 75% MeOH do extrato em acetato de etila do cultivo em ISP-2 ágar de ICBG 328. Detecção ELSD.....	85
APÊNDICE V - Espectro de HR-ESI-MS do composto 28 $[\text{M-H}]^-$	85
APÊNDICE W - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto 28	86
APÊNDICE X - Espectro de gCOSY (500 MHz, CD_3OD) do composto 28	86
APÊNDICE Y - Espectro de gHSQC (500 MHz, CD_3OD) do composto 28	87
APÊNDICE Z - Espectro de gHMBC (500 MHz, CD_3OD) do composto 28	87
APÊNDICE AA - Espectro de HR-ESI-MS do composto 29 $[\text{M}+\text{Na}]^+$	88
APÊNDICE BB - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, C_6D_6) do composto 29	88

APÊNDICE CC - Espectro de gCOSY (600 MHz, C ₆ D ₆) do composto 29.....	89
APÊNDICE DD - Espectro de gHSQC (500 MHz, C ₆ D ₆) do composto 29.....	90
APÊNDICE EE - Espectro de gHMBC (500 MHz, C ₆ D ₆) do composto 29.....	90
APÊNDICE FF - Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, C ₆ D ₆) do composto 29.....	91
APÊNDICE GG - Espectro de HR-ESI-MS do composto 30 [M+Na] ⁺	91
APÊNDICE HH - Espectro de HR-ESI-MS do composto 31 [M+Na] ⁺	92
APÊNDICE II - Espectro de HR-ESI-MS do composto 32 [M+Na] ⁺	92
APÊNDICE JJ - Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, (CD ₃ OD) do composto 30.....	93
APÊNDICE KK - Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) do composto 31.....	93
APÊNDICE LL - Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) do composto 32.....	94
APÊNDICE MM - Espectro de HR-ESI-MS do composto 33 [M+Na] ⁺	94
APÊNDICE NN - Espectro de HR-ESI-MS do composto 34 [M+Na] ⁺	95
APÊNDICE OO - Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do composto 33.....	96
APÊNDICE PP - Espectro de gHSQC (500 MHz, CDCl ₃) do composto 33.....	97
APÊNDICE QQ - Espectro de gHMBC (500 MHz, CDCl ₃) do composto 33.....	97
APÊNDICE RR - Espectro de gCOSY (500 MHz, CDCl ₃) do composto 33.....	98
APÊNDICE SS - Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do composto 34.....	98
APÊNDICE TT - Espectro de gHMBC (500 MHz, CDCl ₃) do composto 34.....	99
APÊNDICE UU - Espectro de gHSQC (500 MHz, CDCl ₃) do composto 34.....	100
APÊNDICE VV - Espectro de gCOSY (500 MHz, CDCl ₃) do composto 34.....	101
APÊNDICE WW - LC-MS dos derivados de <i>L</i> -FDLA (em preto) e <i>L</i> -, <i>D</i> -FDLA (em vermelho) da <i>N</i> - <i>Me</i> -alanina (<i>m/z</i> 398) para o composto 33.	102
APÊNDICE XX - LC-MS dos derivados de <i>L</i> -FDLA (em laranja) e <i>L</i> -, <i>D</i> -FDLA (em azul) da <i>N</i> - <i>Me</i> -alanina (<i>m/z</i> 398) para o composto 34.....	102
APÊNDICE YY - LC-MS dos derivados de <i>L</i> -FDLA do ácido piperázico (<i>m/z</i> 425) para o composto 33.....	103
APÊNDICE ZZ - LC-MS dos derivados de <i>L</i> -FDLA (em vermelho) e <i>L</i> -, <i>D</i> -FDLA (em azul) do ácido piperázico (<i>m/z</i> 425) para o composto 33.	103
APÊNDICE AAA - LC-MS dos derivados de <i>L</i> -FDLA do ácido piperázico (<i>m/z</i> 425) para o composto 34.....	104
APÊNDICE BBB - LC-MS dos derivados de <i>L</i> -FDLA (em azul) e <i>L</i> -, <i>D</i> -FDLA (em roxo) do ácido piperázico (<i>m/z</i> 425) para o composto 34.	104
APÊNDICE CCC - LC-MS dos derivados de <i>L</i> -FDLA do padrão de β-hidroxi-leucina (<i>m/z</i> 442).....	105

APÊNDICE DDD - LC-MS dos derivados de <i>L-, D-FDLA</i> do padrão de β -hidroxi-leucina (<i>m/z</i> 442).....	105
APÊNDICE EEE - LC-MS dos derivados de <i>L-FDLA</i> de β -hidroxi-leucina (<i>m/z</i> 442) para o composto 33 (em azul) em comparação com os derivados <i>L-, D-FDLA</i> do padrão de β -hidroxi-leucina (<i>m/z</i> 442) (em vermelho).....	106
APÊNDICE FFF - Concentração inibitória mínima do composto 33 frente a <i>P. larvae</i>	107
APÊNDICE GGG - Concentração inibitória mínima do composto 34 frente a <i>P. larvae</i> ...	107
APÊNDICE HHH - Concentração inibitória mínima do composto 33 frente a <i>S. aureus</i> ...	108
APÊNDICE III - Concentração inibitória mínima do composto 34 frente a <i>S. aureus</i>	108

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
LISTA DE APÊNDICES	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Produtos naturais e a importância na busca de novos compostos bioativos	1
1.2 Micro-organismos na química de produtos naturais e a simbiose.	3
1.3 Associação de insetos sociais com micro-organismos	5
1.3.1 Produtos naturais de actinobactérias associadas a formigas da tribo Attini	5
1.3.2 Produtos naturais de micro-organismos associados a abelhas sem ferrão	8
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Coleta das formigas e abelhas	14
3.2 Isolamento dos micro-organismos associados às formigas, jardim de fungos e às abelhas	14
3.3 Preservação e identificação dos micro-organismos	15
3.4 Patógenos selecionados para triagem de atividade biológica	15
3.5 Ensaio de inibição em placa de Petri	15
3.6 Ensaio antiparasitário contra linhagens de <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Leishmania donovani</i> e <i>L. infantum</i>	16
3.7 Aumento na escala de cultivo	17
3.8 Extratos	17
3.9 Análise, fracionamento e identificação dos compostos	18
3.10 Determinação da configuração absoluta de aminoácidos dos depsipeptídeos	24
3.11 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Seleção dos micro-organismos	26
4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana em placa de Petri	28
4.3 Avaliação da atividade antiparasitária frente a <i>T. cruzi</i> e <i>L. donovani</i>	28
4.4 Aumento na escala de cultivo	29

4.5 Análise e fracionamento dos extratos	30
4.5.1 <i>Streptomyces</i> sp. ICBG328	30
4.5.2 <i>Streptomyces</i> sp. ICBG197	39
4.5.3 <i>Streptomyces</i> sp. ICBG171	44
4.5.4 <i>Streptomyces</i> sp. ICBG1318	48
5. CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	62
APÊNDICES	76

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais e a importância na busca de novos compostos bioativos

Os produtos naturais desempenham um importante papel na descoberta de novos compostos bioativos, além de servirem como inspiração, considerando a complexidade e diversidade de suas estruturas químicas, para o desenvolvimento de novos fármacos (CHEVRETTE et al., 2020; NEWMAN; CRAGG, 2016; NEWMAN; CRAGG, 2020). Em 2015, o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia foi concedido a pesquisadores que descobriram os compostos naturais avermectina e artemisina, os quais revolucionaram a terapia contra doenças parasitárias, sendo a primeira isolada da actinobactéria *Streptomyces avermitilis* (BURG et al., 1979; CAMPBELL et al., 1983; TU, 2011). Tal fato fascina e revigora a busca por novos produtos naturais que, aliado a avanços em metagenômica e metabolômica, torna possível, segundo Ben Shen, o início de uma nova era na descoberta de fármacos de origem natural, denominada de “*New Golden Age*”, ou “Nova Era Dourada” (SHEN, 2015).

No período de 1981 a 2019, estima-se que apenas 24,6 % dos fármacos aprovados pelo FDA – *Food and Drug Administration*, a agência regulatória americana, são de origem totalmente sintética. O restante são produtos naturais, derivados de produtos naturais ou produtos de semi-síntese, ou produtos sintéticos baseados em estruturas de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2020). Importantes descobertas como o taxol (**1**) (Fig. 1) - agente antitumoral com mecanismo de ação único, utilizado no tratamento de câncer de mama e ovário resistentes (ROWINSKY; DONEHOWER, 1995; WANI et al., 1971); a rapamicina (**2**) (Fig. 1) – potente imunossupressor que tem auxiliado muitos pacientes no transplante de órgãos e também possui ação antiproliferativa de células mamárias (LI; KIM; BLENIS, 2014; VEZINA; KUDELSKI; SEHGAL, 1975) e a penicilina (**3**) (Fig. 1) – antibacteriano que foi usado massivamente durante a década de 50 e continua sendo o tratamento de primeira escolha para muitas doenças infecciosas (ABRAHAM et al., 1941; FLEMING, 1941; HØGLI; GARCIA et al., 2020; SUZUKI; CARLSON; MATSUMOTO, 2020; SWANN, 1983), mostram a complexidade e importância dos produtos naturais em salvar e garantir qualidade de vida da humanidade.

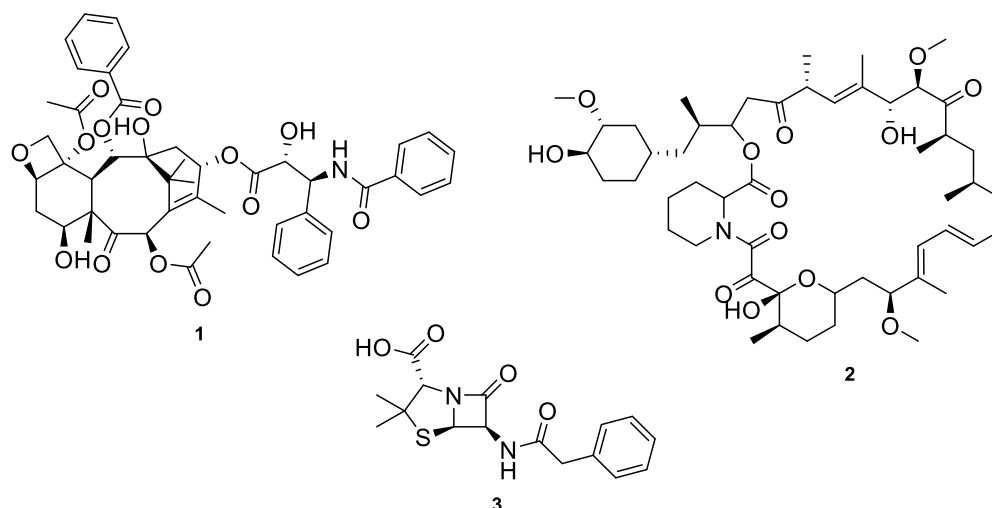


Figura 1. Estruturas químicas dos produtos naturais taxol (produto natural de origem vegetal), rapamicina e penicilina (produtos naturais de origem microbiana).

Apesar da grande variedade de tratamentos disponíveis no mercado, a resistência microbiana aos fármacos vem se tornando prevalente em todo o mundo e a velocidade no surgimento de micro-organismos multirresistentes é acelerada (COATES et al., 2020; VINCENT, 2000). A resistência bacteriana é mais comum, mas há também registros de resistência a fungos, vírus e parasitas (COHEN; TARTASKY, 1997).

A resistência a antimicrobianos é um problema complexo de saúde pública que envolve humanos, animais, setores agrícolas e ambientais, e não reconhece fronteiras geográficas (WHO, 2018). A Organização Mundial da Saúde considera a resistência a antimicrobianos a ameaça do século e estima que atualmente 700.000 pessoas morrem por ano devido a doenças infecciosas resistentes e a estimativa para 2050 é de aproximadamente 10 milhões de mortes se medidas restritivas, coordenadas e multisetoriais ao uso de antibióticos não forem tomadas (WHO, 2019b).

Micro-organismos resistentes estão em todos os ambientes e podem facilitar a disseminação de elementos genéticos que podem conferir resistência a outros organismos (COATES et al., 2002; DAVIES; DAVIES, 2010; GONZÁLEZ ZORN; ESCUDERO, 2012). Muitos patógenos têm evoluído e se tornado multirresistentes a uma variedade de tratamentos, como é o caso do *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da tuberculose que em 2018 causou a morte de 1,5 milhão de pessoas pelo mundo (BROSCH et al., 2002; JOHNSON et al., 2006; WHO, 2019a).

Doenças parasitárias como a leishmaniose, causada por parasitas do gênero *Leishmania*, são complexas pelas manifestações cutâneas, viscerais, muco cutâneas e pela pouca opção de

tratamento disponível (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). O Brasil é um dos sete países mais afetados pela doença, e estima-se que haja 12 milhões de pessoas infectadas com o parasita pelo mundo (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010). O tratamento de escolha consiste no uso da miltefosina, que é o primeiro fármaco oral aprovado para essa doença; apresenta alta toxicidade e baixa eficácia e sua efetividade vem sendo diminuída pelo aparecimento de parasitas resistentes (COJEAN et al., 2012; SEIFERT et al., 2007).

Ao longo dos anos, aumentou-se muito o uso de terapia antifúngica sistêmica devido principalmente a presença de pacientes imunossuprimidos. Estima-se que cerca de 47% (~700.000) dos pacientes portadores do vírus HIV morrem por doenças fúngicas sistêmicas (DENNING, 2016). Com isso, a resistência fúngica também alavancou, e fungos causadores de doenças sistêmicas graves do gênero *Candida*, *Fusarium* e *Aspergillus* já apresentam resistência aos tratamentos convencionais (BADDLEY; MOSER, 2004; BALKIS et al., 2002; MARQUEZ; QUAVE, 2020).

Considerando os dados simplificados citados acima, é de extrema importância a busca por novos compostos antimicrobianos e os produtos naturais de fontes inexploradas ou pouco exploradas podem fornecer novas perspectivas para os problemas de saúde atuais.

1.2 Micro-organismos na química de produtos naturais e a simbiose.

Os produtos naturais, também chamados de metabólitos secundários ou especializados, são os principais meios pelos quais os micro-organismos comunicam e modulam as interações dentro e entre as espécies (CHEVRETTE et al., 2020). Os micro-organismos desempenham um papel fundamental na busca por novos produtos bioativos. Segundo Newman e Cragg (NEWMAN; CRAGG, 2016) “...muitos fármacos e / ou protótipos baseados em produtos naturais são, na verdade, produzidos por micro-organismos ou por interações microbianas com os ‘hospedeiros dos quais foram isolados’, e, portanto, a pesquisa nesta área de produtos naturais deve ser significativamente expandida”.

Muitos fármacos utilizados no tratamento de diferentes doenças, tais como, câncer, infecções, hipercolesterolemia entre outras, têm suas origens em produtos naturais microbianos (DI MARCO et al., 1964; DREWS, 2000; MORIN et al., 1969). Os micro-organismos apresentam, portanto, uma surpreendente capacidade de produzir substâncias químicas com elevada potência biológica (LOPES; GUIMARAES; PUPO, 2011). Acredita-se que, diferentemente dos metabólitos primários, os metabólitos secundários são produzidos por

razões fisiológicas específicas, sociais ou predatórias, estando, portanto, relacionados com a ecologia dos organismos produtores (O'BRIEN; WRIGHT, 2011). De fato, a potência e complexidade química dos produtos naturais é resultado de milhões de anos de evolução para ajustá-los aos seus papéis ecológicos (CHEVRETTE et al., 2020; FIRN; JONES, 2003; KOEHN; CARTER, 2005).

Em um ecossistema os organismos estão constantemente interagindo entre si; e estas relações podem ser intraespecíficas ou interespecíficas. Em função dos tipos de dependência que os organismos mantêm entre si, e se há prejuízo ou benefício para os organismos envolvidos, estas relações ainda são subdivididas em harmônicas e desarmônicas. Nas relações harmônicas não existe prejuízo para nenhuma das espécies envolvidas e pelo menos uma delas é beneficiada; enquanto nas desarmônicas ocorre prejuízo de uma das espécies e benefício da outra (MARTIN; SCHWAB, 2013; PARMENTIER; MICHEL, 2013). A simbiose é uma associação íntima entre dois ou mais organismos de diferentes espécies, em geral de longa duração, frequentemente encontrada nas comunidades terrestres e aquáticas, com papel fundamental no surgimento das principais formas de vida na Terra e na geração de diversidade biológica (MORAN, 2006; MORAN; TRAN; GERARDO, 2005).

As interações benéficas entre organismos eucarióticos e bactérias fazem parte do processo evolutivo de plantas e animais (PARKINSON; GOBIN; HUGHES, 2016). Muitos micro-organismos se tornaram dependentes de seus hospedeiros para a sobrevivência. Por outro lado, os compostos bioativos produzidos pelos micro-organismos podem ser usados como agentes de defesa pelos hospedeiros (BENNETT; MORAN, 2015; MORAN, 2006).

A associação simbiótica de insetos, principalmente formigas da tribo Attini, com micro-organismos é conhecida e originou-se há milhões de anos (CAFARO et al., 2011). Os produtos naturais bioativos envolvidos nesta associação vêm sendo estudados mais recentemente e os resultados são de notória importância. Nosso grupo de pesquisa foi pioneiro no estudo de produtos naturais envolvidos na associação de micro-organismos com abelhas sem ferrão, resultando em compostos que explicam a relação ecológica e também que apresentam atividade contra patógenos humanos (MENEGATTI et al., 2018; MENEGATTI et al., 2020; PALUDO et al., 2016; RODRIGUEZ-HERNANDEZ et al., 2019). Considerando que o Brasil abriga a maior diversidade de insetos no mundo (RAFAEL; AGUIAR; AMORIM, 2009), e que os produtos naturais de micro-organismos associados a insetos são ainda pouco explorados, é de se esperar que seu estudo possa contribuir para a área de produtos naturais, com a descoberta

de novos compostos, assim como enriquecer os conhecimentos ecológicos do sistema simbiótico.

1.3 Associação de insetos sociais com micro-organismos

Insetos compreendem um dos filos de animais mais abundantes e complexos e estabelecem diversas relações com micro-organismos (EGGLETON, 2020). Acredita-se que insetos sociais estejam predispostos a uma alta pressão parasitária (CALDERA; CURRIE, 2012). Estes insetos vivem em altas densidades populacionais, em condições de clima quente e úmido, o que aumenta a susceptibilidade aos parasitas. Alguns insetos sociais, como as formigas agricultoras e abelhas, mantêm ainda fontes de alimentos ricas em nutrientes dentro dos ninhos (ex: jardim de fungo no caso de formigas e mel no caso de abelhas), as quais são também suscetíveis ao ataque de micro-organismos (CURRIE et al., 1999). Abelhas melíferas são atacadas por diversos patógenos, incluindo a bactéria *Paenibacillus larvae* (VANENGELSDORP; MEIXNER, 2010). Portanto, os insetos não somente precisam se defender dos patógenos, mas também necessitam proteger suas fontes de alimento do ataque de micro-organismos. Uma das estratégias de defesa adquirida durante a evolução dos insetos foi a associação simbiótica a bactérias capazes de biossintetizar produtos naturais antibióticos e antifúngicos ativos contra os patógenos. Desta forma, insetos sociais são organismos modelo fascinantes para a pesquisa em ecologia química e podem guiar racionalmente a descoberta por novos produtos naturais com potencial aplicação terapêutica.

1.3.1 Produtos naturais de actinobactérias associadas a formigas da tribo Attini

As formigas da tribo Attini compreendem mais de 230 espécies descritas em 12 diferentes gêneros que tiveram sua origem na América do Sul (CAFARO et al., 2011; MUELLER et al., 2001). Os graus de co-diversificação entre as formigas e o fungo cultivado como forma de alimento, levaram a classificação da tribo em cinco sistemas de agricultura (SCHULTZ; BRADY, 2008). O sistema de agricultura de Attini superiores inclui as formigas mais evoluídas que pertencem ao gênero *Acromyrmex* e *Atta*, as quais são conhecidas por cortar folhas frescas que servem para nutrir o fungo alimento cultivado no interior das colônias em jardins fúngicos (HOLMES et al., 2016; MUELLER; REHNER; SCHULTZ, 1998; MUELLER et al., 2001).

As formigas do gênero *Acromyrmex* compreendem cerca de 40 espécies de formigas que são divididas em castas de acordo com o trabalho realizado, onde geralmente as operárias menores e mais jovens realizam tarefas dentro do ninho, enquanto, as operárias maiores e mais velhas forrageiam no ambiente externo do ninho (FERGUSON-GOW et al., 2014; HUGHES et al., 2003; WADDINGTON; HUGHES, 2010). As formigas *Acromyrmex* operárias possuem tamanho de cabeça que varia de 0,7 mm para as super pequenas, até 2,0 mm para as operárias grandes (CAMARGO et al., 2003; WETTERER, 1995). As formigas *Acromyrmex* constroem ninhos de até 28 m², com diversas quantidades de câmaras com dimensões de até 70 cm. Os ninhos podem ser encontrados perto da superfície do solo ou em profundidades maiores de até 4 metros, podendo variar de acordo com a temperatura e umidade do solo (BOLLAZZI; KRONENBITTER; ROCES, 2008; CALHEIRO et al., 2019; VERZA et al., 2007; VERZA et al., 2020).

As formigas Attini superiores são consideradas pestes na agricultura por terem a habilidade de cortarem uma quantidade considerável de folhas frescas. Entretanto, essas formigas beneficiam o ambiente onde constroem seus ninhos, impactando as propriedades físico-químicas do solo e assim aumentando sua fertilidade (MOUTINHO; NEPSTAD; DAVIDSON, 2003; VERZA et al., 2020).

A simbiose de formigas da tribo Attini com fungos utilizados por elas como fonte de alimento (Basidiomycota; Agaricales: Lepiotaceae e Pterulaceae), é uma relação que existe há mais de 50 milhões de anos. O jardim de fungos cultivado pelas formigas como fonte de alimento pode ser atacado por patógenos específicos – fungos filamentosos do gênero *Escovopsis* que podem comprometer a viabilidade dos ninhos. Assim, as formigas estabeleceram outra relação simbiótica para garantirem a sobrevivência do ninho – associação com actinobactérias que produzem substâncias antimicrobianas capazes de defendê-las contra os patógenos, protegendo as fontes de alimento (CAFARO et al., 2011).

A relação entre formigas e actinobactérias, principalmente do gênero *Streptomyces* e *Pseudonocardia*, é tão fundamental para garantir a viabilidade do sistema agrícola existente, que alguns gêneros de formigas da tribo Attini desenvolveram estruturas especializadas em seu exoesqueleto para abrigar e alimentar as bactérias (RAMADHAR et al., 2014). Por meio do cultivo de *Pseudonocardia* sp. associada a formigas *Apterostigma dentigerum* foi obtido o depsipeptídeo cíclico dentigerumicina (**4**) (Fig. 2), responsável pela inibição do fungo parasita *Escovopsis* sp. (OH et al., 2009). Além de inibir o fungo patogênico, a dentigerumicina também exibiu atividade antifúngica frente a linhagens de *Candida albicans* e foi seletivamente tóxica

a linhagens de células humanas de câncer (RAMADHAR et al., 2014). Da associação desta mesma espécie de formiga cortadeira com outra actinobactéria *Pseudonocardia* sp. foram isolados os compostos pseudonocardonas A, B e C, além de outros antibióticos já descritos como o 6-deoxi-8-O-metilrabelomicina (**5**) e X-14881 (**6**) (Fig. 2), sendo que os dois últimos apresentaram atividade antibiótica e antimalárica (CARR et al., 2012). Da actinobactéria do gênero *Pseudonocardia* em associação com a formiga *Apterostigma dentigerum* foi isolado o novo composto 9-metoxirebecamicina (**7**) (Fig. 2), um análogo da rebecamicina, composto que apresenta atividade antiproliferativa e vem sendo testado em vários ensaios clínicos anti-tumoral (VAN ARNAM et al., 2015). Outra relação simbiótica descrita na literatura é estabelecida entre formigas cortadeiras *Acromyrmex echinator* com actinobactérias dos gêneros *Pseudonocardia* e *Streptomyces*. Antimicinas A1-A4 (**8-11**) (Fig. 2), valinomicina e actinomicinas D e X2 foram identificadas de espécies *Streptomyces* em associação com as formigas cortadeiras e possuem atividade antibiótica relacionada com a proteção das formigas contra patógenos (SCHOENIAN et al., 2011). Diversas espécies *Streptomyces* sp. produziram o antibiótico macrolídeo candicicina D (**12**) (Fig. 2), que, juntamente com outros antibióticos produzidos por essas actinobactérias, deve auxiliar no combate aos fungos patogênicos que possam causar morte do fungo alimento *Leucoagaricus* sp. (HAEDER et al., 2009). De uma linhagem de *Pseudonocardia* sp. associada a formigas do gênero *Apterostigma*, foi o isolado o novo polieno selvamicina (**13**) (Fig. 2) que possui atividade contra *C. albicans* e melhor solubilidade em água quando comparada a nistatina (VAN ARNAM et al., 2016). Recentemente, em nosso grupo de pesquisa, foi isolado de *Streptomyces* sp. associada a formigas do gênero *Chyphomyrmex* sp., o composto cifomicina (**14**) (Fig. 2) que além de possuir atividade contra o fungo *Escovopsis* sp. foi ativo contra patógenos humanos resistentes (CHEVRETTE et al., 2019). Também isolada de formigas *Cyphomyrmex*, *Streptomyces* sp. ICBG292 produziu compostos já conhecidos, incluindo a nigericina, que apresentou potente atividade leishmanicida contra amastigotas do parasita *Leishmania donovani*. Outro composto com potente atividade leishmanicida demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa, foi a dinactina, isolada da linhagem *Streptomyces puniceus* ICBG378, associada a formigas *Acromyrmex rugosus rugosus*. Estes compostos foram ativos contra linhagens do fungo patogênico *Escovopsis* e podem estar envolvidos na defesa dos ninhos de formigas (ORTEGA et al., 2019). As atividades leishmanicidas demonstradas por esses compostos corroboram com a abordagem da busca de novos agentes antiparasitários nas interações simbióticas estudadas.

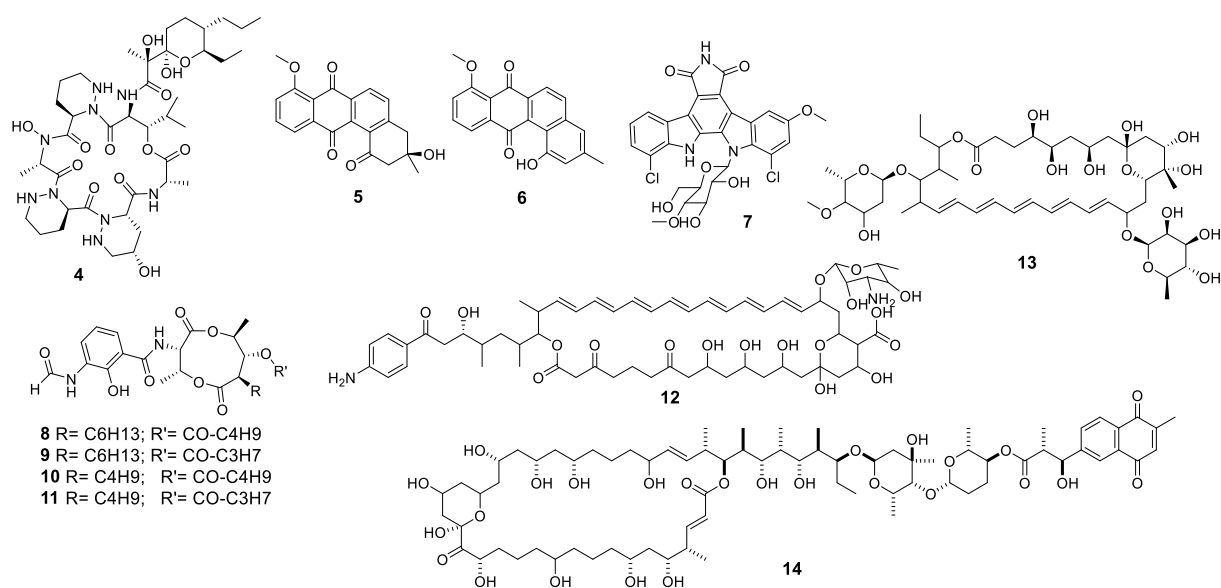


Figura 2. Alguns produtos naturais microbianos envolvidos na simbiose de formigas com actinobactérias.

1.3.2 Produtos naturais de micro-organismos associados a abelhas sem ferrão

As abelhas sem ferrão (Apidae: Meliponini) constituem um outro grupo de insetos sociais com mais de 500 espécies descritas, sendo que cerca de 300 são nativas do Brasil (VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013).

Melipona scutellaris é uma espécie de abelha sem ferrão conhecida popularmente como “uruçu verdadeira”, “uruçu do Nordeste”, ou “uruçu do campo” (DE CARVALHO et al., 2017). As abelhas dessa espécie habitam principalmente regiões tropicais e subtropicais e são reconhecidas pela produção de mel e pela importância crucial na manutenção do ecossistema do nordeste brasileiro, atuando como polinizadoras de diversas espécies de plantas (CUNHA, 2016). Até o momento, não é conhecido nenhum patógeno natural para as colônias de *M. scutellaris*, porém, foi descrito em experimentos *in vitro*, que o fungo *Beauveria bassiana* foi virulento as essas abelhas, sendo capaz de matá-las mesmo nas menores concentrações testadas (DE JESUS CONCEIÇÃO et al., 2014).

Alguns estudos têm direcionado esforços para analisar o impacto do uso de pesticidas na agricultura nas abelhas *M. scutellaris*. Sabe-se que o pesticida pode ser coletado pela abelha forrageira através do néctar da planta e uma vez dentro da colônia, ser distribuído para os diversos compartimentos, como o alimento larval, causando desordens na metamorfose e comprometendo a viabilidade da colônia (AZPIAZU et al., 2019; CHAM et al., 2019;

RORTAIS et al., 2005; TOME et al., 2020). Pesticidas muito usados na agricultura brasileira para o controle de diversas pragas como o tiametoxicam, da família dos neonicotinoides; o fungicida piraclostrobina; o inseticida abamectin, da classe da avermectina e o fungicida difenoconazol são tóxicos e podendo causar a morte dessas abelhas (DA COSTA DOMINGUES et al., 2020; DO PRADO et al., 2020; MIOTELO et al., 2020). Dessa maneira, estudos acerca das abelhas *M. scutellaris* são essenciais para sua manutenção, considerando a diminuição substancial das populações dessa espécie em função da atividade humana (JÚNIOR et al., 2014).

Há poucos estudos acerca da relação de abelhas com micro-organismos. O primeiro relato é de 2015, descrevendo que abelhas *Scaptotrigona depilis* dependem de um fungo alimento durante o desenvolvimento larval para garantir a sobrevivência das colônias (MENEZES et al., 2015). Recentemente foi descrito pelo nosso grupo que o fungo é uma levedura osmofílica do gênero *Zygosaccharomyces* e fornece precursores esteroidais essenciais para o desenvolvimento larval (PALUDO et al., 2018). As larvas desta abelha sem ferrão estão também associadas a bactérias do gênero *Bacillus* com potencial biossintético para produção de antibióticos (PALUDO et al., 2016).

Recentemente foram isoladas diversas espécies de fungos *Monascus* do mel, pólen e colônias de abelhas *M. scutellaris* localizadas na Mata Atlântica no estado de Pernambuco, Brasil (BARBOSA et al., 2017). Estudos acerca da função desse gênero de fungos são necessários visto que sua presença também é marcante na abelha *S. depilis*. *Monascus ruber*, juntamente com o fungo *Candida* sp. são responsáveis pela produção de compostos que regulam o crescimento do simbionte *Zygosaccharomyces* em colônias de *S. depilis* (PALUDO et al., 2019).

Bactérias simbiotes encontradas no intestino e nas células de cria de abelhas também podem ter função na proteção contra patógenos, como *Paenibacillus larvae* – causador da “American foulbrood disease” e *Melissococcus plutonius* – causador da “European foulbrood disease” e também contra o parasita *Crithidia bombi* (ENGEL et al., 2016; KWONG; MORAN, 2016).

Em nosso grupo de pesquisa, foi identificado que a bactéria *Paenibacillus polymyxa*, associada ao alimento larval da abelha *M. scutellaris*, produz compostos como o ácido *L*-fenil-lático (**15**) (Fig. 3) e seis depsipeptídeos cíclicos conhecidos como fusaricidinas (fusaricidina A e B **16 - 17**) (Fig. 3) que possuem atividade contra os entomopatógenos *B. bassiana* e *P. larvae* (MENEGATTI et al., 2018). Linhagens de actinobactérias também associadas as abelhas

M. scutellaris produzem uma série de antraciclinas (**18** e **19**), incluindo um composto com estrutura inédita (**18**) (Fig. 3) e loboforinas (**20** e **21**) (Fig. 3), ativas contra *P. larvae* (RODRIGUEZ-HERNANDEZ et al., 2019).

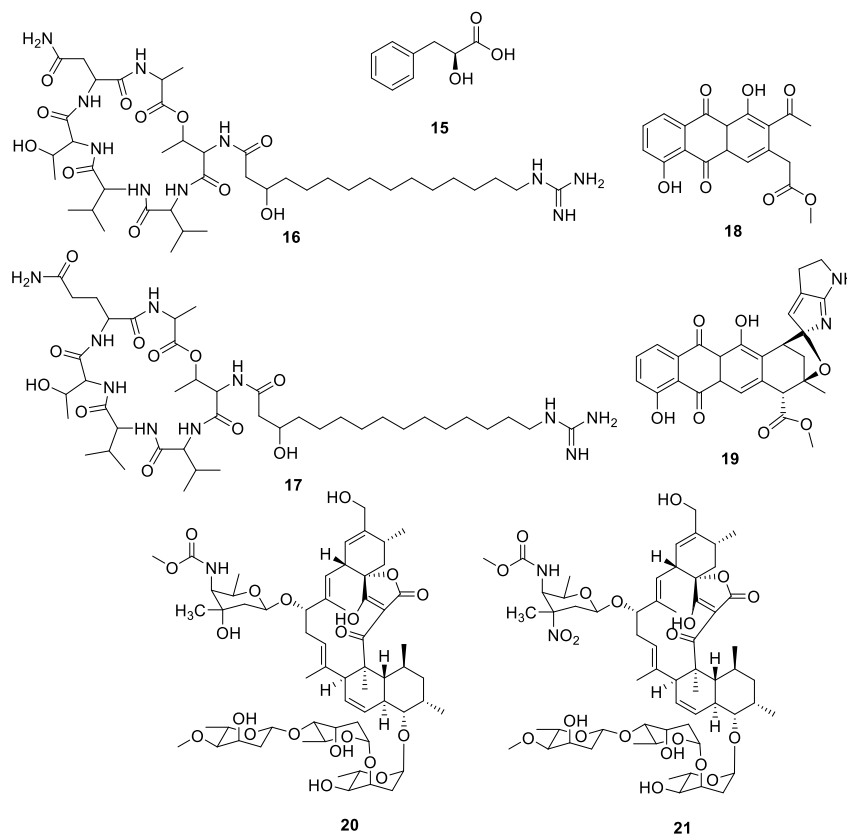


Figura 3. Produtos naturais microbianos envolvidos na associação de abelhas com bactérias.

Os exemplos citados e ilustrados acima mostram a grande diversidade química que pode ser encontrada nas interações entre micro-organismos e insetos. Os estudos são de grande importância para a área de ecologia química a fim de esclarecer as relações intermediadas por estes compostos. Fica evidente que as bactérias associadas a esses insetos produzem compostos específicos com a finalidade de eliminar seus patógenos, compostos que muitas vezes possuem atividades biológicas que podem ter aplicação farmacêutica ou agroquímica. Além disso, a descoberta de novos compostos bioativos enriquece enormemente os estudos na área de produtos naturais e pode contribuir significativamente com a química medicinal.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolar e identificar os produtos naturais produzidos por actinobactérias associadas a insetos sociais e correlacionar estes compostos químicos às possíveis funções ecológicas e biológicas.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar bactérias previamente isoladas de formigas cortadeiras e abelhas sem ferrão a partir do perfil de atividade frente ao fungo patogênico *Escovopsis* sp. e a bactéria *P. larvae*.
- Preparar extratos dos micro-organismos selecionados para triagem contra os parasitas *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* e *L. infantum* com intuito de selecionar os micro-organismos mais promissores.
- Após seleção dos micro-organismos, analisar os perfis químicos dos extratos obtidos através de HPLC-DAD-ELSD.
- Ampliar a escala de cultivo para obter quantidades suficientes de extratos para fracionamento cromatográfico, isolamento e elucidação estrutural das substâncias produzidas.
- Avaliar as substâncias isoladas frente aos entomopatógenos e aos parasitas com o propósito de estabelecer uma possível função ecológica e farmacológica dos compostos.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das formigas e abelhas

Amostras de formigas e do jardim de fungos foram coletadas no período de 13 a 15 de outubro de 2015 e 30 de novembro a 3 de dezembro de 2018 no Parque Nacional de Itatiaia, em Itatiaia, localizado no Estado do Rio de Janeiro, região de Mata Atlântica; no Parque Nacional de Anavilhanas, na região amazônica em janeiro de 2017 e também em coletas realizadas no campus da USP em Ribeirão Preto como parte das atividades do Projeto Temático vinculado (FAPESP/FIC-NIH 2013/50954-0).

Amostras de abelhas foram coletadas no dia 07 de agosto de 2015 de colônias mantidas no laboratório do professor Dr. Fábio Santos do Nascimento, no Departamento de Biologia da FFCLRP-USP (MENEGATTI, 2016).

As permissões de coleta de amostras biológicas e acesso ao material genético foram emitidas pelo SISBIO 46555–6 e pelo CNPq 010936/2014-9.

3.2 Isolamento dos micro-organismos associados às formigas, jardim de fungos e às abelhas

Exemplares de formigas, jardim de fungo alimento, abelhas e partes de suas colônias foram coletados com auxílio de material esterilizado. Após a coleta, o material foi processado rapidamente, sob condições assépticas. Com intuito de isolar actinobactérias foram adotadas as metodologias já descritas pelo grupo de pesquisa do nosso colaborador Prof. Dr. Cameron R. Currie (POULSEN; CURRIE, 2010), com adaptações, que consistiram em lavar exemplares de insetos com 200 µL de água destilada esterilizada para retirada dos micro-organismos presos a cutícula dos insetos. Após esse procedimento, 200 µL de cada solução aquosa foram semeados separadamente em placas de Petri contendo meio quitina (4 g de quitina; 0,7 g K₂HPO₄; 0,3 g KH₂PO₄; 0,5 g MgSO₄.5H₂O; 0,01 g FeSO₄.7H₂O; 0,001 g ZnSO₄; 0,001 g MnCl₂ e 20 g de ágar por litro de água) (HSU e LOCKWOOD, 1975) acrescido de antifúngicos (cicloheximida 0,05 g/L e nistatina 2 g/L). Após crescimento das colônias, as actinobactérias foram purificadas com subseqüentes semeaduras em meio ISP-2 (4 g de extrato de levedura, 4 g de dextrose, 10 g de extrato de malte e 20 g de ágar para um litro de água) contendo os antifúngicos nas mesmas concentrações descritas anteriormente. Adicionalmente, para isolamento de actinobactérias visualmente presentes na cutícula das formigas, fez-se raspagem direta destes micro-

organismos utilizando espátula especial autoclavada. As bactérias foram inoculadas no mesmo meio citado acima e as purificações subsequentes foram realizadas como já mencionado.

3.3 Preservação e identificação dos micro-organismos

Foram feitos estoques em glicerol para preservação de actinobactérias, mantidos em freezer a -80 °C. Foram também utilizadas linhagens de actinobactérias e fungo *Escovopsis* isoladas pela pós-doutoranda Weilan Gomes da P. Melo (Processo FAPESP 15/01001-6) que estão armazenadas no Laboratório de Química de Micro-organismos.

A extração de DNA genômico foi realizada de acordo com o protocolo de Sampaio et al. (2004), enquanto a reação de amplificação seguiu o protocolo elaborado em Pagnocca et al. (2008). As sequências foram editadas e usadas para montar os contigs em BioEdit v7.1.3 (HALL, 1999). Contigs foram usados para pesquisar por sequências homólogas na base de dados Eztaxon-e, Ribosomal Database Project e NCBI – GenBank.

3.4 Patógenos selecionados para triagem de atividade biológica

A patogenicidade do fungo do gênero *Escovopsis* é bem conhecida em relação às formigas da tribo Attini (CAFARO et al., 2011; POULSEN; CURRIE, 2010). Dessa maneira foram escolhidas cinco linhagens deste fungo que foram isoladas e estão preservadas no Laboratório de Química de Micro-organismos. Em relação às abelhas, foram feitos ensaios utilizando os entomopatógenos *Paenibacillus larvae* ATCC9545, *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, sendo os dois últimos fornecidos pelo Prof. Dr. Italo Delalibera Júnior, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP). Os ensaios para triagem de atividade antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* foram realizados sob a coordenação do Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo no Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP).

3.5 Ensaio de inibição em placa de Petri

No ensaio de inibição em placa foi empregada a metodologia descrita por Poulsen e Currie (2010), com adaptações. Inóculos de $0,5 \times 10^6$ esporos/mL dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* foram preparados através de contagem em câmara de Neubauer; com auxílio de uma alça de Drigalski, 500 µL desses inóculos foram semeados em

placas de Petri contendo meio ISP-2. Discos de 6 mm de diâmetro das bactérias isoladas e previamente ativadas foram transferidos para as placas recém semeadas. Foram realizados controles contendo placas apenas com os patógenos e outras apenas com as actinobactérias semeadas da mesma maneira descrita no item 3.2. Os ensaios de antagonismo realizados frente aos fungos *Escovopsis* sp. seguiram a metodologia descrita por Gerardo et al. (2006) e Rodrigues et al. (2009) com adaptações. As actinobactérias foram previamente reativadas, assim como os fungos *Escovopsis*. Foram feitos quatro cortes no ágar, formando assim uma cruz. Discos de 6 mm de diâmetro das actinobactérias foram dispostos em três diferentes cantos da cruz formada, na quarta extremidade da cruz não se adiciona nada, que é a região dita como controle. No centro da placa foi adicionado um disco de 6 mm de diâmetro de cada espécie do fungo *Escovopsis* e observou-se a inibição exercida por cada actinobactéria.

Para os ensaios de inibição utilizando o patógeno *P. larvae*, frações e compostos isolados, foi utilizado o ensaio de *overlay* (sobrecamada) (BRADY, 2007). Discos de 6 mm de diâmetro das actinobactérias isoladas das abelhas foram dispostos no centro da placa de Petri contendo meio ISP-2 ágar. Após 14 dias, o inóculo contendo 2 mL de BHI (*brain heart infusion*) soft com 10 µL de *P. larvae* (0.1 Mc Farland) foi adicionado sobre a placa de Petri (60 mm). Para o ensaio com frações e compostos isolados, foi adicionado o inóculo de 2 mL de BHI soft com 10 µL de *P. larvae* (0.1 Mc Farland) na placa de Petri contendo meio ISP-2 ágar. Após a secagem completa, adicionou-se 100 µg das frações ou compostos isolados solubilizados em 10 µL de metanol sobre as placas contendo o patógeno. Após 24 horas observou-se a formação de halos de inibição. Para o ensaio antifúngico, adicionou-se a placa de Petri (150 mm) contendo 50 mL de meio ISP-2 ágar, 10 mL de meio ISP-2 ágar soft (metade da quantidade de ágar) com 500 µL da suspensão de esporos na concentração de $0,5 \times 10^6$ esporos/mL dos fungos *Escovopsis* sp. Após a secagem das placas, adicionou-se 100 µg das frações ou compostos isolados solubilizados em 10 µL de metanol sobre as placas contendo o patógeno. Após 4 dias foi observada a formação de halos de inibição.

3.6 Ensaio antiparasitário contra linhagens de *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* e *L. infantum*

Os ensaios foram realizados no IFSC-USP com extratos brutos das actinobactérias cultivadas em meio sólido e com alguns compostos isolados. Segue-se o protocolo de Buckner et al. (1996) e Ferreira et al. (2014). São utilizadas amastigotas e promastigotas do parasita *Trypanosoma cruzi* da linhagem Tulahuen geneticamente modificados para expressar o gene β -

galactosidase da *Escherichia coli*, lacZ, que catalisa uma reação colorimétrica com vermelho de clorofenol usando galactopiranosil como substrato. Para o ensaio contra *Leishmania donovani* e *L. infantum*, a reação colorimétrica utilizada é com o composto Resazurina (azul) que quando reduzido passa a Resorufina (rosa) (BUCKNER et al., 1996; FERREIRA et al., 2014). Os ensaios são realizados em placas para cultura de células de 96 poços em duplicata. Os extratos são testados numa concentração final de 20 µg/mL. As reações colorimétricas são medidas por espectrofotômetro. Benzonidazol é usado como controle positivo no ensaio contra *T. cruzi* e miltefosina no ensaio contra *L. donovani* e *L. infantum* e as culturas de parasitas não tratadas são usadas como controle negativo.

3.7 Aumento na escala de cultivo

De acordo com os resultados dos ensaios biológicos foram selecionadas as actinobactérias codificadas como **ICBG 328**, **ICBG 197**, **ICBG 171** e **ICBG 1318** para serem estudadas quimicamente. Para aumento do rendimento dos extratos do cultivo em meio sólido, os micro-organismos **ICBG 328** e **ICBG 1318** foram desenvolvidos em 80 placas de Petri grandes (150 mm diâmetro) em meio ISP-2 por sete e 14 dias, respectivamente, a 30 °C. A actinobactéria **ICBG 197** foi cultivada em dez Erlenmeyers contendo 300 mL de meio YPM (5 g de extrato de levedura, 3 g de peptona e 25 g de manitol para 1L) e 15 g de resina HP20 em cada. Os cultivos foram incubados por sete dias a 30 °C sob agitação de 120 rpm. Os extratos foram obtidos conforme descrito no item 3.8. A actinobactéria **ICBG 171** foi cultivada em dois Erlenmeyers contendo 1L de meio A (20 g de amido solúvel, 10 g de dextrose, 5 g de extrato de levedura, 5 g de peptona e 5 g de CaCO₃) e 70 g de resina HP20 em cada. Os cultivos ficaram por sete dias a 30 °C sob agitação de 120 rpm. Os extratos foram obtidos conforme descrito no item 3.8.

3.8 Extratos

Para obtenção dos extratos dos cultivos em meio sólido, foram feitos cortes no ágar, os pedaços foram transferidos para Erlenmeyers de 500 mL com 250 mL de acetato de etila, seguido de sonicação por 15 minutos com intuito de romper as células. Procedeu-se a filtração e secagem dos solventes sob pressão reduzida. Para obtenção dos extratos em cultivo líquido, procedeu-se a filtração das culturas, a resina foi lavada inicialmente com água e posteriormente com acetona. Em seguida foi realizada a filtração do solvente e a secagem sob pressão reduzida.

3.9 Análise, fracionamento e identificação dos compostos

As análises dos extratos foram feitas em HPLC analítico, usando cromatógrafo Shimadzu acoplado a duas bombas modelo Nexera XR LC-20AD Shimadzu, sistema de controle CBM-20A Shimadzu, detectores DAD SPD-M20A e ELSD-LTII ambos da Shimadzu, injetor automático Nexera SIL-20A Shimadzu, forno CTO-20A Shimadzu, e software LabSolution. Utilizou-se coluna Ascentis Express C18, 10 cm x 4,6 mm, 2,7 μm , com gradientes compostos por ACN:H₂O, iniciando com 10% de ACN, chegando a 100% em 23 min, permanecendo em 100% até 25 min, voltando a 10% em 26 min, e permanecendo em 10% até 30 min para estabilização da coluna. Os extratos obtidos em escala ampliada de ICBG 328, ICBG 1318 e ICBG 197 foram fracionados por extração em fase sólida, utilizando cartuchos Discovery® DSC-18 de 10 gramas e 60 mL de volume; utilizando como solvente H₂O, soluções de MeOH de 25-75% e MeOH 100%, finalizando com Acetona 100%. O extrato obtido em escala ampliada de ICBG 171 foi submetido a partição utilizando hexano e posteriormente clorofórmio. Os extratos resultantes da partição foram fracionados em coluna Sephadex LH-20 utilizando como solvente metanol/clorofórmio 1:1.

Purificações finais do cultivo de ICBG 328, ICBG 1318, ICBG 197 e ICBG 171 foram feitas utilizando HPLC no modo semi-preparativo. Utilizou-se o equipamento de HPLC semi-preparativo Shimadzu acoplado a duas bombas modelo LC-6AD Shimadzu, sistema de controle CBM-20A Shimadzu, detector DAD SPD-M20A, injetor automático SIL-10AF Shimadzu, forno CTO-20A Shimadzu, coletor automático FCR-10A Shimadzu e software LabSolution. Utilizou-se coluna Gemini 5 μm , C18, 110 Å, 250x10 mm para todos os extratos. Para a purificação final do extrato de ICBG 328 (Figura 4), ICBG 197 (Figura 5) e ICBG 1318 (Figura 7) utilizou-se gradientes compostos por ACN:H₂O, iniciando com 40% de acetonitrila, chegando a 100% em 10 minutos, permanecendo nessas condições até 20 minutos, com queda da concentração de solvente orgânico para 40% em 25 minutos. Para a purificação final do extrato em hexano de ICBG 171 (Figura 6) utilizou-se gradientes compostos por ACN:H₂O iniciando com 10% de acetonitrila, chegando a 70% em 15 minutos, permanecendo nessas condições até 30 minutos, com queda da concentração de solvente orgânico para 10% em 35 minutos. Para a purificação final do extrato em clorofórmio de ICBG 171 utilizou coluna preparativa Luna C18 (5 μm , 250 x 10 mm) e gradientes compostos por ACN:H₂O iniciando com 40% de acetonitrila, chegando a 100% em 30 minutos, permanecendo nessas condições até 40 minutos, com queda da concentração de solvente orgânico para 40% em 45 minutos.

As análises de LC-MS foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta pressão Bruker Daltonics acoplado a detectores de diodo UV, e a um espectrômetro de massas com fonte de ionização electrospray (ESI) e analisador microOTOF (tempo de voo). A análise cromatográfica foi realizada utilizando coluna analítica C18 (Phenomenex Gemini, 4.6 mm, 250 mm, 5 μ m), fluxo de 0,7 ml/min, volume de injeção de 20 μ L e sistema de solvente gradiente constituído de solução aquosa (0,1% de ácido fórmico) e acetonitrila (5% a 10%) por 30 minutos (para determinação da configuração absoluta da *N*-Me-alanina) e (20% a 70%) por 50 minutos (para determinação da configuração absoluta do ácido piperázico)

Para identificação estrutural dos compostos isolados foram utilizados métodos espectroscópicos – Ressonância Magnética Nuclear (RMN unidimensional e bidimensional) e espectrométricos – Espectrometria de Massas. Os dados de RMN de todas as substâncias isoladas foram adquiridos em espectrômetro Bruker DRX 500 e Varian Unity-Inova, operando a 500 MHz para ^1H . Os processamentos dos espectros foram realizados com auxílio do software MestReNova 6.0.2. Para análises em alta resolução utilizou-se o espectrômetro de massas micrOTOF II-ESI-TOF (Bruker Daltonics[®]) operando nos modos positivo e negativo.

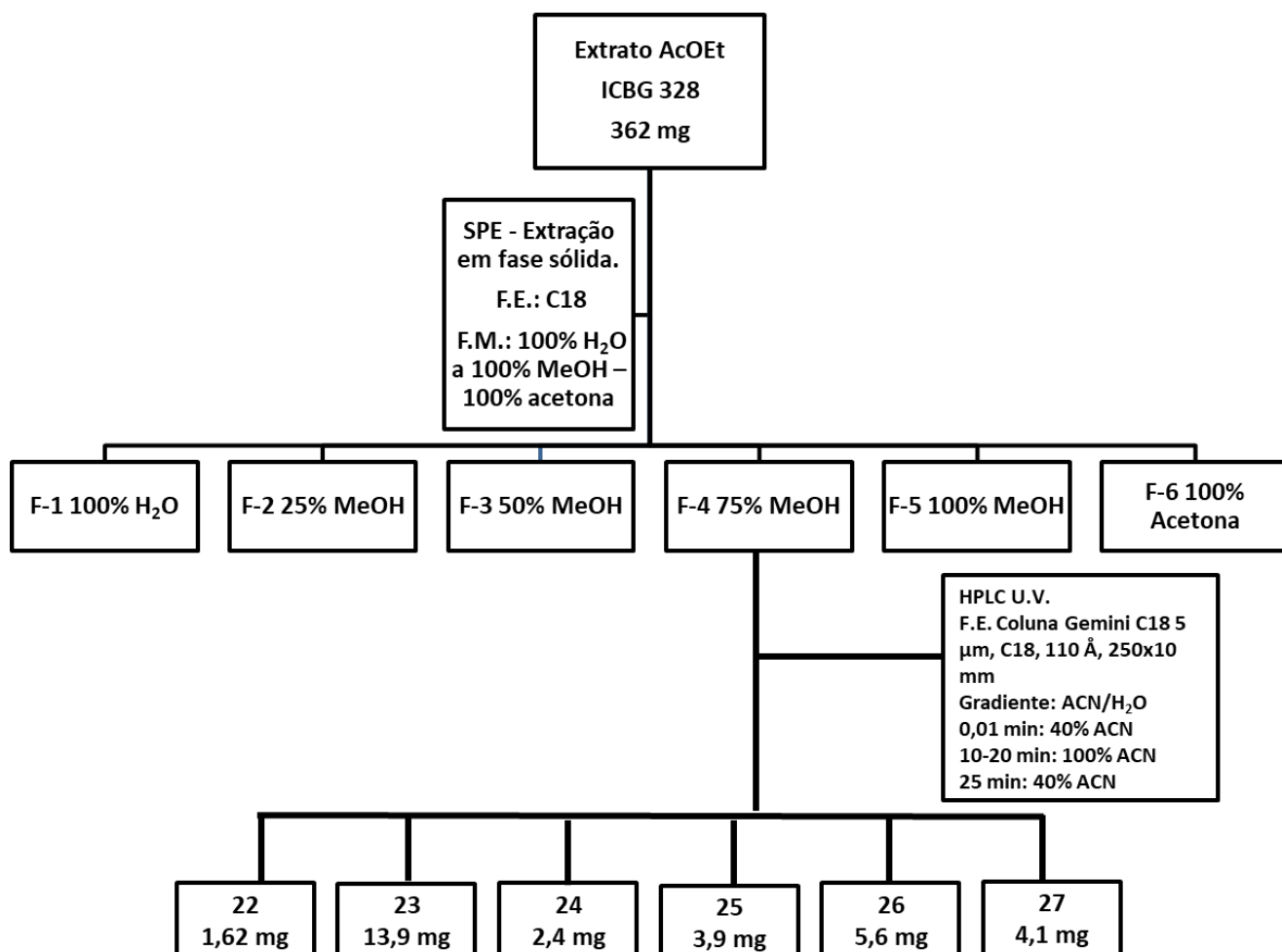


Figura 4. Fluxograma do fracionamento do extrato em AcOEt de ICBG 328 e isolamento dos compostos 22-27.

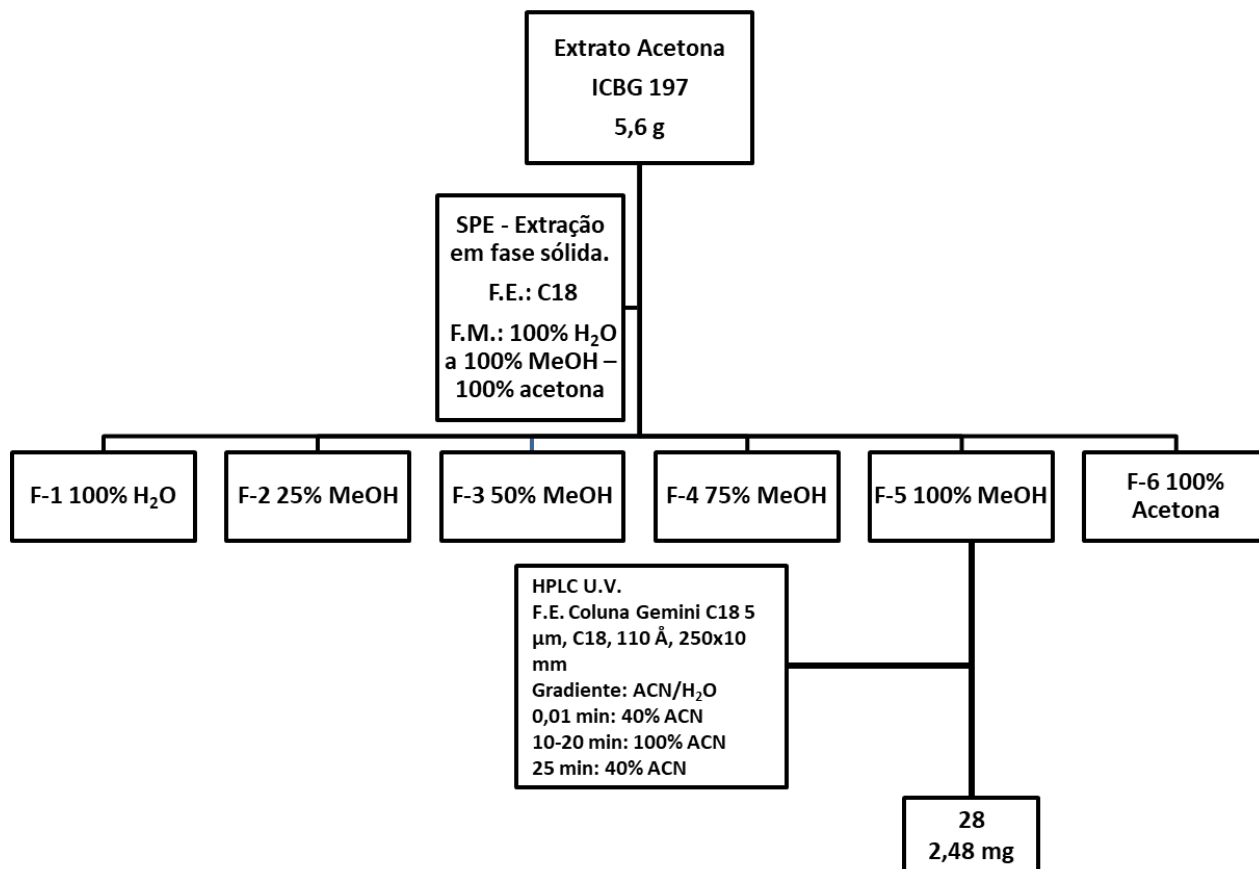


Figura 5. Fluxograma do fracionamento do extrato em acetona de ICBG 197 e isolamento do composto **28**.

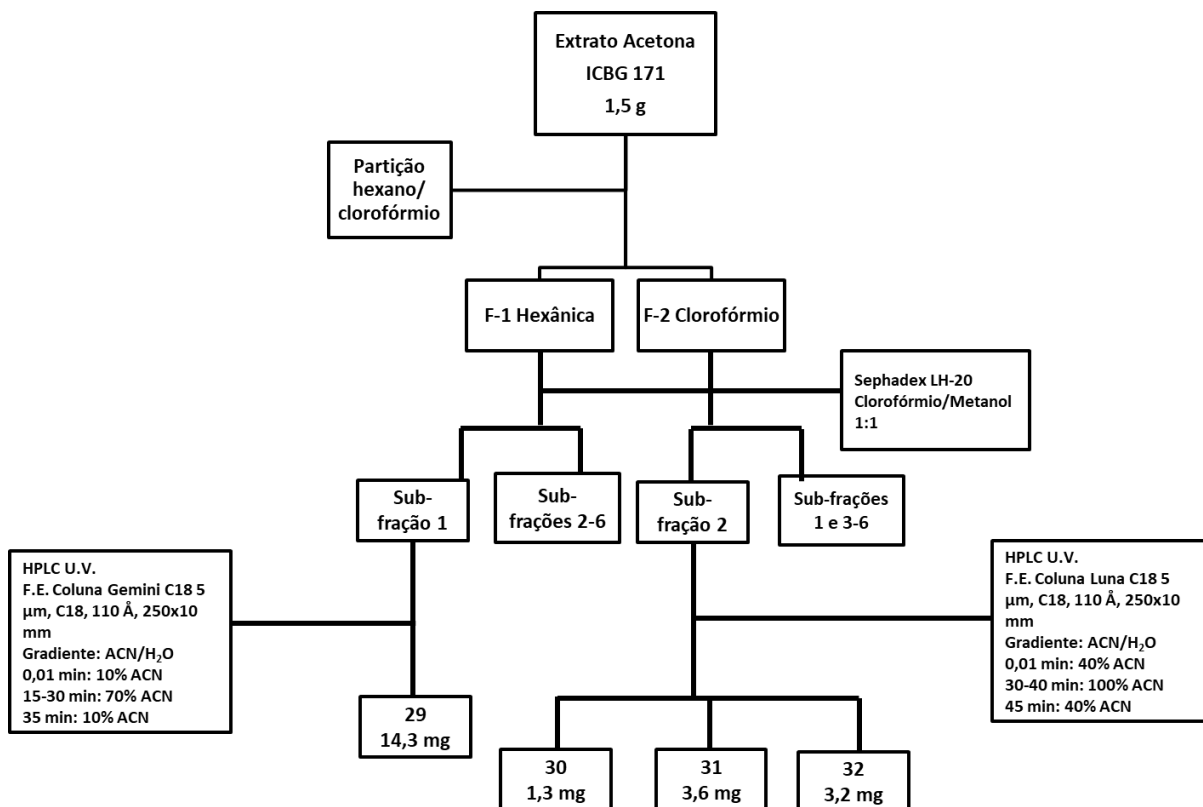


Figura 6. Fluxograma do fracionamento do extrato em acetona de ICBG 171 e isolamento dos compostos **29-32**.

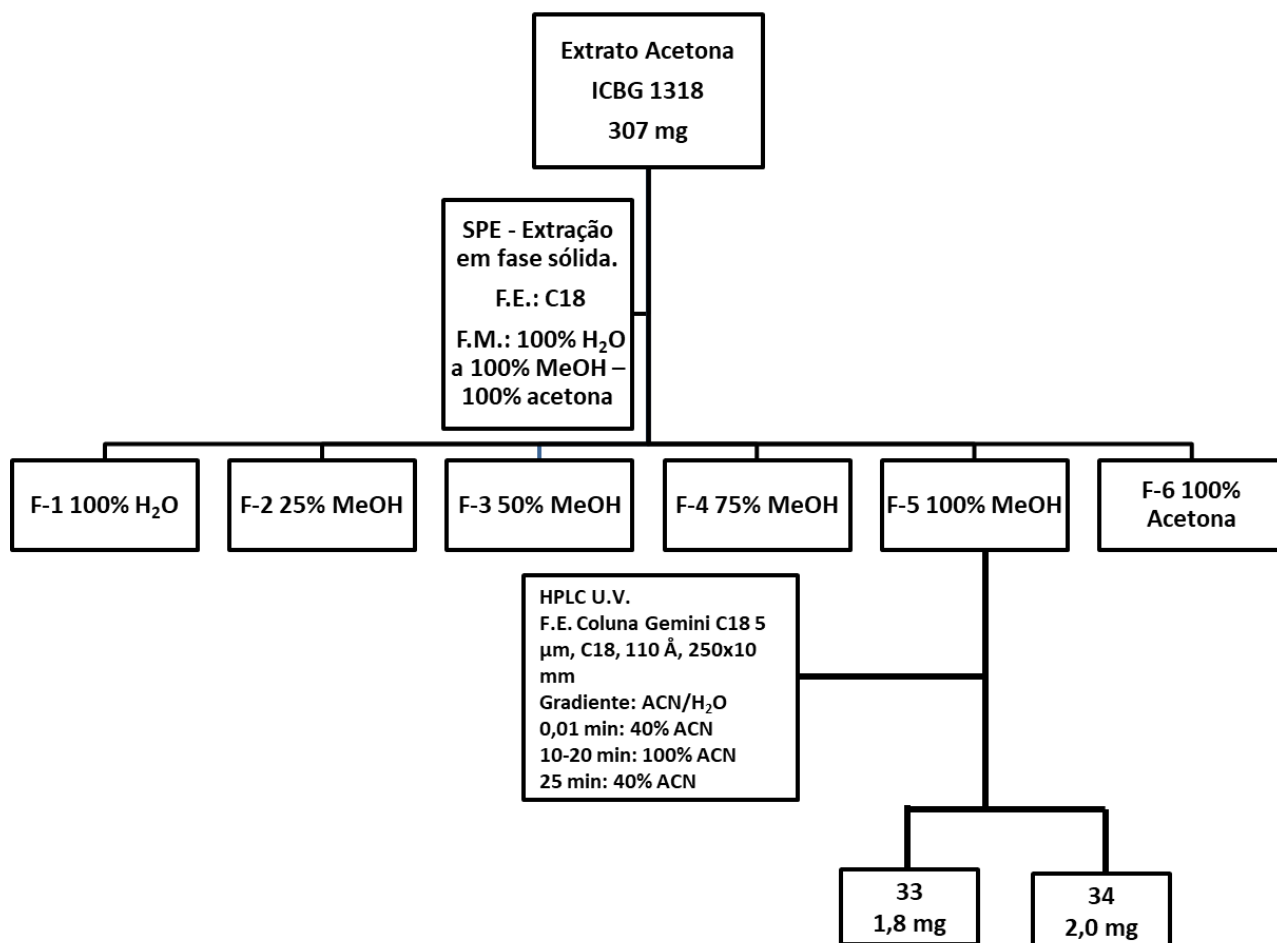


Figura 7. Diagrama do fracionamento do extrato em AcOEt de ICBG 1318 e isolamento dos compostos **33** e **34**.

3.10 Determinação da configuração absoluta de aminoácidos dos depsipeptídeos

Os compostos **33** e **34** foram inicialmente submetidos a hidrólise. A 600 µg e 400 µg dos compostos **33** e **34**, respectivamente, foram adicionados 500 µL de HCl 6 N. As soluções foram hidrolisadas a 110 °C por 24 horas e secadas sob pressão reduzida. O material seco foi ressuspenso em 500 µL de água destilada por três vezes e secado novamente a pressão reduzida para remover os resíduos ácidos. Para determinação da configuração absoluta dos aminoácidos foi aplicado o Método Avançado de Marfey utilizando os reagentes *L*-FDLA e *L,D*-FDLA (FDLA - 2,4-dinitro-5-fluor-fenil leucina-amida) sintetizados e fornecidos por Jiaxuan Yan (Bugni's lab., UW-Madison) (MARFEY, 1984). Os reagentes foram usados para produzir derivados diastereoisoméricos. Os hidrolisados dos compostos **33** e **34** foram divididos em duas porções, e em cada porção foi misturada com 1 N NaHCO₃ (100 µL) e 50 µL de *L*-FDLA (1 mg/ mL em acetona) e *L,D*-FDLA (1 mg/ mL em acetona), e as reações foram aquecidas a 80 °C por 3 min. As reações foram neutralizadas com 50 µL de HCl 2 N. Uma solução aquosa de acetonitrila (1:1) foi adicionada as soluções, que foram analisadas por HPLC-MS (item 3.9).

3.11 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os ensaios antibacterianos para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram realizados segundo o método de microdiluição de acordo com as orientações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2011). O meio ISP-2 foi usado para disseminar as linhagens bacterianas de *P. larvae* ATCC9545 e *S. aureus* INCAS0039. O antibiótico tetraciclina foi usado como controle positivo para ambos os patógenos. Os compostos foram adicionados de uma solução estoque (0,125 mg/mL em DMSO) resultando como maior concentração testada 6,9 µg/mL. Diluições em série dos antibióticos foram preparadas em DMSO, sendo diluídos juntamente com os compostos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção dos micro-organismos

O LQMo (Laboratório de Química de Micro-organismos) conta com uma coleção de mais de mil micro-organismos isolados de insetos sociais (abelhas e formigas). Os micro-organismos selecionados para este trabalho foram isolados de coletas de ninhos de formigas do gênero *Acromyrmex* realizadas no Parque Nacional de Itatiaia no Estado do Rio de Janeiro, área de Mata Atlântica, de coletas realizadas no campus da USP de Ribeirão Preto. Foi também selecionada uma actinobactéria isolada de colônias abelhas *M. scutellaris* mantidas do departamento de Biologia da FFCLRP-USP (Tabela 1). As actinobactérias foram selecionadas de acordo com as atividades antimicrobiana (item 4.2) e antiparasitária (item 4.3) apresentadas.

Os micro-organismos foram identificados pelo sequenciamento do gene 16S rDNA. A Tabela 1 mostra os códigos dos micro-organismos selecionados e a identificação dos mesmos. Todas as linhagens pertencem ao gênero *Streptomyces*, o mais comumente estudado entre as actinobactérias e frequentemente encontrado em associação com insetos (CHEVRETTE et al., 2019).

Tabela 1. Actinobactérias selecionadas e informações sobre hospedeiros e local da coleta.

Código das	Identificação	Hospedeiro	Local da coleta (coordenadas geográficas)
Actinobactérias			
ICBG 328	<i>Streptomyces sp.</i>	Formiga <i>Acromyrmex sp.</i>	Parque Nacional de Itatiaia – RJ S 22°27'31" W 44°36'49"
ICBG 171	<i>Streptomyces sp.</i>	Formiga <i>Acromyrmex sp.</i>	Campus da USP-RP S 21°10'11" W 47°50'53"
ICBG 197	<i>Streptomyces sp.</i>	Formiga <i>Acromyrmex sp.</i>	Campus da USP-RP S 21°10'11" W 47°50'53"
ICBG 1318	<i>Streptomyces sp.</i>	Abelha <i>Melipona scutellaris</i>	Departamento de Biologia - FFCLRP-USP S21°09'47.6" W 47°51'39.1"

4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana em placa de Petri

As actinobactérias isoladas de formigas foram avaliadas para verificação da capacidade de produção de metabólitos com atividade antifúngica frente a cinco linhagens de fungos *Escovopsis* (AB1506201-3 ESCO; AB150620-3 TRACHY; CC150618-2 1/1 ACRO; EM150618-2 2/2 ACRO; LK141108-03 ATTA). As actinobactérias isoladas de abelhas foram submetidas a ensaios contra dois fungos entomopatogênicos, *B. bassiana* e *M. anisopliae* e contra a bactéria patogênica *P. larvae*. Os micro-organismos selecionados para este trabalho apresentaram boa atividade antimicrobiana e os resultados estão expostos na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade antifúngica apresentada por 4 actinobactérias associadas às formigas do gênero *Acromyrmex* e às abelhas *M. scutellaris*.

Micro-organismos	<i>Escovopsis</i> sp. AB1506201-3	<i>Escovopsis</i> sp. AB150620-3	<i>Escovopsis</i> sp. CC150618-2 1/1	<i>Escovopsis</i> sp. EM150618-2 2/2	<i>Escovopsis</i> sp. LK141108-03	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	<i>P. larvae</i>
ICBG 328	+	-	+	-	-	**	**	**
ICBG 171	-	-	+	+	+	**	**	**
ICBG 197	+	+	+	+	+	**	**	**
ICBG 1318	**	**	**	**	**	+	-	+
Miconazol 50µg						+	+	
Tetraciclina 50µg								+

(+) apresentou atividade; (-) não apresentou atividade; ** ensaio não realizado.

Analisando a Tabela 2 é possível observar que *Streptomyces* sp. ICBG197 apresentou atividade antifúngica contra todas as linhagens de *Escovopsis* testadas. As outras actinobactérias apresentaram uma maior seletividade de ação, inibindo determinadas linhagens de *Escovopsis*. *Streptomyces* sp. ICBG1318, associada à abelha *M. scutellaris*, apresentou atividade contra o fungo entomopatogênico *B. bassiana* e contra a bactéria *P. larvae*.

4.3 Avaliação da atividade antiparasitária frente a *T. cruzi* e *L. donovani*

Os micro-organismos mostrados na tabela 2 do item 4.2 tiveram seus extratos em acetato de etila e acetona preparados do cultivo em meio ISP-2 ágar e meios A e YPM líquido, respectivamente, os quais foram encaminhados para o ensaio antiparasitário a fim de realizar

uma segunda triagem para melhor seleção dos micro-organismos a serem quimicamente estudados. Os resultados estão descritos na **Erro! Autoreferência de indicador não válida.3.**

Tabela 3. Resultados de inibição (%) dos extratos em acetato de etila (20 µg/mL) das actinobactérias selecionadas frente às formas amastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. donovani*.

Micro-organismos	<i>T. cruzi</i>			<i>L. donovani</i>		
	A	YPM	ISP-2	A	YPM	ISP-2
ICBG 328	57	-	62	-	-	83
ICBG 171	51	54	16	94	64	41
ICBG 197	24	10	N.I.	33	99	16
ICBG 1318	-	-	45	-	-	99

Controle positivo *T. cruzi*: Benzonidazol – 78% de inibição na concentração de 100 µM.

Controle positivo *L. donovani* e *L. infantum*: Miltefosina – 93% a 99% de inibição na concentração de 15 µM.

N.I.: não inibiu

- ensaio não realizado

Neste ensaio são considerados promissores os extratos que apresentam inibições superiores a 50% das formas amastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. donovani*. Após essa triagem, notou-se atividade pronunciada de 83% de inibição do extrato em acetato de etila de ICBG 328 cultivado em ISP-2 ágar contra o parasita *L. donovani*, bem como dos extratos de ICBG 171 e ICBG 197 cultivados respectivamente em meios A e YPM, nos valores de 94% e 99% de inibição contra o mesmo parasita. O extrato da actinobactéria ICBG 1318 associada à abelha sem ferrão *M. scutellaris* foi bem ativo contra o parasita *L. donovani* (99% de inibição).

4.4 Aumento na escala de cultivo

As actinobactérias *Streptomyces* sp. ICBG 328, *Streptomyces* sp. ICBG197 e *Streptomyces* sp. ICBG 171, que apresentaram boa atividade antiparasitária e inibição do fungo *Escovopsis*, tiveram seus cultivos ampliados para prosseguir com os estudos químicos. Os rendimentos foram de 362 mg para o extrato em acetato de etila do cultivo de ICBG 328, de 5,6 g e 1,5 g para os extratos em acetona de ICBG 197 e ICBG 171, respectivamente. A actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG 1318 também teve seu cultivo ampliado fornecendo 307 mg de extrato em acetato de etila.

4.5 Análise e fracionamento dos extratos

4.5.1 *Streptomyces* sp. ICBG328

A actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG328 (Figura 8) inibiu duas linhagens do fungo *Escovopsis* (Tabela 2). Verificou-se também que seu extrato em acetato de etila apresentou alta porcentagem de inibição contra os parasitas (Tabela 3), especialmente contra *L. donovani*. O extrato bruto em acetato de etila de *Streptomyces* sp. ICBG328, assim como as frações obtidas por extração em fase sólida deste mesmo extrato (item 3.9), foram testados conforme metodologia citada no item 3.5, contra a linhagem de *Escovopsis* AB1506201-3 ESCO. Este ensaio guiou a etapa de isolamento dos compostos, visto que a atividade foi encontrada na fração MeOH 75%, como é mostrado na Figura 9.



Figura 8. *Streptomyces* sp. ICBG328

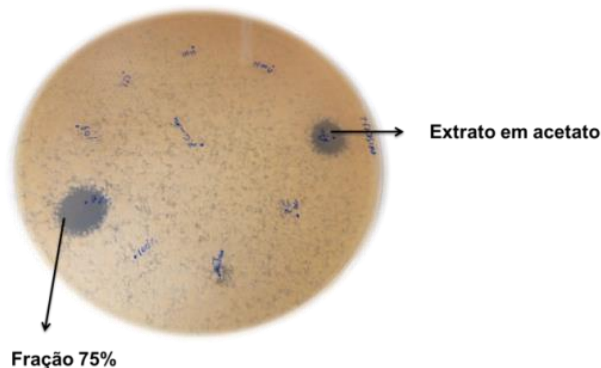


Figura 9. Atividade antifúngica exibida em halo de inibição do extrato bruto em acetato de etila de *Streptomyces* sp. ICBG 328 frente a *Escovopsis* AB1506201-3 ESCO e de sua fração 75% metanol obtida por SPE.

A análise do perfil químico da fração MeOH 75% (Figura 10) indicou a presença de compostos majoritários, devido à intensidade dos sinais, principalmente no tempo de retenção 14,0 minutos. As condições de fracionamento foram otimizadas (item 3.9) e foram isolados os compostos **22**, **23**, **24** e **25**, além dos compostos **26** e **27**, com impurezas (Figura 11).

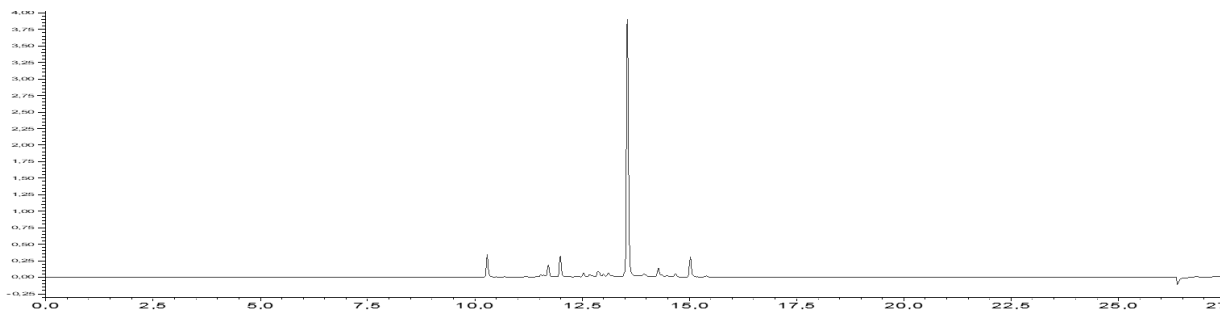


Figura 10. Cromatograma da fração 75% MeOH do extrato em acetato de etila do cultivo em ISP-2 ágar de ICBG 328. Detecção em UV a 278 nm.

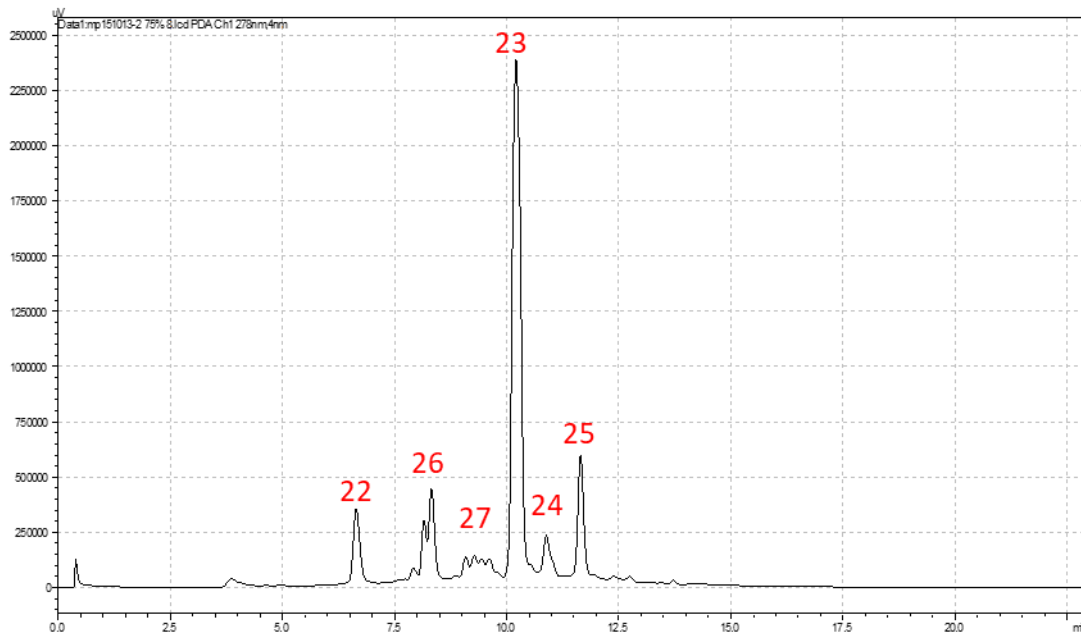


Figura 11. Cromatograma observado durante o isolamento de metabólitos da fração 75% MeOH. Detecção em UV a 278 nm.

Os compostos **22** (1,62 mg), **23** (13,9 mg), **24** (2,4 mg), **25** (3,9 mg), **26** (5,6 mg) e **27** (4,1 mg) foram isolados. Os espectros de RMN de ^1H , assim como os espectros de gCOSY, gHSQC e gHMBC de todos os compostos foram obtidos. Para o composto majoritário, **23**, ainda foram obtidos espectros de RMN de ^{13}C e também TOCSY. A análise dos espectros mostrou grande semelhança entre eles, evidenciando a presença de compostos análogos. Foram obtidos os espectros de massas por HR-ESI-MS operando no modo positivo e negativo. Os dados dos espectros de massas foram consultados no banco de dados Antibase[®], que sugeriu a presença de compostos policetídeos glicosilados conhecidos como cromomicinas, derivados do ácido aureólico e que consistem em uma aglicona ligada a cinco unidades de açúcares (YOSHIMURA; KOENUMA; MATSUMOTO; TORI *et al.*, 1988). Com esta informação, prosseguiu-se com a análise dos dados de RMN 1D e 2D dos compostos.

Iniciou-se pela análise dos espectros (APÊNDICE AAPÊNDICE E) do composto majoritário (**23**).

A Figura 12 mostra a estrutura com as posições numeradas do composto **23**, conhecido como cromomicina A3. A Tabela 4 mostra os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C e as correlações entre eles obtidas por gHMBC.

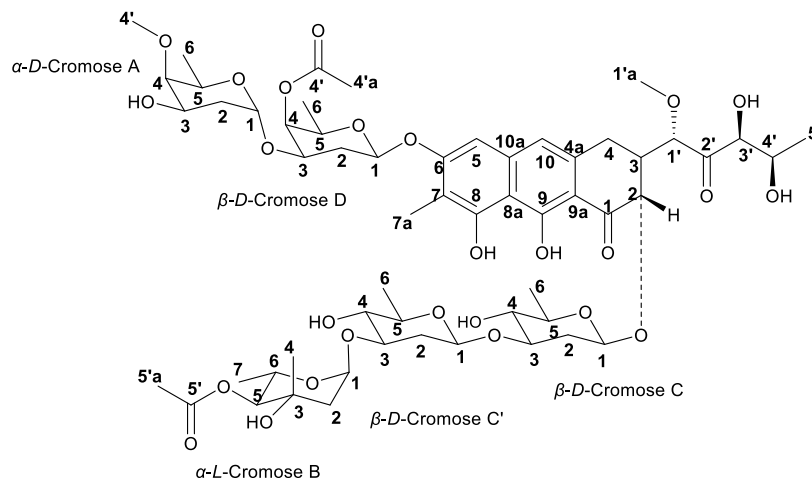


Figura 12. Estrutura química da cromomicina A3 (**23**)

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ da cromomicina A3 (**23**)

Posição	$\delta^1\text{H}$ (mult.; J(Hz); int)	$\delta^{13}\text{C}$	gHMBC H \rightarrow C
Aglicona			
1		203,4	
2	3,55 (<i>d</i> , 11,2; 1H)	73,1	
3	2,86 (<i>m</i> ; 1H)	40,7	C2
4	2,56 (<i>m</i> ; 1H)	29,9	
	2,87 (<i>m</i> ; 1H)		
4a		137,9	
5	6,87 (<i>s</i> ; 1H)	100,9	
6		154,9	
7		110	
7a	2,09 (<i>s</i> ; 3H)	8,2	C7;C6;C8
8		158,7	
8a		107,2	
9		163,7	
9a		108	
10	6,90 (<i>s</i> ; 1H)	116,5	
1'	4,76 (<i>s</i> ; 1H)	81,3	C4;C3;C1'a
1'a	3,27 (<i>s</i> ; 3H)	57,8	C1'
2'		211,7	
3'	3,98 (<i>s</i> ; 1H)	67,7	
4'	4,00 (<i>s</i> ; 1H)	78,9	C2'
5'	1,07 (<i>d</i> , 6,0; 3H)	19,4	C3';C4'
α-D-Cromose A			
1	4,96 (sinal sobreposto)	92,2	C5
2	1,68 (<i>m</i> ; 1H)	32,7	
	1,39 (<i>m</i> ; 1H)		
3	3,81 (<i>m</i> ; 1H)	65,3	
4	3,09 (<i>s</i> ; 1H)	80,9	
4'	3,44 (sinal sobreposto)	60,9	C4
5	3,77 (<i>d</i> , 6,6; 1H)	66,5	C4;C6
6	1,10 (<i>d</i> , 6,2; 3H)	16,8	C4;C5

β-D-Cromose D			
1	5,42 (<i>d</i> , 9,4; 1H)	96,5	
2	1,84 (<i>m</i> , 1H)	32,7	
	2,03 (sinal sobreposto)		
3	4,01 (sinal sobreposto)	69,1	C2
4	5,09 (<i>s</i> ; 1H)	67,4	C4'
4'		170	
4'a	2,11(<i>s</i> , 3H)	20,6	C4'
5	3,94 (<i>d</i> , 6,5; 1H)	68,8	C1;C4;C6
6	1,10 (<i>d</i> , 6,2; 3H)	16,4	C5
β-D-Cromose C			
1	4,95 (<i>d</i> , 8,8; 1H)	94,5	
2	1,44 (<i>m</i> ; 1H)	36,9	
	2,53 (sinal sobreposto)		
3	3,66 (<i>m</i> ; 1H)	78,4	
4	3,29 (sinal sobreposto)	71,6	
5	2,90 (<i>m</i> ; 1H)	74,0	C4
6	1,22 (<i>d</i> , 5,9; 3H)	17,9	C4;C5
β-D-Cromose C'			
1	4,96 (<i>d</i> , 8,8; 1H)	100,2	
2	2,26 (<i>d</i> , 7,2; 1H)	35,8	
	1,25 (sinal sobreposto)		
3	4,72 (<i>d</i> , 5,4; 1H)	77,2	
4	3,30 (sinal sobreposto)	72,1	
5	2,90 (<i>m</i> ; 1H)	74,0	C4
6	1,22 (<i>d</i> , 5,9; 3H)	17,9	C4;C5
α-L-Cromose B			
1	4,71 (<i>d</i> , 5,0; 1H)	97,3	
2	1,80 (<i>m</i> , 1H)	43,7	C3;C4
	1,76 (<i>s</i> ; 1H)		
3		69,0	
4	1,32 (<i>s</i> ; 3H)	23,0	C2;C3;C5
5	4,51 (<i>d</i> , 10,0; 1H)	79,3	C3,C4,C6,C7
5'		170,2	
5'a	2,05 (<i>s</i> ; 3H)	20,9	C5'
6	4,02 (<i>m</i> ; 1H)	64,4	
7	1,00 (<i>d</i> , 6,0; 3H)	17,5	C5

A análise dos dados de RMN de ^1H 1D e 2D e ^{13}C mostra a presença de cinco hidrogênios e cinco carbonos anoméricos em δ_{H} 4,92 e δ_{C} 92,2; δ_{H} 5,42 e δ_{C} 96,5; δ_{H} 4,95 e δ_{C} 94,5; δ_{H} 4,96 e δ_{C} 100,2; δ_{H} 4,71 e δ_{C} 97,3 referentes respectivamente aos açúcares cromose A, cromose D, cromose C e C' e cromose B.

O espectro de RMN de ^1H mostra um sinal em δ_{H} 3,44, que se refere aos hidrogênios do grupamento metoxílico ligado em C-4 da cromose A. Os hidrogênios nas posições 1, 4, 5 e 6 foram identificados principalmente pela análise dos dados do espectro de gHMBC. Os hidrogênios H-2 e H-3 foram determinados com auxílio de espectros de TOCSY (APÊNDICE F), no qual irradiou-se o H-5 em δ_{H} 3,77 e foi possível a observação dos hidrogênios em δ_{H} 1,68 e 1,39 e δ_{H} 3,81, referentes a H-2 e H-3 respectivamente.

A cromose D possui um grupo acetila na posição 4, confirmado pelos dados de RMN de ^1H com o sinal de H-4 em δ_{H} 5,09 e sinal dos hidrogênios metílicos (CH_3 -4'a) em δ_{H} 2,11,

deslocamento químico típico de hidrogênios metílicos próximos a carbonila de éster. No espectro de TOCSY (APÊNDICE G) foi possível observar os hidrogênios H-2, H-3 e H-4 após a irradiação de H-1 em δ_H 5,42. As posições 5 e 6 foram determinadas pelas correlações observadas no espectro de gHMBC. Considerando que o hidrogênio anomérico deste açúcar possui valor de deslocamento químico mais desblindado (δ_H 5,42) que dos outros açúcares, assume-se que ele esteja ligado via ligação O-C ao anel aromático da aglicona (posição 6).

A aglicona é formada por três anéis fundidos, sendo que dois são aromáticos, e uma cadeia alquílica onde é possível inferir a presença de uma metoxila ligada em C-1' e grupos hidroxílicos ligados em C-3' e C-4', que justificam os hidrogênios com deslocamentos químicos em δ_H 3,98 (H-3') e δ_H 4,00 (H-4').

Ligada na posição 2 da aglicona, está a cromose C e em seguida a cromose C'. Estes dois açúcares são iguais e a identificação foi feita basicamente com auxílio dos espectros de TOCSY (APÊNDICE H). Contudo, as atribuições dos hidrogênios das posições 4 destes açúcares podem ser intercambiáveis devido à similaridade de deslocamentos químicos. Os hidrogênios das posições 1 e 3 dos dois açúcares apresentam deslocamentos químicos mais variados, o que é explicado pelos diferentes grupos ligados nestas posições.

A cromose B possui uma acetilação na posição 5, o que é confirmado pela desblindagem de H-5 em δ_H 4,51 e pela correlação no gHMBC de H-5 com um carbono em δ_C 170,2, típico de carbonila de éster. Neste açúcar o C-3 é um carbono quaternário (δ 69,0), identificado por sua correlação no espectro de gHMBC com os hidrogênios metílicos CH₃-4 (δ_H 1,32).

O espectro de HR-ESI-MS no modo negativo exibe o íon m/z 1181,5100 (APÊNDICE I), de maior intensidade. Considerando a massa teórica de m/z 1181,5022, tem-se erro de -6,6 ppm. Dessa maneira, utilizando as análises de RMN de ¹H e ¹³C e espectrometria de massas, conclui-se que o composto **23** possui a estrutura já relatada da cromomicina A3 (YOSHIMURA; KOENUMA; MATSUMOTO; TORI *et al.*, 1988).

Os dados de HR-ESI-MS dos compostos **24** (APÊNDICE J) e **25** (APÊNDICE K) foram consultados no banco de dados Antibase[®], que sugeriu a presença de dois análogos do composto **23**. Estes análogos possuem diferenças apenas na cromose B, o que será discutido a seguir.

As cromoses B dos compostos **24** e **25** diferem do composto **23**, por não apresentarem-se acetiladas na posição 5. Para o composto **24** (Espectros de RMN de ¹H e gHMBC - APÊNDICE L-APÊNDICE M), conhecido como cromomicina-AP, os hidrogênios metilênicos (H-5'a) em δ_H 2,36 se correlacionam com a carbonila (C-5'), caracterizando sua proximidade. Ligado ao grupo metilênico há um grupo metílico (CH₃-5'b, δ_H 1,06 e δ_C 9,3). Para o composto

25 (Espectros de RMN de ^1H e gHMBC - APÊNDICE NAPÊNDICE **O**), conhecido como cromomicina A2, há um grupo isopropílico ligado ao carbono carbonílico do éster. A Figura 13 exemplifica as diferenças entre os açúcares da cromose B dos compostos **24** e **25**.

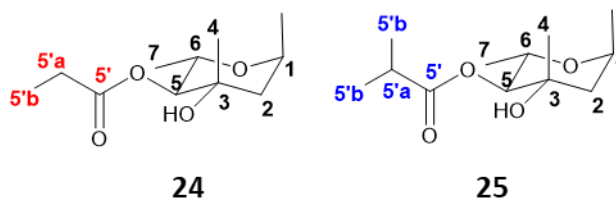


Figura 13. Estruturas químicas das cromoses B dos compostos **24** e **25**.

O composto **22** (Espectros de RMN de ^1H , gHMBC e HR-ESI-MS - APÊNDICE P-APÊNDICE **R**), conhecido como cromomicina 02-3G, apresenta diferença em dois açúcares, não apresentando acetilações nas cromoses D e B.

Os compostos **26** e **27** (Espectros de HR-ESI-MS - APÊNDICE SAPÊNDICE **T**) foram obtidos com impurezas. O composto **26** é conhecido como cromomicina 02-3D e não apresenta acetilação na cromose D. Já o composto **27**, conhecido como 4B-desmetilchromomicina A3, não apresenta o grupo metoxílico na cromose A. A Figura 14 mostra os seis análogos isolados da fração 75% MeOH do extrato em acetato de etila do cultivo em meio sólido da bactéria *Streptomyces* sp. ICBG 328.

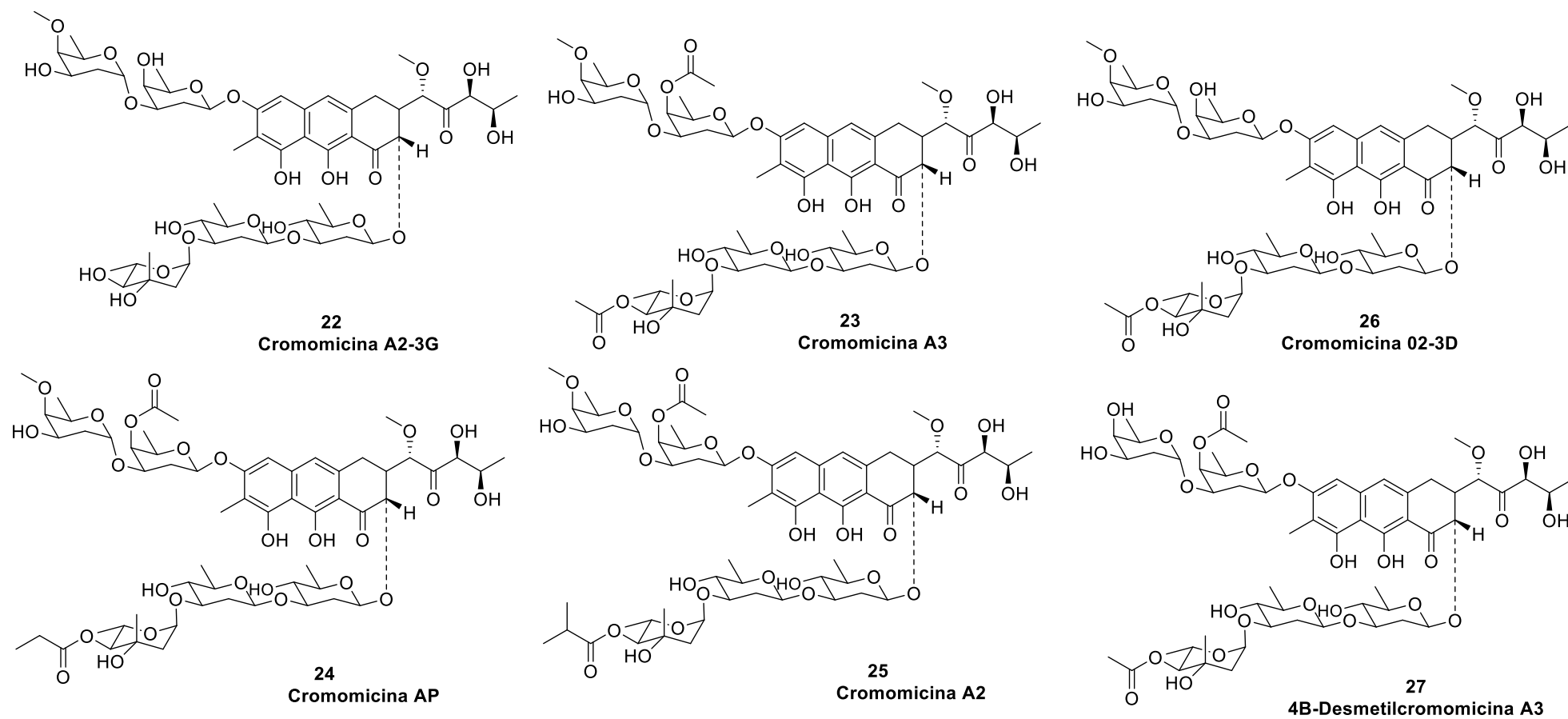


Figura 14. Estruturas químicas dos compostos **22**, **23**, **24**, **25**, **26** e **27**.

A fração 75% MeOH, da qual os compostos foram isolados, havia mostrado atividade (Figura 9). Os compostos **22-27** foram então testados (metodologia item 3.5) frente ao fungo *Escovopsis* AB1506201-3 ESCO. Neste ensaio, os compostos isolados não apresentaram atividade frente ao fungo entomopatogênico. Os ensaios com os compostos foram repetidos várias vezes, inclusive em misturas na tentativa de observar possível sinergismo de ação, porém não foi observada atividade antifúngica. Tal fato indica que possivelmente algum outro composto minoritário possa ser responsável pela ação antifúngica apresentada pela fração.

A fração 75% MeOH foi novamente analisada em HPLC analítico e foi observado com o detector ELSD a presença de dois compostos (APÊNDICE U) no tempo de retenção 21,6 min e 22,5 min que anteriormente não haviam sido detectados no detector UV (Figura 10). A análise deste extrato em LC-MS não foi conclusiva e o isolamento destes compostos não foi realizada devido à pouca quantidade de material. Dessa forma, não foi possível compreender o papel ecológico exercido pela actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG 328 no ninho de formigas *Acromyrmex* sp.

Entretanto, os compostos puros **22**, **23**, **24** e **25** foram testados frente às formas promastigotas e amastigotas intracelulares do parasita *L. donovani* e apresentaram bons resultados de inibição. Os resultados estão expostos na Tabela 5, bem como os testes de citotoxicidade em macrófagos humanos THP-1, que são células hospedeiras para *L. donovani*, utilizando como controle a doxorubicina.

Tabela 5. IC₅₀ (µM) para os compostos **22**, **23**, **24** e **25** frente a amastigotas do parasita *L. donovani* e citotoxicidade em macrófagos humanos THP-1

Composto	IC ₅₀ (µM) (amastigotas intracelular)	IC ₅₀ (µM) (promastigotas)	CC ₅₀ (µM) THP-1
22	>64	53,33	15,11
23	1,26	1,21	0,23
24	0,67	0,72	0,28
25	0,38	0,38	0,44
Miltefosina	5,37	3,95 e 7,26	-
Doxorubicina	-	-	0,60

Os compostos **23**, **24** e **25** foram mais ativos que o controle positivo, destacando-se a elevada atividade do composto **25** (IC₅₀ 380 nM). O ensaio de citotoxicidade mostrou que

o composto **25** apresenta toxicidade um pouco mais elevada que o controle doxorrubicina, um fármaco antitumoral. Analisando os resultados de atividade biológica e as estruturas químicas dos compostos pode-se inferir que a acetilação da cromose D, assim como uma maior substituição por grupos alquilas na cromose B, podem ser importantes para aumentar atividade antiparasitária destes compostos, provavelmente por facilitar passagem por membranas. Infelizmente, os resultados de citotoxicidade frente às células THP-1 permitem inferir que os compostos **23-25** não apresentam índices de seletividade adequados para o uso como antiparasitários.

As cromomicinas são compostos policetídicos glicosilados derivados do ácido aureólico e foram inicialmente isoladas de uma linhagem de *Streptomyces griseus* associada ao sedimento marinho do Japão (MIYAMOTO et al., 1966). As cromomicinas são antibióticos antitumorais que bloqueiam a síntese macromolecular via interação reversível com o DNA na presença de íons metálicos bivalentes como o magnésio (Mg^{2+}) (AICH; SEN; DASGUPTA, 1992; HOU et al., 2004; VAN DYKE; DERVAN, 1983).

Há vários relatos na literatura do isolamento de cromomicinas e todos têm um ponto em comum: as linhagens de *Streptomyces* sp. que produzem os compostos estavam associadas a sedimentos marinhos. Os compostos apresentam atividades contra uma variedade de patógenos como *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (*MRSA*) e *E. coli*; *Bacillus subtilis*; *Enterococcus faecium* e *S. epidermidis*; além disso, as cromomicinas apresentam alta potência inibitória contra diversas linhagens de células cancerígenas (CHO et al., 2020; KALINOVSKAYA et al., 2017; PETTIT et al., 2015; SARANARUK et al., 2020; YI et al., 2019).

Vários estudos têm demonstrado que além de se ligar ao DNA, as cromomicinas podem ter outros mecanismos de ação no tratamento antitumoral. A cromomicina *A₃* é capaz de suprimir proteínas anti-apoptóticas relacionadas ao crescimento do colangiocarcinoma que é o câncer do epitélio biliar, podendo ser útil como um agente quimiossensibilizador (SARANARUK et al., 2020). As cromomicinas *A₂* e *A₃* apresentaram alta citotoxicidade contra uma linhagem celular de adenocarcinoma gástrico e um deles se mostrou capaz de superar o fator de necrose tumoral relacionado a resistência do ligante de indução de apoptose (TOUME et al., 2014).

Recentemente, um grupo brasileiro identificou três novas cromomicinas, *A₆*, *A₇* e *A₈* de uma linhagem *Streptomyces* sp. associada a zoantídeos *Palythoa caribaeorum* coletados no Ceará. Os compostos foram potencialmente ativos contra cinco linhagens de

células tumorais (adenocarcinoma de cólon, carcinoma de mama, câncer de próstata metastático e melanoma metastático) (PINTO et al., 2020). Esses compostos também foram os primeiros relatados na literatura a modular o fator de transcrição TBX2 que está relacionado com a proliferação de células cancerígenas (SAHM et al., 2020).

Algumas cromomicinas já foram testadas contra fungos patogênicos como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum*, e *Trichophyton mentagrophytes* mas não exibiram potencial antifúngico (CHO et al., 2020), dessa maneira é justificável a inatividade das cromomicinas isoladas neste trabalho contra o fungo entomopatogênico *Escovopsis* sp. Não há nenhum relato prévio na literatura sobre a atividade antiparasitária destes compostos.

4.5.2 *Streptomyces* sp. ICBG197

A linhagem *Streptomyces* sp. ICBG197 inibiu todas as linhagens do fungo *Escovopsis* (Tabela 2) e foi selecionada para estudos químicos. Seu extrato em acetona também apresentou 99% de inibição contra o parasita *L. donovani* (Tabela 3).

Foi feita a análise do perfil químico da fração 100% MeOH (Figura 15) e as condições de fracionamento foram otimizadas (item 3.9), levando ao isolamento dos compostos **28** (2,05 mg) (Figura 16).

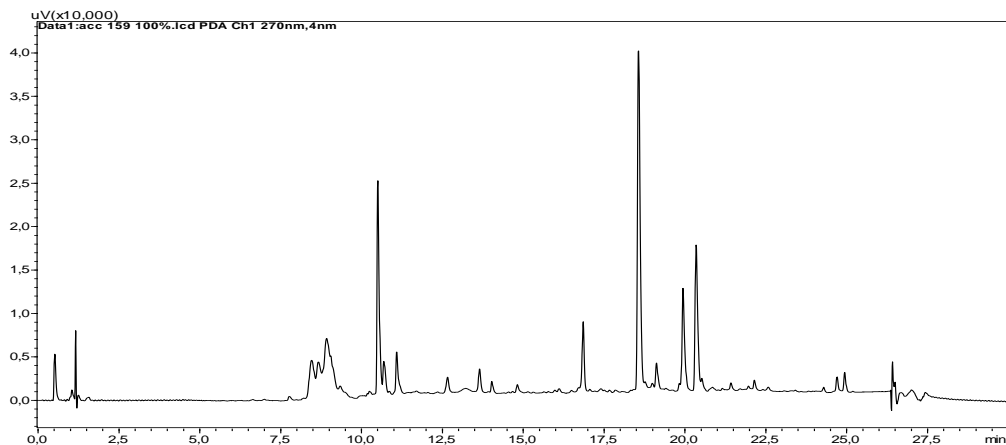


Figura 15. Cromatograma da fração 100% MeOH do extrato em acetona do cultivo em YPM de ICBG 197. Detecção em UV a 270 nm.

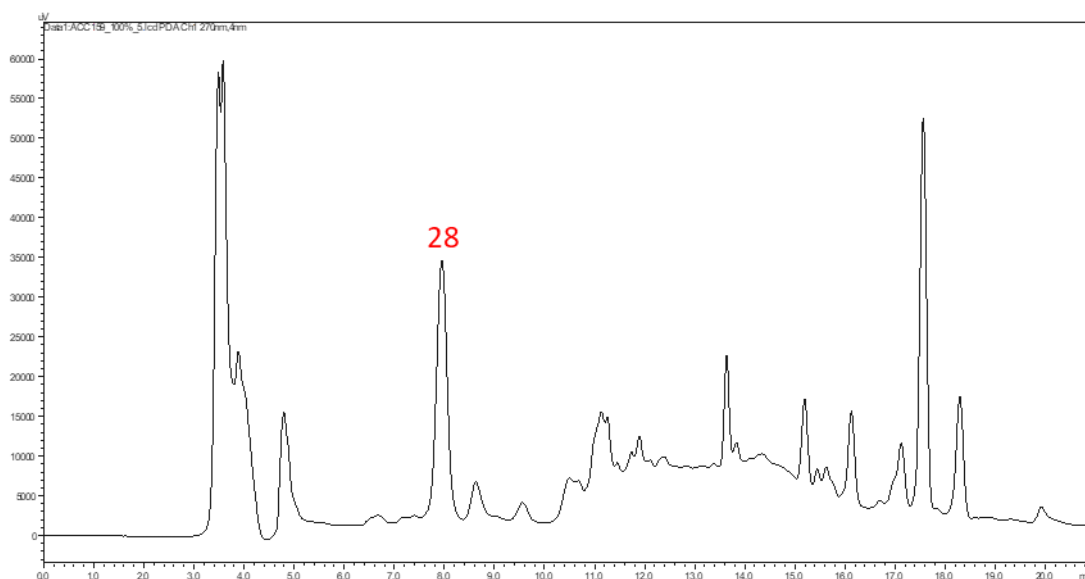


Figura 16. Cromatograma obtido durante o isolamento de metabólitos da fração 100% MeOH. Detecção UV a 270 nm.

Os espectros de HR-ESI-MS e RMN de ^1H , assim como os espectros de $g\text{COSY}$, $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$ de todos os compostos foram obtidos. Os dados dos espectros de massas foram consultados no banco de dados Antibase[®], que sugeriu a presença do composto polieno macrolídeo nistatina (LANCELIN; BEAU, 1989). A massa obtida em modo negativo m/z 924,5040 (APÊNDICE V) quando comparada com a massa teórica do composto (m/z 924,4962) apresenta erro de -8,3 ppm. Foi feita a análise dos espectros de RMN 1 D e 2D (APÊNDICE WAPÊNDICE Z) do composto **28**.

A Figura 17 mostra a estrutura com as posições numeradas do composto **28** (nistatina). A Tabela 6 mostra os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos obtidos pelos dados de RMN de ^1H e pelas correlações do $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$.

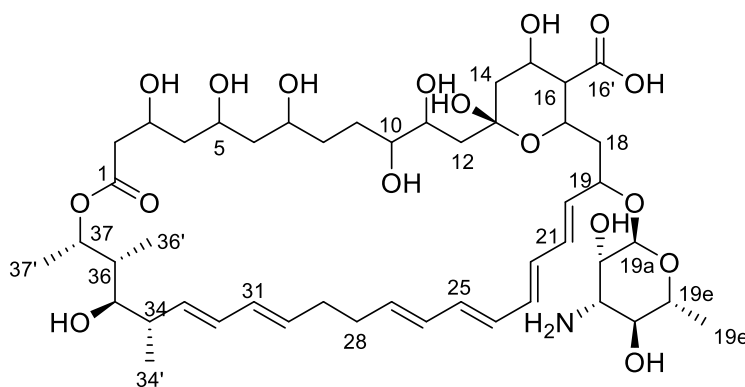


Figura 17. Estrutura química da nistatina (**28**).

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C em CD_3OD da nistatina (**28**).

Posição	$\delta^1\text{H}$ (mult.; J(Hz); int)	$\delta^{13}\text{C}$	$g\text{HMBC}$ H→C	$g\text{COSY}$
1		171,2		
2	2,40 (<i>m</i> , 2H)	43,2	C1	4,19
3	4,19 (<i>m</i> , 1H)	68,3	C1	1,59; 2,40
4	1,59 (<i>m</i> , 1H) 1,28 (<i>m</i> , 1H)	44,5	C3	
5	3,31 (sinal sobreposto, 1H)	74,5	C6	1,28
6	1,57 (<i>m</i> , 1H) 1,67 (<i>m</i> , 1H)	40,9		
7	4,40 (<i>m</i> , 1H)	68,7		1,67
8	1,55 (<i>m</i> , 1H)	35,2	C9	
9	1,64 (<i>m</i> , 1H) 1,55 (<i>m</i> , 1H)	30,1		
10	3,39 (<i>m</i> , 1H)	74,9		1,64
11	3,69 (<i>m</i> , 1H)	74,4		
12	1,74 (<i>m</i> , 1H) 1,66 (<i>m</i> , 1H)	48	C13	
13		97,3		
14	2,02 (<i>m</i> , 1H) 1,61 (<i>m</i> , 1H)	44,5	C13	
15	4,3 (<i>s</i> , 1H)	67,3		2,03
16	2,03 (<i>m</i> , 1H)	61,2	C16'	
16'		178,7		
17	3,74 (<i>m</i> , 1H)	71,3		
18	2,15 (<i>m</i> , 1H) 1,72 (<i>m</i> , 1H)	39,1		4,43
19	4,43 (<i>m</i> , 1H)	79		5,94
19a	4,59 (<i>s</i> , 1H)	99,2	C19b	
19b	4,0 (<i>s</i> , 1H)	68,9	C19c	
19c	3,16 (<i>dd</i> , 10,2; 2,4; 1H)	56,9		4,0; 3,38
19d	3,38 (<i>m</i> , 1H)	70,4		
19e	4,27 (<i>m</i> , 1H)	67,7		1,28
19e'	1,28 (<i>d</i> ; 6,2; 3H)	17,7		
20	5,94 (<i>m</i> , 1H)	135,3		6,22
21	6,22(<i>m</i> , 1H)	133,1		
22	6,22 (<i>m</i> , 1H)	133,1		
23	6,22 (<i>m</i> , 1H)	133,1		
24	6,22 (<i>m</i> , 1H)	133,1		
25	6,22 (<i>m</i> , 1H)	133,1		
26	6,0 (<i>m</i> , 1H)	133,7		5,67
27	5,67 (<i>dt</i> ; 13,8; 6,2; 1H)	134,9		2,2

28	2,2 (<i>m</i> , 1H)	33,5	C29	
29	2,15 (<i>m</i> , 1H)	39,1		
30	5,57 (<i>dt</i> ; 14,9; 6,8; 1H)	132,7		2,15
31	6,00 (<i>m</i> , 1H)	131,7		
32	6,22 (<i>m</i> , 1H)	133,1		
33	5,39 (<i>dd</i> ; 14,5; 8,9; 1H)	135,2	C34	2,34
34	2,34 (<i>m</i> , 1H)	42,5		5,39; 1,06
34'	1,06 (<i>d</i> ; 6,7; 3H)	18,0		2,34
35	3,26 (sinal sobreposto)	78,7		
36	1,9 (<i>ddq</i> ; 14,8; 7,0; 3,8; 1H)	41,8		5,21
36'	0,99 (<i>d</i> ; 7,0; 3H)	12,3	C36	
37	5,21 (<i>m</i> , 1H)	72,2		1,2; 1,9
37'	1,2 (<i>d</i> ; 6,4; 3H)	17,2		5,21

A análise dos dados de RMN de ^1H e dos espectros bidimensionais de RMN mostra a presença de 12 hidrogênios em δ_{H} 6,22 (6H), δ_{H} 6,00 e δ_{H} 5,94 (3H), δ_{H} 5,67 (1H), δ_{H} 5,57 (1H) e δ_{H} 5,39 (1H) ligados a carbonos sp^2 com descolamentos químicos entre δ_{C} 133,1 a δ_{C} 135,2. Para três desses hidrogênios foi possível observar as multiplicidades dos sinais no espectro de RMN de ^1H . O hidrogênio δ_{H} 5,39 apresentou multiplicidade de duplo duplete (*dd*) pois acopla com o hidrogênio em δ_{H} 6,22 e com o hidrogênio H em δ_{H} 2,34. O H-30 em δ_{H} 5,57 apresenta-se como um duplo tripleto (*dt*), pois acopla com o hidrogênio em δ_{H} 6,00 e com os dois hidrogênios em δ_{H} 2,15. O H-27 em δ_{H} 5,67 também é um *dt*, uma vez que acopla com o hidrogênio em δ_{H} 6,00 e com os dois hidrogênios em δ_{H} 2,20. Os outros hidrogênios ligados a carbono sp^2 apresentam sinais sobrepostos, não sendo possível diferenciá-los, principalmente por estarem ligados a carbonos com deslocamentos químicos muito próximos.

Há a presença de dois açúcares na estrutura. Na posição 13 há um carbono não hidrogenado com deslocamento típico de carbono anomérico δ_{C} 97,3. Neste mesmo açúcar, o H-16 em δ_{H} 2,03 correlaciona-se no gHMBC com uma carboxila em δ_{C} 178,7. Para o outro açúcar, o H-19a em δ_{H} 4,59 está ligado a um carbono em δ_{C} 99,2 indicando a posição anomérica. O espectro gHSQC mostra o C-19c em δ_{C} 56,9 que está ligado a um hidrogênio em δ_{H} 3,16, ambos com deslocamentos químicos típicos de ligação C-N.

Assim, com os dados espectroscópicos e espectrométricos, aliados à comparação com a literatura (LANCELIN; BEAU, 1989), confirmou-se a estrutura do composto nistatina (**28**).

A nistatina é um antifúngico poliênico macrolídeo composto por um anel macrolactônico e o aminoaçúcar micosamina. Foi primeiramente isolada da linhagem *Streptomyces noursei* associada ao solo de uma fazenda nos Estados Unidos (ETTLINGER; CORBAZ; HUTTER, 1958; HAZEN; BROWN; MASON, 1953; HAZEN; BROWN, 1951). É usada no tratamento tópico de candidíases e é produzida comercialmente a partir de *S. noursei* (FJAERVIK; ZOTCHEV, 2005). Outras linhagens, como a *S. fungicidicus*, encontrada no Japão, porém sem descrição da fonte e *S. ahyscopicus*, associada ao solo da China, também produzem nistatina (MATSUOKA; UMEZAWA, 1960; REN et al., 2014). No geral, os dados encontrados na literatura relatam o isolamento da nistatina a partir de *S. noursei* ou de linhagens geneticamente modificadas desta (BRAUTASET et al., 2008; ZOTCHEV et al., 2000).

O composto **28** (nistatina) foi testado (metodologia item 3.5) frente a duas linhagens do fungo *Escovopsis* - AB1506201-3 ESCO e EM150618-2 2/2 ACRO (Figura 18).

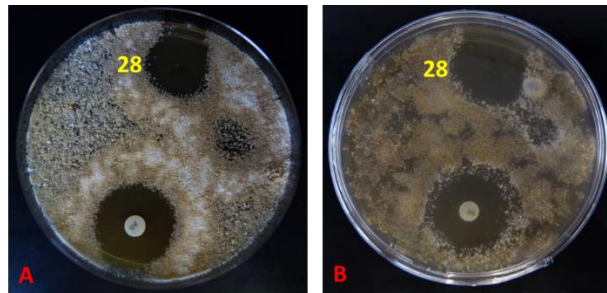


Figura 18. Atividade antifúngica do composto **28**, exibida em halo de inibição, frente aos fungos entomopatogênicos *Escovopsis* – **A**- AB1506201-3 ESCO e **B**- EM150618-2 2/2 ACRO. Controle positivo: anfotericina B.

Como é possível observar na Figura 18, a nistatina (**28**) apresenta atividade contra as duas linhagens do fungo entomopatogênico testadas, sendo um possível aliado das formigas *Acromyrmex* sp. na proteção dos ninhos contra o *Escovopsis*. Assim *Streptomyces* sp. ICBG197 pode estabelecer uma relação ecológica com formigas desta espécie auxiliando na manutenção da viabilidade dos ninhos. O análogo da nistatina, nistatina P1, foi identificado de uma espécie de *Pseudonocardia* associada com formigas *Acromyrmex ostospinosus*. Este composto aparentemente apresenta um açúcar adicional em sua estrutura, porém os dados químicos não foram confirmados experimentalmente. A nistatina P1 não foi testada em ensaios biológicos, entretanto a actinobactéria da qual foi isolada apresentou atividade contra o fungo parasita *Escovopsis weberi* (BARKE et al., 2010).

O extrato bruto de *Streptomyces* sp. ICBG197 apresentou 99% de inibição contra o parasita *L. donovani* e possivelmente essa atividade está relacionada a produção de nistatina

por essa actinobactéria. Há estudos na literatura que relatam a atividade leishmanicida deste composto (GHOSH; CHATTERJEE, 1962; GHOSH; HALDAR; CHATTERJEE, 1960; TEWARY et al., 2006).

4.5.3 *Streptomyces* sp. ICBG171

A linhagem *Streptomyces* sp. ICBG 171 inibiu três linhagens do fungo *Escovopsis* (Tabela 2) e foi selecionada para estudos químicos. Seu extrato em acetona também apresentou 94% de inibição contra o parasita *L. donovani* (Tabela 3).

Após o fracionamento da fração hexânica (item 3.9), todas as sub-frações tiveram seus espectros de RMN de ^1H obtidos e após análise, a sub-fração 1 teve as condições de fracionamento otimizadas (item 3.9), levando ao isolamento do composto **29** (14.3 mg) (Figura 19).

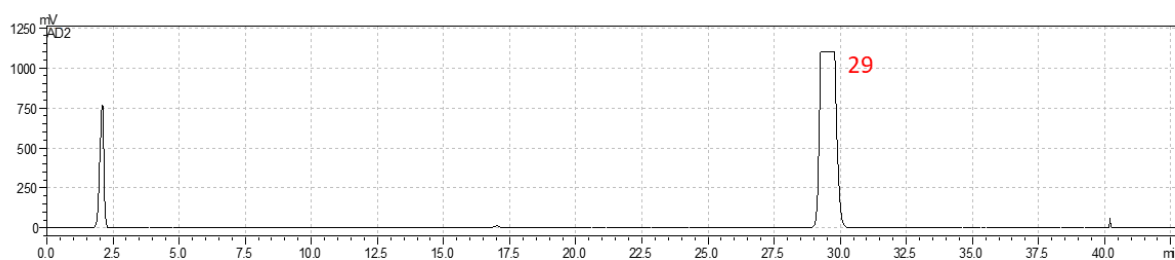


Figura 19. Cromatograma obtido durante o isolamento de metabólitos da sub-fração 1. Detecção ELSD.

Os espectros de HR-ESI-MS e RMN de ^1H , assim como os espectros de gCOSY, gHSQC, gHMBC e ^{13}C foram obtidos. Os dados dos espectros de massas foram consultados no banco de dados Antibase[®], que apontou correlação do composto **29** com o composto poliéter nigericina (STEINRAUF; PINKERTON; CHAMBERLIN, 1968). A massa obtida em modo positivo $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 747,4659 (APÊNDICE AA) quando comparada com a massa teórica do composto ($[\text{M}+\text{Na}]^+$ 747,4654) apresenta erro de -0,7 ppm.

Foi feita a análise dos espectros de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e RMN bidimensionais (APÊNDICE BBAPÊNDICE FF) do composto **29**.

A Figura 20 mostra a estrutura química da nigericina (**29**). A

Tabela 7 mostra os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C e as correlações entre eles obtidas por gHMBC e gCOSY.

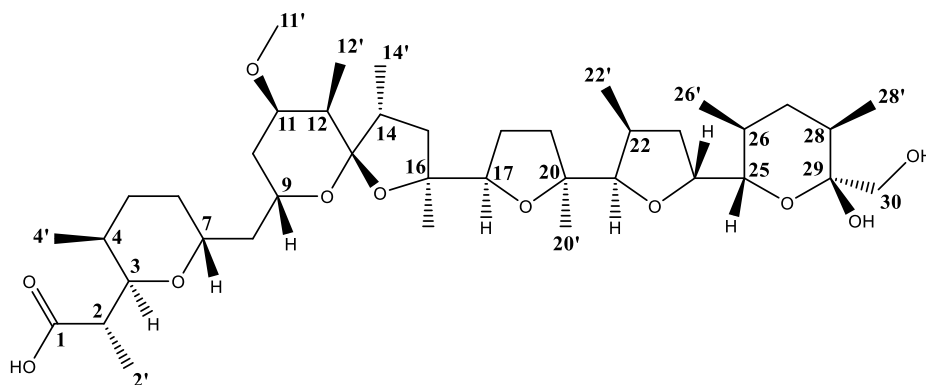


Figura 20. Estrutura química da nigericina (**29**).

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) em C_6D_6 da nigericina (**29**)

Posição	$\delta^1\text{H}$ (mult.; J(Hz); int)	$\delta^{13}\text{C}$	<i>g</i> HMBC H-C	<i>g</i> COSY
1		177,5		
2	2,48 (<i>dq</i> ; 7,1; 2,3; 1H)	44,7	C1,C2',C3,C4	H2', H3
2'	0,97 (<i>m</i> , 3H)	13	C1,C3	H2
3	3,87 (<i>m</i> , 1H)	73,2	C1, C4',C7	H2, H4
4	1,37 (<i>m</i> , 1H)	27,2	C5	H3, H4'
4'	0,71 (<i>m</i> , 3H)	10,3	C3	H4
5	1,75 (<i>m</i> , 1H)	37,5		
	1,54 (<i>m</i> , 1H)			
6	1,86 (<i>m</i> , 1H)	23,7	C5, C7	H7
	0,90 (<i>m</i> , 1H)			
7	3,97 (<i>m</i> , 1H)	68,9	C3,C6	H6, H8
8	2,62 (<i>dt</i> , 3,9; 13,2) 1H)	35,6	C7, C8, C10	H7, H9
	0,9 (<i>m</i> , 1H)			
9	4,40 (<i>m</i> , 1H)	60,8	C11	H8
10	2,17 (<i>m</i> , 1H)	31,7	C11, C12	H11
	0,70 (<i>m</i> , 1H)			
11	3,02 (<i>m</i> , 1H)	78	C9, C12	H10
11'	3,50 (<i>s</i> , 3H)	57,6	C11	
12	1,26 (<i>m</i> , 1H)	37,6		H12'
12'	1,76 (<i>m</i> , 3H)	28,6		H12
13		108,7		
14	2,00 (<i>m</i> , 1H)	39,4	C13,C14',C15	H14', H15
14'	0,97 (<i>m</i> , 3H)	13		H14
15	1,72 (<i>m</i> , 1H)	42,9	C16	H14
	1,64 (<i>m</i> , 1H)			

16		81,9		
16'	0,97 (m, 3H)	23,0	C16	
17	3,42 (m, 1H)	82,9	C16,C18	H18, H19
18	1,87 (m, 1H)	26,4		H17, H19
	1,66 (m, 1H)			
19	1,47 (m, 1H)	26,2		H17, H18
	1,16 (m, 1H)			
20		83,7		
20'	0,97 (m, 3H)	22,9	C20	
21	4,12 (d; 3,9; 1H)	86,2	C22, C22', C23	H22
22	1,92 (m, 1H)	35,4	C22'	H21, H22'
22'	0,7 (m, 3H)	15,4	C22	H22
23	2,30 (m, 1H)	31,2	C21	H24
	1,18 (m, 1H)			
24	4,31 (m, 1H)	77,7	C21, C25	H23, H25
25	4,26 (m, 1H)	74,6	C24, C26	H24, H26
26	1,17 (m, 1H)	33	C26'	H25, H26'
26'	0,6 (d, 6,6; 3H)	17,2	C26	H26
27	1,76 (m, 1H)	38,3	C29	
	1,62 (m, 1H)			
28	2,25 (m, 1H)	32,4	C25	
28'	1,26 (d; 6,6; 3H)	12,6	C28, C29	
29		97,7		
30	3,93 (m, 2H)	69,3	C29	

A análise dos dados de RMN de ^1H , ^{13}C e espectros bidimensionais mostra a presença de seis hidrogênios em δ_H 3,87 (1H), δ_H 3,97 (1H), δ_H 4,40 (1H), δ_H 3,42 (1H), δ_H 4,12 (1H) e δ_H 4,31 (1H) e também dois carbonos sp^3 não hidrogenados em δ_C 81,9 e δ_C 83,7, todos vizinhos a oxigênio. Na posição 11' é possível verificar a presença de O-CH₃ com 3H - singlete em δ_H 3,50 ligados a carbono em δ_C 57,6.

Há a presença de um açúcar na estrutura. Na posição 29 há um carbono não hidrogenado com deslocamento típico de carbono anomérico δ_C 97,7. Na posição 30 ligado ao carbono anomérico há a presença de um grupo metileno ligado a uma hidroxila (δ_H 3,93 e δ_C 69,3).

Assim, com os dados espectroscópicos e espectrométricos, aliados à comparação com a literatura (STEINRAUF; PINKERTON; CHAMBERLIN, 1968), confirmou-se a estrutura do composto nigericina.

Após o estudo químico da fração hexânica do extrato em acetona de *Streptomyces* sp. ICBG 171, a fração em clorofórmio também foi analisada. Como descrito acima, a fração em

clorofórmio foi fracionada (item 3.9) e todas as sub-frações tiveram seus espectros de RMN de ^1H obtidos. Após análise dos espectros, a sub-fração 2 teve as condições de fracionamento otimizadas (item 3.9), levando ao isolamento dos compostos **30** (1,3 mg), **31** (3,6 mg) e **32** (3,2 mg) (Figura 21).

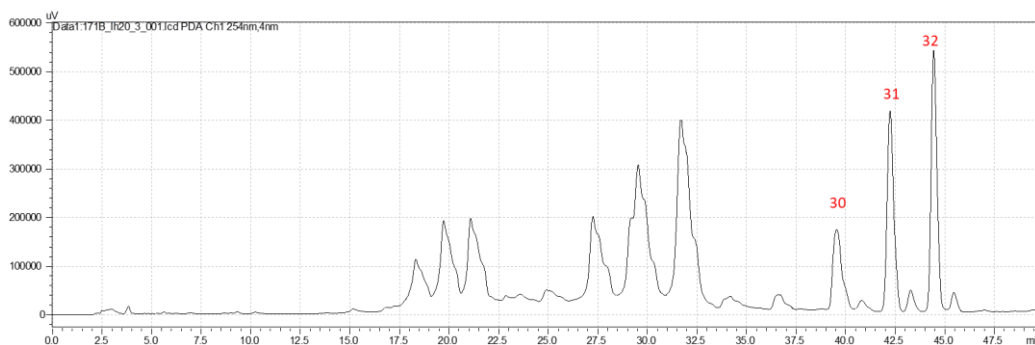


Figura 21. Cromatograma obtido durante o isolamento de metabólitos da sub-fração 2 - clorofórmio. Detecção UV 250nm.

Os espectros de HR-ESI-MS (APÊNDICE GGAPÊNDICE II) foram obtidos e consultados no banco de dados Antibase[®], que apontou correlação dos compostos **30**, **31** e **32** com os macrolídeos elaiofilina, 11-*O*-metilelaiofilina e 11,11-*O,O*-dimetilelaiofilina (Figura 22) As massas obtidas em modo positivo $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1047,5836, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1061,6002 e $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1075,6139, respectivamente, quando comparada com a massa teórica dos compostos de $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1047,5868, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1061,6025 e $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1075,6181, apresentam erros de -3,05 ppm, -2,16 ppm e -3,9 ppm. Para os compostos **30**, **31** e **32** foram obtidos apenas os espectros de RMN de ^1H (APÊNDICE JJAPÊNDICE LL) para comparação com a literatura (RITZAU et al., 1998).

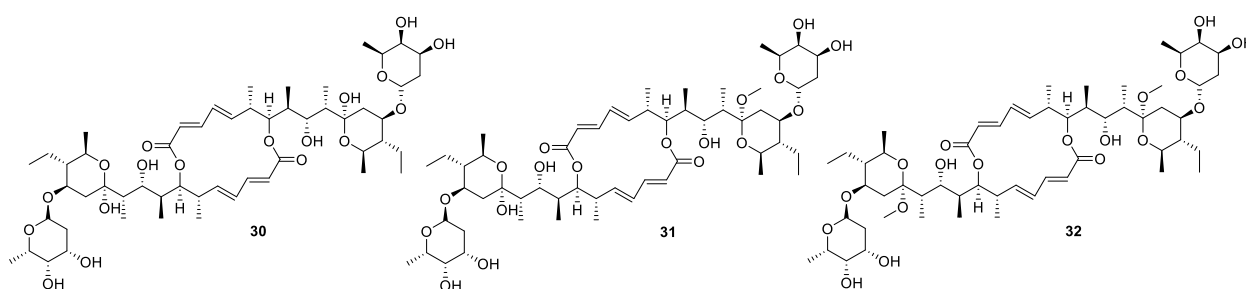


Figura 22. Estruturas químicas dos compostos **30**-elaiofilina **31**- 11-*O*-metilelaiofilina e **32**-11,11-*O,O*-dimetilelaiofilina

A elaiofilina foi originalmente isolada de uma linhagem de *Streptomyces melanosporus* associada ao solo de um campo de trigo na Itália (ARCAMONE et al., 1959). A elaiofilina e

seus derivados são macrolídeos glicosilados que têm sido isolados de diversas espécies de *Streptomyces* associadas ao solo, sedimento marinho e regiões de mangue (GRABLEY et al., 1990; HAN et al., 2016; HAO et al., 2001; SHENG et al., 2015; SUPONG et al., 2017; WU et al., 2013; YIN et al., 2017).

A nigericina foi o primeiro poliéter ionóforo descoberto, isolado de uma linhagem de *Streptomyces hygroscopicus* associada ao solo (BERGER et al., 1951; STEMPEL; WESTLEY; BENZ, 1969). A nigericina já foi isolada de diversas linhagens de *Streptomyces* sp. associada ao solo e também de *S. hygroscopicus* BRM10, um endófito das raízes de *Alpinia galanga*, uma planta da família do gengibre (FANG; WONG; DEMAIN, 2000; LEULMI et al., 2019; TAECHOWISAN et al., 2013; WU et al., 2009).

Formigas *Acromyrmex* sp. podem se beneficiar da associação com a actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG 171 por esta biossintetizar compostos bioativos que podem proteger o ninho contra patógenos. A nigericina (**29**) já foi previamente isolada de outra linhagem de *Streptomyces* associada a formigas *Cyphomyrmex* pelo nosso grupo de pesquisa, e inibiu o fungo patogênico *Escovopsis* sp., além de apresentar acentuada atividade contra o parasita *L. donovani* (ORTEGA et al., 2019). A alta atividade antiparasitária demonstrada pelo extrato bruto desta bactéria pode ser explicada pela produção da nigericina e da elaiofilina e seus análogos, que já apresentam comprovada ação leishmanicida (ORTEGA et al., 2019; PEÑA; SCARONE; SERRA, 2015). Os compostos **30**, **31** e **32** não foram testados contra o fungo entomopatogênico *Escovopsis* sp.

4.5.4 *Streptomyces* sp. ICBG1318

Nos ensaios de triagem de atividade biológica, notou-se que a actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG 1318 (Figura 23), isolada da abelha sem ferrão *M. scutellaris* apresentou alta inibição do parasita *L. donovani* (99% de inibição) e também atividade antibacteriana contra o patógeno de abelhas melíferas *P. larvae* (Figura 24) (RODRIGUEZ-HERNANDEZ et al., 2019).

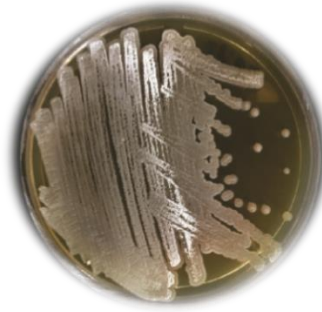


Figura 23. *Streptomyces* sp. ICBG1318

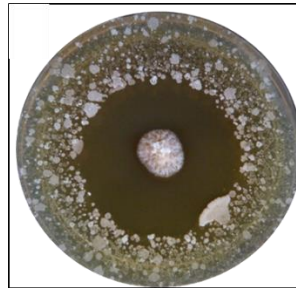


Figura 24. Halo de inibição desenvolvido por *Streptomyces* sp. ICBG 1318 contra o patógeno *P. larvae*.

O extrato bruto em acetato de etila de *Streptomyces* sp. ICBG 1318, assim como as frações obtidas por extração em fase sólida deste mesmo extrato (item 3.9), foram testados conforme metodologia citada no item 3.5, contra o patógeno *P. larvae* (Figura 25). Este ensaio guiou a etapa de isolamento dos compostos.

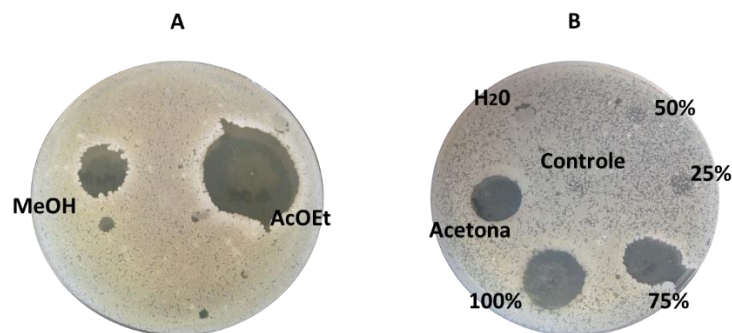


Figura 25. Halo de inibição desenvolvido por **A**-extrato bruto do cultivo em ISP-2 ágar de ICBG 1318 e **B**-frações obtidas por SPE do extrato em AcOEt contra o patógeno *P. larvae*.

A análise do perfil químico da fração MeOH 100% indicou a presença de dois compostos majoritários e assim as condições de fracionamento foram otimizadas (item 3.9) e foram isolados os compostos **33 e 34** (Figura 26).

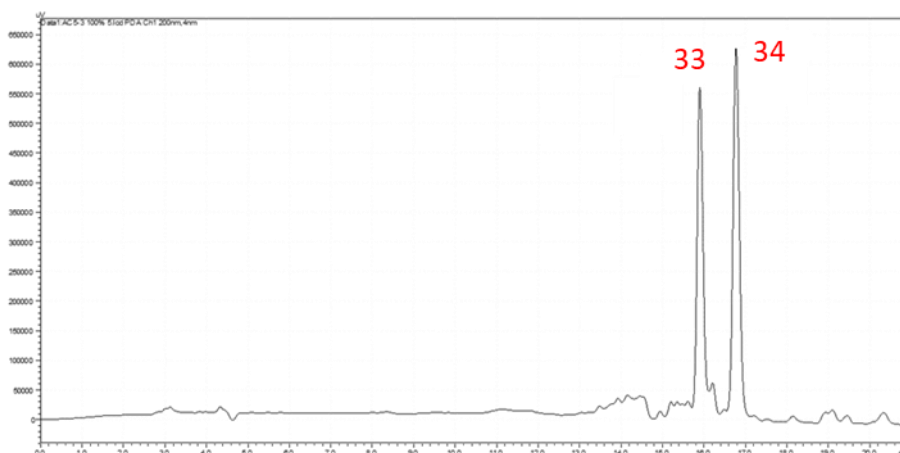


Figura 26. Cromatograma observado obtido durante o isolamento de metabólitos da fração MeOH 100%. Detecção em UV a 200 nm.

Os compostos **33** (1,8 mg) e **34** (2,0 mg) foram isolados. Os espectros de RMN de ^1H , $g\text{COSY}$, $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$ (APÊNDICE OOAPÊNDICE **vv**) dos dois compostos foram obtidos. Analisando os espectros, observou-se grande semelhança entre eles, evidenciando a presença de compostos análogos. Foram obtidos os espectros de massas por HR-ESI-MS (APÊNDICE MMAPÊNDICE **nn**) operando no modo positivo. Os dados dos espectros de massas foram consultados no banco de dados Antibase[®], que não apontou nenhuma correlação de compostos já conhecidos para **33** e **34**.

A

Tabela **8** mostra os deslocamentos químicos de hidrogênios, obtidos por RMN de ^1H , e dos carbonos, obtidos indiretamente através de $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$, além das correlações entre eles obtidas por $g\text{HMBC}$ para os dois compostos.

Tabela 8. Dados de RMN 1D e 2D (500 MHz, CDCl_3) para os compostos **33** e **34**

Posição	Composto 33			Composto 34		
	δ_{C}	δ_{H} , (<i>J</i> em Hz)	HMBC ^a	δ_{C}	δ_{H} , (<i>J</i> em Hz)	HMBC ^a
1	167,3, C			167,3, C		
2	51,7, CH_2	4,69, <i>d</i> (17,5) 3,43, <i>d</i> (17,5)	1, 3	51,7, CH_2	4,69, <i>d</i> (17,6) 3,43, <i>d</i> (17,6)	1, 3
2 N- CH_3	36,6, CH_3	3,12, <i>s</i>	3, 2	36,6, CH_3	3,12, <i>s</i>	3, 2
3	170,9, C			170,9, C		
4	42,7, CH_2	5,04, <i>m</i> 3,63, <i>m</i> 7,21 <i>sl</i>	3, 5	42,7, CH_2	5,03, <i>m</i> 3,63, <i>m</i> 7,21 <i>sl</i>	3, 5
4 NH			3, 5			3, 5
5	172,8, C			172,9, C		
6	55,3, CH	4,23, <i>sl</i> (5,5)	5, 7, 8, N- CH_3 (6)	55,9, CH	4,23, <i>sl</i> (6,2)	5, 7, 8, N- CH_3 (6)
6 N- CH_3	29,3, CH_3	2,78, <i>s</i>	6, 8	29,3, CH_3	2,78, <i>s</i>	6, 8

7	15,1, CH ₃	1,61, <i>m</i>	5, 6	15,2, CH ₃	1,62, <i>m</i>	5, 6
8	166,8, C			166,9, C		
9	51,1, CH ₂	5,27, <i>d</i> (15,5) 3,90, <i>d</i> (15,5)	8	51,1, CH ₂	5,27, <i>d</i> (15,4) 3,90, <i>d</i> (15,4)	8
9 N-OH		9,21, <i>s</i>			9,22, <i>s</i>	
10	171,2, C			171,2, C		
11	48,4, CH	5,32, <i>d</i> (4,7)	10, 12, 13	48,4, CH	5,32, <i>d</i> (4,7)	10, 12, 13
12	24,1, CH ₂	2,17, <i>m</i> 1,87, <i>m</i>	10	24,0, CH ₂	2,17, <i>m</i> 1,87, <i>m</i>	
13	21,4, CH ₂	1,48, <i>m</i> 1,57, <i>m</i>		21,3, CH ₂	1,47, <i>m</i> 1,58, <i>m</i>	
14	46,9, CH ₂	2,66, <i>m</i> 3,13, <i>m</i>		46,9, CH ₂	2,66, <i>m</i> 3,13, <i>m</i>	
14 NH		4,90, <i>d</i> (13,5)	15		4,90, <i>d</i> (13,3)	15
15	171,9, C			172,0, C		
16	46,5, CH	6,09, <i>d</i> (9,3)	15	46,6, CH	6,09, <i>d</i> (9,2)	15
16 NH		7,44, <i>d</i> (9,3)	21		7,44, <i>d</i> (9,2)	21
17	80,1, CH	4,86, <i>d</i> (9,6)	15	80,1, CH	4,86, <i>d</i> (9,6)	15
18	30,2, CH	1,74, <i>m</i>	17	30,2, CH	1,74, <i>m</i>	
19	19,2, CH ₃	0,87, <i>sl</i>	17, 18, 20	19,3, CH ₃	0,88, <i>sl</i>	17, 18, 20
20	18,4, CH ₃	1,10, <i>d</i> (4,9)	17, 18, 19	18,4, CH ₃	1,09, <i>d</i> (4,9)	17, 18, 19
21	177,5, C			177,6, C		
22	77,4, C			77,5, C		
22 OH		3,49, <i>s</i>	22		3,50, <i>s</i>	22
23	98,4, C			98,4, C		
23 OH		6,13, <i>s</i>	22, 23, 24		6,13, <i>s</i>	22, 23, 24
24	27,3, CH ₂	1,71, <i>m</i>		27,7, CH ₂	1,72, <i>m</i>	
25	24,5, CH ₂	1,66, <i>m</i> 1,51, <i>m</i>	23	24,5, CH ₂	1,66, <i>m</i> 1,52, <i>m</i>	23
26	35,1, CH	1,35, <i>m</i>		34,8, CH	1,37, <i>m</i>	
27	75,3, CH	3,63, <i>m</i>		75,3, CH	3,63, <i>m</i>	
28	20,0, CH ₃	1,35, <i>s</i>	21, 22, 23	20,1, CH ₃	1,35, <i>s</i>	21, 22, 23
29	40,5, CH ₂	1,07, <i>m</i> 0,94, <i>m</i>	31, 32	38,1, CH ₂	1,01, <i>m</i>	26, 30
30	24,3, CH	1,67, <i>m</i>	31, 32	30,9, CH	1,39, <i>m</i>	
31	24,4, CH ₃	0,89, <i>sl</i>		30,9, CH ₂	1,19, <i>m</i>	
32	213, CH ₃	0,82, <i>d</i> (4,3)	29, 31	18,5, CH ₃	0,80, <i>d</i> (4,4)	29, 31
33	23,9, CH ₂	1,41, <i>m</i>		11,7, CH ₃	0,86, <i>sl</i>	31
34	8,4, CH ₃	0,89, <i>sl</i>	27, 33	23,8, CH ₂	1,37, <i>m</i>	
35				8,4, CH ₃	0,89, <i>sl</i>	27, 34

A análise dos espectros de RMN indicou a presença de seis hidrogênios ligados a heteroátomos. Um hidrogênio desblindado em δ 9,21; dois hidrogênios ligados a nitrogênio - um dubleto em δ 7,44 (*d*, $J = 9,3$ Hz) e um singlete largo em δ 7,21. Análises dos espectros de gHMBC e gHSQC permitiram inferir a presença de sete carbonilas de amidas ou éster, quatro carbonos sp^3 ligados a átomos de oxigênio e sete carbonos sp^3 ligados a átomos de nitrogênio.

Analisando os espectros foi possível verificar a presença de seis subestruturas derivadas de aminoácidos e uma subestrutura derivada de policetídeo: uma unidade de ácido piperázico (Pip-1), β -hidroxi-leucina (β -OH-Leu), *N*-hidroxiglicina (*N*-OH-Gly), *N*-metilglicina (*N*-Me-Gly), *N*-metilalanina (*N*-Me-Ala), glicina (Gly) e um anel pirano ligado a cadeia lateral.

A presença de *N*-OH-Gly foi confirmada pela desblindagem dos deslocamentos químicos de C-9 e H-9 (δ_C 51,1; δ_H 5,27 e 3,90) quando comparados com os deslocamentos químicos da glicina, e pelo hidrogênio em δ_H 9,21 referente ao grupo N-OH. A sequência dos aminoácidos foi estabelecida pelas correlações de gHMBC. As correlações de H-17 (δ_H 4,86, d, $J = 9,6$ Hz) e dos hidrogênios metilênicos H-2 (δ_H 4,69, d, $J = 17,5$ Hz e δ_H 3,43, d, $J = 17,5$ Hz) com a carbonila C-1 (δ_C 167,3) conectaram o aminoácido β -OH-Leu e *N*-Me-Gly. *N*-Me-Gly foi ligada a unidade de Gly pelas correlações analisadas no espectro de gHMBC de *N*-Me (δ_H 3,12, s), H-2 (δ_H 4,69, 3,43) e H-4 (δ_H 5,04, 3,63) com a carbonila em C-3 (δ_C 170,9). Gly foi conectada a *N*-Me-Ala pelas correlações do hidrogênio da amida da glicina 4-NH (δ_H 7,21) e de H-6 (δ_H 4,23, sl $J = 5,5$ Hz) com C-5 (δ_C 172,8). A ligação entre as unidade de *N*-Me-Ala e *N*-OH-Gly foi inferida pelas correlações de *N*-Me (δ_H 2,78, s), e de H-9 (δ_H 5,27 d, $J = 15,5$ Hz e δ_H 3,90 d, $J = 15,5$ Hz) com a carbonila C-8 (δ_C 166,8). A ligação entre *N*-OH-glicina e o ácido piperázico foi estabelecida pelas correlações observadas entre H-11 (δ_H 5,32, d, $J = 4,7$ Hz) e H-12b (δ_H 1,87, m) com C-10 (δ_C 171,2). Finalmente, os hidrogênios H-16 (δ_H 6,09, d, $J = 9,3$ Hz) e H-17 (δ_H 4,86, d, $J = 9,6$ Hz) da β -OH-Leu e 14-NH (δ_H 4,90, d, $J = 13,5$ Hz) do ácido piperázico mostraram correlações com a carbonila C-15 (δ_C 171,9), conduzindo a formação do fragmento hexapeptídico cíclico (Figura 27).

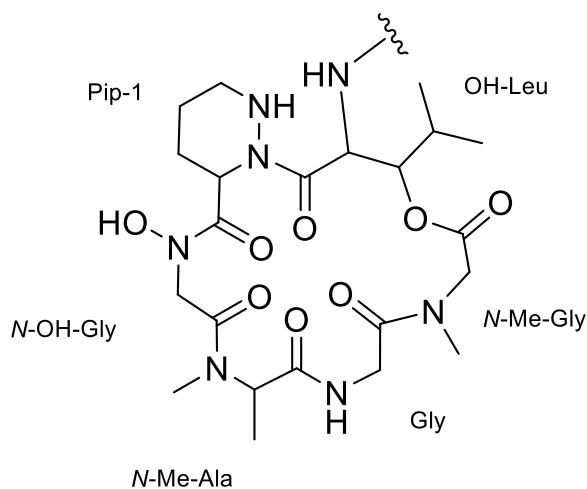


Figura 27. Fragmento hexapeptídico cíclico dos compostos **33** e **34**.

Em seguida a cadeia lateral policetílica teve sua estrutura determinada. Pela análise do espectro de COSY (APÊNDICE RR) foi possível observar dois grupamentos metilas H-31 e H-32 (δ_H 0,89 e 0,82) que mostraram correlações com H-30 (δ_H 1,67). Os hidrogênios H-34 (δ_H 0,89) acoplam com H-33 (δ_H 1,41). Pelas correlações de HMBC foi possível observar acoplamentos dos hidrogênios H-28 (δ_H 1,35) com a carbonila em (δ_C 177,5), com o C-22 (δ_C 77,4) e com o carbono hemiacetal C-23 (δ_C 98,4).

A ligação do policetídeo ao depsipeptídeo cíclico foi determinada pelas correlações observadas por HMBC de 16-NH (δ_H 7,44, d, $J = 9,3$ Hz) e H-28 (δ_H 1,35) com a carbonila C-21 (δ_C 177,5). Os dados de HR-ESI-MS indicaram a presença do íon $[M+Na]^+$ 806,4252 (APÊNDICE MM), com fórmula molecular $C_{36}H_{61}N_7O_{12}$, que quando comparado com o valor teórico apresenta erro de 2,97 ppm. Os dados de RMN e HR-ESI-MS possibilitaram o estabelecimento da estrutura planar do composto **33**.

As análises de RMN 1D e 2D mostraram que os compostos **33** e **34** eram análogos devido à grande semelhança entre eles. A diferença foi observada na cadeia lateral ligada ao anel pirano que muda de isobutil (composto **33**) para 2-metil-butil (C-29-C-33) para o composto **34**. Tal fato foi confirmado pelas correlações de gHMBC e gCOSY (APÊNDICE TTAPÊNDICE vv), que juntamente com os dados de HR-ESI-MS $[M+Na]^+$ 820,4396 (APÊNDICE NN), com fórmula molecular de $C_{37}H_{63}N_7O_{12}$ e erro 4,38 ppm completaram a determinação da estrutura planar do composto **34**.

Devido ao histórico de isolamento da actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG 1318 de abelhas *M. scutellaris* e por se tratar de estruturas inéditas, os compostos **33** e **34** receberam os nomes de meliponamicina A e meliponamicina B, respectivamente (

Figura 28). A Figura 28 mostra as correlações apresentados por gHMBC para os compostos **33** e **34**.

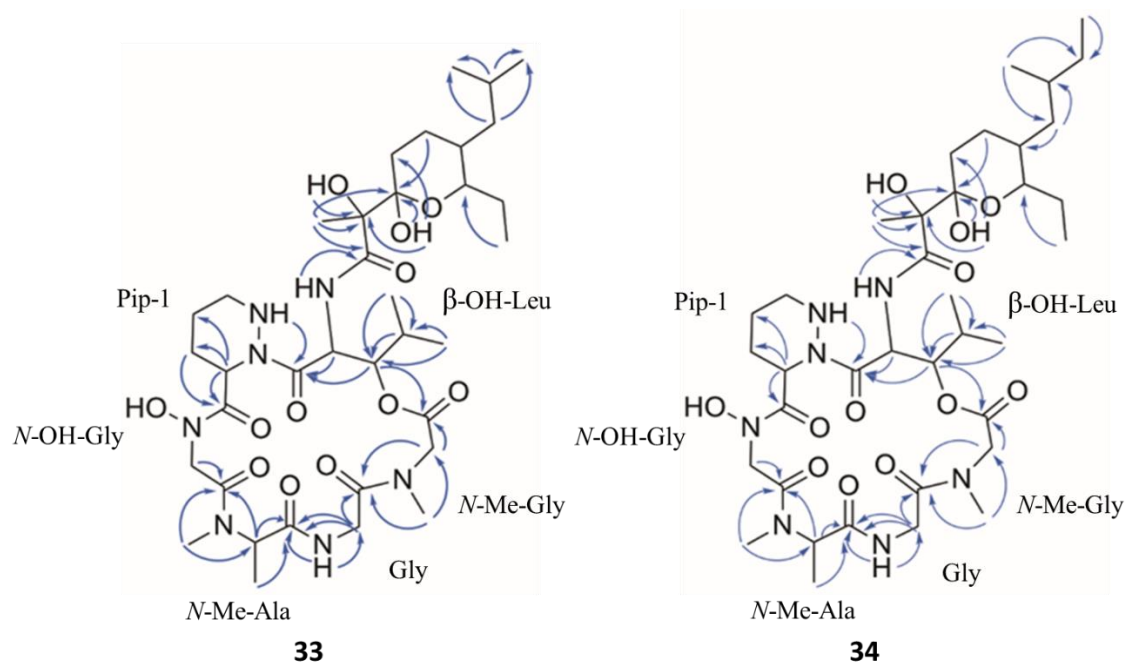


Figura 28. Estruturas planares e correlações observadas por *g*HMBC (H-C) para os compostos **33** e **34**.

A fim de determinar a configuração absoluta dos aminoácidos, os compostos **33** e **34** foram submetidos a hidrólise e derivatização com reagentes de Marfey (item 3.10) (FUJII et al., 1997). Ambos os compostos apresentaram a mesma configuração para os aminoácidos. Nas análises de LC-MS os derivados de *L*-FDLA e *D*-FDLA da *N*-Me-alanina (m/z 398) (APÊNDICE WWAPÊNDICE **XX**) eluíram nos tempos de retenção de 12,0 min e 12,1 min, respectivamente. Assim, concluiu-se que a configuração do carbono α é *L* visto que é conhecido que os derivados *L*-FDLA eluem primeiro que os derivados *D*-FDLA para esse aminoácido (HARADA et al., 1995). Os derivados *L*-DFLA e *D*-DFLA do ácido piperázico (m/z 425) (APÊNDICE YY-APÊNDICE **BBB**) eluíram no tempo de retenção de 22,3 min e 29,7 min. Seu carbono α também apresenta configuração *L* baseado no tempo de retenção de *L*- e *D*-derivados sintéticos do ácido piperázico descritos na literatura (OH et al., 2009). A configuração absoluta da β -hidroxi-leucina foi determinada baseada em comparação com os derivados *L*- e *D*- do padrão (2*S*,3*S*)-3- β -hidroxi-leucina (m/z 442) (APÊNDICE CCCAPÊNDICE **DDD**) e estabelecida como configuração *L* (APÊNDICE EEE). As configurações relativas da cadeia policetídic dos compostos **33** e **34** foram determinadas com base na comparação de dados de RMN de compostos similares já reportados na literatura, como a dentigerumicina, polioxipepetina e aurantimicina (GRÄFE et al., 1995; OH et al., 2009; UMEZAWA et al., 1998)

(Figura 29). As estruturas químicas das meliponamicinas A (**33**) e B (**34**) estão apresentadas na Figura 30.

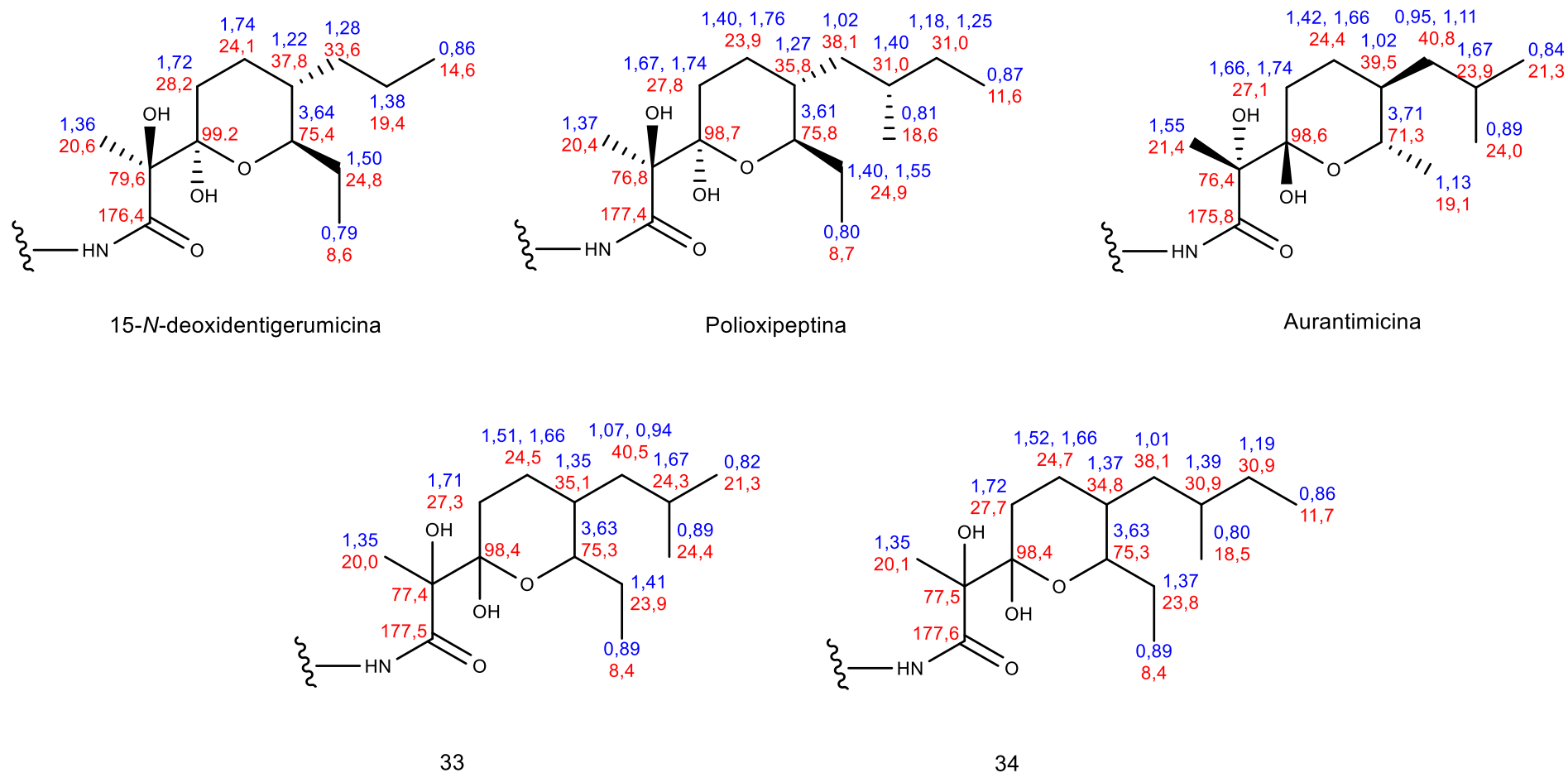


Figura 29. Dados de RMN ¹H e ¹³C das unidades policetídicas de compostos similares a **33** e **34** (dados obtidos em CDCl₃).

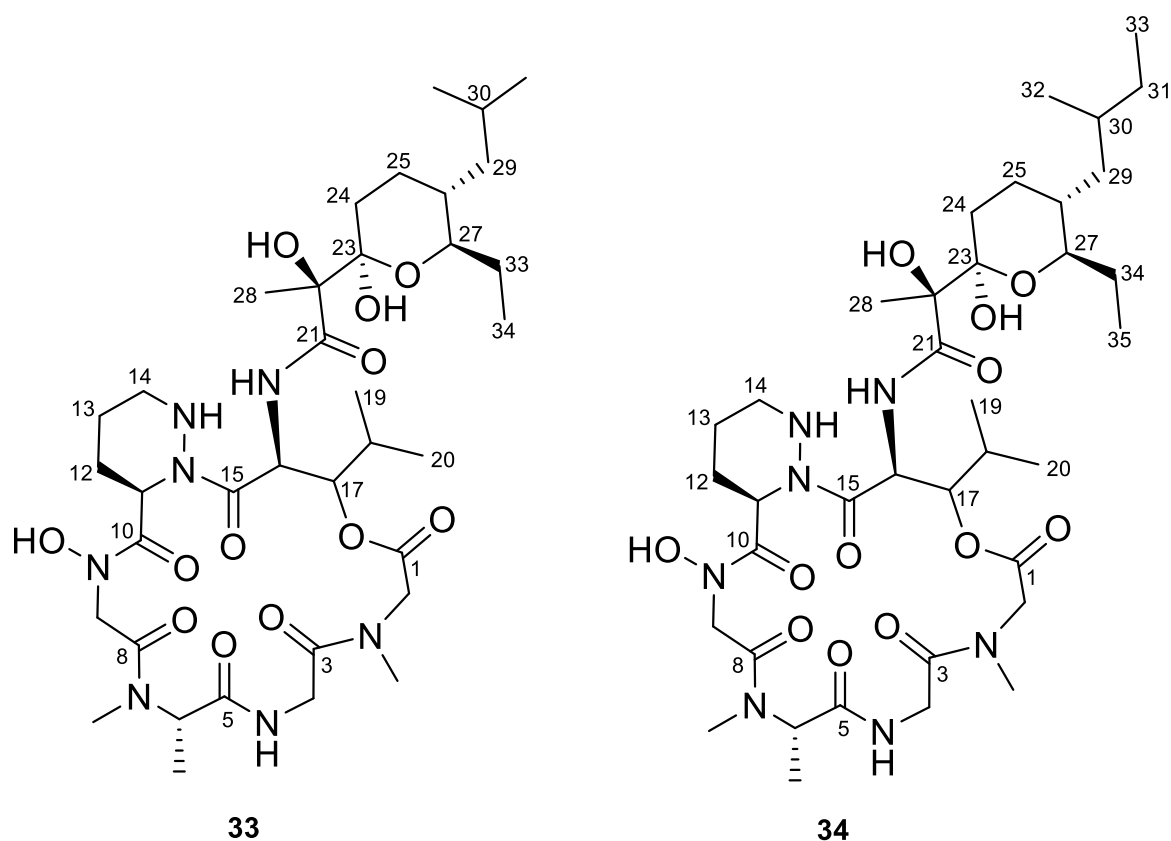


Figura 30. Estruturas químicas dos compostos inéditos meliponamicina A (**33**) e meliponamicina B (**34**), isolados de *Streptomyces* sp. ICBG 1310 associado às abelhas sem ferrão *M. scutellaris*.

Os compostos **33** e **34** foram testados contra o patógeno de abelhas *P. larvae* e mostraram valores de concentração inibitória mínima (CIM) (APÊNDICE FFFAPÊNDICE GGG) de respectivamente, 0,55 μM e 0,54 μM , muito superiores ao valor do controle positivo tetraciclina – CIM de 7,76 μM . Essa alta atividade demonstrada por meliponamicinas A e B contra o entomopatógeno *P. larvae* pode estar relacionada a uma função protetora que *Streptomyces* sp. ICBG 1318 desempenha nas colônias de abelhas *M. scutellaris*, podendo assim exercer um papel ecológico bastante relevante na proteção contra patógenos.

Os compostos foram também testados contra o patógeno humano *Staphylococcus aureus* INCAS0039 e o parasita *L. infantum*. Meliponamicinas A e B apresentaram boa atividade contra *S. aureus* apresentando valores de CIM de 2,20 μM e 1,08 μM (controle positivo tetraciclina CIM de 0,24 μM) (APÊNDICE HHHAPÊNDICE III). Os compostos **33** e **34** apresentaram boa atividade leishmanicida contra *L. infantum* com IC_{50} de 2,19 μM e 1,03 μM , respectivamente. Infelizmente, os compostos não apresentaram valores seguros de seletividade (Tabela 9).

Tabela 9. Atividade dos compostos **33** e **34** contra amastigotas intracelulares de *L. infantum* e células THP-1.

Compostos	IC ₅₀ (µM) Amastigotas intracelulares	CC ₅₀ (µM) THP-1*	Índice de seletividade**
33	2,19 ± 0,25	1,05 ± 0,05	0,47
34	1,03 ± 0,08	0,70 ± 0,03	0,67
Miltefosina	2,40 ± 0,22	-	-
Doxorubicina	-	1,80 ± 0,16	-

Dados de replicatas ± DP ($n = 2$ replicatas)

*THP-1 macrófagos de leucemia humano (células hospedeiras de *L. infantum*)

**Índice de seletividade = CC_{50} THP-1/IC₅₀ amastigotas intracelulares

Meliponamicinas A e B são dois novos hexadepsipeptídeos cíclicos que possuem aminoácidos e a cadeia policetílica similares com os compostos aurantimicinas, polioxiptinas, variaeptinas e dentigerumicinas (GRÄFE et al., 1995; NAKAGAWA et al., 1990; OH et al., 2009; UMEZAWA et al., 1998). Entretanto, a sequência de aminoácidos das meliponamicinas é inédita na literatura e apresenta apenas uma unidade de ácido piperázico, diferentemente dos compostos já descritos.

Baseado nas análises do sequenciamento dos genomas das actinobactérias que produzem os compostos citados acima e devido à similaridade das estruturas químicas, podemos inferir que as meliponamicinas são híbridos PKS-NRPS. São biossintetizados por complexos enzimáticos multimodulares denominados peptídeos não ribossomais sintetases (NRPS) e policetídeo sintases (PKSs) (DU et al., 2014; SHIN et al., 2018; WYCHE et al., 2017; ZHAO et al., 2016).

Assim como as meliponamicinas, os compostos similares apresentam alta atividade biológica, como antibacterianos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e atividade antiproliferativa. Híbridos PKS-NRPS geralmente apresentam elevada atividade biológica e neste caso, esta atividade pode estar ainda relacionada a presença do ácido piperázico (MORGAN; ANDERSEN; RYAN, 2019; NIKOLOULI; MOSSIALOS, 2012; SHIN et al., 2018; ZHAO et al., 2016).

A dentigerumicina é biossintetizada por uma linhagem de *Pseudonocardia* sp. simbiote de formigas cortadeiras e apresenta atividade seletiva contra o fungo *Escovopsis*, patógeno específico do ninho de formigas da tribo Attine (OH et al., 2009). Dessa maneira, acredita-se que a elevada atividade biológica das meliponamicinas A e B contra o patógeno *P. larvae* esteja relacionada a uma relação simbiótica protetiva da actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG1318 com a colônia de abelhas *M. scutellaris*.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

A linhagem *Streptomyces* sp. ICBG328 produziu seis compostos análogos (**22-27**) com estruturas químicas complexas pertencentes a classe de compostos policetídeos conhecidos como cromomicinas, que foram identificados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas. Segundo a literatura, esta classe de compostos apresenta alta atividade biológica, principalmente como agentes anti-tumorais (MENÉNDEZ et al., 2006). Os compostos foram testados frente a uma linhagem do fungo *Escovopsis* porém não apresentaram atividade, assim não foi possível encontrar uma possível relação ecológica entre *Streptomyces* sp. ICBG328 e formigas do gênero *Acromyrmex*. Outro fato importante é que as substâncias **23**, **24** e **25** apresentaram potente atividade leishmanicida. O composto **25** foi o mais ativo, mas apresentou citotoxicidade maior que o controle de doxorubicina. Apesar da baixa seletividade, a atividade apresentada pelos compostos pode contribuir para ampliar o conhecimento acerca de substâncias leishmanicidas.

A actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG 197 produziu o composto **28**, identificado como sendo o polieno macrolídeo nistatina. Tal composto apresentou atividade antifúngica contra duas linhagens de fungos *Escovopsis*, podendo estar relacionado com um possível papel protetor de *Streptomyces* sp. ICBG 197 nos ninhos de formigas *Acromyrmex*. O extrato bruto deste micro-organismo apresentou 99% de inibição contra o parasita *L. donovani*. Esta atividade pode ser decorrente da produção do composto **28**, visto que já há estudos na literatura sobre a atividade leishmanicida da nistatina (GHOSH; CHATTERJEE, 1962; GHOSH; HALDAR; CHATTERJEE, 1960; TEWARY et al., 2006).

A actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG171, que apresentou atividade frente a três linhagens do fungo *Escovopsis* e cujo extrato apresentou 94% de inibição dos parasitas *L. donovani*, produziu os compostos já conhecidos nigericina (**29**), elaiofilina (**30**), 11-O-metilelaiofilina (**31**) e 11,11-O,O-dimetilelaiofilina (**32**). A nigerina apresenta atividade contra o fungo *Escovopsis* sp. e atividade leishmanicida, como demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa (ORTEGA et al., 2019). Os compostos **30-32** são conhecidos pela alta atividade antiparasitária (PEÑA; SCARONE; SERRA, 2015), dessa maneira os compostos isolados de ICBG 171 são responsáveis pela atividade leishmanicida exercida pelo seu extrato bruto e também podem estar relacionados a uma atividade protetora dentro do ninho de formigas *Acromyrmex* sp. protegendo-as de ataques do fungo patogênico *Escovopsis* sp.

Da associação com abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris* foi observada uma alta atividade antibacteriana contra o patógeno *P. larvae* exercida por *Streptomyces* sp. ICBG 1318. Seu extrato em acetato de etila também inibiu 99% de parasitas *L. donovani*. Visto seu potencial biológico, ICBG 1318 foi estudada quimicamente, o que levou ao isolamento de dois novos hexadepsipeptídeos cíclicos. Os compostos **33** e **34**, nomeados respectivamente de meliponamicina A e meliponamicina B, tiveram suas estruturas determinadas e apresentaram alta atividade antibacteriana contra *P. larvae* sugerindo uma possível relação simbiótica entre ICBG 1318 e abelhas *M. scutellaris*. Os compostos **33** e **34** foram também ativos contra os patógenos humanos *S. aureus* e *L. infantum*. Infelizmente os compostos não apresentaram bons índices de seletividade contra o parasita, porém a descoberta destes compostos pode enriquecer conhecimentos biológicos acerca de *L. infantum*.

Os resultados encontrados corroboram com a abordagem de estudar as interações simbiotes entre insetos e micro-organismos que são mediadas por compostos bioativos, conhecidos e inéditos, que podem contribuir com a identificação de novos protótipos para o tratamento de doenças microbianas em humanos, como bacterianas, fúngicas ou mesmo doenças parasitárias negligenciadas. Além disso, esse trabalho relata o isolamento e identificação das meliponamicinas, compostos bioativos inéditos na literatura, a partir de simbionte bacteriano de abelha sem ferrão. Os resultados demonstram que fontes naturais ainda pouco exploradas podem fornecer substâncias potencialmente ativas, colaborando com o desenvolvimento de novos hits e o entendimento das relações ecológicas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E.; FLETCHER, C. M.; GARDNER, A. D.; HEATLEY, N. G.; JENNINGS, M. A. Further observations on penicillin. **The Lancet**, v. 238, n. 6155, p. 177-189, 1941.

AICH, P.; SEN, R.; DASGUPTA, D. Role of magnesium ion in the interaction between chromomycin A3 and DNA: binding of chromomycin A3-magnesium (2+) complexes with DNA. **Biochemistry**, v. 31, n. 11, p. 2988-2997, 1992.

AZPIAZU, C.; BOSCH, J.; VIÑUELA, E.; MEDRZYCKI, P.; TEPER, D.; SGOLAstra, F. Chronic oral exposure to field-realistic pesticide combinations via pollen and nectar: effects on feeding and thermal performance in a solitary bee. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

BADDLEY, J. W.; MOSER, S. A. Emerging fungal resistance. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 24, n. 3, p. 721, 2004.

BALKIS, M. M.; LEIDICH, S. D.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Mechanisms of fungal resistance. **Drugs**, v. 62, n. 7, p. 1025-1040, 2002.

BARBOSA, R.; LEONG, S.; VINNERE-PETTERSSON, O.; CHEN, A.; SOUZA-MOTTA, C. M.; FRISCAD, J. C.; SAMSON, R. A.; OLIVEIRA, N. T.; HOUBRAKEN, J. Phylogenetic analysis of *Monascus* and new species from honey, pollen and nests of stingless bees. **Studies in Mycology**, v. 86, p. 29-51, 2017.

BARKE, J.; SEIPKE, R. F.; GRUSCHOW, S.; HEAVENS, D.; DROU, N.; BIBB, M. J.; GOSS, R. J. M.; YU, D. W.; HUTCHINGS, M. I. A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. **BMC Biology**, v. 8, n. 1, p. 10, 2010.

BENNETT, G. M.; MORAN, N. A. Heritable symbiosis: the advantages and perils of an evolutionary rabbit hole. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 33, p. 10169-10176, 2015.

BRADY, S. F. Construction of soil environmental DNA cosmid libraries and screening for clones that produce biologically active small molecules. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1297-1305, 2007.

BRAUTASET, T.; SLETTA, H.; NEDAL, A.; BORGOS, S. E. F.; DEGnes, K. F.; BAKKE, I.; VOLOKHAN, O.; SEKUROVA, O. N.; TRESHALIN, I. D.; MIRCHINK, E. P.; DIKY, A.; ELLINGSEN, T. E.; ZOTCHEV, S. B. Improved antifungal polyene macrolides via engineering of the nystatin biosynthetic genes in *Streptomyces noursei*. **Chemistry & Biology**, v.15, n. 11, p. 1198-1206, 2008.

BROSCH, R.; GORDON, S. V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P. BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A. S.; SAMPER, S.; VAN SOOLINGEN, D.; COLE, S. T. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 6, p. 3684-3689, 2002.

BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C.; LA FLAMME, A. C.; VAN VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592-2597, 1996.

BURG, R. W.; MILLER, B. M.; BAKER, E. E.; BIRNBAUM, J.; CURIE, S. A.; HARTMAN, R.; KONG, Y. L.; MONAGHAN, R. L.; OLSON, G.; PUTTER, I.; TUNAC, J. B.; WALLICK, H.; STAPLEY, E. O.; OIWA, R.; OMURA, S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents - producing organism and fermentation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, n. 3, p. 361-367, 1979.

CAFARO, M. J.; POULSEN, M.; LITTLE, A. E.; 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: Biological Sciences**, v. 278, n. 1713, 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. **American Naturalist**, v. 180, n. 5, p. 604-617, 2012.

CAMPBELL, W. C.; FISHER, M. H.; STAPLEY, E. O.; ALBERSSCHONBERG, G. JACON, T. A. Ivermectin - a potent new anti-parasitic agent. **Science**, v. 221, n. 4613, p. 823-828, 1983.

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, n. 10, p. 1806-1809, 2012.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 167, 2010.

CHAM, K. O.; NOCELLI, R. C.; BORGES, L. O.; VIANA-SILVA, F. E. C.; TONELLI, C. A. M.; MALASPINA, O.; MENEZES, C.; ROSA-FONTANA, A. S.; BLOCHTEIN, B.; FREITAS, B. M.; PIRES, C. S. S.; OLIVEIRA, F. F.; CONTRERA, F. A. L.; TOREZANI, K. R. S.; RIBEIRO, M. F.; SIQUEIRA, M. A. L.; ROCHA, M. C. L. S. A. Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. **Environmental Entomology**, v. 48, n. 1, p. 36-48, 2019.

CHEVRETTE, M. G.; CARLSON, C. M.; ORTEGA, H. E.; THOMAS, C.; ANANIEV, G. E.; BARNS, K. J.; BOOK, A. J.; CAGNAZZO, J.; CARLOS, C.; FLANIGAN, W.; GRUBBS, K. J.; HORN, H. A.; HOFFMAN, M.; KLASSEN, J. L.; KNACK, J. J.; LEWIN, G. R.; McDONALD, B. R.; MULLER, L.; MELO, W. G. P.; PINTO-TOMÁS, A. A.; SCHMITZ, A.; ENDT-PIENKOWSKI, E.; WILDMAN, S.; ZHAO, M.; ZHANG, F.; BUGNI, T. S.; ANDES, D. R.; PUPO, M. T.; CURRIE, C. R. The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. **Nature Communications**, v. 10, n.1, p. 1-11, 2019.

CHEVRETTE, M. G.; GUTIERREZ-GARCIA, K.; SELEM-MOJICA, N.; AGUILAR-MARTINEZ, C.; YAÑEZ-OLVERA, A.; RAMOS-ABOITES, H. E.; HOSKISSON, P. A.; BARONA-GÓMEZ, F. Evolutionary dynamics of natural product biosynthesis in bacteria. **Natural Product Reports**, v. 37, n. 4, p. 566-599, 2020.

CHO, E.; KWON, O. S.; CHUNG, B.; LEE, J. SUN, J.; SHIN, J.; OH, K. B. Antibacterial activity of chromomycins from a marine-derived *Streptomyces microflavus*. **Marine Drugs**, v. 18, n. 10, p. 522, 2020.

COATES, A.; HU, Y.; BAX, R.; PAGE, C. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 11, p. 895-910, 2002.

COATES, A. R.; HU, Y.; HOLT, J.; YEH, P. Antibiotic combination therapy against resistant bacterial infections: synergy, rejuvenation and resistance reduction. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 18, n. 1, p. 5-15, 2020.

COHEN, F. L.; TARTASKY, D. Microbial resistance to drug therapy: a review. **American Journal of Infection Control**, v. 25, n. 1, p. 51-64, 1997.

COJEAN, S.; HOUZÉ, S.; HAOUCHINE, D.; HUTEAU, F. *et al.* *Leishmania* resistance to miltefosine associated with genetic marker. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 704, 2012.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CUNHA, M. G. D. **Isolamento e identificação de compostos da geoprópolis de *Melipona scutellaris* com atividades antiproliferativa e antiosteoclastogênica**. 2016. Tese – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2016.

CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, v. 398, n. 6729, p. 701-704, 1999.

DA COSTA DOMINGUES, C. E.; INOUE, L. V. B.; DA SILVA-ZACARIN, E. C. M.; MALASPINA, O. Fungicide pyraclostrobin affects midgut morphophysiology and reduces

survival of Brazilian native stingless bee *Melipona scutellaris*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 206, n. 1 p. 111395, 2020.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DE CARVALHO, W. J.; FUJIMURA, P. T.; BONETTI, A. M.; GOULART, L. R.; CLOONAN, K.; DA SILVA, N. M.; ARAÚJO, E. C. B.; UEIRA-VIEIRA, C.; LEAL, W. S. Characterization of antennal sensilla, larvae morphology and olfactory genes of *Melipona scutellaris* stingless bee. **PLoS One**, v. 12, n. 4, p. e0174857, 2017.

DE JESUS CONCEIÇÃO, P.; DE LYRA NEVES, C. M.; DA SILVA SODRÉ, G.; DE CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, A. V.; RIBEIRO, G. S.; PEREIRA, R. C. Susceptibility of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) worker bees to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Sociobiology**, v. 61, n. 2, p. 184-188, 2014.

DENNING, D. W. Minimizing fungal disease deaths will allow the UNAIDS target of reducing annual AIDS deaths below 500 000 by 2020 to be realized. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1709, p. 20150468, 2016.

DI MARCO, A.; GAETANI, M.; OREZZI, P.; SCARPINATO, B.; SILVESTRINI, R.; SOLDATI, M.; DASDIA, T.; VALENTINI, L. 'Daunomycin', a new antibiotic of the rhodomycin group. **Nature**, v. 201, n. 4920, p. 706-707, 1964.

DO PRADO, F. S. R.; DOS SANTOS, D. M.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, T. M.; BURGARELLI, J. A. M. CASTELE, J. B.; VIEIRA, E. M. Determination and uptake of abamectin and difenoconazole in the stingless bee *Melipona scutellaris* Latreille (1811) via oral and topic acute exposure. **Environmental Pollution**, v. 265, n. 1, p. 114313, 2020.

DREWS, J. Drug Discovery: a historical perspective. **Science**, v. 287, n. 5460, p. 1960-1964, 2000.

DU, Y. H.; WANG, Y. M.; HUANG, T. T.; TAO, M. F. DENG, Z.; LIN, S. Identification and characterization of the biosynthetic gene cluster of polyoxypeptin A, a potent apoptosis inducer. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 30, 2014.

EGGLETON, P. The State of the world's insects. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 45, n. 1, p. 61-82, 2020.

ENGEL, P.; KWONG, W. K.; MCFREDERICK, Q.; ANDERSON, K. E.; BARRIBEAU, S. M.; CHANDLER, J. A.; CORNMAN, R. S.; DAINAT, J.; DE MIRANDA, J. R.; DOUBLET, V.; EMERY, O.; EVANS, J. D.; FARINELLI, L.; FLENNIKEN, M. L.; GRANBERG, F.; GRASIS, J. A.; GAUTHIER, L.; HAYER, J.; KOCH, H.; KOCHER, S.; MARTINSON, V. G.; MORAN, N.; MUNOZ-TORRES, M.; NEWTON, I.; PAXTON, R. J.; POWELL, E.; SADD,

B. M.; SCHMID-HEMPEL, P.; SCHMID-HEMPEL, R.; SONG, S. J.; SCHWARZ, R. S.; vanENGELSDORP, D.; DAINAT, B. The bee microbiome: impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. **MBio**, v. 7, n. 2, p. e02164-02115, 2016.

ETTLINGER, L.; CORBAZ, R.; HUTTER, R. Zur Systematik der Actinomyceten. **Archiv für Mikrobiologie**, v.31, n. 2, p. 326-358, 1958.

FERREIRA, R. S.; DESSOY, M. A.; PAULI, I.; SOUZA, M. L.; KROGH, R.; SALES, A. I. L.; OLIVA, G.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Synthesis, biological evaluation, and structure–activity relationships of potent noncovalent and nonpeptidic cruzain inhibitors as anti-trypanosoma cruzi agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2380-2392, 2014.

FIRN, R. D.; JONES, C. G. Natural products—a simple model to explain chemical diversity. **Natural Product Reports**, v. 20, n. 4, p. 382-391, 2003.

FJAERVIK, E.; ZOTCHEV, S. B. Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 4, p. 436-443, 2005.

FLEMING, A. Penicillin. **British Medical Journal**, v. 2, n. 4210, p. 386, 1941.

FUJII, K.; IKAI, Y.; OKA, H.; SUZUKI, M.; HARADA, K. I. A nonempirical method using LC/MS for determination of the absolute configuration of constituent amino acids in a peptide: combination of Marfey's method with mass spectrometry and its practical application. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 24, p. 5146-5151, 1997.

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, n. 1, p. 88, 2006.

GHOSH, B.; CHATTERJEE, A. Leishmanicidal activity of nystatin, a polyene antifungal antibiotic: i. the probable mechanism of action of nystatin on *Leishmania donovani*. **Antibiotics & Chemotherapy**, v. 12, n. 3, p. 204-206, 1962.

GHOSH, B.; HALDAR, D.; CHATTERJEE, A. Effect of nystatin on the metabolism of a protozoal organism, *Leishmania donovani*. **Annals of Biochemistry and Experimental Medicine**, v. 20, n. 2, p. 55-56, 1960.

GONZÁLEZ ZORN, B.; ESCUDERO, J. A. Ecology of antimicrobial resistance: humans, animals, food and environment. **International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology**, v.15, n. 3, p. 101-109, 2012.

GRÄFE, U.; SCHLEGEL, R.; RITZAU, M.; IHN, W.; DORNBERGER, K.; STENGEL, C.; FLECK, W. F.; GUTSCHE, W.; HARTL, A.; PAULUS, E. F. Aurantimycins, new depsipeptide antibiotics from *Streptomyces aumntiacus* IMET 43917. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, n. 2, p. 119-125, 1995.

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 of the United States of America**, v. 106, n. 12, p. 4742-4746, 2009.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, n. 41, p.95-98, 1999.

HARADA, K.-I.; FUJII, K.; MAYUMI, T.; HIBINO, Y.; SUZULI, M. A method using LCMS for determination of absolute configuration of constituent amino acids in peptide-advanced Marfey's method. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 9, p. 1515-1518, 1995.

HAZEN, E.; BROWN, R.; MASON, A. Protective action of fungicidin (nystatin) in mice against virulence enhancing activity of oxytetracycline on *Candida albicans*. **Antibiotics & Chemotherapy (Northfield, Ill.)**, v. 3, n. 11, p. 1125-1128, 1953.

HAZEN, E. L.; BROWN, R. Fungicidin, an antibiotic produced by a soil actinomycete. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 76, n. 1, p. 93-97, 1951.

HOU, M. H.; ROBINSON, H.; GAO, Y. G.; WANG, A. H. J. Crystal structure of the [Mg²⁺-(chromomycin A3) 2]-d (TTGGCCAA) 2 complex reveals GGCC binding specificity of the drug dimer chelated by a metal ion. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 7, p. 2214-2222, 2004.

HØGLI, J. U.; GARCIA, B. H.; SVENDSEN, K.; SKOGEN, V.; SMABREKKE, L. Empirical prescribing of penicillin G/V reduces risk of readmission of hospitalized patients with community-acquired pneumonia in Norway: a retrospective observational study. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 20, n. 1, p. 1-9, 2020.

JOHNSON, R.; STREICHER, E. M.; LOUW, G. E.; WARREN, R. M.; vanHELDEN, P. D.; VICTOR, T. C. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Current Issues In Molecular Biology**, v. 8, n. 2, p. 97-112, 2006.

JÚNIOR, C. A. L.; CARVALHO, C. A. L.; NUNES, L. A.; FRANCOY, T. M. Population divergence of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Meliponina) in two restricted areas in Bahia, Brazil. **Sociobiology**, v. 59, n. 1, p. 107-122, 2014.

KALINOVSKAYA, N. I.; ROMANENKO, L. A.; KALINOVSKY, A. I.; ERMAKOVA, S. P.; DMITRENOK, P. S.; AFIYATULLOV, S. S. The antitumor antibiotics complex of aureolic acids from the marine sediment-associated strain of *Streptomyces* sp KMM 9048. **Natural Product Communications**, v. 12, n. 4, p. 571-577, 2017.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206-220, 2005.

KWONG, W. K.; MORAN, N. A. Gut microbial communities of social bees. **Nature Reviews Microbiology**, v.14, n. 6, p. 374, 2016.

LANCELIN, J.-M.; BEAU, J.-M. Complete stereostructure of nystatin A1: a proton NMR study. **Tetrahedron Letters**, v. 30, n. 34, p. 4521-4524, 1989.

LI, J.; KIM, S. G.; BLENIS, J. Rapamycin: one drug, many effects. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 3, p. 373-379, 2014.

LOPES, A. A.; GUIMARAES, D. O.; PUPO, M. T. Quando os microorganismos salvam vidas. **Ciência Hoje**, v. 286, n. 1, p. 6, 2011.

MARFEY, P. Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1, 5-difluoro-2, 4-dinitrobenzene. **Carlsberg Research Communications**, v. 49, n. 6, p. 591, 1984.

MARQUEZ, L.; QUAVE, C. L. Prevalence and therapeutic challenges of fungal drug resistance: role for plants in drug discovery. **Antibiotics**, v. 9, n. 4, p. 150, 2020.

MARTIN, B. D.; SCHWAB, E. Current usage of symbiosis and associated terminology. **International Journal of Biology**, v. 5, n. 1, p. 32, 2013.

MATSUOKA, M.; UMEZAWA, H. UNAMYCIN, AN ANTIFUNGAL SUBSTANCE PRODUCED BY STREPTOMYCES-FUNGICIDICUS. **Journal of Antibiotics**, v. 13, n. 2, p. 114-120, 1960.

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

MENEGATTI, C.; DA PAIXÃO MELO, W. G.; CARRÃO, D. B.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; DO NASCIMENTO, F. S.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T. *Paenibacillus polymyxa* associated with the stingless bee *Melipona scutellaris* produces antimicrobial compounds against entomopathogens. **Journal of Chemical Ecology**, v. 44, n. 12, p. 1158-1169, 2018.

MENEGATTI, C.; LOURENZON, V. B.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, D.; DA PAIXÃO MELO, W. G.; FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D.; DO NASCIMENTO, F. S.; PUPO, M. T. Meliponamycins: antimicrobials from stingless bee-associated *Streptomyces* sp. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 610-616, 2020.

MENEZES, C.; VOLLET-NETO, A.; MARSAIOLI, A. J.; ZAMPIERI, D.; FONTOURA, I. C.; LUCHESSI, A. D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. **Current Biology**, v. 25, n. 21, p. 2851-2855, 2015.

MENÉNDEZ, N.; NUR-E-ALAM, M.; FISCHER, C.; BRAÑA, A. F.; SALAS, J. A.; ROHR, J.; MÉNDEZ, C. Deoxysugar transfer during chromomycin A3 biosynthesis in *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*: new derivatives with antitumor activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 167-177, 2006.

MIOTELO, L.; DOS REIS, A. L. M.; MALAQUIAS, J. B.; MALASPINA, O.; ROAT, T. C. *Apis mellifera* and *Melipona scutellaris* exhibit differential sensitivity to thiamethoxam. **Environmental Pollution**, v. 268, p. 115770, 2020.

MIYAMOTO, M.; KAWAMATSU, Y.; KAWASHIMA, K.; SHINOHARA, M.; NAKANISHI, K. The full structures of three chromomycins, A2, A3 and A4. **Tetrahedron Letters**, v. 7, n. 6, p. 545-552, 1966.

MORAN, N. A. Symbiosis. **Current Biology**, v. 16, p. 7, 2006.

MORAN, N. A.; TRAN, P.; GERARDO, N. M. Symbiosis and insect diversification: an ancient symbiont of sap-feeding insects from the bacterial phylum Bacteroidetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8802-8810, 2005.

MORGAN, K. D.; ANDERSEN, R. J.; RYAN, K. S. Piperazic acid-containing natural products: structures and biosynthesis. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 12, p. 1628-1653, 2019.

MORIN, R. B.; JACKSON, B. G.; FLYNN, E. H.; ROESKE, R. W.; ANDREWS, S. L. Chemistry of cephalosporin antibiotics. XIV. Reaction of cephalosporin C with nitrosyl chloride. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, n. 6, p. 1396-1400, 1969.

NAKAGAWA, M.; HAYAKAWA, Y.; ADACHI, K.; SETO, H. A new depsipeptide antibiotic, variapeptin. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 791-794, 1990.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NIKOLOULI, K.; MOSSIALOS, D. Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 8, p. 1393-1403, 2012.

OH, D.-C.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 6, p. 391-393, 2009.

ORTEGA, H. E.; FERREIRA, L. L.; MELO, W. G.; OLIVEIRA, A. L. L.; ALVARENGA, R. F. R.; LOPES, N. P.; BUGNI, T. S.; ANDRICOPULO, A. D.; PUPO, M. T. Antifungal compounds from *Streptomyces* associated with attine ants also inhibit *Leishmania donovani*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, p. e0007643, 2019.

O'BRIEN, J.; WRIGHT, G. D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 552-558, 2011.

PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; NAGAMOTO, N. S.; BACCI JR, M. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, n. 4, p. 517-526, 2008.

PALUDO, C. R.; MENEZES, C.; SILVA-JUNIOR, E. A.; VOLLET-NETO, A.; ANDRADE-DOMINGUEZ, A.; PISHCHANY, G.; KHADEMPOUR, L.; DO NASCIMENTO, F. S.; CURRIE, C. R.; KOLTER, R.; CLARDY, J.; PUPO, M. T. Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1122, 2018.

PALUDO, C. R.; PISHCHANY, G.; ANDRADE-DOMINGUEZ, A.; SILVA-JUNIOR, E. A.; MENEZES, C.; DO NASCIMENTO, F. S.; CURRIE, C. R.; KOLTER, R.; CLARDY, J.; PUPO, M. T. Microbial community modulates growth of symbiotic fungus required for stingless bee metamorphosis. **PLoS One**, v. 14, n. 7, p. e0219696, 2019.

PALUDO, C. R.; RUZZINI, A. C.; SILVA-JUNIOR, E. A.; PISHCHANY, G.; CURRIE, C. R.; DO NASCIMENTO, F. S.; KOLTER, R. G.; CLARDY, J.; PUPO, M. T. Whole-genome sequence of *Bacillus* sp. SDL11, isolated from the social bee *Scaptotrigona depilis*. **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, p. e00174-00116, 2016.

PARKINSON, J. F.; GOBIN, B.; HUGHES, W. O. Heritability of symbiont density reveals distinct regulatory mechanisms in a tripartite symbiosis. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 7, p. 2053-2060, 2016.

PARMENTIER, E.; MICHEL, L. Boundary lines in symbiosis forms. **Symbiosis**, v. 60, n. 1, p. 1-5, 2013.

PETTIT, G. R.; TAN, R.; PETTIT, R. K.; DOUBEK, D. L.; CHAPUIS, J. C.; WEBER, C. A. Antineoplastic agents 596. Isolation and structure of chromomycin A(5) from a Beaufort Sea microorganism. **RSC Advances**, v. 5, n. 12, p. 9116-9122, 2015.

PEÑA, S.; SCARONE, L.; SERRA, G. Macrocycles as potential therapeutic agents in neglected diseases. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 3, p. 355-382, 2015.

PINTO, F. C. L.; SILVEIRA, E. R.; VASCONCELOS, A. C. L.; FLORENCIO, K. G. D.; OLIVEIRA, F. A. S.; SAHM, B. B.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BAUERMEISTER, A.; LOPES, N. P.; WILKE, D. V.; PESSOA, O. D. L. dextrorotatory chromomycins from the marine streptomycetes sp. associated to *Palythoa caribaeorum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 1, p. 143-152, 2020.

POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Symbiotic interactions in a tripartite mutualism: exploring the presence and impact of antagonism between two fungus-growing ant mutualists. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8748, 2010.

RAFAEL, J. A.; AGUIAR, A. P.; AMORIM, D. D. S. Knowledge of insect diversity in Brazil: challenges and advances. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 5, p. 565-570, 2009.

RAMADHAR, T. R.; BEEMELMANNS, C.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Bacterial symbionts in agricultural systems provide a strategic source for antibiotic discovery. **The Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 1, p. 53-58, 2014.

REN, J.; CUI, Y. Q.; ZHANG, F.; CUI, H. NI, X.; CHEN, F.; LI, L.; XIA, H. Enhancement of nystatin production by redirecting precursor fluxes after disruption of the tetramycin gene from *Streptomyces ahngroscopicus*. **Microbiological Research**, v. 169, n. 7-8, p. 602-608, 2014.

RITZAU, M.; HEINZE, S.; FLECK, W. F.; DAHSE, H. M. GRAFE, U. New macrodiolide antibiotics, 11-O-monomethyl- and 11, 11'-O-dimethylelaioylphylins, from *Streptomyces* sp. HKI-0113 and HKI-0114. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 11, p. 1337-1339, 1998.

RODRIGUES, A.; CABLE, R. N.; MUELLER, U. G.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F. C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungus garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, n. 3, p. 331-342, 2009.

RODRIGUEZ-HERNANDEZ, D.; MELO, W. G.; MENEGATTI, C.; LOURENZON, V. B.; DO NASCIMENTO, F. S.; PUPO, M. T. Actinobacteria associated with stingless bee biosynthesize bioactive polyketides against bacterial pathogen. **New Journal of Chemistry**, v. 43, n. 25, p. 10109-10117, 2019.

RORTAIS, A.; ARNOLD, G.; HALM, M.-P.; TOUFFET-BRIENS, F. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, v. 36, n. 1, p. 71-83, 2005.

ROWINSKY, E. K.; DONEHOWER, R. C. Paclitaxel (taxol). **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 15, p. 1004-1014, 1995.

SAHM, B. D.; PERES, J.; REZENDE-TEIXEIRA, P.; SANTOS, E. A.; BRANCO, P. C.; BAUERMEISTER, A.; KIMANI, S.; MOREIRA, E. A.; BISI-ALVES, R.; BELLIS, C.; MLAZA, M.; JIMEZEZ, P. C.; LOPES, N. P.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; PRINCE, S.; COSTA-LOTUFO, L. V. Targeting the oncogenic TBX2 transcription factor with chromomycins. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, n. 110, 2020.

SAMPAIO, J. P.; GADANHO, M.; SANTOS, S.; DUARTE, F. L.; PAIS, C.; FONSECA, A.; FELL, J. W. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 687-697, 2001.

SARANARUK, P.; KARIYA, R.; SITTITHUMCHAREE, G.; BOUEROY, P. BOONMARS, T.; SAWANYWISUTH, K.; WONGKHAM, C.; WONGKHAM, S.; OKADA, S.; VAETEEWOOTTACHARN, K. Chromomycin A3 suppresses cholangiocarcinoma growth by induction of S phase cell cycle arrest and suppression of Sp1-related anti-apoptotic proteins. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 45, n. 4, p. 1005-1016, 2020.

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 of the United States of America**, v. 108, n. 5, p. 1955-1960, 2011.

SEIFERT, K.; PÉREZ-VICTORIA, F. J.; STETTLER, M.; SÁNCHEZ-CAÑETE, M. P.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; CROFT, S. L. Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists in vivo. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 3, p. 229-235, 2007.

SHEN, B. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1297-1300, 2015.

SHIN, D.; BYUN, W. S.; MOON, K.; KWON, Y. BAE, M.; UM, S.; LEE, S. K.; OH, D. C. Coculture of marine *Streptomyces* sp with *Bacillus* sp produces a new piperazic acid-bearing cyclic peptide. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 498, 2018.

STEINRAUF, L.; PINKERTON, M.; CHAMBERLIN, J. The structure of nigericin. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 33, n. 1, p. 29-31, 1968.

SUZUKI, H.; CARLSON, J. R.; MATSUMOTO, E. Treatment of *Enterococcus faecalis* infective endocarditis with penicillin G plus ceftriaxone. **Infectious Diseases**, v. 52, n. 2, p. 135-138, 2020.

SWANN, J. P. The search for synthetic penicillin during World War II. **The British Journal for the History of Science**, p. 154-190, 1983.

TEWARY, P.; VEENA, K.; PUCADYIL, T. J.; CHATTOPADHYAY, A.; MADHUBALA, R. The sterol-binding antibiotic nystatin inhibits entry of non-opsonized *Leishmania donovani* into macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 339, n. 2, p. 661-666, 2006.

TOME, H. V.; SCHMEHL, D. R.; WEDDE, A. E.; GODOY, R. S. RAVAIANO, S. V. GUEDES, R. N. C.; MARTINS, G. F.; ELLIS, J. D. Frequently encountered pesticides can cause multiple disorders in developing worker honey bees. **Environmental Pollution**, v. 256, p. 113420, 2020.

TOUME, K.; TSUKAHARA, K.; ITO, H.; ARAI, M. A.; ISHIBASHI, M. Chromomycins A(2) and A(3) from marine actinomycetes with trail resistance-overcoming and wnt signal inhibitory activities. **Marine Drugs**, v. 12, n. 6, p. 3466-3476, 2014.

TU, Y. Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. **Nature Medicine**, v.17, n. 10, p. 1217-1220, 2011.

UMEZAWA, K.; NAKAZAWA, K.; UEMURA, T.; IKEDA, Y.; KONDO, S.; NAGANAWA, H.; KINOSHITA, N.; HASHIZUME, H.; HAMADA, M.; TAKEUCHI, T.; OHBA, S. Polyoxypeptin isolated from *Streptomyces*: a bioactive cyclic depsipeptide containing the novel amino acid 3-hydroxy-3-methylproline. **Tetrahedron letters**, v. 39, n. 11, p. 1389-1392, 1998.

VAN ARNAM, E. B.; RUZZINI, A. C.; SIT, C. S.; CURRIE, C. R.; CLARDY, C. A rebeccamycin analog provides plasmid-encoded niche defense. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 45, p. 14272-14274, 2015.

VAN ARNAM, E. B.; RUZZINI, A. C.; SIT, C. S.; HORN, H.; PINTO-TÓMAZ, A. A.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Selvamycin, an atypical antifungal polyene from two alternative genomic contexts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 46, p. 12940-12945, 2016.

VAN DYKE, M. W.; DERVAN, P. B. Chromomycin, mithramycin, and olivomycin binding sites on heterogeneous DNA. Footprinting with methidiumpropyl-EDTA. cntdot. iron (II). **Biochemistry**, v. 22, n. 10, p. 2373-2377, 1983.

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

VEZINA, C.; KUDELSKI, A.; SEHGAL, S. Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic. **The Journal Of Antibiotics**, v. 28, n. 10, p. 721-726, 1975.

VINCENT, J.-L. Microbial resistance: lessons from the EPIC study. **Intensive Care Medicine**, v. 26, n. 1, p. S003-S008, 2000.

Vit, P.; Pedro, S. R.; Roubik, D. W., Eds. **Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology**; Cham, CH: Springer: New York, 2018.

WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGGON, P.; McPHAIL, A. T. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 9, p. 2325-2327, 1971.

Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. Wayne, Pennsylvania, USA: CLSI, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption: 2016-2018 early implementation**. Geneva, p. 1-128. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2019**. Geneva, p. 1-297. 2019a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **No Time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections**. Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance, p. 1-25. 2019b.

WYCHE, T. P.; RUZZINI, A. C.; BEEMELMANN, C.; KIM, K. H.; KLASSEN, J. L.; CAO, S.; POULSEN, M.; BUGNI, T. S.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Linear peptides are the major products of a biosynthetic pathway that encodes for cyclic depsipeptides. **Organic Letters**, v. 19, n. 7, p. 1772-1775, 2017.

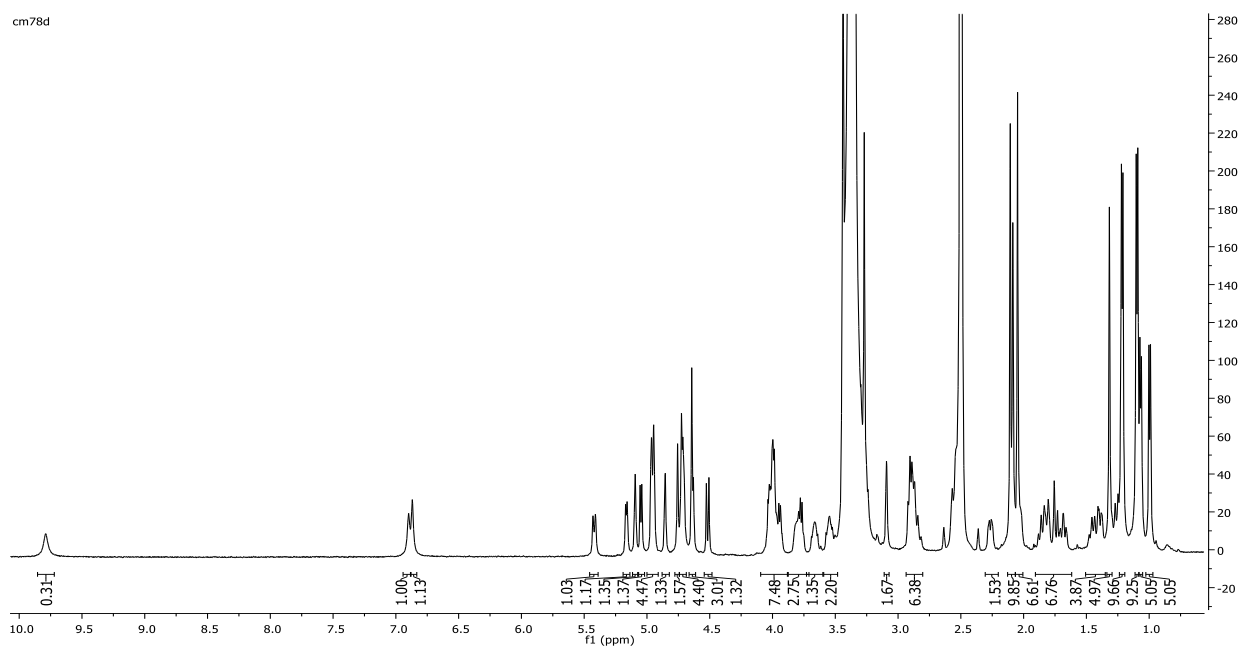
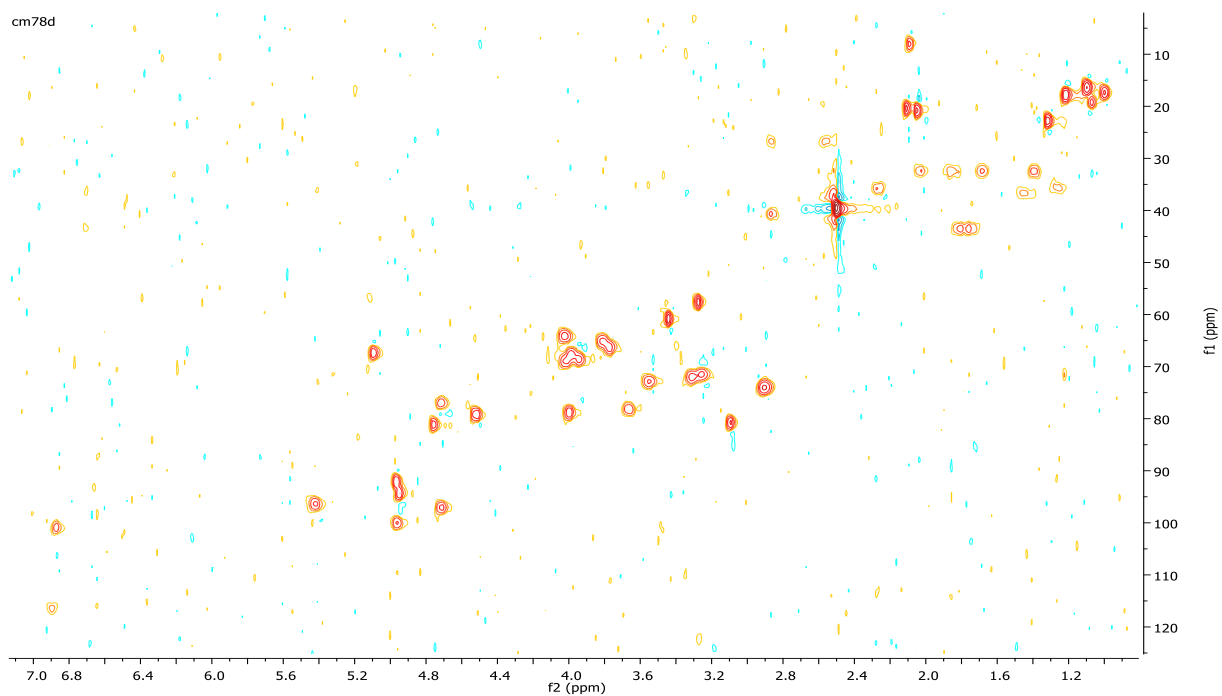
YI, W. W.; LI, Q.; SONG, T. F.; CHEN, L.; LI, X. C.; ZHANG, Z.; LIAN, X. Y. Isolation, structure elucidation, and antibacterial evaluation of the metabolites produced by the marine-sourced *Streptomyces* sp. ZZ820. **Tetrahedron**, v. 75, n. 9, p. 1186-1193, 2019.

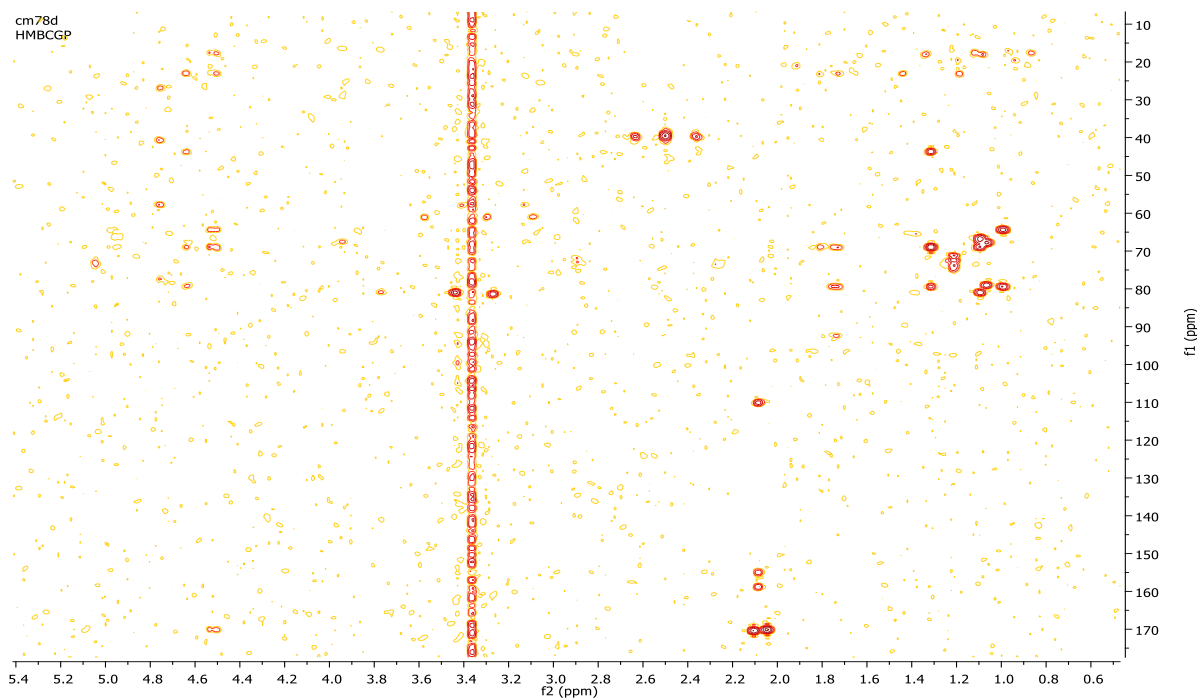
YOSHIMURA, Y.; KOENUMA, M.; MATSUMOTO, K.; TORI, K.; TERUI, Y. NMR studies of chromomycins, olivomycins, and their derivatives. **The Journal of antibiotics**, v. 41, n. 1, p. 53-67, 1988.

ZHAO, H. Y.; WANG, L.; WAN, D.; QI, J. Z.; GONG, R.; DENG, Z.; CHEN, W. Characterization of the aurantimycin biosynthetic gene cluster and enhancing its production by manipulating two pathway-specific activators in *Streptomyces aurantiacus* JA 4570. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 160, 2016.

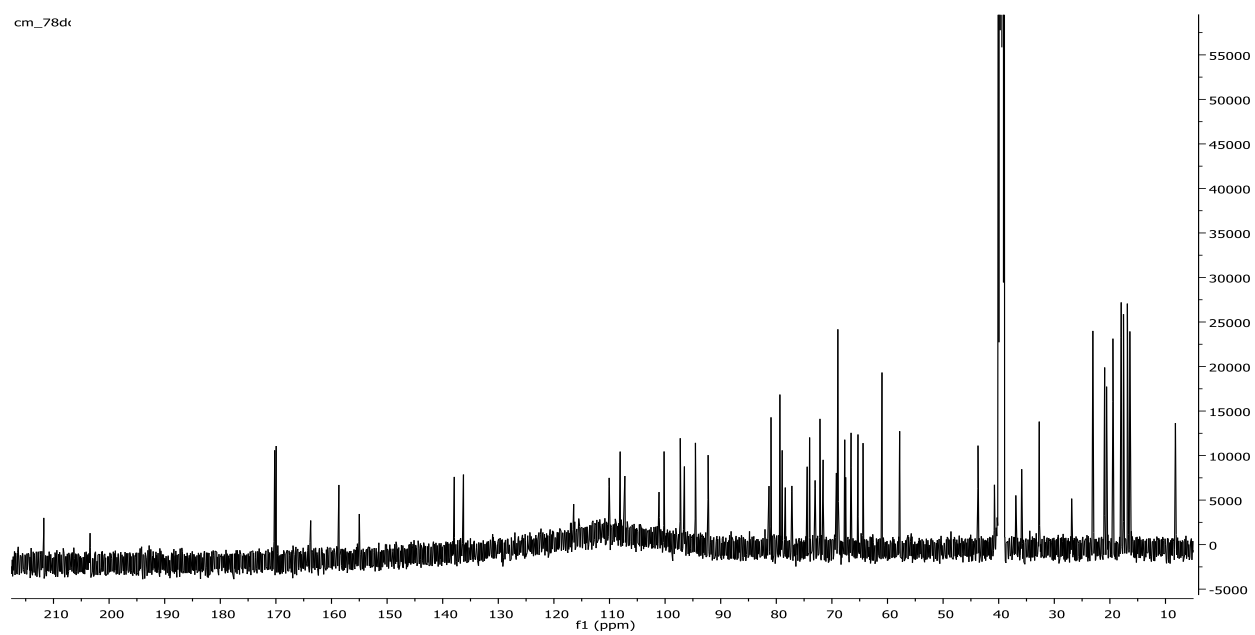
ZOTCHEV, S.; HAUGAN, K.; SEKUROVA, O.; SLETTA, H.; ELLINGSEN, T. E.; VALLA, S. Identification of a gene cluster for antibacterial polyketide-derived antibiotic biosynthesis in the nystatin producer *Streptomyces noursei* ATCC 11455. **Microbiology-Uk**, v.146, n. 3 p. 611-619, 2000.

APÊNDICES

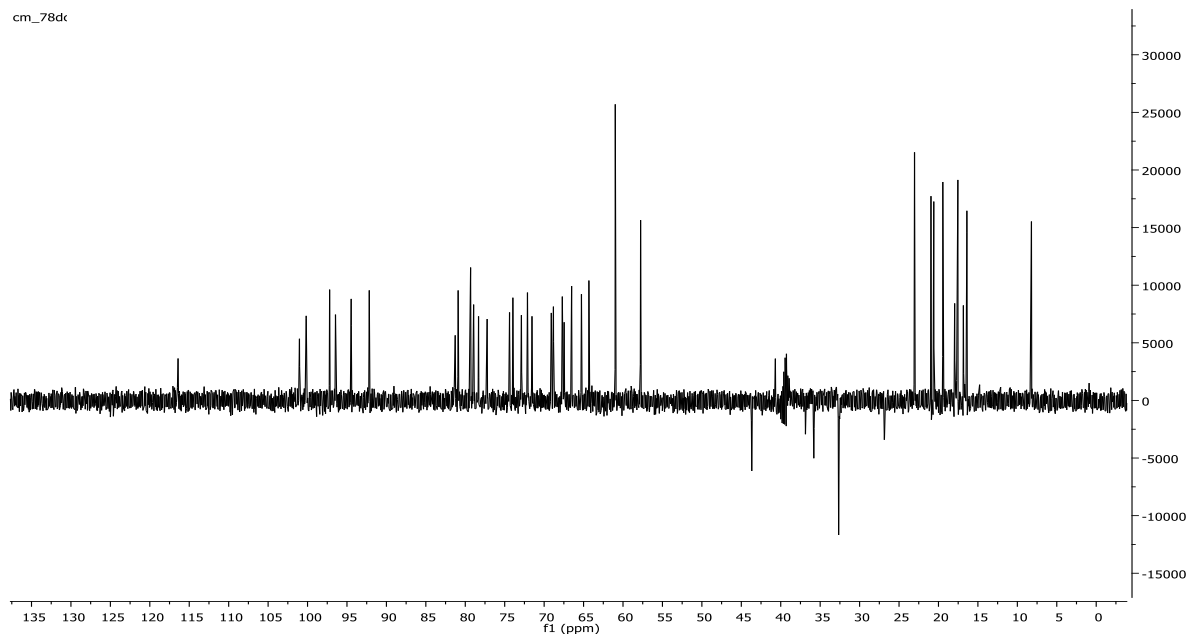
APÊNDICE A - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto **23**.APÊNDICE B - Espectro de gHSQC (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto **23**.



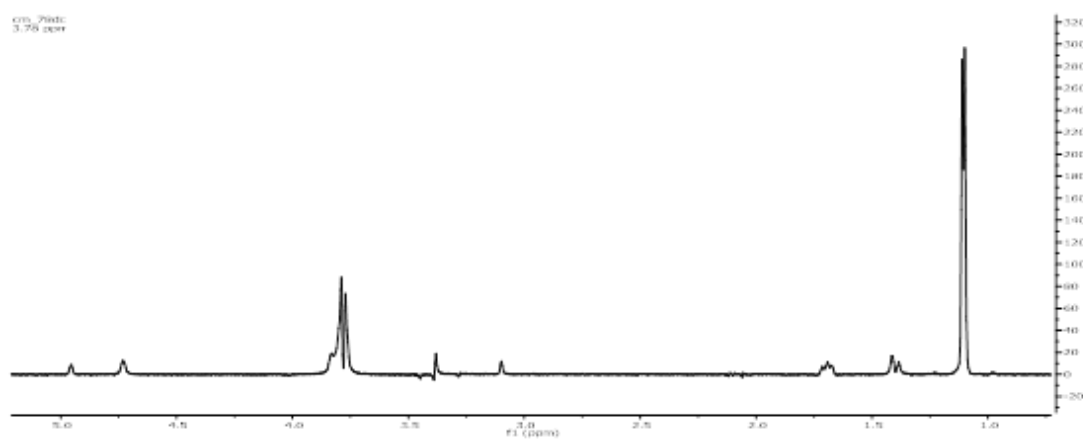
APÊNDICE C - Espectro de gHMBC (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto **23**



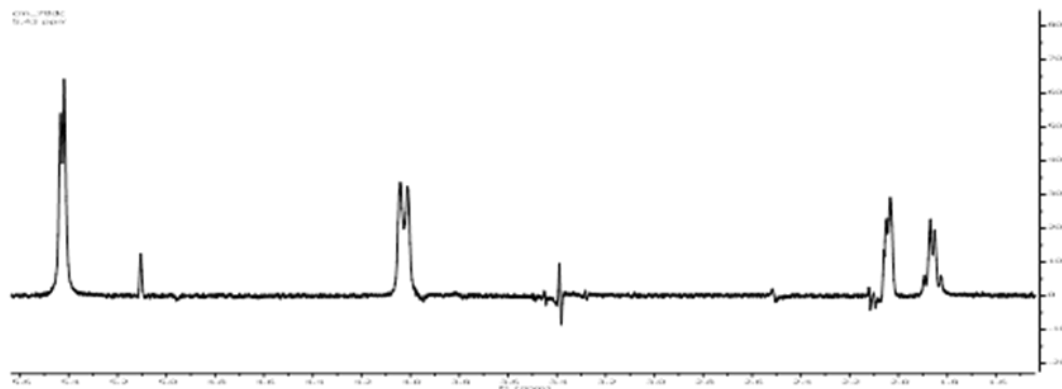
APÊNDICE D - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto **23**.



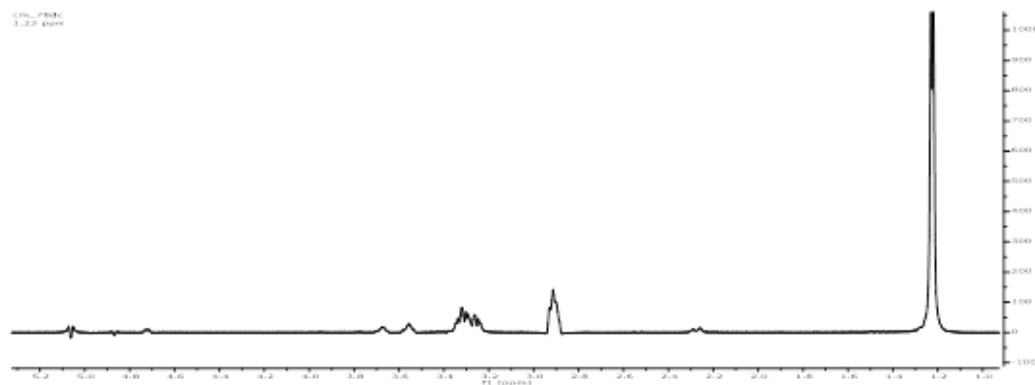
APÊNDICE E - Espectro de DEPT (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto **23**



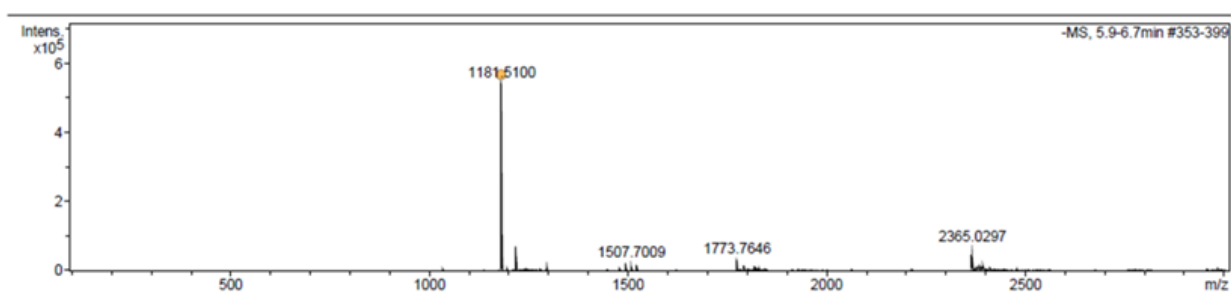
APÊNDICE F - Espectro de TOCSY 1D (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) composto **23** (irradiação em δ_H 3,77)



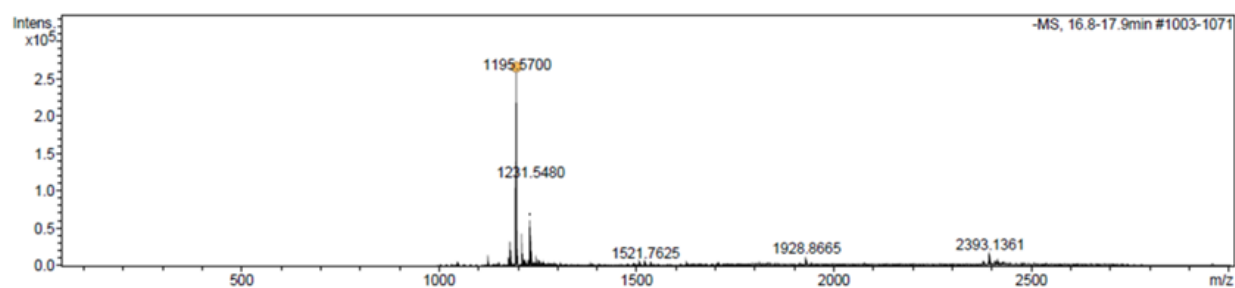
APÊNDICE G - Espectro de TOCSY 1D (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) composto **23** (irradiação em δ_H 5,42)



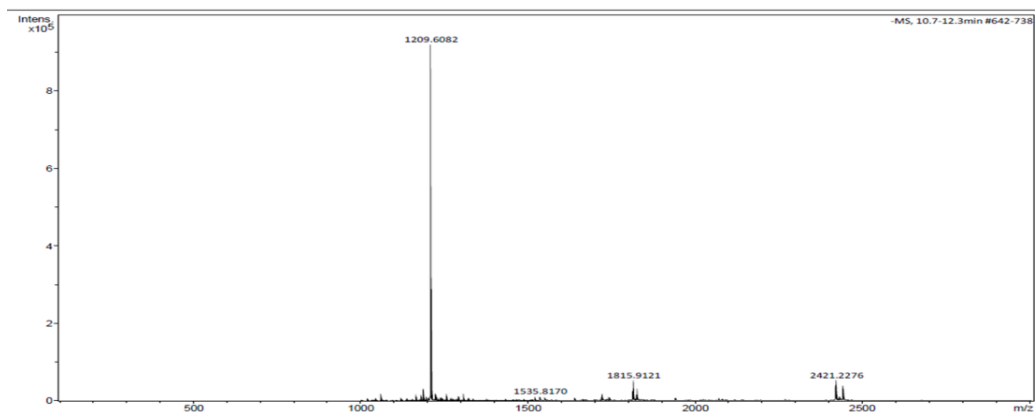
APÊNDICE H - Espectro de TOCSY 1D (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) composto **23** (irradiação em δ_H 1,22).



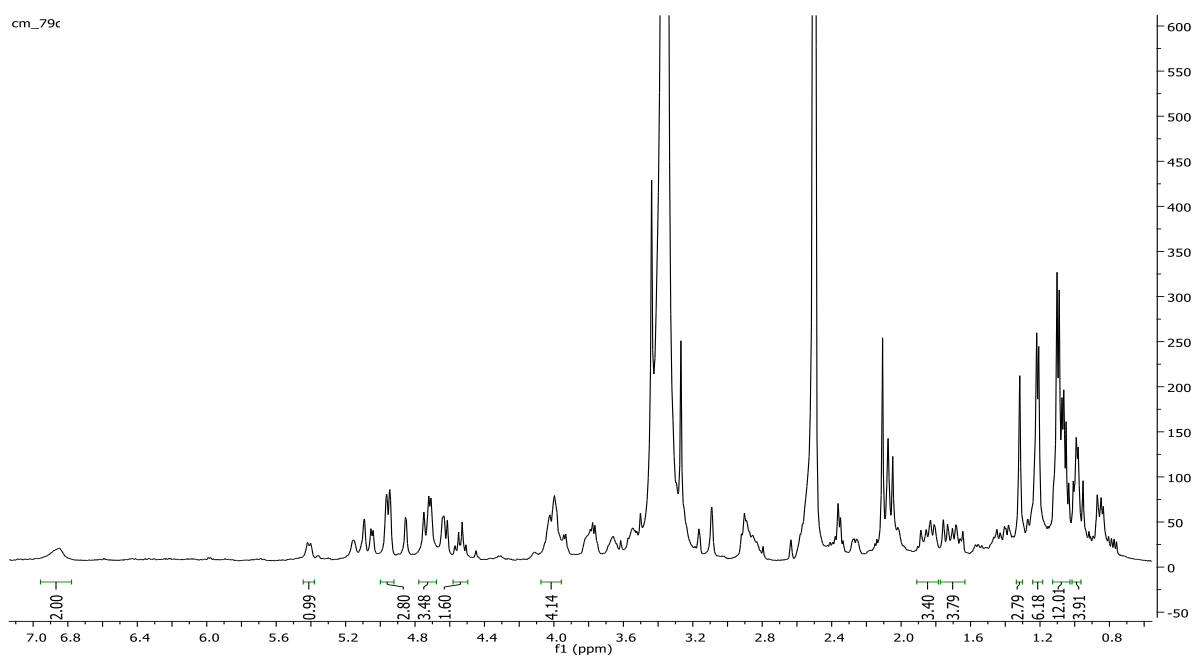
APÊNDICE I - Espectro de HR-ESI-MS do composto **23** $[\text{M}-\text{H}]^-$



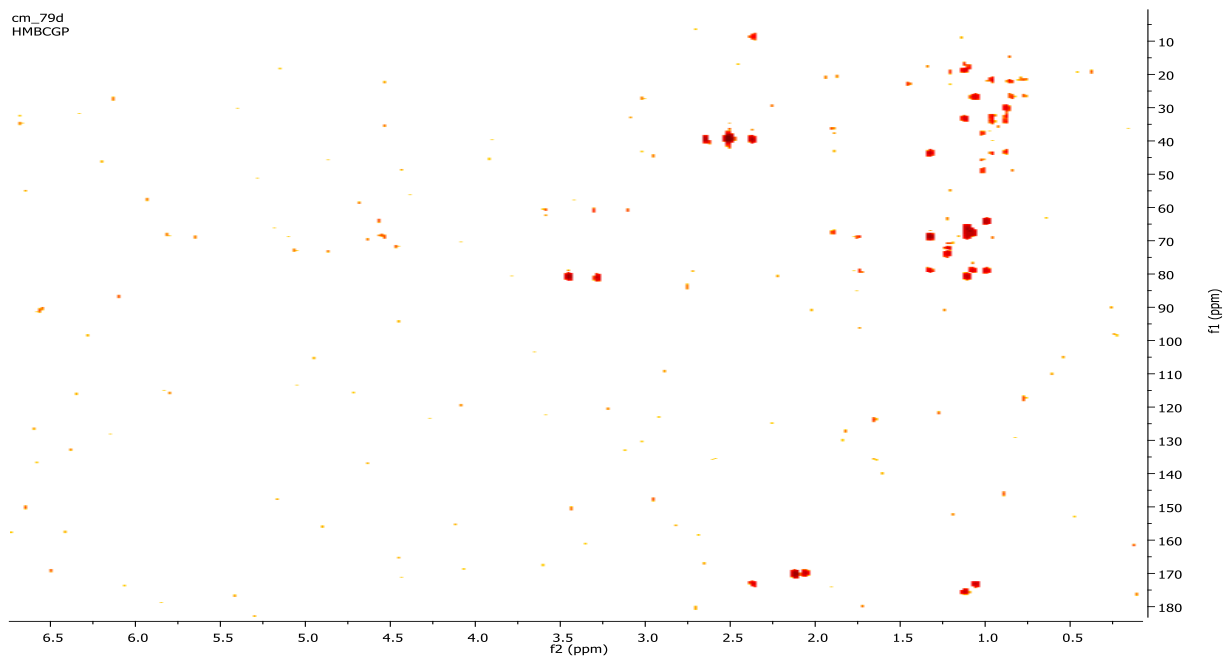
APÊNDICE J - Espectro de HR-ESI-MS do composto **24** $[\text{M}-\text{H}]^-$



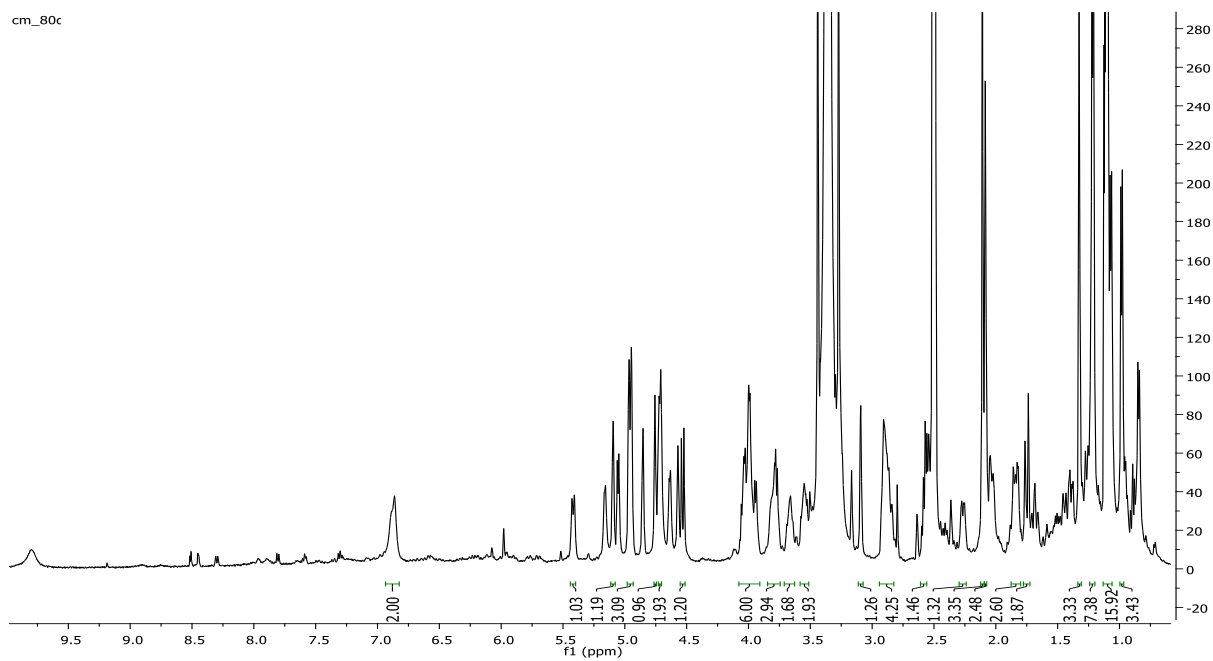
APÊNDICE K - Espectro de HR-ESI-MS do composto **25** [M-H]⁻



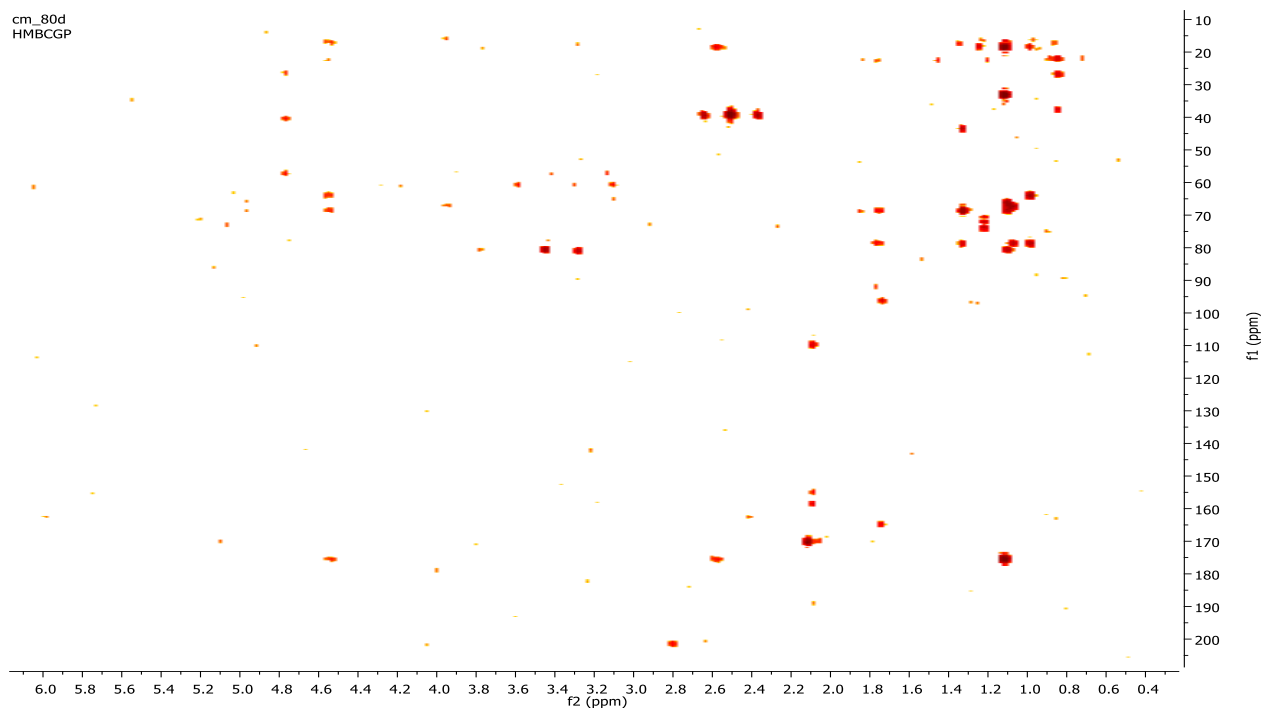
APÊNDICE L - Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, (CD₃)₂SO) do composto **24**



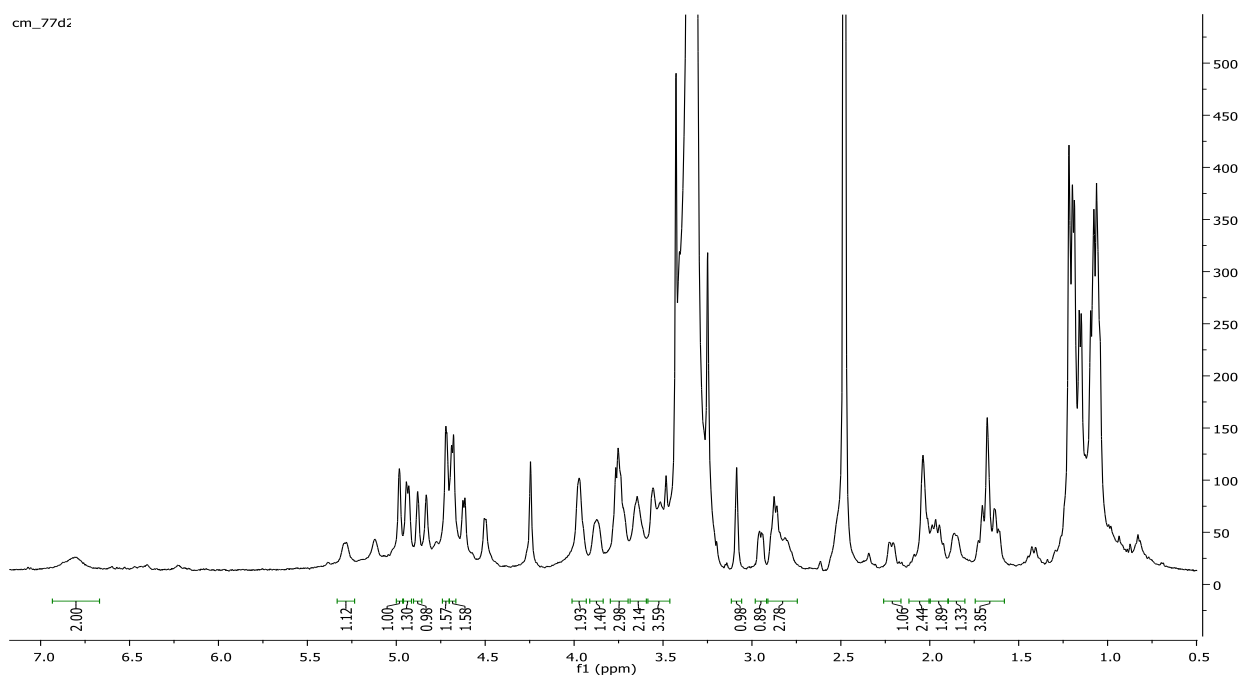
APÊNDICE M - Espectro de gHMBC (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto **24**.



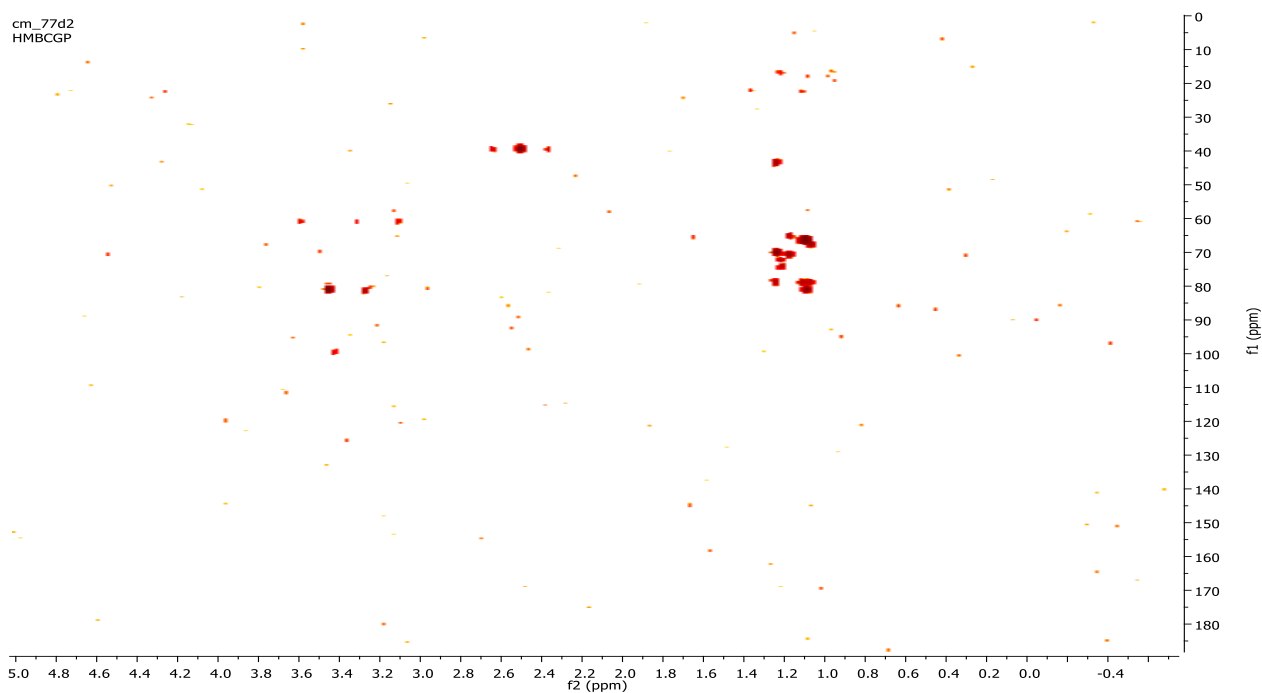
APÊNDICE N - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto **25**



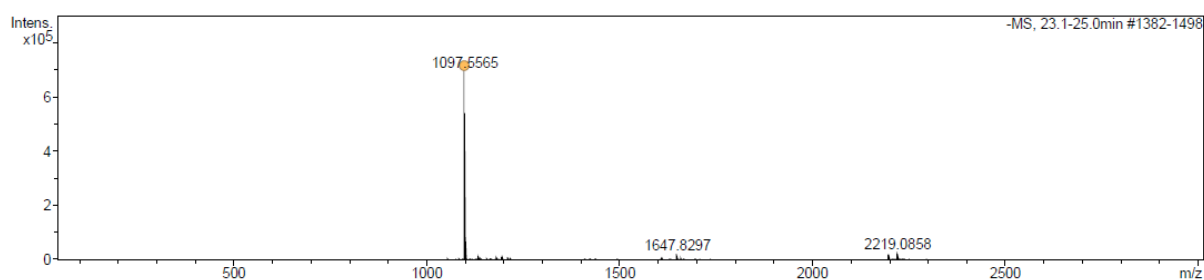
APÊNDICE O - Espectro de gHMBC (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto **25**



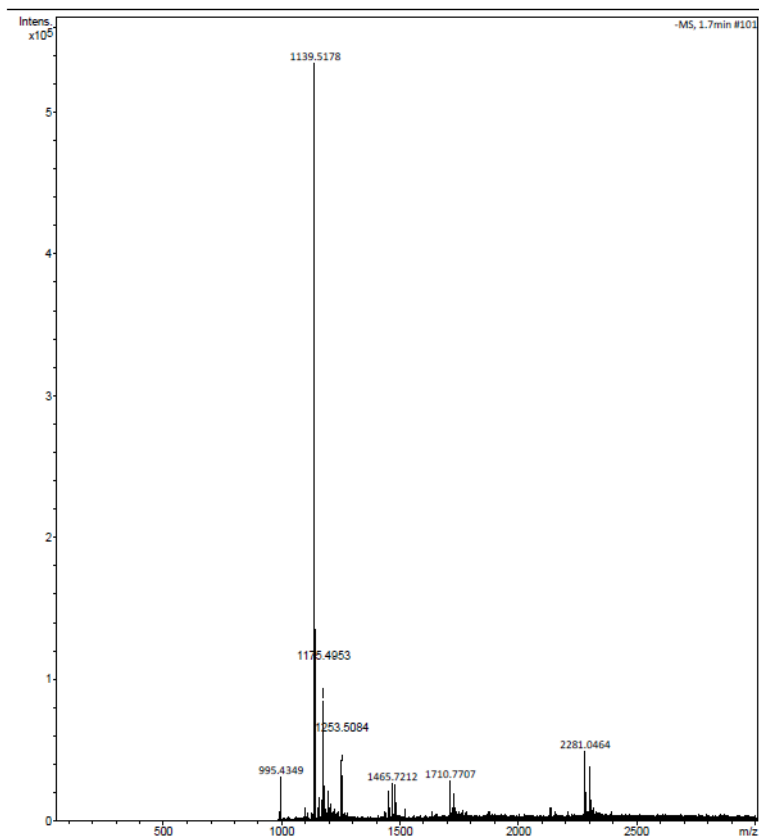
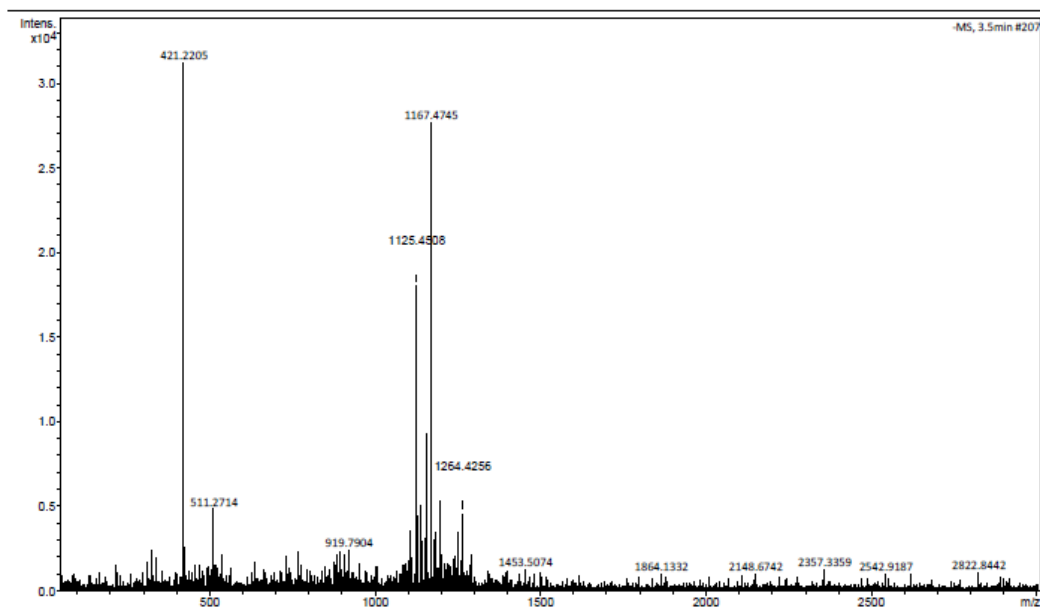
APÊNDICE P - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto **22**

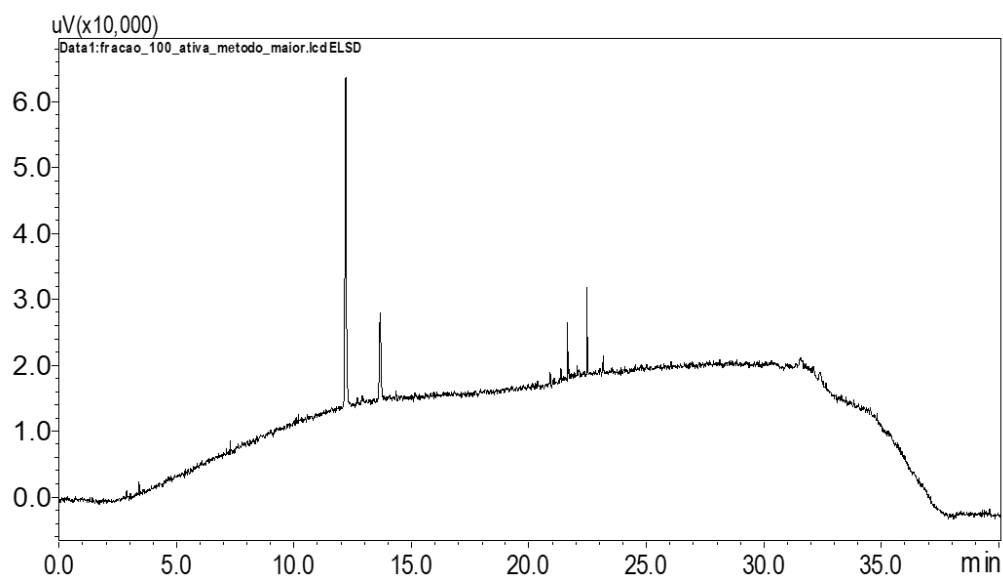


APÊNDICE Q - Espectro de gHMBC (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto **22**

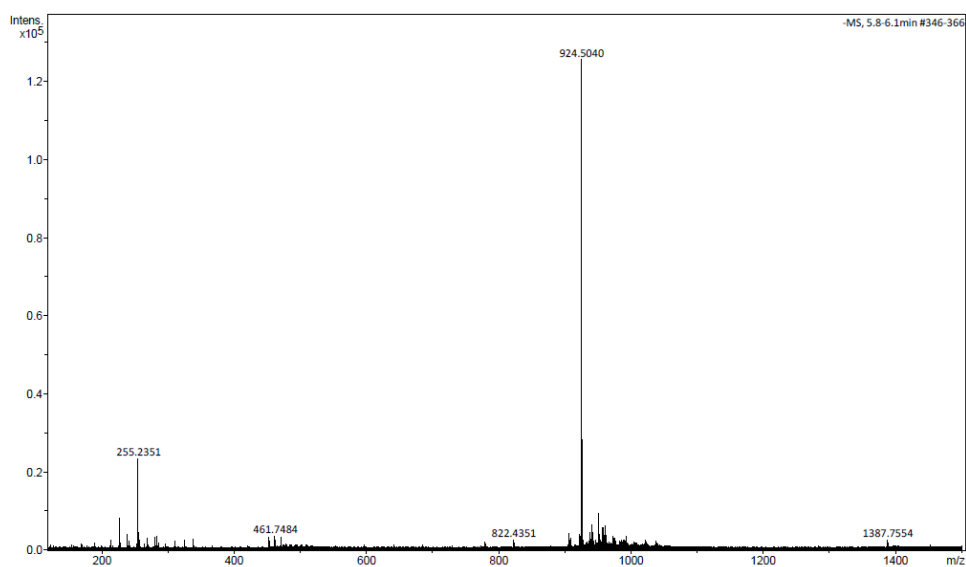


APÊNDICE R - Espectro de HR-ESI-MS do composto **22** $[\text{M}-\text{H}]^-$

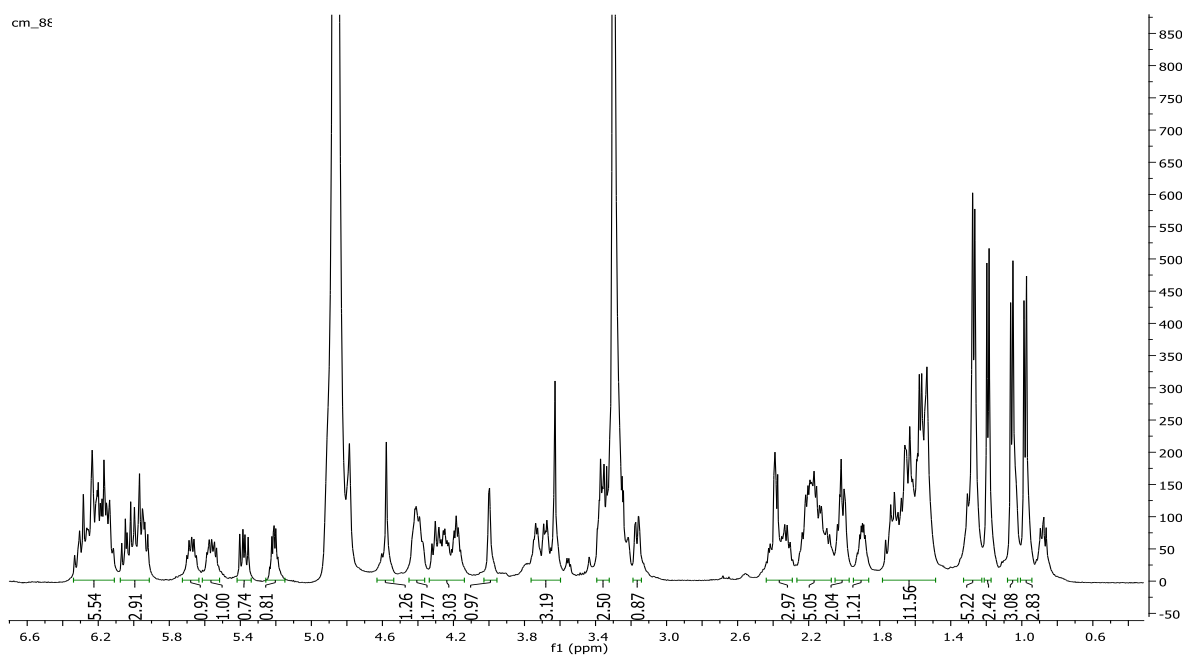
APÊNDICE S - Espectro de HR-ESI-MS do composto **26** [M-H]⁻APÊNDICE T - Espectro de HR-ESI-MS do composto **27** [M-H]⁻



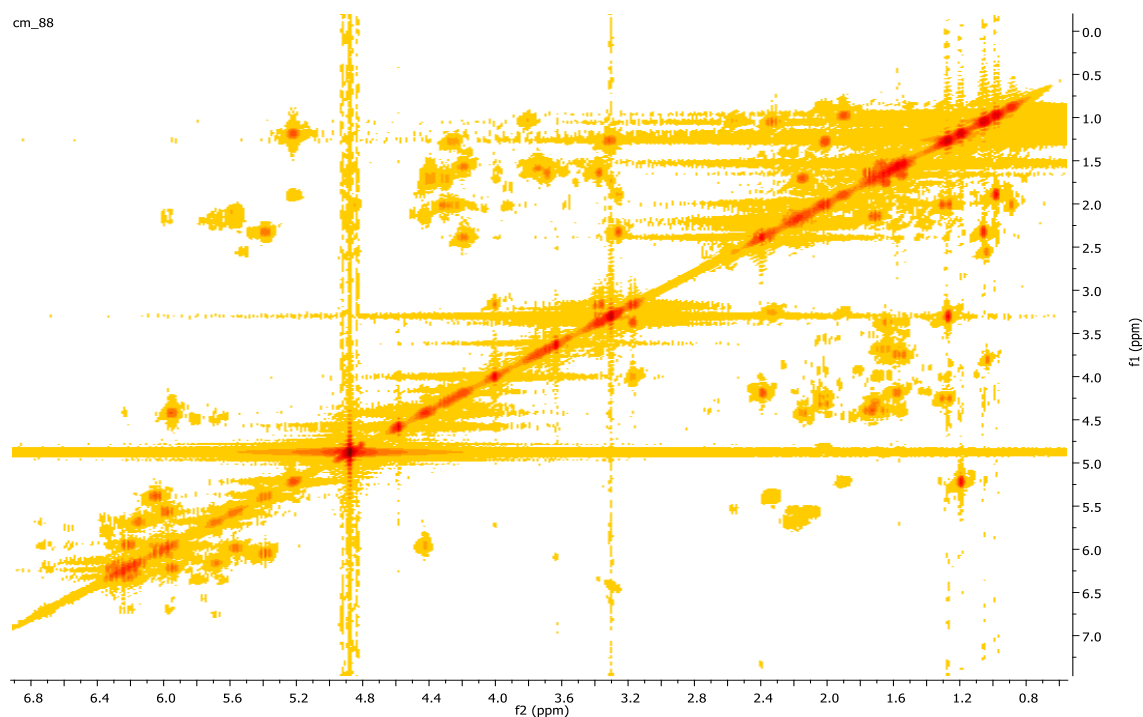
APÊNDICE U - Cromatograma da fração 75% MeOH do extrato em acetato de etila do cultivo em ISP-2 ágar de ICBG 328. Detecção ELSD.



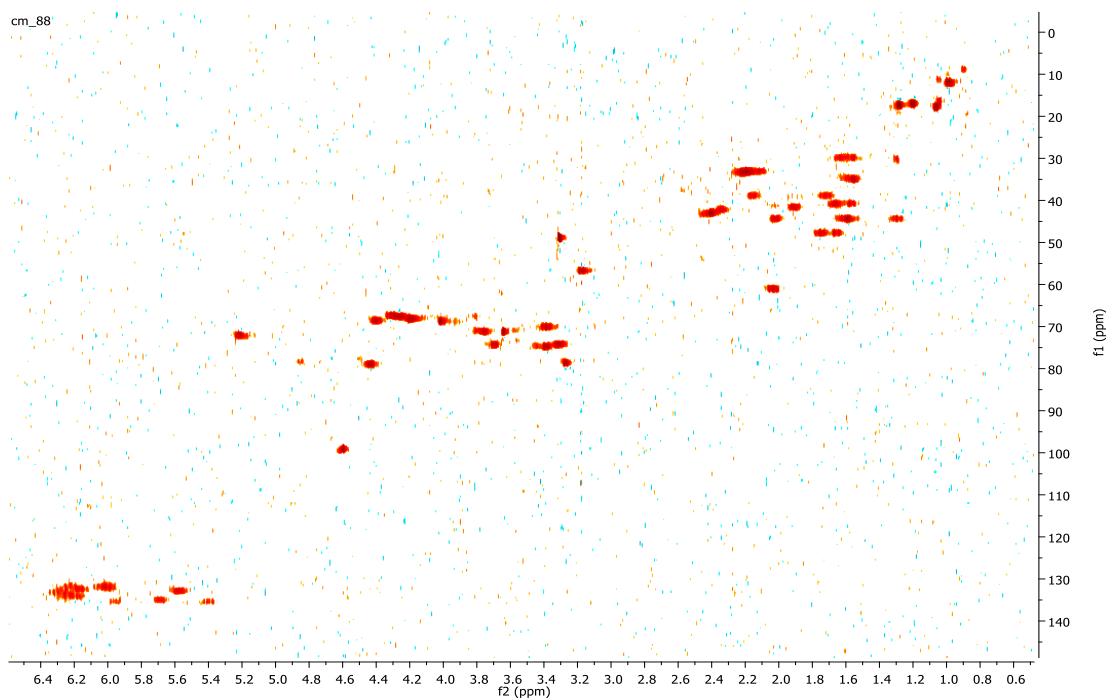
APÊNDICE V - Espectro de HR-ESI-MS do composto **28** [M-H]⁻



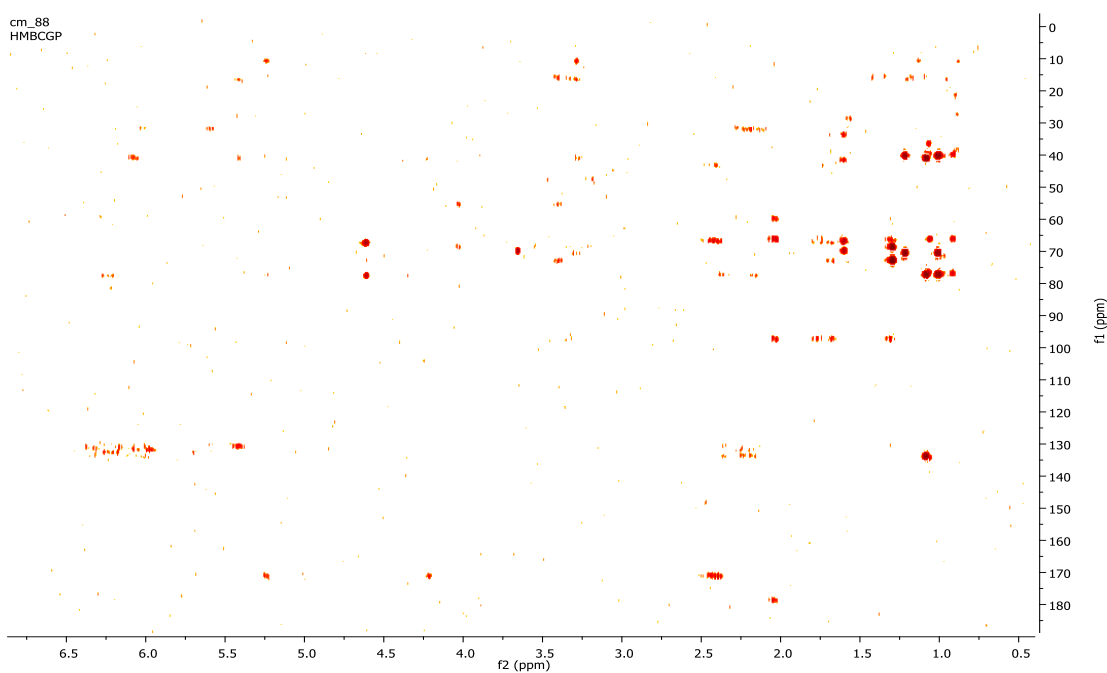
APÊNDICE W - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto **28**.



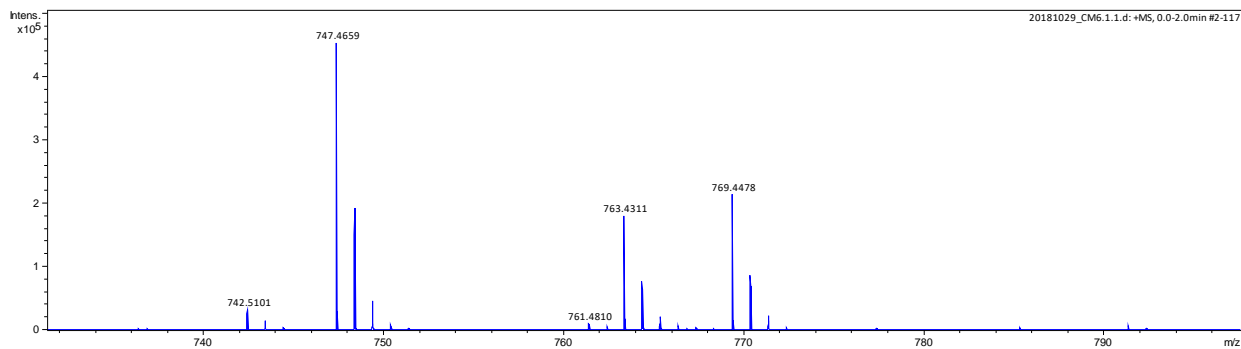
APÊNDICE X - Espectro de gCOSY (500 MHz, CD_3OD) do composto **28**.



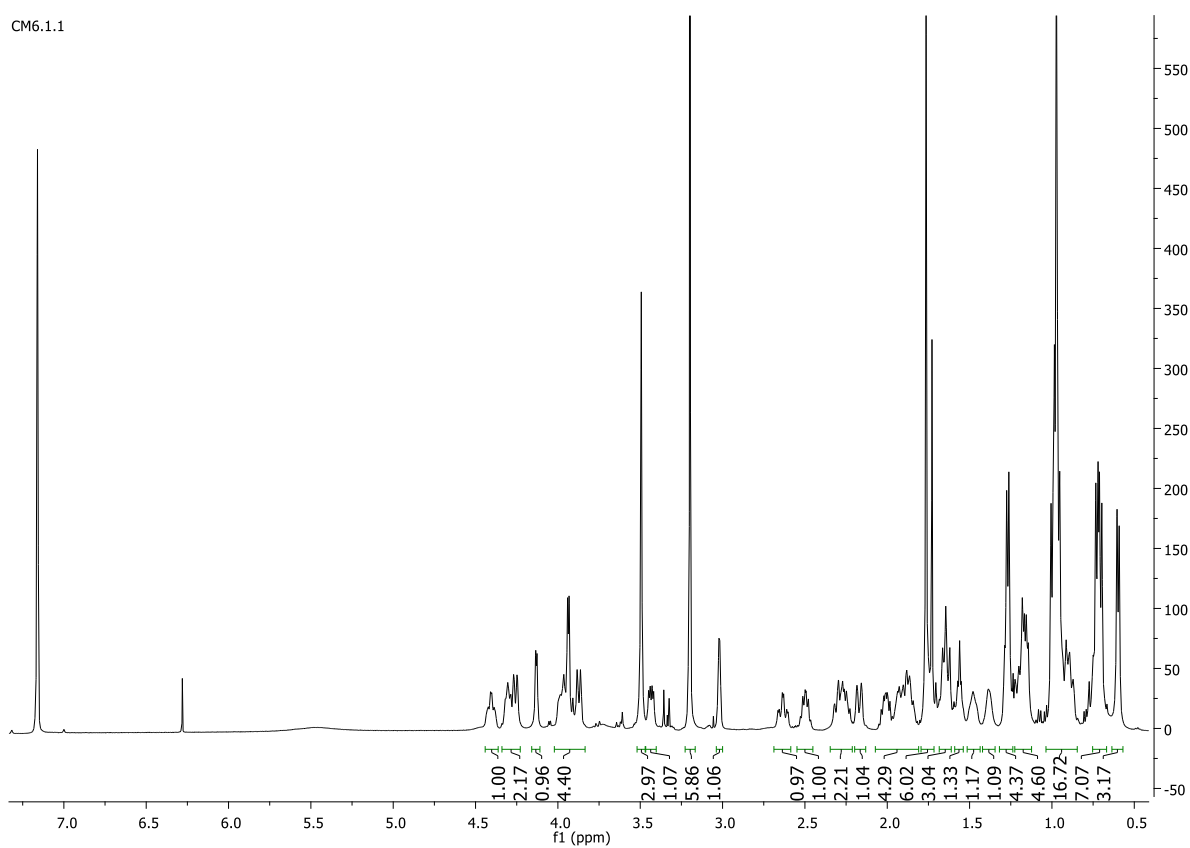
APÊNDICE Y - Espectro de gHSQC (500 MHz, CD₃OD) do composto **28**.



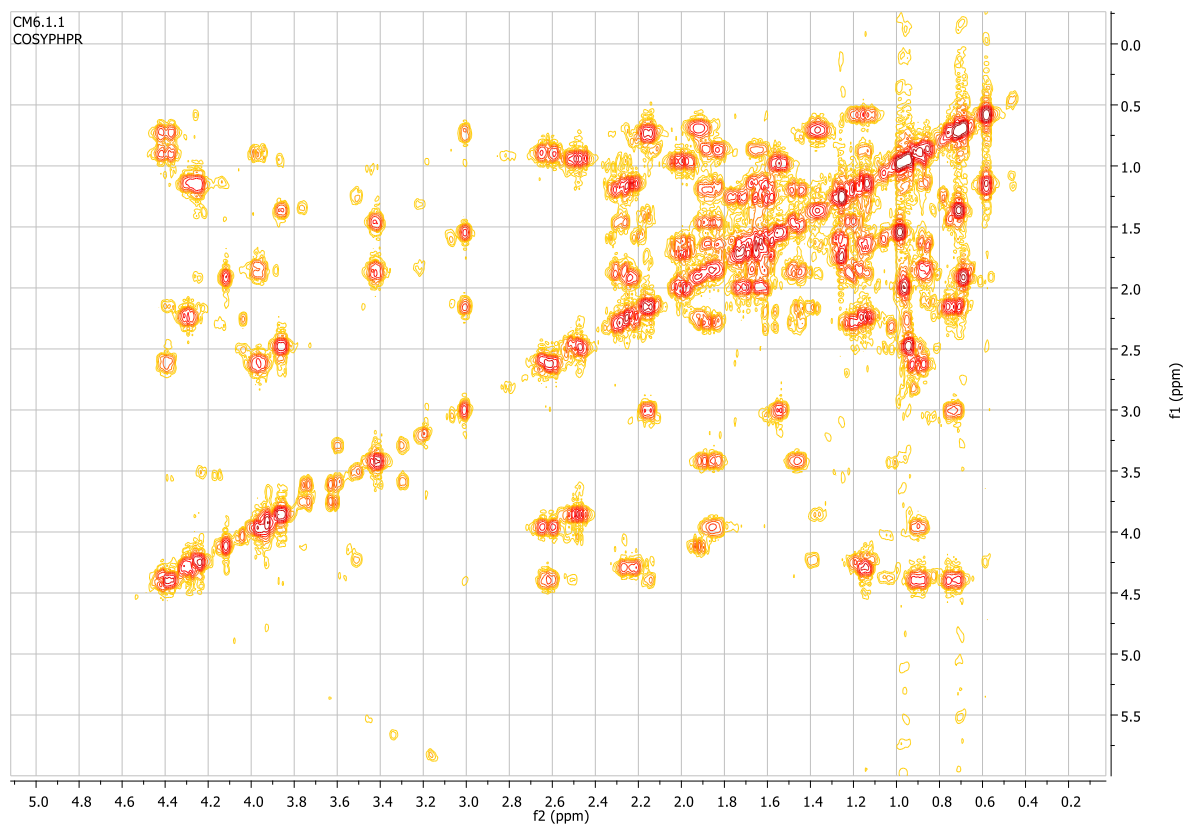
APÊNDICE Z - Espectro de gHMBC (500 MHz, CD₃OD) do composto **28**.



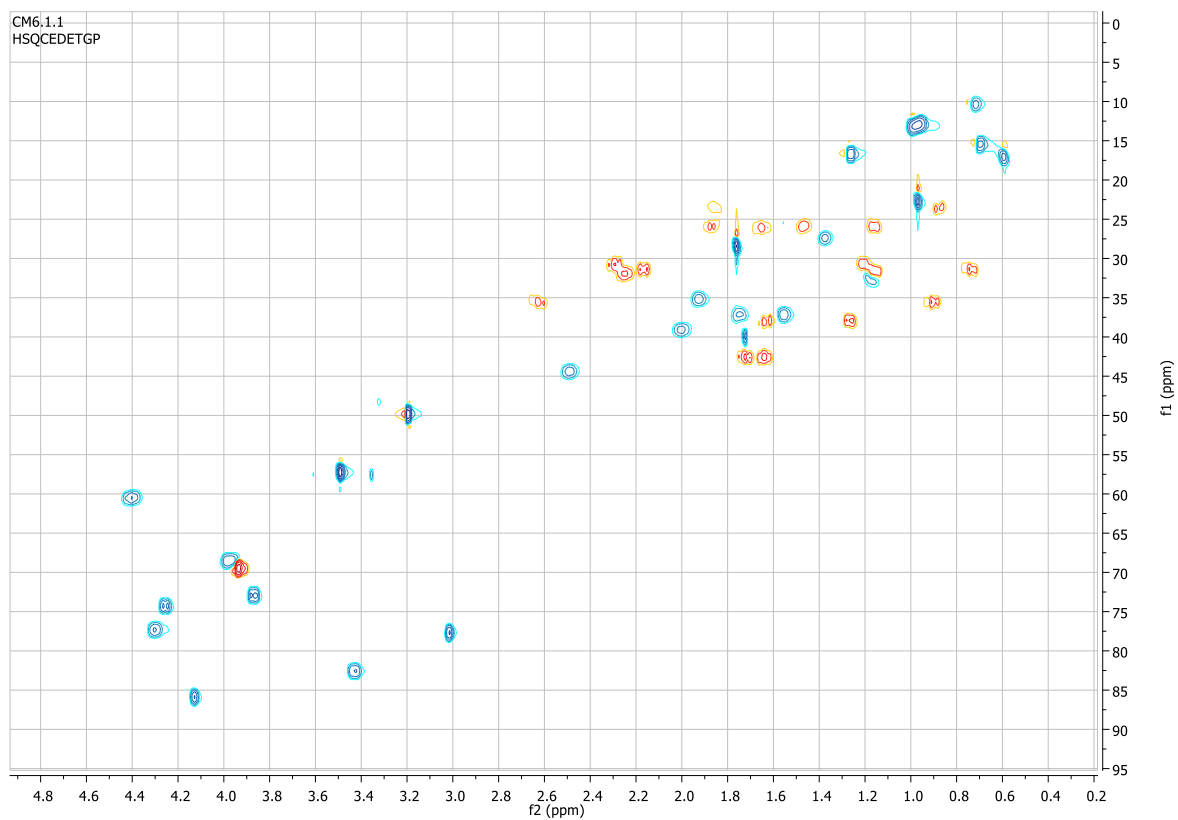
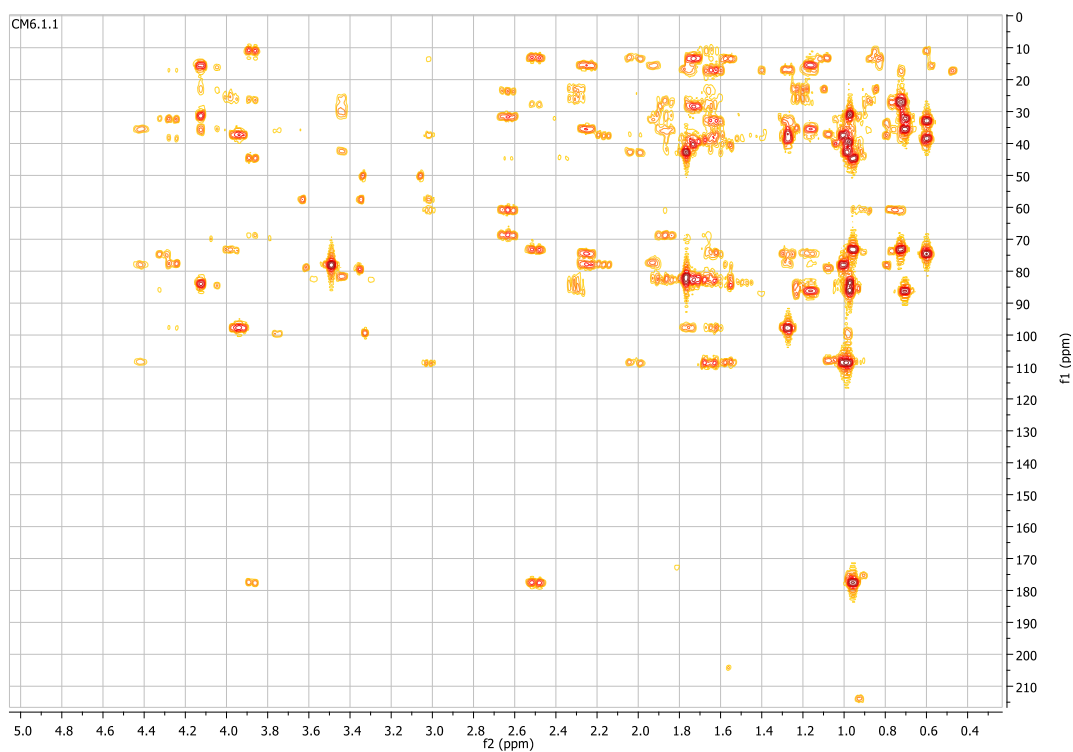
APÊNDICE AA - Espectro de HR-ESI-MS do composto **29** [M+Na]⁺

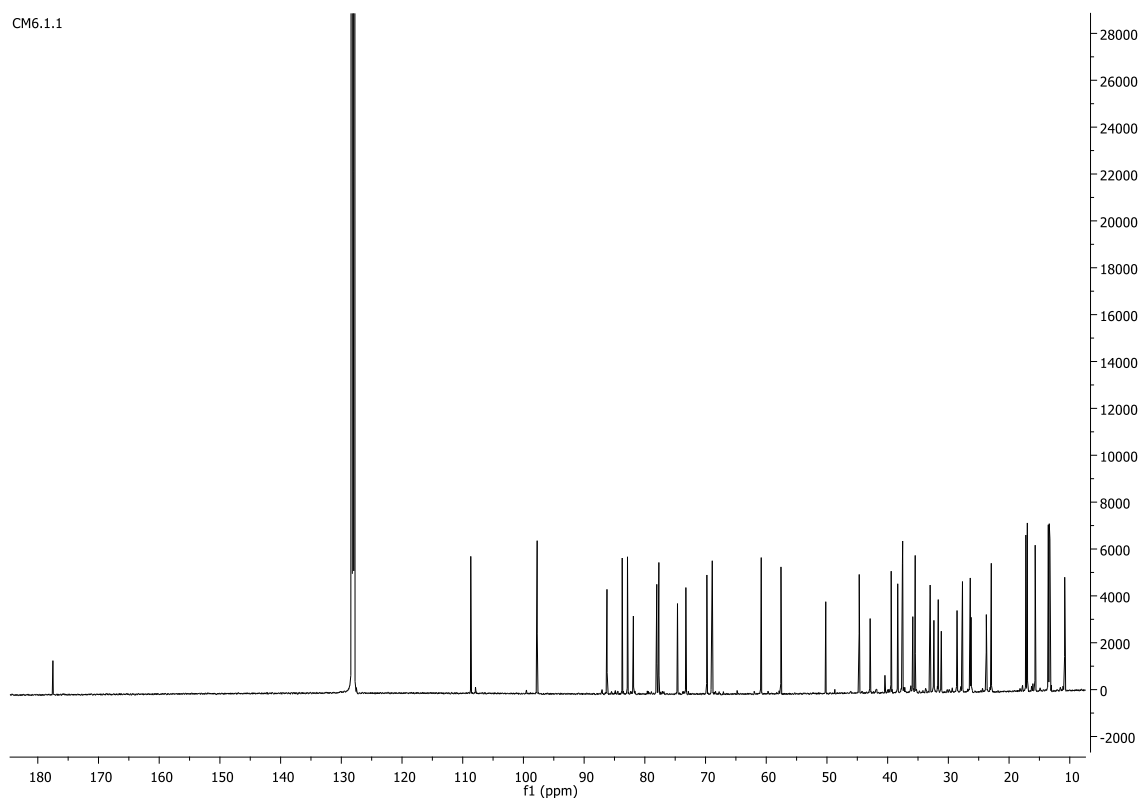


APÊNDICE BB - Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, C₆D₆) do composto **29**.

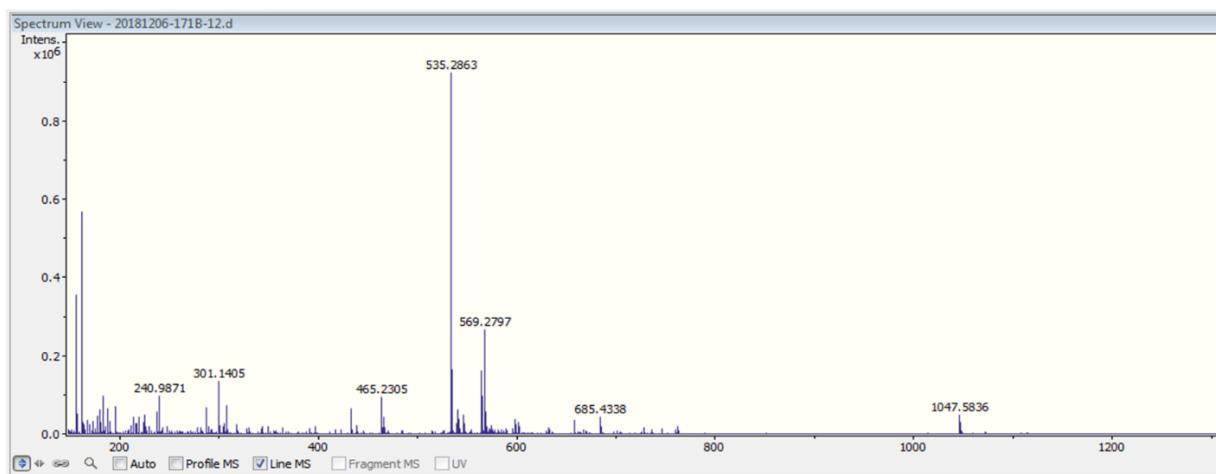


APÊNDICE CC - Espectro de gCOSY (600 MHz, C₆D₆) do composto **29**.

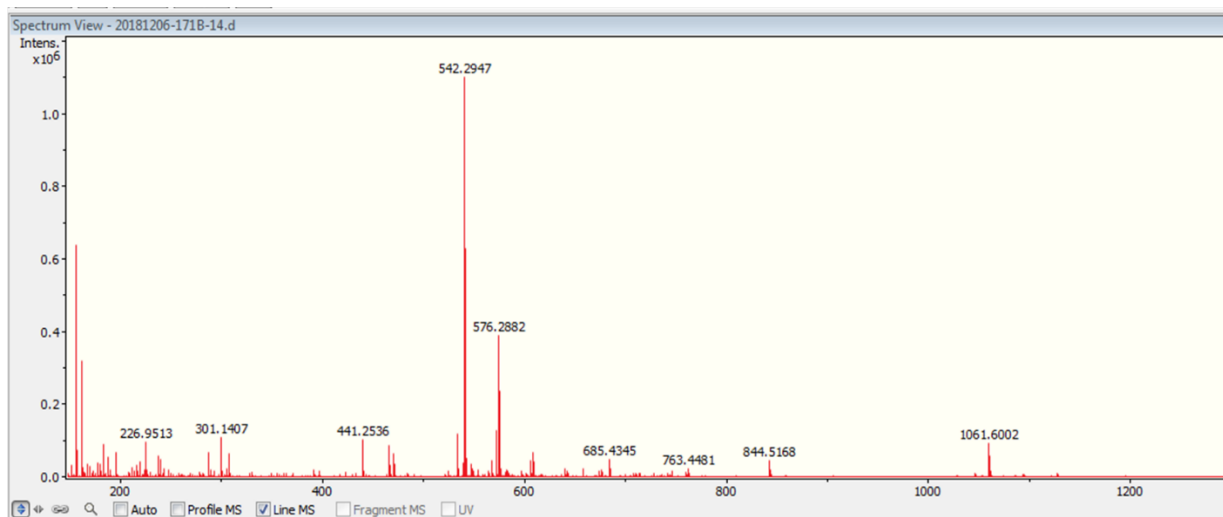
APÊNDICE DD - Espectro de gHSQC (500 MHz, C₆D₆) do composto **29**APÊNDICE EE - Espectro de gHMBC (500 MHz, C₆D₆) do composto **29**



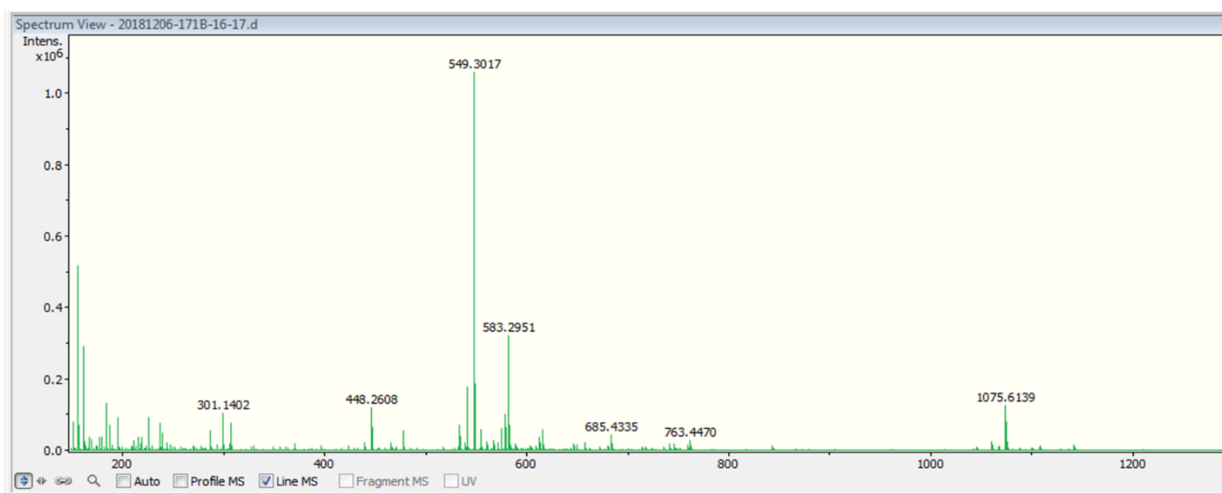
APÊNDICE FF - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, C_6D_6) do composto **29**.



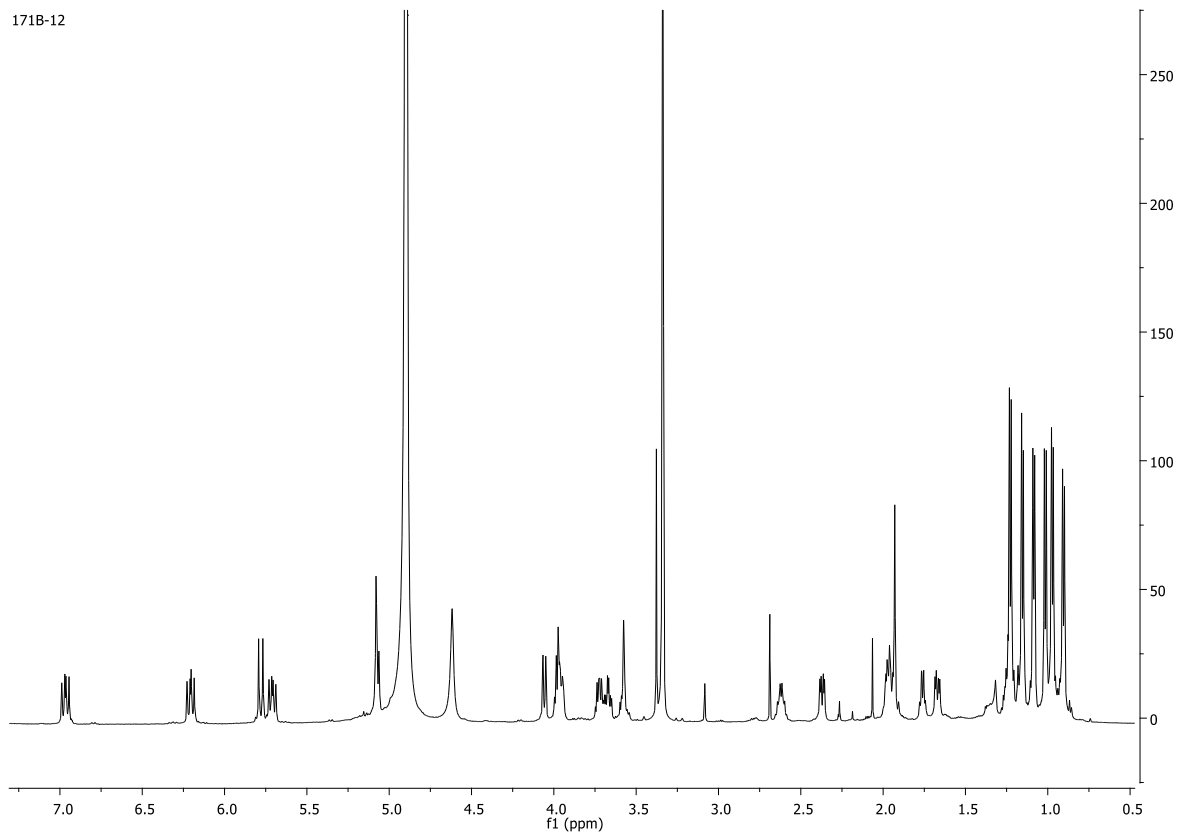
APÊNDICE GG - Espectro de HR-ESI-MS do composto **30** $[\text{M}+\text{Na}]^+$



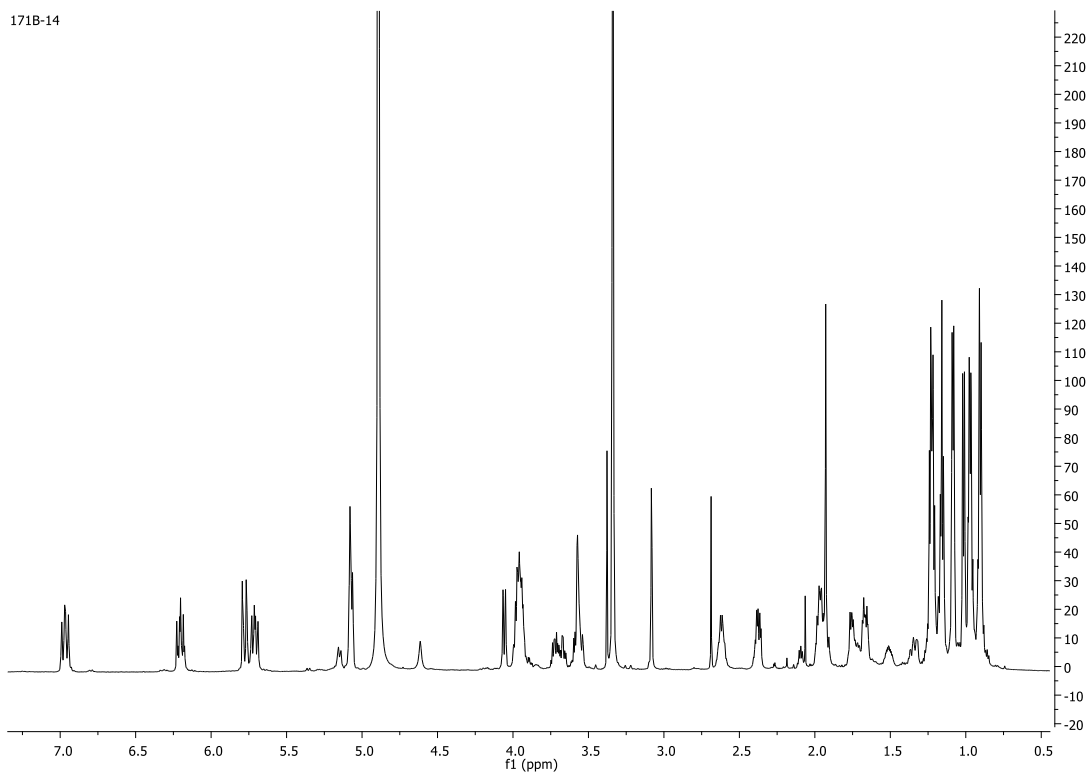
APÊNDICE HH - Espectro de HR-ESI-MS do composto **31** [M+Na]⁺



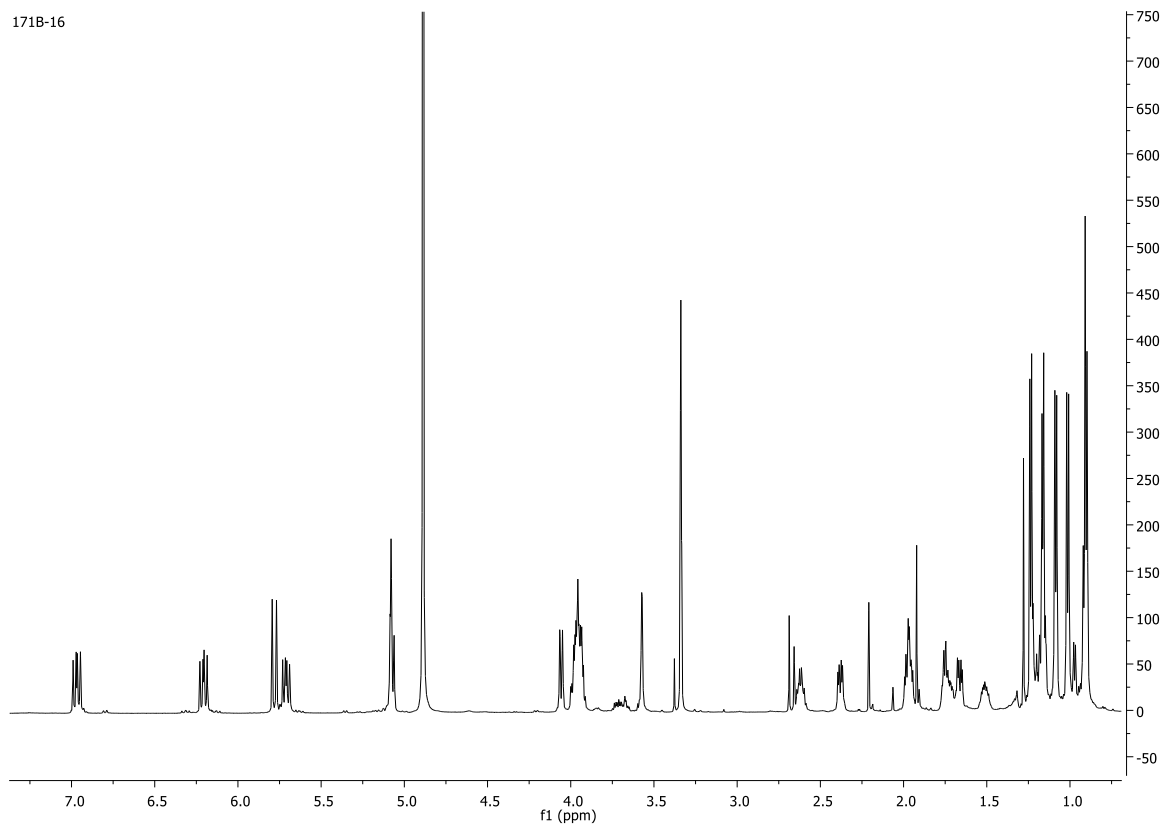
APÊNDICE II - Espectro de HR-ESI-MS do composto **32** [M+Na]⁺



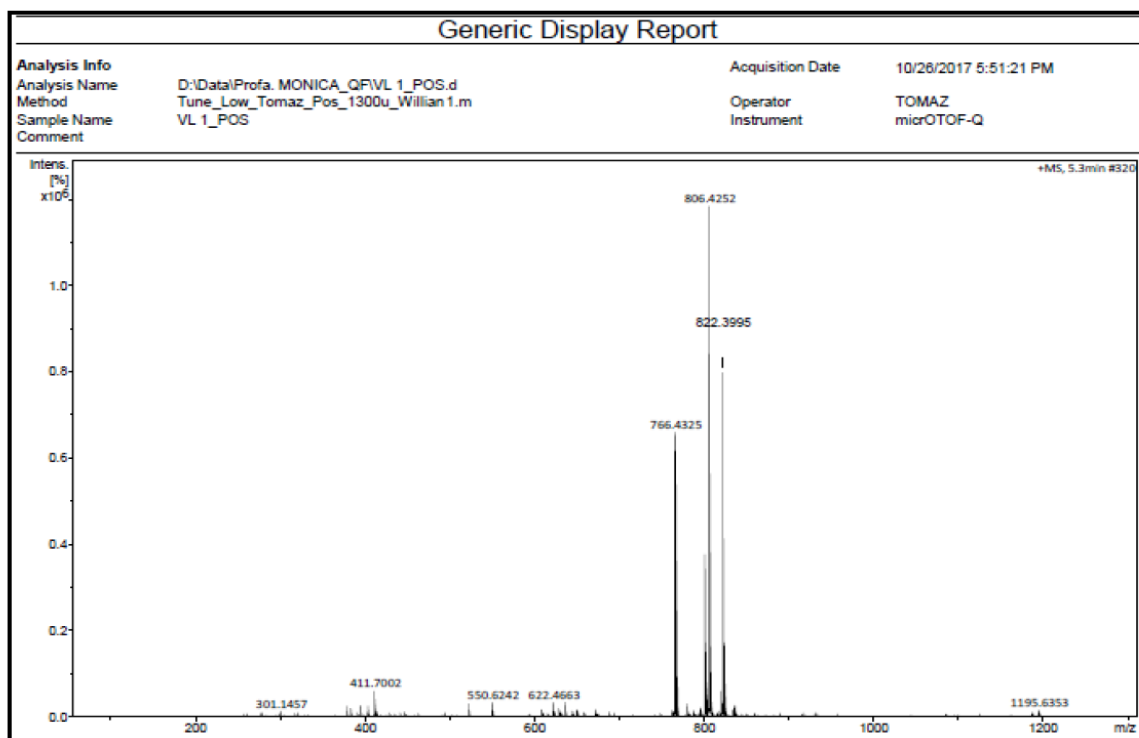
APÊNDICE JJ - Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CD₃OD) do composto **30**



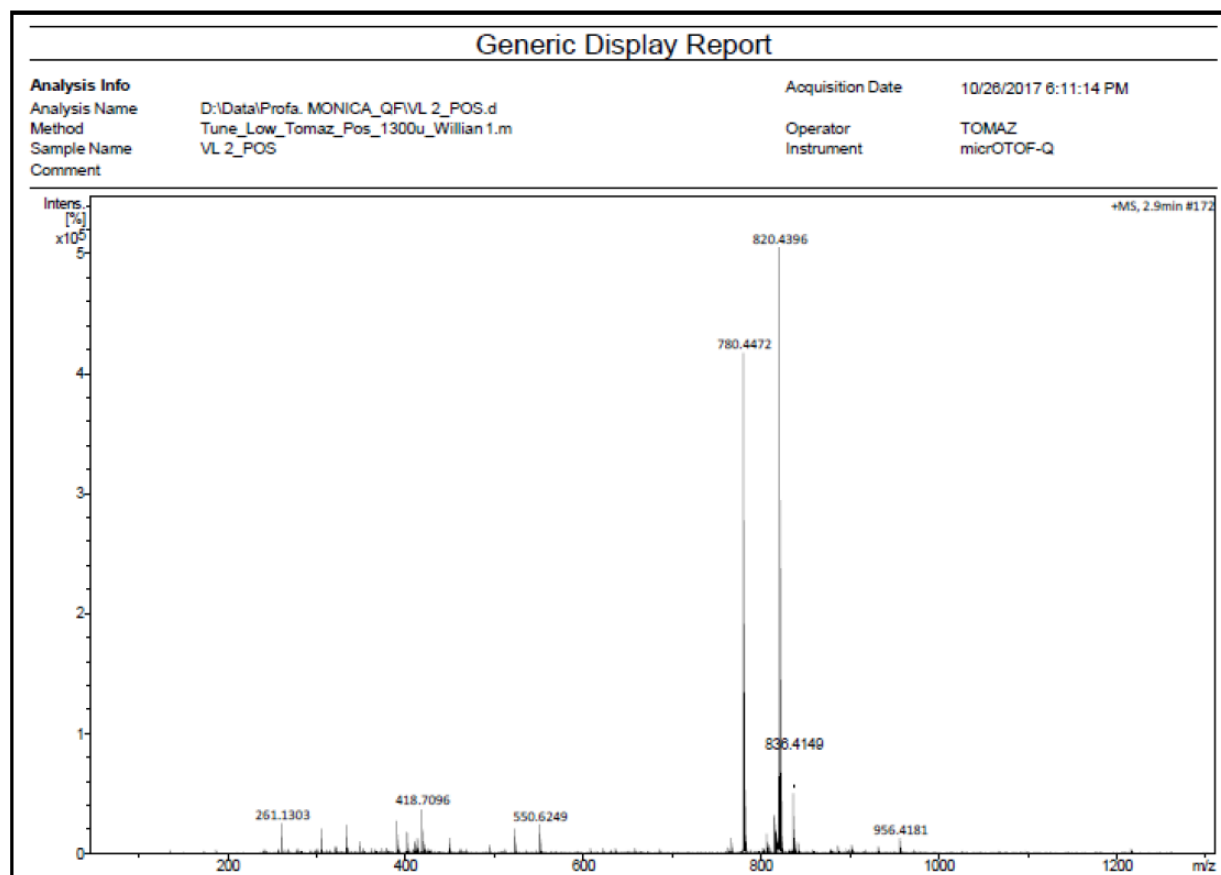
APÊNDICE KK - Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CD₃OD) do composto **31**



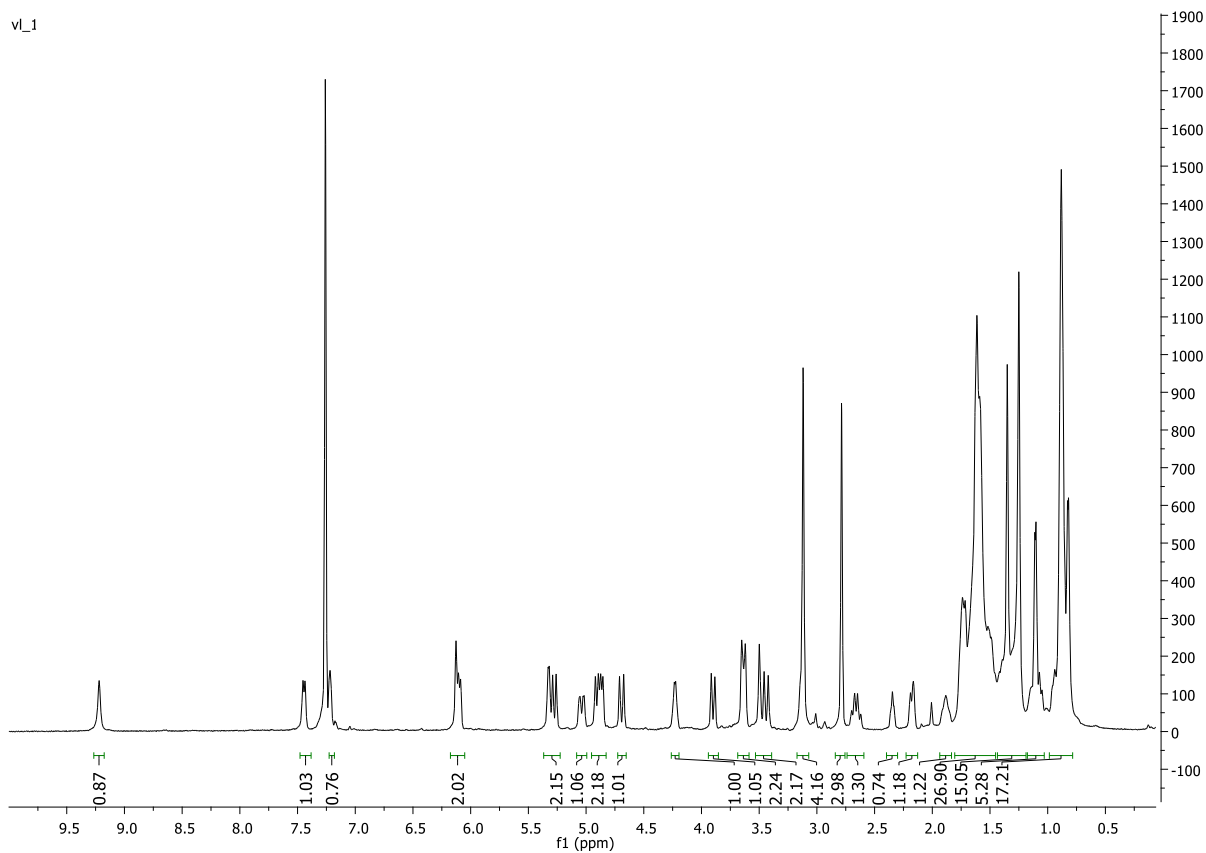
APÊNDICE LL - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto **32**



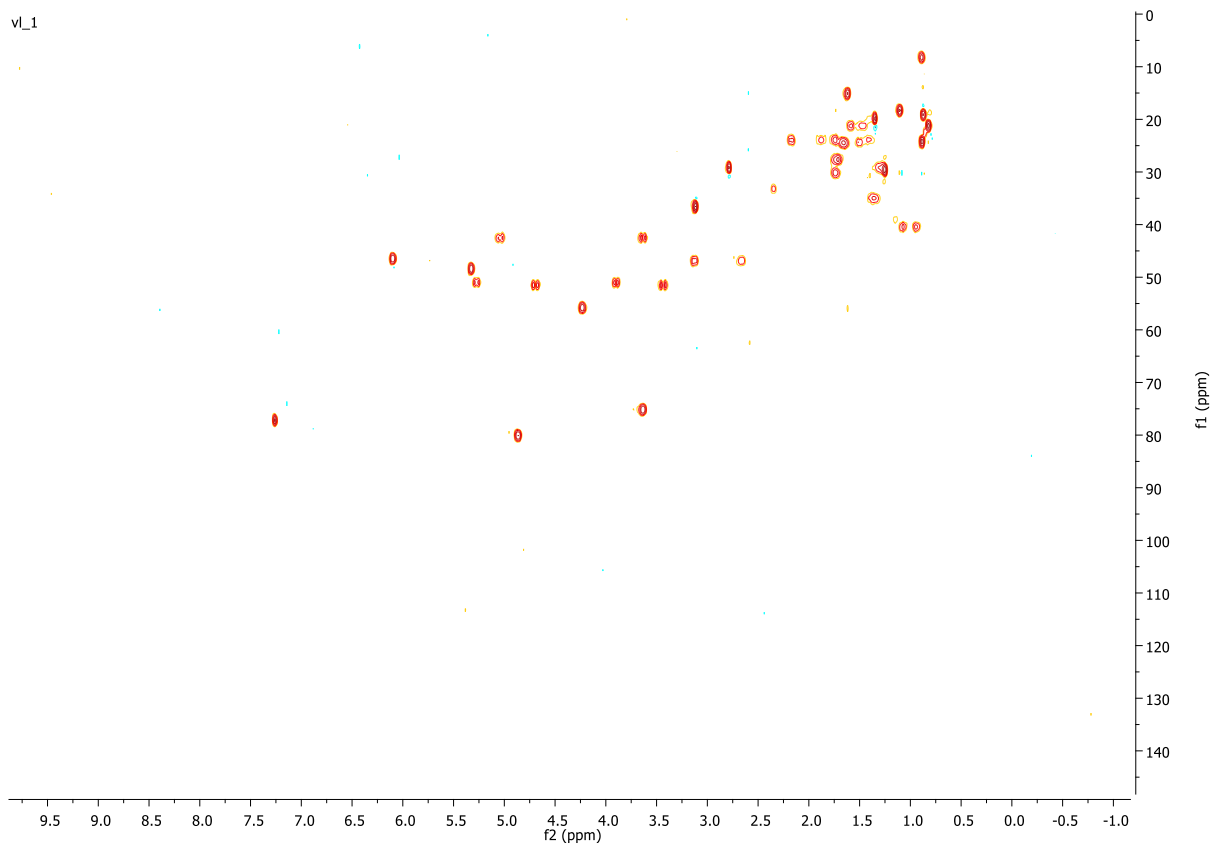
APÊNDICE MM - Espectro de HR-ESI-MS do composto **33** $[\text{M}+\text{Na}]^+$



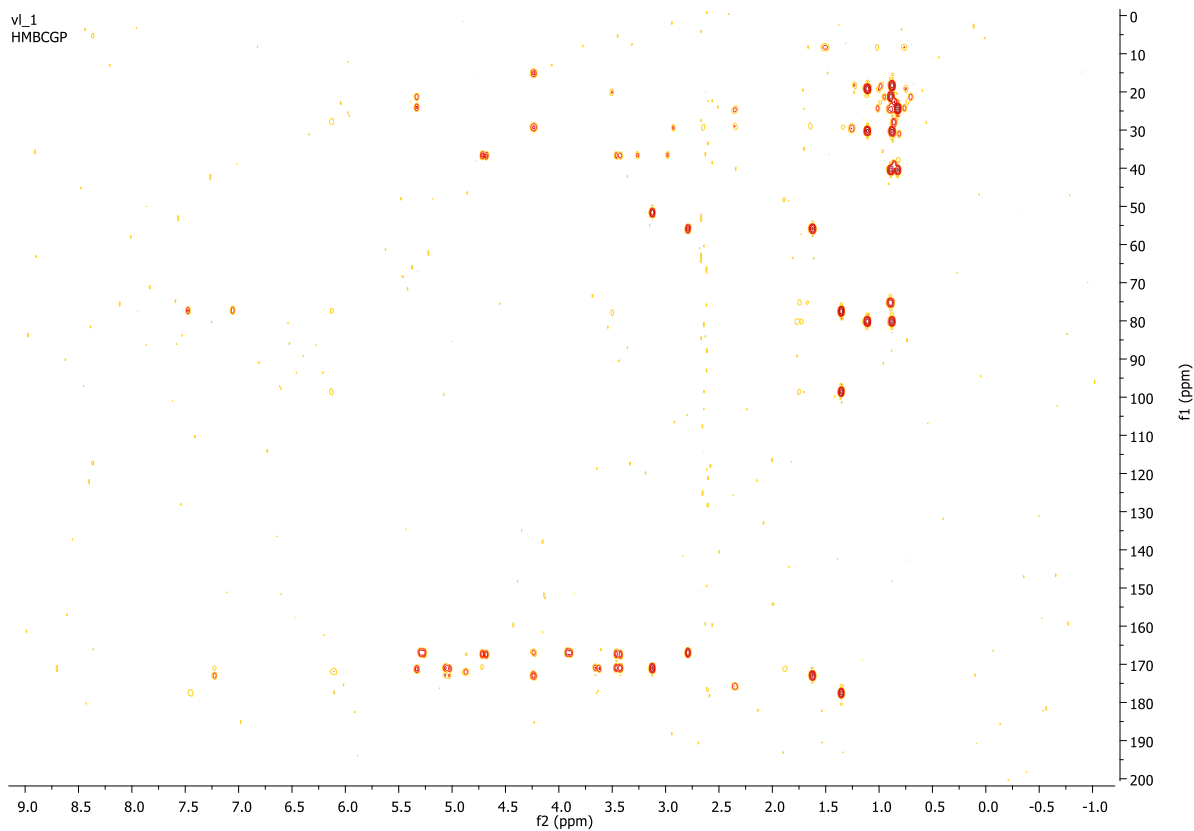
APÊNDICE NN - Espectro de HR-ESI-MS do composto **34** $[M+Na]^+$



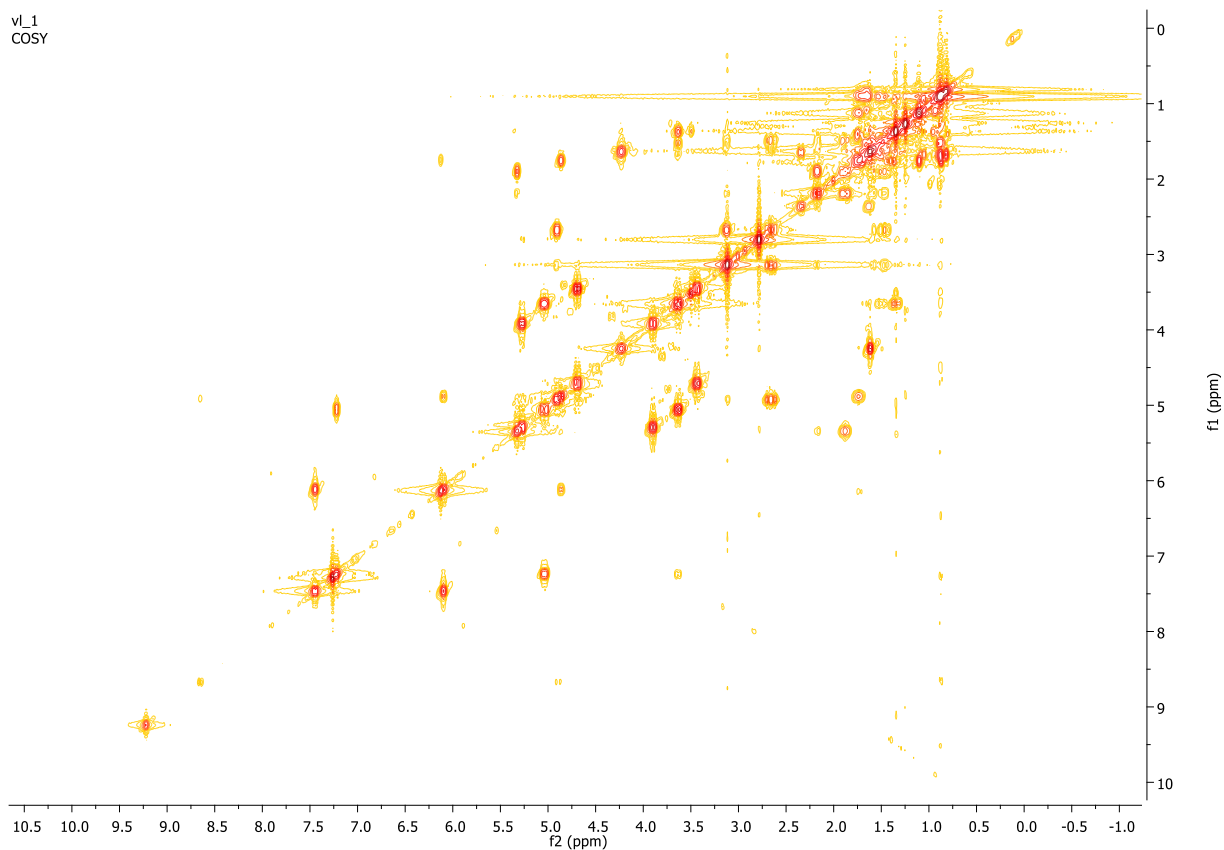
APÊNDICE OO - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **33**



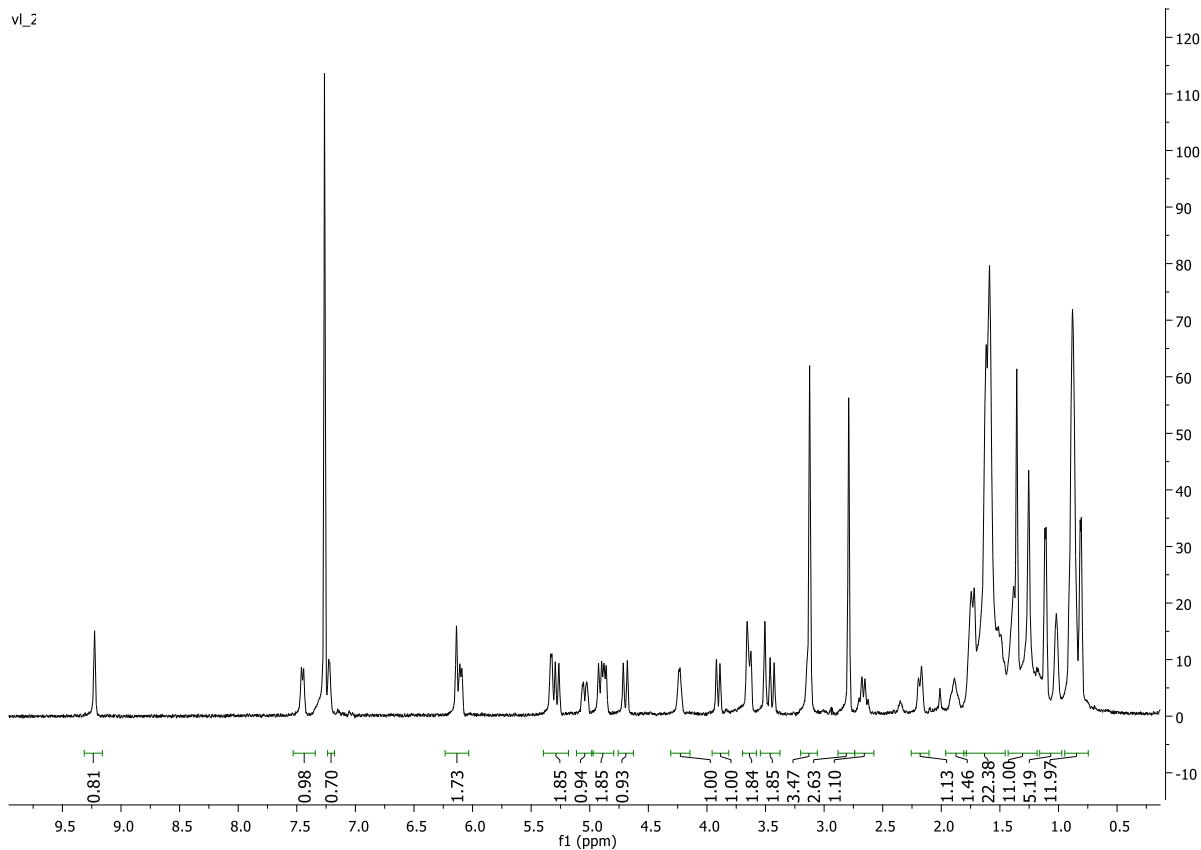
APÊNDICE PP - Espectro de gHSQC (500 MHz, CDCl₃) do composto **33**



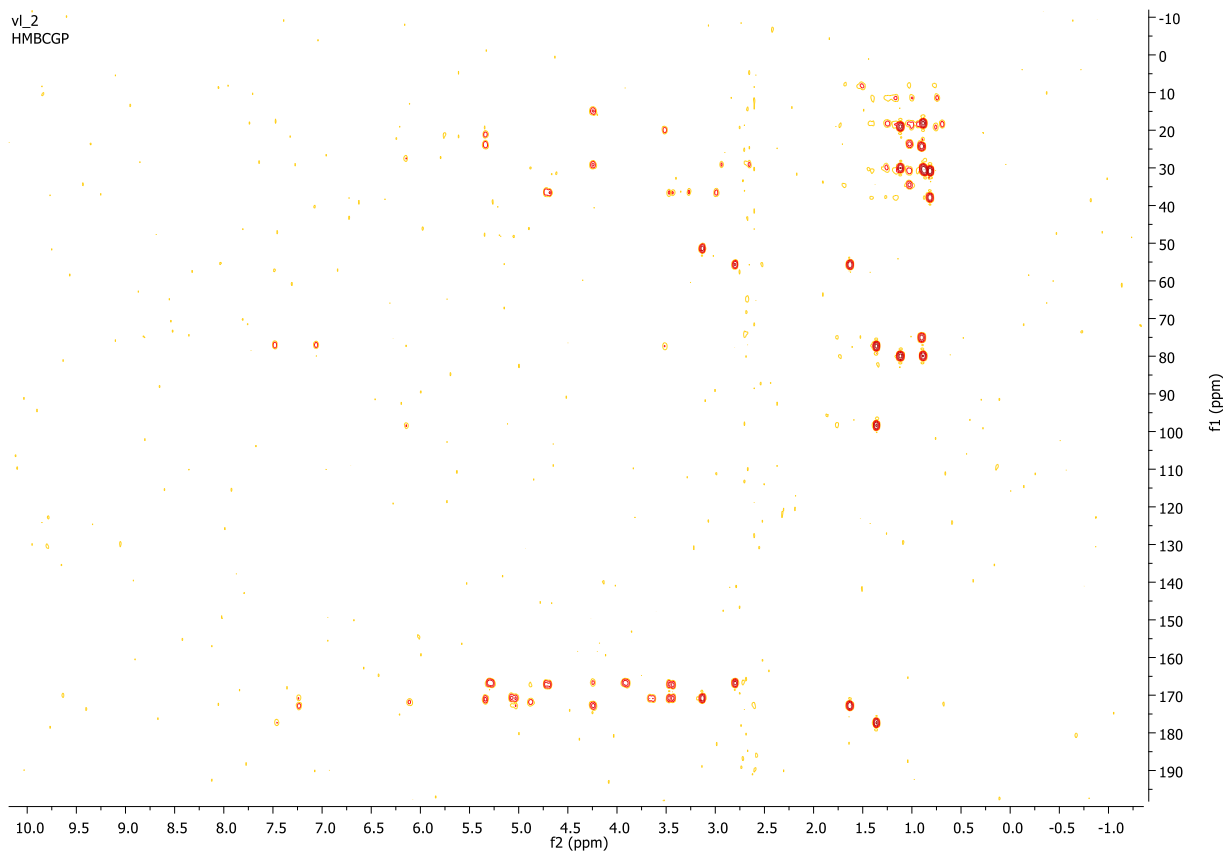
APÊNDICE QQ - Espectro de gHMBC (500 MHz, CDCl₃) do composto **33**



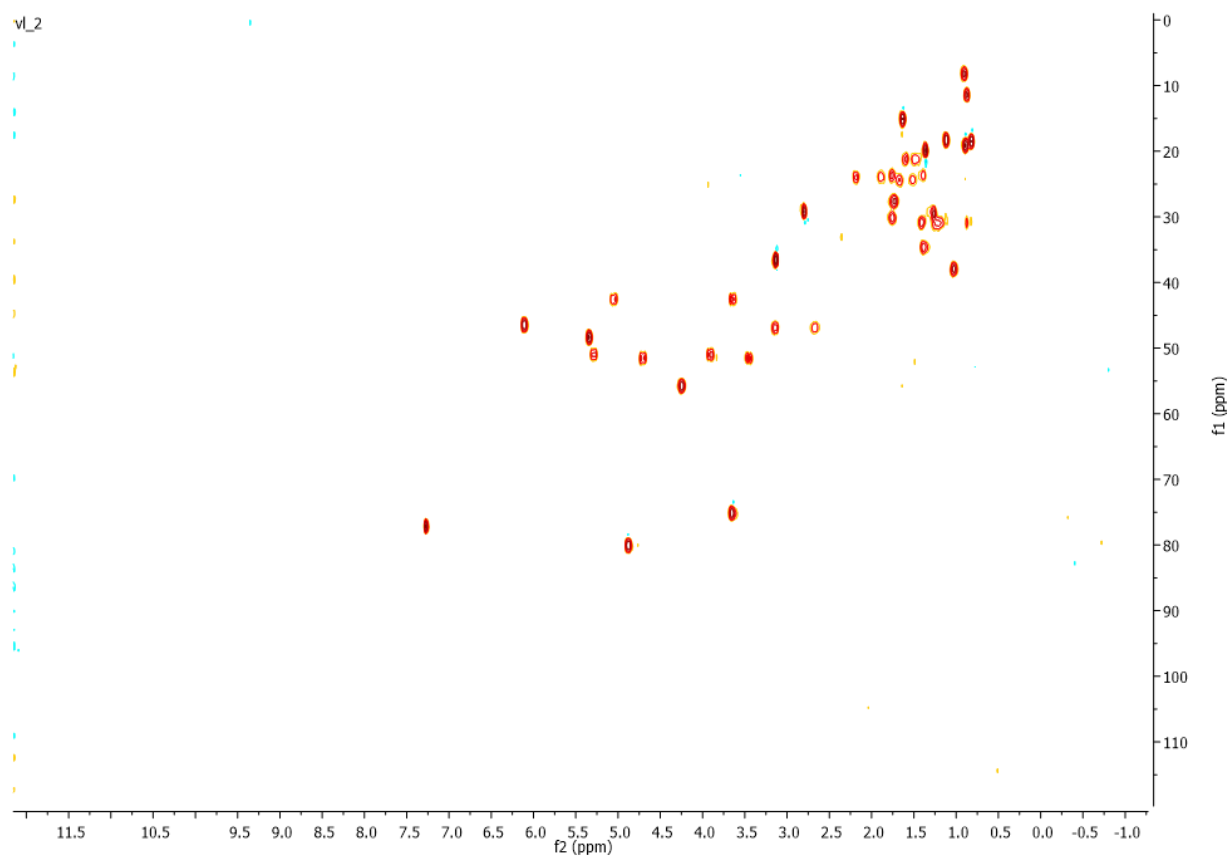
APÊNDICE RR - Espectro de gCOSY (500 MHz, CDCl₃) do composto **33**



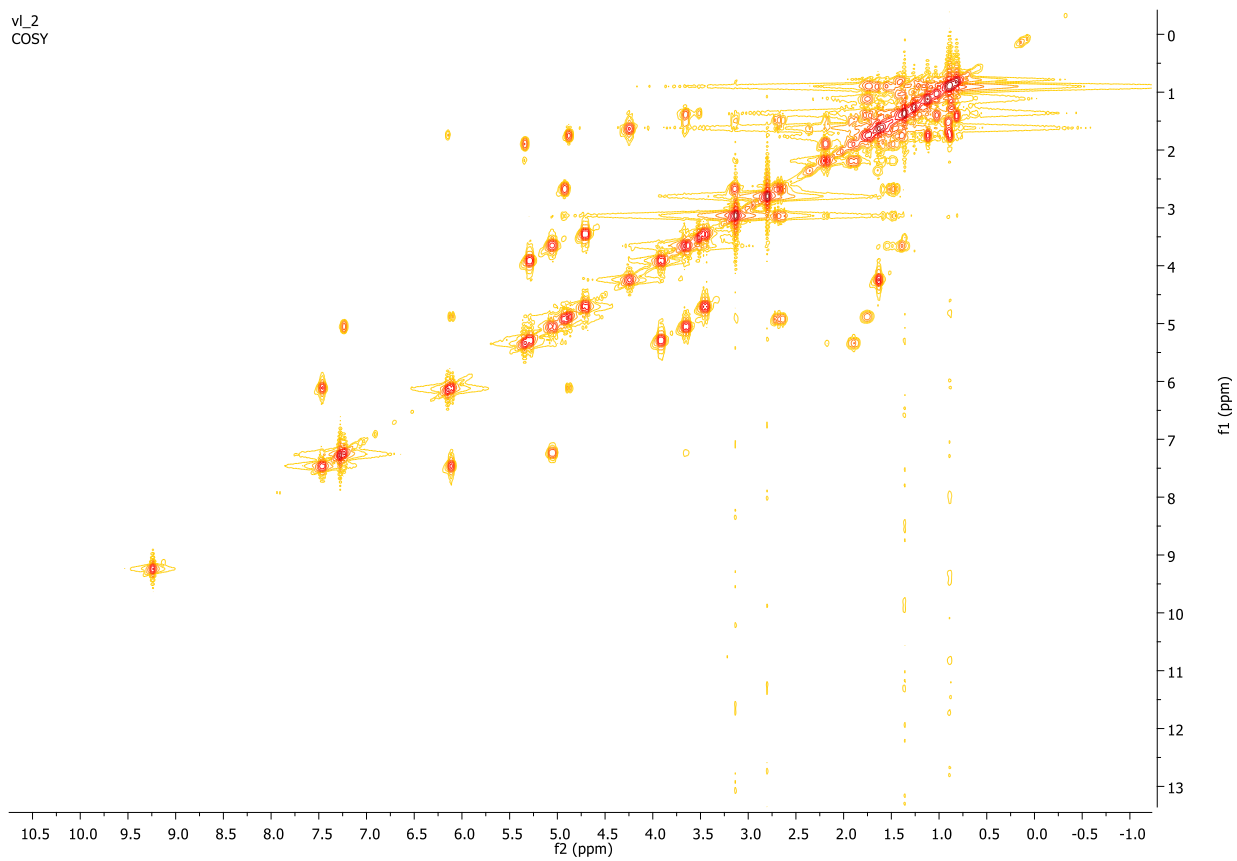
APÊNDICE SS - Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto **34**



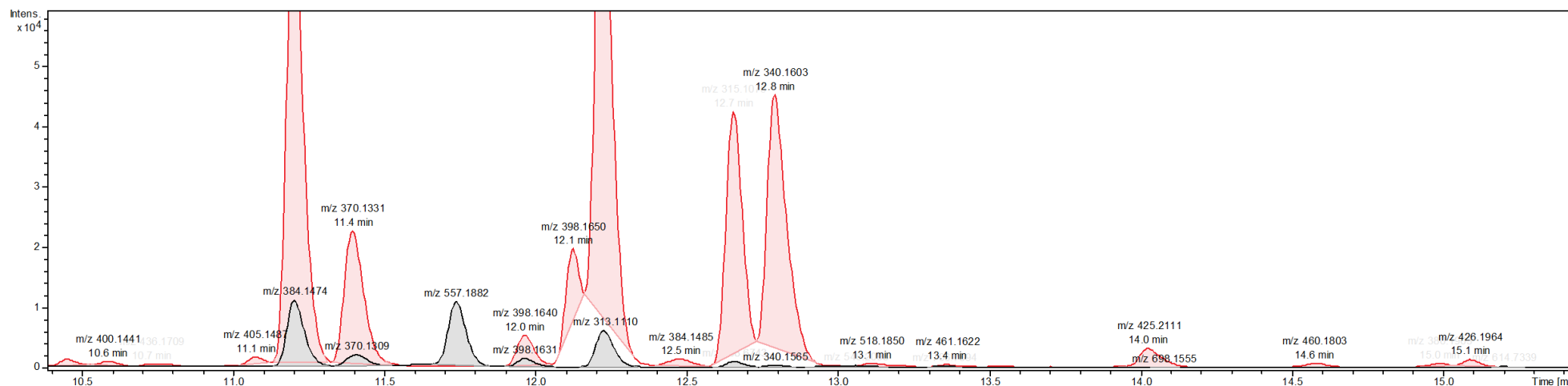
APÊNDICE TT - Espectro de gHMBC (500 MHz, CDCl_3) do composto **34**



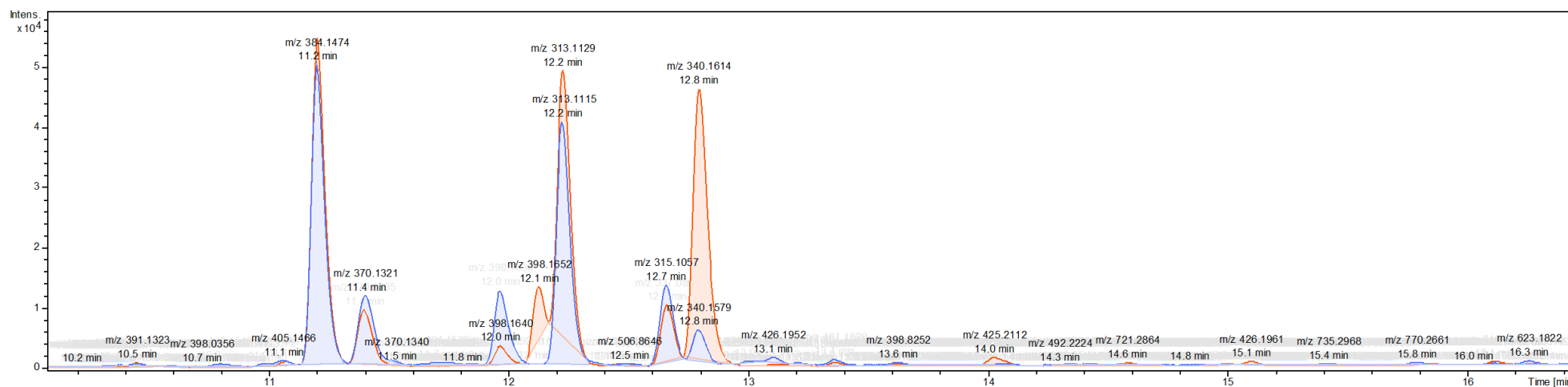
APÊNDICE UU - Espectro de gHSQC (500 MHz, CDCl_3) do composto **34**



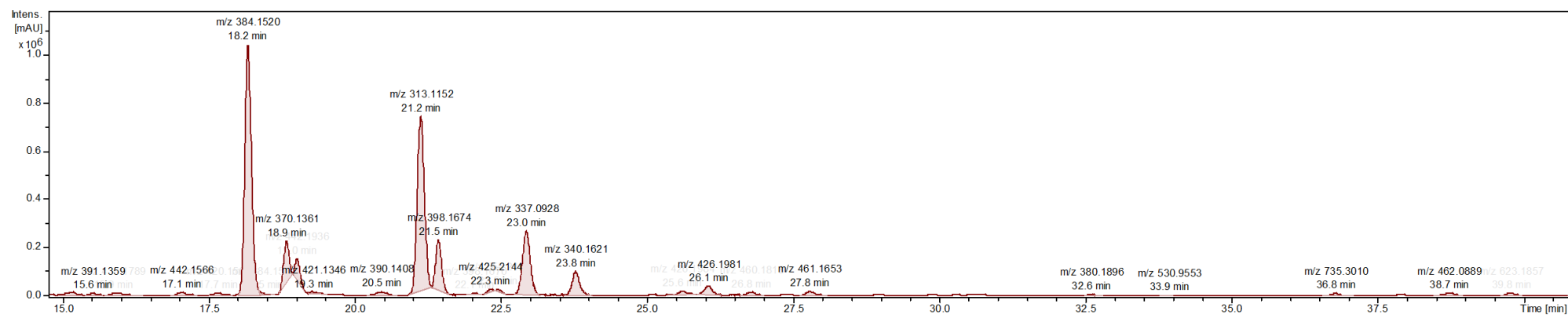
APÊNDICE VV - Espectro de gCOSY (500 MHz, CDCl_3) do composto **34**



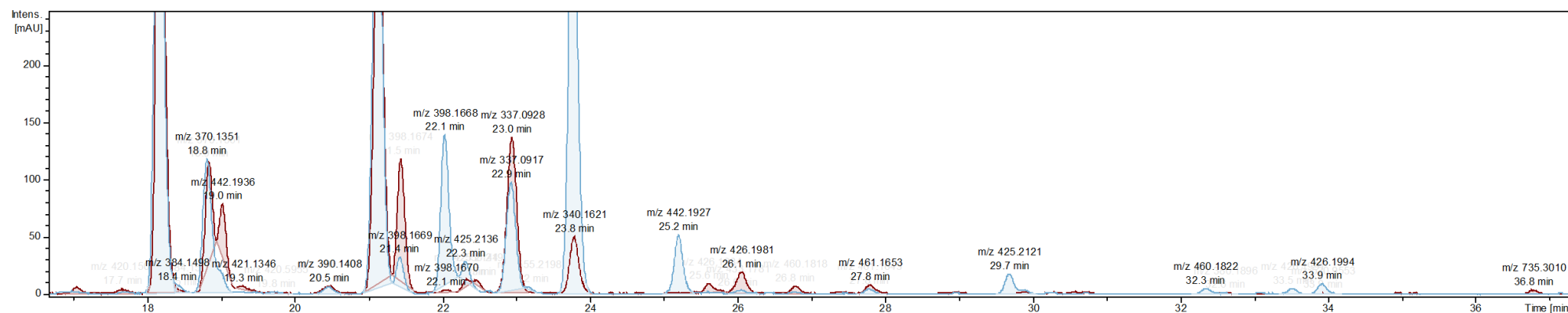
APÊNDICE WW - LC-MS dos derivados de *L*-FDLA (em preto) e *L*-, *D*-FDLA (em vermelho) da *N*-Me-alanina (*m/z* 398) para o composto **33**.



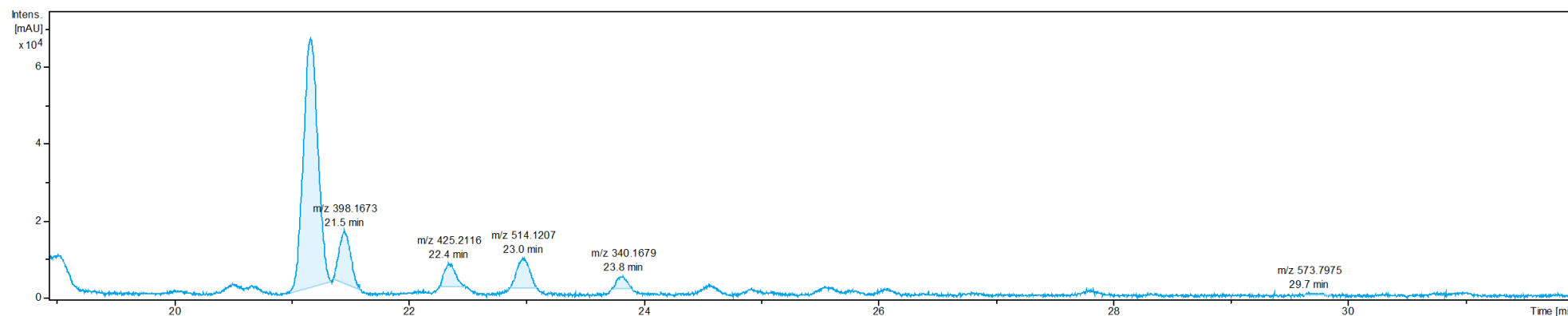
APÊNDICE XX - LC-MS dos derivados de *L*-FDLA (em laranja) e *L*-, *D*-FDLA (em azul) da *N*-Me-alanina (*m/z* 398) para o composto **34**.



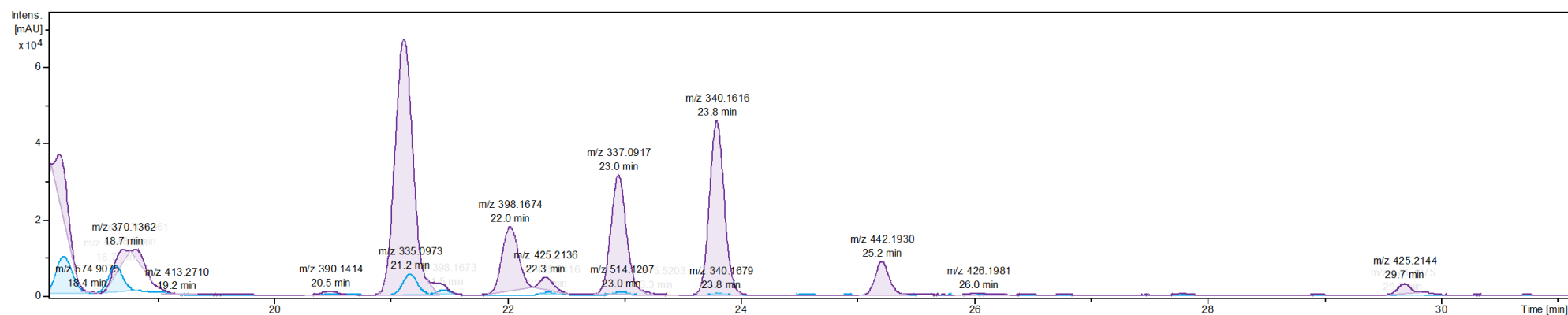
APÊNDICE YY - LC-MS dos derivados de L-FDLA do ácido piperázico (m/z 425) para o composto **33**.



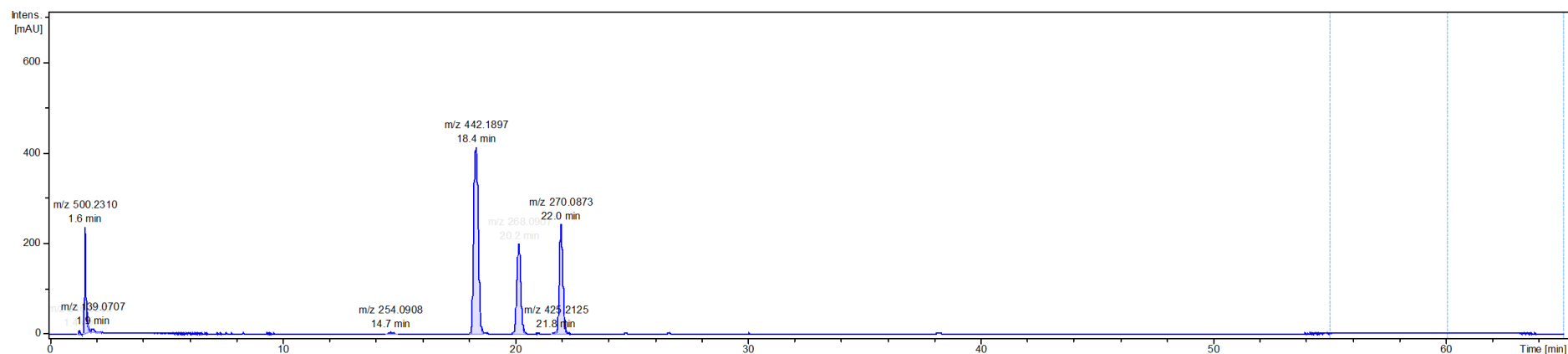
APÊNDICE ZZ - LC-MS dos derivados de L-FDLA (em vermelho) e L-, D-FDLA (em azul) do ácido piperázico (m/z 425) para o composto **33**.



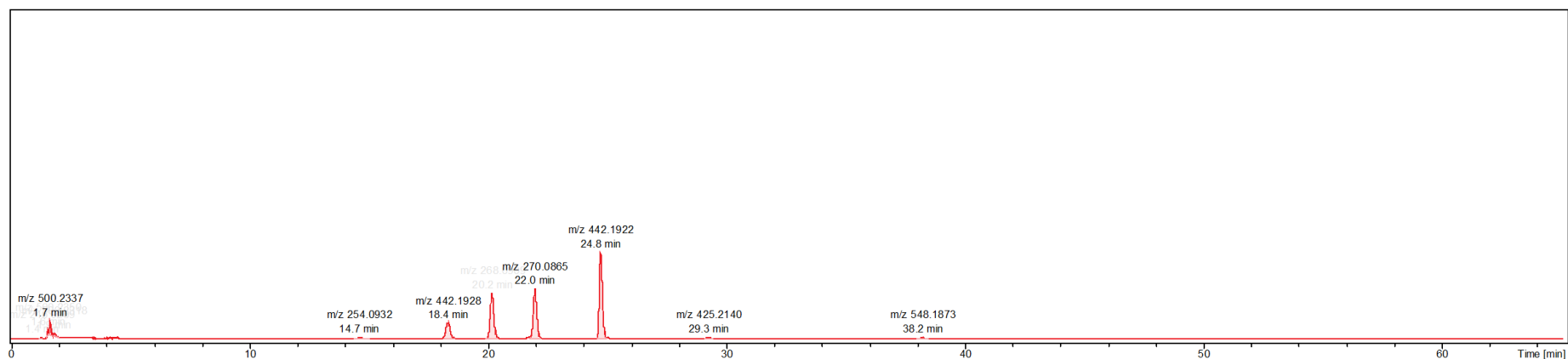
APÊNDICE AAA - LC-MS dos derivados de *L*-FDLA do ácido piperázico (m/z 425) para o composto **34**.



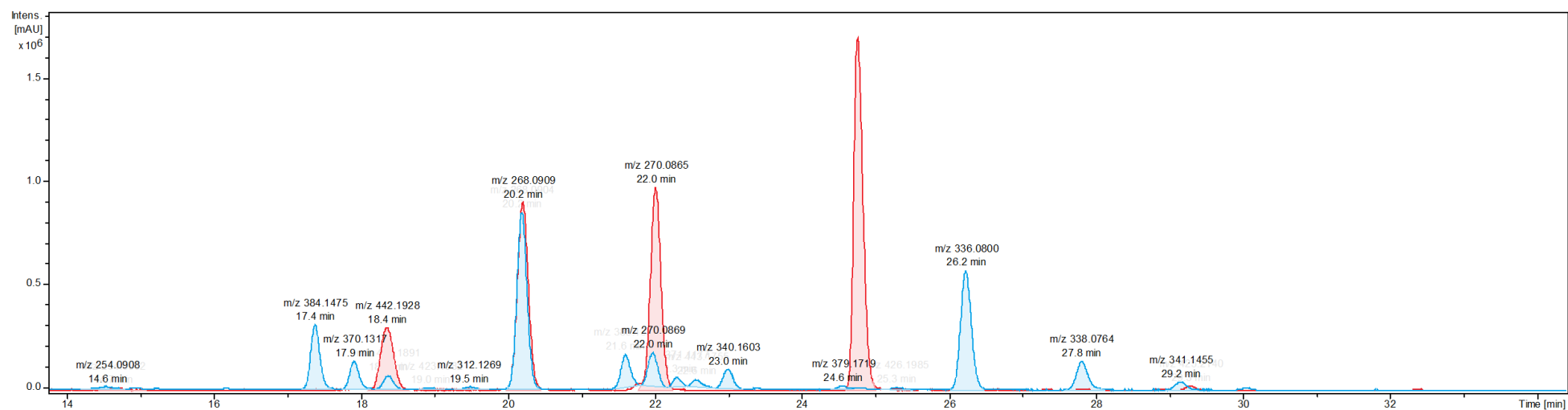
APÊNDICE BBB - LC-MS dos derivados de *L*-FDLA (em azul) e *L*-, *D*-FDLA (em roxo) do ácido piperázico (m/z 425) para o composto **34**.



APÊNDICE CCC - LC-MS dos derivados de *L*-FDLA do padrão de β -hidroxi-leucina (m/z 442).



APÊNDICE DDD - LC-MS dos derivados de *L*-, *D*-FDLA do padrão de β -hidroxi-leucina (m/z 442).



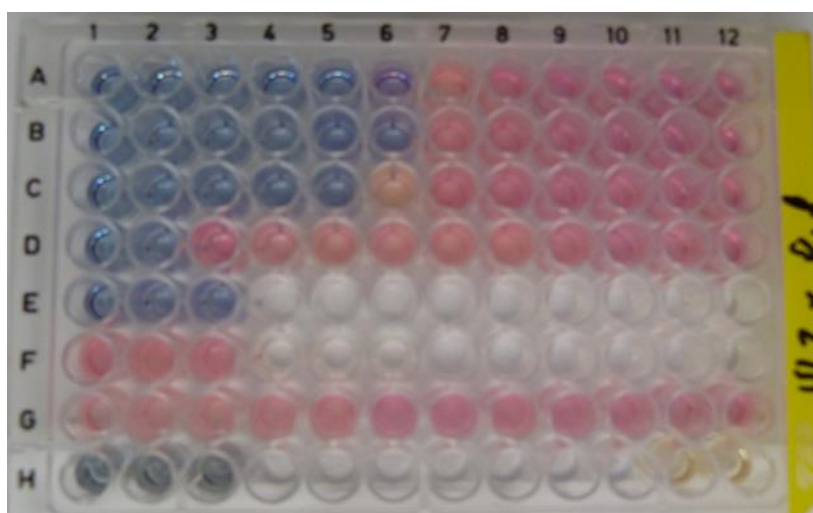
APÊNDICE EEE - LC-MS dos derivados de *L*-FDLA de β -hidroxi-leucina (m/z 442) para o composto **33** (em azul) em comparação com os derivados *L*-, *D*-FDLA do padrão de β -hidroxi-leucina (m/z 442) (em vermelho).

Para interpretação do CIM:

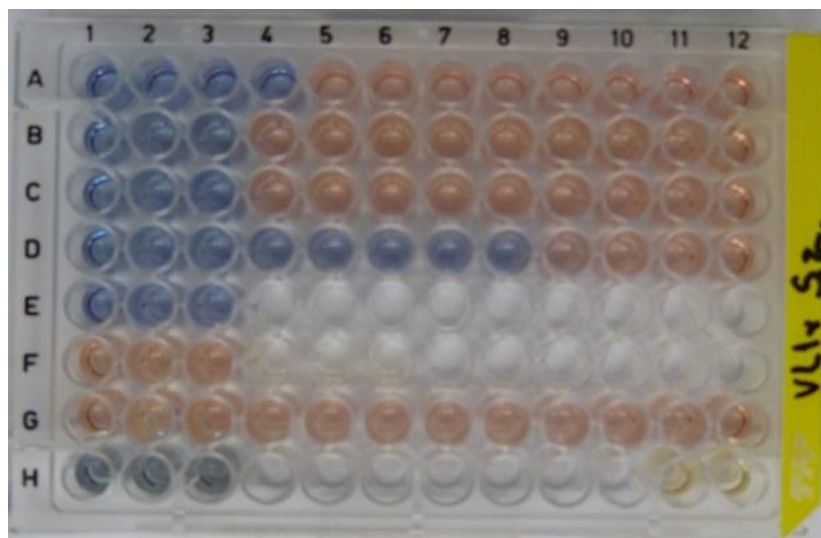
Linha A	Composto
Linha B	Composto
Linha C	Composto
Linha D	Controle positivo
Linha E	Controle do meio
Linha F	Viabilidade do micro-organismo
Linha G	Controle negativo - DMSO
Linha H	Pureza triplicata



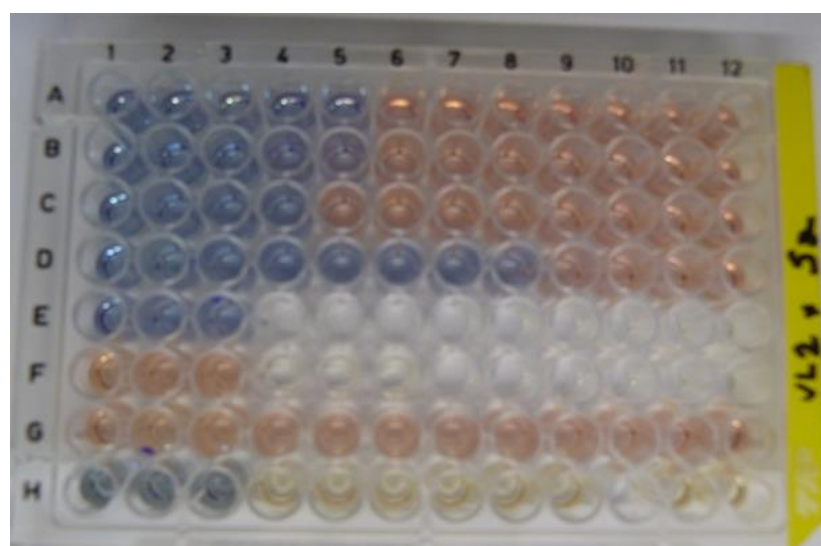
APÊNDICE FFF - Concentração inibitória mínima do composto **33** frente a *P. larvae*



APÊNDICE GGG - Concentração inibitória mínima do composto **34** frente a *P. larvae*



APÊNDICE HHH - Concentração inibitória mínima do composto **33** frente a *S. aureus*



APÊNDICE III - Concentração inibitória mínima do composto **34** frente a *S. aureus*

