



**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**FRANCISCA DIANA DA SILVA ARAÚJO**

**ASPECTOS DA ECOLOGIA QUÍMICA DE *Enterobacter sakazakii*  
(*Cronobacter* spp.), *Epicoccum nigrum* E *Tetragonisca angustula***

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS.**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
POR FRANCISCA DIANA DA SILVA ARAÚJO, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ANITA JOCELYNE  
MARSAIOLI.**

\_\_\_\_\_  
**Assinatura da Orientadora**

**CAMPINAS, 2012**

## II

### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 - BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Ar15a Araújo, Francisca Diana da Silva (1984-).  
Aspectos da ecologia química de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), *Epicoccum nigrum* e *Tetragonisca angustula* / Francisca Diana da Silva Araújo. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Ecologia química. 2. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.). 3. *Bacillus cereus*. 4. *Epicoccum nigrum*. 5. *Tetragonisca angustula*. I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Aspects of the chemical ecology of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), *Epicoccum nigrum* and *Tetragonisca angustula*

#### **Palavras-chave em inglês:**

Chemical ecology

*Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.)

*Bacillus cereus*

*Epicoccum nigrum*

*Tetragonisca angustula*

**Área de concentração:** Química Orgânica

**Titulação:** Doutora em Ciências

#### **Banca examinadora:**

Anita Jocelyne Marsaioli [Orientadora]

Antônia Maria das Graças Lopes Citó

Andrés González Ritzel

Paulo Mitsuo Imamura

Paulo José Samenho Moran

**Data de defesa:** 14/06/2012

**Programa de pós-graduação:** Química



*“Mas o justo pela sua fé viverá”*

(Habacuque 2:4)



## AGRADECIMENTOS

Ao meu Pai, a Jesus Cristo e ao meu amigo Espírito Santo. *“Porque a tua benignidade é melhor do que a vida”* (Salmos 63:3).

Aos mais preciosos presentes de Deus em minha vida: meus pais, Antonio e Otacília, pelo amor e cuidados dedicados a mim, e por serem meus maiores incentivadores; minhas irmãs, Divanir e Patrícia; e meus sobrinhos, Ritinha, Maria Luiza e Davi. Amo vocês!

À Profa. Dra. Anita J. Marsaioli, pela orientação, compreensão e exemplos de dedicação e ética na ciência;

Aos meus colaboradores, Prof. Dr. Welington L. Araújo, Prof. Dr. Arnaldo Kuaye, Profa. Dra. Vera Lúcia Imperatriz-Fonseca, Profa. Dra. Luciana Maria Ramires Esper, Dra. Léia Cecília L. Fávaro, e ao doutorando Charles F. Santos, pela amizade e importante contribuição na obtenção dos resultados desta tese.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado e Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, pelos recursos disponibilizados.

Aos Prof. Dr. Antônia Maria das Graças Lopes Citó (DQ-UFPI), Andrés González (Universidad de La República Uruguay), Paulo Mitsuo Imamura (IQ-UNICAMP) e Paulo José Samenho Moran (IQ-UNICAMP) por aceitarem o convite de participação na minha banca de defesa de Doutorado, bem como os suplentes Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva (DQ-UFSCar), Roberto Rittner Neto (IQ-UNICAMP) e José Augusto Rosário Rodrigues (IQ-UNICAMP).

Aos Prof. Dr. Paulo Miranda e Paulo Imamura pelas contribuições no meu exame de qualificação de área, ao Prof. Dr. Sebastião e Profa. Dra. Raquel, no exame de qualificação geral, e ao Prof. Dr. Roberto Rittner que participou de ambos os exames.

## VIII

Às grandes amigas Adriana, Elidiane e Fabiana, pelo amor, pelas aventuras compartilhadas e por me auxiliarem e incentivarem em tantos momentos. Amo vocês minhas irmãs queridas!

À Dona Maria, técnica do laboratório, pelo auxílio na destilação de solventes e tantas outras coisas, mas principalmente pela amizade.

À galera do Piauí por cada gesto de auxílio ou palavra de conforto, em especial Socorro, Livia e Flamys, com quem tive a oportunidade de dividir moradia, e principalmente Eva e Lília por me receberem em sua casa no início do meu doutorado, que o Senhor as recompense!

Aos colegas do grupo de pesquisa: Daniele, Haleem, Raphael, Lucas (muito obrigada pelos espectros de RMN!), Cíntia, Tiago, Giédre, Lair, Bruna, Dávila, Célio, Carol, Simone, Carla, Cabeça, Armando, Georgiana, Francine, Marcelo e Felipe.

Aos funcionários: Simone (secretária); Anderson, Paula e Sônia (RMN); Bel e Gabriela (CPG); Everaldo (impressão de painéis); Pimpim (setor de gases); Flávia (ESI-MS); Daniel ( $\alpha_D$ ) e Cláudia (UV), pelo auxílio prestado.

À minha amada família IBVN, em especial meus Pastores Paulo e Valéria Petrizi, e Marcos e Daene David, preciosos presentes que Deus me deu em Campinas.

Muito obrigada!

## *Curriculum Vitae*

### 1. Dados pessoais

Nome: Francisca Diana da Silva Araújo; Data de Nascimento: 22/03/1984; Nacionalidade: Brasileira; Cidade: Capitão de Campos, Piauí; Filiação: Antonio José de Araújo e Maria Otacília da Silva Araújo; Estado Civil: Solteira; RG: 2.117.452 - SSP - PI. Endereço: Rua São Luís, Bairro Califórnia. CEP 64270-000, Capitão de Campos, Piauí. E-mail: fdsaraujo@gmail.com.

### 2. Formação Acadêmica

- **2008 - 2012: Doutorado em Química.** Aspectos da ecologia química de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), *Epicoccum nigrum* e *Tetragonisca angustula*. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas - SP. Orientadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli. Bolsista: CNPq.
- **2006 - 2008: Mestrado em Química.** Potencialidades das espécies *Jatropha curcas* L., *Bombacopsis glabra* (Pasq.) A. Robyns e *Dipteryx lacunifera* Ducke para produção de biodiesel. Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina - PI. Orientadora: Mariana Helena Chaves. Bolsista: CNPq.
- **2005 - 2005: Graduação em Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas.** Universidade Federal do Piauí (UFPI).
- **2001 - 2005: Graduação em Licenciatura Plena em Química.** Universidade Federal do Piauí (UFPI). Bolsista da Iniciação Científica: CNPq.

### 3. Experiência profissional

- **2005-2006:** Brasil Ecodiesel Comércio e Indústria de Óleos Vegetais LTDA. Enquadramento Funcional: Analista Químico, Carga horária: 40 h semanais.



#### 4. Artigos publicados em periódicos

- Araújo, F. D. S.; Esper, L. M. R.; Kuaye, A. Y.; Sircili, M. P.; Marsaioli, A. J. *N*-Acyl-homoserine lactones from *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and their degradation by *Bacillus cereus* enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 585-592, **2012**.
- Chaves, M. H.; Araújo, F. D. S.; Moura, C. V. R.; Tozetto, L. J.; Aued-Pimentel, S.; Caruso, M. S. F. Chemical characterization and stability of the *Bombacopsis glabra* nut oil. *Food and Public Health*, 2, 104-109, **2012**.
- Araújo, F. D. S.; Moura, C. V. R.; Chaves, M. H. Biodiesel metílico de *Dipteryx lacunifera*: preparação, caracterização e efeito de antioxidantes na estabilidade à oxidação. *Química Nova*, 33, 1671-1676, **2010**.
- Souza, C. M. L.; Moita Neto, J. M.; Silva, E. G.; Araújo, F. D. S. Composição do coco babaçu triturado integralmente. *Revista Química no Brasil*, 1, 21-24, **2007**.

#### 5. Artigos aceitos para publicação em periódicos

- Araújo, F. D. S.; Fávaro, L. C. L.; Araújo, W. L.; Oliveira, F. L.; Aparicio, R.; Marsaioli, A. J. Epicolactone - natural product isolated from the sugarcane endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. *European Journal of Organic Chemistry*, xx, xx-xx, 2012 (artigo escolhido como capa da referente revista).

#### 6. Participações em congressos

Totalizaram-se 16 participações em congressos e seminários nacionais e 3 congressos internacionais, incluindo pôsteres e apresentações orais.

**RESUMO****ASPECTOS DA ECOLOGIA QUÍMICA DE *Enterobacter sakazakii*  
(*Cronobacter* spp.), *Epicoccum nigrum* E *Tetragonisca angustula***

Autora: Francisca Diana da Silva Araújo

Orientadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

Aspectos distintos da ecologia química de bactéria, fungo e abelha foram investigados e abordados em três capítulos. O primeiro capítulo descreve o estudo das moléculas sinalizadoras envolvidas no processo de *quorum-sensing* da bactéria *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), que resultou na identificação de três acil-homosserina lactonas (acil-HSLs): (S)-(-)-*N*-heptanoil-HSL, (S)-(-)-*N*-dodecanoil-HSL e (S)-(-)-*N*-tetradecanoil-HSL. Estes semioquímicos foram degradados por enzimas de *Bacillus cereus*. No segundo capítulo o estudo do fungo *Epicoccum nigrum* possibilitou o isolamento de meleína, 4,5-dimetil-resorcinol, flavipina e de um novo metabólito, denominado epicolactona. O monitoramento destas substâncias em três mutantes de *E. nigrum* apontou para a produção de 5-hidroxi-meleína, ausente no fungo selvagem, indicando que a rota biossintética de policetídeos em *E. nigrum* foi alterada, ativando a ação de uma mono-oxigenase responsável pela oxidação da meleína. No terceiro capítulo, foram investigados feromônios produzidos por diferentes castas da abelha social *Tetragonisca angustula*. Bioensaios com as rainhas indicaram que lipídios cuticulares são possíveis responsáveis pela indução da cópula nos machos. Operárias fundadoras e guardas foram diferenciadas quimicamente por compostos presentes em seus extratos cefálicos e abdominais. Extratos cefálicos de machos em diferentes ciclos de vida mostraram-se semelhantes.



## ABSTRACT

**ASPECTS OF THE CHEMICAL ECOLOGY OF *Enterobacter sakazakii*  
(*Cronobacter* spp.), *Epicoccum nigrum* AND *Tetragonisca angustula***

Author: Francisca Diana da Silva Araújo

Advisor: Prof. Dr. Anita Jocelyne Marsaioli

Different aspects of bacteria, fungus and bee chemical ecology were investigated and discussed in three chapters. First chapter describes the study of signaling molecules involved in the *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) quorum sensing process that resulted in the identification of three acyl-homoserine lactones (acyl-HSLs): (*S*)-(-)-*N*-heptanoyl-HSL, (*S*)-(-)-*N*-dodecanoyl-HSL and (*S*)-(-)-*N*-tetradecanoyl-HSL. These semiochemicals were modified by *Bacillus cereus* enzymes. Second chapter describes the study of *Epicoccum nigrum* (fungus) revealing the isolation of mellein, 4,5-dimethylresorcinol, flavipin and of a novel metabolite, named epicolactone. Monitoring these compounds in three *E. nigrum* mutants pointed to the production of 5-hydroxymellein, absent in wild fungus strain, indicating that biosynthetic route of polyketides in *E. nigrum* has been modified, activating a monooxygenase responsible for mellein oxidation. Third chapter describes pheromones produced by different castes of *Tetragonisca angustula* social bee. Bioassays with queens indicated that cuticular lipids might be responsible for copulation induction in males. Cephalic and abdominal extracts of founded and guard workers were chemically different, while cephalic extracts of males at different life cycles were similar.



## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	XIX
LISTA DE TABELAS .....	XXI
LISTA DE QUADROS .....	XXII
LISTA DE FIGURAS .....	XXIII
INTRODUÇÃO GERAL .....	3
CAPÍTULO 1. <i>N</i> -acil-homoserina lactonas de <i>Enterobacter sakazakii</i> ( <i>Cronobacter</i> spp.) e co-cultivo de <i>Enterobacter sakazakii</i> e <i>Bacillus cereus</i> .....	9
1.1. Introdução .....	9
1.1.1. <i>Quorum-sensing</i> em bactérias Gram-negativas.....	12
1.1.2. <i>Enterobacter sakazakii</i> ( <i>Cronobacter</i> spp.) .....	16
1.1.3. <i>Bacillus cereus</i> .....	19
1.1.4. Interferência no mecanismo de <i>quorum-sensing</i> via acil-HSLs .....	20
1.2. Objetivos.....	27
1.2.1. Gerais.....	27
1.2.2. Específicos.....	27
1.3. Resultados e Discussão.....	28
1.3.1. Detecção de acil-HSL em <i>E. sakazakii</i> .....	28
1.3.2. Purificação e caracterização estrutural de acil-HSL .....	30
1.3.3. Configuração absoluta das acil-HSLs .....	38
1.3.4. Detecção de acil-HSL em co-cultivo de <i>E. sakazakii</i> e <i>B. cereus</i> ATCC 14579. ....	39
1.3.5. Mecanismo de degradação de acil-HSL por enzimas de <i>B. cereus</i> .....	42
1.4. Conclusões parciais .....	48

CAPÍTULO 2. Metabólitos secundários de <i>Epicoccum nigrum</i> e monitoramento de suas produções em cepas mutantes .....	51
2.1. Introdução .....	51
2.1.1. Fungos endofíticos.....	52
2.1.2. <i>Epicoccum nigrum</i> .....	58
2.2. Objetivos.....	67
2.2.1. Gerais.....	67
2.2.2. Específicos.....	67
2.3. Resultados e Discussão.....	68
2.3.1. Elucidação estrutural das substâncias isoladas.....	70
2.3.2. Monitoramento da produção dos compostos isolados em <i>E. nigrum</i> selvagem nas cepas mutantes .....	83
2.4. Conclusões parciais .....	88
CAPÍTULO 3. Feromônios produzidos por indivíduos da espécie <i>Tetragonisca angustula</i> .....	91
3.1. Introdução .....	91
3.1.1. Abelhas sem ferrão .....	93
3.1.2. Comunicação química em abelhas sociais .....	99
3.1.3. <i>Tetragonisca angustula</i> .....	103
3.2. Objetivos.....	106
3.2.1. Gerais.....	106
3.2.2. Específicos.....	106
3.3. Resultados e Discussão.....	107
3.3.1. Investigação do feromônio sexual de <i>T. angustula</i> .....	107
3.3.2. Análises das glândulas de Dufour e tergaís de rainhas virgens atrativas e fisogástricas de <i>T. angustula</i> .....	120

## XVII

3.3.3. Diferenciação química entre castas de operárias <i>T. angustula</i> .....	126
3.3.4. Diferenciação química entre os extratos cefálicos de machos de <i>T. angustula</i> em diferentes ciclos de vida.....	132
3.4. Conclusões parciais .....	135
CONCLUSÕES FINAIS.....	139
PARTE EXPERIMENTAL.....	143
Solventes, reagentes e demais materiais .....	143
Equipamentos .....	144
Material biológico e meios de cultivos .....	149
Bioensaios com <i>A. tumefaciens</i> NTL4(pZLR4) utilizando as cepas de <i>E. sakazakii</i> , <i>B. cereus</i> ATCC 14597 e co-cultivo de <i>E. sakazaki</i> e <i>B. cereus</i> ATCC 14597 .....	150
Preparação dos extratos de <i>E. sakazakii</i> , <i>B. cereus</i> ATCC 14597 e co-cultivo de <i>E. sakazakii</i> e <i>B. cereus</i> ATCC 14597.....	151
Purificação das acil-homosserina lactonas dos extratos de <i>E. sakazakii</i> e cultivo misto de <i>E. sakazakii</i> e <i>B. cereus</i> ATCC 14597 .....	152
Sínteses de acil-homosserinas lactonas .....	153
Co-injeção dos produtos sintéticos com os produtos naturais .....	155
Determinação das configurações absolutas das acil-HSLs naturais .....	156
Biotransformação de ( <i>S</i> )- <i>N</i> -dodecanoil-HSL por <i>B. cereus</i> .....	156
Obtenção dos extratos de <i>E. nigrum</i> selvagem e cepas modificadas geneticamente.....	157
Concentração inibitória mínima dos extratos de <i>E. nigrum</i> selvagem e mutantes.....	158
Fracionamento bioguiado do extrato acetato de etila de <i>E. nigrum</i> selvagem....	159



## XVIII

Avaliação da atividade antimicrobiana das frações dos extratos de <i>E. nigrum</i> selvagem por bioautografia .....	159
Purificação da fração 3 .....	160
Purificação da fração 5 .....	160
Purificação da fração 6 .....	161
Monitoramento da produção dos compostos isolados em <i>E. nigrum</i> selvagem nos mutantes P16-47set, P16-17 e P16-91 .....	163
Isolamento do intermediário presente nos extratos dos mutantes .....	164
Testes de campo para investigação do feromônio sexual das rainhas .....	165
Headspace dinâmico das rainhas de <i>T. angustula</i> .....	165
Obtenção de extratos cuticulares de machos, rainhas virgens e fisogástricas de <i>T. angustula</i> .....	166
Obtenção dos cefálicos e abdominais das rainhas, machos e operárias de <i>T. angustula</i> .....	166
Obtenção dos extratos glandulares das rainhas virgens e fisogástricas .....	166
Síntese de hexanoato de isopropila e hexanoato de hexila .....	167
Quantificação do hexanoato de isopropila e hexanoato de hexila nos voláteis das rainhas .....	169
Índices de retenção .....	169
Derivatização com DMDS/I <sub>2</sub> .....	170
Fracionamento dos hidrocarbonetos de extratos cuticulares da rainha de <i>T. angustula</i> .....	170
Metilação de amostras contendo ácidos carboxílicos .....	171
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	175
ANEXOS .....	201

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\delta$	Deslocamento químico
Acil-HSL	Acil-homosserina lactona
ACP	<i>Acyl carrier protein</i> (proteína carreadora de acila)
AcOEt	Acetato de etila
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção de Culturas Tipo Americana)
BOD	<i>Biochemical oxygen demand</i> (demanda bioquímica de oxigênio)
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
$\text{CDCl}_3$	Clorofórmio deuterado
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CG-DIC	Cromatografia Gasosa acoplada a detector por ionização em chama
CoA	Coenzima-A
CDP	<i>Composite Pulse Decoupling</i> (desacoplamento de pulso composto)
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i> (correlação homonuclear de $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ a múltiplas ligações)
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> (incremento sem distorção por transferência de polarização)
DMDS	Dissulfeto de metila

eV	Elétron volt
FabI	Enoil-ACP redutase
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i> (correlação heteronuclear de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ a múltiplas ligações)
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i> (correlação heteronuclear de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ a uma ligação)
Hz	Hertz
IR	Índice de retenção
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LB	Luria-Bertani
m	Multiplete
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MHz	Mega Hetz
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NOE	Efeito <i>Overhauser</i> nuclear
ppm	Partes por milhão
quint.	Quinteto
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Simpleto
SAM	S-adenosilmetionina
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
TSB	Tripticase soy broth
UV-vis	Ultravioleta visível
X-gal	$\beta$ -D-galactopiranosídeo de 5-bromo-4-cloro-3-indolil

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Soluções utilizadas para calibrar a resposta de análises por ESI-MS e MS <sup>2</sup> (μmol/L).....	42
<b>Tabela 2.</b> Concentração mínima inibitória (ppm) dos extratos de <i>E. nigrum</i> selvagem e mutantes.....	69
<b>Tabela 3.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C para a meleína (7) em CDCl <sub>3</sub> . ....	71
<b>Tabela 4.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C para 4,5-dimetil-resorcinol (8) em acetona-d <sub>6</sub> . ....	75
<b>Tabela 5.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C e gHMBC da flavipina (9) em acetona-d <sub>6</sub> . ..	77
<b>Tabela 6.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C e correlação heteronuclear <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C a ligações múltiplas (gHMBC) para a epicolactona (10) em DMSO-d <sub>6</sub> .....	82
<b>Tabela 7.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C para a 5-hidroxi-meleína (11) em acetona-d <sub>6</sub> .....	86
<b>Tabela 8.</b> Composição química dos extratos cefálicos, abdominais e cuticulares de rainhas de <i>T. angustula</i> .....	110
<b>Tabela 9.</b> Composição química dos extratos glandulares de rainhas de <i>T. angustula</i> . ....	123
<b>Tabela 10.</b> Composição química dos extratos cefálicos e abdominais de operárias fundadoras e guardas de <i>T. angustula</i> . ....	127
<b>Tabela 11.</b> Composição química dos extratos cefálicos de machos de <i>T. angustula</i> em diferentes ciclos de vida, e extratos cuticulares e abdominais de machos maduros. ....	133
<b>Tabela 12.</b> Programações de temperatura utilizadas nas análises das <i>N</i> -acil-HSL por CG-DIC.....	146

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Exemplos de moléculas sinalizadoras de <i>quorum-sensing</i> .....	10
<b>Quadro 2.</b> Metabólitos secundários produzidos por <i>Epicoccum</i> spp.....	61

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura genérica de acil-homosserina lactonas.....	12
<b>Figura 2.</b> Regulação da bioluminescência em <i>V. fischeri</i> , mediado por <i>N</i> -(3-oxo-hexanoil)-HSL (3-oxo-C6-HSL). Em baixa densidade celular, a transcrição de genes é fraca e insuficiente para emissão de luz, devido à baixa concentração de 3-oxo-C6-HSL. Em alta densidade celular, a concentração crítica de 3-oxo-C6-HSL é atingida e ocorre a ligação com LuxR estimulando a transcrição de genes que regulam a emissão de luz (Whitehead et al., 2001). .....	14
<b>Figura 3.</b> Aspecto de recém-nascido com meningite por <i>E. sakazakii</i> (Barreira et al., 2003).....	17
<b>Figura 4.</b> Rota biossintética de acil-HSL. Abreviações: ACP, proteína carreadora de acila; acil-HSL, acil-homosserina lactona; CoA, coenzima A; FabI, enoil-ACP redutase. Símbolos: n = 3-12; R = H, OH ou O (Zhang, 2003).....	21
<b>Figura 5.</b> Rotas de degradação enzimática de acil-HSL (Dong e Zhang, 2005). ...	22
<b>Figura 6.</b> Rota de degradação hipotética de C4-HSL. Os asteriscos indicam a posição do carbono marcado com C14 (baseado em Leadbetter e Greenberg, 2000). .....	25
<b>Figura 7.</b> Reação de degradação do reagente X-Gal e formação do derivado de índigo de coloração azul por ação da enzima $\beta$ -galactosidase (Berg et al., 2002). .	29
<b>Figura 8.</b> Bioensaio com <i>A. tumefaciens</i> NTL4(pZLR4). A. Suspensão de células de <i>E. sakazakii</i> ; B. Controle negativo. Ensaios realizados em duplicata.....	29
<b>Figura 9.</b> Bioensaio com <i>A. tumefaciens</i> NTL4(pZLR4). A. ( <i>S</i> )-dodecanoil-HSL (controle positivo). B. Controle negativo. C. Extrato acetato de etila de <i>E. sakazakii</i> . Ensaios realizados em duplicata.....	30
<b>Figura 10.</b> Estrutura da violaceína. ....	31

<b>Figura 11.</b> Fragmentos característicos de acil-HSLs por espectrometria de massas (IE, 70 eV).....	32
<b>Figura 12.</b> A. Cromatograma de íons totais (IE, 70 eV) da fração F59 (0,5 mg) do extrato acetato de etila de <i>E. sakazakii</i> . B. Espectro de massas de <i>N</i> -heptanoil-HSL (1). .....	32
<b>Figura 13.</b> A. Cromatograma de íons totais (GC-EM, IE, 70 eV) da fração F63 (3,0 mg) do extrato acetato de etila de <i>E. sakazakii</i> . B. Espectro de massas de <i>N</i> -dodecanoil-HSL (2).....	33
<b>Figura 14.</b> A. Cromatograma de íons totais (GC-EM, IE, 70 eV) da fração F55 (0,5 mg) do extrato acetato de etila de <i>E. sakazakii</i> . B. Espectro de massas de <i>N</i> -tetradecanoil-HSL (3).....	34
<b>Figura 15.</b> Cromatograma de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV). A. Fração F59 do extrato acetato de etila de <i>E. sakazakii</i> . B. ( $\pm$ )- <i>N</i> -heptanoil-HSL. C. Co-injeção da fração F59 com produto sintético.....	35
<b>Figura 16.</b> Cromatograma de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV). A. Fração F63 do extrato acetato de etila de <i>E. sakazakii</i> . B. ( $\pm$ )- <i>N</i> -dodecanoil-HSL; C. Co-injeção da fração F63 com produto sintético.....	36
<b>Figura 17.</b> Cromatograma de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV). A. Fração F55 do extrato acetato de etila de <i>E. sakazakii</i> . B. ( $\pm$ )- <i>N</i> -tetradecanoil-HSL; C. Co-eluição da fração F55 com produto sintético.....	37
<b>Figura 18.</b> Configuração absoluta de ( <i>S</i> )- <i>N</i> -heptanoil-HSL (I), ( <i>S</i> )- <i>N</i> -dodecanoil-HSL (II) e ( <i>S</i> )- <i>N</i> -tetradecanoil-HSL (III) por CG-DIC usando coluna quiral. A. <i>N</i> -acil-HSL sintética racêmica; B. ( <i>S</i> )- <i>N</i> -acil-HSL sintética; C. <i>N</i> -acil-HSL natural; D. Co-eluição de <i>N</i> -acil-HSL sintética racêmica e <i>N</i> -acil-HSL natural. ....	39

- Figura 19.** Bioensaio com *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). A. Suspensão de células de *B. cereus* ATCC 14579; B. Suspensão de células do co-cultivo de *E. sakazakii* e *B. cereus* ATCC 14579; C. Controle negativo. Ensaio realizado em duplicata. ...40
- Figura 20.** Bioensaio com *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). A. (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL (controle positivo); B. Controle negativo; C. Extrato acetato de etila do cultivo misto de *E. sakazakii* e *B. cereus*. Ensaio realizado em duplicata. ....40
- Figura 21.** Bioensaio com *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). Da esquerda para a direita: Tubo 1: controle positivo usando (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL; Tubo 2: Controle negativo. Os demais tubos são frações do extrato AcOEt do co-cultivo de *E. sakazakii* e *B. cereus*, eluídas em AcOEt puro. Ensaio realizado em duplicata. ...41
- Figura 22.** Cromatograma de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV) da fração M42 (3,7 mg) do extrato acetato de etila do co-cultivo de *E. sakazakii* e *B. cereus*, com expansão do pico da (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL.....42
- Figura 23.** Monitoramento da biorreação por ESI-MS. A. Origem esquemática de 4, 5 e 6. B. Espectro e compostos 4, 5 e 6 indicados com setas. ....44
- Figura 24.** A) Espectro do experimento controle usando extrato de acetato de etila do tampão fosfato e células úmidas. B) Espectro do experimento controle usando tampão fosfato e substrato ((*S*)-*N*-dodecanoil-HSL). ....45
- Figura 25.** (a) MS<sup>2</sup> do fragmento de *m/z* 300,2183; (b) MS<sup>2</sup> do fragmento de *m/z* 199,1702 e (c) MS<sup>2</sup> do fragmento de *m/z* 118,0507. ....46
- Figura 26.** Metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos. ....57
- Figura 27.** *Epicoccum nigrum* Link. Fonte: <http://www.mycology.adelaide.edu.au>. ....58
- Figura 28.** Reação de redução de MTT (amarelo) em formazana (azul) pelas células microbianas. ....69
- Figura 29.** (a) Estrutura da meleína (7). ....70



<b>Figura 30.</b> Biossíntese da meleína.....	72
<b>Figura 31.</b> Estrutura de 4,5-dimetil-resorcinol (8).....	72
<b>Figura 32.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (NOESY 1D) (499,88 MHz, $\text{CDCl}_3$ , TMS) de 4,5-dimetil-resorcinol (8), obtido por irradiação dos simpletos em (A) $\delta$ 2,00 ( $\text{CH}_3$ ), (B) $\delta$ 2,13 ( $\text{CH}_3$ ) e (C) $\delta$ 7,92 (OH).....	74
<b>Figura 33.</b> Estrutura da flavipina (9).....	75
<b>Figura 34.</b> Biossíntese da flavipina (9). ....	78
<b>Figura 35.</b> Estrutura da epicolactona (10).....	78
<b>Figura 36.</b> Representação ORTEP da epicolactona mostrando elipsóides de deslocamentos desenhados no nível de 50% de probabilidade. Átomos de H são apresentados como esferas pequenas de raio arbitrário. ....	80
<b>Figura 37.</b> Correlações NOESY da epicolactona (10).....	81
<b>Figura 38.</b> Cromatogramas de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV) da fração eluída em benzeno/acetato de etila (6:4) do extrato de <i>E. nigrum</i> selvagem (A), mutantes P16-47set (B), P16-17 (C) e P16-91 (D). ....	84
<b>Figura 39.</b> Estrutura da 5-hidroxi-meleína (11). ....	86
Figura 40. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (NOESY 1D) (400,13 MHz, acetona- $\text{d}_6$ ) de 5-hidroxi-meleína (11), obtido por irradiação dos sinais em (A) $\delta_{\text{H}}$ 2,65, (B) 3,19 e (C) 6,71.....	87
<b>Figura 41.</b> Exemplos de espécies pertencentes às subfamílias (da esquerda para a direita): Euglossinae ( <i>Euglossa cordata</i> ), Bombinae ( <i>Bombus hypnorum</i> ), Apinae ( <i>Apis mellifera</i> ) e Meliponinae ( <i>Tetragonisca angustula</i> ).....	91
<b>Figura 42.</b> Espécie de Bombinae ( <i>Bombus</i> sp.) com pólen na córbicula (em destaque).....	92
<b>Figura 43.</b> Glândulas exócrinas presentes no corpo das abelhas (Billen, 2006).....	99

- Figura 44.** Da esquerda para a direita, entrada do ninho de *Tetragonisca angustula* (van Zweden et al., 2011), rainha fisogástrica e operária. .... 104
- Figura 45.** (1) macho (destaque para a estrutura da genitália); (2) rainha fisogástrica após cópula com o macho (destaque para a estrutura da genitália do macho que permanece na rainha após a cópula); (3) abdome da rainha fisogástrica pós-cópula com a estrutura da genitália do macho; (4) genitália do macho retirada do abdome da rainha. Foto gentilmente cedida pelo Biólogo Charles Santos (colaborador) no Departamento de Biologia, seção de Entomologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP. .... 108
- Figura 46.** Espectro de massas e fragmentações dos derivados DMDS dos isômeros de pentacoseno. .... 116
- Figura 47.** Espectro de massas e fragmentação dos isômeros 9- e 11-metiltricosano. .... 118
- Figura 48.** Espectro de massas e fragmentação do 9,13-dimetil-pentacosano .... 119
- Figura 49.** Da esquerda para a direita: (A) Aparelho reprodutivo de rainhas fisogástricas de *T. angustula*; (B) Detalhe da espermateca e glândula de Dufour. Foto gentilmente cedida pelo Biólogo Charles Santos (colaborador) no Departamento de Biologia, seção de Entomologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP. .... 120
- Figura 50.** Da esquerda para a direita: (A) Aparelho reprodutivo de rainhas virgens de *T. angustula*; (B) Detalhe da espermateca e glândula de Dufour. Foto gentilmente cedida pelo Biólogo Charles Santos (colaborador) no Departamento de Biologia, seção de Entomologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP. .... 121
- Figura 51.** Cromatograma de íons totais (IE, 70 eV) da secreção abdominal das operárias guardas e espectro de massas do acetato de geranil-farnesila (14). .... 129

**Figura 52.** Algumas fragmentações de massas do acetato de geranyl-farnesila (14).  
..... 130

**Figura 53.** Espectro de massas (IE 70 eV) e fragmentações do composto 13. .... 131

# **INTRODUÇÃO GERAL**

---



## INTRODUÇÃO GERAL

A Ecologia Química é um ramo interdisciplinar da ciência, desenvolvida desde a década de 1970, que estuda as interações inter- e intra-específicas entre os organismos vivos mediada por substâncias químicas (Dicke e Sabelis, 1988; Mori, 2000). Apesar de grande parte das pesquisas nesta área serem principalmente em plantas e insetos, a comunicação através de substâncias químicas está presente em todos os reinos da natureza (Sbarbati e Osculati, 2006; Stowers e Marton, 2005).

O termo semioquímico é normalmente o mais utilizado para definir as substâncias químicas envolvidas nas interações dos organismos (Nordlund e Lewis, 1976; Hick et al., 1978). Este termo leva em consideração o critério de organismo produtor, por este motivo, Dicke e Sabelis (1988) propuseram o termo infoquímico no lugar de semioquímicos, priorizando o critério de emissor e levando em consideração o caráter benéfico ou prejudicial das substâncias químicas nestas interações.

Desta forma, Dicke e Sabelis (1988) definiram infoquímicos como substâncias que, no contexto natural, transmitem informações em uma interação entre indivíduos, evocando no receptor uma resposta comportamental ou fisiológica que é adaptativamente favorável a qualquer um dos integrantes, ou a ambos. Subdividem-se em dois grupos principais, feromônios e aleloquímicos.

Feromônios são substâncias químicas que mediam uma interação entre organismos da mesma espécie, onde o benefício é para o organismo emissor (feromônio +/-), para o organismo receptor (feromônio -/+), ou para ambos (feromônio +/+). Podem ser classificados em feromônios de agregação, dispersão, sexuais, trilha, oviposição, alarme, dentre outros (Shorey, 1973). O primeiro semioquímico isolado e caracterizado foi o bombicol, hexadeca-10*E*,12*Z*-dien-1-ol,

feromônio sexual liberado pela fêmea do bicho-da-seda, *Bombyx mori* L., para atrair machos (Butenandt et al., 1961). Desde então, diversos feromônios específicos de espécies foram descobertos, e muitas das descobertas estavam relacionadas com o monitoramento ou supressão de insetos-pragas (Norin, 2007).

Wilson e Bosset (1963) classificaram os feromônios como modificadores (do inglês *primer*) e desencadeadores (do inglês *releaser*). Os feromônios *primers* são substâncias químicas que provocam uma cadeia de mudanças fisiológicas no receptor, sem no entanto causar modificações imediatas de comportamento. Já os feromônios *releaser* produzem uma resposta imediata e reversível no comportamento do receptor.

Aleloquímicos são infoquímicos que mediam interações entre indivíduos pertencentes a espécies diferentes, e estão classificados em quatro categorias (Dicke e Sabelis, 1988):

- Alomônios (+/-): substâncias químicas pertinentes à biologia de um organismo (organismo 1) e que, quando em contato com um indivíduo de uma outra espécie (organismo 2), evocam no receptor uma resposta fisiológica ou comportamental que é adaptativamente favorável ao organismo 1 mas não ao organismo 2, por exemplo, quando insetos-pragas são atraídas por voláteis de plantas;
- Cairomônios (-/+): substâncias químicas pertinentes à biologia de um organismo (organismo 1) que, quando em contato com um indivíduo de outra espécie (organismo 2), evocam no receptor uma resposta fisiológica ou comportamental que é adaptativamente favorável ao organismo 2 mas não ao organismo 1. São exemplos de cairomônios as secreções de defesa liberadas por alguns insetos para impedir o ataque de predadores;
- Sinomônios (+/+): aleloquímicos pertinentes à biologia de um organismo (organismo 1) que, quando em contato com um indivíduo de outra espécie

(organismo 2), evocam no organismo receptor uma resposta fisiológica ou adaptativamente favorável a ambos organismos 1 e 2. Um exemplo típico são os voláteis emitidos pelo milho *Zea mays* que ao ser atacado por lagartas da mariposa *Spodoptera exigua*, atraem fêmeas da vespa *Cortesia marginiventris*, que é um parasitóide natural destas lagartas (Schröder 1998).

Este trabalho encontra-se dividido em três capítulos que abordam diferentes tipos de semioquímicos em organismos distintos. No primeiro capítulo realizou-se o estudo das moléculas sinalizadoras de comunicação célula-célula produzidas pela bactéria Gram-negativa *Enterobacter sakazakii*, e as modificações sofridas nestes semioquímicos durante o co-cultivo desta bactéria com uma bactéria Gram-positiva, *Bacillus cereus*. No segundo capítulo foram realizados o isolamento e caracterização química de alguns metabólitos secundários produzidos pelo fungo endofítico isolado da cana-de-açúcar, *Epicoccum nigrum*, bem como o monitoramento da produção de alguns destes metabólitos em cepas modificadas geneticamente. E no terceiro capítulo foram investigados feromônios produzidos pelas diferentes castas da abelha social *Tetragonisca angustula*.





# CAPÍTULO 1

---



## CAPÍTULO 1.

### ***N*-acil-homoserina lactonas de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e co-cultivo de *Enterobacter sakazakii* e *Bacillus cereus***

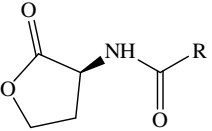
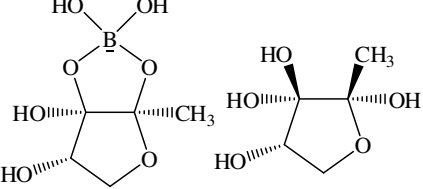
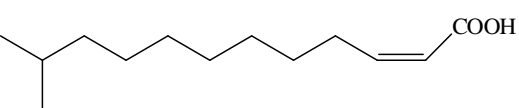
#### **1.1. Introdução**

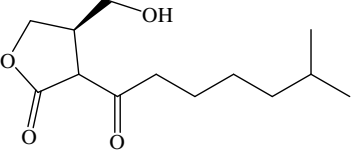
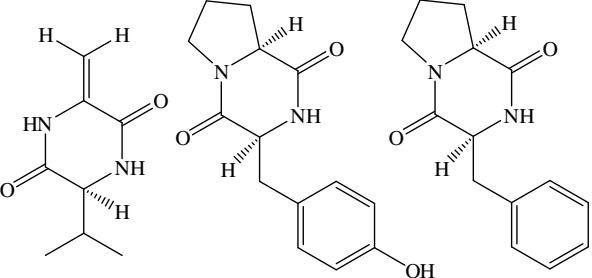
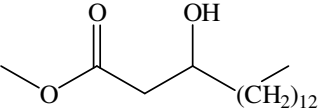
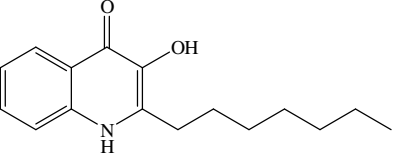
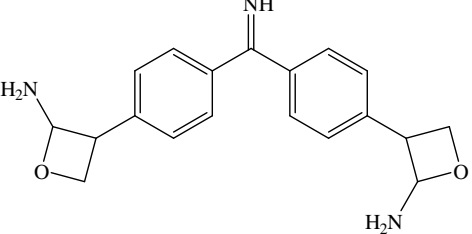
Embora as bactérias sejam organismos unicelulares, elas podem agregar-se em comunidades multicelulares e co-ordenar processos de colonização e associação com os organismos superiores que seriam de difícil execução isoladamente. O comportamento de tais comunidades é largamente controlado por um sistema de sinalização célula-célula denominado *quorum-sensing* ou autoindução (Geske et al., 2008).

O processo *quorum-sensing* se baseia na produção, liberação e detecção de substâncias sinalizadoras de baixa massa molecular, denominadas autoindutores (AI) ou feromônios, cujas concentrações extracelulares estão relacionadas com a densidade populacional do micro-organismo. Devido ao fato destas moléculas sinalizadoras serem difusíveis através de membranas, suas concentrações dentro e fora das células são aproximadamente iguais. Ao atingir uma determinada concentração crítica, tais moléculas podem ativar ou ligar-se a receptores dentro da célula bacteriana, que podem alterar a expressão de genes e induzir a população a iniciar uma ação coordenada para expressão de um fenótipo (antibiótico, corante, etc.) (Antunes et al., 2010; Whitehead et al., 2001).

Diferentes classes de compostos podem ser empregadas pelas bactérias como substâncias sinalizadoras, alguns destes encontram-se sumarizados no Quadro 1.

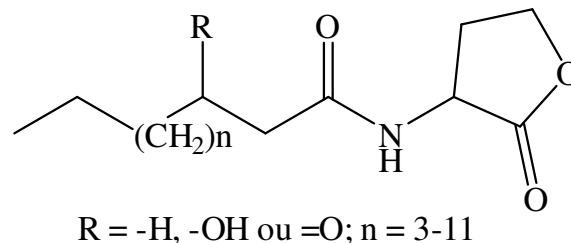
**Quadro 1.** Exemplos de moléculas sinalizadoras de *quorum-sensing*.

Autoindutor	Estrutura geral	Exemplos de organismos produtores	Referências
<i>N</i> -acil-homosserina lactona (AI-1)		<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Vibrio fischeri</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fuqua et al. 1994 Engebrecht et al. 1984 Passador et al. 1993
Autoindutor 2 (AI-2)		<i>Vibrio harveyi</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Salmonella thypimurium</i>	Chen et al. 2002 Miller et al. 2002 Miller et al. 2004
Oligopeptídeos	ComX ADPITRQWGD CSP EMRLSKFFRDFILQRKK AIP-1 YSTCDFIM AIP-2 GVNACSSLF AIP-3 INCDFLL AIP-4 YSTCDFIM	<i>Staphylococcus aureus</i>      <i>Bacillus subtilis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ji et al. 1995      Ansaldi et al. 2002 Pestova et al. 1996
Fator de sinal difusível		<i>Xanthomonas campestris</i> <i>Xanthomonas fastidiosa</i> <i>Stenophomonas maltophilia</i>	Barber et al. 1997 Simionato et al. 2007 Huang et al. 2007

<p>Butirolactonas</p>		<p><i>Streptomyces griseus</i></p>	<p>Chater et al. 2003</p>
<p>Dicetopiperazinas</p>		<p><i>Proteus mirabilis</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter agglomerans</i></p>	<p>Holden et al., 1999</p>
<p>3-Hidroxi-hexadecanoato de metila</p>		<p><i>Ralstonia solanacearum</i></p>	<p>Flavier et al. 1997</p>
<p>Sinal de quinolona de Pseudomonas (PQS)</p>		<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>	<p>Pesci et al. 1999</p>
<p>Bradioxetina (estrutura proposta)</p>		<p><i>Bradyrhizobium japonicum</i></p>	<p>Loh et al. 2002</p>

### 1.1.1. *Quorum-sensing* em bactérias Gram-negativas

A comunicação célula-célula em bactérias Gram-negativas é mediada principalmente por acil-HSLs. Estas moléculas possuem em sua estrutura genérica uma lactona (porção homosserina) ligada a uma cadeia acila saturada ou insaturada, podendo conter no átomo de carbono 3 uma carbonila ou hidroxila (Figura 1) (Fuqua e Greenberg, 2002).



**Figura 1.** Estrutura genérica de acil-homosserina lactonas.

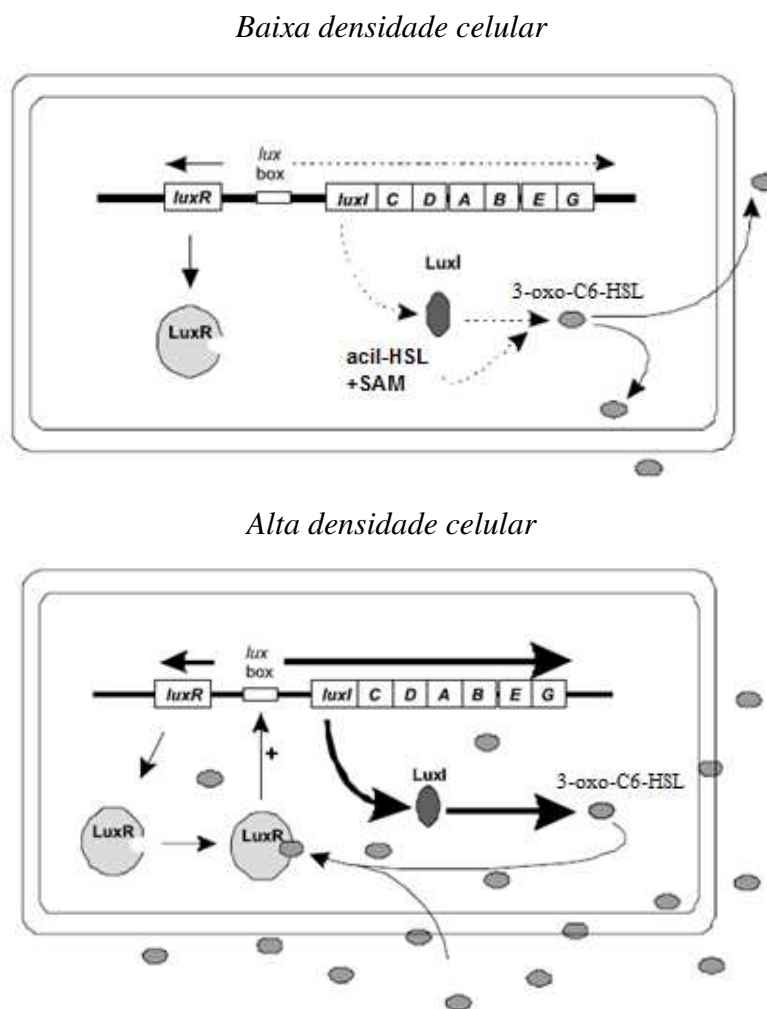
A autoindução mediada por acil-HSL foi descrita pela primeira vez na regulação da bioluminescência na bactéria *Vibrio fischeri*, observada em interações simbióticas com algumas espécies de peixes e moluscos. O exemplo mais estudado desta simbiose ocorre entre *V. fischeri* e o molusco *Euprymna scolopes*, que vive nas superfícies rasas de areias e corais no arquipélago do Hawaí e tem hábito alimentar noturno. *E. scolopes* apresenta bioluminescência em ambientes escuros devido à manutenção de uma alta densidade populacional de *V. fischeri* em um órgão de luz especializado ( $10^{10}$ - $10^{11}$  células  $\text{mL}^{-1}$ ). O molusco usa a luz fornecida pelas bactérias para mascarar a sua sombra e evitar a predação, e, em contrapartida, a bactéria também é beneficiada pelos nutrientes presentes no órgão que permite a sua proliferação (Waters e Bassler, 2005; Whitehead et al., 2001).

O grupo de genes bioluminescentes de *V. fischeri* consiste de oito genes *lux* (*luxA-E*, *luxG*, *luxI* e *luxR*). Os produtos dos genes *luxI* e *luxR* funcionam como

reguladores de bioluminescência. Em *V. fischeri*, o produto da expressão do gene *luxI* é enzima LuxI que, juntamente com a enzima transportadora de acila (ACP) e a S-adenosil-metionina, é responsável pela síntese de *N*-(3-oxo-hexanoil)-HSL, a qual pode difundir livremente através da membrana celular. Em baixa densidade populacional de *V. fischeri*, o gene *luxI* é expresso em nível basal, desta forma, a concentração de *N*-(3-oxo-hexanoil)-HSL no meio permanece baixa, aumentando à medida em que aumenta a densidade populacional celular. Em concentrações críticas de *N*-(3-oxo-hexanoil)-HSL ocorre a sua ligação com a proteína LuxR, resultante da expressão do gene *luxR* e situada no citoplasma. Esta proteína é subsequentemente ativada, provavelmente pela indução de uma mudança conformacional mediada pela molécula sinalizadora. O complexo LuxR-(acil-HSL) ativa o operon da enzima luciferase levando à expressão da bioluminescência (Figura 2) (Fuqua e Greenberg, 2002; Whitehead et al., 2001).

Pesquisas adicionais revelaram que além de *N*-(3-oxo-hexanoil)-HSL, *V. fischeri* produz mais dois autoindutores com atividade no sistema *lux*, *N*-hexanoil-HSL, também dependente de *luxI* para sua síntese, e *N*-octanoil-HSL, cuja síntese é dependente do gene *ainS*, e constitui um segundo sistema de autoindução para regulação da expressão do gene *lux*, e possivelmente outros genes nesta bactéria. A presença de múltiplos sistemas de autoindução de ação cruzada em *V. fischeri*, quimicamente e geneticamente distintos, indica uma complexidade inesperada para a autoindução como mecanismo regulatório de genes e sinalização dentro de uma única bactéria (Kuo et al., 1994).





**Figura 2.** Regulação da bioluminescência em *V. fischeri*, mediado por *N*-(3-oxo-hexanoil)-HSL (3-oxo-C6-HSL). Em baixa densidade celular, a transcrição de genes é fraca e insuficiente para emissão de luz, devido à baixa concentração de 3-oxo-C6-HSL. Em alta densidade celular, a concentração crítica de 3-oxo-C6-HSL é atingida e ocorre a ligação com LuxR estimulando a transcrição de genes que regulam a emissão de luz (Whitehead et al., 2001).

Homólogos do sistema LuxI-LuxR foram identificados em outras bactérias, regulando a transcrição de diversos genes envolvidos em uma variedade de fenótipos (Eberhard et al., 1994). Dentre os principais fatores fenotípicos observados encontram-se a expressão de enzimas e antibióticos em *Erwinia carotovora*, produção de pigmento em *Chromobacterium violaceum*, produção de

fatores de virulência (agressão ao hospedeiro) em *Pseudomonas aeruginosa*, formação de biofilme e exoprotease em *Aeromonas hydrophila*, a conjugação (transferência de genes entre duas bactérias através de contato) em *Agrobacterium tumefaciens* e *Enterococcus faecalis*, expressão de toxinas em *Staphylococcus aureus*, dentre outros (Bosgelmez-Tinaz et al., 2003). O mecanismo de comunicação célula-célula constitui, portanto, uma importante área de estudo para o controle de fenótipos expressos por bactérias, podendo ser uma estratégia interessante no domínio de infecções patogênicas ou fitopatogênicas causadas por micro-organismos.

Sistemas de *quorum-sensing* dependentes de acil-HSLs requerem uma variedade de moléculas sinalizadoras. Embora diversas espécies de bactérias produzam o mesmo tipo de acil-HSL, estas moléculas são responsáveis pela regulação de diferentes processos. Por exemplo, 3-oxo-hexanoil-HSL está envolvida na produção de exoenzimas e antibióticos carbapenêmicos por *Pectobacterium carotovorum* (*Erwinia carotovora*), exopolissacarídeo em *Pantoea* (*Erwinia*) *stewartii*, e bioluminescência de *V. fischeri* (Czajkowski e Jafra, 2009; von Bodman et al., 1998; von Bodman e Ferrand, 1995; Pirhonen et al., 1993; Bainton et al., 1992; Eberhard et al., 1981).

Bactérias da mesma espécie também podem produzir acil-HSLs distintas dependendo da cepa. Este fenômeno foi observado, por exemplo, para diferentes cepas de *Rahnella aquatilis*, onde um dos isolados da rizosfera do tomate produz 3-oxo-hexanoil-HSL e 3-oxo-octanoil-HSL, enquanto outra cepa produz somente 3-oxo-hexanoil-HSL (Czajkowski e Jafra, 2009; Steidle et al., 2001).

Alguns sistemas de *quorum-sensing* são organizados de uma forma hierárquica e controlam o metabolismo em mais de um nível. Além de *V. fischeri*, este fenômeno também foi detectado no patógeno humano *P. aeruginosa*, onde dois

tipos distintos de moléculas sinalizadoras, 3-oxo-dodecanoil-HSL e butanoil-HSL, estão envolvidos na regulação de fatores determinantes da patogenicidade. A síntese da acil-HSL de cadeia curta é dependente do mecanismo de *quorum-sensing* mediado pela acil-HSL de cadeia longa. Este sistema duplo de *quorum-sensing* asseguraria que genes alvos seriam expressos somente sob condições ambientais muito específicas e em uma adequada densidade populacional bacteriana. Contudo, pesquisas adicionais demonstraram que a regulação da patogenicidade de *P. aeruginosa* é mais complexa, uma vez que envolve outros tipos de autoindutores (Czajkowski e Jafra, 2009; Diggle et al., 2003; de Kievit e Iglewski, 2000; Reimann et al., 1997).

### 1.1.2. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.)

*Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), uma bactéria Gram-negativa pertencente à família Enterobacteriaceae, é um patógeno oportunista associado a casos de meningite, enterocolite necrosante, bacteremia e septicemia em bebês prematuros e pacientes imunocomprometidos de qualquer idade. Por essa razão, essa bactéria ganhou atenção de autoridades de saúde pública e pesquisadores em diversos países (Iversen et al., 2008; Bowen e Braden, 2006; Gurtler et al., 2005; Lehner et al., 2005; Iversen et al., 2003).

O primeiro caso de meningite neonatal causada por *E. sakazakii* foi reportado em 1958, na Inglaterra, resultando na morte de dois recém-nascidos (Nazarowec-White e Farber, 1997; Urmenyi e Flanklin, 1961). Desde então diversos casos foram documentados em inúmeros países ao redor do mundo (Drudy et al., 2006; Gurtler et al., 2005; van Acker et al., 2001). A taxa de mortalidade varia de 10-80% e os sobreviventes da meningite sofrem severas seqüelas neurológicas, tais como

hidrocefalia, tetraplegia e desenvolvimento neural retardado (Iversen et al., 2004; van Acker et al., 2001).

No Brasil existem poucos relatos de infecções por *E. sakazakii*, o mais recente foi um caso de meningite que acometeu um bebê de 14 dias de vida, em aleitamento materno exclusivo, atendido no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (Figura 3). A bactéria foi detectada na cultura do liquor, com resistência à ampicilina e ceftazidima, provocando no recém-nascido convulsão, hipertensão intracraniana, edema cerebral e extensa hemorragia, evoluindo para coma arreativo, abaulamento acentuado de fontanela e disjunção de suturas cranianas, que levou a criança a falecer no 15º dia de internação, não sendo indicada a causa da contaminação (Barreira et al., 2003).



**Figura 3.** Aspecto de recém-nascido com meningite por *E. sakazakii* (Barreira et al., 2003).

A ocorrência de surtos intra-hospitalares de infecções por *E. sakazakii* levou à pesquisa de uma fonte comum de contaminação. Alguns relatos mostraram a contaminação de fórmulas lácteas em pó, tanto em latas fechadas como no leite reconstituído, assim como em utensílios utilizados no preparo das fórmulas (Giovanni et al., 2008; Friedemann, 2007; Iversen e Forsythe, 2003; van Acker et al., 2001; Biering et al., 1989). Apesar destes produtos serem aquecidos durante o

processamento, observou-se que a bactéria apresenta termotolerância, podendo sobreviver ao processo de pasteurização e permanecer no produto seco (Iversen et al., 2004).

A presença de *E. sakazakii* em equipamentos e utensílios pode ser decorrente de sua capacidade de aderir às mais diversas superfícies, incluindo silicone, látex, policarbonato (usado na confecção de mamadeiras) e aço inoxidável, formando biofilme (Friedemann, 2007; Lehner et al., 2005; Zogaj et al., 2003).

Os biofilmes são constituídos por uma comunidade estruturada de micro-organismos aderentes a uma superfície inerte ou viva, embebidos em uma matriz de exopolissacarídeos, possibilitando uma barreira física que protege as células do estresse causado pelo ambiente tais como luz UV, estresse osmótico, calor, fome, ácidos, detergentes, antibióticos, anticorpos, fagócitos e bacteriófagos (van Houdt et al., 2004).

Certos processos envolvidos na formação de biofilme são mediados por *quorum-sensing*. Baseado nisso, Lehner et al. (2005) investigaram a capacidade de *E. sakazakii* em produzir acil-HSL, e verificaram a presença de 3-oxo-C6-HSL e 3-oxo-C8-HSL, utilizando a técnica de cromatografia em camada fina. Pinto et al. (2007) também detectaram acil-HSLs de cadeia curta em cepas de *E. sakazakii*, através o ensaio de produção de violaceína com o biossensor *Chromobacterium violaceum* CV026. Contudo, o isolamento e a caracterização química completa destas moléculas não foram realizados.

### 1.1.3. *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus*, bactéria Gram-positiva pertencente à família Bacillaceae, é um micro-organismo que produz acil-HSL lactonase (Medina-Martínez et al., 2007; Zao et al., 2002; Dong et al., 2002), bem como peptidases (Tran et al., 2010). É largamente distribuída no ambiente, podendo ser isolada facilmente de produtos agrícolas e alimentos, bem como solo, vegetação e águas naturais (Schoeni et al., 2005; Kotiranta et al., 2000). Devido a sua capacidade de formar esporos, apresenta resistência a elevadas temperaturas e valores de pH, à desidratação e irradiação. (Vidal-Martins et al., 2006; Casadei et al., 2001).

*B. cereus* é responsável por envenenamento alimentar (Kotiranta et al., 2000; Drobniowski et al., 1993), e uma variedade de infecções sistêmicas, tais como meningite (Evreux et al., 2007; Gaur et al., 2001; Tokieda et al., 1997). Muitas das infecções não-gastrointestinais são manifestadas em grupos de alto risco, tais como pacientes com baixa imunidade, usuários de drogas de injeção, neonatos e pacientes com desvios intraventriculares (Gaur et al., 2001; Drobniowski et al., 1993). Meningoencefalite causada por *B. cereus* em neonatos é bastante rara, e em muitos casos a infecção é fatal devido aos danos extensivos e necrose do tecido infectado, causado por toxinas produzidas pela bactéria (Lequin et al., 2005; Chu et al., 2001).

Semelhantemente à *E. sakazakii*, *B. cereus* também afeta a qualidade de leite e seus derivados (Larsen e Jorsensen, 1999; Crielly et al., 1994; Christiansson et al., 1989). Sua capacidade de formar esporos e crescer em temperatura de refrigeração torna difícil o seu controle. Esta bactéria tem se mostrado capaz de formar biofilme em plástico, lã de vidro e aço inoxidável, ocasionando um impacto na saúde pública e na economia, uma vez que diminui a qualidade e segurança dos alimentos (Hsueh et al., 2006; Vidal-Martins et al., 2006).

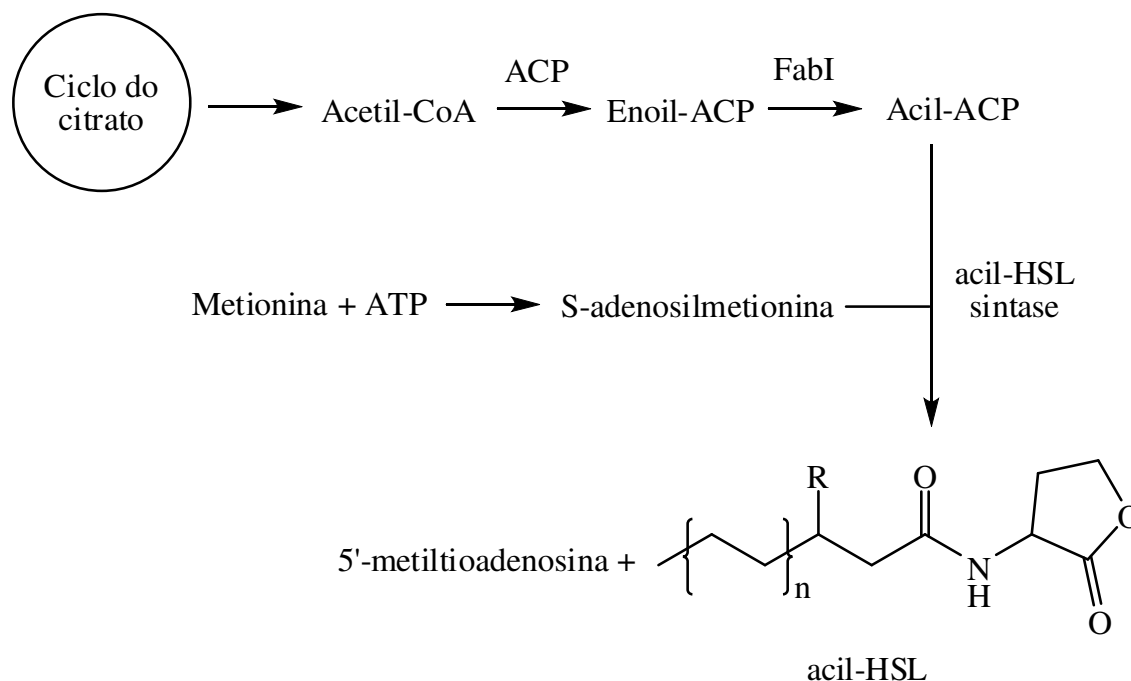
Ambos os gêneros *Bacillus* e *Enterobacter* co-ocorrem em ambientes industriais e em produtos de leite pasteurizado e são responsáveis pela deterioração dos alimentos, juntamente com outros micro-organismos que co-existem em biofilmes (Simões et al., 2010; Sharma e Anand, 2002). Desta forma, a existência de biofilme de espécies múltiplas motivou a presente investigação sobre a comunicação célula-célula via acil-HSL de uma bactéria Gram-negativa (*E. sakazakii*) co-ocorrendo com uma bactéria Gram-positiva (*B. cereus*).

#### **1.1.4. Interferência no mecanismo de *quorum-sensing* via acil-HSLs**

Todo processo que interfere no mecanismo de *quorum-sensing* é denominado *quorum-quenching*. A estratégia de *quorum-quenching* não tem como objetivo matar a bactéria ou limitar o seu crescimento, mas afetar a expressão de uma função específica. Desta forma, trata-se de uma ferramenta valiosa para o desenvolvimento de biocontrole sustentável ou procedimentos terapêuticos, tendo em vista o atual contexto de resistência aos antibióticos (Uroz et al., 2009; Czajkowski e Jafra, 2009; Dong et al., 2007).

As acil-HSLs são derivadas de duas rotas biossintéticas (Figura 4), a cadeia acila é sintetizada via biossíntese de ácido graxo, e a homoserina é proveniente da S-adenosilmetionina. Diversas proteínas foram identificadas na biossíntese de acil-HSLs, incluindo as proteínas transportadoras de acila (ACP), a enoil-ACP redutase (FabI) e acil-HSL sintase (enzima do tipo-LuxI). FabI reduz enoil-ACP a acil-ACP, que reage com S-adenosilmetionina catalisada pela acil-HSL sintase, para produzir a acil-HSL. Outra proteína importante envolvida na biossíntese de acil-HSL é o fator transcricional do tipo-LuxR, que é requerida para ativação da produção de

acil-HSL dependente de *quorum-sensing* (Zhang 2003; Hoang et al., 1999; Schaefer et al., 1996).



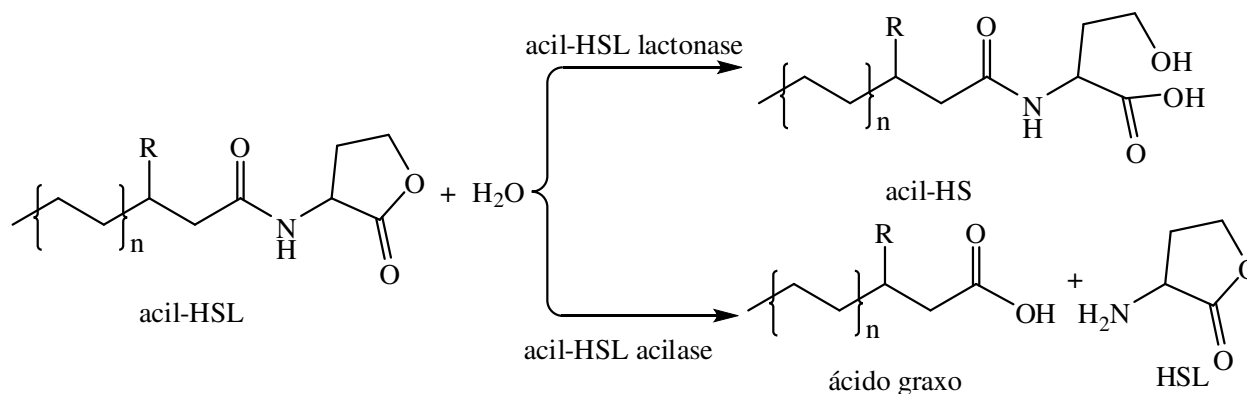
**Figura 4.** Rota biossintética de acil-HSL. Abreviações: ACP, proteína carreadora de acila; acil-HSL, acil-homosserina lactona; CoA, coenzima A; FabI, enoil-ACP redutase. Símbolos: n = 3-12; R = H, OH ou O (Zhang, 2003).

O *quenching* ou supressão do *quorum-sensing* pode ser realizado por três mecanismos: 1) interferindo na biossíntese da molécula sinalizadora, 2) degradando a molécula sinalizadora, e 3) inibindo a proteína receptora do sinal (Uroz et al., 2009; Dong et al., 2007). Dentre estas estratégias, a degradação enzimática das acil-HSLs tem sido proposta como uma alternativa promissora para o silenciamento do *quorum-sensing*, e será discutida com mais detalhes no presente trabalho.

*Quorum-quenching* enzimático pode ser promovido por dois grupos principais de enzimas degradantes de acil-HSLs: 1) acil-HSL lactonases, que clivam o anel lactônico sem afetar o restante da estrutura da molécula; e 2) acil-



HSL acilases (sin. acil-HSL amidases) [EC 3.1.1.81], que clivam a cadeia acila para produzir homosserina lactona e ácido graxo (Figura 5) (Czajkowski e Jafra, 2009; Dong et al., 2007; Dong e Zhang, 2005).



**Figura 5.** Rotas de degradação enzimática de acil-HSL (Dong e Zhang, 2005).

#### 1.1.4.1. Acil-HSL lactonases

As enzimas de *quorum-quenching* mais caracterizadas são as acil-HSL lactonases, que são metaloproteínas pertencentes à superfamília metalo-beta-lactamase (Liu et al., 2007). A atividade de degradação da acil-HSL lactonase foi inicialmente descoberta em espécies de *Bacillus* spp., cepa 240B1 (Dong et al., 2000), mas é relativamente comum em diversas bactérias e também em células eucarióticas.

A expressão do *aiiA* em *Erwinia carotovora* SCG1, gene que codifica a acil-HSL lactonase em *Bacillus* sp., reduziu significativamente a liberação de acil-HSLs, diminuindo as atividades de enzimas pectolíticas extracelulares e atenuando a patogenicidade sobre batata, beringela, couve chinesa, cenoura, aipo, fumo e couve-flor (Dong et al., 2000). Plantas transgênicas expressando acil-HSL lactonase exibiram um melhoramento significativo na resistência à infecção por *E.*

*carotovora*, bem como um atraso no desenvolvimento de sintomas da doença (Dong et al., 2001).

Estirpes de *Bacillus thuringiensis* produzem acil-HSL lactonase, que podem suprimir a virulência dependente de *quorum-sensing* de *E. carotovora*, uma bactéria patógena de plantas (Dong et al., 2004). *E. carotovora* produz e responde à presença de acil-HSLs na produção de antibióticos e expressão gênica de fatores de virulência, que são funções que poderiam ser de importância crítica para este patógeno em competição por nichos ecológicos, em competição micróbio-micróbio e interações patógeno-hospedeiro. Estes dados indicam claramente que acil-HSL lactonase desempenha um papel significativo na obtenção de vantagens competitivas para o produtor sobre os seus competidores em ecossistemas naturais (Dong e Zhang, 2005; Dong et al., 2004).

Interessantemente, acil-HSL lactonases foram encontradas em bactérias que fazem uso do mecanismo de *quorum-sensing* dependente de acil-HSLs. Em *A. tumefaciens*, o gene *attM*, homólogo de *aiiM* de *Bacillus* sp. e codante de acil-HSL lactonase, foi identificado e caracterizado. Entretanto, a expressão da enzima acil-HSL lactonase parece ser bem regulada nesta bactéria, uma vez que é expressa somente quando as células bacterianas encontram-se na fase estacionária de crescimento. Desta forma uma investigação mais aprofundada dos mecanismos moleculares de regulação genética pode levar à identificação e concepção de novas formas de ativar antecipadamente a degradação do sinal de *quorum-sensing*, portanto, bloqueando a expressão do fator de virulência dependente do *quorum-sensing* (Zhang et al., 2002).

Resultados semelhantes foram obtidos com o patógeno humano *P. aeruginosa* PAO1, que tem sua virulência controlada pela densidade celular via acil-HSLs (*N*-3-oxo-dodecanoil-HSL e *N*-butanoil-HSL). A cepa mutante

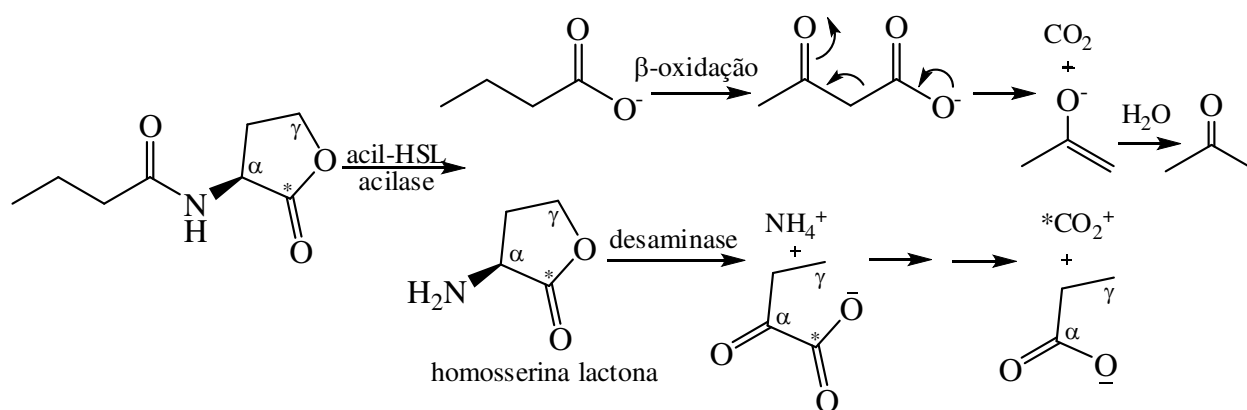
expressando um gene homólogo de *aiiA* reduziu a quantidade de *N*-3-oxo-dodecanoil-HSL e preveniu completamente a acumulação da segunda molécula sinalizadora, *N*-butanoil-HSL, conseqüentemente, diminuindo a expressão e produção de diversos fatores de virulência. Contudo, esta mutação não interferiu na colonização de superfícies (Reimamm et al., 2002).

A atividade de acil-HSL lactonase também foi reportada em diferentes eucariotos e em soro de mamíferos. As lactonases de soro, ao contrário das acil-HSL lactonases, são dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , um traço consistente com estas enzimas que são paraoxonases com atividade lactonase. Três paraoxonases Pon1, Pon2 e Pon3 mostraram atividade de degradação de acil-HSL em soro de mamíferos, interferindo com a regulação de *quorum-sensing* em biofilmes de *P. aeruginosa* (Uroz et al., 2009; Ozer et al., 2005; Dragonov et al., 2005; Yang et al., 2005; Chun et al., 2004).

#### 1.1.4.2. Acil-HSL acilases

As acil-HSL acilases são encontradas em procariotos e eucariotos (Uroz et al., 2009), e foram descritas pela primeira vez na bactéria Gram-negativa *Variovorax paradoxus*, cepa VAI-C (Leadbetter e Greenberg, 2000). Quando esta bactéria cresce na presença de acil-HSL, libera no meio de crescimento a homoserina lactona e ácido graxo como produtos de degradação, este último é utilizado para gerar energia. Leadbetter e Greenberg (2000) sugeriram que após a hidrólise da ligação acil-amida, a próxima etapa na rota degradativa poderia envolver a ação de desaminases via eliminação- $\alpha,\gamma$  gerando  $\alpha$ -cetobutirato e  $\text{NH}_4^+$  (Figura 6).

Alternativamente, a acil-HSL lactonase poderia converter HSL em homoserina, entretanto, esta última hipótese parece inconsistente para a cepa de *V. paradoxus* VAI-C, tendo em vista que a mesma utiliza homoserina, mas não HSL (adicionada exogenamente ou derivada de acil-HSLs), como fonte de carbono. Contudo, a clonagem do gene responsável pela degradação de acil-HSLs ainda não foi realizada, por esse motivo, a atividade enzimática envolvida na diminuição da concentração de acil-HSL por *V. paradoxus* é pouco caracterizada (Czajkowski e Jafra, 2009).



**Figura 6.** Rota de degradação hipotética de C4-HSL. Os asteriscos indicam a posição do carbono marcado com C14 (baseado em Leadbetter e Greenberg, 2000).

Os genes codantes de acil-HSLs acilases são comuns em bactérias, tanto em Gram-negativas, tais como *aiiD* de *R. eutropha* (Lin et al., 2003), *pvdQ* e *quiP* de *P. aeruginosa* (Huang et al., 2003; 2006), como em Gram-positiva (*ahlM* de *Streptomyces* (Park et al., 2005), bem como na cianobactéria *Anabaena* sp., gene *all3924* (Romero et al., 2008).

Em *Streptomyces* sp. a proteína AhlM, codificada pelo gene *ahlM* e identificada como uma acil-HSL acilase, é a única conhecida como sendo secretada para fora da célula bacteriana. Esta proteína é capaz de degradar não somente acil-

HSLs como também penicilina G, o que revela sua baixa especificidade (Park et al., 2005).

A acilase de rins suínos, que anteriormente era conhecida por sua capacidade de hidrolisar uma variedade de *N*-acil-<sub>L</sub>-aminoácidos, mostrou-se capaz de degradar acil-HSLs com cadeia acila variando de quatro a oito carbonos (Uroz et al., 2009; Xu et al., 2003).

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Gerais

Tendo em vista que ambos os gêneros *Bacillus* e *Enterobacter* ocorrem nos mesmos ambientes, o objetivo do presente trabalho foi realizar o estudo químico das substâncias sinalizadoras produzidas por *E. sakazakii*, e avaliar as modificações que acontecem nestas moléculas durante o co-cultivo com o *B. cereus*.

### 1.2.2. Específicos

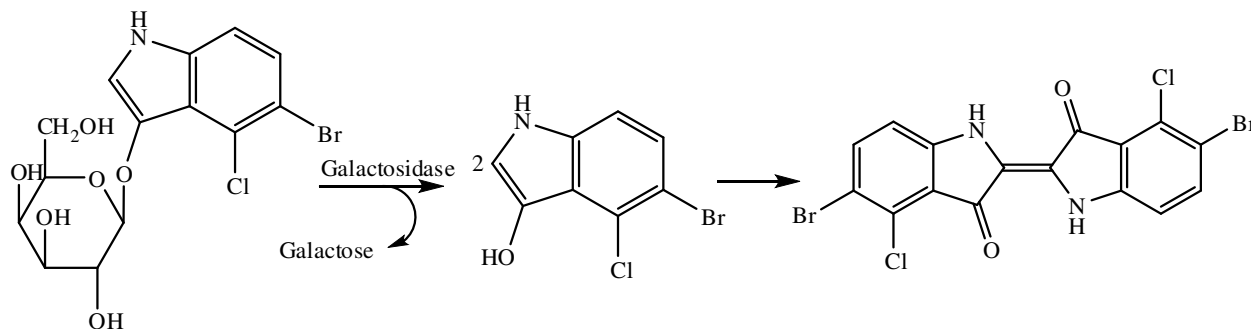
- Avaliar a produção de acil-HSLs em *E. sakazakii*, utilizando o biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4);
- Realizar extração, purificação e caracterização espectroscópica das acil-HSLs de *E. sakazakii*;
- Sintetizar as substâncias identificadas;
- Determinar a configuração absoluta das acil-HSLs naturais;
- Avaliar as modificações que ocorrem nas acil-HSLs durante o co-cultivo de *E. sakazakii* com *B. cereus*, utilizando o biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) e técnicas de cromatografia e massas.

## 1.3. Resultados e Discussão

### 1.3.1. Detecção de acil-HSL em *E. sakazakii*

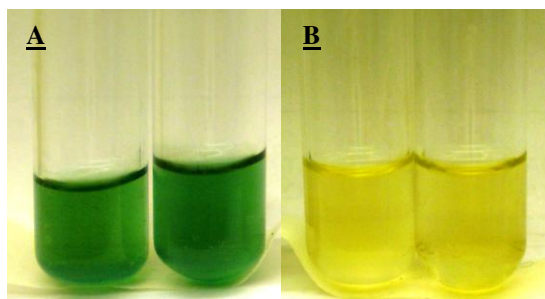
A produção de acil-HSLs em *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) foi inicialmente investigada utilizando-se o biossensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4).

*A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) é um mutante que teve o gene *traI*, homólogo de *luxI*, silenciado, sendo, portanto, incapaz de produzir acil-HSLs, mas podendo detectar a presença destes metabólitos em produtos naturais e sintéticos. Isso é possível porque o sistema de detecção foi inserido pelo plasmídeo pTiC58, que contém o gene *traR* (homólogo de *luxR*) e uma fusão *traG::lacZ*. Desta forma, acil-HSLs exógenas ligam-se a proteína receptora TraR e o complexo formado [TraR-(acil-HSL)] regula a expressão do gene *lacZ*, responsável pela síntese de uma  $\beta$ -galactosidase capaz de degradar o reagente  $\beta$ -D-galactopiranosídeo de 5-bromo-4-cloro-3-indolil (X-Gal), gerando um derivado de índigo de coloração azul (Figura 7). Dessa forma, a presença de acil-HSLs pode ser monitorada visualmente pela mudança de coloração do meio de amarelo para verde (coloração resultante da mistura da cor azul do corante com a cor amarelo do meio de cultivo), caso a concentração desse metabólito seja suficiente para ativar o biossensor. O mutante *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) apresenta uma ampla faixa de sensibilidade para acil-HSLs com diferentes comprimentos de cadeia acila e substituintes do tipo -oxo e -hidroxi (Berg et al., 2002; Ravn et al., 2001; Cha et al., 1998).



**Figura 7.** Reação de degradação do reagente X-Gal e formação do derivado de índigo de coloração azul por ação da enzima  $\beta$ -galactosidase (Berg et al., 2002).

Neste ensaio preliminar observou-se que a suspensão de células de *E. sakazakii* apresentou uma coloração verde na presença de *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) e X-gal (Figura 8), fornecendo indícios de que o biossensor detectou acil-HSLs de *E. sakazakii*.

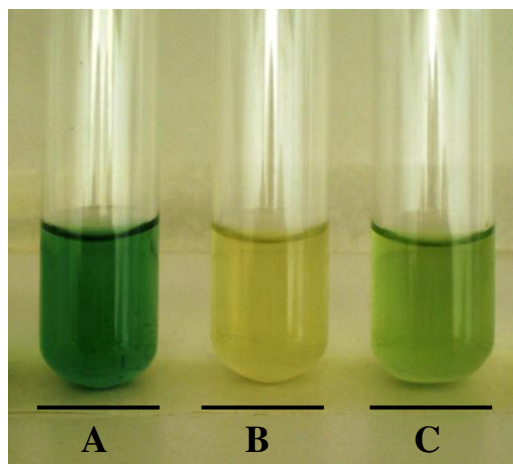


**Figura 8.** Bioensaio com *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). A. Suspensão de células de *E. sakazakii*; B. Controle negativo. Ensaio realizado em duplicata.

Tendo em vista que a ocorrência natural de  $\beta$ -galactosidase em *E. sakazakii* poderia hidrolisar o X-gal e produzir um resultado falso positivo, o biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) foi utilizado em um teste com o extrato acetato de etila de *E. sakazakii*, o qual deu origem a uma coloração verde no meio de cultura após 24 h, confirmando a presença de acil-HSL, que é consistente com os resultados empregando suspensões de células (Figura 9). O controle negativo com *A.*



*tumefaciens* NTL4(pZLR4) foi desenvolvido com suspensões de células em meio LB contendo X-gal e a coloração verde não foi observada.

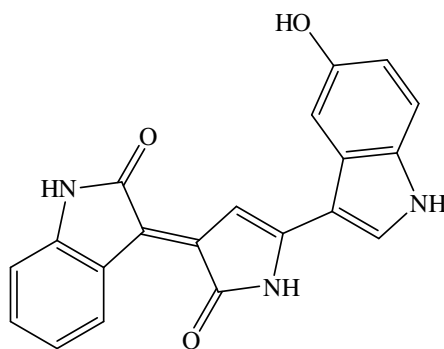


**Figura 9.** Bioensaio com *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). A. (*S*)-dodecanoil-HSL (controle positivo). B. Controle negativo. C. Extrato acetato de etila de *E. sakazakii*. Ensaios realizados em duplicata.

A interpretação de dados baseados em biossensores de acil-HSL precisa ser cautelosa, por esse motivo, a presença das acil-HSLs foi comprovada a partir do isolamento e identificação das moléculas sinalizadoras produzidas por *E. sakazakii*.

### 1.3.2. Purificação e caracterização estrutural de acil-HSL

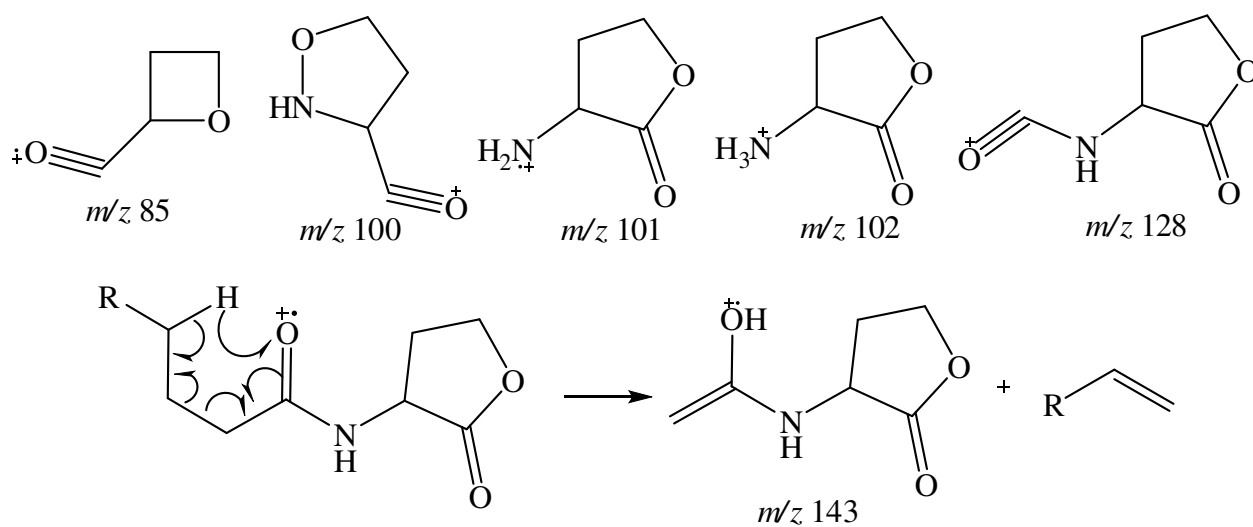
O extrato obtido a partir de 8 L de meio de cultivo de *E. sakazakii* foi submetido a um fracionamento bioguiado utilizando os biossensores *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) e, adicionalmente, com *Chromobacterium violaceum* CV026. *C. violaceum* CV026 é um mutante que não produz acil-HSLs e violaceína (Figura 10), pigmento regulado por *quorum-sensing*. A presença de acil-HSLs exógenas, com cadeias laterais de quatro a oito carbonos, ativa a produção deste corante (fenótipo) tornando o meio roxo (Cha et al., 1998; McClean et al., 1997).



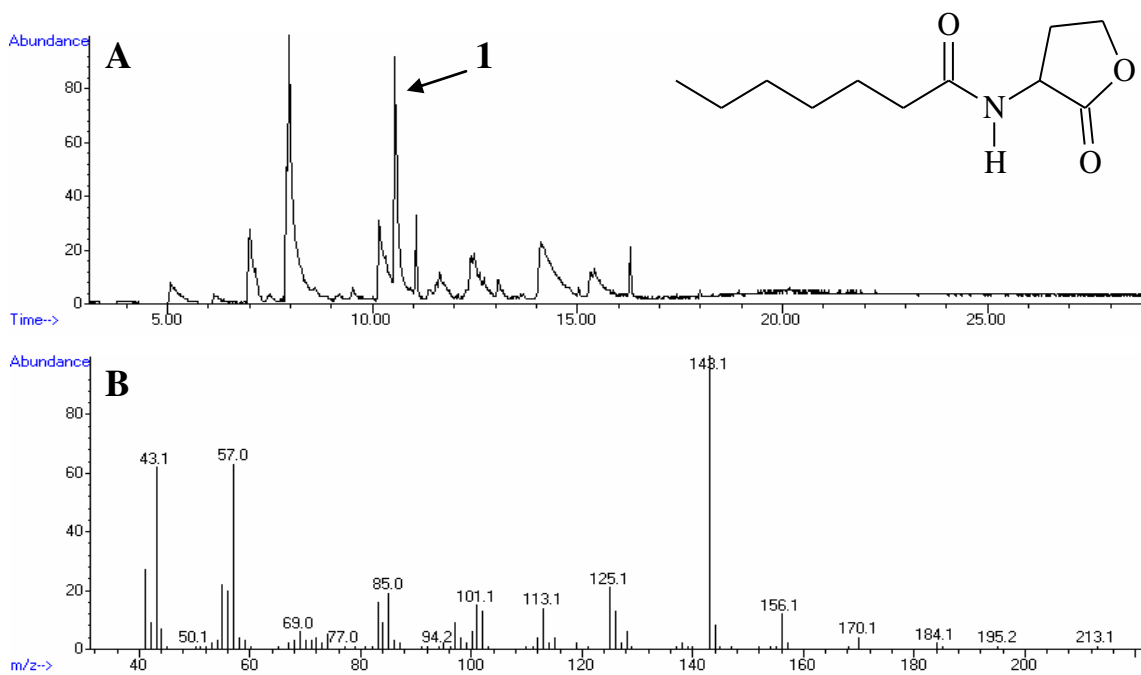
**Figura 10.** Estrutura da violaceína.

As frações F50-64, eluidas com hexano:acetato de etila (50%) e acetato de etila puro, mostraram atividade positiva frente a *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). Adicionalmente, as frações F50 e F56-62 responderam à *C. violaceum* CV026, indicando a presença de acil-HSL de cadeia curta nestas frações, e de cadeia longa nas demais que ativaram o biossensor *A. tumefaciens*.

As frações bioativas foram analisadas por CG-EM, monitorando os sinais com padrões de fragmentação característicos das acil-HSLs, como  $m/z$  143, 128, 102, 101, 100 e 85 (Figura 11) (Pomini et al., 2005; Chhabra et al., 1993). *N*-heptanoil-HSL (**1**) ( $M^+$   $m/z$  213) (Figura 12) foi detectada nas frações F56-F61. Uma cadeia lateral não-substituída foi sugerida pelo decréscimo nas abundâncias relativas de  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $m/z$  156 (13%), e  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $m/z$  170 (4%). Verificaram-se ainda os sinais em  $m/z$  143, pico base resultante do rearranjo de McLafferty com a carbonila da cadeia acila,  $m/z$  125 (21%) ( $m/z$  143 –  $\text{H}_2\text{O}$ ),  $m/z$  128 (5%), fragmentação  $\alpha$  à carbonila da cadeia acila,  $m/z$  100 (7%) e suas formas protonadas  $m/z$  101 (16%) e 102 (12%) correspondentes ao fragmento homosserina lactona, e o sinal em  $m/z$  113 (13%), referente à perda do grupo homosserina lactona ( $M^+$  -  $\text{C}_4\text{H}_6\text{NO}_2$ ).

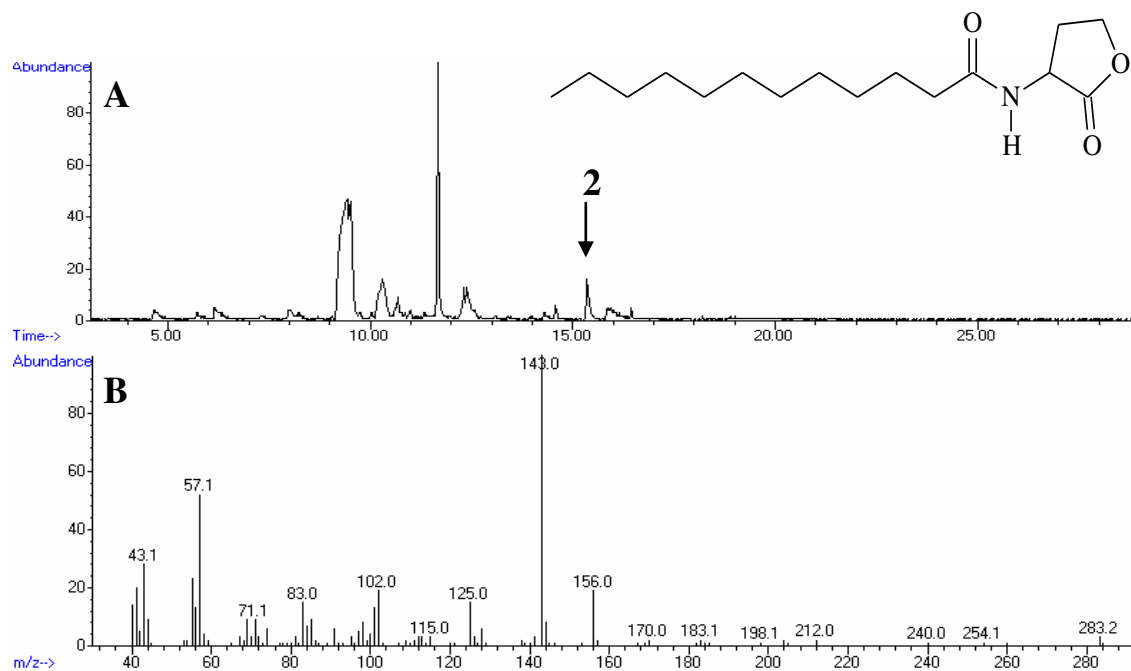


**Figura 11.** Fragmentos característicos de acil-HSLs por espectrometria de massas (IE, 70 eV).

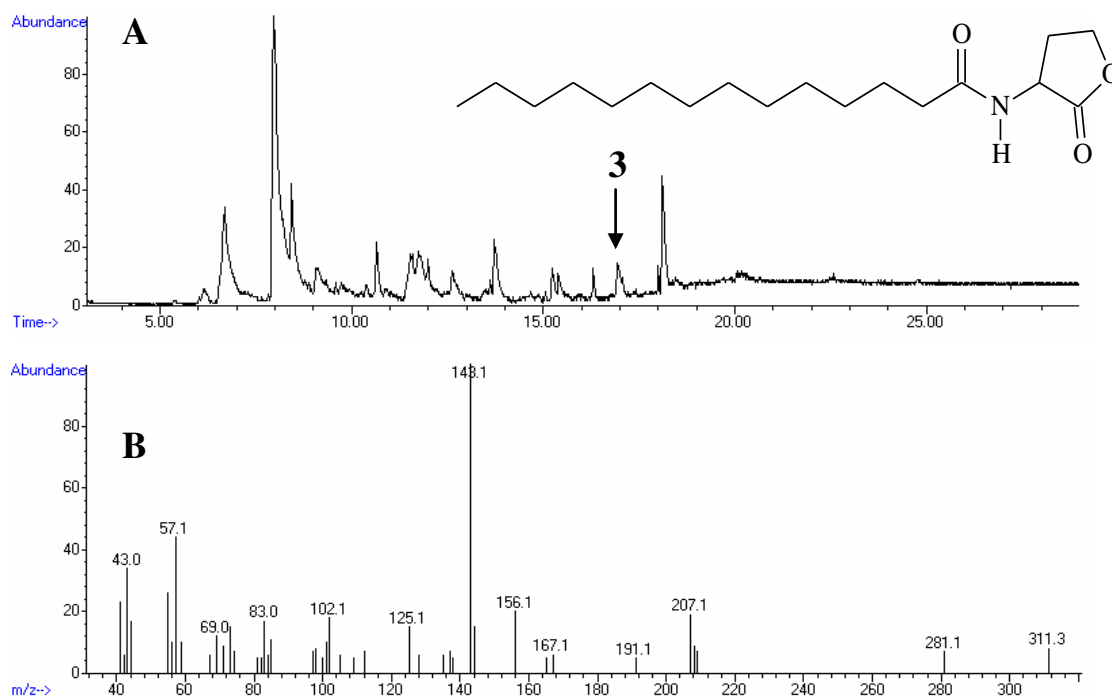


**Figura 12.** A. Cromatograma de íons totais (IE, 70 eV) da fração F59 (0,5 mg) do extrato acetato de etila de *E. sakazakii*. B. Espectro de massas de *N*-heptanoil-HSL (**1**).

*N*-Dodecanoil-HSL (**2**) ( $M^+$   $m/z$  283) e *N*-tetradecanoil-HSL (**3**) ( $M^+$   $m/z$  311) foram detectadas nas frações F63-F64 (Figura 13) e F52-F56 (Figura 14) respectivamente, ambas apresentando no espectro de massas o pico base característico das acil-HSLs em  $m/z$  143 (Pomini et al., 2005).



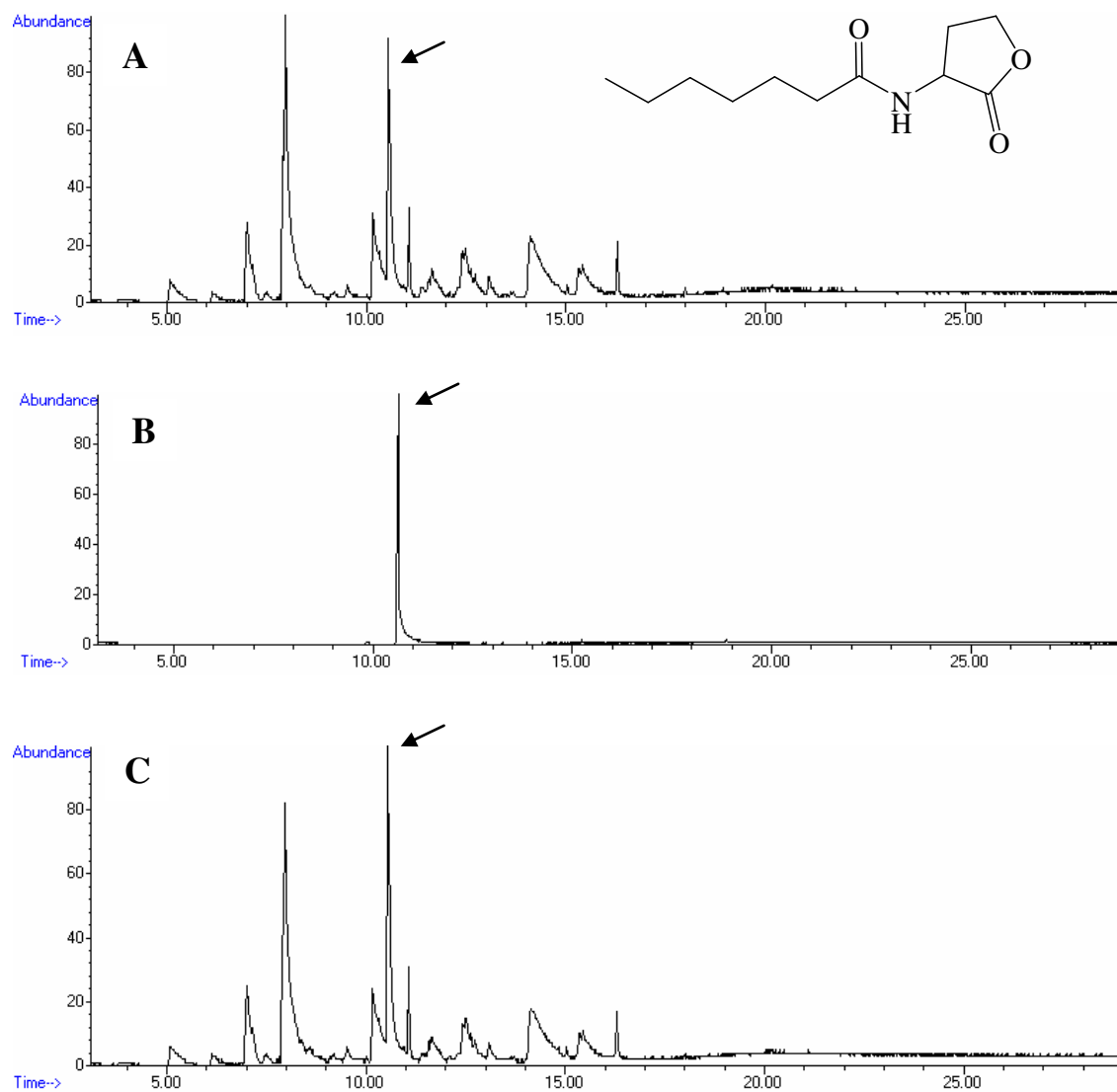
**Figura 13.** A. Cromatograma de íons totais (GC-EM, IE, 70 eV) da fração F63 (3,0 mg) do extrato acetato de etila de *E. sakazakii*. B. Espectro de massas de *N*-dodecanoil-HSL (**2**).



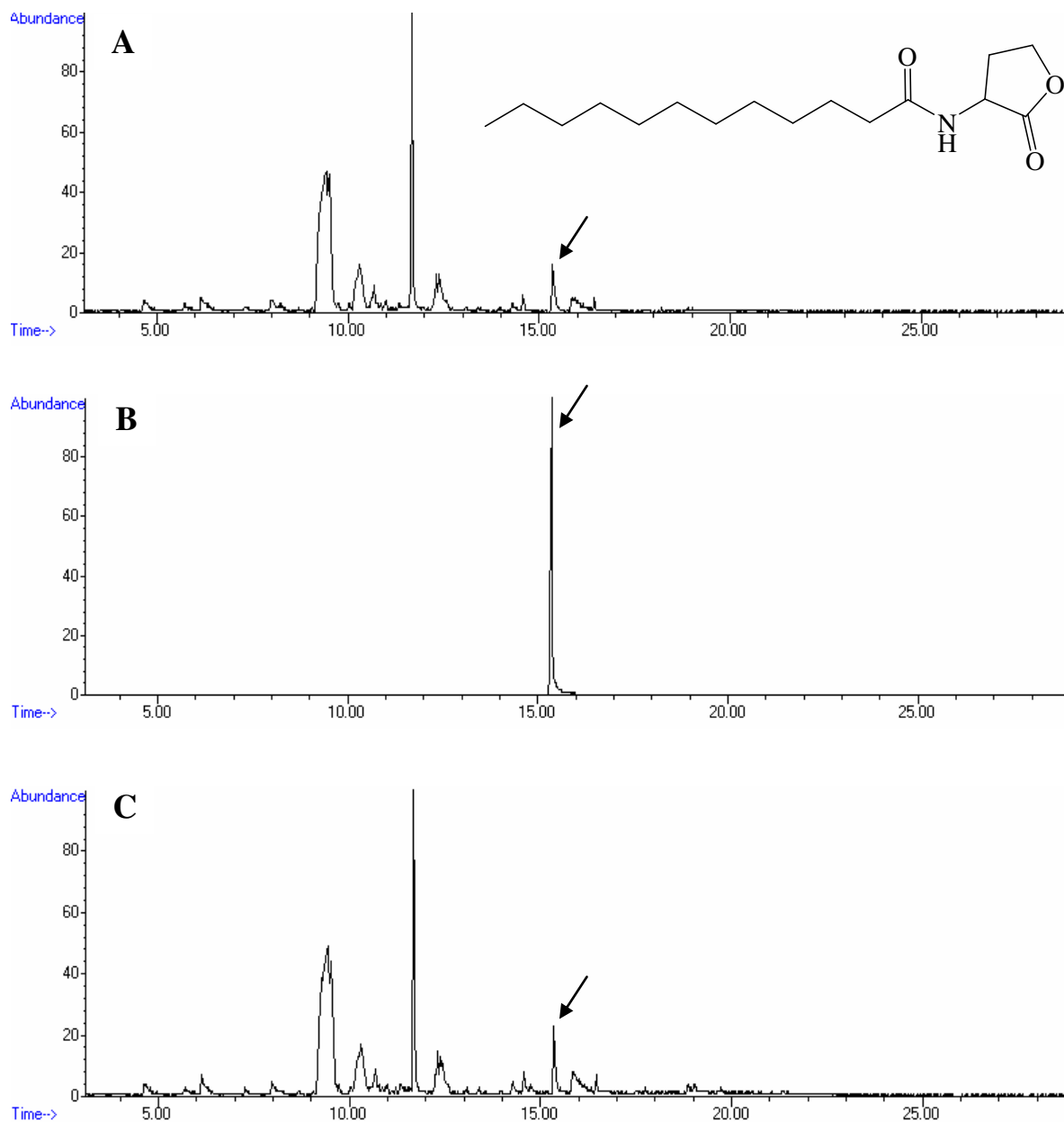
**Figura 14.** A. Cromatograma de íons totais (GC-EM, IE, 70 eV) da fração F55 (0,5 mg) do extrato acetato de etila de *E. sakazakii*. B. Espectro de massas de *N*-tetradecanoil-HSL (3).

As C7- e C12-HSLs (racêmicas e enantiômero-*S*) foram sintetizadas de acordo com metodologia previamente descrita (Pomini et al., 2005; Pomini e Marsaioli, 2008), enquanto a C14-HSL se encontrava disponível no laboratório (Pomini et al., 2009). Todos os produtos sintetizados foram caracterizados por CG-EM, RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (CPD, DEPT 135° e 90°) e correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a uma ligação (gHSQC) (Figuras 1A-10A).

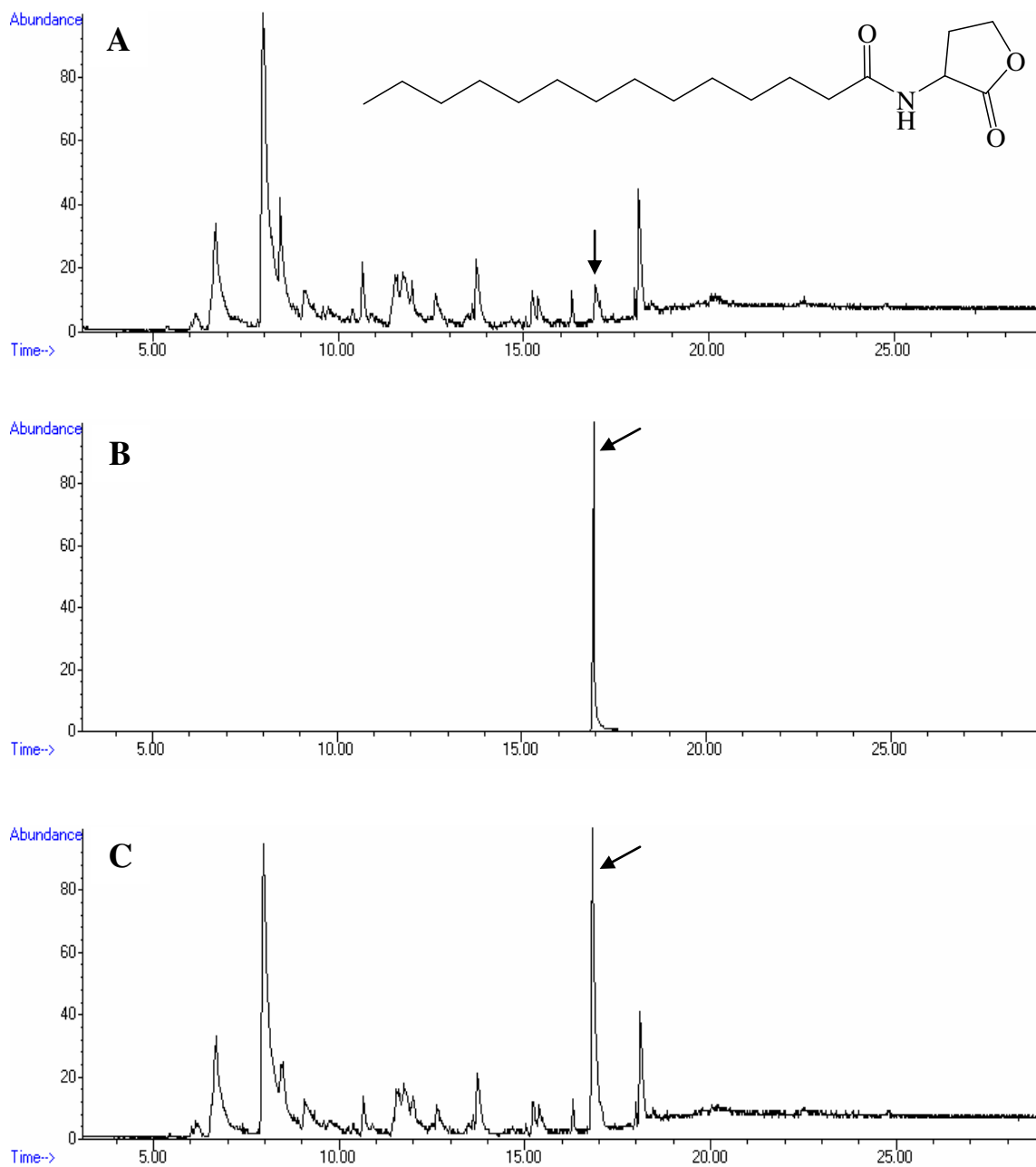
Os compostos detectados foram co-injetados com estas acil-HSLs sintéticas, revelando padrão de fragmentação de massas e tempos de retenção cromatográficos correspondentes (Figuras 15 a 17).



**Figura 15.** Cromatograma de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV). A. Fração F59 do extrato acetato de etila de *E. sakazakii*. B. (±)-*N*-heptanoil-HSL. C. Co-injeção da fração F59 com produto sintético.



**Figura 16.** Cromatograma de ions totais (CG-EM, IE, 70 eV). A. Fração F63 do extrato acetato de etila de *E. sakazakii*. B. (±)-*N*-dodecanoil-HSL; C. Co-injeção da fração F63 com produto sintético.

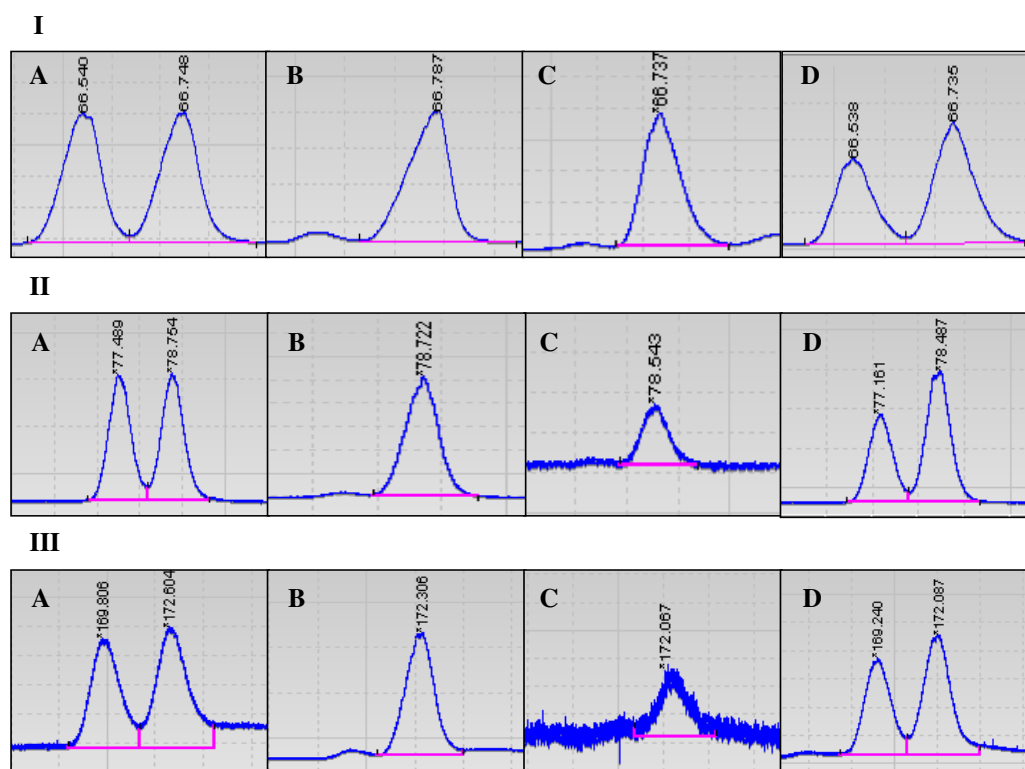


**Figura 17.** Cromatograma de ions totais (CG-EM, IE, 70 eV). A. Fração F55 do extrato acetato de etila de *E. sakazakii*. B. ( $\pm$ )-*N*-tetradecanoil-HSL; C. Co-eluição da fração F55 com produto sintético.



### 1.3.3. Configuração absoluta das acil-HSLs

A configuração absoluta das acil-HSLs produzidas por *E. sakazakii* foi determinada usando um cromatógrafo a gás equipado com uma coluna quiral Chrompack (Chirasil cyclodextrin CB) e um detector de ionização em chama. ( $\pm$ )-*N*-heptanoil-HSL sintética foi utilizada para otimizar as condições analíticas a fim de se obter uma boa discriminação enantiomérica de (*R*) e (*S*) (Figura 18, IA). A (*S*)-*N*-heptanoil-HSL sintética eluiu 66,75 min, permitindo-se concluir que no produto racêmico este enantiômero correspondia ao pico em 66,78 min, com enantiômero (*R*) em 66,54 min. Dessa forma, a configuração da *N*-heptanoil-HSL presente na fração F59 (66,73 min) foi correspondente ao enantiômero (*S*) devido à proximidade em seus tempos de retenção. Uma co-injeção do produto natural com o padrão racêmico sintético produziu um acréscimo na abundância relativa do pico (*S*) (66,73 min) em relação ao enantiômero (*R*) (66,53 min), confirmando esta hipótese. A configuração (*S*) da *N*-dodecanoil-HSL em F63 e *N*-tetradecanoil-HSL em F55 também foi confirmada (Figura 18, II e III) (Pomini e Marsaioli, 2008; Pomini et al., 2009).

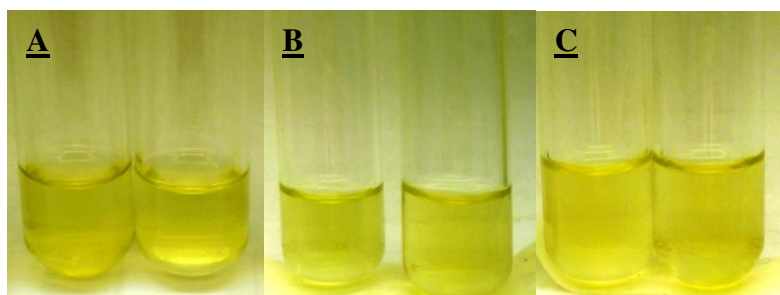


**Figura 18.** Configuração absoluta de (*S*)-*N*-heptanoil-HSL (**I**), (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL (**II**) e (*S*)-*N*-tetradecanoil-HSL (**III**) por CG-DIC usando coluna quiral. A. *N*-acil-HSL sintética racêmica; B. (*S*)-*N*-acil-HSL sintética; C. *N*-acil-HSL natural; D. Co-eluição de *N*-acil-HSL sintética racêmica e *N*-acil-HSL natural.

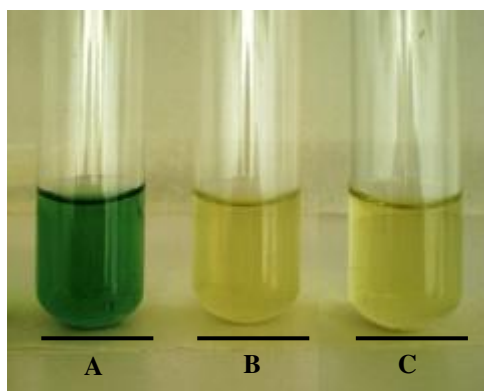
### 1.3.4. Detecção de acil-HSL em co-cultivo de *E. sakazakii* e *B. cereus* ATCC 14579.

O bioensaio com *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) realizado com a suspensão de células do co-cultivo de *E. sakazakii* e *B. cereus* ATCC 14579, forneceu resultado negativo (Figura 19), indicando a ausência de acil-HSL ou degradação das mesmas. Portanto, este biossensor foi novamente utilizado com o extrato acetato de etila do cultivo misto de *E. sakazakii* e *B. cereus* ATCC 14579 (livre de enzimas) fornecendo uma resposta análoga (Figura 20). Estes resultados foram interpretados como degradação das acil-HSLs de *E. sakazakii* pelas enzimas do *B.*

*cereus*. Para confirmar esta hipótese, realizou-se um monitoramento das acil-HSLs no extrato acetato de etila do co-cultivo de *E. sakazakii* e *B. cereus* ATCC 14579 e investigou-se a atividade de hidrolases em diferentes cepas de *B. cereus*. O bioensaio realizado apenas com a suspensão de células de *B. cereus* ATCC 14579 forneceu uma resposta negativa, o que já era esperado tendo em vista que se trata de uma bactéria Gram-positiva que emprega outro tipo de molécula sinalizadora na sua comunicação química.



**Figura 19.** Bioensaio com *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). A. Suspensão de células de *B. cereus* ATCC 14579; B. Suspensão de células do co-cultivo de *E. sakazakii* e *B. cereus* ATCC 14579; C. Controle negativo. Ensaios realizados em duplicata.

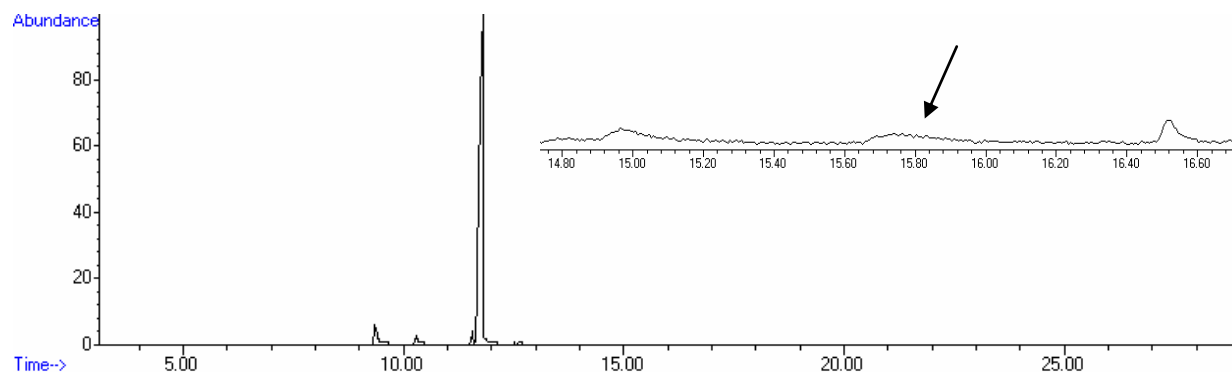


**Figura 20.** Bioensaio com *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). A. (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL (controle positivo); B. Controle negativo; C. Extrato acetato de etila do cultivo misto de *E. sakazakii* e *B. cereus*. Ensaios realizados em duplicata.

Uma estratégia de desreplicação (separação cromatográfica bioguiada) foi aplicada às frações cromatográficas com *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) e *C. violaceum* CV026, revelando que uma única fração (M42) forneceu uma resposta positiva com *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) (Figura 21). As análises por CG-EM em modo SIM (*single ion monitoring*,  $m/z$  143) revelou a presença de quantidades traços de (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL (Figura 22), confirmando que a maioria das acil-HSLs foram degradadas pelas enzimas de *B. cereus* ATCC 14579. Este fenômeno de degradação de moléculas sinalizadoras de *quorum-sensing*, dependente de acil-HSLs, pela atuação de acil-HSL lactonases já foi reportada na literatura para as espécies *Erwinia carotovora* e *Yersinia enterocolitica* (Zhao et al., 2008). Contudo, a degradação de acil-HSL poderia seguir dois caminhos: a hidrólise da lactona ou a hidrólise da ligação *N*-acil, demandando uma melhor investigação do mecanismo de degradação de acil-HSL.



**Figura 21.** Bioensaio com *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). Da esquerda para a direita: Tubo 1: controle positivo usando (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL; Tubo 2: Controle negativo. Os demais tubos são frações do extrato AcOEt do co-cultivo de *E. sakazakii* e *B. cereus*, eluídas em AcOEt puro. Ensaios realizados em duplicata.



**Figura 22.** Cromatograma de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV) da fração M42 (3,7 mg) do extrato acetato de etila do co-cultivo de *E. sakazakii* e *B. cereus*, com expansão do pico da (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL.

### 1.3.5. Mecanismo de degradação de acil-HSL por enzimas de *B. cereus*

Para detectar tais reações enzimáticas primeiramente foi selecionada e otimizada a metodologia de espectrometria ESI-MS-MS pelo uso de misturas de acil-HSL, ácido graxo e homosserina em diferentes concentrações (Tabela 1).

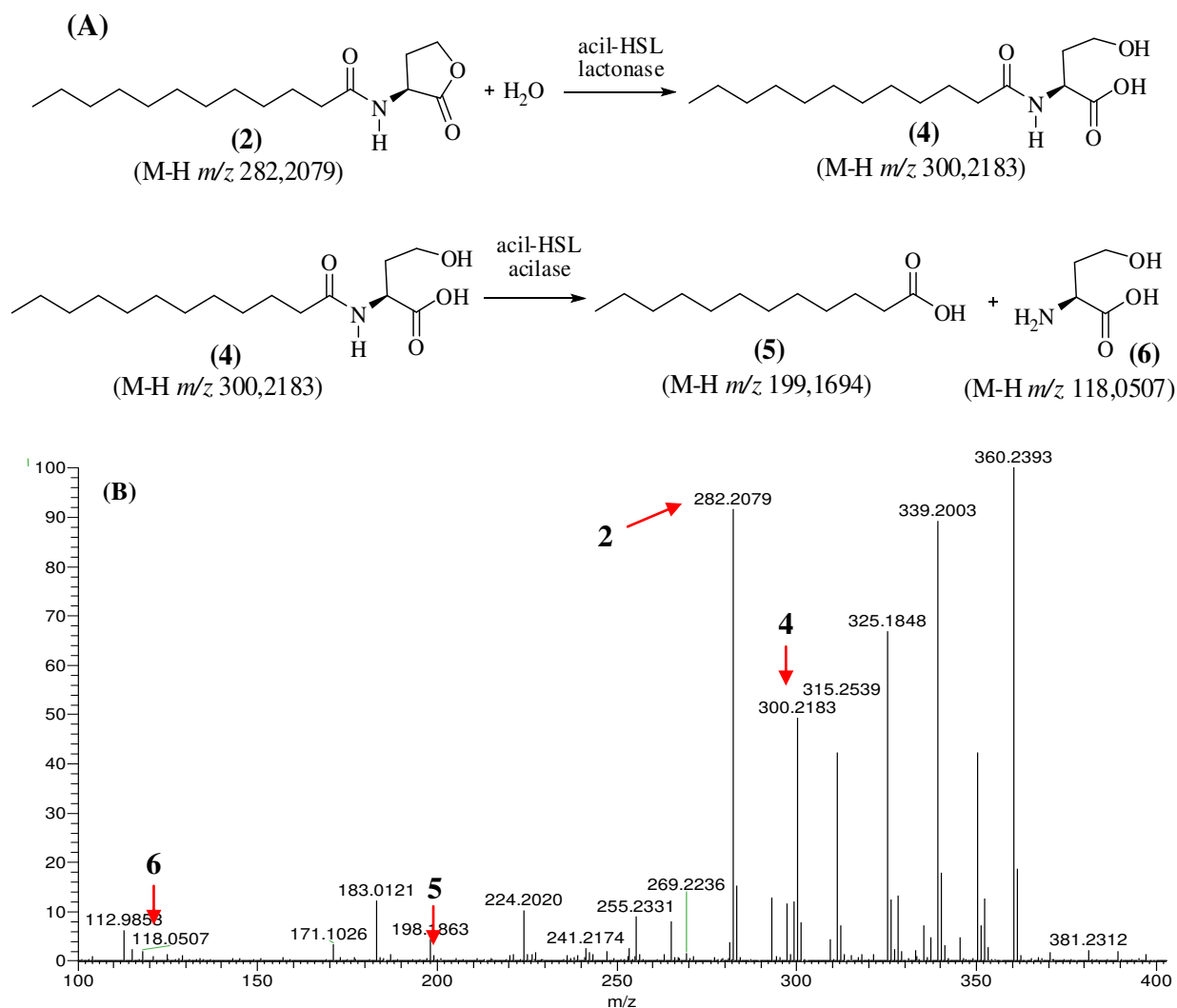
**Tabela 1.** Soluções utilizadas para calibrar a resposta de análises por ESI-MS e MS<sup>2</sup> (μmol/L).

Amostra	Homosserina lactona	( <i>S</i> )- <i>N</i> -Dodecanoil-homosserina lactona	Ácido dodecanóico
A	422,48	271,33	383,88
B	211,30	678,56	-
C	1026,65	-	192,00

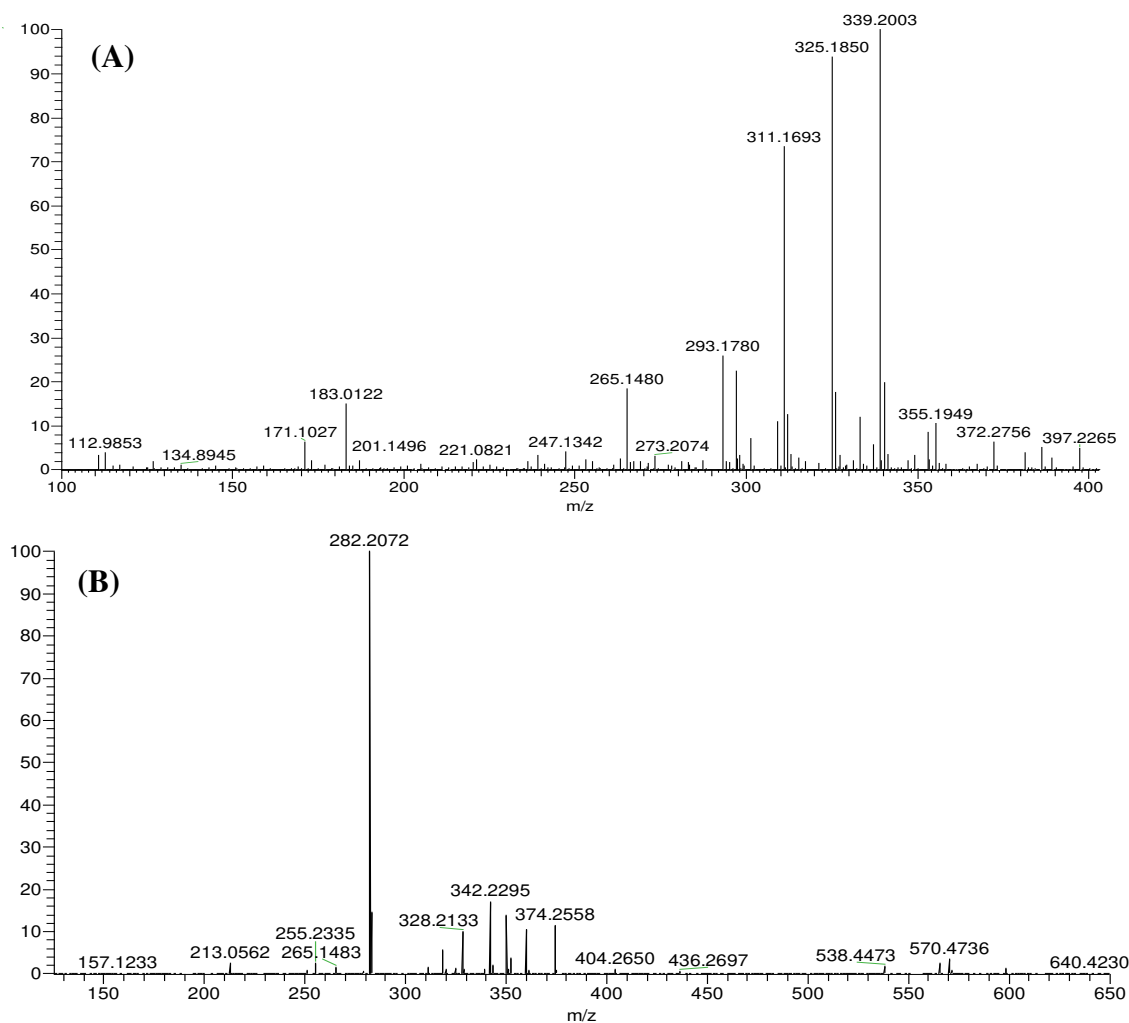
A homosserina e a acil-HSL foram melhores detectadas no modo positivo em níveis de 422,48 e 271,33  $\mu\text{mol/L}$ . Contudo, o ácido graxo e, conseqüentemente, a acil-HSL aberta (este padrão não foi disponível) foram detectados eficientemente no modo negativo em 383,88  $\mu\text{mol/L}$ .

A bioreação para detectar as atividades de acil-HSL lactonase e/ou acil-HSL acilase em *B. cereus* a fim de explicar as degradações sofridas pelas acil-HSLs em co-cultivo de *E. sakazakii* e *B. cereus* foi desenvolvida com (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL e células de *B. cereus* em solução tampão. A solução livre de células desta bioreação foi monitorada por ESI-MS-MS no modo negativo, em intervalos de 1, 3, 5 e 8 h, porém (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL (**2**), *N*-dodecanoil homosserina (**4**), ácido dodecanóico (**5**) e homosserina (**6**) (Figura 23) não foram detectados possivelmente devido à supressão dos sinais. Conseqüentemente, bioreações usando duas cepas diferentes de *B. cereus* (ATCC 14579 e CCT 4060) foram monitoradas por 3 h, sendo extraído previamente com acetato de etila para análise ESI-MS-MS no modo negativo.

A bioreação com *B. cereus* CCT 4060 e (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL (**2**) produziu *N*-dodecanoil-homosserina (**4**), sugerido pela presença do íon quasi-molecular (M-H) de  $m/z$  300,2183, indicando que 18 u foram adicionados à (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL por ação enzimática. Isto está de acordo com a *N*-dodecanoil-homosserina (**4**), confirmando a presença de acil-HSL lactonase (Figura 23). Adicionalmente, os íons quasi-moleculares de  $m/z$  199,1702 e 118,0507 revelaram a formação de ácido dodecanóico (**5**) e homosserina (**6**), respectivamente, que são os produtos esperados de uma acil-homosserina acilase sobre (*S*)-*N*-dodecanoil-homosserina (**4**) (Figura 23). Estes compostos não foram detectados nos extratos de acetato de etila das reações controle com e sem células de *B. cereus* CCT 4060 em tampão fosfato (Figura 24).



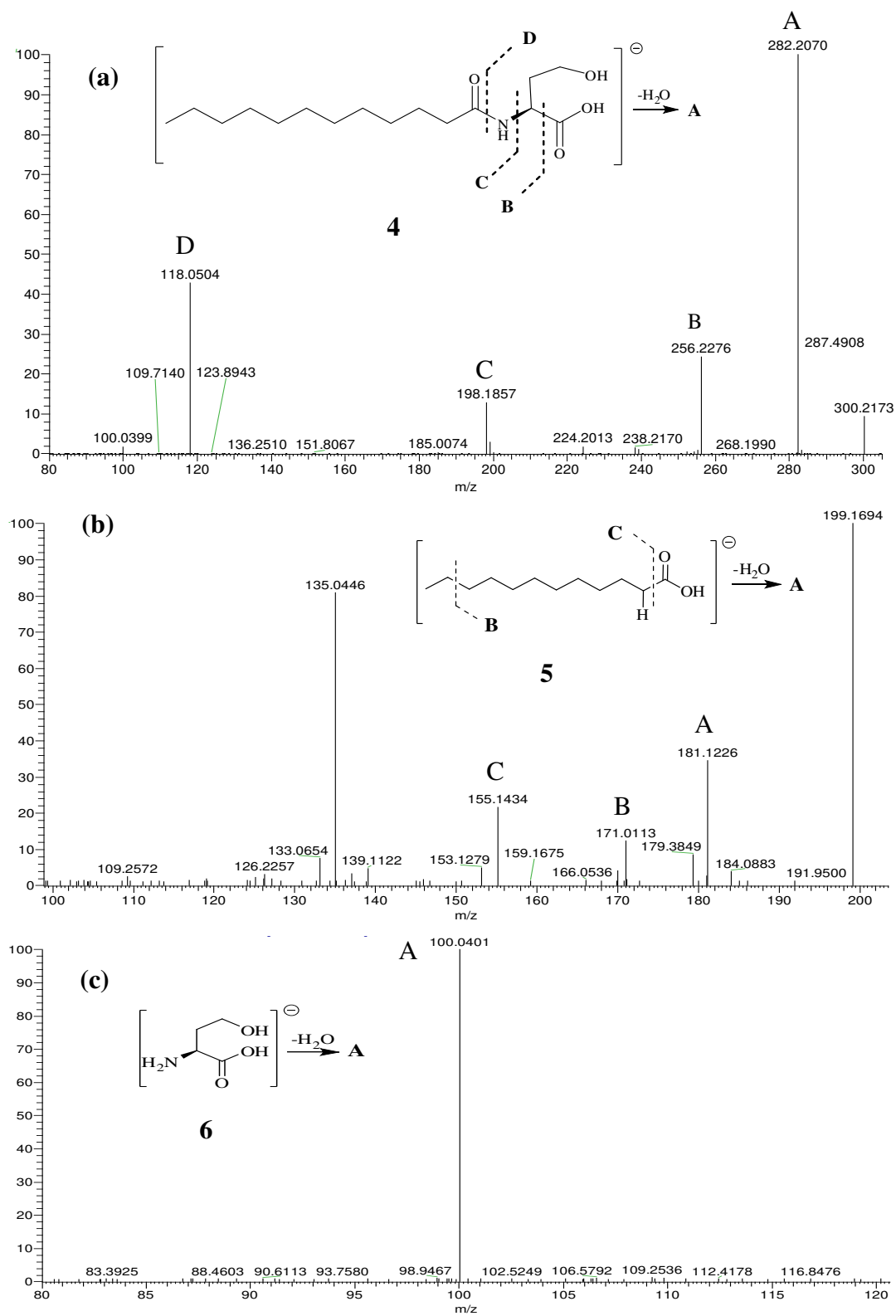
**Figura 23.** Monitoramento da biorreação por ESI-MS. A. Origem esquemática de 4, 5 e 6. B. Espectro e compostos 4, 5 e 6 indicados com setas.



**Figura 24.** A) Espectro do experimento controle usando extrato de acetato de etila do tampão fosfato e células úmidas. B) Espectro do experimento controle usando tampão fosfato e substrato ((S)-N-dodecanoil-HSL).

A fragmentação  $MS^2$  do íon quasi-molecular  $m/z$  300,2183 produziu os íons de  $m/z$  282,2068, característico da perda de uma molécula de água, de  $m/z$  256,2275, atribuída à perda de  $CO_2$ , fragmento de  $m/z$  198,1857, referente à clivagem da ligação N-C, e íon de  $m/z$  118,0504, correspondente à perda da unidade homoserina. A fragmentação  $MS^2$  do íon de  $m/z$  118,0507 produziu o íon de  $m/z$  100,0401 pela perda de uma molécula de água (Figura 25).





**Figura 25.** (a) MS<sup>2</sup> do fragmento de  $m/z$  300,2183; (b) MS<sup>2</sup> do fragmento de  $m/z$  199,1702 e (c) MS<sup>2</sup> do fragmento de  $m/z$  118,0507.

Os genes que codificam enzimas inativadoras de acil-HSLs foram detectados e estudados (Dong et al., 2002), mostrando que eles estão presentes em vários micro-organismos. Além disso, bases de dados de genomas sequenciados mostram organismos que possuem domínios conservados para acil-HSL lactonase e acil-HSL acilase (*Deinococcus*, *Streptomyces*, *Hyphomonas*, *Photorhabdus* e *Ralstonia*), contudo o gênero *Bacillus* apresentou domínios somente para acil-HSL lactonase (Kalia et al., 2011). A atividade de acil-HSL acilases/acil-homosserina acilase nunca foi reportada anteriormente em *Bacillus*, no entanto, baseado na promiscuidade enzimática (Khersonsky e Tawfik, 2010), que se refere a uma enzima aceitar mais de um substrato, e no fato de que peptidases foram detectadas no genoma do *B. cereus* (Tran et al., 2010), estes resultados são novos, mas não inesperados.

Finalmente, em *B. cereus* ATCC 14579 somente lactonase foi detectada, contudo, nenhuma atividade de acil-HSL acilase/acil-homosserina acilase, ou peptidase, foi observada.

## 1.4. Conclusões parciais

Este trabalho revelou que a cepa de *E. sakazakii* produz três acil-HSLs: (*S*)-*N*-heptanoil-HSL, (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL e (*S*)-*N*-tetradecanoil-HSL, resultado não reportado anteriormente para esta espécie. A identificação e caracterização destas estruturas foram importantes nesta primeira etapa, contudo, mais pesquisas serão necessárias para identificar as funções reguladas por estas moléculas em *E. sakazakii*.

O presente trabalho também forneceu evidência da degradação de acil-HSLs durante o co-cultivo de uma bactéria Gram-negativa (*E. sakazakii*) com uma bactéria Gram-positiva (*B. cereus*). A investigação mais aprofundada deste fenômeno revelou uma cascata de reações enzimáticas com uma acil-HSL lactonase e acil-HSL acilase/acil-homosserina acilase ou peptidase, em operação sincronizada, que são responsáveis pela degradação efetuada pelo *B. cereus*, levando à ruptura do sistema de comunicação via acil-HSL.

## CAPÍTULO 2

---



## CAPÍTULO 2.

### Metabólitos secundários de *Epicoccum nigrum* e monitoramento de suas produções em cepas mutantes

#### 2.1. Introdução

As plantas vivem associadas a diversos micro-organismos, e entre estas associações encontram-se as mutualísticas com fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio, e com micro-organismos endófitos (do grego *endon*, no interior, *phyton*, planta), os quais têm proporcionado novas perspectivas para o estudo da interação planta/micro-organismo (Schulz e Boyle, 2005; Azevedo, 1999).

Os micro-organismos endofíticos, geralmente fungos e bactérias, habitam sistematicamente no interior das plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais como folhas, ramos e raízes, sem causar dano aparente aos seus hospedeiros. As distinções entre fungos endofíticos, fitopatogênicos (que causam doenças nas plantas), e epifíticos (que vivem na superfície dos vegetais) são apenas de natureza didática, uma vez que um fungo endofítico pode tornar-se um patógeno dependendo das condições ambientais ou equilíbrio com outros endofíticos, assim como um micro-organismo epifítico pode penetrar no tecido da planta e permanecer por certo período, causando ou não prejuízos (Arnold, 2007; Schulz e Boyle, 2005; Strobel et al., 2004; Azevedo, 1999).

Estes micro-organismos endofíticos são potencialmente úteis na agricultura e na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados como vetores para introdução de genes de interesse nas plantas (Berde et al., 2010; Taghavi et al., 2005), como agentes biocontroladores de pragas e patógenos

(Sandhu et al., 2012; Ryan et al., 2008) e como fontes de metabólitos primários (Rajulu et al., 2011) e secundários de interesse, como o agente antitumoral taxol (Stierle et al., 1993), e diversos outros antibióticos.

Apenas uma pequena fração de aproximadamente 300.000 espécies de plantas existentes foi investigada quanto ao potencial metabólico da microbiota endofítica cultivável, conseqüentemente, a oportunidade de encontrar novas espécies de micro-organismos endofíticos entre a miríade de plantas em diferentes ecossistemas é muito grande. Desta forma, a bioprospecção de endófitos é considerada uma estratégia inteligente para busca de novos compostos, permitindo identificar novas moléculas e condições fisiológicas para a sua produção (Yu et al., 2010; Strobel e Daisy, 2003).

### **2.1.1. Fungos endofíticos**

Os fungos endofíticos são fontes promissoras de novos produtos naturais (Schultz e Boyle, 2005; Strobel e Daisy, 2003). São representados por dois grupos principais, os endófitos clavicipitaceos (C-endófitos) que infectam algumas gramíneas, e os endófitos não-clavicipitaceos (NC-endófitos), que podem ser encontrados em tecidos de plantas não vasculares, gimnospermas e angiospermas (Rodriguez et al., 2009).

A biodiversidade dos fungos endofíticos é composta por representantes dos filos Ascomycota, Zygomycota, Basidiomycota, Glomerulomycota e Dothideomycete (Arnold, 2007; Huang et al., 2001), incluindo uma diversidade de gêneros como *Fusarium*, *Neotyphodium*, *Epicoccum*, *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Neotyphodium*, dentre vários outros (Almeida et al., 2005).

Todas as plantas em seus ecossistemas naturais parecem ocorrer de forma simbiótica com fungos endofíticos (Schultz e Boyle, 2005). A interação biológica mais simples neste sistema é a relação mutualística, onde a planta fornece nutrientes ao fungo e, em contrapartida, este fornece algum tipo de proteção (Schultz e Boyle, 2005; Backman e Sikora, 2008; Castilho et al., 2007). Dentre os benefícios que a planta recebe, os micro-organismos endófitos podem melhorar a absorção de nutrientes das plantas hospedeiras, promover o seu crescimento, aumentar a tolerância a estresses abióticos e resistência a patógenos, e eventualmente proporcionar um aumento da biomassa das plantas (Mei e Flin, 2010). A energia perdida pelo vegetal na produção de biomassa endofítica é integralmente compensada pela melhoria da saúde da planta pela presença destes micro-organismos mutualísticos (Backman e Sikora, 2008; Mei e Flin, 2010).

Uma proporção elevada de fungos endofíticos (80%) produziram compostos biologicamente ativos em testes para atividade antibacteriana, fungicida e herbicida. Apesar das plantas colonizadas por fungos endofíticos não exibirem sintomas evidentes de doenças, dos isolados de plantas saudáveis, 43% expressaram atividades herbicidas (Schultz e Boyle, 2005; Schulz et al., 1999).

Tan e Zou (2001) revisaram uma diversidade de metabólitos que foram isolados de fungos endofíticos, enfatizando seus possíveis papéis ecológicos. As raízes de plantas colonizadas por endófitos crescem mais rapidamente do que aquelas não infectadas, devido à liberação de fitohormônios e outras substâncias promotoras de crescimento pelos fungos simbiotes (Schultz e Boyle, 2005).

Existe uma chamada geral para a descoberta de novos antibióticos mais eficazes no combate de doenças, assim como agentes quimioterapêuticos que tenham baixa toxicidade e agroquímicos que apresentem menor impacto ambiental. Esta pesquisa é impulsionada pelo desenvolvimento de micro-organismos



infecciosos resistentes (por exemplo, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*) aos tratamentos existentes (Strobel et al., 2004 e 2003). Estudos demonstraram que 51% de compostos bioativos isolados de fungos endofíticos possuem estrutura química desconhecida, tratando-se de novos compostos bioativos. Reforça-se, portanto, o grande potencial para a descoberta de substâncias antimicrobianas novas, altamente bioativas e de baixa toxicidade (Schutz et al., 2001).

Uma diversidade de metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos foi descrita nos últimos anos, incluindo peptídeos, alcalóides, quinonas, terpenóides, esteróides, flavonóides, fenóis, dentre outros. Estes produtos naturais de fungos endofíticos mostraram inibir ou matar uma ampla variedade de microorganismos nocivos, tais como fitopatógenos, bactérias, vírus e protozoários que afetam seres humanos e animais (Yu et al., 2010; Strobel et al., 2004). Basicamente estes metabólitos secundários são derivados de quatro classes de enzimas: poliketídeo sintases (PKS), peptídeo sintases não ribossômicas (NRPS), terpeno sintases (TS) e dimetilalil difosfato triptofano sintases (DMATS), sendo que cada uma destas classes utiliza metabólitos simples como substrato, que são rearranjados ou condensados em moléculas mais complexas, como poliketídeos, peptídeos não-ribossômicos, terpenos e alcalóides (Fox e Howlett, 2008; Keller et al., 2005).

O taxol (Paclitaxel<sup>®</sup>) (Figura 26), um diterpenóide altamente funcionalizado com potente atividade antitumoral e de alto valor no mercado internacional, isolado originalmente das cascas da planta *Taxus brevifolia*, era inicialmente conhecido como produzido somente a partir de algumas espécies vegetais. Stierle et al. (1993) demonstraram que o mesmo poderia ser produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado da casca da árvore *Taxus brevifolia*. Estudos desenvolvidos por Li et al. (1996) revelaram que o fungo endofítico *Pestalotiopsis*

*microspora* de *Taxus wallichiana*, planta nativa do Nepal, também produzia taxol. Desta forma, um grande número de fungos endofíticos produzem taxol, mostrando que esta molécula é de distribuição mundial e não confinada simplesmente a endofíticos de árvores da família das taxáceas (Liu et al., 2009).

A vincristina (Figura 26), outra droga com atividade antitumoral e originalmente obtida de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), também foi detectada em culturas de um endófito, *Fusarium oxysporum*, na mesma planta (Lingqi et al., 2000; Johnson et al., 1963). Este alcalóide é terapêuticamente utilizado no tratamento de várias doenças neoplásicas (Mann, 2002; Owellen e Donigian, 1972).

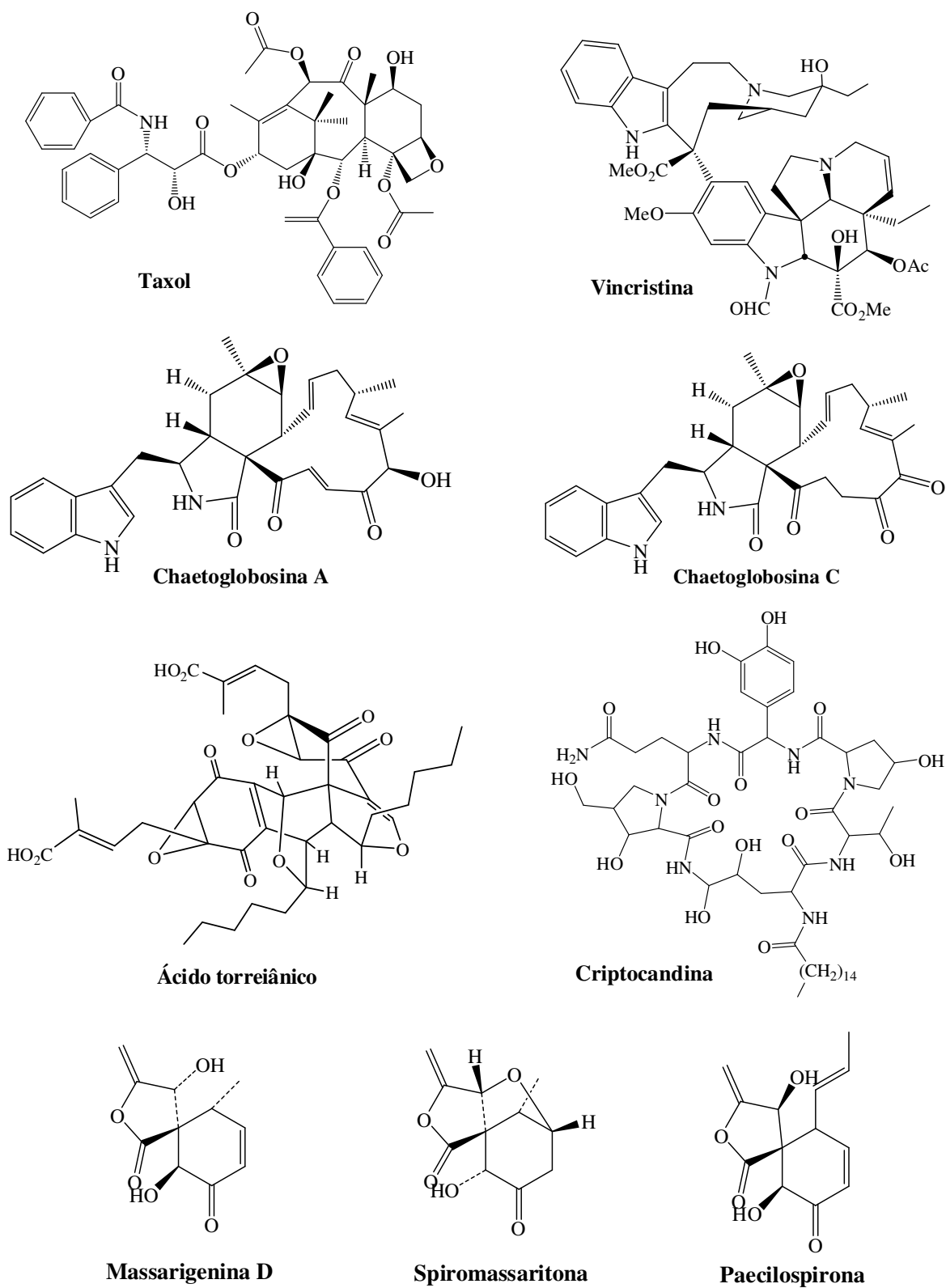
Os alcalóides chaetoglobosinas A e C (Figura 26) foram isolados e caracterizados da cultura de *Chaetomium globosum*, proveniente originalmente das folhas de *Ginkgo biloba*. Estes metabólitos mostraram significativa atividade contra *Mucor miehei* e *Artemia salina* (Qin et al., 2009). As chaetoglobosinas A e C, juntamente com outras micotoxinas, agentes químicos e particulados, foram apontadas como responsáveis pela diminuição da qualidade do ar em interiores de edifícios, causando a "Síndrome dos Edifícios Doentes" (Fogle et al., 2007).

Ácido torreiânico, uma quinona dimérica seletivamente citotóxica e agente anticancerígeno, foi isolado do fungo endofítico *Pestalotiopsis microspora* de *Torreya taxifolia*, árvore em extinção (Figura 26). Este composto foi testado em diversas linhagens de células cancerígenas, demonstrando ser 5 a 10 vezes mais potente nas linhagens sensíveis aos agonistas de proteína quinase C (Li et al., 2003; Lee et al., 1996).

*Cryptosporiopsis* cf. *quercina* foi isolado como endófito de *Tripterigeum wilfordii*, planta medicinal nativa da Eurásia, e demonstrou uma excelente atividade antifúngica contra alguns patógenos humanos, incluindo *Candida albicans* e *Trichophyton* spp. Um único peptídeo antimicótico denominado criptocandina foi

isolado e caracterizado de *C. quercina*, contendo um número peculiar de ácidos hidroxilados além de um novo aminoácido, a 3-hidroxi-4-hidroxi-metil-prolina (Figura 26). Criptocandina também é ativa contra um número de fungos patogênicos de plantas incluindo *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea*, e atualmente está sendo considerada para o uso contra um número de fungos que causam doenças de pele e unhas (Strobel et al., 1999).

Sun et al. (2011) isolaram três novos metabólitos com esqueleto carbônico contendo um anel espiro-5,6-lactona (Figura 26), do fungo endofítico *Massrison* sp. associado com *Rehmannia glutinosa*, uma importante erva tradicional da China utilizada no tratamento de aftas e carcinoma de mama. Estes compostos mostraram-se ativos contra fungos patogênicos e células tumorais.

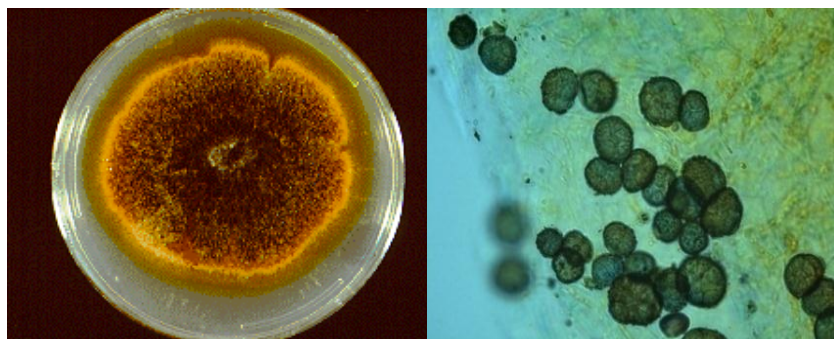


**Figura 26.** Metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos.

### 2.1.2. *Epicoccum nigrum*

Fungos do gênero *Epicoccum* são encontrados em plantas, solo, ar, pele humana e insetos. Sua disseminação ocorre por meio de esporos secos conduzidos pelo vento (Martini et al., 2009; Camatti-Sartori et al., 2005; Almeida et al., 2005; Wittig et al., 1997). Até 1959 aproximadamente 70 espécies do gênero *Epicoccum* foram descritas, as quais foram reavaliadas e unificadas em uma única espécie variável, a *Epicoccum nigrum* Link (sinonímia *Epicoccum purpurascens* Ebernb. ex. Schlecht.) (Schol-Schwaz, 1959). Contudo, recentemente Fávaro et al. (2011) desenvolveram uma análise por meio de abordagem polifásica e sugeriram a ocorrência de espécies ocultas dentro de *E. nigrum* e também que muitas das sequências depositadas como *E. nigrum* no GenBank e coleção de cultura de cepas microbianas deveriam ser reclassificadas, incluindo a cepa CBS 161.73 sequenciada por estes pesquisadores. Os compostos encontrados neste gênero estão sumarizados no Quadro 2.

A espécie *E. nigrum* (Figura 27) é responsável pela produção de uma diversidade de metabólitos secundários (Quadro 2) que apresentam as mais variadas atividades biológicas, tais como antifúngica, antioxidante, antitumoral, bactericida, etc.



**Figura 27.** *Epicoccum nigrum* Link. Fonte: <http://www.mycology.adelaide.edu.au>.

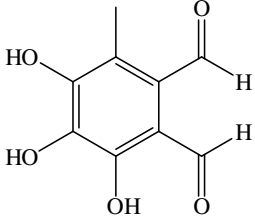
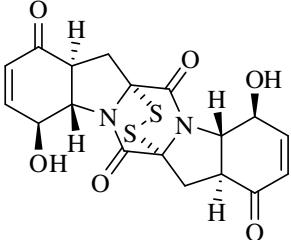
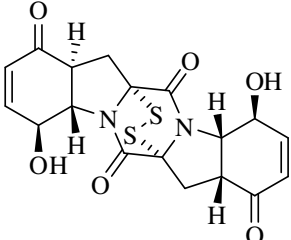
Dentre os compostos encontrados em *E. nigrum*, a flavina apresenta toxicidade contra fungos, sendo fracamente ativo contra bactérias (Raistrick e Rudman, 1956; Bamford *et al.*, 1961; Brown *et al.*, 1987; Madrigal e Melgarejo, 1995). A epirodina, nome dado à mistura das epirodinas A e B interconvertíveis em solução, são moléculas capazes de inibir o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* e promover a hemólise de eritrócitos (Ikawa *et al.*, 1978). A triornicina é um sideróforo que apresenta atividade antitumoral (Frederick *et al.*, 1981). A epicoccina A mostrou atividade contra *Bacillus subtilis* (Zhang *et al.*, 2007), e as epicorazinas A e B foram ativas contra *Staphylococcus aureus* (Baute *et al.*, 1978) e os fungos *Phytophthora* spp. e *Pythium* spp. (Brown *et al.*, 1987). O orevactaeno inibe a ligação entre a proteína regulatória Rev de HIV-1 e seu sítio de ligação ao RNA viral, inibindo a replicação do HIV (Shu *et al.*, 1987). A epicocconona é um fluoróforo utilizado na coloração de membranas de células e géis de proteína e comercialmente disponível como LavaCell™ (ActiveMotif) e como Deep Purple™ Total Protein Stain (GE Healthcare) (Bell e Karuso, 2003). O composto D8646-2-6 foi isolado como inibidor de telomerase pelo grupo Mitsubishi Pharma Corporation (Kanai *et al.*, 2007). A epicoccalona é inibidora de serino protease do tipo  $\alpha$ -quimotripsina (Wangun *et al.*, 2008). As epicoccinas G e H, bem como a difenilalazina A, apresentaram inibição contra a replicação de HIV-1 em células C8166 (Guo *et al.*, 2009). Epicoccinas E, M, S e *ent*-epicoccina G mostraram uma potente atividade *in vitro* contra a liberação de  $\beta$ -glucuronidase em leucócitos polimorfonucleares de ratos induzidos pelo fator de ativação plaquetária (Wang *et al.*, 2010).

A interação endofítica de *E. nigrum* com plantas é extremamente útil no biocontrole de fitopatógenos que prejudicam vários tipos de culturas, tendo em vista que este fungo é particularmente importante como produtor de antibióticos

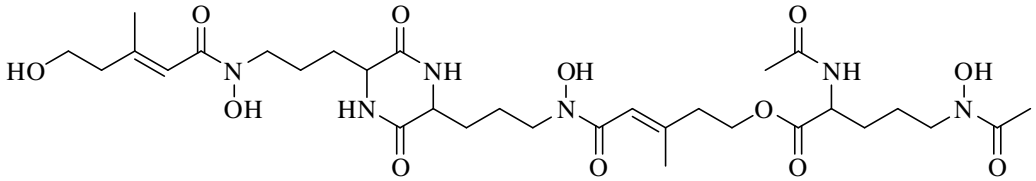
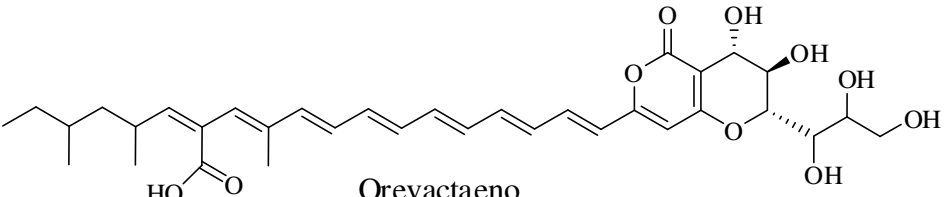
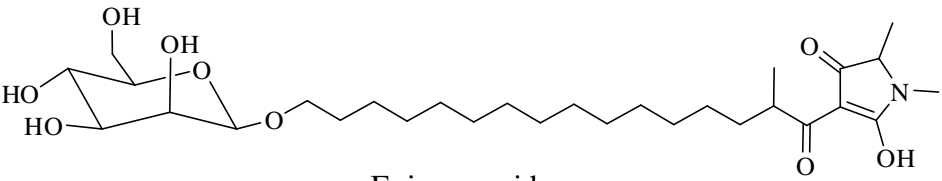
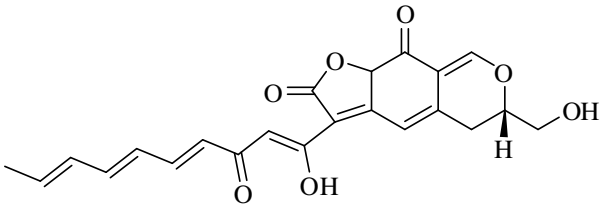
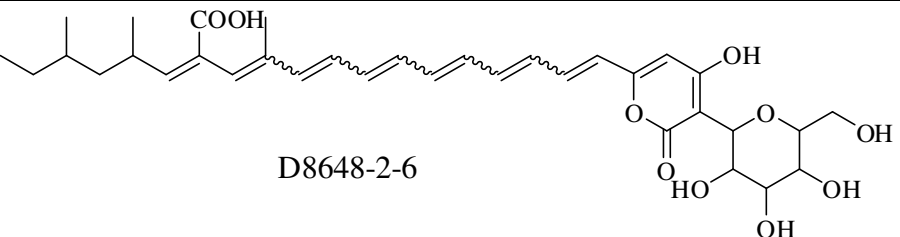
(Almeida et al., 2005). *E. nigrum* é um componente comum da microflora residente (Park, 1982; Melgarejo et al., 1985), servindo como saprófito primário sobre diferentes órgãos de plantas vivas e secas.

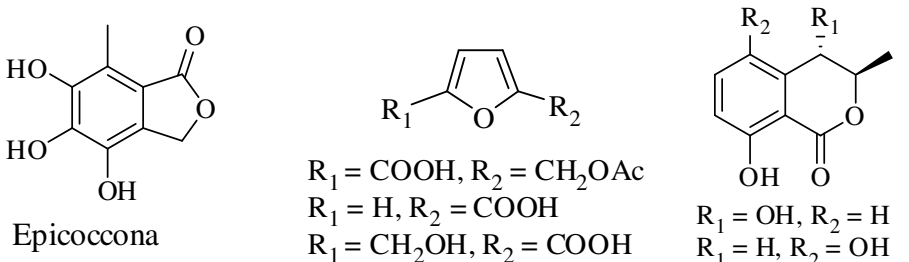
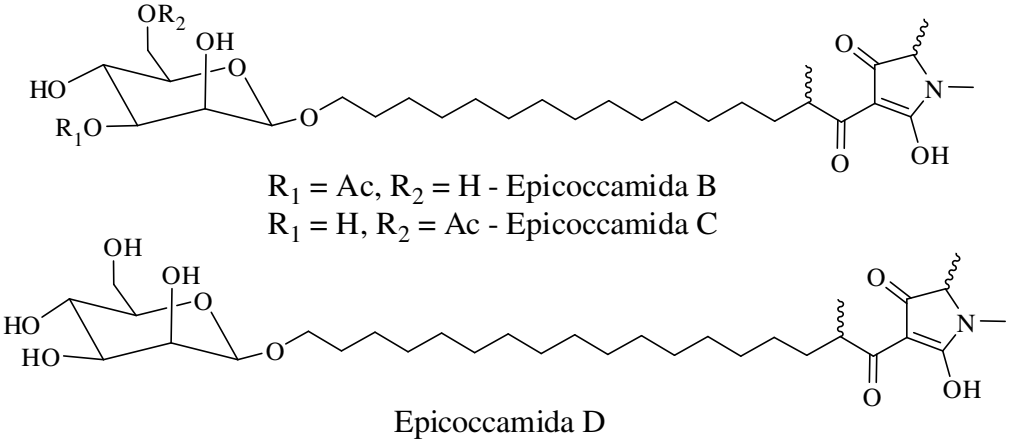
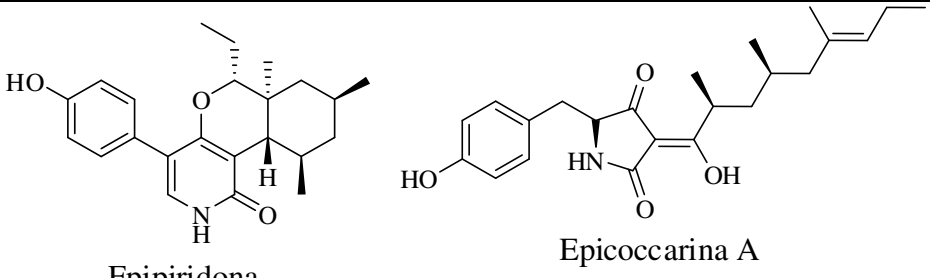
*E. nigrum* demonstrou atividade contra *Monilinia laxa*, um fungo fitopatogênico que causa doença em culturas de frutas de caroços (Madrigal et al., 1991; Madrigal e Melgarejo, 1995). Também foi relatada sua atividade de inibição contra patógenos de uva como *Plasmopara viticola* (Kortekamp, 1997), bem como contra *Pythium* spp., que afetam plantas de algodão (Hashem e Ali, 2004). *E. nigrum* também foi descrito como antagonista de vários fitopatógenos aéreos, tais como *Leucostoma cincta* (Biggs e Alm, 1992) e *Sclerotinia sclerotiorum* (Zhou et al., 1991; Pieckenstain et al., 2001). Pesquisas desenvolvidas por Musseti et al. (2011) mostraram que a inoculação de *E. nigrum* melhorou a resistência de *Cantharanthus roseus* contra fitoplasmas.

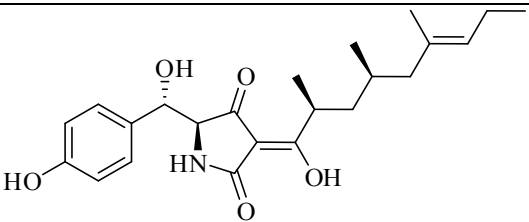
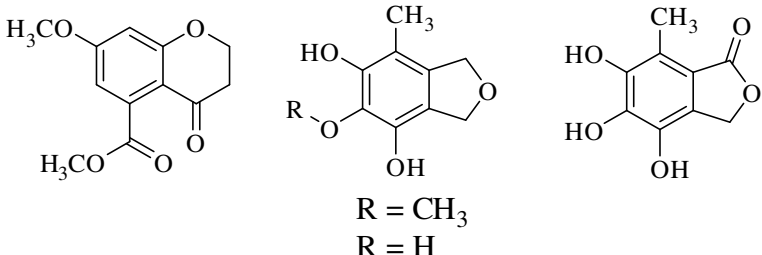
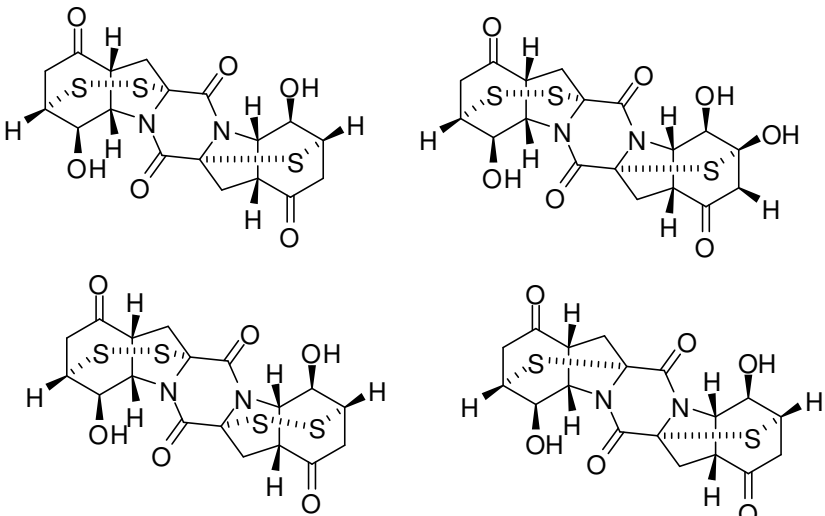
**Quadro 2.** Metabólitos secundários produzidos por *Epicoccum* spp.

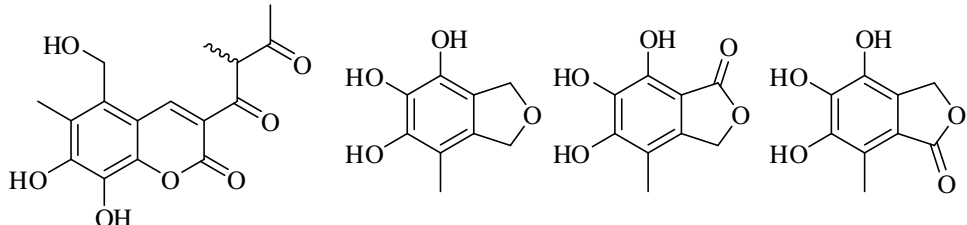
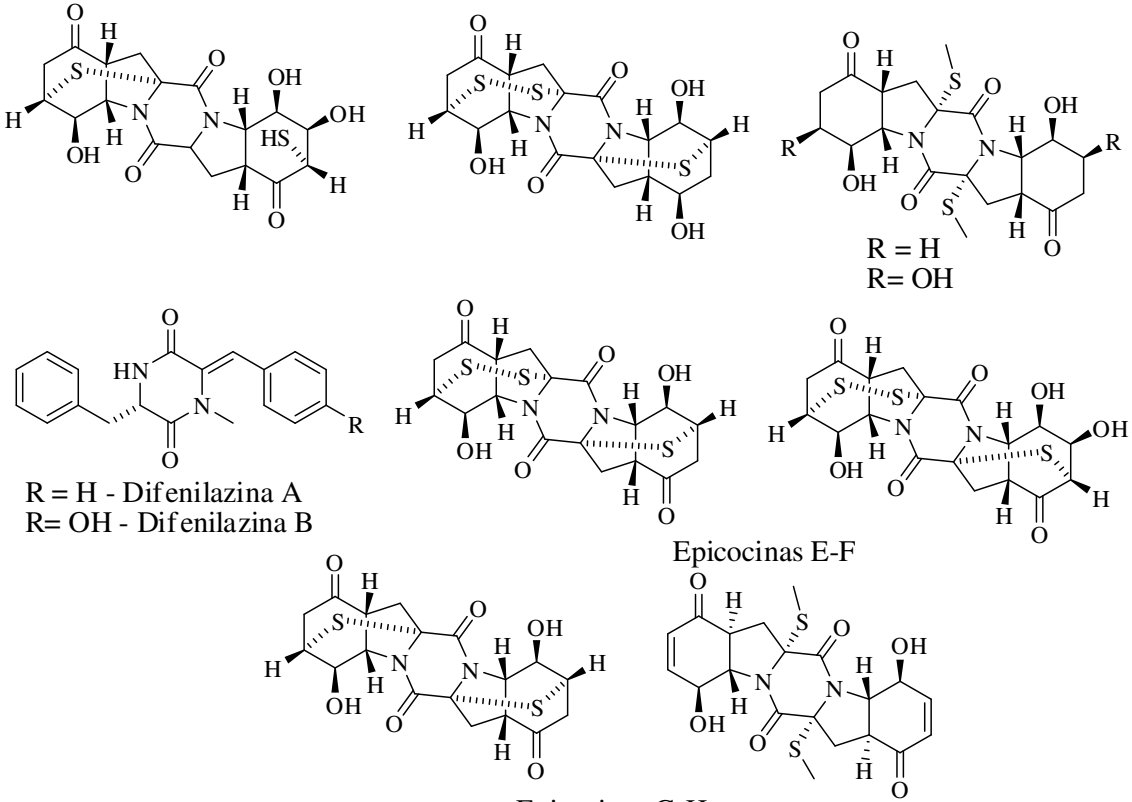
Espécie	Compostos	Referência
<i>E. nigrum</i>	 <p data-bbox="947 526 1079 561">Flavipina</p>	Bamford et al., 1961
<i>E. nigrum</i>	Epirodina (estrutura indefinida)	Ikawa et al., 1978
<i>E. nigrum</i>	 <p data-bbox="940 899 1127 935">Epicorazina A</p>	Diffieux et al., 1978
<i>E. nigrum</i>	 <p data-bbox="940 1201 1127 1237">Epicorazina B</p>	Deffieux et al., 1978

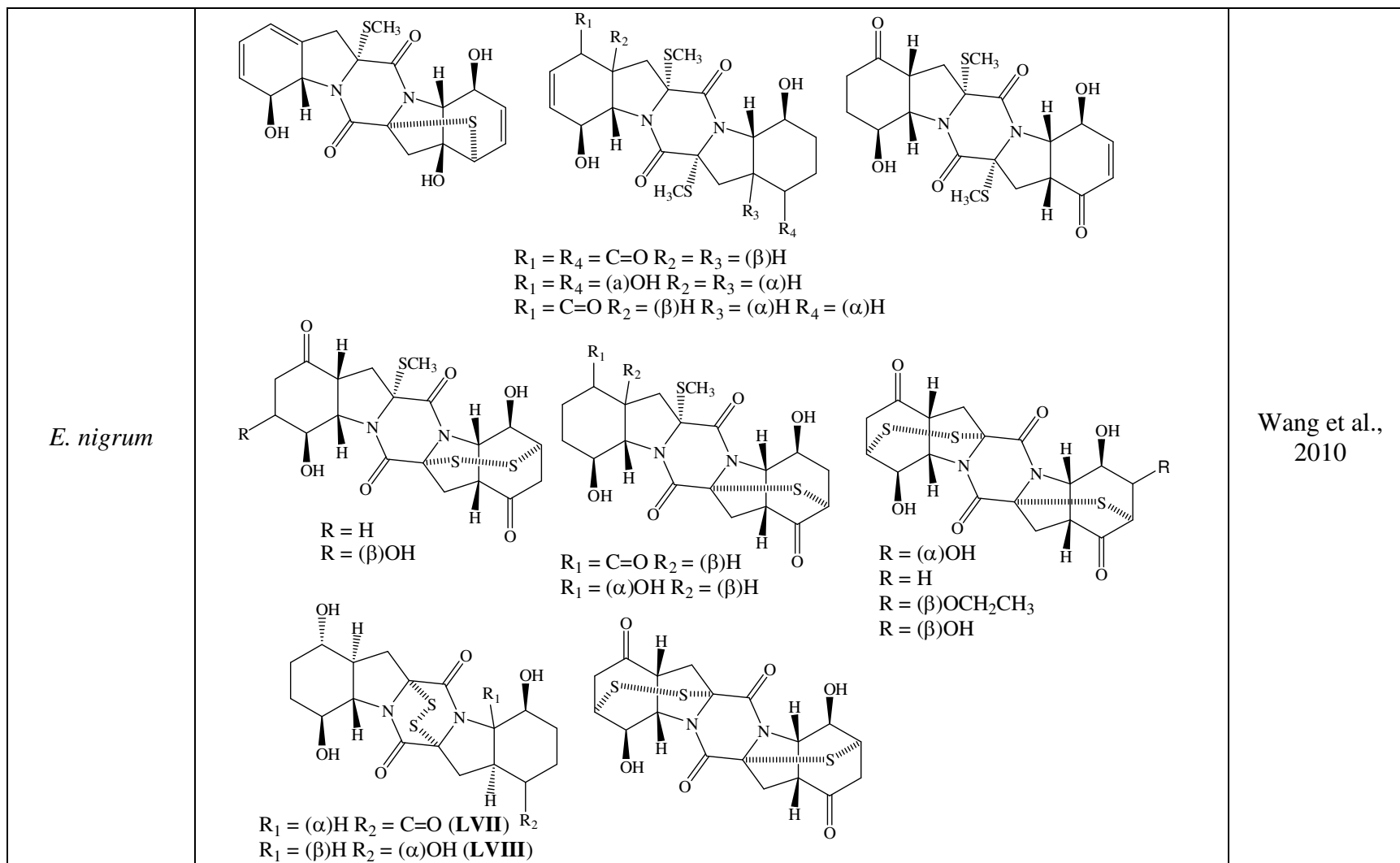


<p><i>E. nigrum</i></p>	 <p>Triornicina</p>	<p>Friederick et al., 1981</p>
<p><i>E. nigrum</i></p>	 <p>Orevactaeno</p>	<p>Shu et al., 1997</p>
<p><i>E. nigrum</i></p>	 <p>Epicoccamida</p>	<p>Wright et al., 2003</p>
<p><i>E. nigrum</i></p>	 <p>Epicocconona</p>	<p>Bell et al., 2003</p>
<p><i>E. nigrum</i></p>	 <p>D8648-2-6</p>	<p>Kanai et al., 2003</p>

<p><i>Epicoccum</i> sp.</p>	 <p>Epicoccona</p> <p> <math>R_1 = \text{COOH}, R_2 = \text{CH}_2\text{OAc}</math>  <math>R_1 = \text{H}, R_2 = \text{COOH}</math>  <math>R_1 = \text{CH}_2\text{OH}, R_2 = \text{COOH}</math> </p> <p> <math>R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}</math>  <math>R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}</math> </p>	<p>Abdel-Lateff et al., 2003</p>
<p><i>Epicoccum</i> sp.</p>	 <p> <math>R_1 = \text{Ac}, R_2 = \text{H}</math> - Epicoccamida B  <math>R_1 = \text{H}, R_2 = \text{Ac}</math> - Epicoccamida C         </p> <p>Epicoccamida D</p>	<p>Wangun et al., 2007</p>
<p><i>Epicoccum</i> sp.</p>	 <p>Epipiridona</p> <p>Epicocarina A</p>	<p>Wangun e Hertweck, 2007</p>

	 <p>Epicoccarina B</p>	
<i>E. nigrum</i>	 <p>R = CH<sub>3</sub> R = H</p>	Lee et al., 2007
<i>E. nigrum</i>	 <p>Epicoccinas A-D</p>	Zhang et al., 2007

<p><i>Epicoccum</i> sp.</p>	 <p>Epicoccalona</p> <p>Derivados de isobenzofuranos</p>	<p>Wangun et al., 2008</p>
<p><i>E. nigrum</i></p>	 <p>R = H - Difenilazina A R = OH - Difenilazina B</p> <p>Epicocinas E-F</p> <p>Epicocinas G-H</p>	<p>Guo et al., 2009</p>



## 2.2. Objetivos

### 2.2.1. Gerais

Linhagens do fungo endofítico *E. nigrum*, isoladas de cana-de-açúcar, foram avaliadas quanto a sua capacidade de inibir diferentes patógenos de interesse clínico e agrônômico pela equipe do Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo (Esalq/USP-Piracicaba e Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana/USP-São Paulo). A linhagem que apresentou maior atividade inibitória (P16 selvagem) foi submetida a uma transformação mediada por *A. tumefaciens*, com inserção do gene *hph*, que confere resistência a higromicina, e do gene *gfp*, que leva a fluorescência sob luz UV. Devido ao fato desta inserção ser aleatória, aproximadamente 1000 mutantes foram avaliados, dos quais 12 perderam em maior ou menor grau a atividade inibitória frente aos diferentes patógenos (Fávaro, 2009). Desta forma, o objetivo da presente pesquisa foi monitorar alguns metabólitos secundários produzidos por *E. nigrum* selvagem e mutantes.

### 2.2.2. Específicos

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos acetato de etila das linhagens de *E. nigrum* selvagem e três mutantes P16-47set, P16-17 e P16-91;
- Isolar e caracterizar estruturalmente alguns metabólitos secundários presentes no extrato acetato de etila de *E. nigrum* P16 selvagem e monitorá-los nos extratos dos mutantes.

### 2.3. Resultados e Discussão

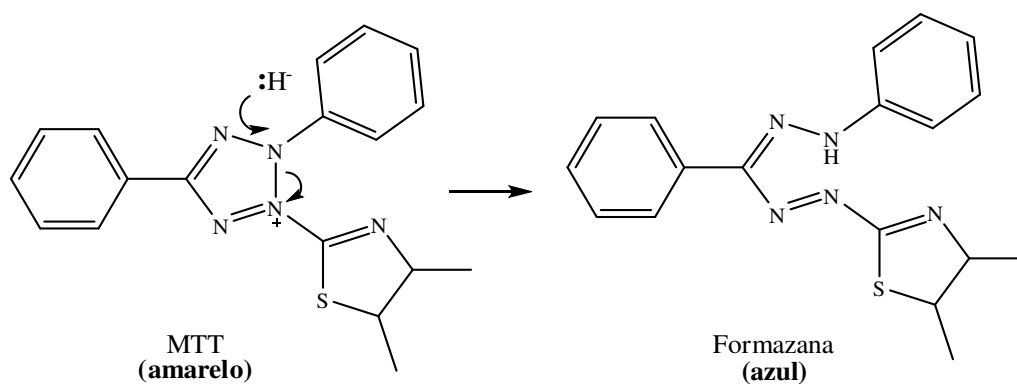
As linhagens de *E. nigrum* P16-selvagem e os mutantes P16-47set, P16-17 e P16-91 foram cultivados em larga escala e após cultivo os sobrenadantes foram extraídos com acetato de etila fornecendo os extratos brutos que foram avaliados quanto aos seus potenciais antimicrobianos mediante a determinação das concentrações inibitórias mínimas contra os micro-organismos representativos de bacilo (*Bacillus subtilis*), bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli*) e bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*). A presença de compostos bioativos foi indicada por manchas claras sob o fundo azul escuro, após revelação com brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (Figura 28). Na presença de células vivas, o MTT é reduzido a formazana (azul), permanecendo amarelo onde o crescimento das células foi inibido (Bicalho *et al.*, 2003).

Todos os extratos de acetato de etila dos mutantes mostraram-se incapazes de inibir o crescimento de *E. coli* na faixa de concentração de 500 a 3,91 ppm, enquanto o extrato do fungo selvagem inibiu a uma concentração mínima de 250 ppm. As concentrações inibitórias mínimas dos extratos dos mutantes P16-47set e P16-91 frente aos micro-organismos *S. aureus* e *B. subtilis* foram semelhantes às do fungo selvagem, em contrapartida, o extrato do mutante P16-17 apresentou menor potencial antimicrobiano. O controle do branco, realizado com água e dimetilsulfóxido, foi incapaz de inibir o crescimento de *S. aureus*, mas afetou *B. subtilis* e *E. coli* na concentração de 500 ppm, enquanto o controle positivo com cloridrato de ciprofloxacino foi bastante eficiente inibindo o crescimento de todos os micro-organismos na faixa de concentração de 500 a 3,91 ppm (Tabela 2).

**Tabela 2.** Concentração mínima inibitória (ppm) dos extratos de *E. nigrum* selvagem e mutantes.

Extratos	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Água/DMSO 20%	NI	500	500
Antibiótico	< 3,91	< 3,91	< 3,91
Selvagem	250	125	250
Mutante P16-47set	250	125	NI
Mutante P16-17	250-500	250	NI
Mutante P16-91	250	125	NI

\*NI = não inibiu o crescimento do micro-organismo.



**Figura 28.** Reação de redução de MTT (amarelo) em formazana (azul) pelas células microbianas.

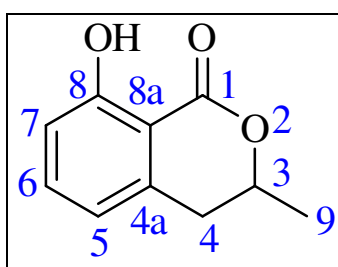
O extrato acetato de etila de *E. nigrum* selvagem foi submetido à purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica, utilizando hexano, acetato de etila, metanol, em ordem crescente de polaridade, finalizando com éter etílico/ácido fórmico. Foram obtidas 27 frações que depois de analisadas por CCD foram reagrupadas em 14 frações, das quais F2 a F7 e F11 mostraram atividade antimicrobiana por bioautografia contra *S. aureus*. As frações F3, F5 e F6 foram



submetidas a um novo processo de purificação cromatográfica visando o isolamento de compostos bioativos.

### 2.3.1. Elucidação estrutural das substâncias isoladas

#### 2.3.1.1. Meleína



**Figura 29.** (a) Estrutura da meleína (7).

A purificação da fração F3 resultou no isolamento da meleína (3,4-di-hidro-8-hidroxi-3-metil-isocumarina) (7, Figura 29), que foi isolada como um sólido branco com a fórmula molecular  $C_{10}H_{10}O_3$ . O espectro de massas de 7 apresentou íon molecular  $m/z$  178 ( $M^+$ , 100%) (Figura 11A em anexo). As análises dos espectros de RMN de  $^1H$ ,  $^{13}C$  (CPD, DEPT 135° e DEPT 90°), correlação homonuclear  $^1H$ ,  $^1H$  (gCOSY) e correlação heteronuclear  $^1H$ ,  $^{13}C$  a uma ligação (gHSQC) de 7 (Tabela 3 e Figuras 12-16A em anexo) mostraram que os deslocamentos químicos foram de acordo com os valores da literatura para a (3*R*)-meleína, isolada originalmente da espécie *Aspergillus melleus* (Nishikawa, 1993). Dentre outras fontes, a meleína também foi reportada em fungos endofíticos (Floerke et al., 2006), plantas (Rukachaisirikul et al., 2005), como feromônio de trilha da formiga *Lasius fuliginosus* (Kern et al., 1997), em secreções mandibulares de formigas *Carpenter* (Brand et al., 1973) e secreções de defesa de cupins (Blun et

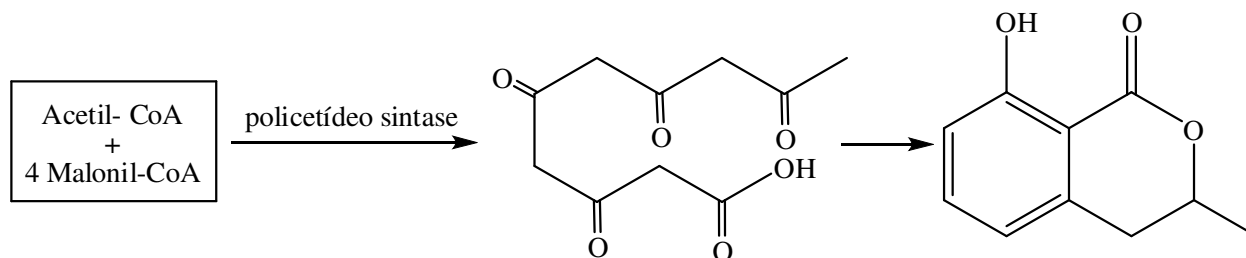
al., 1982), apresentando uma variedade de atividades biológicas, tais como bactericida, fungicida e algicida (Efdi et al., 2007; Hoelker e Simpson, 1999; Sun e Toia, 1993), o que justifica a atividade observada na fração da qual foi isolada. Este é o primeiro relato de ocorrência de meleína em *E. nigrum*, porém, alguns derivados já haviam sido encontrados como a (-)-(3*R*,4*S*)-4-hidroxi-meleína e a (-)-(3*R*)-5-hidroxi-meleína em *Epicoccum* sp. (Abdel-Lateff et al., 2003).

**Tabela 3.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para a meleína (**7**) em  $\text{CDCl}_3$ .

Atribuição	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	<i>J</i> (Hz)
1	170,1, C	-	-
3	76,3, CH	4,74 (m)	<i>J</i> = 6,0
4	34,8, CH <sub>2</sub>	2,93 (d)	<i>J</i> = 7,5
4a	139,3, C	-	-
5	118,1, CH	6,69 (d)	<i>J</i> = 7,5
6	136,3, CH	7,41 (dd)	<i>J</i> = 8,5 e 8,0
7	116,5, CH	6,89 (d)	<i>J</i> = 8,5
8	162,4, C	-	-
8a	108,5, C	-	-
9	21,0, CH <sub>3</sub>	1,53 (d)	<i>J</i> = 6,0
8-OH	-	11,03 (s)	-

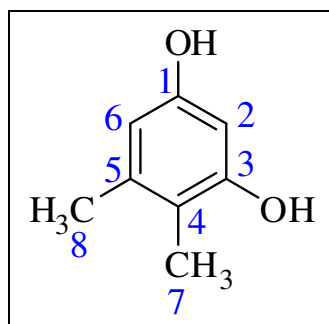
Estudos biossintéticos mediante incorporação de precursores contendo átomos marcados revelaram a origem policetídica da meleína (Sun e Toia, 1993; Abell et al., 1983; Holker e Simpson, 1981). A primeira etapa na síntese desta isocumarina consiste na condensação de uma unidade acetil-CoA com quatro

unidades de malonil-CoA pela ação de uma poliketídeo sintase (Figura 30) (Ringot et al., 2006; O’Callaghan et al., 2003).



**Figura 30.** Biossíntese da meleína.

### 2.3.1.2. 4,5-Dimetil-resorcinol



**Figura 31.** Estrutura de 4,5-dimetil-resorcinol (**8**).

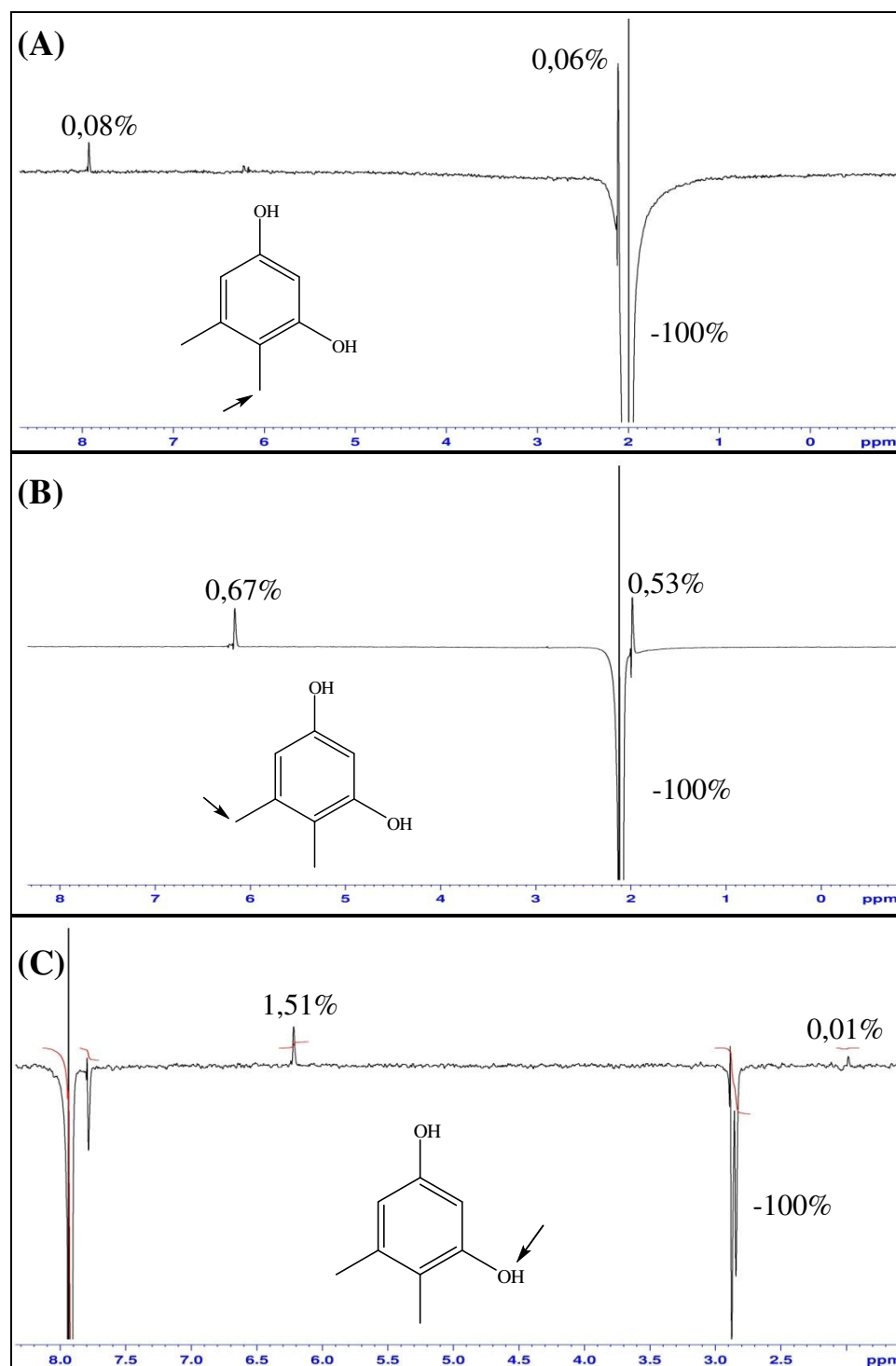
A purificação da fração F5 resultou no isolamento do 4,5-dimetil-resorcinol (4,5-dimetil-benzeno-1,3-diol) (**8**, Figura 31), com fórmula molecular  $C_8H_{10}O_2$ . O espectro de massas de **8** apresentou íon molecular  $m/z$  138 ( $M^+$ , 9%) (Figura 17A em anexo).

O espectro de RMN de  $^1H$  de **8** (Figura 18A - anexo) apresentou um duplete em  $\delta_H$  6,24 ( $J = 2,0$  Hz) correspondente a um hidrogênio acoplado ao hidrogênio em  $\delta_H$  6,18 ( $J = 2,0$  Hz), com acoplamento *meta* de hidrogênio em anel aromático, dois simpletos correspondes a duas metilas em  $\delta_H$  2,13 e  $\delta_H$  2,00 e dois simpletos

referentes aos hidrogênios hidroxílicos em  $\delta_H$  7,78 e 7,92 (Tabela 4). As análises dos espectros de RMN de  $^{13}C$  (CPD, DEPT 135° e DEPT 90°) e correlação heteronuclear  $^1H$ ,  $^{13}C$  a uma ligação (gHSQC) de **8** indicaram a presença de 8 sinais referentes a 2  $CH_3$ , 2  $CH$  e 4  $C$  quaternários (Tabela 4 e Figuras 19-21A em anexo).

O espectro de diferença de NOE (Figura 32) apresentou incrementos de 0,06% e 0,08% nos sinais dos hidrogênios de H-8 ( $\delta_H$  2,13) e OH-3 ( $\delta_H$  7,92), respectivamente, quando a metila H-7 em  $\delta_H$  2,00 foi irradiada, concluindo-se, que a mesma encontrava-se ligada ao carbono 4 ( $\delta_C$  114,4). A vizinhança da metila H-8 em  $\delta_H$  2,13 ao H-6, em  $\delta_H$  6,18, foi confirmada pelo incremento de 0,53% no sinal do hidrogênio H-6 quando esta metila foi irradiada, observando-se adicionalmente o incremento de 0,67% no sinal de H-7. A irradiação do hidrogênio da hidroxila em  $\delta_H$  7,92 provocou os incrementos de 1,51 e 0,01 nos sinais de H-2 ( $\delta_H$  6,24) e H-7 ( $\delta$  2,00), respectivamente, confirmando as atribuições apresentadas na Tabela 4.

4,5-Dimetil-resorcinol foi isolado do fungo *Penicillium spinulosum* (Verachter e Hanssens, 1975). Este composto foi responsável pela inibição da secreção de  $Cl^-$  de ratos (Ogata e Shibata, 2004). Estudos de marcação isotópica demonstraram que  $[^{14}C]$ -orcilaldeído é convertido a 4,5-dimetil-resorcinol (Better e Gatenback, 1977).

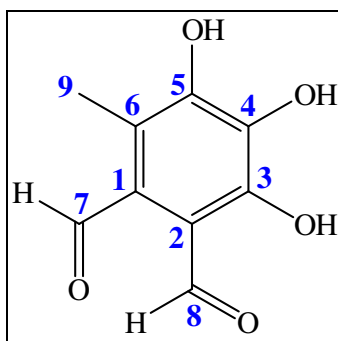


**Figura 32.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (NOESY 1D) (499,88 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) de 4,5-dimetilresorcinol (**8**), obtido por irradiação dos simples em (A)  $\delta$  2,00 ( $\text{CH}_3$ ), (B)  $\delta$  2,13 ( $\text{CH}_3$ ) e (C)  $\delta$  7,92 (OH).

**Tabela 4.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para 4,5-dimetil-resorcinol (**8**) em acetona- $\text{d}_6$ .

Atribuição	RMN de $^{13}\text{C}$ (ppm)	RMN de $^1\text{H}$ (ppm)	$J$ (Hz)
1	156,4; C	-	-
2	101,0; CH	6,24 (d)	$J = 2,0$
3	156,7; C	-	-
4	114,3; C	-	-
5	137,5; C	-	-
6	109,2; CH	6,18 (d)	$J = 2,0$
7	11,1; $\text{CH}_3$	2,00 (s)	-
8	20,3; $\text{CH}_3$	2,13 (s)	-
1-OH	-	7,78 (s)	-
3-OH	-	7,92 (s)	-

### 2.3.1.3. Flavipina



**Figura 33.** Estrutura da flavipina (**9**).

A purificação da fração F6 resultou no isolamento da flavipina (3,4,5-tri-hidroxi-6-metil-benzeno-1,2-dicarboxaldeído) (**9**, Figura 33), com fórmula molecular  $C_9H_8O_5$ . O espectro de massas de **9** apresentou íon molecular  $m/z$  196 ( $M^+$ , 88%) (Figura 22A em anexo). O espectro de RMN de  $^1H$  (Figura 23A em anexo) apresentou seis simpletos equivalentes a uma metila em  $\delta_H$  2,51, dois hidrogênios de aldeídos em  $\delta_H$  10,39 e 10,58, e três hidrogênios hidroxílicos em  $\delta_H$  9,05, 9,24 e 12,60. Nos espectros de RMN de  $^{13}C$  (CDP) e correlação heteronuclear  $^1H$ ,  $^{13}C$  a uma ligação (gHSQC) (Figura 24-25A - anexo) observaram-se 9 sinais referentes a 6 carbonos quaternários, 1  $CH_3$  e 2  $CH$ , e a atribuição completa dos sinais de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$  foi finalizada pela análise do espectro de correlação heteronuclear  $^1H$ ,  $^{13}C$  a ligações múltiplas (gHMBC) (Tabela 5, Figura 26A em anexo).

A flavipina foi isolada pela primeira vez das espécies de *Aspergillus flavipes* e *A. terreus* (Raistrick e Rudman, 1956), sendo posteriormente encontrada em *Epicoccum nigrum* (Bamford et al., 1961), bem como *Chaetomium globosum* (Serika et al., 1982). Este composto apresenta fortes propriedades antifúngicas, sendo fracamente tóxico contra bactérias (Raistrick e Rudman, 1956; Bamford et al., 1961; Brown et al., 1987; Madrigal e Melgarejo, 1995). Foi descrita como substância responsável pelo biocontrole do fungo *Monilinia laxa*, um patógeno de plantas inibido na presença de *E. nigrum* (Madrigal et al., 1991), e também como antagonista de *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*, nematóides parasitas de plantas (Nitao et al., 2002). Bioquimicamente, a flavipina inibe o transporte de elétrons, a fosforilação oxidativa e a síntese de proteínas, possivelmente como resultado da ligação cruzada dos grupos orto-dialdeídos aromáticos com os resíduos de lisina na proteína citocromo C e membranas mitocondriais (Nitao et al., 2002; Madrigal e Melgarejo, 1994; White e Elliott, 1972, 1980).

**Tabela 5.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e gHMBC da flavipina (**9**) em acetona- $d_6$ .

Atribuição	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	HMBC (H $\rightarrow$ C#)
1	128,9; C	-	-
2	113,1; C	-	-
3	151,7; C	-	-
4	136,6; C	-	-
5	150,4; C	-	-
6	124,7; C	-	-
7	192,9; CH	10,58 (s)	6, 5, 4 e 3
8	197,5; CH	10,39 (s)	4, 3 e 2
9	10,2; CH <sub>3</sub>	2,51 (s)	6, 5, 4, 2 e 1
3-OH	-	12,60 (s)	-
4-OH	-	9,05 (s)	-
5-OH	-	9,24 (s)	-

*Arpergillus flaviceps* produz ácido 5-metil-orselínico como precursor da flavipina (**9**) (Figura 34). Estudos biossintéticos utilizando unidades de acetato e metionina marcados, bem como precursores aromáticos, forneceram evidências de que ocorre uma metilação após a cadeia tetracetídica ter sido formada (Herbert, 1989).



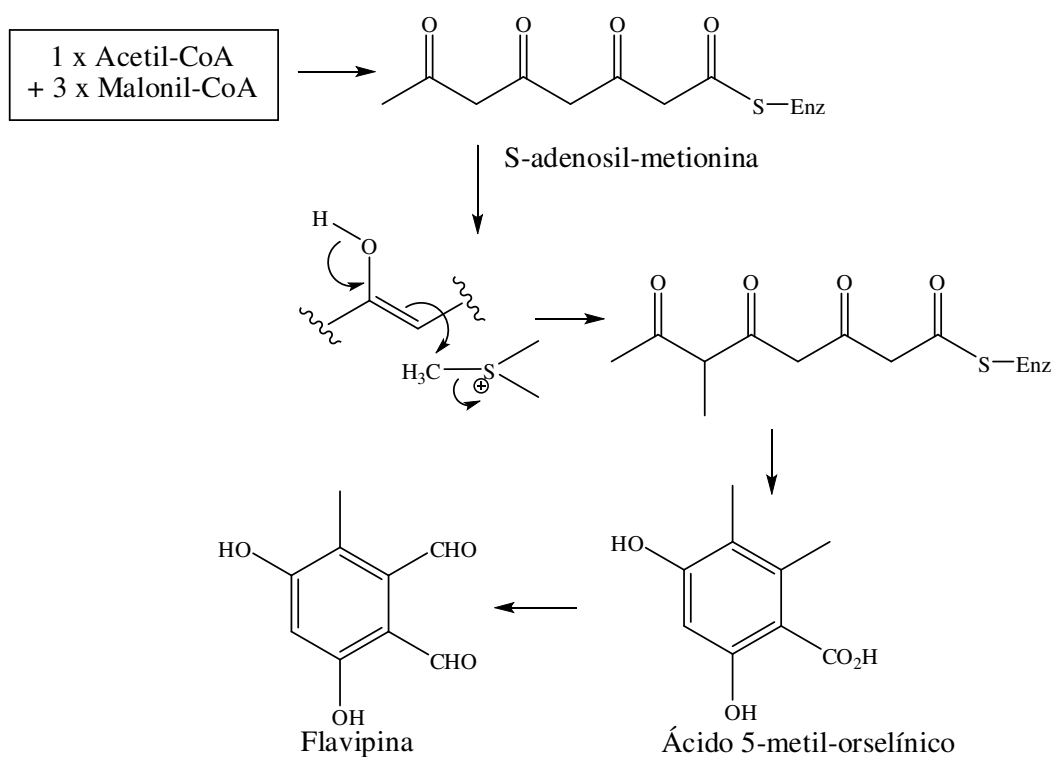


Figura 34. Biosíntese da flavipina (9).

### 2.3.1.4. Epicolactona

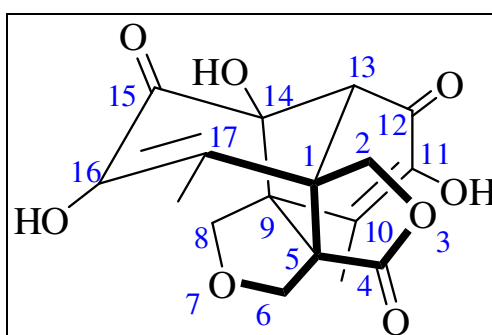
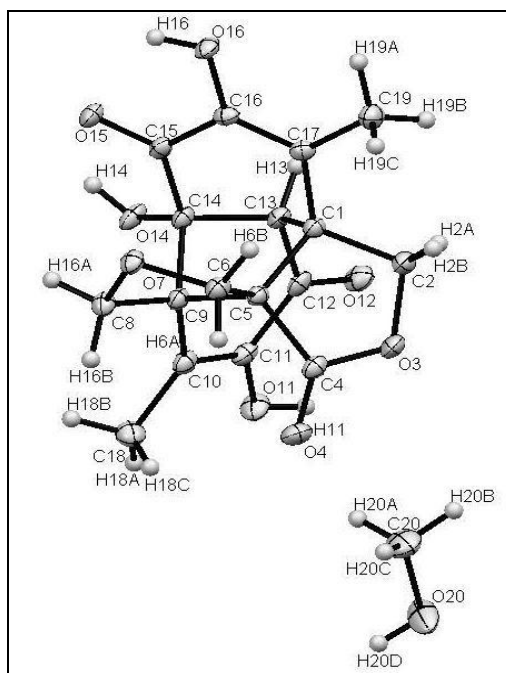


Figura 35. Estrutura da epicolactona (10).

A purificação da fração bioativa F6 possibilitou o isolamento do novo produto natural (1R\*,5S\*,9S\*,13R\*,14R\*)-11,14,16-trihidroxi-10,17-dimetil-3,7-dioxapentaciclo[11.4.0.0<sup>1,5</sup>.0<sup>5,9</sup>.0<sup>9,14</sup>]heptadeca-10,16-dieno-4,12,15-triona, que foi

denominada de epicolactona (**10**, Figura 35). Este metabólito foi isolado como cristais brancos, ao qual foi atribuído a fórmula molecular  $C_{17}H_{16}O_8$  (10 graus de insaturação) baseado em HR-ESI-MS ( $m/z$  347,0748  $[M - H]^-$  para  $C_{17}H_{16}O_8$  347,0772) em combinação com dados de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$ .

A análise dos dados de RMN de  $^1H$ ,  $^{13}C$  (CPD, DEPT 135° e DEPT 90°), e correlação heteronuclear  $^1H$ ,  $^{13}C$  a uma ligação (gHSQC) (Tabela 6, Figuras 29-32A em anexo) de (**10**) mostrou a ocorrência de 3 simpletos em  $\delta_H$  6,07, 8,50, e 8,61, com nenhuma correlação aos carbonos e, portanto, atribuídos a OH, dois grupos metilas, três oximetilênicos com hidrogênios diastereotópicos, um metino, e 11 carbonos não ligados à hidrogênios, três dos quais eram carbonos carbonílicos. O espectro de correlação homonuclear  $^1H$ ,  $^1H$  (gCOSY) (Figuras 33A em anexo) confirmou a presença dos três sistemas de spins atribuídos à dois hidrogênios oximetilênicos diastereotópicos. Os nove hidrogênios remanescentes mostraram nenhum acoplamento escalar ou correlações. Estas informações combinadas com a análise de cristalografia de raio-X, desenvolvida pelo grupo do Prof. Dr. Ricardo Aparicio (Unicamp), revelou uma molécula quasi-simétrica com nenhum esqueleto semelhante na literatura (Figura 36).

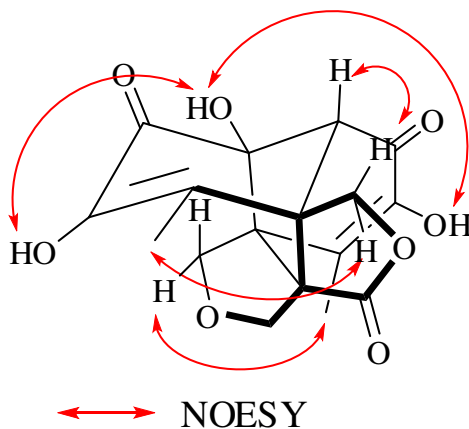


**Figura 36.** Representação ORTEP da epicolactona mostrando elipsóides de deslocamentos desenhados no nível de 50% de probabilidade. Átomos de H são apresentados como esferas pequenas de raio arbitrário.

As atribuições dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  da epicolactona foram concluídas com a análise do espectro de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a ligações múltiplas (gHMBC) (Tabela 6 e Figura 34A em anexo). O sinal do hidrogênio oximetilênico em  $\delta_{\text{H}}$  4,51 (H-2) correlaciona-se com os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  128,7 (C-17), 71,3 (C-13) e 50,1 (C-1), enquanto o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  4,16 (H-2') apresenta correlação com  $\delta_{\text{C}}$  71,3 (C-13), 68,3 (C-5), 176,0 (C-4) e 50,1 (C-1). O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,70 (H-6) correlaciona-se com  $\delta_{\text{C}}$  66,6 (C-8), 176,0 (C-4) e 50,1 (C-1), e o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,53 (H-6') com  $\delta_{\text{C}}$  176,0 (C-4) e 50,1 (C-1). Adicionalmente, o hidrogênio oximetilênico em  $\delta_{\text{H}}$  3,90 (H-8) apresenta correlação com  $\delta_{\text{C}}$  90,9 (C-14), 73,0 (C-6) e 68,3 (C-5), e o sinal  $\delta_{\text{H}}$  3,65 (H-8') com  $\delta_{\text{C}}$  90,9 (C-14) e 127,5 (C-10). O hidrogênio metínico em  $\delta_{\text{H}}$  3,06 (H-13) mostrou correlação com os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  128,7 (C-17), 192,8 (C-15), 90,9 (C-14), 190,1 (C-12), 146,6 (C-11), 67,7 (C-9) e

50,1 (C-1). Os hidrogênios hidroxílicos em  $\delta_H$  8,50 (11-OH) e 8,61 (16-OH) apresentaram correlações com  $\delta_C$  190,1 (C-12), 146,6 (C-11) e 127,5 (C-10), e com  $\delta_C$  128,7 (C-17), 145,9 (C-16) e 192,8 (C-15), respectivamente, enquanto o terceiro hidrogênio hidroxílico em  $\delta_H$  6,07 (14-OH) correlacionou-se com  $\delta_C$  192,8 (C-15), 90,9 (C-14), 71,3 (C-13) e 67,7 (C-9). O sinal em  $\delta_H$  1,79 (H-18) correlacionou-se com  $\delta_C$  190,1 (C-12), 146,6 (C-11), 127,5 (C-10) e 67,7 (C-9), e o sinal em  $\delta_H$  1,96 (H-19) correlacionou-se com  $\delta_C$  128,7 (C-17), 145,9 (C-16), 192,8 (C-15), 67,7 (C-9) e 50,1 (C-1).

As correlações no espectro NOESY (Figura 35A em anexo) entre H-2 e H-19, H-2' e H-13, e entre H-8' e H-18, forneceram mais suporte a estas atribuições, bem como as correlações entre 11-OH e 14-OH, e 16-OH e 14-OH (Figura 37).



**Figura 37.** Correlações NOESY da epicolactona (10).

**Tabela 6.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a ligações múltiplas (gHMBC) para a epicolactona (**10**) em  $\text{DMSO-}d_6$ .

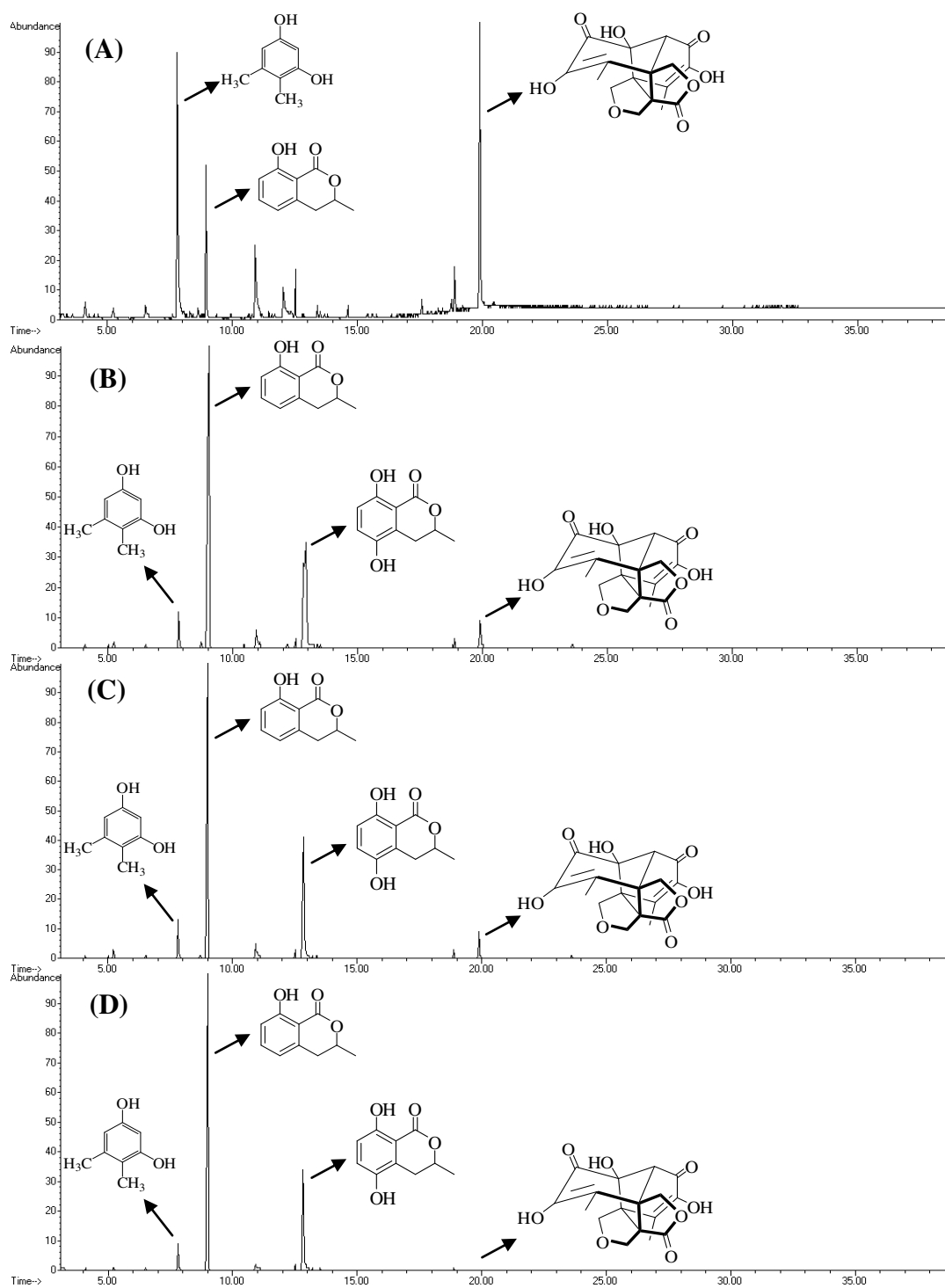
Atribuição	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	HMBC (H $\rightarrow$ C#)
1	50,1, C	-	-
2	67,2, CH <sub>2</sub>	4,51 (d), 4,16 (d), $J = 9,6$ Hz	H-2 (4,51): 17, 13 e 1 H-2' (4,16): 13, 5, 4 e 1
4	176,0, C	-	-
5	68,3, C	-	-
6	73,0, CH <sub>2</sub>	3,70 (d), 3,53 (d), $J = 10,4$ Hz	H-6 (3,70): 8, 4 e 1 H-6' (3,53): 4 e 1
8	66,6, CH <sub>2</sub>	3,90 (d), 3,65 (d), $J = 9,8$ Hz	H-8 (3,90): 14, 6 e 5 H-8' (3,65): 14 e 10
9	67,7, C	-	-
10	127,5, C	-	-
11	146,6, C	-	-
11-OH	-	8,50 (s)	12, 11 e 10
12	190,1, C	-	-
13	71,3, CH	3,06 (s)	17, 15, 14, 12, 11, 9 e 1
14	90,9, C	-	-
14-OH	-	6,07 (s)	15, 14, 13 e 9
15	192,8, C	-	-
16	145,9, C	-	-
16-OH	-	8,61 (s)	17, 16 e 15
17	128,7, C	-	-
18	14,4, CH <sub>3</sub>	1,79 (s)	12, 11, 10 e 9
19	13,0, CH <sub>3</sub>	1,96 (s)	17, 16, 15, 9 e 1

Um aspecto incomum em relação à epicolactona é que o grupo de espaço do cristal ( $P\bar{1}$ ) contém um centro de inversão como um elemento de simetria, contudo a epicolactona é quiral e a existência de uma simetria imprópria implica que ambos os enantiômeros estão presentes no cristal. A razão enantiomérica não foi determinada, mas o baixo valor de rotação óptica sugere uma razão de quase 1:1. O isolamento de metabólitos secundários racêmicos não é incomum, há precedentes como o ipsdienol, feromônio produzido por machos de besouros do pinheiro, o qual ocorre em diferentes razões enantioméricas, que tem a função de distinguir os indivíduos de diferentes populações destes insetos (Miller et al., 1989). O gossipol é outro exemplo de metabólito secundário que ocorre naturalmente racêmico (Huang, 1988; Freedman et al., 2003).

A epicolactona foi avaliada quanto à sua atividade antimicrobiana contra os *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, e, adicionalmente, contra *C. albicans*, por meio da determinação da concentração inibitória mínima. Entretanto, este metabólito não foi ativo contra nenhum destes micro-organismos (Figura 36A em anexo).

### **2.3.2. Monitoramento da produção dos compostos isolados em *E. nigrum* selvagem nas cepas mutantes**

Com a finalidade de verificar se compostos que foram isolados no presente trabalho em *E. nigrum* selvagem encontravam-se nas cepas mutantes P16-47set, P16-17 e P16-91, 20 mg dos seus extratos (dissolvidos em acetato de etila) foram eluídos em placa de CCD preparativa, utilizando como eluente benzeno/acetato de etila (6:4). Após eluição, os compostos arrastados pelo solvente foram separados dos que permaneceram na base, e, em seguida, extraídos da sílica com acetato de etila e acetonitrila, e analisados por CG-EM (Figura 38).



**Figura 38.** Cromatogramas de íons totais (CG-EM, IE, 70 eV) da fração eluída em benzeno/acetato de etila (6:4) do extrato de *E. nigrum* selvagem (A), mutantes P16-47set (B), P16-17 (C) e P16-91 (D).

Em todos os mutantes foi verificada a ocorrência dos três compostos que foram isolados no fungo selvagem (meleína **7**, 4,5-dimetil-resorcinol **8** e epicolactona **10**), contudo, em diferentes proporções. Observou-se um acúmulo da produção de meleína e diminuição nas abundâncias relativas de 4,5-dimetil-resorcinol e da epicolactona, a qual foi encontrada em quantidades traços no mutante P16-91. Interessantemente, foi observado o acúmulo de um composto adicional, a 5-hidroxi-meleína (**11**), que não foi produzido pelo fungo selvagem e somente pelos mutantes. Estas modificações sinalizaram a alteração dos genes envolvidos na rota biossintética destes metabólitos. O monitoramento da presença de flavipina (**9**) por ESI-MS ( $m/z$  195,0295 [M - H]<sup>-</sup>, calc. para C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub> 195,0372) permitiu verificar sua presença em todos os mutantes.

Uma rápida avaliação das rotas biossintéticas de **7**, **8** e **9** indicou que estes compostos têm origem policetí dica comprovada. A origem policetí dica da 5-hidroxi-meleína (**11**) está atrelada a meleína, portanto, é possível sinalizar que os transformantes sofreram alteração do cluster PKS (policetí deo sintase) ativando a ação de uma P450 sobre a meleína, como comprovado pelos estudos paralelos realizados pela equipe do Prof. Dr. Welington L. Araújo.

A 5-hidroxi-meleína (3,4-dihidro-5,8-dihidroxi-3-metil-isocumarina) (**11**, Figura 39) foi isolada como um sólido branco com a fórmula molecular C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> e espectro de massas com íon molecular de  $m/z$  194 (M<sup>+</sup>, 100%) (Figura 37A em anexo). Os dados de RMN de <sup>1</sup>H de **11** (Figura 38A em anexo) foram semelhantes aos da literatura para (-)-(3*R*)-5-hidroxi-meleína, isolada originalmente de madeira podre infectada por um fungo não identificado, e também do fungo *Septoria nodorum* (Devys et al., 1994; Alvarenga et al., 1978). A completa confirmação estrutural de **11** foi efetuada pela análise dos espectros de RMN de <sup>13</sup>C (CDP, DEPT 135° e 90°), correlações homonucleares <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H (gCOSY) (Tabela 7 e



Figuras 39-41A em anexo) e NOE diferencial (Figura 40), onde foi possível comprovar a presença de um substituinte no carbono 5, ou seja, uma hidroxila. Este é o primeiro relato deste metabólito em *E. nigrum*, contudo a (-)-(3*R*)-5-hidroxi-meleína já foi encontrada em *Epicoccum* sp. (Abdel-Lateff et al., 2003).

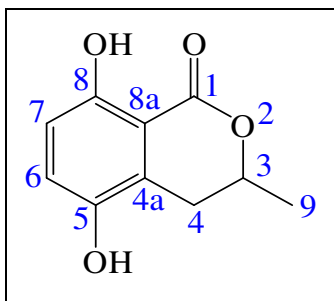
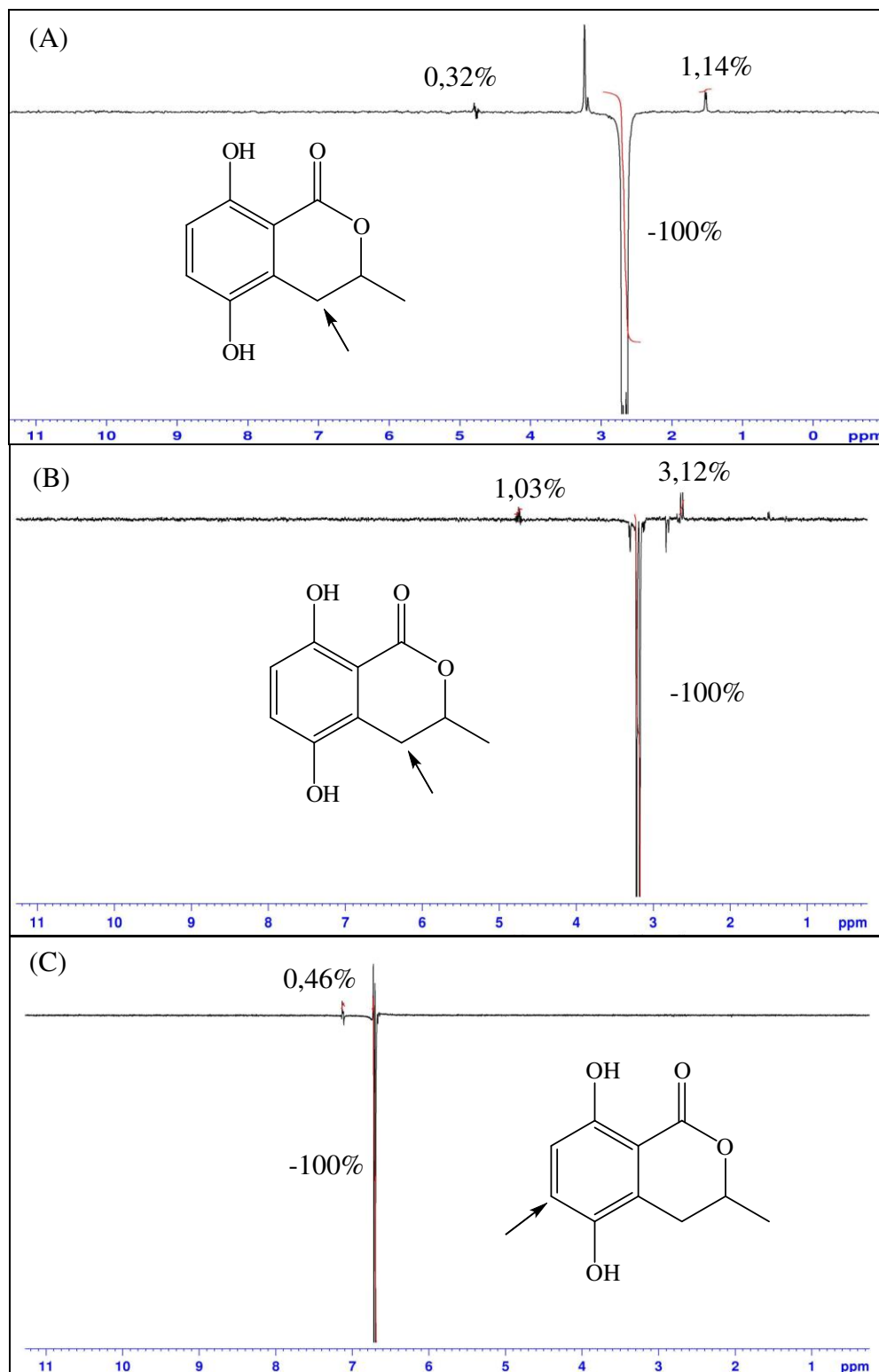


Figura 39. Estrutura da 5-hidroxi-meleína (11).

Tabela 7. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para a 5-hidroxi-meleína (11) em acetona- $d_6$ .

Atribuição	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J$ (Hz)
1	170,9; C	-	-
3	77,0; CH	4,75 (m)	-
4	21,1; CH <sub>2</sub>	2,65 (dd) e 3,19 (dd)	$J = 16,9$ e 3,4 e $J = 16,9$ e 11,5
4a	125,7; C	-	-
5	146,4; C	-	-
6	124,8; CH	6,71 (d)	$J = 8,9$
7	116,2; CH	7,41 (d)	$J = 8,9$
8	156,3; C	-	-
8a	109,2; C	-	-
9	20,3; CH <sub>3</sub>	1,50 (d)	$J = 6,3$
OH	-	8,38 (s)	-
OH	-	10,57 (s)	-



**Figura 40.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (NOESY 1D) (400,13 MHz, acetona- $\text{d}_6$ ) de 5-hidroxi-meleína (11), obtido por irradiação dos sinais em (A)  $\delta_{\text{H}}$  2,65, (B) 3,19 e (C) 6,71.

## 2.4. Conclusões parciais

O estudo químico do extrato acetato de etila do fungo *E. nigrum* permitiu o isolamento dos compostos já conhecidos na literatura: meleína, 4,5-dimetil-resorcinol e flavipina. Adicionalmente foi identificado o novo produto natural que denominamos epicolactona, o qual foi inativo contra os micro-organismos *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *C. albicans*.

A alteração na produção de meleína e 4,5-dimetil-resorcinol nos três transformantes em comparação ao fungo selvagem confirmou a ocorrência da mutação no cluster PKS, corroborando com os resultados obtidos pela equipe do Prof. Dr. Welington L. Araújo (USP).

O monitoramento da produção da epicolactona permitiu verificar que este metabólito foi praticamente inexistente no mutante P16-91, levando-se a concluir que genes presentes na rota biossintética desta molécula, possivelmente também relacionados ao cluster PKS, foram alterados neste mutante.

## CAPÍTULO 3

---



## CAPÍTULO 3.

### Feromônios produzidos por indivíduos da espécie *Tetragonisca angustula*

#### 3.1. Introdução

Os insetos estão inseridos em um grande filo zoológico (Insecta) dividido em várias ordens, dentre as quais se encontra a ordem Hymenoptera, que compreende as formigas (Formicoidea), as vespas (Vespoidea) e as abelhas (Apoidea) (Nogueira-Neto, 1997). A superfamília Apoidea na qual todas as abelhas estão reunidas encontra-se subdividida em onze famílias: Melittidae, Ctenoplectridae, Colletidae, Stenotritidae, Andrenidae, Oxaeidae, Megachilidae, Fideliidae, Halictidae, Anthophoridae e Apidae. A família Apidae, por sua vez, subdivide-se em quatro subfamílias: Euglossinae (abelhas das orquídeas), Bombinae (mamangavas), Apinae (abelhas do mel) e Meliponinae (abelhas sem ferrão) (Figura 41) (Michener, 2007; Nogueira-Neto, 1997; Camargo e Pedro, 1992; Roubik, 1989).



**Figura 41.** Exemplos de espécies pertencentes às subfamílias (da esquerda para a direita): Euglossinae (*Euglossa cordata*), Bombinae (*Bombus hypnorum*), Apinae (*Apis mellifera*) e Meliponinae (*Tetragonisca angustula*).<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Euglossa cordata*, disponível em <http://flickrriver.com/groups/fotografiamacro/pool/random/>. *Bombus hypnorum*, disponível em <http://www.wildaboutbritain.co.uk/pictures/showphoto.php/photo/79118/size/big>. *Apis mellifera*, disponível em [http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img\\_query?enlarge=0000+0000+0506+0034](http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+0506+0034). *Tetragonisca*

As espécies da família Apidae possuem como característica comum o fato das abelhas utilizarem cera ou cerume<sup>2</sup> na construção de ninhos, células de cria ou células ou depósitos de alimento. Outra característica comum entre estas quatro subfamílias Apidae, com algumas exceções, é a presença de uma concavidade denominada corbícula, situada nas tíbias das patas traseiras das fêmeas, cuja função é carregar o pólen das flores ou outras substâncias para os seus ninhos (Figura 42). Entre os indivíduos destas subfamílias que não possuem corbícula estão as rainhas de Meliponinae e Apinae, bem como as fêmeas das espécies parasitas e os machos de todos esses quatro grupos (Michener, 2007; Silveira et al., 2002; Nogueira-Neto, 1997).



**Figura 42.** Espécie de Bombinae (*Bombus* sp.) com pólen na corbícula (em destaque).<sup>3</sup>

Estima-se que existam cerca de 30 mil espécies de abelhas distribuídas nas diferentes regiões do mundo (Michener, 2007), com aproximadamente 5000 sendo encontradas no Brasil (Santos, 2002). Dentre esta diversidade de espécies descritas, 85% são solitárias (Batra, 1984) e outras vivem em colônias, conhecidas como **sociais** (Michener, 2007).

---

*angustula*, disponível em <http://abelhasdobrasil.blogspot.com/2011/03/fotos-incriveis-da-abelha-jatai-dentro.html>. Acessos em 03/03/2012.

<sup>2</sup> Cerume: mistura de cera pura e branca, secretada pelas abelhas, com o própolis que elas retiram dos eventuais ferimentos que algum acidente ou corte causou à uma árvore ou arbusto.

<sup>3</sup> Corbícula, disponível em <http://pt.encydia.com/es/Polen>, acessado em 03/03/2012.

Uma colônia consiste de duas ou mais fêmeas adultas que vivem em um único ninho, independentemente de suas relações. Frequentemente, as fêmeas de uma colônia podem ser divididas em: (1) **operárias**, que realizam a maioria ou todo o trabalho de forrageamento, cuidado do ninho, guarda, etc., e muitas vezes não são acasaladas; e (2) uma **rainha**, que faz a maioria ou a totalidade da postura de ovos, a qual é acasalada. A rainha é frequentemente maior do que as operárias (Michener, 2007).

Dentre as espécies que vivem em colônias, existem as abelhas **altamente eussociais**, onde as rainhas e operárias são morfologicamente muito diferentes, e a rainha é incapaz de viver sozinha, bem como as operárias, que não formam colônias viáveis por si só. Tais abelhas sempre vivem em colônias e são pertencentes somente a duas subfamílias: Apinae e Meliponinae (Michener, 2007).

### 3.1.1. Abelhas sem ferrão

Todos os machos da ordem Hymenoptera apresentam ferrão atrofiado (órgão de defesa), entretanto, na subfamília Meliponinae, da qual deriva o nome meliponíneo, as fêmeas também são caracterizadas especificamente por não possuírem ferrão. Por esse motivo as espécies pertencentes aos meliponíneos são também conhecidas popularmente como abelhas sem ferrão, e por serem tradicionalmente manejadas por povos indígenas, também são chamadas de abelhas indígenas (Nogueira-Neto, 1997).

Os meliponíneos constituem um importante grupo de abelhas com cerca de 400 espécies pertencentes a, aproximadamente, 50 gêneros (Velthuis, 1997). São classificados em duas tribos: Meliponini e Trigonini. A tribo Meliponini possui unicamente o gênero *Melipona*, enquanto a tribo Trigonini constitui um grupo



muito diversificado, com dezenas de gêneros (Nogueira-Neto, 1997; Camargo e Pedro, 1992; Wille, 1983; Moure 1961 e 1951).

O gênero *Melipona* é composto por cerca de 40 espécies, sendo 36 encontradas no Brasil (Michener, 2007; Silveira et al., 2002), com muitas destas ocorrendo na região amazônica (Cortopassi-Laurino et al., 2007). São abelhas relativamente grandes e diversas espécies são criadas para a produção de mel em populações rurais. As espécies do gênero *Melipona* coletam alimentos ao longo do ano preferindo visitar plantas das famílias Leguminosae, Solanaceae, Myrtaceae e Melastomataceae (Cortopassi-Laurino et al., 2007; Wilms & Wiechers, 1997; Ramalho et al., 1990) e também Orquidaceae (Cortopassi-Laurino et al., 2007; Reis, 2005). Possuem como característica comum, a ausência de favos especiais para criação das rainhas, chamados de células reais, ou seja, todos os indivíduos destas espécies (rainhas, operárias e machos) são criados no mesmo tipo de célula. Outra característica que distingue esta tribo está relacionada com a entrada dos ninhos, que se encontra quase sempre no centro de uma estrutura construída de terra ou geoprópolis<sup>4</sup> (Nogueira-Neto, 1997).

Ao contrário da tribo Meliponini, quase todas as espécies pertencentes à Trigonini constroem células reais, as quais são maiores que as células destinadas a operárias ou machos. Porém, existem algumas exceções, como as espécies de *Frieseomelitta* spp. e, às vezes, *Leurotrigona*, que apesar de possuírem rainhas grandes que emergem de casulos reais, estas não constroem tais estruturas uma vez que esporadicamente uma larva perfura a célula de cria vizinha, consome o seu alimento e assim, devido ao seu tamanho maior, tece um casulo real (Nogueira-Neto, 1997). Algumas das células muito ocasionalmente podem originar machos

---

<sup>4</sup> Geoprópolis: argila e resinas vegetais.

(Nogueira-Neto, 1997; Imperatriz-Fonseca e Zucchi, 1995) e operárias gigantes (Imperatriz-Fonseca e Zucchi, 1995; Oliveira e Imperatriz-Fonseca, 1973).

As abelhas indígenas sem ferrão ocorrem tipicamente nas regiões tropicais e algumas regiões de clima temperado subtropical do planeta. Assim, estas abelhas são encontradas na maior parte da América Neotropical, além de Austrália, Indonésia, Malásia, Índia e África (Nogueira-Neto, 1997; Camargo e Pedro, 1992).

Com exceção das espécies carnívoras *Trigona crassipes*, *T. hypogea* e *T. necrophaga*, a maioria das espécies de abelhas sem ferrão alimenta-se de pólen, fonte de proteína, e néctar, fonte de energia (Nieh, 2004; Nogueira-Neto, 1997; Velthuis, 1997). Neste sentido, ao mesmo tempo em que estas abelhas recebem suas recompensas florais, as flores são beneficiadas com a polinização.

Provavelmente a atividade mais importante das abelhas em termos de benefícios ao homem, é a sua contribuição à polinização da vegetação, assegurando a perpetuação de milhares de plantas nativas e das exóticas cultivadas (Michener, 2007, Kerr et al., 1996). No Brasil existem cerca de 300 espécies de abelhas indígenas sem ferrão espalhadas por todo território nacional (Nogueira-Neto, 1970, 1997), as quais são responsáveis por 40 a 90% da polinização cruzada em florestas tropicais, sendo as 60 a 10% restantes polinizadas pelas abelhas solitárias, borboletas, coleópteros, morcegos, aves, alguns mamíferos, água, vento, e pelas abelhas africanizadas (Thakur, 2012; Kerr et al., 1996). Apesar disso, no Brasil muitas espécies de abelhas sem ferrão estão ameaçadas de extinção devido às alterações de seus ecossistemas, como o desmatamento, uso indiscriminado de agrotóxico e ação predatória de meliívoros (Kerr et al., 1996). Além da contribuição à polinização, estas abelhas também são importantes do ponto de vista nutricional e terapêutico do seu mel, e fabricação de cera (Thakur, 2012; Kerr et al., 1996).

Os meliponíneos vivem em colônias perenes construídas, geralmente, em cavidades pré-existentes em ocos de árvores (Roubik, 2006; Nogueira-Neto, 1997).

As colônias são compostas por uma **rainha**, **operárias** e **machos** recém-emergidos. A rainha é responsável pela postura dos ovos que vão dar origem às fêmeas (rainhas e operárias) e machos, sendo denominada **rainha fisogástrica**. Colônias de *Melipona bicolor* com grandes populações pode conter até cinco rainhas fisogástricas envolvidas simultaneamente na oviposição, e aparentemente sem qualquer comportamento agonístico (Imperatriz-Fonseca e Zacchi, 1995). As operárias realizam as tarefas de construção e manutenção da estrutura física da colônia, coleta e processamento do alimento, cuidado com a cria e defesa. Os machos são produzidos em grande número em certas épocas do ano e, normalmente, alguns dias após emergirem, são expulsos da colônia. Esporadicamente estes indivíduos realizam algumas tarefas dentro da colônia, e são responsáveis por fecundarem as **rainhas virgens**, durante o voo nupcial (Michener, 2007; Kerr et al., 1996 ; Roubik, 1989). Em algumas espécies de meliponíneos, há indicações de produção de machos pelas operárias, denominadas **operárias poedeiras**, as quais têm a capacidade de desenvolver ovários, mesmo na presença de rainhas (Cruz-Landim, 2009).

A constante produção de rainhas é uma característica marcante do comportamento reprodutivo das abelhas sem ferrão. O sistema de provisionamento de massa para a alimentação larval em meliponíneos não permite uma resposta rápida às perdas das abelhas, e como resultado, rainhas de substituição precisam estar disponíveis o tempo todo. Se houver perda de rainha no ninho de *Apis mellifera* Linnaeus, por exemplo, larvas de operárias jovens podem ser criadas para se tornarem rainhas de emergência, através da alteração da dieta larval. Contudo, no caso de abelhas sem ferrão, geralmente há dois sistemas para produção de rainha. Em colônias de *Trigona*, onde as rainhas são criadas em células reais, somente algumas rainhas virgens são produzidas. Elas podem permanecer vivas pelas operárias por um tempo considerável e em algumas espécies, rainhas

emergentes são “presas” em células de armazenamento de alimento vazias (Sommeijer et al., 2003). Em contraste, nas espécies de *Melipona* a determinação das castas é em parte genética, tendo em vista que há uma combinação de fatores genéticos e tróficos (Michener, 2007).

Na tribo Meliponi, rainhas virgens emergem durante todo o ano, e são menores do que as operárias, sendo normalmente mortas por estas últimas. Estas rainhas apresentam características semelhantes em seu repertório comportamental, pois elas têm uma ontogenia mais curta do que as operárias (dados para *Melipona marginata* e *M. quadrifasciata*), e normalmente emergem sem atratividade, isto é, elas não liberam respostas específicas em operárias. No início da atratividade elas se movem mais rapidamente ao redor do ninho, pedindo comida às operárias pelo contato com as antenas ajudadas por suas patas dianteiras, sendo esta a fase em que provavelmente começa a produção de feromônio. No auge de sua capacidade de atração, elas expõem seu abdome inchado para a maioria das operárias ao redor, através de movimentos circulares, podendo, então, serem mortas ou aceitas. Quando a rainha é aceita, ela ajuda as operárias a eliminar as outras rainhas virgens (Imperatriz-Fonseca e Zacchi, 1995). Pesquisas desenvolvidas com *Melipona favosa* (Fabricius) mostraram que as rainhas virgens desta espécie são capazes de deixar o ninho caso não sejam aceitas pelas operárias na colônia-mãe. Ao abandonar seus ninhos, estas rainhas se alimentam em flores, e podem visitar sítios de congregação de machos. Tais rainhas virgens buscam outras colônias de sua própria espécie, conseguindo passar pelas guardas e entrar nos ninhos (Sommeijer et al., 2003).

As atividades desempenhadas pelas rainhas virgens no momento de emergência, na tribo Trigonini, diferem de espécie a espécie. Em algumas espécies, muitas rainhas nascem não atrativas e não pigmentadas, como por exemplo, *Scaptotrigona*, *Paratrigona*, *Schwarziana* e *Nannotrigona*, enquanto em outras elas

já nascem apresentando atratividade, como em *Plebeia*, *Frieseomelitta*, *Tetragonula*, *Meliponula* e *Friesella*. Feromônios de atração emitidos pela rainha recém-emergida causam mudanças no comportamento intranidal, que pode até mesmo alterar o processo de construção de células de cria, desencadeando respostas específicas de operárias. Em casos excepcionais, a rainha pode ser tão atraente que pode substituir a rainha dominante do ninho, como acontece com *Plebeia remota* (Imperatriz-Fonseca e Zacchi, 1995).

Nos meliponíneos, após a cópula a genitália do macho fica presa à da fêmea, obstruindo sua abertura genital, sendo removida após alguns dias, conseqüentemente, nessas abelhas a rainha é inseminada por um único macho (Kerr e Krause, 1950). Rainhas já inseminadas, após iniciarem a postura, se acidentalmente, são expostas a machos maduros (quando da manipulação de colméia, por exemplo) podem copular com estes. Em alguns casos, vários machos tentam copular com a rainha e podem ferí-la, ocasionando sua morte (Melo e Campos, 1990). Os machos de abelha sem ferrão nunca procuram aleatoriamente o ambiente das fêmeas, mas concentram suas atividades na forma de aglomerados temporários nos prováveis locais em que elas podem ocorrer, permanecendo perto da entrada das colônias ou na vizinhança, onde aguardam o voo nupcial da rainha virgem (Velthuis et al., 2005; Sommeijer e Bruijin, 1995; Eickwort e Ginsberg, 1980). Este aglomerado começa poucos dias antes do voo nupcial e se dispersa alguns dias depois (Velthuis et al., 2005).

### 3.1.2. Comunicação química em abelhas sociais

A comunicação em abelhas sociais, bem como nos insetos em geral, é mediada por vários canais sensoriais, usando sinais visuais, acústicos, táteis, algumas vezes magnéticos, e principalmente pela ação de sinais químicos, que são feromônios produzidos por uma variedade de glândulas exócrinas, distribuídas ao longo de todo o corpo dos insetos (Billen, 2011 e 2006).

As glândulas exócrinas são muito numerosas nos insetos sociais, uma vez que diversas atividades dentro da colônia são reguladas por feromônios produzidos pelas mesmas. Billen (2006) distinguiram um total de 105 diferentes glândulas exócrinas entre estes insetos. Na Figura 43 estão distinguidas as glândulas exócrinas de abelhas, cujas secreções liberadas desempenham diferentes funções na comunicação química.

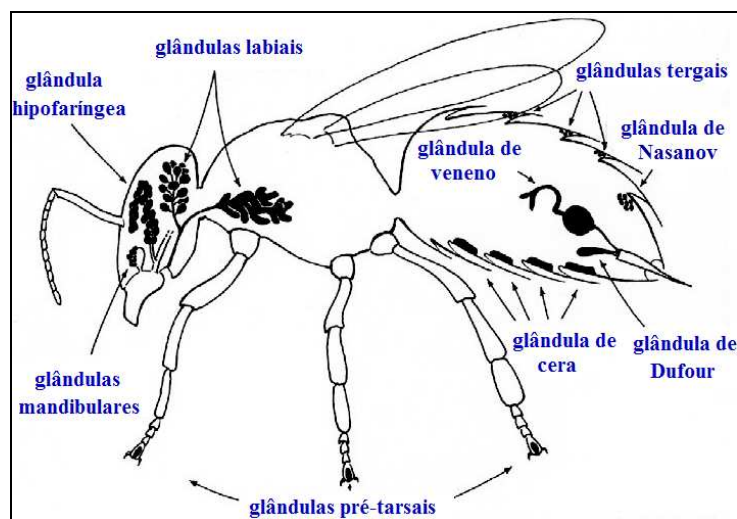


Figura 43. Glândulas exócrinas presentes no corpo das abelhas (Billen, 2006).

A **glândula Dufour**, acessória do aparelho de veneno e descrita pela primeira vez por Dufour (1834), é encontrada em todas as fêmeas dos himenópteros aculeados, sendo sua função, em grande parte, desconhecida nas abelhas sociais.

Em meliponíneos e outras espécies de abelhas, esta glândula apresenta-se mais desenvolvida nas rainhas que nas operárias, e na maioria das espécies de abelhas sem ferrão encontra-se ausente nas operárias (Cruz-Landim, 2009; Abdalla e Cruz-Landim, 2001).

Pesquisas desenvolvidas por Katzav-Gozansky *et al.* (1997) mostraram que a secreção da glândula de Dufour em operárias poedeiras e rainhas de *Apis mellifera* é composta de hidrocarbonetos e ésteres, enquanto que em operárias não-poedeiras é composta apenas por hidrocarbonetos. De acordo com estes pesquisadores, tais ésteres servem para marcar os ovos da rainha a fim de prevenir sua eliminação, durante a atividade de inspeção das operárias. Adicionalmente, os mesmos ésteres foram encontrados na secreção de operárias poedeiras de colônias orfãs, os quais provavelmente são usados por elas para mimetizar os ovos da rainha, impedindo que os mesmos sejam ingeridos por outras operárias da colônia. Este fato sugere que a rota biossintética dos ésteres está presente em ambas as castas, mas, de alguma forma, é inibida nas operárias na presença da rainha. Desta forma, a marcação do ovo pela rainha é considerada como um dos meios para distinguir ovos produzidos pela rainha daqueles produzidos pelas operárias poedeiras (Oldroyd *et al.*, 2002; Katzav-Gozansky *et al.*, 1997), porém a função exata desta glândula ainda é contestada.

Abdalla *et al.* (2004) investigaram as diferenças na composição química da secreção da glândula de Dufour de rainhas virgens e fisogástricas de *Melipona bicolor*, e observaram que a secreção da glândula de rainhas virgens consiste de hidrocarbonetos, enquanto a das rainhas fisogástricas contém, além de hidrocarbonetos, uma variedade de outros compostos, tais como ésteres isobutíricos e acéticos. Adicionalmente, foi verificado que a secreção da glândula de Dufour de *M. bicolor* pode ser usada para as operárias identificarem a rainha fisogástrica. Bioensaios demonstraram que extratos desta glândula provoca a atração de

operárias, enquanto que as rainhas virgens são repelidas, principalmente se estes extratos forem depositados na área de cria do ninho (Cruz-Landim, 2009; Abdalla, 2004).

Nos meliponíneos geralmente a constituição da glândula de Dufour é diferente nas rainhas virgens e fisogástricas. Tendo em vista que a composição dos hidrocarbonetos é semelhante aos hidrocarbonetos cuticulares, e parece variar com a alimentação da colônia, foi levantada a hipótese de que estes possam ser de origem exógena e não secretados pela glândula (Cruz-Landim, 2009; Neil et al., 1994).

As **glândulas mandibulares** em *Apis mellifera* são responsáveis pela produção do feromônio sexual, ácido 9-oxo-*trans*-dec-2-enóico, liberado pela rainha virgem (Gary, 1962). Rainhas de *A. mellifera* também utilizam as glândulas mandibulares (Butler e Simpson 1958), bem como **tergais** (Vierling e Renner, 1977) e **pré-tarsais** (Lensky e Slabezki, 1981) na sinalização da sua presença para as operárias. A secreção da **glândula de Nasanov**, localizada no sétimo tergito em operárias de *A. mellifera*, é usada por estes indivíduos como feromônio de reconhecimento e recrutamento (Boch, 1962; Williams et al., 1981).

Schorkopf et al. (2009) estudaram os extratos das secreções das glândulas mandibulares de *Trigona spinipes* e *Scaptotrigona* aff. *depilis* ('*postica*'). Os componentes majoritários dos extratos foram heptan-2-ol (em ambas as espécies), nonanal (*T. spinipes*), benzaldeído e tridecan-2-ona (*S. aff. depilis*). O efeito de extratos das glândulas mandibulares e de componentes individuais sobre o comportamento das operárias, tanto próximo aos seus ninhos como em suas fontes de alimentos, foram consistentes e indicaram que independente da quantidade aplicada dos extratos nestes locais, as operárias reagiram agressivamente apresentando comportamento defensivo. Ambas as espécies de abelhas são capazes



de usar as secreções de suas glândulas mandibulares para comunicação intra- e interespecífica de defesa e agressão.

Feromônios de trilha de *Trigona recurva* (Jarau et al., 2006 e 2004), *Trigona spinipes* (Schorkopf et al., 2007) e *Geotrigona mombuca* (Stangler et al., 2009) foram secretados de **glândulas labiais** das operárias forrageiras. O decanoato de hexila foi o componente majoritário em glândulas labiais de *Trigona recurva*, atuando como um composto que desencadeia o comportamento de acompanhar a trilha nas operárias. Entretanto, a capacidade de atração reduzida deste éster em comparação com os extratos naturais, indicou que o feromônio de trilha é composto pela mistura (Jarau et al., 2006). Em *Trigona spinipes*, o octanoato de octila foi o único composto predominante nas secreções das glândulas labiais, e foi tão eficiente quanto o extrato natural (Schorkopf et al., 2007). O feromônio de trilha de *Geotrigona mombuca* foi constituído de uma mistura de ésteres, com o butanoato de farnesila como componente majoritário, porém, a investigação isolada da atuação de cada um destes compostos ainda não foi realizada (Stangler et al., 2009).

As **glândulas de cera** dos meliponíneos estão localizadas do terceiro ao sexto tergito e apresentam a organização ultraestrutural semelhante em todos eles (Cruz-Landim, 2009). Koedam et al. (2002) observaram que rainhas virgens de *Melipona bicolor* produzem cera como as operárias, contudo, as operárias produzem cera de glândulas localizadas no quarto ao sétimo tergito, enquanto as rainhas secretam cera das glândulas epidermais no terceiro tergito somente. A análise da cera produzida pela rainha mostrou composição semelhante a produzida pelas operárias e constituída essencialmente por ésteres de cadeia longa (acetatos de triacontanila e octacosanila), pequenas quantidades de alcanos (C21 a C31) e alcenos, e ainda quantidades minoritárias de aldeídos lineares e isobutiratos.

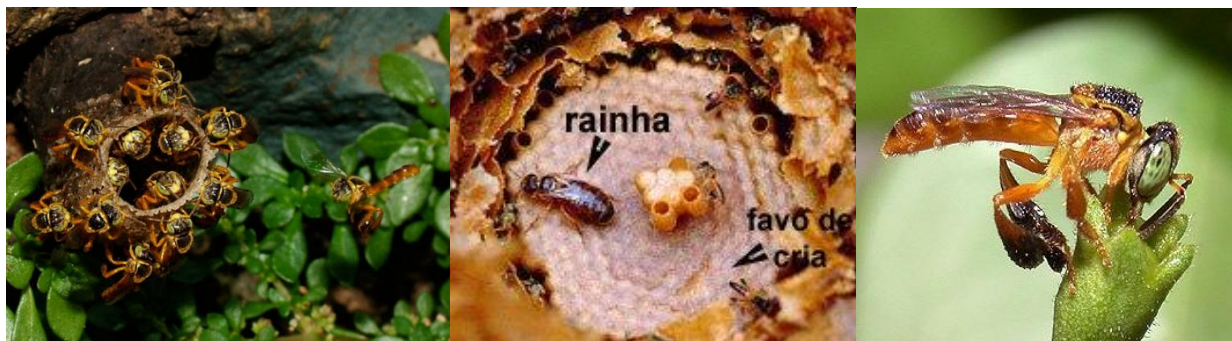
A **cutícula**, células epidérmicas que cobrem todo o exterior do corpo do inseto formando o exoesqueleto, é constituída por uma camada muito fina chamada epicutícula, sobre a qual está depositada uma camada de cera constituída principalmente por hidrocarbonetos importantes (Cruz-Landim, 2009). Os hidrocarbonetos cuticulares são importantes para evitar a desidratação do inseto e também funcionam como feromônios de superfície (Nunes et al., 2009; Tannure-Nascimento et al., 2009; Howard e Blomquist, 2005).

Em espécies de abelhas sem ferrão, alguns trabalhos indicaram que há uma variação dos hidrocarbonetos entre diferentes colônias, castas e indivíduos de diferentes idades (Nunes et al., 2009 e 2008). Jungnickel et al. (2004) observaram que a composição dos hidrocarbonetos em operárias de *Scaptotrigona postica* diferem de uma colônia para outra e podem ser a base da agressão intercolonial verificada na espécie. Nunes et al. (2008) realizaram um estudo comparativo dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares das guardas de *Frieseomelita varia* em relação às forrageiras de mesmo ninho e ninhos diferentes, heteroespecíficos (*Lestrimelitta limao*) e conspecíficos, e verificaram que forrageiras de mesmo ninho foram quase invariavelmente aceitas, enquanto as de ninhos diferentes foram rejeitadas em taxas relativamente altas.

### 3.1.3. *Tetragonisca angustula*

*Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) (Figura 44), conhecida popularmente como jataí, é uma abelha social sem ferrão que se adapta facilmente às diferentes condições de nidificação, como troncos ocos de árvores, buracos de muros e pedras. Esta espécie apresenta importância econômica, uma vez que o extrativismo de mel, cerume e resinas é amplamente disseminado, principalmente no norte e nordeste do Brasil, e também importante papel ecológico,

devido a sua contribuição significativa como agentes polinizadores (Oliveira et al., 2004).



**Figura 44.** Da esquerda para a direita, entrada do ninho de *Tetragonisca angustula* (van Zweden et al., 2011), rainha fisogástrica e operária.<sup>5</sup>

De acordo com Nogueira-Neto (1997), a *T. angustula* apresenta grande potencial como agente polinizador de flores não polinizadas por *Apis mellifera*. Nascimento et al. (2011) realizaram a identificação das abelhas visitantes das flores em pomar de tangerina (*Citrus reticulata*) em Salinas-MG, e verificaram que *T. angustula*, juntamente com *Apis mellifera* e *Trigona spinipes*, foram as espécies de maior predominância em todos os horários amostrados. A criação racional de abelhas jataí é econômica e ecológica, não necessitando de grandes investimentos e possibilitando a reprodução de muitas espécies vegetais através da polinização cruzada (Kerr et al., 1996).

O ninho de jataí é construído em forma de disco contendo uma média de sete favos sobrepostos e ligados entre si por pequenas colunas. As rainhas nascem de células maiores (células reais), que se localizam na borda dos discos. A diferenciação no desenvolvimento de uma operária e uma rainha é exclusivamente

<sup>5</sup> *Tetragonisca angustula*, disponível em <http://www.ufv.br/Dbg/bee/rainha.htm> e <http://www.ame-rio.org/2010/05/abelha-jatai-tetragonisca-angustula.html>. Acesso em: 07/03/2012.

devido à oferta de alimento para a larva, maior para a rainha e menor para a operária, permitindo o completo desenvolvimento do sistema reprodutor (Kerr et al., 1996; Nogueira-Neto, 1997). As operárias possuem a coloração clara quando mais novas, realizando neste estágio somente trabalhos internos na colméia. Na medida em que estas amadurecem, vão ficando mais escuras e fazem o trabalho fora da colméia (Grosso e Bego, 1992). As operárias campeiras, ou forrageiras, marcam o caminho entre a colméia e a fonte de alimento com feromônio para que as outras abelhas, e elas mesmas, possam encontrar o alimento. Cada vez que fazem o voo até sua fonte alimentar, elas reforçam as marcas na trilha (Lindauer e Kerr, 1960).

Recentes pesquisas indicaram que *T. angustula* apresenta uma estratégia inédita de defesa (Grüter et al., 2012 e 2011; Zweden et al., 2011). Nesta espécie a defesa do ninho é realizada por dois grupos de guardas, uma pairando perto da entrada do ninho e outra em pé no tubo de entrada. Ambos os tipos de guardas são 30% mais pesadas do que as forrageiras e possuem formatos diferentes: as forrageiras têm cabeças relativamente maiores, enquanto que as guardas têm pernas maiores. As operárias que removem o lixo do ninho são de tamanho intermediário, sugerindo que elas podem representar uma casta desconhecida. As guardas ou soldados são criados em número reduzido, mas suficiente (1-2% das operárias emergentes), considerando que menos de 1% geralmente executa esta tarefa. Quando desafiadas pela abelha *Lestrimelitta limao*, um importante inimigo natural, as operárias de maior porte são capazes de lutar por mais tempo antes de serem derrotadas. Esta descoberta abre oportunidades para o estudo comparativo das castas em insetos sociais.

## 3.2. Objetivos

### 3.2.1. Gerais

Investigar os ferômonios produzidos pelas diferentes castas da abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula*.

### 3.2.2. Específicos

- Investigar os ferômonios sexuais de *T. angustula* e identificar as glândulas responsáveis por sua produção nestes indivíduos;
- Diferenciar quimicamente castas de operárias de *T. angustula*;
- Diferenciar quimicamente extratos cefálicos de machos de *T. angustula* em diferentes ciclos de vida.

### 3.3. Resultados e Discussão

#### 3.3.1. Investigação do feromônio sexual de *T. angustula*

Com a finalidade de identificar o feromônio sexual responsável pela atração dos machos, testes de campo foram conduzidos utilizando-se rainhas virgens atrativas (12-14 dias de idade) e fisogástricas de *T. angustula*.

Nestes bioensaios, as rainhas foram apresentadas em frascos de vidro aos machos dentro do aglomerado e a cinco metros de distância do mesmo da seguinte maneira: (1) em frasco de vidro completamente vedado; (2) em frasco de vidro semi-aberto, perfurado parcialmente para permitir a saída de voláteis, mas não a entrada dos machos; (3) frasco de vidro completamente aberto contendo apenas o odor deixado pela rainha.

Os machos apresentaram uma distinta atração em relação às rainhas virgens atrativas e fisogástricas. No caso (1) todos os indivíduos ignoraram ambas as rainhas, embora estas pudessem ser aparentemente visualizadas. No caso (2) foi observada a atração de alguns machos a ambas as rainhas, com um maior número sendo atraído pela rainha fisogástrica. Após retirar a rainha do frasco (caso 3), verificou-se uma forte atração da nuvem de machos, os quais se projetavam vigorosamente sobre os recipientes demonstrando forte estímulo sexual. Este resultado foi extremamente importante, pois possibilitou a comprovação da atração da nuvem de machos pelo odor da rainha, anulando qualquer hipótese de estímulo visual.

Os resultados obtidos nos testes de campo desenvolvidos em aglomerados de machos de *T. angustula*, pertos de ninhos ativos ou em fundação, onde os machos foram atraídos tanto pelas rainhas virgens como também pelas fisogástricas,

também foram observados recentemente por Fierro et al. (2011). A atração dos machos pelos odores liberados pela rainha virgem indica provavelmente que estes voláteis desempenham papel reprodutivo durante o voo nupcial. Adicionalmente, as rainhas fisogástricas de *T. angustula* também atraíram os machos, indicando que os feromônios das rainhas fecundadas possivelmente tem outra função dentro do ninho.

Quando uma rainha fisogástrica morta foi apresentada livremente aos machos, estes ficaram extremamente agitados e avançaram sobre a mesma, sendo constatado posteriormente que um dos indivíduos conseguiu efetuar a cópula (Figura 45).



**Figura 45.** (1) macho (destaque para a estrutura da genitália); (2) rainha fisogástrica após cópula com o macho (destaque para a estrutura da genitália do macho que permanece na rainha após a cópula); (3) abdome da rainha fisogástrica pós-cópula com a estrutura da genitália do macho; (4) genitália do macho retirada do abdome da rainha. Foto gentilmente cedida pelo Biólogo Charles Santos (colaborador) no Departamento de Biologia, seção de Entomologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP.

Os voláteis liberados pelas rainhas virgens atrativas e fisogástricas foram coletados durante 2 horas ( $N=1$ , triplicata) através da técnica de headspace dinâmico, possibilitando a identificação de dois ésteres liberados pela rainha fisogástrica, o hexanoato de isopropila ( $0,7988 \mu\text{g/h}$  para uma abelha com massa média de  $393 \text{ mg}$ ,  $R^2=0,9824$ ) e hexanoato de hexila ( $2,5815 \mu\text{g/h}$ ,  $R^2=0,9921$ ),

enquanto a rainha virgem sexualmente atrativa produziu somente o hexanoato de isopropila (0,0257  $\mu\text{g/h}$  para uma abelha com massa média de 100 mg).

Fierro et al. (2011) verificaram que as rainhas virgens de *T. angustula* foram caracterizadas por uma abundância de hexanoato de isopropila, uma pequena quantidade de hexanoato de butila, e traços de hexanoato de hexila. Desta forma, as pequenas quantidades hexanoato de butila e hexila obtidas por estes pesquisadores explicam o fato de ter sido encontrado apenas o hexanoato de isopropila nas rainhas virgens por meio do método de headspace dinâmico, desenvolvido no presente trabalho com um único indivíduo. O mesmo foi observado para a rainha fisogástrica, onde a pequena quantidade de hexanoato de butila observada por Fierro et al. (2011) justificou o fato de termos encontrado no nosso trabalho somente os hexanoatos de isopropila e hexila.

A fim de se verificar a parte corporal da rainha em que estavam localizadas as glândulas responsáveis pela produção dos hexanoatos de isopropila e hexila, foram realizadas análises por CG-EM dos extratos cefálicos e abdominais das rainhas fisogástricas ( $N=1$ , triplicata), uma vez que é mais difícil a obtenção de rainhas virgens *in vitro*. Através destas análises verificou-se que os compostos encontrados nos voláteis coletados por headspace dinâmico, estavam presentes no abdome (Tabela 8). Adicionalmente aos hexanoatos de isopropila e hexila, foram identificados no extrato do abdome da rainha fisogástrica: nonanol; nonadecanona; os ácidos esteárico, oléico e linoléico; alcanos ( $n\text{-C21}$ ,  $n\text{-C23}$ ,  $n\text{-C25}$ ,  $n\text{-C27}$  e  $n\text{-C29}$ ); isômeros de metil-alcanos (metil-C23, -C25, -C27, -C29 e -C31); alcenos (C25:1, C27:1, C29:1, C31:1 e C33:1); alcadienos (C31:2 e C33:2); dimetil-alcano (9,13-dimetil-C25) e quatro esteróides.



**Tabela 8.** Composição química dos extratos cefálicos, abdominais e cuticulares de rainhas de *T. angustula*.

No.	Compostos	IR (calc.)	IR (lit.)	Rainha fisogástrica			Rainha virgem	
				Cabeças (%) <sup>a</sup>	Abdome (%) <sup>b</sup>	Lipídios da cutícula (%) <sup>a</sup>	Cabeças (%) <sup>a</sup>	Lipídios da cutícula (%) <sup>a</sup>
<b>Alcanos</b>								
1	Heneicosano	2100	2100	-	0,27±0,11	-	-	0,20±0,28
2	Tricosano	2300	2300	5,59±0,67	12,34±4,91	11,87±3,01	-	8,08±1,60
3	Pentacosano	2500	2500	2,39±0,41	5,61±1,49	6,26±8,84	-	20,03±3,83
4	Heptacosano	2700	2700	1,94±0,24	4,75±1,23	16,72±3,99	-	17,32±0,54
5	Nonacosano	2900	2900	-	0,65±0,13	2,73±0,82	-	2,58±0,56
<b>Metil-alcanos</b>								
6	9-, e 11-metil-tricosano <sup>c</sup>	2338	-	2,46±0,69	3,60±0,48	2,52±0,98	-	0,65±0,10
7	9-, 11-, e 13-metil-pentacosano <sup>c</sup>	2536	-	2,56±0,72	4,87±1,47	1,76±0,61	-	1,04±0,05
8	9-, 11-, e 13-metil-heptacosano <sup>c</sup>	2735	-	1,79±0,44	3,93±1,72	4,46±3,43	-	0,91±0,06
9	9-, 11-, 13-, e 15-metil-nonacosano <sup>c</sup>	2935	-	1,72±0,28	3,45±1,26	4,38±2,45	-	0,50±0,32
10	11-, 13-, e 15-metil-hentriacontano <sup>c</sup>	3133	-	2,55±0,99	3,70±2,44	4,25±0,47	-	0,70±0,95
<b>Alcenos</b>								
11	9-, 10-, 11- e 12-Pentacoseno <sup>c</sup>	2471	-	0,92±0,15	1,72±0,44	6,19±7,54	-	3,12±2,17
12	9-, 10-, 11-, 12- e 13-Heptacoseno <sup>c</sup>	2671	-	0,42±0,11	0,66±0,24	0,63±0,90	-	2,11±1,59
13	10-, 11-, 12-, 13- e 14-Nonacoseno <sup>c</sup>	2876	-	2,24±0,39	3,87±0,95	3,62±0,32	-	6,51±1,58
14	Hentriacontadieno	3048	-	5,22±1,38	6,49±4,61	6,76±0,13	-	10,13±3,83
15	10-, 11-, 12-, 13-, 14- e 15-Hentriaconteno <sup>c</sup>	3067	-	7,01±0,58	11,37±5,17	11,84±1,78	-	13,21±4,29
16	Tritriacontadieno	3286	-	5,86±0,18	5,96±3,67	6,95±2,13	-	2,76±3,91
17	11-, 12-, 13-, 14-, 15- e 16-Tritriaconteno <sup>c</sup>	3312	-	-	2,19±1,11	1,98±1,77	-	1,04±1,47

<b>Dimetil-alcano</b>								
18	9,13-dimetil-pentacosano	2564	-	0,56±0,72	0,98±0,69	0,22±0,32	-	0,54±0,15
<b>Ácidos</b>								
19	Ácido hexadecanóico	1969	1984	0,23±0,11	0,31±0,54	-	-	-
20	Ácido octadec-9-enóico + octadecadienóico <sup>c</sup>	2137	2161	31,06±8,92	6,84±10,52	-	-	-
21	Ácido octadecanóico	2149	2124	4,64±1,24	1,98±2,68	-	-	-
<b>Álcoois</b>								
22	Nonanol	1169	1171	-	0,36±0,39	-	-	-
23	Nerol <sup>d</sup>	1266	1228	-	-	-	92,45±5,68	-
<b>Cetonas</b>								
24	Nonadecanona	2104	2106	1,09±0,70	3,25±0,47	1,07±0,89	-	4,57±2,12
<b>Ésteres</b>								
25	Hexanoato de isopropila <sup>d</sup>	1035	1040	-	0,42±0,69	-	-	-
26	Hexanoato de butila	1188	1188	-	0,12±0,22	-	-	-
27	Hexanoato de hexila <sup>d</sup>	1383	1352	-	1,48±1,78	-	-	-
<b>Esteróides</b>								
28	Ergostadien-3β-ol	3282	-	2,55±0,11	-	-	-	-
29	Campesterol	3290	3305	4,37±3,78	-	-	-	-
30	β-Sitosterol	3419	3408	5,64±2,24	3,69±2,95	-	-	-
31	Fucosterol	3447	-	7,10±1,60	4,87±3,67	-	-	-
<b>Compostos desconhecidos</b>								
		-	-	0,09	0,27	5,79	7,45	4,00
<b>Total</b>								
		-	-	100	100	100	100	100

IR (calc.) = índice de retenção calculado; IR (lit.) = índice de retenção da literatura (<http://www.pherobase.com/>). <sup>a,b</sup> Média (abundâncias relativas em %) ± DP de rainhas de *T. angustula* de duas colônias (a) e três colônias (b). <sup>c</sup> Compostos co-eluídos em um único pico. <sup>d</sup> Padrões sintéticos foram usados para confirmação destas estruturas.

O hexanoato de isopropila foi anteriormente relatado no extrato hexânico de machos das espécies de moscas *Drosophila putrida* Sturtevant e *Drosophila recens* Wheeler (Jaenike et al., 1992). Testes de campo realizados com estes extratos aumentaram significativamente o número de *Drosophila* spp. no ambiente. Jaenike et al. (1992) concluíram, portanto, que compostos presentes nestes extratos poderiam funcionar como feromônios de agregação. Contudo, não foram realizados testes com os compostos sintéticos. O hexanoato de hexila foi o componente majoritário encontrado na glândula de Dufour das rainhas fisogástricas de um ano de idade da espécie *Scaptotrigona mexicana* (Conesa et al., 2007). Pesquisas desenvolvidas com *Apis mellifera* mostraram que ésteres são os principais componentes identificados nas secreções da glândula de Dufour da rainha e podem funcionar como feromônio de discriminação de ovos ou como sinalização química de fertilidade da rainha para as operárias (Katzav-Gozansk et al., 2001). De acordo com Conesa et al. (2007) ésteres presentes nesta glândula podem funcionar como feromônios que atraem operárias para realizar o processo de provisão da rainha.

Para investigar a função dos hexanoatos de isopropila e hexila nas rainhas virgens atrativas e fisogástricas de *T. angustula*, estes ésteres foram sintetizados (Neises e Steglich, 1978), e caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (CDP) (Figuras 42-45A em anexo). Os testes de campo foram desenvolvidos ao lado de ninhos em condições normais e realizados na Universidade Estadual de Campinas, em junho de 2011, e na Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, em setembro de 2011.

Foram preparados extratos hexânicos com o hexanoato de isopropila e hexila e os mesmos foram adicionados a tiras de papel de filtro colocadas dentro de placas de Petri. As tiras foram monitoradas durante 10 min para cada um dos compostos, mistura 1:1 dos ésteres e o controle (hexano). Ao final dos testes foi observada a presença de machos (3 indivíduos), não sendo possível distinguir se estes foram atraídos pelos compostos puros ou mistura dos dois. Entretanto, Fierro et al. (2011)

observaram que o hexanoato de isopropila, composto mais abundante na rainha virgem e um dos mais abundantes na rainha fisogástrica, foi identificado como um dos compostos que elicitou uma resposta na rainha por Cromatografia Gasosa acoplada a Eletroantenografia, e também foi demonstrado que atraiu machos nos testes de campo. No teste de campo utilizando hexanoato de isopropila sintético, foi observado que os machos eram atraídos até o ninho, mas não apresentavam qualquer comportamento de indução de cópula. Dessa forma, provavelmente os ésteres identificados por Fierro et al. (2011) atuam de modo secundário ou sinérgico aos feromônios sexuais, sendo responsáveis pela atração a média distância, havendo a necessidade da presença de um segundo composto (ou mais) para induzir a cópula (Flach et al., 2006; Ayasse et al., 2000).

Baseado na atração que foi observada dos machos aos compostos deixados pelas rainhas nos frascos de vidro em que elas estiveram aprisionadas, análises dos lipídios cuticulares da rainha fisogástrica foram realizados por CG-EM. Os compostos foram identificados por comparação de seus espectros de massas com dados da biblioteca Wiley275 do equipamento, bem como por meio dos índices de retenção e co-eluição com padrões. Nesta análise verificou-se a presença de alcanos (*n*-C23, *n*-C25, *n*-C27 e *n*-C29); alcenos (C25:1, C27:1, C29:1, C31:1 e C33:1); isômeros de metil-alcanos (metil-C23, -C25, -C27, -C29 e -C31); dimetil-alcano (9,13-dimetil-C25) e uma cetona (nonadecanona). A rainha virgem sexualmente atrativa também apresentou os mesmos hidrocarbonetos em sua constituição, incluindo o *n*-C21 (Tabela 8).

A função primordial dos lipídios cuticulares é proteger os insetos da dissecação, porém eles também podem ser utilizados em sistemas de reconhecimento de ambos os insetos solitários e sociais, permitindo o inseto reconhecer e, possivelmente, discriminar a sua própria espécie, sexo ou castas do de outros insetos, podendo ainda funcionar como atrativos sexuais (Singer, 1998).

O estudo do comportamento de pseudocópula no sistema abelha *Andrena-Ophrys* mostrou que tanto a abelha como a orquídea possuem constituintes alcanos/alcenos semelhantes e esta mistura, presente tanto na rainha virgem desta espécie como na orquídea, é responsável por este comportamento de pseudocópula (Schiestl e Ayasse; 2002). Flach et al. (2006) demonstraram que a similaridade entre série homóloga de alcanos/9-alcenos presente nas flores de *Mormolyca ringens* e na cera das rainhas virgens de *Scaptotrigona* sp. podem ser responsáveis pelo fenômeno da pseudocópula em machos. Estes pesquisadores sugeriram que alcanóis são sinais responsáveis pela atração de machos à longa distância, enquanto a série homóloga de alcanos/9-alcenos atua como um sinal a curta distância de indução da cópula em *Scaptotrigona* sp. Ayasse et al. (1999) também observaram que alcanos e alcenos produzidos pela fêmea da abelha *Lasioglossum malachurum* foram atrativos para machos.

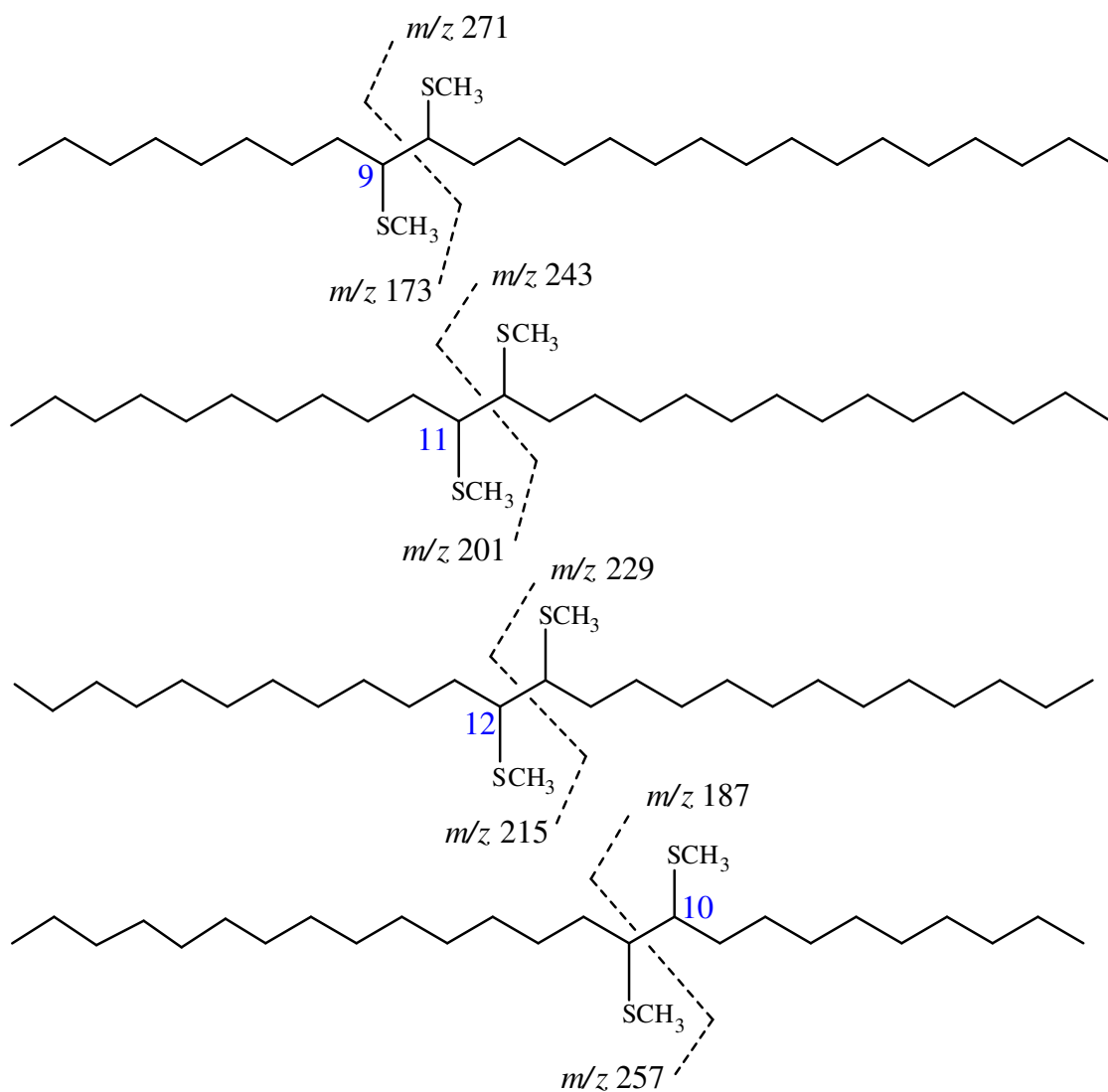
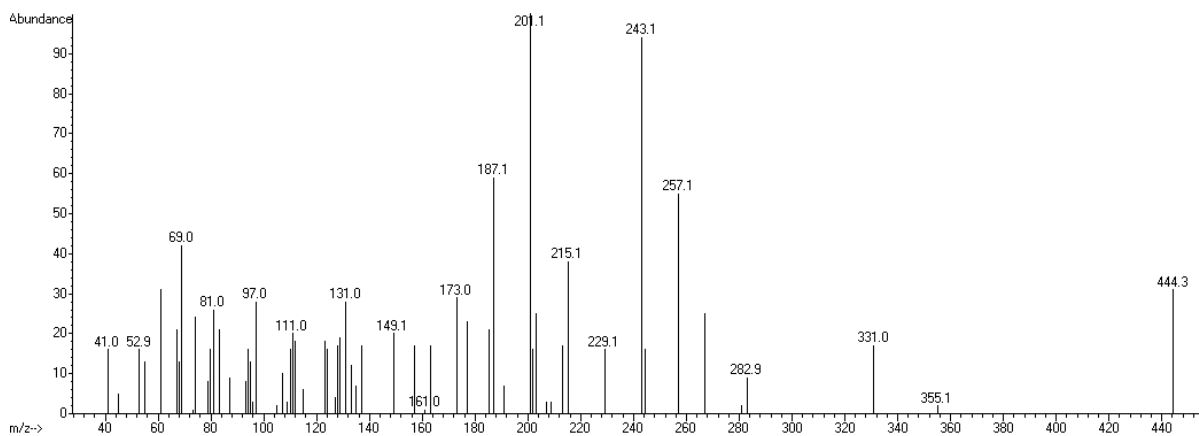
Baseado nestes dados foi levantado a hipótese de que os hidrocarbonetos identificados nas rainhas poderiam ser os responsáveis pela indução dos machos à cópula. Para tanto, realizou-se o fracionamento do extrato lipídico da cutícula da rainha fisogástrica em coluna cromatográfica de sílica impregnada com nitrato de prata separando-se a mistura de alcenos da mistura de alcanos e metil-alcanos, que co-eluíram (Figuras 46A em anexo). Estas frações serão submetidas futuramente a testes de campo em aglomerados de machos.

Quase todos os hidrocarbonetos encontrados no abdome da rainha fisogástrica também estiveram presentes no extrato da cabeça, com exceção do C21, C29 e C33:1 que foram exclusivos do abdome, isso pode ser decorrente do fato destes hidrocarbonetos estarem presentes na cutícula deste inseto. O extrato da cabeça da rainha virgem foi constituído majoritariamente de nerol (Tabela 8). O nerol foi o componente majoritário em cabeças de operárias de *Trigona*

*fulviventris*, demonstrando em testes de campo a função de feromônio de alarme (Johnson e Wiemer, 1982).

A presença de dois isômeros dos alcenos foi observada nos extratos de lipídios cuticulares, cefálicos e abdominais das rainhas, podendo se tratar de isômeros contendo uma ligação dupla em diferentes posições ou ainda de isômeros geométricos. Dessa forma, os extratos das ceras foram submetidos à derivatização com dissulfeto de dimetila/iodo (DMDS/I<sub>2</sub>) e analisados por CG-EM, onde foi possível se observar a presença de um único pico para cada alceno, os quais apresentaram espectros de massas bastante complexos.

A análise do espectro de massa do derivado DMDS do pentacoseno ( $M^{+}$   $m/z$  144, Figura 46), por exemplo, permitiu verificar a ocorrência de cinco isômeros, com as ligações duplas localizadas na posição 9, confirmada pelos pares de fragmentos de  $m/z$  173 e 271, posição 10, pelos pares de fragmentos de  $m/z$  187 e 257, posição 11, pelos pares de fragmentos majoritários de  $m/z$  243 e 201, e posição 12, pelos fragmentos de  $m/z$  229 e 215. Os isômeros dos derivados DMDS dos alcenos heptacoseno, nonacoseno, hentriaconteno e tritriaconteno também tiveram as posições de suas ligações duplas determinadas (Tabela 8 e Figuras 47-51A em anexo).



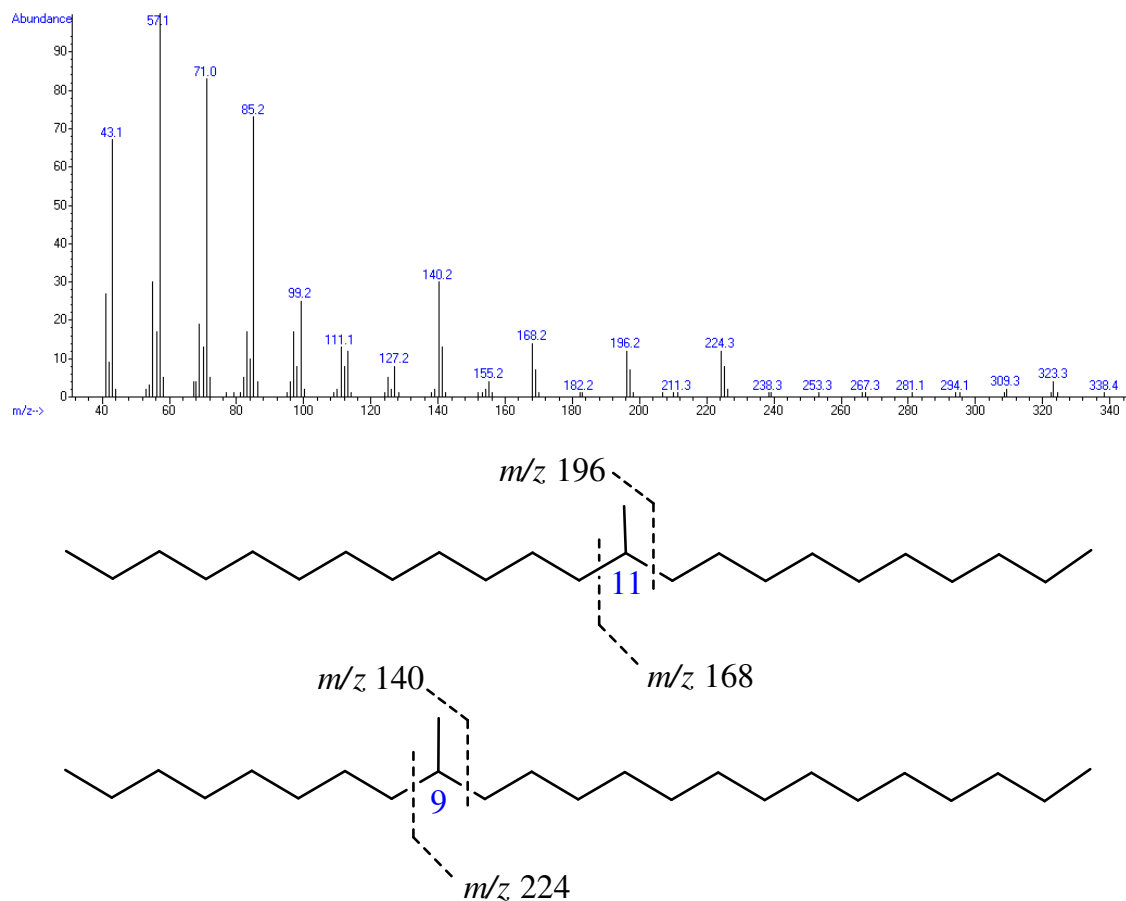
**Figura 46.** Espectro de massas e fragmentações dos derivados DMDS dos isômeros de pentacoseno.

Além dos alcenos, a mistura isomérica de monometil-alcenos também foi observada nos extratos das ceras das rainhas (Tabela 8). Alcanos ramificados são identificados em espectrometria de massas por seu íon molecular característico e pela sua clivagem característica na posição da ramificação. Contudo, outro fragmento característico pode ser observado, o qual é resultante da transferência de hidrogênio que ocorre no íon fragmento decorrente da clivagem na posição da ramificação, dando origem ao um pico  $C_nH_{2n}$  cuja intensidade é maior que a do correspondente pico  $C_nH_{2n+1}$  (ímpar) quando este íon fragmento tem uma cadeia alifática longa, com sete ou mais átomos de carbono (Nelson et al., 1972; McCarthy et al., 1968).

Na Figura 47 encontra-se o espectro de massas dos isômeros 9- e 11-metiltricosano ( $M^+$   $m/z$  338). Os quatro picos característicos de  $m/z$  140, 168, 196 e 224, indicaram que dois isômeros monometil-alcenos estavam presentes. A posição da ramificação no primeiro isômero da mistura foi estabelecida como sendo no carbono 9 pelos pares de picos de íons secundários característicos de  $m/z$  224 e 225, conclusão suportada pela presença dos pares de fragmentos de íons primários com 8 carbonos de  $m/z$  112 e 113 (não mostrado na figura), e dos pares de picos de fragmentos de íons secundários de  $m/z$  140 e 141 resultantes da clivagem do outro lado do ponto de ramificação da molécula. Neste último caso os pares de picos de  $m/z$  196 e 197 (não mostrado na figura) para o fragmento de íons primários de 15 carbonos não foram considerados devido às contribuições dessas massas ao fragmento de íon secundário do isômero 11-metil. Por este mesmo motivo os fragmentos de íons primários do outro isômero também não foram considerados. O isômero 11-metil apresentou pares de picos de íons secundários de  $m/z$  168 e 169 e  $m/z$  196 e 197. Desta forma, baseado nos fragmentos característicos de monometil-alcenos e no fato da mistura apresentar tempo de retenção compatível com o



esperado para um monometil-alcano (ver índice de retenção na Tabela 8), concluiu-se que se tratava, de fato, da mistura isomérica de 9- e 11-metil-tricosano.

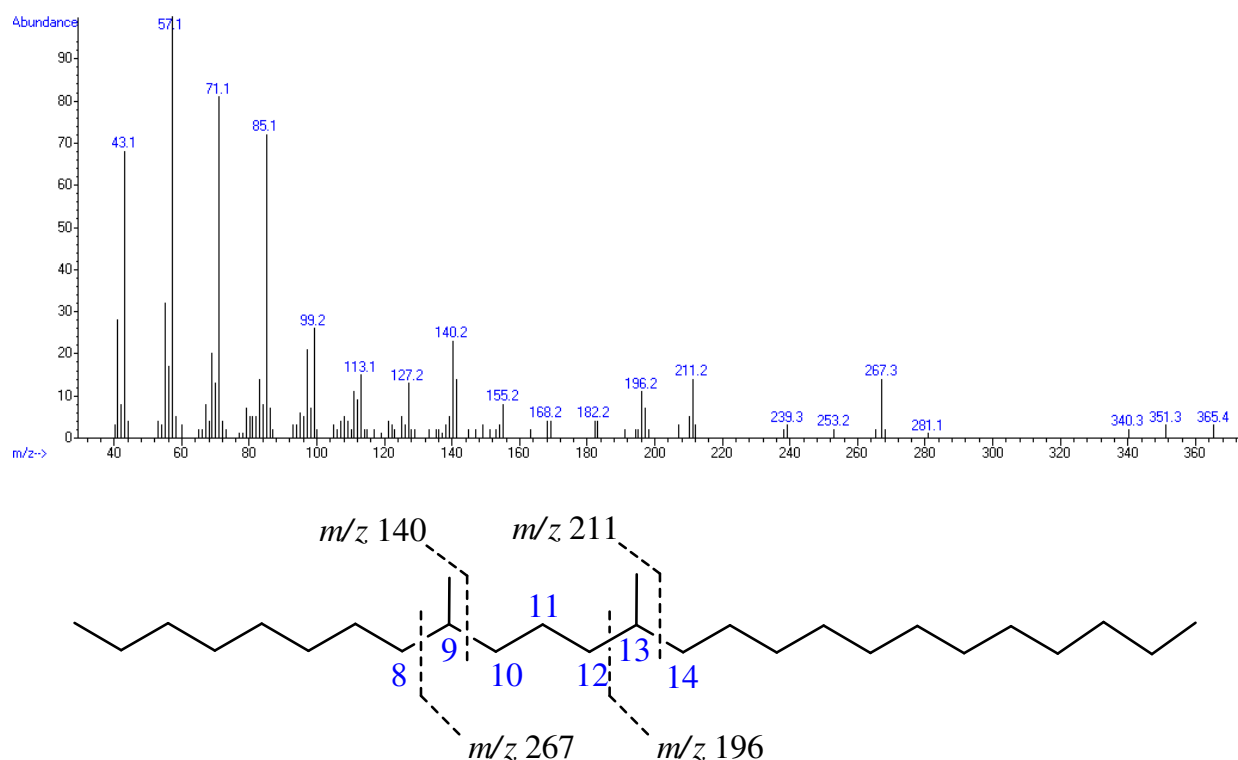


**Figura 47.** Espectro de massas e fragmentação dos isômeros 9- e 11-metil-tricosano.

As análises dos espectros de massas dos demais monometil-alcenos indicaram a presença das misturas isoméricas de 9-, 11- e 13-metil-pentacosano (Figura 52A em anexo); 9-, 11- e 13-metil-heptacosano (Figura 53A em anexo); 9-, 11-, 13- e 15-metil-nonacosano (Figura 54A em anexo); e 11-, 13- e 15-metil-hentriacontano (Figura 55A em anexo), ressaltando-se que nos casos de 13-metil-pentacosano e 15-metil-nonacosano, que são moléculas simétricas, não foi possível distinguir se os fragmentos de íons secundários de  $m/z$  196 e 224, respectivamente,

são de fato resultantes das fragmentações destes isômeros ou correspondem a fragmentos de íons primários dos isômeros 11-metil-pentacosano e 13-metil-nonacosano, respectivamente.

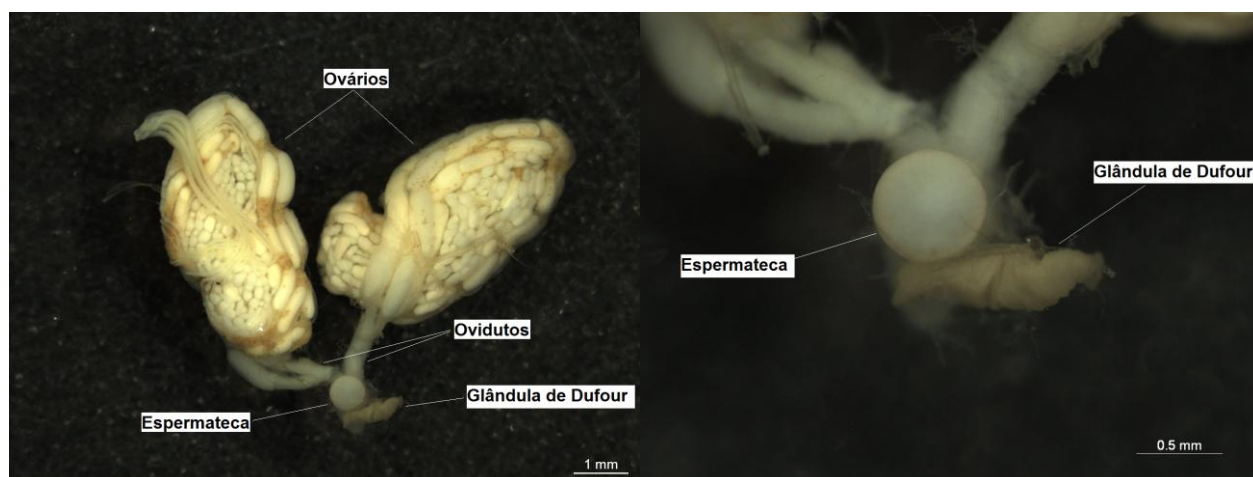
9,13-Dimetil-pentacosano ( $M^+$   $m/z$  380) (Figura 48) também foi identificado nos extratos de lipídios cuticulares das rainhas, o que foi evidenciado pelo tempo de retenção compatível para um dimetil-alcano (ver índices de retenção na Tabela 8) e fragmentações características. As clivagens nas posições 8 e 13 geraram os fragmentos de íons secundários ímpares de  $m/z$  267 e 211, respectivamente. Por sua vez, as clivagens nas posições 9 e 12 deram origem aos picos de fragmentos de íons secundários pares de  $m/z$  140 e 196, uma vez que estes íons têm uma de cadeia linear longa.



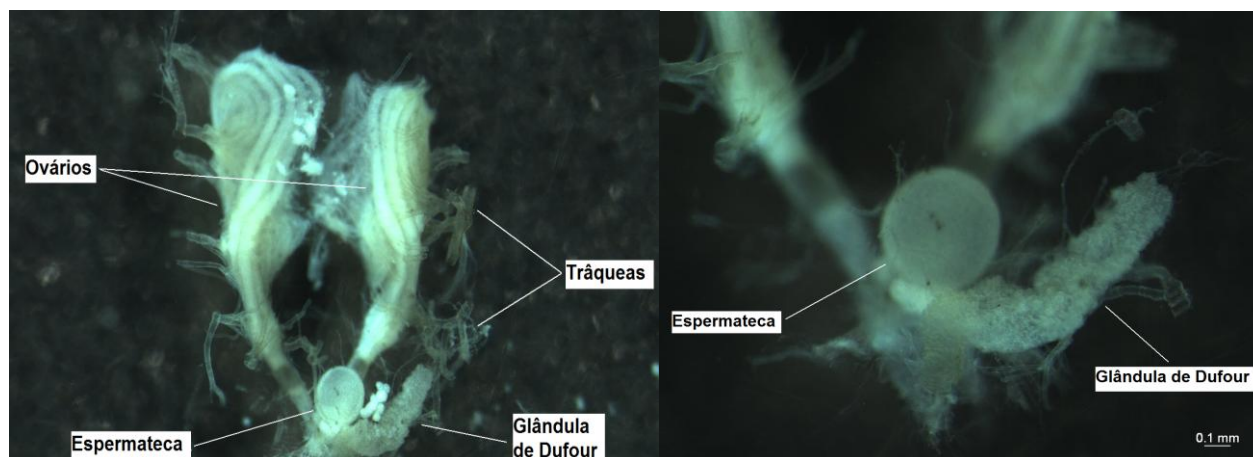
**Figura 48.** Espectro de massas e fragmentação do 9,13-dimetil-pentacosano

### 3.3.2. Análises das glândulas de Dufour e tergaís de rainhas virgens atrativas e fisogástricas de *T. angustula*

As extrações das glândulas de Dufour e tergaís de rainhas virgens e fisogástricas foram realizadas pelo doutorando Charles Santos (USP-SP), a partir de indivíduos removidos imediatamente das placas de Petri de criação e das colônias, respectivamente, e prontamente mortos por resfriamento em freezer. As glândulas dissecadas (Figuras 49 e 50) foram imediatamente injetadas em CG-EM.



**Figura 49.** Da esquerda para a direita: (A) Aparelho reprodutivo de rainhas fisogástricas de *T. angustula*; (B) Detalhe da espermateca e glândula de Dufour. Foto gentilmente cedida pelo Biólogo Charles Santos (colaborador) no Departamento de Biologia, seção de Entomologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP.



**Figura 50.** Da esquerda para a direita: (A) Aparelho reprodutivo de rainhas virgens de *T. angustula*; (B) Detalhe da espermateca e glândula de Dufour. Foto gentilmente cedida pelo Biólogo Charles Santos (colaborador) no Departamento de Biologia, seção de Entomologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP.

Nas secreções das glândulas de Dufour das rainhas fisogástricas foram encontrados ésteres, incluindo os hexanoatos de isopropila e hexila, com acetato de tetradecila (21,63%) e butirato de tetradecila (21,83%) como majoritários. Foram observadas co-eluições de dodecanoato de butila e butirato de dodecila. Na glândula de Dufour das rainhas virgens sugeriu-se a presença do octadecenoato de octadecila como componente majoritário (67,34%) (Tabela 9), contudo, a confirmação desta estrutura será efetivada em estudos posteriores do grupo de pesquisa. Adicionalmente, foi ainda observada uma porcentagem significativa de pentacosano (19,22%) na glândula de Dufour das rainhas virgens, provavelmente proveniente da cutícula deste indivíduo (Cruz-Landim, 2009; Neil et al., 1994).

Nas glândulas terçais de ambas as rainhas foram encontrados os hexanoatos de isopropila e hexila, além de nonanol, nonadecanona, alcanos, alcenos, isômeros de metil-alcanos e 9,13-dimetil-C25. Heneicoseno, acetato de dodecila e octadecenoato de octadecila foram encontrados somente nas glândulas terçais das rainhas virgens, enquanto que isômeros de tritriaconteno, triacontadieno, 9,13-

dimetil-C25 e hexanoato de butila foram detectados apenas nas glândulas terciais das rainhas fisogástricas (Tabela 9).

A existência de hexanoatos de isopropila e hexila em ambas as glândulas de Dufour e terciais de rainhas fisogástricas de *T. angustula* foi um fato interessante observado no presente trabalho. Alguns estudos apontaram que compostos semelhantes podem ser encontrados em glândulas diferentes de um mesmo indivíduo, provavelmente podem ter sido absorvidos da hemolinfa desses insetos (Abdalla et al., 1999; Katzav-Gozansky et al., 1998). Apesar de não se poder afirmar quais das glândulas (ou talvez as duas) foram responsáveis por liberarem estes compostos, devido ao fato da rainha virgem liberar hexanoatos de isopropila e este composto está ausente em sua glândula de Dufour, possivelmente as glândulas terciais de ambas as rainhas sejam os responsáveis por sua produção.

**Tabela 9.** Composição química dos extratos glandulares de rainhas de *T. angustula*.

No.	Compostos	IR (calc.)	IR (lit.)	Rainha fisogástrica		Rainha virgem	
				Glândula de Dufour (%) <sup>a</sup>	Glândula tergal (%) <sup>a</sup>	Glândula de Dufour (%) <sup>a</sup>	Glândula tergal (%) <sup>a</sup>
<b>Alcanos</b>							
1	Heneicosano	2100	2100	-	0,33±0,09	-	0,66±0,15
2	Tricosano	2300	2300	0,96±1,35	10,27±1,51	-	3,89±1,61
3	Pentacosano	2500	2500	1,92±3,33	5,15±1,63	19,22±15,31	44,82±4,87
4	Heptacosano	2700	2700	2,38±4,12	5,64±2,31	-	7,31±3,73
5	Nonacosano	2900	2900	-	1,06±0,73	-	0,23±0,23
<b>Metil-alcanos</b>							
6	9-, e 11-metil-tricosano <sup>b</sup>	2338	-	-	2,39±1,53	-	0,42±0,24
7	9-, 11-, e 13-metil-pentacosano <sup>b</sup>	2536	-	-	2,37±1,15	-	1,15±0,71
8	9-, 11-, e 13-metil-heptacosano <sup>b</sup>	2735	-	-	1,90±0,39	-	0,58±0,18
9	9-, 11-, 13-, e 15-metil-nonacosano <sup>b</sup>	2935	-	-	2,72±0,81	-	0,09±0,15
10	11-, 13-, e 15-metil-hentriacontano <sup>b</sup>	3133	-	-	4,27±1,15	-	0,47±0,43
<b>Alcenos</b>							
11	Heneicoseno	-	-	-	-	-	0,10±0,16
12	Tricoseno	-	-	-	0,39±0,34	-	0,11±0,18
13	9-, 10-, 11- e 12-Pentacoseno <sup>b</sup>	2471	-	-	2,56±1,73	-	2,46±1,07
14	9-, 10-, 11-, 12- e 13-Heptacoseno <sup>b</sup>	2671	-	-	0,82±0,41	-	2,94±1,05
15	10-, 11-, 12-, 13- e 14-Nonacoseno <sup>b</sup>	2876	-	-	6,06±3,17	-	3,11±2,04
16	Hentriacontadieno	3048	-	-	12,77±3,48	-	1,37±1,51
17	10-, 11-, 12-, 13-, 14- e 15-Hentriaconteno <sup>b</sup>	3067	-	-	19,84±9,88	-	4,43±2,59

18	Tritriacontadieno	3286	-	-	11,52±3,11	-	-
19	11-, 12-, 13-, 14-, 15- e 16-Tritriaconteno <sup>b</sup>	3312	-	-	3,41±1,84	-	-
<b>Dimetil-alcano</b>							
20	9,13-dimetil-pentacosano	2564	-	-	0,48±0,56	-	-
<b>Álcoois</b>							
21	Nonanol	1169	1171	-	1,33±1,28	-	0,03±0,05
<b>Cetonas</b>							
22	Nonadecanona	2104	2106	0,24±0,25	3,22±1,81	-	14,95±9,26
<b>Ésteres</b>							
23	Hexanoato de etila	-	-	0,10±0,13	-	-	-
24	Hexanoato de isopropila <sup>c</sup>	1035	1040	0,25±0,20	0,33±0,36	-	0,03±0,06
25	Hexanoato de butila	1188	1188	0,64±0,13	0,03±0,05	-	-
26	Hexanoato de hexila <sup>c</sup>	1383	1352	0,90±0,85	1,16±1,26	-	0,10±0,14
27	Acetato de decila	-	1408	0,08±0,11	-	-	-
28	Dodecanoato de etila	-	1595	0,05±0,07	-	-	-
29	Acetato de dodecila	1603	1609	14,13±6,86	-	-	0,13±0,19
30	Dodecanoato de isopropila	1623	-	1,76±1,73	-	-	-
31	Dodecanoato de butila + butirato de dodecila <sup>b</sup>	1783	-	6,12±2,16	-	-	-
32	Acetato de tetradecila	1805	1811	21,63±5,13	-	-	-
33	Tetradecanoato de isopropila	-	1814	0,11±0,16	-	-	-
34	Hexanoato de dodecila	1978	-	14,91±4,65	-	-	-
35	Butirato de tetradecila	1985	-	21,83±3,98	-	-	-
36	Acetato de hexadecila	2004	2009	0,95±0,75	-	-	-
37	Hexanoato de tetradecila	2177	-	5,72±2,69	-	-	-
38	Butirato de hexadecila	2183	-	1,03±0,97	-	-	-

39	Hexanoato de hexadecila	2373	-	0,14±0,15	-	-	-
40	Dodecanoato de dodecila	2565	-	1,69±1,11	-	-	-
41	Dodecanoato de tetradecila	-	-	0,85±0,69	-	-	-
42	Tetradecanoato de tetradecila	2764	-	0,11±0,15	-	-	-
43	Octadecenoato de octadecila <sup>d</sup>	2803	-	-	-	67,34±24,73	2,76±2,40
<b>Compostos desconhecidos</b>		-	-	1,50	-	13,44	7,86
<b>Total</b>		-	-	100	100	100	100

IR (calc.) = índice de retenção calculado; IR (lit.) = índice de retenção da literatura (<http://www.pherobase.com/>). <sup>a</sup> Média (abundâncias relativas em %) ± DP de rainhas de *T. angustula* de três colônias. <sup>b</sup> Compostos co-eluídos em um único pico. <sup>c</sup> Padrões sintéticos foram utilizados para confirmação destas estruturas. <sup>d</sup> Sugestão de estrutura a ser confirmada em trabalhos posteriores do grupo de pesquisa.



### 3.3.3. Diferenciação química entre castas de operárias *T. angustula*

Durante a fundação de ninhos em abelhas sem ferrão há a participação de diversas operárias e, pouco tempo depois de iniciada, vários machos aparecem para se acasalarem com uma rainha virgem prestes a chegar para essa nova colônia. Acredita-se que uma parte dessas operárias poderia ter entrato em contato com a rainha e adsorvido os feromônios sexuais da fêmea reprodutiva e quando se dirigisse para o local do ninho em fundação, os feromônios da rainha virgem se espalhariam pelo ambiente, formando uma trilha de odor e atraindo os machos próximos, os quais se dirigem para o ninho em fundação e aguardam a chegada da rainha virgem, evento que ocorre poucos dias após a chegada dos machos. Uma segunda hipótese seria a de que as próprias operárias fundadoras é que, de fato, seriam as responsáveis por liberar tais compostos que atraem os machos, uma vez que estes são atraídos sem que a rainha virgem esteja presente. Desta forma, a fim de contribuir na investigação deste fenômeno identificaram-se as substâncias químicas presentes nos extratos das cabeças e abdômes das operárias fundadoras, e adicionalmente, operárias guardas de ninhos órfãos também tiveram seus extratos cefálicos e abdominais analisados, a fim de comparar seus compostos com aqueles encontrados nas fundadoras.

O extrato cefálico das operárias fundadoras de *T. angustula* foi constituído por 6 ácidos (32,57%), 4 alcanos (24,82%), 1 alceno (0,16%), 8 álcoois (7,42%), 4 aldeídos (7,06%), 4 ésteres (5,79%) e 4 esteróides (18,98%). A análise do extrato das secreções cefálicas de operárias guardas desta mesma espécie, coletadas de ninhos órfãos, revelou a presença de 6 ácidos (57,21%), 3 alcanos (5,79%), 7 álcoois (5,20%), 4 aldeídos (6,29%), 6 ésteres (5,82%) e 4 esteróides (11,88%) (Tabela 10).

Francke et al. (2000) analisaram os constituintes voláteis das secreções cefálicas de operárias forrageiras de *T. angustula* e encontraram uma mistura de 9 alcoóis, 3 cetonas, 8 ácidos carboxílicos, 15 ésteres e 1 composto aromático. Os alcoóis tetradecanol, hexadecanol e octadecanol foram compostos comuns às operárias forrageiras, fundadoras e guardas, bem como os ácidos tetradecanóico, hexadecanóico, oléico, linoléico e esteárico, os ésteres butirato de tetradecila e hexadecila, e o fenilacetaldéido. Entretanto, os extratos cefálicos das operárias forrageiras do estudo desenvolvido por Francke et al. (2000) mostraram uma maior variedade de ésteres e alcoóis, e ainda a presença de cetonas, as quais não estiveram presentes nas operárias guardas e fundadoras analisadas neste trabalho. Em contrapartida, os terpenos nerol, neral, geraniol e geranial foram encontrados somente nas secreções cefálicas das operárias guardas e fundadoras, assim como os esteróides, álcool benzílico, benzaldeído e ácido benzóico. Os butiratos de benzila e dodecila estiveram presentes somente nas operárias guardas, e nonacoseno e hentriancotano apenas nas operárias fundadoras.

**Tabela 10.** Composição química dos extratos cefálicos e abdominais de operárias fundadoras e guardas de *T. angustula*.

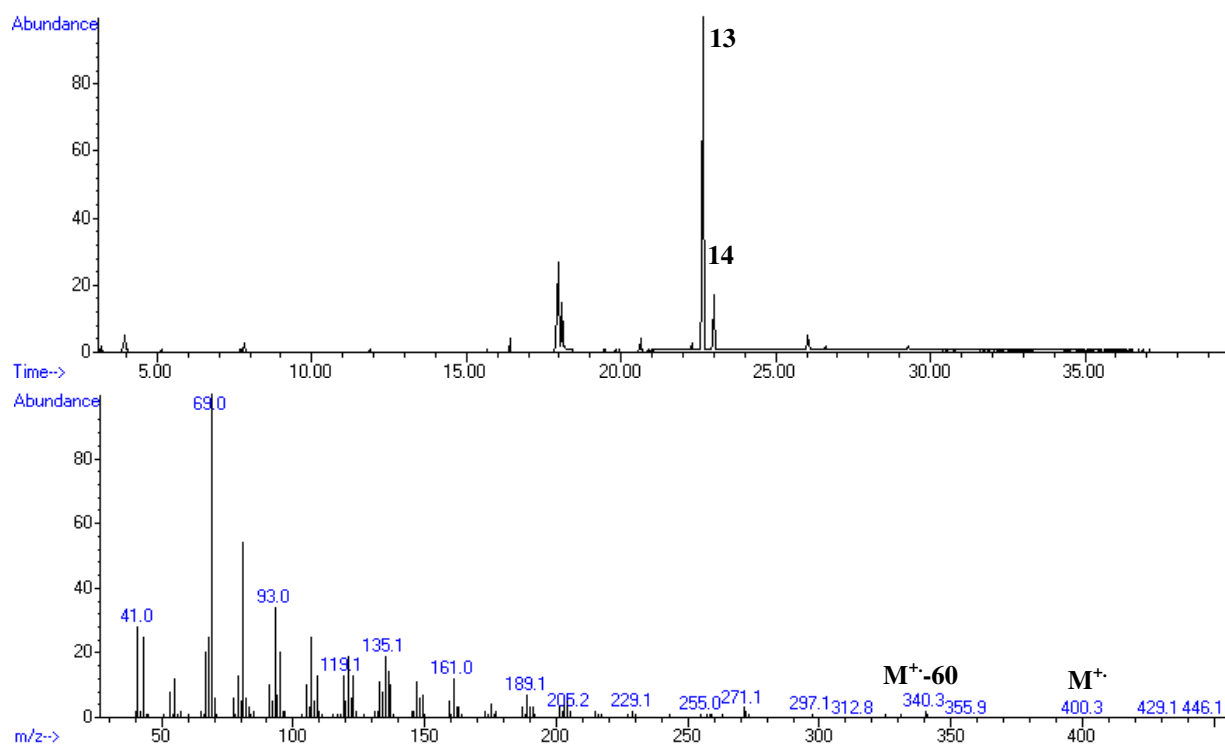
No.	Compostos	IR (calc.)	IR (lit.)	Operárias fundadoras		Operárias guardas	
				Cabeças (%) <sup>a</sup>	Abdomes (%) <sup>a</sup>	Cabeças (%) <sup>a</sup>	Abdomes (%) <sup>a</sup>
<b>Ácidos</b>							
1	Ácido benzóico	1174	-	0,29±0,41	-	0,30±0,11	0,18±0,26
2	Ácido tetradecanóico	1789	1720	0,14±0,19	-	0,16±0,00	-
3	Ácido hexadecenóico	1998	1938	0,21±0,30	-	0,08±0,11	-
4	Ácido hexadecanóico	2028	1984	0,45±0,07	1,33±0,76	2,04±0,75	1,33±0,19
5	Ácidos octadecenóico + octadecadienóico <sup>b</sup>	2238	2161	22,39±17,52	50,27±5,57	38,65±3,39	16,18±6,88
6	Ácido octadecanóico	2248	2200	9,09±5,13	18,93±2,48	15,98±5,20	4,69±3,11
<b>Alcanos</b>							
7	Pentacosano	2500	2500	14,48±16,75	15,88±13,30	4,13±0,36	1,68±0,46

8	Heptacosano	2700	2700	6,88±8,77	4,76±3,52	1,43±0,17	1,16±0,24
9	Nonacosano	2900	2900	1,51±2,13	1,04±1,47	0,23±0,06	-
10	Hentriacontano	3100	3100	1,95±2,75	-	-	-
<b>Alcenos</b>							
11	Nonacoseno	-	-	0,16±0,23	-	-	-
<b>Álcoois</b>							
12	Álcool benzílico	1016	1032	1,01±1,25	-	0,34±0,17	-
13	Benzenoetanol	1112	1110	1,67±1,94	-	0,66±0,28	-
14	Nerol <sup>c</sup>	-	1228	Traços	-	0,04±0,05	-
15	Geraniol <sup>c</sup>	-	1255	Traços	-	0,14±0,19	-
16	Tetradecanol	-	-	0,06±0,08	-	0,59±0,01	-
17	Hexadecanol	-	-	1,81±2,56	-	2,84±0,88	-
18	Octadecanol	-	-	0,18±0,26	-	0,59±0,37	-
19	Eicosenol	-	-	2,69±3,80	-	-	-
<b>Aldeídos</b>							
20	Benzaldeído <sup>c</sup>	932	961	5,76±2,58	-	4,30±0,98	-
21	Fenilacetaldéido	1027	1043	0,80±0,36	-	1,24±0,40	-
22	Neral	1251	1240	0,10±0,14	-	0,27±0,08	-
23	Geranial	1283	1270	0,40±0,56	-	0,48±0,27	-
<b>Ésteres</b>							
24	Butirato de benzila	1362	1345	-	-	0,04±0,06	-
25	Butirato de dodecila	1774	-	-	-	0,14±0,04	-
26	Butirato de tetradecila	2053	-	2,36±2,17	-	2,20±0,06	-
27	Octadecenoato de etila	2202	-	2,26±3,19	-	2,36±3,33	0,64±0,90
28	Butirato de hexadecila	2220	-	1,00±0,39	-	0,79±0,47	-
29	Octadecanoato de etila	2227	-	0,17±0,24	-	0,29±0,41	-
30	Desconhecido	2785	-	-	6,00±8,48	-	48,40±1,95
31	Acetato de geranil-farnesila	2816	-	-	-	-	9,71±2,45
<b>Esteróides</b>							
32	Ergostadien-3β-ol	3250	-	4,65±3,96	-	2,95±0,59	-
33	Campesterol	3258	3305	5,21±2,71	-	3,24±0,25	-
34	β-Sitosterol	3374	3408	5,08±1,21	0,08±0,11	3,05±0,67	-
35	Fucosterol	3398	-	4,04±0,43	1,70±2,41	2,64±0,43	-
<b>Compostos desconhecidos</b>				3,20	-	7,81	16,03
<b>Total</b>				100	100	100	100

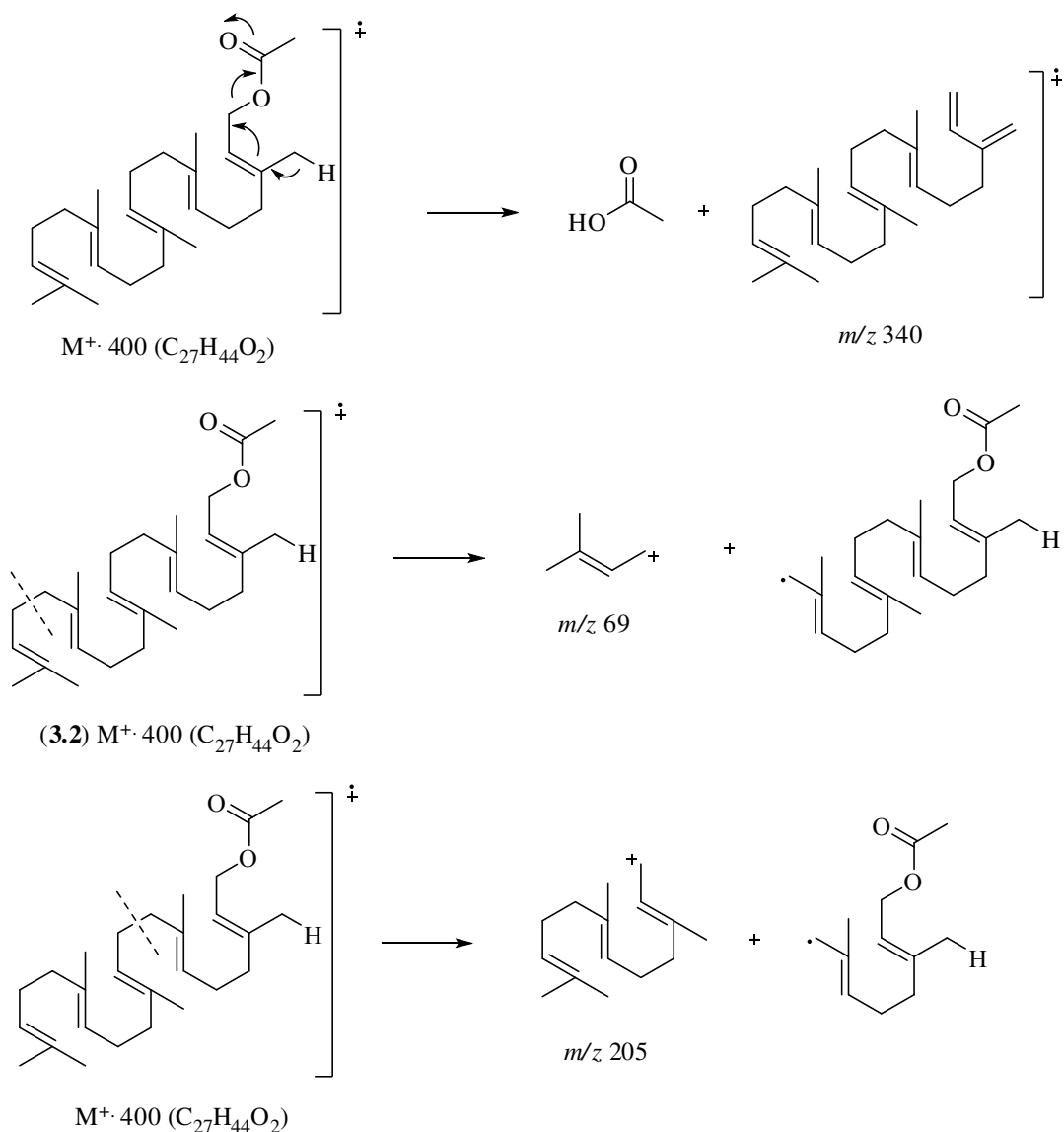
IR (calc.) = índice de retenção calculado; IR (lit.) = índice de retenção da literatura (<http://www.pherobase.com/>).

<sup>a</sup>Média (abundâncias relativas em %) ± DP de operárias de *T. angustula* (N=6) de duas colônias. <sup>b</sup>Compostos co-eluídos em um único pico. <sup>c</sup>Padrões sintéticos foram usados para confirmação destas estruturas.

Os extratos abdominais das operárias guardas de *T. angustula* foram constituídos de 5 ácidos (22,38%), 2 alcanos (2,84%), 2 ésteres (10,35%) e 1 composto de estrutura desconhecida (58,11%) indicado na Figura 51 como composto **13**. A identificação do acetato de geranyl-farnesila (**14**) foi realizada através da análise do seu espectro de massas (Figura 51) que evidenciou fragmentações características de sua estrutura (Figura 52), anteriormente relatado nas secreções das glândulas labiais de machos da espécie *Bombus semenoviellus* (Hovorka et al., 2006).



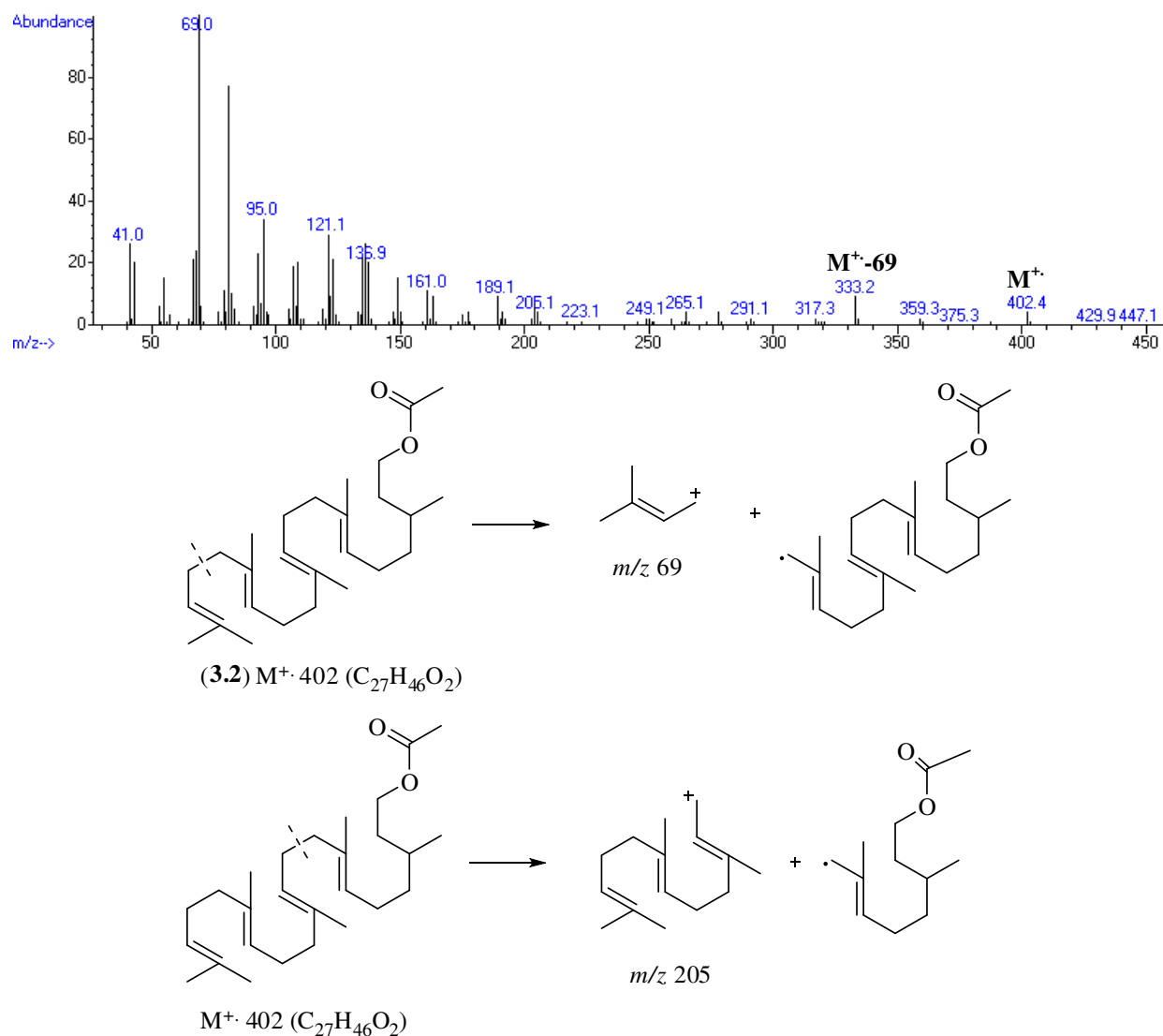
**Figura 51.** Cromatograma de íons totais (IE, 70 eV) da secreção abdominal das operárias guardas e espectro de massas do acetato de geranyl-farnesila (**14**).



**Figura 52.** Algumas fragmentações de massas do acetato de geranyl-farnesila (**14**).

O composto **13**, majoritário no extrato cefálico das operárias guardas de *T. angustula*, apresentou em seu espectro de massas (Figura 53) íon molecular com duas unidades de massas a mais que o acetato de geranyl-farnesila (**13**), podendo se tratar deste composto com uma de suas duplas ligações reduzida. Tendo em vista que os fragmentos  $m/z$  69 e 205 foram observados, concluiu-se que as duas ligações duplas das duas unidades de isoprenos terminais encontravam-se intactas, e devido ao fato de não se observar o fragmento  $m/z$  342 ( $M^+ - 60$ ) resultante da perda de

C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, sugeriu-se que a ligação dupla que encontrava-se reduzida era a da unidade de isopreno inicial, ligada ao acetato. Esta estrutura seria correspondente ao acetato de citronelil-farnesila, contudo, a confirmação e caracterização química completa desta molécula será objeto de futuros estudos no grupo de pesquisa.



**Figura 53.** Espectro de massas (IE 70 eV) e fragmentações do composto **13**.

Os extratos abdominais das operárias fundadoras apresentaram 4 ácidos (70,53%), 3 alcanos (21,68%), 2 esteróides (1,78%) e o composto **13** (acetato de citronelil-farnesila) (6,00%) (Tabela 10). O acetato de geranyl-farnesila não esteve ausente nestes indivíduos, bem como o octadecenoato de etila.

### 3.3.4. Diferenciação química entre os extratos cefálicos de machos de *T. angustula* em diferentes ciclos de vida

Dentre os diferentes estágios dos ciclos de vida dos machos de *T. angustula*, há uma fase no interior do ninho onde eles permanecem parados e agrupados juntos em um local denominado arena. Após este estágio a outra fase é no exterior do ninho, quando eles são observados em aglomerados próximos de colônias conspecíficas à espera do voo nupcial da rainha virgem. Tendo em vista a ausência de informações relacionadas ao estudo dos compostos químicos presentes nestes indivíduos em seus diferentes ciclos de vida, realizou-se um estudo preliminar objetivando a comparação dos extratos cefálicos de machos de dentro e fora dos ninhos.

Os machos presentes em aglomerados apresentaram extratos cefálicos constituídos por 3 alcanos (16,40%), 4 aldeídos (1,18%), 2 ésteres (1,25%), 4 esteróides (15,49%), ácidos graxos (54,16%), um único alceno (0,05%) e quantidades traços de nerol e geraniol. Os extratos cefálicos dos machos de dentro dos ninhos (arena) foram constituídos por 2 alcanos (2,59%), 4 aldeídos (3,32%), 1 éster (0,52%), 4 esteróides (13,73%), ácidos (76,50%) e os terpenos nerol e geraniol (Tabela 11). Aplicando-se o teste t de *Student* observou-se que não houve diferenças significativas entre estes extratos. Tendo em vista que em meliponíneos os machos são expulsos dos ninhos quando adquirem maturidade sexual, esta similaridade observada nos extratos cefálicos de machos dentro e fora do ninho pode ser um indício de que os machos presentes na arena já estão sexualmente maduros.

Adicionalmente foram analisados os abdômes dos machos de aglomerados e verificou a ocorrência da maioria dos compostos que estiveram presentes nas

cabeças destes indivíduos: 2 alcanos (15,79%), 5 ácidos (73,65%), 2 ésteres (2,91%) e 1 esteróide (5,46%) (Tabela 11).

Os extratos dos lipídios cuticulares dos machos capturados dos aglomerados foram constituídos majoritariamente por *n*-alcanos (*n*-C25, *n*-C27, *n*-C29 e *n*-C31), os quais também foram encontrados nas rainhas virgens e fisogástricas desta espécie (Tabela 8). Os hidrocarbonetos *n*-C25 e *n*-C27 que estiveram presentes tanto nos extratos cefálicos como nos abdomens destes indivíduos podem, portanto, terem sido provenientes da cutícula dos mesmos, uma vez que estes hidrocarbonetos correspondem a 87,91% da abundância relativa do extrato cuticular. Tais hidrocarbonetos provavelmente são utilizados para reconhecimento da espécie (Singer, 1998), uma vez que foram encontrados em todas as castas.

**Tabela 11.** Composição química dos extratos cefálicos de machos de *T. angustula* em diferentes ciclos de vida, e extratos cuticulares e abdominais de machos maduros.

No.	Compostos	IR (calc.)	IR (lit.)	Machos em aglomerado			Machos imaturos
				Cabeças (%) <sup>a</sup>	Abdomes (%) <sup>a</sup>	Lipídios cuticulares (%) <sup>a</sup>	Cabeças (%) <sup>a</sup>
<b>Ácidos</b>							
1	Ácido benzoico	1174	-	0,10±0,14	-	-	0,96±0,22
2	Ácido decanóico	-	-	0,04±0,05	-	-	-
3	Ácido dodecanóico	1582	1568	2,21±2,55	1,69±1,16	-	3,77±0,47
4	Ácido tetradecenóico	1763	-	0,39±0,55	-	-	0,36±0,10
5	Ácido tetradecanóico	1789	1720	4,62±4,89	3,11±1,41	-	8,74±0,78
6	Ácido hexadecenóico	1998	1938	0,67±0,94	-	-	1,46±0,14
7	Ácido hexadecanóico	2028	1984	3,16±3,91	2,64±0,46	-	6,83±0,43
8	Ácido heptadecanóico	-	-	0,03±0,04	-	-	-
9	Ácidos octadecenóico + octadecadienóico <sup>b</sup>	2238	2161	37,64±36,16	51,52±25,84	-	46,11±0,52



10	Ácido octadecanóico	2248	2200	5,30±6,68	14,69±2,48	-	8,27±2,28
<b>Alcanos</b>							
11	Pentacosano <sup>c</sup>	2500	2500	15,37±18,62	10,29±11,40	48,89±3,78	1,67±0,18
12	Heptacosano <sup>c</sup>	2700	2700	0,57±0,81	5,50±5,85	38,90±2,49	0,92±0,06
13	Nonacosano <sup>c</sup>	2900	2900	0,46±0,39	-	7,81±1,09	-
14	Hentriacontano <sup>c</sup>	3100	3100	-	-	4,39±0,19	-
<b>Alcenos</b>							
15	Pentacoseno	-	-	0,05±0,07	-	-	-
<b>Álcoois</b>							
18	Nerol <sup>c</sup>	-	1228	Traços	-	-	Traços
19	Geraniol <sup>c</sup>	-	1255	Traços	-	-	Traços
<b>Aldeídos</b>							
21	Benzaldeído <sup>c</sup>	932	961	0,64±0,58	-	-	2,19±0,71
22	Benzenoacetaldeído	1027	1043	0,32±0,16	-	-	0,58±0,04
23	Neral	1251	1240	0,08±0,12	-	-	0,19±0,12
24	Geranial	1283	1270	0,14±0,20	-	-	0,36±0,18
<b>Ésteres</b>							
25	Butirato de tetradecila	1985	-	0,72±0,80	-	-	0,52±0,08
26	Acetato de hexadecila	2004	2009	-	0,65±0,92	-	-
27	Octadecenoato de etila	-	-	0,53±0,75	2,26±3,19	-	-
<b>Esteróides</b>							
32	Ergostadien-3β-ol	3250	-	1,66±2,35	-	-	4,08±0,98
33	Campesterol	3258	3305	6,91±9,77	-	-	3,05±0,11
34	β-Sitosterol	3374	3408	6,83±9,66	5,46±7,72	-	3,44±0,37
35	Fucosterol	3398	-	0,09±0,12	-	-	3,16±0,18
<b>Compostos desconhecidos</b>				11,46	2,19	-	3,33
<b>Total</b>				100	100	100	100

IR (calc.) = índice de retenção calculado; IR (lit.) = índice de retenção da literatura (<http://www.pherobase.com/>).

<sup>a</sup>Média (abundâncias relativas em %) ± DP de machos de *T. angustula* (N=6) de duas colônias. <sup>b</sup>Compostos co-eluídos em um único pico. <sup>c</sup>Padrões sintéticos foram usados para confirmação destas estruturas.

### 3.4. Conclusões parciais

O estudo dos compostos liberados pela rainha fisogástrica de *T. angustula* indicou a presença de dois ésteres, os hexanoatos de isopropila e hexila, os quais foram encontrados no abdome da rainha, mais precisamente nas glândulas de Dufour e terçais. Somente o hexanoato de isopropila foi detectado nos voláteis coletados da rainha virgem sexualmente atrativa, entretanto ambos os ésteres foram encontrados na sua glândula tergal. Os bioensaios preliminares realizados com as rainhas apontaram para a possível função dos lipídios cuticulares como responsáveis pela indução da cópula nesta espécie.

As operárias fundadoras e guardas apresentaram extratos cefálicos constituídos por uma variedade de compostos comuns a ambas, entretanto os butiratos de benzila e dodecila foram exclusivos das operárias guardas, enquanto o eicosanol, nonacoseno e hentriacotano estiveram presentes somente nas operárias fundadoras. Diferentes compostos majoritários foram identificados nos extratos abdominais destas operárias.

As composições dos extratos cefálicos das populações de machos de dentro (arena) e fora de ninhos foram significativamente semelhantes e constituídos majoritariamente de ácidos. A ocorrência dos *n*-alcanos C23, C25, C27 e C29 nas rainhas, operárias e machos de *T. angustula* sugere que tais compostos possam ser responsáveis pelo reconhecimento da espécie.



## CONCLUSÕES FINAIS

---



## CONCLUSÕES FINAIS

No presente trabalho três tópicos distintos dentro da área de semioquímicos foram abordados, tendo como objetos de estudos: bactérias patogênicas, fungos endofíticos e abelhas sociais.

A pesquisa de moléculas sinalizadoras produzidas pela bactéria Gram-negativa *E. sakazakii*, resultou na identificação de (*S*)-(-)-*N*-heptanoil-HSL, (*S*)-(-)-*N*-dodecanoil-HSL e (*S*)-(-)-*N*-tetradecanoil-HSL, fornecendo uma importante contribuição para a compreensão do mecanismo de comunicação deste micro-organismo patogênico, bem como subsídios para futuras pesquisas relacionadas com o controle de doenças causadas pelo mesmo. O estudo do co-cultivo de *E. sakazakii* e *B. cereus* mostrou a interferência na comunicação mediada por acil-HSL, provocada por enzimas do *B. cereus*.

O estudo químico de alguns metabólitos secundários produzidos por *E. nigrum*, um fungo isolado da cana-de-açúcar, implicou no isolamento de quatro compostos, um dos quais foi inédito na literatura e apresentando um esqueleto carbônico totalmente novo. A análise de três mutantes deste fungo demonstrou a alteração de genes presentes na rota biossintética da epicolactona, inspirando a investigação em trabalhos futuros de outros genes envolvidos na biossíntese deste metabólito, a fim de traçar a sua rota biossintética. Todos os mutantes estudados apresentaram em sua constituição a 5-hidroxi-meleína, substância que não esteve presente no fungo selvagem. Este resultado sugeriu a ativação de genes reguladores de uma citocromo-P450 nestes transformantes.

Na terceira parte do trabalho investigaram-se ferômonios sexuais da espécie *T. angustula*, onde se verificou a atuação da rainha fisogástrica que, assim como as rainhas virgens sexualmente atrativas, produzem feromônios que atraem machos para o processo de cópula. Ésteres de cadeia curta foram identificados como os

compostos responsáveis pela atração de machos à média distância, havendo a necessidade de outro(s) composto(s) para realizar a indução da cópula. Diferentes castas de operárias foram analisadas e diferenciadas quimicamente, assim como machos de dentro e fora de ninhos de *T. angustula*.

Adicionalmente às contribuições científicas revelantes para a literatura, o presente trabalho possibilitou à doutoranda o aprendizado de metodologias e técnicas essenciais à pesquisa na área da Química de Produtos Naturais, e mais especificamente na Ecologia Química.

# **PARTE EXPERIMENTAL**

---





## PARTE EXPERIMENTAL

### Solventes, reagentes e demais materiais

- *Solventes*

Todos os solventes utilizados foram da marca Synth ou Merck. Os solventes acetato de etila e hexano foram destilados ou bidestilados antes do uso, e o diclorometano empregado nas sínteses foi seco sob refluxo e destilação, usando  $\text{CaH}_2$ .

Nas análises de RMN utilizaram-se como solventes: clorofórmio deuterado, da Cambridge Isotope Laboratories; DMSO- $d_6$ , da Fluka; e acetona- $d_6$ , da Merck.

- *Reagentes*

Foram utilizados os seguintes reagentes: bromidrato de ( $\pm$ )- $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona, bromidrato de (*S*)-(-)- $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona, ácido heptanóico e hexanóico todos provenientes da Aldrich; cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida, da Sigma; o ácido dodecanóico foi adquirido da Cognis; trietilamina, proveniente da Merck, foi destilada e mantida sob KOH (Synth); iodo (Rothyl); dissulfeto de dimetila (Acros Organics); sulfato de magnésio anidro (Nuclear); sulfato de sódio anidro (Synth); tiosulfato de sódio (Vetec); *p*-anisaldeído (Sigma-Aldrich); ácido acético glacial (Synth); ácido sulfúrico (Nuclear); hexanol; isopropanol (Tedia); dicitclohexil-carbodiimida, DCC (Merck); dimetilamino-piridina, DMAP (Aldrich); benzaldeído (Fisher);

permanganato de potássio (Nuclear), X-gal (Sigma); brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio, MTT (Merck).

- *Cromatografia em coluna aberta (CC)*

As purificações em colunas cromatográficas foram realizadas com gel de sílica da Acros Organics (0,035-0,070 mm). Em alguns casos realizou a cromatografia *flash* em coluna, utilizando-se pressão com gás nitrogênio para permitir velocidade de fluxo através da sílica.

- *Cromatografia em camada delgada (CCD)*

As análises por CCD foram feitas em placas de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> ou 60 RP-18 F<sub>254</sub> (Merck) suportadas sobre alumínio, utilizando-se como reveladores a exposição à luz ultravioleta (254 nm) e revelação química com as soluções de: (1) p-anisaldeído (5 %); (2) KMnO<sub>4</sub>; e (3) ácido fosfomolibdico. As placas foram imersas em tais soluções e, posteriormente, submetidas a aquecimento das placas até aparecimento de manchas coloridas. Também se fez uso de iodo como revelador em alguns casos.

## Equipamentos

- *Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)*

As análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas em cromatógrafo a gás Agilent 6890, acoplado a um detector de massas Hewlett-Packard 5973 operando por impacto de elétrons a 70

eV. O cromatógrafo estava equipado com coluna capilar de sílica fundida (DB5, 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m). Utilizou-se hélio de alta pureza como gás de arraste (fluxo de 1 mL/min). As análises foram realizadas com interface a 280 °C. Os espectros de massas foram registrados no intervalo de  $m/z$  40-600 em 3,54 scans/s. As amostras foram diluídas em acetato de etila na concentração de 0,5 mg/mL, para produtos sintéticos, e 1 mg/mL para produtos naturais. As seguintes programações de temperatura foram empregadas:

Programa 1: temperatura inicial da coluna de 100 °C, com rampa de aquecimento de 10 °C/min, e 10 min isotermicamente a 290 °C. Injetor funcionando a 250 °C. Amostras injetadas com volume de 1  $\mu$ L e no modo split 10:1.

Programa 2: temperatura inicial da coluna de 50 °C, com incrementos de temperatura de 12 °C/min, permanecendo a 290 °C por 20 min. Injetor funcionando a 240 °C. Amostras injetadas com volume de 1-2  $\mu$ L e no modo splitless.

Programa 3: temperatura inicial da coluna de 50 °C, com incrementos de temperatura de 4 °C/min, permanecendo a 290 °C por 20 min. Injetor funcionando a 240 °C. Amostras injetadas com volume de 1  $\mu$ L e no modo splitless.

Programa 4: temperatura inicial da coluna de 50 °C, com incrementos de temperatura de 12 °C/min, permanecendo a 290 °C por 60 min. Injetor funcionando a 240 °C. Amostras injetadas com volume de 1  $\mu$ L e no modo splitless.

- *Cromatografia gasosa acoplada à detecção por ionização em chama (CG-DIC)*

As análises de cromatografia gasosa com detector de detecção por ionização em chama e fase estacionária quiral foram feitas em cromatógrafo a gás marca Agilent modelo 6890, operando com coluna do tipo Chrompack chirasil ciclodextrina CB (25 m x 0,25  $\mu$ m x 0,25  $\mu$ m). Empregou-se hidrogênio de alta pureza como gás de arraste, fluxo de 1 mL/min. Os volumes injetados foram de 1  $\mu$ L com concentração de solutos a 1 mg/mL, com divisão de fluxo de 1/100.

**Tabela 12.** Programações de temperatura utilizadas nas análises das *N*-acil-HSL por CG-DIC.

Parâmetro	<i>N</i> -C7-HSL	<i>N</i> -C12-HSL	<i>N</i> -C14-HSL
Forno	50°C-180°C (2°C/min), mantido por 5 min em 180°C	Isotermicamente a 180 °C durante 150 min	Isotermicamente a 180 °C durante 200 min
Injetor	220 °C	240 °C	220 °C
Detector	250 °C	280 °C	240 °C

- *Espectrometria de massas por ionização eletrospray (ESI-MS)*

Todos os experimentos foram desenvolvidos usando um espectrômetro de massas híbrido LTQ-Orbitrap (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany). O nitrogênio foi usado como gás para nebulização, dessolvatação e dissociação induzida por colisão (CID). As amostras foram diluídas em metanol ou acetonitrila, acrescentou-se 0,1% de hidróxido de amônio para o modo negativo, e submeteu-se à injeção direta em pressão atmosférica e em velocidade de fluxo de 10  $\mu$ L/min.

O modo de ionização positivo foi melhor para detectar a (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL, “sheat gas” = 8, voltagem do spray = 3,5 kV, voltagem do capilar = 43 V, temperatura do capilar = 275 °C. O modo de ionização positivo foi mais apropriado para monitorar a degradação da acil-HSL, com “sheat” gás = 10, voltagem do spray = 3,8 kV, voltagem e temperatura do capilar em -38 V e 275 °C, respectivamente. Os experimentos de varredura completa (*full scan*) (*m/z* 50-800) foram desenvolvidos tanto em trap linear como no orbitrap. As massas foram adquiridas como um perfil de dados em uma resolução de 30.000 em *m/z* 400. O controle de ganho automático da população alvo de íons em varredura completa foi de 30.000 para LTQ-MS e 300.000 para o Orbitrap-MS, e a população alvo de íons para MSn foi 10.000 para o LTQ-MS. Os dados de massas foram analisados pelo software Xcalibur 2.0.5 (Thermo Electron Corporation).

- *Ressonância magnética nuclear (RMN)*

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C (CPD e DEPT), NOE diferencial, NOESY e espectros bidimensionais (gHSQC, gHMBC e gCOSY) foram obtidos em equipamento Varian Inova-500 (11 Tesla) e Bruker Avance-400 (9,4 Tesla), com campo de, à temperatura ambiente, equipados com sonda de 5 mm ou nanosonda. Foram utilizados como solvente CDCl<sub>3</sub> com trimetilsilano (TMS) ( $\delta$  0,0 ppm) como referência interna; acetona-d<sub>6</sub> ( $\delta_H$  = 2,05 ppm;  $\delta_C$  = 29,92 e 106,68 ppm) ou DMSO-d<sub>9</sub> ( $\delta_H$  = 2,50 ppm;  $\delta_C$  = 39,51 ppm), utilizando o sinal do solvente como referência interna. Os valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram obtidos em ppm e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz). Alguns espectros de diferença de NOE foram obtidos em temperatura de 30 °C.

- *Ultravioleta-visível (UV-vis)*

Os espectros de UV-vis foram obtidos em equipamento Varian Cary 50.

- *Rotação ótica específica ( $\alpha_D$ )*

A rotação ótica foi medida em um espectropolarímetro Jasco J-720 com cela de 3 cm<sup>3</sup> e 0,1 cm de caminho ótico. Utilizou-se metanol (grau HPLC) como solvente.

- *Manipulação de micro-organismos*

Utilizou-se capela de fluxo laminar Veco VLF 509, centrífuga Harrier MSE 18/80, autoclave Phoenix LV30, BOD da Quimis, para cultivo dos micro-organismos, e incubadora Shaker Marconi MA 420.

- *Demais equipamentos*

Fez-se uso de evaporador rotativo Buchi B-480, sob pressão reduzida com bombas de vácuo Brinkmann B-169; ultrassom Thornton T4; balança analítica Sartorius BL120S; balança técnica Mettler PJ4000; geladeira e freezer da Eletrolux; vidrarias em geral.

## Material biológico e meios de cultivos

- *Bactérias*

A cepa de *E. sakazakii* DUP 18623 foi cedida pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade de São Paulo, Brasil, tendo sido isolada de mamadeiras pertencentes a um berçário da região da Grande São Paulo. *B. cereus* ATCC 14597 foi fornecido pelo Laboratório de Higiene e Legislação da Universidade Estadual de Campinas, Brasil. Ambas as cepas foram mantidas em tubo Eppendorf contendo BHI (Brain Heart Infusion) e glicerol (80:20) a -80 °C.

*B. cereus* CCT 4060 foi comprado da Coleção de Cultura André Tosello, Campinas-SP, e permaneceu em meio Luria-Bertani (LB), preparado através da adição de 1% de peptona (Oxoid), 0,5% de NaCl (Sigma) e 0,5% de extrato de levedura (Oxoid) a 100 mL de água destilada. Os meios sólidos foram preparados a partir da adição de 2% de ágar bacteriológico (Sigma).

A cepa de *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) foi mantida em meio LB e suplementado com gentamicina (50 µg/mL). *C. violaceum* CV026 também foi mantida em meio LB suplementado com 20 µL/mL de canamicina em 25 °C por 24 horas.

*Escherichia coli* CCT 5050, *Staphylococcus aureus* CCT 4295 e *Bacillus subtilis* CCT 0089 adquiridas da Coleção de Cultura André Tosello, Campinas-SP, foram inoculadas em meio TSB. Também foram utilizadas cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *Xanthomonas albilineans* obtidas do banco de linhagens do Laboratório de Genética de Micro-organismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”, Esalq/USP, Piracicaba, São Paulo.



- *Fungos e leveduras*

Linhagens de *E. nigrum* foram isoladas da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) pela equipe do Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo (Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana, USP, São Paulo), e a linhagem P16 selvagem foi selecionada para o presente trabalho, a partir da qual foram obtidas cepas mutantes. Todos estes micro-organismos foram mantidos em meio de cultura BDA (Difco). *Candida albicans* CCT 0776, obtida da Coleção de Cultura André Tosello, Campinas-SP, foi inoculada em meio PDA.

- *Abelhas*

As rainhas fisogástricas de *T. angustula* foram obtidas de colônias ativas, enquanto as rainhas virgens (12-14 dias de idade) foram criadas artificialmente em laboratório ou obtidas a partir de células reais, em colaboração com o doutorando Charles Santos e a Profa. Dra. Vera Lúcia Imperatriz-Fonseca, USP, São Paulo-SP.

As operárias de *T. angustula* foram capturadas de ninhos disponíveis na Universidade de São Paulo, USP, no município de Ribeirão Preto-SP, e os machos foram capturados de aglomerados nas proximidades destes ninhos.

### **Bioensaios com *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) utilizando as cepas de *E. sakazakii*, *B. cereus* ATCC 14597 e co-cultivo de *E. sakazaki* e *B. cereus* ATCC 14597**

Os inóculos de *E. sakazakii*, *B. cereus* ATCC 14597 e co-cultivo de ambas as bactérias, foram preparados a partir do repique de cada microorganismo em tubos

de ensaio contendo 2 mL de meio líquido LB, os quais, posteriormente, foram incubados em BOD a 30 °C por 24 horas. Após esse período realizaram-se os seguintes experimentos em tubos de ensaio: tubo teste 1 (controle): 20 µL de *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4), 20 µL de X-Gal (50 mg/mL em DMF), 2 mL de meio LB; tubo teste 2: 20 µL de *E. sakazakii*, 20 µL de X-Gal, 2 mL de meio LB; tubo teste 3: 20 µL de *B. cereus* ATCC 14597, 20 µL de X-Gal, 2 mL de meio LB; tubo teste 4: 20 µL de *E. sakazakii* + *B. cereus* ATCC 14597, 20 µL de X-Gal, 2 mL de meio LB. Todos os experimentos foram realizados duplicata. Em seguida, os tubos foram mantidos sob incubação em BOD a 30 °C, e após 24 horas avaliaram-se visualmente as mudanças de coloração (Pomini et al., 2005).

### **Preparação dos extratos de *E. sakazakii*, *B. cereus* ATCC 14597 e co-cultivo de *E. sakazakii* e *B. cereus* ATCC 14597**

*E. sakazakii*, *B. cereus* ATCC 14597 e co-cultivo foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio líquido LB e mantidos em incubação a 30 °C, em BOD, por 24 horas. Em seguida, os cultivos foram transferidos, separadamente, para erlenmeyers (2 L) contendo 1 L de meio líquido LB e incubados sob agitação de 100 rpm, a 30 °C, por 24 horas. Realizou-se a centrifugação dos meios a 5000 rpm por 20 minutos, e, após a separação das células, adicionou-se uma colher de NaCl e extraiu-se com acetato de etila destilado (3 x 300 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com sulfato de magnésio anidro, filtradas com algodão tratado e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, produzindo os extratos brutos de *E. sakazakii* (87,5 mg), *B. cereus* ATCC 14579 e cultivos misto de *E. sakazakii* e *B. cereus* ATCC 14579 (89,2 mg). Um experimento controle foi feito a

partir do meio de cultivo LB estéril (1 L), o qual foi extraído com acetato de etila conforme descrito acima, produzindo 80,5 mg.

Os extratos dos cultivos dos micro-organismos foram dissolvidos em etanol (2 mg/mL) e 20  $\mu$ L de cada solução foi usado no bioensaio com *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) para detectar a expressão de  $\beta$ -galactosidase.

### **Purificação das acil-homoserina lactonas dos extratos de *E. sakazakii* e cultivo misto de *E. sakazakii* e *B. cereus* ATCC 14597**

O procedimento de cultivo e extração com acetato de etila, apresentado no item 4.5, foi repetido oito vezes, obtendo-se 700,2 e 713,2 mg, respectivamente, de extratos de *E. sakazakii* e cultivo misto. Estes extratos foram purificados por cromatografia em coluna de gel de sílica (coluna com 2 cm de diâmetro; 15 g de sílica 0,035-0,070 mm de granulometria), utilizando hexano, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 81 e 56 frações, respectivamente para os extratos de *E. sakazakii* e cultivo misto. O fracionamento foi bioguiado utilizando os biossensores *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) e *C. violaceum* CV026, além disso, também foi realizado o acompanhamento por CCD.

Os bioensaios das frações foram desenvolvidos pela adição de 2  $\mu$ L da suspensão de células do biossensor à 20  $\mu$ L de solução etanólica de cada fração (2 mg/mL) em tubos testes contendo 2 mL de meio LB, incubado à 25 °C por 24 h. Um experimento controle para o biossensor *C. violaceum* CV026 foi desenvolvido pela adição de 20  $\mu$ L da suspensão de células, crescida por 24 h, à 20  $\mu$ L da solução etanólica da (*S*)-*N*-heptanoil-HSL sintética (2 mg/mL), e o desenvolvimento da coloração violeta indicou a presença de acil-HSLs de cadeia curta. O experimento controle para *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) foi desenvolvido

pela adição de 20  $\mu$ L da suspensão de células crescidas por 24 h à 20  $\mu$ L da solução de (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL sintética (2 mg/mL), e o desenvolvimento da coloração verde (mistura da cor amarela do meio de cultivo com a cor azul do corante) indicou a presença de acil-HSL.

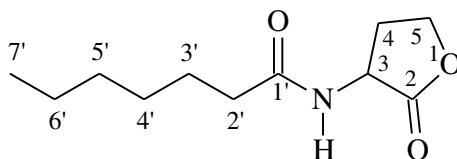
## Sínteses de acil-homosserinas lactonas

Realizaram-se as sínteses de ( $\pm$ )-*N*-heptanoil-HSL, (*S*)-*N*-heptanoil-HSL, ( $\pm$ )-*N*-dodecanoil-HSL e (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL, através do procedimento desenvolvido por Pomini et al. (2005), relatado a seguir:

Adicionou-se em um balão de 5 mL, trietilamina (0,105 mmol), bromidrato de ( $\pm$ )- $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona ou (*S*)- $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona (0,105 mmol) e ácido heptanóico ou dodecanóico (0,157 mmol), dissolvidos em 2,5 mL de água ultra pura. Posteriormente, adicionou-se cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (0,157 mmol). A mistura reacional permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente durante 24 horas, sendo, em seguida, transferida para um funil de separação onde se realizou a extração com acetato de etila (3 x 10 mL). A fase orgânica combinada foi lavada com solução de bicarbonato de sódio 10 % (2 x 10 mL), bissulfato de sódio 1 mol/L (10 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (10 mL). O solvente foi seco com sulfato de magnésio anidro, filtrado e evaporado sob pressão reduzida.

Os compostos ( $\pm$ )-*N*-tetradecanoil-homosserina lactona e (*S*)-*N*-tetradecanoil-homosserina lactona foram sintetizados previamente pelo Dr. Armando Mateus Pomini durante o desenvolvimento de sua tese de doutorado (Pomini et al., 2009).

- ( $\pm$ )-*N*-heptanoil-homosserina lactona



Rendimento: 6,7 mg; 30,0 %.

CG-EM (IE 70 eV)  $m/z$ : 213 ( $M^+$ , 1 %), 184 (1 %), 170 (4 %), 156 (13 %), 143 (100 %), 128 (5 %), 125 (21 %), 113 (14 %), 102 (13 %), 101 (17 %), 100 (6 %), 85 (18 %), 83 (16 %), 57 (61 %), 43 (56 %).

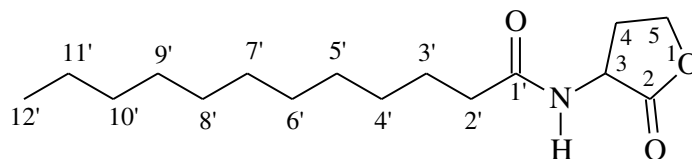
RMN de  $^1H$  (499,88 MHz,  $CDCl_3$ , TMS):  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $J$  6,8 Hz, H-7'), 1,29 (m, 6H, H-4', H-5', H-6'), 1,64 (quint, 2H,  $J$  7,5 Hz, H-3'), 2,14 (m, 1H, H-4), 2,25 (t, 1H,  $J$  8,0 Hz, H-2'), 2,85 (m, 1H, H-4), 4,28 (ddd, 1H,  $J$  6,0; 9,5; 11,0 Hz, H-5), 4,47 (t, 1H,  $J$  9,0 Hz, H-5), 4,55 (ddd, 1H,  $J$  5,5; 8,5; 12,0 Hz, H-3), 6,08 (s, NH, largo).

RMN de  $^{13}C$  (125,71 MHz,  $CDCl_3$ , TMS):  $\delta$  14,0 (C-7'); 22,5 (C-6'); 25,4 (C-3'); 28,9 (C-5'); 30,7 (C-4); 31,5 (C-4'); 36,2 (C-2'); 49,3 (C-3); 66,1 (C-5); 173,8 (C-1'); 175,6 (C-2).

- (*S*)-(-)-*N*-heptanoil-homosserina lactona

Rendimento: 11,1 mg; 49,6 %.  $[\alpha]_D^{20}$   $-34,00^\circ$  (c. 0,05 MeOH). Dados espectroscópicos idênticos a ( $\pm$ )-heptanoil-homosserina lactona.

- ( $\pm$ )-*dodecanoil-homosserina lactona*



Rendimento: 33,9 mg; 76,30 %.

CG-EM (IE 70 eV)  $m/z$ : 283 ( $M^+$ , 4 %), 183 (2 %), 170 (2 %), 156 (20 %), 143 (100 %), 128 (5 %), 125 (15 %), 102 (17 %), 101 (11 %), 100 (3 %), 85 (6 %), 83 (13 %), 57 (40 %), 43 (19 %).

RMN de  $^1H$  (499,88 MHz,  $CDCl_3$ , TMS):  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $J$  7,0 Hz, H-12'), 1,25 (m, 16H, H-11' a H-4'), 1,63 (quint, 2H,  $J$  7,0 Hz, H-3'), 2,13 (m, 1H, H-4), 2,25 (t, 1H,  $J$  7,8 Hz, H-2'), 2,86 (m, 1H, H-4), 4,28 (ddd, 1H,  $J$  6,0; 9,5; 11,5 Hz, H-5), 4,46 (t, 1H,  $J$  9,0 Hz, H-5), 4,56 (ddd, 1H,  $J$  6,0; 9,0; 11,5 Hz, H-3), 6,13 (d, NH,  $J$  4,5 Hz).

RMN de  $^{13}C$  (125,71 MHz,  $CDCl_3$ , TMS):  $\delta$  14,1 (C-12'); 22,6 (C-11'); 24,8 (C-10'); 25,4 (C-9'); 29,1 (C-8'); 29,2 (C-7'); 29,3 (C-5'); 29,4 (C-4'); 29,6 (C-3'); 30,6 (C-4); 31,9 (C-6'); 36,2 (C-2'); 49,2 (C-3); 66,1 (C-5); 173,9 (C-1'); 175,6 (C-2).

- (*S*)-(-)-*N*-dodecanoil-homosserina lactona

Rendimento: 30,5 mg; 68,65 %.  $[\alpha]_D^{20}$  -18,33° (c. 0,30 MeOH). Dados espectroscópicos idênticos a ( $\pm$ )-dodecanoil-homosserina lactona.

## Co-injeção dos produtos sintéticos com os produtos naturais

As estruturas das acil-HSLs detectadas nas frações do extrato bruto de *E. sakazakii* foram confirmadas pela co-injeção em CG-EM (Programa 1) com padrões sintéticos previamente sintetizados.

## Determinação das configurações absolutas das acil-HSLs naturais

A configuração absoluta das AHSLs naturais foi determinada por GC-DIC equipado com uma coluna Chrompack Chirasil ciclodextrina aplicando as condições cromatográficas, previamente descritas, para discriminar ambos enantiômeros dos padrões enantiômeros (*S*) e racêmico sintético: 66,54 min = (*R*)-*N*-heptanoil-HSL, 66,75 min = (*S*)-*N*-heptanoil-HSL (Pomini et al., 2008); 77,49 min = (*R*)-*N*-dodecanoil-HSL, 78,75 min = (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL; e 169,81 min = (*R*)-*N*-tetradecanoil-HSL, 172,60 min = (*S*)-*N*-tetradecanoil-HSL (Pomini et al., 2009). O produto natural foi determinado pela injeção das frações e padrões usando as mesmas condições e pela co-injeção com produtos sintéticos racêmicos.

## Biotransformação de (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL por *B. cereus*

A cepa de *B. cereus* CCT 4060 foi inoculada em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio líquido LB e mantida em incubação a 30 °C, em BOD, por 24 horas. Após o período de incubação, os meios de cultura foram centrifugados a 5000 rpm por 20 minutos, para separação das células. Em seguida, foram adicionados a tubos falcon de 50 mL, solução tampão fosfato estéril (5 mL, pH 7,0), células (100 mg, peso úmido) e (*S*)-*N*-dodecanoil-HSL (1 mg dissolvidos em etanol). A suspensão resultante foi agitada em shaker a 220 rpm, mantendo-se a temperatura em 29 °C. Após 3 horas de reação, efetuou-se extração com acetato de etila (3 x 5 mL), secagem com sulfato de sódio anidro, filtração com algodão tratado e evaporação do solvente sob pressão reduzida. Um experimento controle foi feito com solução tampão fosfato estéril (5 mL) e células de *B. cereus* (100 mg, peso úmido), o qual foi extraído com acetato de etila conforme descrito acima. As amostras foram

analisadas por espectrometria de massas por ionização eletrospray (ESI-MS) e também acompanhadas por CCD de gel de sílica, utilizando anisalaldeído sulfúrico como revelador.

### **Obtenção dos extratos de *E. nigrum* selvagem e cepas modificadas geneticamente**

As linhagens de *E. nigrum* P16-selvagem e os mutantes P16-17, P16-47set e P16-91, foram crescidas em placas de Petri a 28 °C utilizando meio PDA, por 15 dias, em BOD no escuro. Após crescimento, um fragmento do ágar de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> foi recortado, com lâmina de bisturi esterilizada, e inoculado em erlenmeyer contendo 500 mL de meio caldo batata. Os cultivos foram incubados a 28 °C, na ausência de luz, por 60 dias, sem agitação. Ao todo foram 12 litros de meio de cultivo para a cada linhagem. As culturas foram filtradas, e os micélios foram condicionados em refrigerador, para posterior extração. Este procedimento inicial foi realizado pela equipe do Prof. Dr. Wellington Luiz de Araújo (Esalq/USP e Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana/USP, São Paulo). Os sobrenadantes de cada linhagem foram extraídos com acetato de etila (3 x 300 mL/L de meio), as fases orgânicas foram combinadas, secas com MgSO<sub>4</sub> anidro, filtradas utilizando algodão tratado e concentradas sob pressão reduzida a 40 °C. A linhagem P16-selvagem, após extração com AcOEt, foi extraída com *n*-butanol, e, posteriormente, o extrato foi liofilizado, devido a presença significativa de água após evaporação do solvente. Obtiveram-se 8,3 g de extrato AcOEt e 4,6 g do extrato *n*-butanol de P-16 selvagem, e 0,5 g, 0,5 g e 0,3 g de extrato AcOEt para as linhagens P16-17, P16-



47set e P16-91, respectivamente. Somente os extratos obtidos em acetato de etila foram estudados no presente trabalho.

### **Concentração inibitória mínima dos extratos de *E. nigrum* selvagem e mutantes**

Os bioensaios foram desenvolvidos com as bactérias *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. coli*. Os inóculos destes micro-organismos foram preparados em placas contendo meio caldo nutriente sólido, crescidos a 30°C por 24 horas em BOD. As células de cada micro-organismo foram removidas e suspensas em água destilada estéril (10 mL), até a obtenção de uma suspensão com turbidez equivalente a  $3 \times 10^8$  UFC/mL, de acordo com uma escala de McFarland. Em seguida, 5 mL desta suspensão foram adicionados a 50 mL de meio Müller-Hinton e 100 µL foi pipetado para a microplaca de 96 poços estéreis. No topo de cada coluna foram pipetados 100 µL de cada solução a ser testada (branco, controle positivo e soluções dos extratos), homogeneizados e diluídos em série, sendo descartados os 100 µL de solução ao final das diluições. As soluções dos extratos foram preparadas em água destilada/DMSO 20% (estoque a 1 mg/mL), utilizando tubos de ensaio estéreis. O controle negativo (branco) foi preparado com água destilada/DMSO 20%, e o controle positivo com cloranfenicol ou cloridrato de ciprofloxacino comerciais e água destilada/DMSO 20% (estoque a 1 mg/mL).

As placas foram incubadas em BOD durante 24 horas a 30°C, e, após este período, adicionaram-se nos poços 100 µL de solução de MTT (0,025 % em água destilada). As placas foram avaliadas visualmente e fotografadas 1 hora após a adição do corante. Nos poços em que o desenvolvimento microbiano foi normal,

observou-se a formação de coloração roxa ou azul, e nos poços onde o crescimento foi inibido, observou-se coloração amarelada.

### **Fracionamento bioguiado do extrato acetato de etila de *E. nigrum* selvagem**

O extrato acetato de etila foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (coluna com 4 cm de diâmetro; 150 g de sílica 0,035-0,070 mm de granulometria), utilizando hexano, acetato de etila, metanol, em ordem crescente de polaridade, e por fim, éter etílico/ácido fórmico (1:1). Foram obtidas 27 frações, que depois de analisadas por CCD foram reagrupadas em 14 frações. Todas as frações foram monitoradas por CCD e bioautografia contra *S. aureus*.

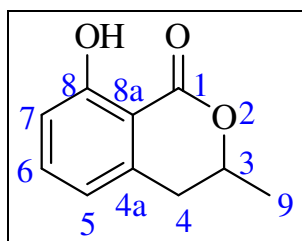
### **Avaliação da atividade antimicrobiana das frações dos extratos de *E. nigrum* selvagem por bioautografia**

Prepararam-se soluções de concentração conhecida com as frações do extrato acetato de etila de *E. nigrum* selvagem. Em seguida, alíquotas destas soluções foram aplicadas em placas de CCD de gel de sílica (2 x 5 cm) e eluídas em hexano:acetato de etila (1:1), acetato de etila, acetato de etila:metanol (1:1) ou metanol. Após completa evaporação do solvente, as placas de CCD foram transferidas para placas de Petri esterilizadas, sobre as quais foi vertido aproximadamente 20 mL do inóculo de *S. aureus*, preparado através da adição de 1 mL do inóculo em 100 mL do seu respectivo meio contendo ágar. Iniciada a solidificação dos meios, as placas foram tampadas e incubadas a 30 °C e após 24 h, borrifou-se sobre as mesmas uma solução de MTT (0,05 % em água destilada).

### Purificação da fração 3

A fração 3 (7,4 mg) foi analisada por CG-EM (Programa 1), RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (CPD, DEPT  $135^\circ$  e  $90^\circ$ ), correlação homonuclear  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  (gCOSY) e de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a uma ligação (gHSQC). Em virtude de impurezas ainda presentes na amostra, esta foi submetida à derivatização com diazometano, que facilitou a sua purificação por coluna se gel de sílica (coluna com 1 cm de diâmetro; 220 mg de sílica 0,035-0,070 mm de granulometria), utilizando hexano e acetato de etila, em ordem crescente de polaridade, resultando no isolamento da 3,4-dihidro-metil-8-hidroxi-isocumarina ou meleína pura (0,7 mg), a qual foi caracterizada por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  utilizando nanosonda.

- *Meleína. 3,4-Di-hidro-metil-8-hidroxi-isocumarina (7)*



CG-EM (70 eV):  $m/z$  178 ( $\text{M}^+$ , 100%), 160 (40%), 149 (20%), 134 (78%), 121 (4%), 106 (16%), 78 (16%), 63 (5%), 51 (8%), 43 (3%).

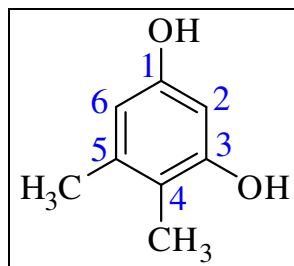
Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  ver tabela 3.

### Purificação da fração 5

A fração 5 (20,9 mg) foi submetida à purificação em coluna de gel de sílica (coluna com 1 cm de diâmetro; 630 mg de sílica 0,035-0,070 mm de

granulometria), utilizando hexano, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade, resultando na obtenção a fração F9-13-18 (10 mg), contendo o composto 4,5-dimetil-benzeno-1,3-diol impuro, que foi analisado por CG-EM (Programa 1), RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (CDP, DEPT 135° e 90°), e RMN de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a uma ligação (gHSQC). Este composto foi novamente purificado em coluna de gel de sílica dando origem à fração I-13 pura (0,5 mg), que foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  utilizando nanosonda.

- 4,5-dimetil-resorcinol (8)



CG-EM (IE 70 eV):  $m/z$  139 (9%), 138 ( $\text{M}^+$ , 100%), 137 (48%), 124 (7%), 123 (92%), 121 (6%), 109 (7%), 95 (8%), 91 (10%), 79 (6%), 77 (6%), 69 (9%), 53 (6%), 41 (5%).

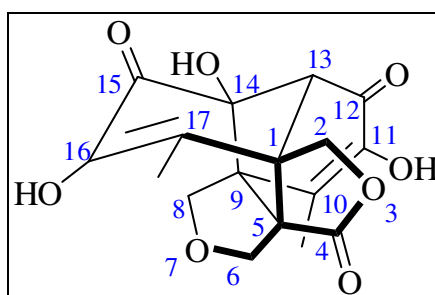
Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  ver tabela 4.

## Purificação da fração 6

A fração 6 (723,7 mg), eluída em 100% de acetato de etila, foi cromatografada em coluna de gel de sílica (22 g de sílica; coluna com 2 cm de diâmetro), utilizando um gradiente de hexano-acetato de etila que resultou em 55 frações (10 mL), combinadas em 20 frações. A subfração F6-C9 (385,60 mg),

eluida em 100% de acetato de etila, foi sujeita a purificações adicionais por coluna de gel de sílica (12 g de sílica, coluna de 2 cm de diâmetro) usando eluição em gradiente de hexano-diclorometano-AcOEt, que forneceu 30 frações (10 mL) combinada em 15 frações. A subfração F6-C9-9 (89,1 mg) eluida em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt (80:20), continha um precipitado parcialmente insolúvel em acetato de etila e totalmente insolúvel em metanol. O precipitado foi isolado rendendo a epicolactona (11 mg). A subfração F6-C9-12 (108,7 mg) eluida em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOAc (1:1) e, em parte, em acetato de etila puro foi mais fracionada dando origem a flavipina (7,0 mg). Estas moléculas foram caracterizadas por CG-EM (Programa 1), RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C (CDP, DEPT 135° e 90°), correlação heteronuclear <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C a uma ligação (gHSQC) e ligações múltiplas (gHMBC), e adicionalmente para a epicolactona utilizou-se RMN de correlação homonuclear <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H (gCOSY), UV-vis, rotação óptica e difração de raio-X, sendo esta última análise desenvolvida pelo grupo do Prof. Dr. Ricardo Aparicio (Unicamp, São Paulo).

- *Epicolactona (10)*

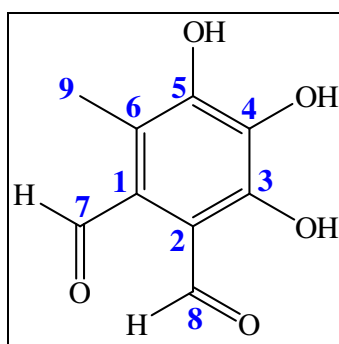


Cristais brancos;  $[\alpha]_D^{20}$  -2,50° (c. 0,20 acetonitrila). UV (acetonitrila)  $\lambda_{max}$  280, 244 nm;

CG-EM (IE 70 eV):  $m/z$  348(38), 329(1), 300(1), 284(1), 272(1), 256(1), 244(1), 215(1), 197(17), 179(4), 167(4), 153(100), 139(2), 124(11), 107(3), 95(4), 77(7), 53(5), 43(5).

Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , e dados de HMBC, ver tabela 6; HR-ESIMS 347,0748  $[\text{M} - \text{H}]^-$  (calcd. para  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_8$  347,0772).

- *Flavipina (9)*



CG-EM (70 eV):  $m/z$  196 ( $\text{M}^+$ , 88%), 167 (100), 152 (10), 139 (33), 122 (12), 111 (6), 93 (10), 77 (6), 65 (14), 53 (9), 43 (4).

Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , e dados de HMBC, ver tabela 5.

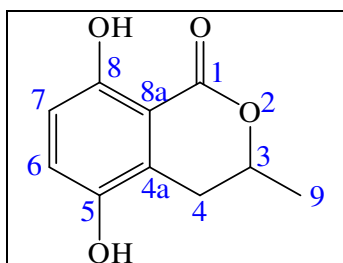
## Monitoramento da produção dos compostos isolados em *E. nigrum* selvagem nos mutantes P16-47set, P16-17 e P16-91

Um total de 20 mg dos extratos acetato de etila dos mutantes P16-17, P16-47set e P16-91, bem como do fungo selvagem, foram dissolvidos em acetato de etila e aplicados em placa de CCD preparativa. A placa foi eluída em benzeno/acetato de etila (6:4). Em seguida os compostos arrastados pelo solvente foram separados dos que permaneceram na base, extraídos da sílica com acetato de etila e acetonitrila, e analisados por CG-EM.

## Isolamento do intermediário presente nos extratos dos mutantes

Tendo em vista que foi observada a presença de um composto adicional nos mutantes e que não esteve presente no fungo selvagem, realizou-se o isolamento e identificação deste composto a partir do mutante P16-91. A fração resultante da eluição em benzeno/acetato de etila utilizando CCD preparativa (ver seção anterior, 6.19) foi novamente submetida à eluição mediante mesma metodologia. Compostos de diferentes Rfs foram extraídos e analisados em CG-EM, verificando-se a presença do composto de interesse em  $R_f = 0,5$ , o qual era referente a 5-hidroxi-meleína (1,0 mg).

- *5-Hidroxi-meleína (II)*



CG-EM (70 eV):  $m/z$  194 ( $M^+$ , 100%), 176 (58), 165 (39), 150 (25), 137 (5), 121 (20), 105 (5), 91 (13), 77 (5), 65 (10), 53 (6), 43 (4).

Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  ver tabela 7.

## Testes de campo para investigação do feromônio sexual das rainhas

Os testes de campo foram realizados na Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto-SP, no período de novembro de 2010 a maio de 2011.

A um aglomerado de machos nas proximidades de ninhos ativos ou em fundação, bem como a cinco metros de distância do mesmo, foram apresentadas rainhas virgens e fisogástricas nas seguintes situações:

- (1) frasco de vidro vedado e contendo a rainha;
- (2) frasco de vidro com tampa perfurada, contendo rainha;
- (3) frasco totalmente aberto com odor da rainha.

Cada tratamento foi realizado durante 2 min, com um intervalo de 10 min entre eles, e em triplicata. Ao final destes testes de campo apresentou-se livremente ao aglomerado de machos uma rainha fisogástrica morta e observou-se o comportamento dos machos.

## Headspace dinâmico das rainhas de *T. angustula*

Os voláteis liberados por rainhas virgens sexualmente atrativas (12-14 dias) e fisogástricas vivas, foram coletados através da técnica de headspace dinâmico utilizando porapak-Q, durante o período de 2 horas, ao final do qual se devolveu as rainhas ao ninho. Os voláteis foram extraídos dos porapaks utilizando-se 2 mL de hexano e 2 mL de acetato de etila bidestilados. O solvente foi evaporado com um leve fluxo de nitrogênio até atingir o volume de 30  $\mu$ L. Posteriormente, as amostras foram analisadas por CG-EM (Programa 2) utilizando heptadecano (1 mg/mL) como padrão interno.



## **Obtenção de extratos cuticulares de machos, rainhas virgens e fisogástricas de *T. angustula***

Os indivíduos de *T. angustula* (machos, rainhas e operárias) foram sacrificados no freezer ( $T = -18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e, em seguida, lavados com 1 mL de hexano bidestilado por 1 min, para retirada dos lipídios cuticulares. Os extratos hexânicos das rainhas e machos foram concentrados em um leve fluxo de nitrogênio até atingir o volume de 30  $\mu\text{L}$ , e, então, analisados por CG-EM (Programa 2). Uma identificação prévia dos componentes das amostras foi feita por comparação com os espectros de massas da biblioteca Wiley presente no equipamento.

## **Obtenção dos cefálicos e abdominais das rainhas, machos e operárias de *T. angustula***

Após banho com hexano, os extratos das cabeças e abdômes de rainhas ( $N=1$ , triplicata), machos ( $N=6$ , duplicata) e operárias ( $N=6$ , duplicata) foram preparados por meio de maceração de cada uma das partes com 30  $\mu\text{L}$  de acetato de etila bidestilado, e analisados por CG-EM (Programa 2).

## **Obtenção dos extratos glandulares das rainhas virgens e fisogástricas**

A extração das glândulas de Dufour e terga das rainhas virgens e fisogástricas foi feita a partir de indivíduos removidos imediatamente das placas de Petri de criação e das colônias, respectivamente, e prontamente mortas por resfriamento em freezer ( $T = -18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 10 minutos. Os indivíduos foram

dissecados sob lupa Quimis em placa de Petri, contendo água de Milli-Q, e resfriadas com gelo seco para impedir a perda dos compostos mais voláteis. As glândulas dissecadas foram imediatamente injetadas em CG-EM ( $N=1$ , triplicata). Adicionalmente as glândulas foram fotografadas pelo doutorando Charles Santos, no Departamento de Biologia, seção de Entomologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP.

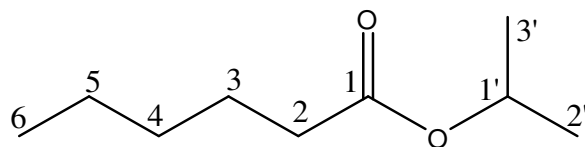
### **Síntese de hexanoato de isopropila e hexanoato de hexila**

Os ésteres hexanoato de hexila e hexanoato de isopropila foram sintetizados de acordo com a metodologia de Steglich, descrita a seguir (Neises e Steglich, 1978).

Em um balão de fundo redondo adicionou-se diclorometano (10 mL), ácido hexanóico (10 mmol), DMAP (30-110 mg) e hexanol ou isopropanol (20-40 mmol), e submeteu-se à agitação constante. Após homogeneização resfriou-se a reação até 0 °C e adicionou-se DCC (10 mmol), sob agitação, por 5 min. Em seguida, a reação permaneceu à temperatura ambiente por 3 horas. Ao final deste período, filtrou-se a mistura reacional para eliminação da uréia precipitada, extraiu-se com HCl 0,5 mol/L (3 x 10 mL) e NaHCO<sub>3</sub> saturado (3 x 10 mL). A fase orgânica foi reunida, seca sobre sulfato de magnésio anidro, filtrada com algodão tratado e o solvente evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se um líquido incolor.

O produto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (30 g; coluna com 2 cm de diâmetro) utilizando hexano e acetato de etila em polaridade crescente. As substâncias de interesse foram eluídas em hexano.

- *Hexanoato de isopropila*



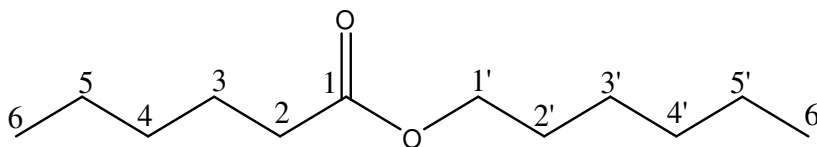
Rendimento global: 24,2%.

CG-EM (IE, 70 eV)  $m/z$  143 ( $M^+$ , 6), 117 (43), 99 (75), 87 (14), 71 (22), 60 (44), 55 (12), 43 (100), 41 (29).

RMN de  $^1\text{H}$  (499,88 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  0,90 (t, 3H,  $J$  7,0 Hz, H-6); 1,23 (d, H-1' e H-2'); 1,31 (m, H-5 e H-4); 1,62 (quint, H-3); 2,25 (t,  $J$  7,5 Hz, H-2); 5,00 (sept, H-1').

RMN de  $^{13}\text{C}$  (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  13,9 (C-6); 21,9 (C-2' e C-3'); 22,3 (C-5); 24,7 (C-4); 31,3 (C-3); 34,7 (C-2); 67,3 (C-1'); 173,5 (C-1).

- *Hexanoato de hexila*



Rendimento global: 73,3%.

CG-EM (IE, 70 eV)  $m/z$  129 ( $M^+$ , 4), 117 (100), 99 (73), 84 (63), 71 (25), 69 (24), 61 (16), 56 (49), 43 (78), 41 (37).

RMN de  $^1\text{H}$  (499,88 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  0,89 e 0,90 (2t, 3H,  $J$  7.0 Hz, H-6 e H-6'), 1.32 (m, H-3', H-4, H-4', H-5 e H-5'), 1.62 (m, H-3 e H-2'), 2.29 (t,  $J$  7.5 Hz, H-2), 4.06 (t,  $J$  7.0 Hz, H-1').

RMN de  $^{13}\text{C}$  (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  13,9 e 14,0 (C-6 e C-6'); 22,3 (C-5), 22,5 (C-5'); 24,7 (C-4); 25,6 (C-4'); 28,6 (C-2'); 31,4 (C-3); 31,5 (C-3'); 34,4 (C-2); 64,4 (C-1'); 174,0 (C-1).

## Quantificação do hexanoato de isopropila e hexanoato de hexila nos voláteis das rainhas

As quantificações relativas destes dois compostos nos voláteis das rainhas virgens e fisogástricas foram realizadas através do método do padrão interno, obtendo-se uma curva de calibração para cada éster (concentrações usadas: 0,25; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), e utilizando-se heptadecano como padrão interno (Raffa e Steffeck, 1988).

## Índices de retenção

Realizou-se a co-injeção de todos os extratos de *T. angustula* com a mistura de *n*-alcanos padrão (C9-C32) por CG-EM (Programa 3), e os índices de retenção dos compostos foram calculados de acordo com a equação de van den Dool e Kratz. Os valores obtidos foram comparados com dados da literatura.

$$IR = 100z + 100 \left[ \frac{t_{R(X)} - t_{R(Z)}}{t_{R(X+1)} - t_{R(Z)}} \right]$$

Onde:

$z$  = número de átomos de carbono do *n*-alcano que elui antes da substância analisada (X);

$t_{R(X)}$  = tempo de retenção da substância analisada;

$t_{R(Z)}$  = tempo de retenção do *n*-alcano que elui antes da substância analisada;

$t_{R(Z+1)}$  = tempo de retenção do *n*-alcano que elui depois da substância analisada.

Os índices de retenção dos *n*-alcanos padrões (C9-C32) foram considerados como números inteiros de 900 a 3200. O padrão de *n*-alcanos foi obtido a partir do petróleo bruto (50 mL) purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (200 g), utilizando hexano bidestilado como eluente.

### **Derivatização com DMDS/I<sub>2</sub>**

As amostras foram solubilizadas em 2 mL de hexano bidestilado e tratadas com 200 µL de dissulfeto de dimetila (DMDS) e 100 µL da solução de iodo (32 mg de I<sub>2</sub> em 2 mL de éter étílico destilado), permanecendo em agitação magnética e temperatura de 50 °C por 24 horas, sob refluxo. As reações foram interrompidas com 2 mL da solução aquosa de tiosulfato de sódio (1g de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em 10 mL de água destilada). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada com algodão tratado e evaporada em atmosfera de nitrogênio. As amostras derivatizadas foram solubilizadas em hexano bidestilado analisadas por CG-EM (Programa 4) (Buser et al., 1983).

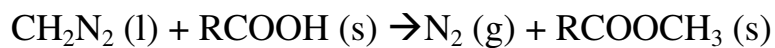
### **Fracionamento dos hidrocarbonetos de extratos cuticulares da rainha de *T. angustula***

Os hidrocarbonetos cuticulares do extrato de lipídios cuticulares da rainha (1 mg) foram separados pelo grau de insaturação utilizando coluna de sílica impregnada com nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub> 20%, 6,0 g, coluna de 1 cm de diâmetro interno). A eluição foi realizada utilizando gradiente de hexano/éter etílico (100:0, 95:5, 90:10, 50:50 e 0:100, 6 mL cada). A composição das frações foi determinada por CG-EM (Programa 2), verificando-se que os *n*-alcanos e

monometil-alcanos eluam conjuntamente na fração hexânica e os alcenos eluam no segundo eluente (Krokos et al., 2001). Estas frações serão submetidas futuramente a testes de campo em aglomerados de machos de *T. angustula*.

### **Metilação de amostras contendo ácidos carboxílicos**

A amostra foi solubilizada em éter etílico e, em seguida, adicionou-se gotas de solução etérea de diazometano até não mais se observar efervescência, que ocorre devido ao desprendimento de nitrogênio na reação.





## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---





## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, F. C.; CRUZ-LANDIM, C. Dufour glands in the hymenopterans (Apidae, Formicidae, Vespidae): a review. **Rev. Bras. Biol.**, 61, 95-106, 2001.
- ABDALLA, F. C.; JONES, G. R.; MORGAN, D.; CRUZ-LANDIM, C. Chemical composition of the Dufour gland secretion in queen of *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Meliponini). **J. Braz. Chem. Soc.**, 15, 621-625, 2004.
- ABDEL-LATEFF A.; FISCH, K. M.; WRIGHT, A. D.; KÖNIG, G. M. A new antioxidant isobenzofuranone derivative from the algicolous marine fungus *Epicoccum* sp. **Planta Med.**, 69, 831-834, 2003.
- ABELL, C.; DODDRELL, D.; GARSON, M. J.; LAUE, E. D.; STAUNTON, J. Biosynthesis of the polyketide mellein from CD<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H and CD<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H in *Aspergillus melleus*: detection of Deuterium by <sup>1</sup>H NMR and edited <sup>13</sup>C NMR spectra. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, 695-696, 1983.
- ALMEIDA, C. V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesq. Agropec. Bras.**, 40, 467-470, 2005.
- ANSALDI, M.; MAROLT, D.; STEBE, T.; MANDIC-MULEC, I.; DUBNAU, D. Specific activation of the *Bacillus* quorum-sensing systems by isoprenylated pheromone variants. **Mol. Microbiol.**, 44, 1561-1573, 2002.
- ANTUNES, L. C. M.; FERREIRA, R. B. R.; BUCKNER, M. M. C.; FINLAY, B. B. Quorum sensing in bacterial virulence. **Microbiology**, 156, 2271-2282, 2010.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biol. Rev.**, 21, 51-66, 2007.
- AYASSE, M., ENGELS, W., LÜBKE, G.; FRANCKE, W. Mating expenditures reduced via female sex pheromone modulation in the primitively eusocial halictine bee, *Lasioglossum (Evylaeus) malachurum* (Hymenoptera: Halictidae). **Behav. Ecol. Sociobiol.**, 45, 95-106, 1999.
- AYASSE, M.; SCHIESTL, F. P.; PAULUS, H. F.; IBARRA, F.; FRANCKE, W. Pollinator attraction in a sexually deceptive orchid by means of unconventional chemicals. **Proc. R. Soc. Lond., B Biol. Sci.**, 270, 517-522, 2003.
- AYASSE, M.; SCHIESTL, F. P.; PAULUS, H. F.; LOFSTED, C.; HANSSON, B.; IBARRA, F.; FRANCKE, W. Evolution of reproductive strategies in the sexually deceptive orchid *Ophrys sphegodes*: how does flower-specific

- variation of odor signals influence reproductive success? **Evolution**, 54, 1995-2006, 2000.
- AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Rev. Bras. Bot.**, 22, 225-229, 1999.
- BACKMAN, P. A.; SIKORA, R. A. Endophytes: an emerging tool for biological control. **Biol. Control**, 46, 1-3, 2008.
- BAINTON, N. J.; BYCROFT B. W.; CHHABRA, S. R.; STEAD, P.; GLEDHILL, L.; HILL P. J.; REES, C. E.; WINSON, M. K.; SALMOND, G. P.; STEWART, G. S. et al. A general role for the *lux* autoinducer in bacterial cell signalling: control of antibiotic biosynthesis in *Erwinia*. **Gene**, 116, 87-91, 1992.
- BAMFORD, P. C.; NORRIS, L. F.; WARD, G. Flavipin production by *Epicoccum* spp. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, 44, 354-356, 1961.
- BARBER, C. E.; TANG, J. L.; FENG, J. X.; PAN, M. Q.; WILSON, T. J.; SLATER, H.; DOW, L. M.; WILLIAMS, P.; DANIELS, M. J. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. **Mol. Microbiol.**, 24, 555-566, 1997.
- BARREIRA, E. R.; SOUZA, D. C.; GÓIS, P. F.; FERNANDE, J. C. Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de caso. **Pediatria**, 25, 65-70, 2003.
- BATRA, S.W. Solitary bees. **Sci. Amer.**, 250, 86-93, 1984.
- BAUTE, M. A.; DEFFIEUX, G.; BAUTE, R.; NEVEU, A. New antibiotics from the fungus *Epicoccum nigrum*. I. Fermentation, isolation and antibacterial properties. **J. Antibiot.**, 31, 1099-1105, 1978.
- BELL, P. J. L.; KARUSO, P. Epicoccone, a novel fluorescent compound from the fungus *Epicoccum nigrum*. **J. Am. Chem. Soc.**, 125, 9304-9305, 2003.
- BERDE, C. V.; BHOSALE, P. P.; CHAPHALKAR, S. R. Plasmids of endophytic bacteria as vectors for transformation in plants. **Int. J. Integr. Biol.**, 9, 113-118, 2010.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**, 5th ed., W. H. Freeman and Company: New York, 2002.
- BETTER, J.; GATENBECK, S. Intermediates in the barnol biosynthesis in *Penicillium baarnense*. **Acta Chem. Scand.**, B31, 391-394, 1977.
- BICALHO, B., GONÇALVES, R. A. C., ZIBORDI, A. P. M., MANFIO, G. P., MARSAIOLI, A. J. Antimicrobial compounds of fungi vectored by *Clusia* spp. (Clusiaceae) pollinating bees. **Z. Naturforsch.**, 58c, 746-751, 2003.
- BIERING, G.; KARLSSON, S.; CLARK, N. C.; JÓNSDÓTTIR, K. E.; LÚDVÍGSSON, P.; STEINGRÍMSSON, Ó. Three cases of neonatal

- meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. **J. Clin. Microbiol.**, 27, 2054-2056, 1989.
- BIGGS, A. R.; ALM, G. R. Response of peach bark tissues to inoculation with epiphytic fungi alone and in combination with *Leucostoma cincta*. **Can J Bot.**, 70, 186-191, 1992.
- BILLEN, J. Exocrine Glands and Their Key Function in the communication system of social insects. **Formosan Entomol.**, 31, 75-84, 2011.
- BILLEN, J. Signal variety and communication in social insects. **Proc. Neth. Entomol. Soc. Meet.**, 17, 9-25, 2006.
- BLUM, M. S.; JONES, T. H.; HOWARD, D. F.; OVERAL, W. L. Biochemistry of termite defenses: Coptotermes, Rhinotermes and Cornitermes species. **Comp. Biochem. Physiol.**, 71B, 731-733, 1982.
- BOCH, R.; SHEARER, D. A. Identification of geraniol as the active component in the Nassenoff pheromone of the honey bee. **Nature**, 194, 704-706, 1962.
- BOSGELMEZ-TINAZ, G. Quorum sensing in Gram-negative bacteria. **Turk. J. Biol.**, 27, 85-93, 2003.
- BOWEN, A. B.; BRADEN, C. R. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. **Emerging Infect. Dis.**, 12, 1185-1189, 2006.
- BRAND, J. M., FALES, H. M., SOKOLOSKI, F. A., MACCONNELL, J. G., BLUM, M. S., and DUFFIELD, R. M. Identification of mellein in the mandibular gland secretions of carpenter ants. **Life Sci.**, 13, 201-211, 1973.
- BROWN, A. E.; FINLAY, R.; WARD, J. S. Antifungal compounds produced by *Epicoccum purpurascens* against soil-borne plant pathogenic fungi. **Soil Biol. Biochem.**, 19, 657-664, 1987.
- BUSER, H. R.; ARN, H.; GUERIN, P.; RAUSCHER, S. Determination of double bond position in mono-unsaturated acetates by mass spectrometry of dimethyl disulfite adducts. **Analytical Chemistry**, 55, 818-822, 1983.
- BUTENANDT, A., BECKMANN, R., HECKER, E. Veber den Sexuallockstoff des Seidenspinners. Teil I. Der Biologische Test and de Isolierung des reinen Sexuallockstuffs Bombykol. **Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.**, 324, 71-83, 1961.
- BUTLER, C.G.; SIMPSON, J. The source of the queen substance of the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Proc. R. Entomol. Soc. London**, 22, 120-122, 1958.
- CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Systematic, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera: Apoidea): a mini-review. **Apidologie**, 23, 509-522, 1992.
- CAMATTI-SARTORI, V.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; PAGNOCCA, F. C.; ECHEVERRIGARAY, S.; AZEVEDO, J. L. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with

- southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. **J. Basic Microbiol.**, 45, 397-402, 2005.
- CAMPOS L. A. O., MELO G. A. R. Physogastric queen mating in *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Bras. Gen.**, 13, 491-500, 1990.
- CASADEI, M. A.; INGRAM, R.; HITCHINGS, E.; ARCHER, J.; GAZE, J. E. Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. **Int. J. Food Microbiol.**, 63, 125-134, 2001.
- CASTILLO, U. F.; BROWNE, L.; STROBEL, G.; HESS, W. M.; EZRA, S.; PACHECO, G.; EZRA, D. Biologically active endophytic Streptomycetes from *Nothofagus* spp. and other plants in Patagonia. **Microb. Ecol.**, 53, 12-19, 2007.
- CHA, C.; GAO, P.; CHEN, Y. C.; SHAW, P. D.; FARRAND, S. K. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, 11, 1119-1129, 1998.
- CHATER, K. F.; HORINOUCI, S. Signalling early developmental events in two highly diverged Streptomyces species. **Mol. Microbiol.**, 48, 9-15, 2003.
- CHEN, X.; SCHAUDER, S.; POTIER, N.; VAN DORSSELAER, A.; PELCZER, I.; BASSLER, B. L.; HUGHSON, F. M. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. **Nature**, 415, 545-549, 2002.
- CHHABRA, S. R.; STEAD, P.; BAINTON, N. J.; SALMOND, G. P. C.; STEWART, G. S. A. B.; WILLIAMS, P.; BYCROFT, B. Autoregulation of carbapenem biosynthesis in *Erwinia carotovora* by analogues of *N*-(3-oxohexanoyl)-*L*-homoserine lactone. **J. Antibiot.**, 46, 441-454, 1993.
- CHRISTIANSSON, A.; NAIDU, A. S.; NILSSON, I.; WADSTRÖM, T.; PETTERSSON, H. E. Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures. **Appl. Environ. Microbiol.**, 55, 2595-2600, 1989.
- CHU, W. P.; QUE, T. L.; LEE, W. K.; WONG, S. N. Meningoencephalitis caused by *Bacillus cereus* in a neonate. **Hong Kong Med. J.**, 7, 89-92, 2001.
- CHUN, C. K.; OZER, E. A.; WELSH, M. J.; ZABNER, J.; GREENBERG, E. P. Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 101, 3587-3590, 2004.
- CONESA, J. G.; ROJAS, J. C.; DIAZ, M. G.; RABANALES, M. R., LOPEZ, L. C. Cephalic and Dufour gland secretions of *Scaptotrigona mexicana* queens: Chemical composition and biological activity. **Apidologie**, 38, 38-46, 2007.

- CORTOPASSI-LAURINO, M.; VELTHIUS, H. J. W.; NOGUEIRA-NETO, P. Diversity of stingless bees from the Amazon Forest in Xapuri (Acre), Brazil. **Proc. Neth. Entomol. Soc. Meet.**, 18, 105-114, 2007.
- CRIELLY, E. M.; LOGAN, N. A.; ANDERTON A. Studies on the Bacillus flora of milk and milk products. **J. Appl. Bacteriol.**, 77, 256-263, 1994.
- CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas - morfologia e função de sistemas**. Editora Unesp: São Paulo, 2009.
- CZAJKOWSKI, R.; JAFRA, S. Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. **Acta Biochim. Pol.**, 56, 1-16, 2009.
- DE ALVARENGA; M. A.; FO, R. B.; GOTTLIEB, O. R.; DIAS, J. P. P.; MAGALHAES. A. F.; MAGALHAES, E. G.; DE MAGALHAES, G. C.; MAGALHAES, M. T.; MAIA, J. G. S.; MARQUES, R.; MARSAIOLI, A. J.; MESQUITA, A. A. L.; DE MORAES, A. A.; DE OLIVEIRA, A. B.; DE OLIVEIRA, G. G.; PEDREIRA, G.; PEREIRA, S. A.; PINHO, S. L. V.; SANT'ANA, A. E. G.; SANTOS, C. C. Dihydroisocoumarins and phthalide from wood samples infested by fungi. **Phytochemistry**, 17, 511-516, 1978.
- DE KIEVIT, T. R.; IGLEWSKI, B. H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. **Infect. Immun.**, 68, 4839-4849, 2000.
- DEFFIEUX, G.; BAUTE, M. A.; BAUTE, R.; FILLEAU, M. J. Epicorazine A: structure elucidation and absolute configuration. **J. Antibiot.**, 31, 1102-1105, 1978.
- DEFFIEUX, G.; FILLEAU, M. J.; BAUTE, R. Epicorazine B: structure elucidation and absolute configuration. **J. Antibiot.**, 31, 1106-1109, 1978.
- DEVYS, M.; BARBIER, M.; BOUSQUET, J.-F.; KOLLMANN, A. Isolation of the (-)-(3R)-5-hydroxymellein from the fungus *Septoria nodorum*. **Phytochemistry**, 35, 825-826, 1994.
- DICKE, M.; SABELIS, M. W. Infochemical Terminology: Based on Cost-Benefit Analysis Rather than Origin of Compounds? **Funct. Ecol.**, 2, 131-139, 1988.
- DIGGLE S. P.; WINZER, K.; CHHABRA, S. R.; WORRALL, K. E.; CAMARA, M.; WILLIAMS, P. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent phenotypes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. **Mol. Microbiol.**, 50, 29-43, 2003.
- DONG, Y. H.; WANG, L. H.; ZHANG, L. H. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. **Phil. Trans. R. Soc.**, 362, 1201-1211, 2007.
- DONG, Y.-H., ZHANG, X.-F. Quorum sensing and quorum quenching enzymes. **J. Microbiol.**, 43, 101-109, 2005.

- DONG, Y.-H., ZHANG, X.-F., XU, J.-L., ZHANG, L.-H. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. **Appl. Environ. Microbiol.**, 70, 954-960, 2004.
- DONG, Y.-H.; GUSTI, A. R.; ZHANG, Q.; XU, J.-L.; ZHANG, L.-H. Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, 68, 1754-1759, 2002.
- DONG, Y.-H.; WANG, L.-H.; XU, J.-L.; ZHANG, H.-B.; ZHANG, X.-F.; ZHANG, L.-H. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserine lactonase. **Nature**, 411, 813-817, 2001.
- DONG, Y.-H.; XU, J.-L.; LI, X.-Z.; ZHANG, L.-H. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 97, 3526-3531, 2000.
- DRAGONOV, D. I.; TEIBER, J. F.; SPEELMAN, A.; OSAWA, Y.; SUNAHARA, R.; LA DU, B. N. Paraoxonase 2 attenuates macrophage triglyceride accumulation via inhibition of diacylglycerol acyltransferase 1. **J. Lipid Res.**, 46, 1239-1247, 2005.
- DROBNIEWSKI, F. A. *Bacillus cereus* and related species. **Clin. Microbiol. Rev.**, 6, 324-338, 1993.
- DRUDY, D.; MULLANE, N. R.; QUINN, T.; WALL, P. G.; FANNING, S. *Enterobacter sakazakii*: an emerging pathogen in powdered infant formula. **Food Saf.**, 42, 996-1002, 2006.
- DUFOUR, L. 1834. Recherches anatomiques et physiologiques sur les orthoptères, les hymenoptères et les névroptères. Memoir présentés par divers savants à l'Academie Royale des Sciences de l'Institute de France, et imprimé par son ordre. **Sci. Math. Phys.**, 7, 265-647, 1834.
- EBERHARD, A., BURLINGAME, A. L., EBERHARD, C., KENYON, G. L., NEALSON, K. H., OPPENHEIMER, N. J. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. **Biochemistry**, 20, 2444-2449, 1981.
- EFDI, M.; ITOH, T.; AKAO, Y.; NOZAWA, Y.; KOKETSU, M.; ISHIHARA, H. The isolation of secondary metabolites and in vitro potent anti-cancer activity of clerodermic acid from *Enicosanthum membranifolium*. **Bioorg. Med. Chem.**, 15, 3667-3671, 2007.
- EICKWORT, G. C.; GINSBERG, H. S. Foraging and mating behavior in Apoidea. **Ann. Rev. Entomol.**, 25, 421-446, 1980.

- ENGBRECHT, J.; SILVERMAN, M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 81, 4154-4158, 1984.
- EVREUX, F.; DELAPORTE, B.; LERET, N.; BUFFET-JANVRESSE, C.; MOREL, A. Méningite néonatale à *Bacillus cereus*, à propôs d'um cãs: a case of fatal neonatal *Bacillus cereus* meningitis. **Arch. pédiatrie**, 14, 365-368, 2007.
- FÁVARO, F. **Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. Com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.)**. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2009.
- FÁVARO, L. C. L.; MELO, F. L.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; ARAÚJO, W. L. Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. **Plos One**, 6, 1-18, 2011.
- FIERRO, M. M.; CRUZ-LÓPEZ, L.; SÁNCHEZ, D.; VILLANUEVA-GUTIÉRREZ, R. Queen volatiles as a modulator of *Tetragonisca angustula* drone behavior. **J. Chem. Ecol.**, 37, 1255-1262, 2011.
- FLACH, A.; MARSAIOLI, A.; SINGER, R. B.; AMARAL, M. C. E.; MENEZES, C.; KERR, W. E.; BATISTA-PEREIRA, L. G.; CORRÊA, A. G. Pollination by sexual mimicry in *Mormolyca ringens*: a floral chemistry that remarkably matches the pheromones of virgin queens of *Scaptotrigona* sp. **J. Chem. Ecol.**, 32, 59-70, 2006.
- FLAVIER, A. B., GANOVA-RAEVA, L. M., SCHELL, M. A., DENNY, T. P. Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum*: control of acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. **J. Bacteriol.**, 179:7089-7097, 1997.
- FLOERKE, U.; KROHN, K.; ZIA-ULLAH; HUSSAIN, H. An orthorhombic modification of (*R*)-(-)-8-hydroxy-3-methyl-3,4-dihydro-1*H*-2-benzopyran-1-one [(*R*)-(-)-mellein]. **Acta Crystallogr. Sect. E**, E62, o3539-o3541, 2006.
- FOGLE, M. R.; DOUGLAS, D. R.; JUMPER, C. A.; STRAUS, D. C. Growth and mycotoxin production by *Chaetomium globosum*. **Mycopathologia**, 164, 49-56, 2007.
- FOX, E. M.; HOWLETT, B. J. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. **Curr. Opin. Microbiol.**, 11, 481-487, 2008.
- FRANCKE, W.; LÜBKE, G.; SCHRÖDER, W.; RECKZIEGEL, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.; KLEINERT, A.; ENGELS, E.; HARTFELDER, K.; RADTKE, R.; ENGELS, W. Identification of oxygen containing volatiles in cephalic secretions of workers of Brazilian stingless bees. **J. Braz. Chem. Soc.**, 11, 561-571, 2000.



- FREDERICK, C. B.; SZANISZLO, P. J.; VICKEREY, P. E.; BENTLEY, M. D.; SHIVE, W. Production and isolation of siderophores from the soil fungus *Epicoccum purpurascens*. **Biochemistry**, 20, 2432-2436, 1981.
- FREEDMAN, T. B.; CAO, X.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B.; NAFIE, L. A. Determination of the absolute configuration and solution conformation of gossypol by vibrational circular dichroism. **Chirality**, 15, 196-200, 2003.
- FRIEDEMANN, M. *Enterobacter sakazakii*: in food and beverages (other than infant formula and milk powder). **Int. J. Food Microbiol.**, 116, 1-10, 2007.
- FUQUA, C.; GREENBERG, P. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, 3, 685-695, 2002.
- FUQUA, W. C.; WINANS, S. C. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. **J. Bacteriol.**, 176, 2796-2806, 1994.
- GARY, N. E. Chemical mating attractants in the queen honey bee. **Science**, 136, 357-358, 1962.
- GAUR, A. H.; PATRICK, C. C.; MCCULLERS, J. A.; FLYNN, P. M.; PEARSON, T. A.; RAZZOUK, B. I.; THOMPSON, S. J.; SHENEP, J. L. *Bacillus cereus* bacteremia and meningitis in immunocompromised children. **Clin. Infect. Dis.**, 32, 1456-1462, 2001.
- GESKE, G. D.; MATTMANN, M. E.; BLACKWELL, H. E. Evaluation of a focused library of *N*-aryl L-homoserine lactones reveals a new set of potent quorum sensing modulators. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 18, 5978-5981, 2008.
- GIOVANNI, M.; VERDUCI, E.; GHISLENI, D.; SALVATICI, E.; RIVA, E.; AGOSTONI, C. *Enterobacter sakazakii*: an emerging problem in paediatric nutrition. **J. Int. Med. Res.**, 36, 394-399, 2008.
- GROSSO A. F.; BEGO, L. R. Labor division, average life span, survival curve, and nest architecture of *Tetragonisca angustula angustula* (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). **Sociobiology**, 40, 615-637, 2002.
- GRÜTER, C.; KÄRCHER, M. H.; RATNIEKS, F. L. W. The natural history of nest defence in a stingless bee, *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae), with two distinct types of entrance guards. **Neotrop. Entomol.**, 40, 55-61, 2011.
- GRÜTER, C.; MENEZES, C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; RATNIEKS, F. L. W. A morphologically specialized soldier caste improves colony defense in a neotropical eusocial bee. **Proc. Natl. Acad. Soc.**, 109, 1182-1186, 2012.
- GUO, H.; SUN, B.; GAO, H.; CHEN, X.; LIU, S.; YAO, X.; LIU, X.; CHE, Y. Diketopiperazines from the *Cordyceps* colonizing fungus *Epicoccum nigrum*. **J. Nat. Prod.**, 72, 2115-2119, 2009.

- GUTLER, J. B.; KORNACKI, J. L.; BEUCHAT, L. R. *Enterobacter sakazakii*: concern to infant health. **Int. J. Food Microbiol.**, 104, 1-34, 2005.
- HASHEM, M.; ALI, E. *Epicoccum nigrum* as biocontrol agent of *Pythium* damping-off and root-rot of cotton seedlings. **Arch. Phytopathol. Plant Prot.**, 37, 283-297, 2004.
- HERBERT, R. B. **The biosynthesis of secondary metabolites**, 2th ed, Chapman & Hall: London, 1989.
- HICK, A.; LUSZNIAK, M. C.; PICKETT, J. A. Volatile isoprenoids that control insect behaviour and development. **Nat. Prod. Rep.**, 16, 39-54, 1999.
- HOANG, T. T.; SCHWEIZER, H. P. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis. **J. Bacteriol.**, 181, 5489-5497, 1999.
- HOLDEN, M. T.; RAM CHHABRA, S. R.; de NYS, R.; STEAD, P.; BAINTON, N. J.; HILL, P. J.; MANEFIELD, M.; KUMAR, N.; LABATTE, M.; ENGLAND, D.; RICE, S.; GIVSKOV, M.; SALMOND, G. P.; STEWART, G. S.; BYCROFT, B. W.; KJELLEBERG, S.; WILLIAMS, P. Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. **Mol. Microbiol.**, 33, 1254-1266, 1999.
- HOLKER, J. S. E.; SIMPSON, T. J. Studies on fungal metabolites. Part 2. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance biosynthetic studies on pentaketide metabolites of *Aspergillus melleus*: 3-(1,2-Epoxypropyl)-5,6-di-hydro-5-hydroxy-6-methylpyran-2-one and mullein. **J. Chem. Soc. Perkin I**, 1397-1400, 1981.
- HOVORKA, O.; VALTEROVÁ, I.; RASMONT, P.; TERZO, M. Male cephalic labial gland secretions of two bumblebee species of the subgenus *Cullmanobombus* (Hymenoptera: Apidae: *Bombus* Latreille) and their distribution in Central Europe. **Chem. Biodiversity**, 3, 1015-1022, 2006.
- HSUEH, Y.; SOMERS, E. B.; LERECLUS, D.; WONG, A. C. L. Biofilm formation by *Bacillus cereus* is influenced by PlcR, a pleiotropic regulator. **Appl. Environ. Microbiol.**, 72, 5089-5092, 2006.
- HUANG J. J.; HAN, J. I.; ZHANG, L. H.; LEADBETTER, J. R. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Appl. Environ. Microbiol.**, 69, 5941-5949, 2003.
- HUANG Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus*

- mairi*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreyia grandis*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, 31, 163-167, 2001.
- HUANG, J. J.; PETERSEN, A.; WHITELEY, M.; LEADBETTER, J. R. Identification of QuiP, the product of gene PA1032, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Appl. Environ. Microbiol.**, 72, 1190-1197, 2006.
- HUANG, L. Absolute configuration of gossypol. **Coll. Czechoslov. Chem. Commun.**, 53, 2664-2666, 1988.
- HUANG, T. P.; LEE WONG, A. C. Extracellular fatty acids facilitate flagella-independent translocation by *Stenotrophomonas maltophilia*. **Res. Microbiol.**, 158, 702-711, 2007.
- IKAWA, M.; MCGRATTAN, C. J.; BURGE, W. R.; IANNITELLI, R. C. Epirodin, a polyene antibiotic from the mold *Epicoccum nigrum*. **J. Antib.**, 31, 159-161, 1978.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. I. Miscellaneous observations on the behaviour of *Schwarziana quadripunctata*. **Bol. Zool. e Biol. Marinha**, 30, 633-640, 1973.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ZUCCHI, R. Virgin queens in stingless bee (Apidae, Meliponinae) colonies: a review. **Apidologie**, 26, 231-244, 1995.
- IVERSEN, C.; FORSYTHE, S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. **Trends Food Sci. Technol.**, 14, 443-454, 2003.
- IVERSEN, C.; LANE, M.; FORSYTHE, S. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. **Lett. Appl. Microbiol.**, 38, 378-382, 2004.
- IVERSEN, C.; MULLANE, M.; MC CARDELL, B.; TALL, B. D.; LEHNER, A.; FANNING, S.; STEPHAN, R.; JOOSTEN, H. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies. *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov., and A nov., and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 58, 1442-1447, 2008.
- JAENIKE, J.; BARTELT, R. J.; HUBERTY, A. F.; THIBAUT, S.; LIBLER, J. S. Aggregations in mycophagous *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae): candidate pheromones and field responses. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, 85, 696-704, 1992.

- JARAU, S.; HRNCIR, M.; ZUCCHI, R.; BARTH, F. G. A stingless bee uses labial gland secretions for scent trail communication (*Trigona recursa* Smith 1863). **J. Comp. Physiol. A.**, 190, 233-239, 2004.
- JARAU, S.; SCHULZ, C. M.; HRNCIR, M.; FRANCKE, W.; ZUCCHI, R.; BARTH, F. G.; AYASSE, M. Hexyl decanoate, the first trail pheromone compound identified in a stingless bee, *Trigona recursa*. **J. Chem. Ecol.**, 32, 1555-1564, 2006.
- JI, G.; BEAVIS, R. C.; NOVICK, R. P. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 92, 12055-12059, 1995.
- JOHNSON, I. S.; ARMSTRONG, J. G.; GORMAN, M.; BURNETT, J. P. JR. The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. **Cancer Res.**, 23, 1390-1427, 1963.
- JOHNSON, L. K.; WIEMER, D. F. Nerol: an alarm substance of the stingless bee, *Trigona fulviventris* (Hymenoptera: Apidae). **J. Chem. Ecol.**, 8, 1167-1181, 1982.
- JUNGNICKEL, H.; COSTA, A.J.S.; TENTSCHERT, J.; PATRICIO, E. F. L. R. A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; DRIJFHOUT, F.; MORGAN, E. D. Chemical basis of inter-colonial aggression in stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera: Apidae). **J. Insect Physiol.**, 50, 761-766, 2004.
- KALIA, V. C.; RAJU, S. C.; PUROHIT, H. J. Genomic analysis reveals versatile organisms for quorum quenching enzymes: acyl-homoserine lactone-acylase and -lactonase. **Open Microbiol. J.**, 5, 1-13, 2011.
- KANAI, A.; KAMIRO, T.; KURAMOCHI, K.; KOBAYASHI, S. Synthetic studies directed toward the assembly of the C-glycoside fragment of the telomerase inhibitor D8646-2-6. **Org. Lett.**, 5, 2837-2839, 2003.
- KATZAV-GOZANSK, T.; SOROKER, V.; IBARRA, F.; FRANCKE, W.; HEFETZ, A. Dufour's gland secretion of the queen honeybee (*Apis mellifera*): an egg discriminator pheromone or a queen signal? **Behav. Ecol. Sociobiol.**, 51, 76-86, 2001.
- KATZAV-GOZANSKY, T.; SOROKER, V.; HEFETZ, A.; COJOCARU, M.; ERDMANN, D. H.; FRANCKE, W. Plasticity of caste-specific Dufour's gland secretion in the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Naturwissenschaften**, 84, 238-241, 1997.
- KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. **Nat. Rev. Microbiol.**, 3, 937-947, 2005.
- KERN, F.; KLEIN, R. W.; JANSSEN, E.; BESTMANN, H.-J.; ATTYGALLE, A. B.; SCHÄFER; MASCHWITZ, U. Mellein, a trail pheromone component of the ant *Lasius fuliginosus*. **J. Chem. Ecol.**, 23, 779-792, 1997.

- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha urucu: biologia, manejo e conservação**. Fundação Acangau, Coleção Manejo da Vida Silvestre: Belo Horizonte, 1996.
- KERR, W. E.; KRAUSE, W. Contribuição para o conhecimento da bionomia dos Meliponini. I. Fecundação da rainha em *Melipona quadrifasciata* Lepeletiere (Hymenoptera, Apoidea). **Dusenya**, Curitiba, 1, 275-282, 1950.
- KHERSONSKY, O.; TAWFIK, D. S. Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective. **Annu. Rev. Biochem.**, 79, 471-505, 2010.
- KOEDAM, D.; JUNGnickel, H.; Tentschert, J.; Jones, G.R.; Morgan, E.D. Production of wax by virgin queens of the stingless bee *Melipona bicolor* (Apidae, Meliponinae). **Insectes Soc.**, 49, 229-233, 2002.
- KORTEKAMP, A. *Epicoccum nigrum* Link: a biological control agent of *Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) Berl. et De Toni? *Vitis* 36, 215-216, 1997.
- KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes infect.**, 2, 189-198, 2000.
- KROKOS, F. D.; KONSTANTOPOULOU, M. A.; MAZOMENOS, B. E. Alkadienes and alkenes, sex pheromones components of the almond seed wasp *Eurytoma amygdale*. **J. Chem. Ecol.**, 27, 2169-2181, 2011.
- KUO, A.; BLOUGH, N. V.; DUNLAP, P. V. Multiple *N*-acyl-L-homoserine lactone autoinducers of luminescence in the marine symbiotic bacterium *Vibrio fischeri*. **J. Bacteriol.**, 176, 7558-7565, 1994.
- LARSEN, H. D.; JORGENSEN, K. Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk products. **Int. J. Food Microbiol.**, 46, 173-176, 1999.
- LEADBETTER, J. R.; GREENBERG, E. P. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. **J. Bacteriol.**, 182, 6921-6926, 2000.
- LEE, J. C.; STROBEL, G. A.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. **J. Org. Chem.**, 61, 3232-3233, 1996.
- LEE, N. H.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T. Isolation of chromanone and isobenzofuran derivatives from a fungicolous isolate of *Epicoccum purpurascens*. **Bull. Korean Chem. Soc.**, 28, 877-879, 2007.
- LEHNER, A.; RIEDEL, K.; EBERL, L.; BREEUWER, P.; DIEP, B.; STEPHAN, R. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. **J. Food. Prot.**, 68, 2287-2294, 2005.

- LENSKY, Y.; SLABEZKI, Y. The inhibitory effect of the queen bee (*Apis mellifera* L.) footprint pheromone on the construction of swarming queen cups. **J. Insect Physiol.**, 27, 313-323, 1981.
- LEQUIN, M. H.; VERMEULEN, J. R.; VAN ELBURG, R. M.; BARKHOF, F.; KORNELISSE, R. F.; SWARTE, R.; GOVAERT, P. P. *Bacillus cereus* meningoencephalitis in preterm infants: neuroimaging characteristics. **Am. J. Neuroradiol.**, 26, 2137-2143, 2005.
- LI, C.; JOHNSON, R. P.; PORCO, J. A. JR Total synthesis of the quinine epoxide dimer (+)-torreyanic acid: application of a biomimetic oxidation/electrocyclization/Diels-Alder dimerization cascade. **J. Am. Chem. Soc.**, 125, 5095-5106, 2003.
- LI, J.; STROBEL, G.; SIDHU, R.; HESS, W. M.; FORD, E. J. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. **Microbiology**, 142, 2223-2226, 1996.
- LIN, Y. H.; XU, J. L.; HU, J.; WANG, L. H.; ONG, S. L.; LEADBETTER, J. R.; ZHANG L. H. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. **Mol. Microbiol.**, 47, 849-860, 2003.
- LINDAUER, M.; KERR, W. E. Communication between the workers of stingless bees. **Bee World**, 41, 29-71, 1960.
- LINGQI, Z.; BO, G.; HAIYAN, L.; SONGRONG, Z.; HUA, S.; SU, G.; RONGCHENG, W. Preliminary study on the isolation of endophytic fungus of *Catharanthus roseus* and its fermentation to produce products of therapeutic value. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 31, 805-807, 2000.
- LIU, D.; THOMAS, P. W.; MOMB, J.; HOANG, Q. Q.; PETSKO, G. A.; RINGE, D.; FAST, W. Structure and specificity of a quorum-quenching lactonase (AiiB) from *Agrobacterium tumefaciens*. **Biochemistry**, 46, 11789-11799, 2007.
- LIU, K.; DING, X.; DENG, B.; CHEN, W. Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 36, 1171-1177, 2009.
- LOH, J.; CARLSON, R. W.; YORK, W. S.; STACEY, G. Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 99, 14446-14451, 2002.
- MADRIGAL, C.; MELGAREJO, P. Morphological effects of *Epicoccum nigrum* and its antibiotic flavipin on *Monilinia laxa*. **Can. J. Bot.**, 73, 425-431, 1995.

- MADRIGAL, C.; TADEO, J. L.; MELGAREJO, P. Relationship between flavipin production by *Epicoccum nigrum* and antagonism against *Monilinia laxa*. **Mycol. Res.**, 95, 1375-1381, 1991.
- MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nat. Rev.**, 2, 143-148, 2002.
- MARTINI, M.; MUSETTI, R.; GRISAN, S.; POLIZZOTO, R.; BORSELLI, S.; PAVAN, F.; OSLER, R. DNA-Dependent detection of the grapevine fungal endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. **Plant Dis.**, 93, 993-998, 2009.
- MCCARTHY, E. D.; HAN, J.; CALVIN, M. Hydrogen atom transfer in mass spectrometric fragmentation patterns of saturated aliphatic hydrocarbons. **Anal. Chem.**, 40, 1475-1480, 1968.
- MCCLEAN, K. H., WINSON, M. K., FISH, L., TAYLOR, A., CHHABRA, S. R., CAMARA, M., DAYKIN, M., LAMB, J. H., SWIFT, S., BYCROFT, B. W., STEWART, G. S. A. B., AND WILLIAMS, P. Quorum-sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. **Microbiology**, 143, 3703-3711, 1997.
- MEDINA-MARTÍNEZ, M. S.; UYTENDAELE, M.; RAJKOVIC, A.; NADAL, P.; DEBEVERE, J. Degradation of *N*-acyl-L-homoserine lactones by *Bacillus cereus* in culture media and pork extract. **Appl. Environ. Microbiol.**, 73, 2329-2332, 2007.
- MEI, C.; FLINN, B. The use of beneficial microbial endophytes for plant biomass and stress tolerance improvement. **Recent Pat. Biotechnol.**, 4, 81-95, 2010.
- MELGAREJO, P.; CARRILLO, R.; SAGASTA, E. M. Mycoflora of peach twigs and flowers and its possible significance in biological control of *Monilinia laxa*. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, 85, 313-317, 1985.
- MICHENER, C. D. **The bees of the world**. Johns Hopkins: Baltimore. 2007.
- MILLER, D. R.; BORDEN, J. H.; SLESSOR, K. N. (*S*)-(+)-Ipsdienol: Interspecific inhibition of *Ips latidens* (leconte) by *Ips pini* (Say) (Coleoptera: Scolytidae). **Biomed. Life Sci.**, 15, 233-247, 1989.
- MILLER, M. B.; SKORUPSKI, K.; LENZ, D. H.; TAYLOR, R. K.; BASSLER, B. L. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholera*. **Cell**, 110, 303-314, 2002.
- MILLER, S. T.; XAVIER, K. B.; CAMPAGNA, S. R.; TAGA, M. E.; SEMMELHACK, M. F.; BASSLER, B. L.; HUGHSON, F. M. *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. **Mol. Cell**, 15, 677-687, 2004.

- MORI, K. Organic Synthesis and Chemical Ecology. **Acc. Chem. Res.**, 33, 102-110, 2000.
- MOURE, J. S. A preliminary supra-specific classification of the old world Meliponine bees (Hymenoptera, Apoidea). **Studia Entomologica**, 4, 181-242, 1961.
- MOURE, J. S. Notas sobre Meliponinae. **Dusenía**, 2, 25-70, 1951.
- MUSSETI, R.; GRISAN, S.; POLIZZOTTO, R.; MARTINI, M.; PADUANO, C.; OSLER, R. Interactions between ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ and the Apple endophyte *Epicoccum nigrum* in *Catharanthus roseus* plants. **J. Appl. Microbiol.**, 110, 746-756, 2011.
- NASCIMENTO, E. T.; PÉREZ-MALUF, R.; GUIMARÃES, R. A.; CASTELLANI, M. A. Diversidade de abelhas visitantes das flores de Citrus em pomares de laranjeira e tangerineira. **Rev. Bras. Frutic.**, 33, 111-117, 2011.
- NAZAROWEC-WHITE, M.; FARBER, J. M. *Enterobacter sakazakii*: a review. **Int. J. Food Microbiol.**, 34, 103-113, 1997.
- NEIL, J. O.; BILLEN, J.; MORGAN, E. D. On the similarity of the Dufour gland secretion and the cuticular hydrocarbons of some bumblebees. **Physiol. Entomol.**, 19, 95-123, 1981.
- NEISES, B.; STEGLICH, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. **Angew. Chem. Int. Ed.**, 17, 522-524, 1978.
- NELSON, D. R.; SUKKESTAD, D. R.; ZAYLSKIE, R. G. Mass spectra of methyl-branched hydrocarbons from eggs of the tobacco hornworm. **J. Lipid. Res.**, 13 413-421, 1972.
- NIEH, J. C. Recruitment communication in stingless bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Apidologie**, 35, 159-182, 2004.
- NISHIKAWA, H. Biochemistry of molds II. A metabolic product of *Aspergillus melleus*. **J. Agric. Chem. Soc. Jpn.**, 9, 772-774, 1933.
- NITAO, J. K.; MEYER, S. L. F.; OLIVER, J. E.; SCHMIDT, W. F.; CHITWOOD, D. J. Isolation of flavipin, a fungus compound antagonistic to plant-parasitic nematodes. **Nematology**, 4, 55-63, 2002.
- NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**, Nogueirapis: São Paulo, 1997.
- NORDLUND, D. A.; LEWIS, W. J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **J. Chem. Ecol.**, 2, 211-220, 1976.
- NORIN, T. Semiochemicals for insect pest management. **Pure Appl. Chem.**, 79, 2129-2136, 2007.



- NUNES, T. M.; NASCIMENTO, F. S.; TURATTI, I. C.; LOPES, N. P.; ZUCCHI, R. Nestmate recognition in a stingless bee: does the similarity of chemical cues determine guard acceptance? **Anim. Behav.**, 75, 1165-1171, 2008.
- NUNES, T. M.; TURATTI, I.C.C.; MATEUS, S.; NASCIMENTO, F.S.; LOPES, N.P.; ZUCCHI, R. Cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): differences between colonies, castes and age. **Gen. Mol. Res.**, 8, 589-595, 2009.
- O'CALLAGHAN, J.; CADDICK, M. X.; DOBSON, A. D. W. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. **Microbiology**, 149, 3485-3491, 2003.
- OGATA, N.; SHIBATA, T. Inhibition of rat intestinal Cl<sup>-</sup> secretion by 4,5-dimethylresorcinol. **Pharmacology**, 72, 247-53, 2004.
- OLDROYD, B. P.; RATNIEKS, F. L. W.; WOSSLER, T. C. Egg-marking pheromones in honey-bees *Apis mellifera*. **Behavioral Ecol. Sociobiol.**, 51, 590-591, 2002.
- OLIVEIRA, R. C.; NUNES, F. M. F.; CAMPOS, A. P. S.; VASCONCELOS, S. M.; ROUBIK, D.; GOULART, L. R.; KERR, W. E. Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on rapd markers. **Genet. Mol. Biol.**, 27, 181-186, 2004.
- OWELLEN, R. J.; DONIGIAN, D. W. [3H]Vincristine. Preparation and preliminary pharmacology. **J. Med. Chem.**, 15, 894-898, 1972.
- OZER, E. A.; PEZZULO, A.; SHIH, D. M.; HUN, C.; FURLONG, C.; LUSIS, A. J.; GREENBERG, E. P.; ZABNER, J. Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing. **FEMS Microbiol. Lett.**, 253, 29-37, 2005.
- PARK, D. Varicosporium as a competitive soil saprophyte. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, 78, 33-41, 1982.
- PARK, S. Y.; KANG, H. O.; JANG, H. S.; LEE, J. K.; KOO, B. T.; YUM, D. Y. Identification of extracellular *N*-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. **Appl. Environ. Microbiol.**, 71, 2632-2641, 2005.
- PASSADOR, L.; COOK, J. M.; GAMBELLO, M. J.; RUST, L.; IGLEWSKI, B. H. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. **Science**, 260, 1127-1130, 1993.
- PESCI E. C.; MILKBANK J. B. J.; PEARSON, J. P.; MCKNIGHT, S.; KENDE A. S.; GREENBERG E. P.; IGLEWSKI B. H. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 96, 11229-11234, 1999.

- PESTOVA, E. V.; HAVARSTEIN, L. S.; MORRISON, D. A. Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. **Mol. Microbiol.**, 21, 853-862, 1996.
- PIECKENSTAIN, F. L.; BAZZALO, M. E.; ROBERTS, A. M. I.; UGALDE, R. A. *Epicoccum purpurascens* for biocontrol of *Sclerotinia* head rot of sunflower. **Mycol. Res.**, 105, 77-84, 2001.
- PINTO, U. M.; VIANA, E. S.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. **Food Control**, 18, 1322-1327, 2007.
- PIRHONEN M.; FLEGO, D.; HEIKINHEIMO R.; PALVA E. T. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. **EMBO J.**, 12, 2467-2476, 1993.
- POMINI, A. M.; CRUZ, P. L. R.; GAI, C.; ARAUJO, W. L.; MARSAIOLI, A. J. Long-chain acyl-homoserine lactones from *Methylobacterium mesophilicum*: Synthesis and absolute configuration. **J. Nat. Prod.**, 72, 2125-2129, 2009.
- POMINI, A. M.; MANFIO, G. P.; ARAUJO, W. L.; MARSAIOLI, A. J. Acyl-homoserine lactones from *Erwinia psidii* IBSBF 435T, a guava phytopathogen (*Psidium guajava* L.). **J. Agric. Food Chem.**, 53, 6262-6265, 2005.
- POMINI, A. M.; MARSAIOLI, A. J. Absolute configuration and antimicrobial activity of acyl-homoserine lactones. **J. Nat. Prod.**, 71, 1032-1036, 2008.
- QIN, J.-C.; ZHANG, Y.-M.; GAO, J.-M.; BAI, M.-S.; YANG, S.-X.; LAATSCH, H.; ZHANG, A.-L. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 19, 1572-1574, 2009.
- RAISTRICK, H.; RUDMAN, P. Studies in the biochemistry of micro-organisms. 97. Flavipin, a crystalline metabolite of *Aspergillus flavipes* and *A. terreus*. **Biochem. J.**, 63, 395-405, 1956.
- RAJULU, M. B. G.; THIRUNAVUKKARASU, N.; SURYANARAYANAN, T. S.; RAVISHANKAR, J. P.; EL GUEDDARI, N. E.; MOERSCHBACHER, B. M. Chitinolytic enzymes from endophytic fungi. **Fungal Diversity**, 47, 43-53, 2011.
- RAMALHO, M., KLEINERT-GIOVANNINI, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Important bee plants for stingless bees (*Melipona* and Trigonini) and africanized honeybees (*Apis mellifera*) in neotropical habitats: a review. **Apidologie**, 21, 469-488, 1990.
- RAVN, L.; CHRISTENSEN, A. B.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; GRAM, L. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-

- negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. **J. Microbiol. Methods**, 44, 239-251, 2001.
- REIMMANN, C.; BEYELER, M.; LATIFI, M.; WINTELER, H.; FOGLINO, M.; LAZDUNSKI, A.; HAAS, D. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer *N*-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. **Mol. Microbiol.**, 24, 309-319, 1997.
- REIMMANN, C.; GINET, N.; MICHEL, L.; KEEL, C.; MICHAUX, P.; KRISHNAPILLAI, V.; ZALA, M.; HEURLIER, K.; TRIANDAFILLU, K.; HARMS, H.; DÉFAGO, G.; HAAS, D. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Microbiology**, 148, 923-932, 2002.
- REIS, M. G. **Caracteres químicos em estudos de filogenia e biologia de polinização de espécies de Oncidiinae (Orchidaceae)**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER, Y.-J.; LARONDELLE, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chem.-Biol. Interact.**, 159, 18-46, 2006.
- RODRIGUEZ, R. J.; WHITE JR, J. F.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, 182, 314-330, 2009.
- ROMERO M.; DIGGLE, S. P.; HEEB, S.; CAMARA, M.; OTERO, A. Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase. **FEMS Microb. Lett.**, 280, 73-80, 2008.
- ROUBIK, D. W. **Ecology and Natural History of Tropical Bees**. Cambridge University Press: Cambridge, 1989.
- ROUBIK, D. W. Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, 37, 124-143, 2006.
- RUKACHAISIRIKUL, V.; ARUNPANICHLERT, J.; SUKPONDMA, Y.; PHONGPAICHT, S.; SAKAYAROJ, J. Metabolites from the endophytic fungi *Botryosphaeria rhodina* PSU-M35 and PSU-M114. **Tetrahedron**, 65, 10590-10595, 2009.
- RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiol. Lett.**, 278, 1-9, 2008.
- SANDHU, S. S.; SHARMA, A. K.; BENIWAL, V.; GOEL, G.; BATRA, P. KUMAR, A.; JAGLAN, S.; SHARMA, A. K.; MALHOTRA, S. Myco-biocontrol of insect pests: factors involved, mechanism and regulation. **J. Pathog.**, 1-10, 2012.
- SANTOS, I. A. A vida de uma abelha solitária. **Revista Ciência Hoje**, 179, 2002.

- SBARBATI, S.; OSCULATI, F. Allelochemical Communication in Vertebrates: Kairomones, Allomones and Synomones. **Cells Tissues Organs**, 183, 206-219, 2006.
- SCHAEFER, A. L.; VAL, D. L.; HANZELKA, B. L.; CRONAN, J. E.; GREENBERG, E. P. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93, 9505-9509, 1996.
- SCHIESTL, F. P.; AYASSE, M.; PAULUS, H. F.; LOFSTEDT, C.; HANSSON, B.; IBARRA, F.; FRANCKE, W. Sexual pheromone mimicry in the early spider orchid (*Ophrys sphegodes*): patterns of hydrocarbons and the key mechanism for pollination by sexual deception. **J. Comp. Physiol. A**, 186, 567-574, 2000.
- SCHOENI, J. L.; WONG, A. C. L. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. **J. Food Prot.**, 68, 636-648, 2005.
- SCHOL-SCHWARZ, M. B. The genus *Epicoccum* Link. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, 42, 149-173, 1959.
- SCHORKOPF, D. L. P.; HRNCIR, M.; MATEUS, S.; ZUCCHI, R.; SCHMIDT, V. M.; BARTH, F. G. Mandibular gland secretions of meliponine worker bees: further evidence for their role in interspecific and intraspecific defence and aggression and against their role in food source signalling. **J. Exp. Biol.**, 212, 1153-1162, 2009.
- SCHRÖDER, F. Induced Chemical Defense in Plants. **Angew. Chemie Int. Ed.**, 37, 1213-1216, 1998.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycol. Res.**, 109, 661-686, 2005.
- SCHULZ, B.; RÖMMERT, A.-K.; DAMMANN, U.; AUST, H.-J.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? **Mycol. Res.**, 103, 1275-1283, 1999.
- SEKITA, S.; YOSHIHIRA, K.; NATORI, S.; UDAGAWA, S.-I.; SAKABE, F.; KURATA, H.; UMEDA, M. Chaetoglobosins, cytotoxic 10-(indol-3-yl)-[13]cytochalasans from *Chaetomium* spp. I. Production, isolation and some cytological effects of chaetoglobosins A-J. **Chem. Pharm. Bull.**, 30, 1609-1617, 1982.
- SHARMA, M.; ANAND, S. K. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. **Food Microbiol.**, 19, 627-636, 2002.
- SHOREY, H. H. Behavioral Responses to Insect Pheromones. **Annu. Rev. Entomol.**, 18, 349-380, 1973.
- SHU, Y. Z.; YE, Q.; LI, H.; KADOW, K. F.; HUSSAIN, R. A.; HUANG, S.; GUSTAVSON, D. R.; LOWE, S. E.; CHANG, L. P.; PIRNIK, D. M.;

- KODUKULA, K. Orevactaene, a novel binding inhibitor of HIV-1 rev protein to Rev response element (RRE) from *Epicoccum nigrum* WC47880. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 7, 2295-2298, 1997.
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação**, 1ª ed., Fernando A. Silveira: Belo Horizonte, 2002.
- SIMIONATO, A. V. C.; SILVA, D. S.; LAMBAIS, M. R.; CARRILHO, E. Characterization of a putative *Xylella fastidiosa* diffusible signal factor by HRGC-ESI-MS. **J. Mass Spectrom.**, 42, 1375-1381, 2007.
- SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **J. Food Sci. Technol.**, 43, 573-583, 2010.
- SINGER, T. L. Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. **Amer. Zool.**, 38, 394-405, 1998.
- SOMMEIJER, M. J.; BRUIJN, L. L. M. Drone congregations apart from the nest in *Melipona favosa*. **Insectes Sociaux**, 42, 123-127, 1995.
- SOMMEIJER, M. J.; BRUIJN, L. L. M.; MEEUWSEN, F. J. A. J. Behaviour of males, gynes and workers at drone congregation sites of the stingless bee *Melipona favosa* (Apidae: Meliponini). **Entomologische Berichten**, 64, 10-15, 2003.
- STANGLER, E. S.; JARAU, S.; HRNCIR, M.; ZUCCHI, R.; AYASSE, M. Identification of trail pheromone compounds from the labial glands of the stingless bee *Geotrigona mombuca*. **Chemoecology**, 19, 13-19, 2009.
- STEIDLE, A.; SIGL, K.; SCHUHEGGER, R.; IHRING, A.; SCHMID, M.; GANTNER, S.; STOFFELS, M.; RIEDEL, K.; GIVSKOV, M.; HARTMANN, A.; LANGEBARTELS, C.; EBERL, L. Visualization of *n*-acylhomoserine lactone-mediated cell-cell communication between bacteria colonizing the tomato rhizosphere. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67, 5761-5770, 2001.
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, 260, 214-216, 1993.
- STOWERS, L.; MARTON, T. F. What Is a Pheromone? Mammalian Pheromones Reconsidered. **Neuron**, 46, 699-702, 2005.
- STROBEL G. A.; MILLER R. V.; MARTINEZ-MILLER C.; CONDRON, M. M.; TEPLow D. B.; HESS, W. M. Cryptocandin a potent and antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Microbiology**, 145, 1919-26, 1999.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 67, 491-502, 2003.

- STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **J. Nat. Prod.**, 67, 257-268, 2004.
- SUN, C.-M.; TOIA, R. F. Biosynthetic studies on ant metabolites of mellein and 2,4-dihydroxyacetophenone from [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]acetate. **J. Nat. Prod.**, 56, 953-956, 1993.
- SUN, Z.-L.; ZHANG, M.; ZHANG, M.; ZHANG, J.-F.; FENG, J. Antifungal and cytotoxic activities of the secondary metabolites from endophytic fungus *Massison* sp. **Phytochemistry**, 18, 859-862, 2011.
- TAGHAVI, S.; BARAC, T.; GREENBERG, B.; BORREMANS, B.; VANGRONSVELD, J.; VAN DER LELIE, D. Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation to toluene. **Appl. Environ. Microbiol.**, 71, 8500-8505, 2005.
- TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Nat. Prod. Rep.**, 18, 448-459, 2001.
- THAKUR, M. Bees as pollinators - biodiversity and conservation. **Int. Res. J. Agric. Sci. Soil Sci.**, 2, 1-7, 2012.
- TOKIEDA, K.; MORIKAWA, Y.; MAEYAMA, K.; MORI, K.; IKEDA, K. Clinical manifestations of *Bacillus cereus* meningitis in newborn infants. **J. Paediatr. Health**, 35, 582-584, 1999.
- TRAN, S. L.; GUILLEMET, E.; GOHAR, M.; LERECLUS, D.; RAMARAO, N. CwpFM (EntFM) is a *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation, and virulence. **J. Bacteriol.**, 192, 2638-2642, 2010.
- URMENYI, A. M. C.; FRANKLIN, A. W. Neonatal death from pigmented coliform infection. **Lancet**, 1, 313-315, 1961.
- UROZ, S.; DESSAUX, Y.; OGER, P. Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. **ChemBioChem**, 10, 205-216, 2009.
- VAN ACKNER, J.; DE SMET, F.; MUYLDERMANS, G.; BOUGATEF, A.; NAESSENS, A.; LAUWERS, S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. **J. Clin. Microbiol.**, 39, 293-297, 2001.
- VAN HOUDT, R.; AERTSEN, A.; JANSEN, A.; QUINTANA, A. L.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and cell-to-cell signaling in Gram-negative bacteria isolated from a food processing environment. **J. Appl. Microbiol.**, 96, 177-184, 2004.
- VAN ZWEDEN, J. S.; GRÜTER, C.; JONES, S. M.; RATNIEKS, F. L. W. Hovering guards of the stingless bee *Tetragonisca angustula* increase colony defensive perimeter as shown by intra- and inter-specific comparisons. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, 65, 1277-1282, 2011.

- VELTHUIS, H. H. W.; KOEDAM, D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The male of *Melipona* and other stingless bees, and their mothers. **Apidologie**, 36, 169-185, 2005.
- VELTHUIS, H. W. **Biologia das abelhas sem ferrão**. Universidade de São Paulo: São Paulo, 1997.
- VERACHTER, H.; HANSSENS, L. Isolation and identification of phenolic substances from the fungus *Penicillium spinulosum*. **Ann. Microbiol.**, 126, 143-149, 1975.
- VIDAL-MARTINS, A. M. C.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; BÜRGER, K. P.; CARDOZO, M. V.; SALLOTI, B. M.; CORTEZ, A. L. L. *Bacillus cereus* enterotoxigênicos em diferentes fases do processamento de leite UAT. **Rev. Bras. Ci. Vet.**, 13, 32-36, 2006.
- VON BODMAN S. B., BAUER W. D., COPLIN, D. L. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 41, 455-482, 2003.
- VON BODMAN, S.; FARRAND, S. K. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an *N*-acylhomoserine lactone autoinducer. **J. Bacteriol.**, 177, 5000-5008, 1995.
- WANG, J.-M.; DING, G.-Z.; FANG, L.; DAI, J.-G.; YU, S.-S.; WANG, Y.-H.; CHEN, X.-G.; MA, S.-G.; QU, J.; XU, S.; DU, D. Thiodiketopiperazines produced by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. **J. Nat. Prod.**, 73, 1240-1249, 2010.
- WANGUN, H. V. K.; DAHSE, H. M.; HERTWECK, C. Epicoccamides B-D, glycosylated tetramic acid derivatives from an *Epicoccum* sp. associated with the tree fungus *Pholiota squarrosa*. **J. Nat. Prod.**, 70, 1800-1803, 2007.
- WANGUN, H. V. K.; HERTWECK, C. Epicoccarines A, B and epipyridone: tetramic acids and pyridone alkaloids from an *Epicoccum* sp. associated with the tree fungus *Pholiota squarrosa*. **Org. Biomol. Chem.**, 5, 1702-1705, 2007.
- WANGUN, H. V. K.; ISHIDA, K.; HERTWECK, C. Epicoccalone, a coumarin-type chymotrypsin inhibitor, and isobenzofuran congeners from an *Epicoccum* sp. associated with a tree fungus. **Eur. J. Org. Chem.**, 3781-3784, 2008.
- WATERS, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, 21, 319-346, 2005.
- WHITE, G. A.; ELLIOTT, W. B. Gladiolic acid and related aromatic ortho-dialdehydes, a novel class of mitochondrial inhibitors. Inactivation of cytochrome C. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 47, 1186-1195, 1972.
- WHITE, G. A.; ELLIOTT, W. B. Inhibition of electron transport and oxidative phosphorylation in plant mitochondria by gladiolic acid and structurally-related aromatic ortho dialdehydes. **Can. J. Biochem.**, 58, 9-22, 1980.

- WHITEHEAD, N. A.; BARNARD, A. M. L.; SLATER, H.; SIMPSON, N. J. L.; SALMOND, G. P. C. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, 25, 365-404, 2001.
- WILLE, A. Biology of the stingless bees. **Ann. Rev. Entomol.**, 28, 41-64, 1983.
- WILLIAMS, I. H.; PICKETT, J. A.; MARTIN, A. P. The Nassenov pheromone of the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). II. Bioassay of the components using foragers. **J. Chem. Ecol.**, 7, 225-237, 1981.
- WILMS, W.; WIECHERS, B. Floral resource partitioning between native *Melipona* bees and the introduced Africanized honeybee in the Brazilian rain forest. **Apidologie**, 28, 339-355, 1997.
- WILSON, E. O.; BOSSERT, W. H. Chemical communication among animals. **Rec. Progr. Hormone Res.**, 19, 673-716, 1963.
- WITTIG, H. P. P.; JOHNSON, K. B.; PSCHIEDT, J. W. Effect of epiphytic fungi on brown rot blossom blight and latent infections in sweet cherry. **Plant Dis.**, 81, 383-387, 1997.
- WRIGHT, A. D., OSTERHAGE, C., KÖNIG, G. M. Epicoccamide, a novel secondary metabolite from a jellyfish derived culture of *Epicoccum purpurascens*. **Org. Biomol. Chem.**, 1, 507-510, 2003.
- XU, F.; BYUN, T.; DEUSSEN, H. J.; DUKE, K. R. Degradation of *N*-acylhomoserine lactones, the bacterial quorum-sensing molecules, by acylase. **J. Biotechnol.**, 101, 89-96, 2003.
- YANG, F. ; WANG, L. H.; WANG, J.; DONG, Y. H.; HU, J. Y.; ZHANG, L. H. Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mammalian species. **FEBS Lett.**, 579, 3713-3717, 2005.
- YU, H.; ZHANG, L. Z.; LI, L.; ZHENG, C.; GUO, L.; LI, W.; SUN, P.; QIN, L. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiol. Res.**, 165, 437-449, 2010.
- ZHANG, L. H. Quorum quenching and proactive host defense. **Trends Plant Sci.**, 8, 238-244, 2003.
- ZHANG, L. H.; WANG, L.-H.; ZHANG, L.-H. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 99, 4638-4643, 2002.
- ZHANG, Y.; LIU, S.; CHE, Y.; LIU, X. Epicoccins A–D, epipolythiodioxopiperazines from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Epicoccum nigrum*. **J. Nat. Prod.**, 70, 1522-1525, 2007.
- ZHAO, C.; ZENG, H.; YU, Z.; SUN, M. *N*-Acyl homoserine lactonase promotes prevention of *Erwinia* virulence with zwittermicin a-producing strain *Bacillus cereus*. **Biotechnol. Bioeng.**, 100, 599-603, 2008.



- ZHOU, T.; REELEDER, R. D.; SPARACE, S. A. Interactions between *Sclerotinia sclerotiorum* and *Epicoccum purpurascens*. **Can. J. Bot.**, 69, 2503-2510, 1991.
- ZOGAJ, X.; BOKRANZ, W.; NIMTZ, M.; RÖMLING, U. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. **Infect. Immun.**, 71, 4151-4158, 2003.

# ANEXOS

---



## ANEXOS

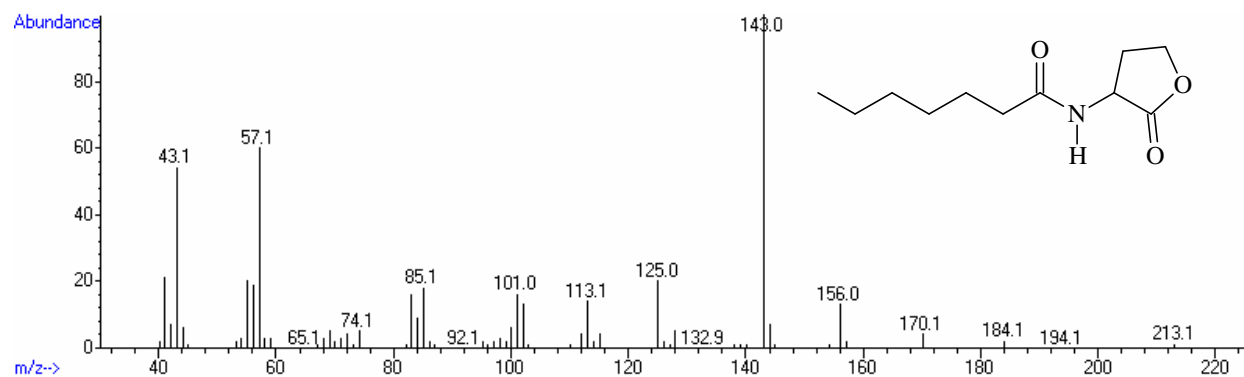


Figura 1A. Espectro de massas (IE 70 eV) da (±)-N-heptanoil-HSL sintética.

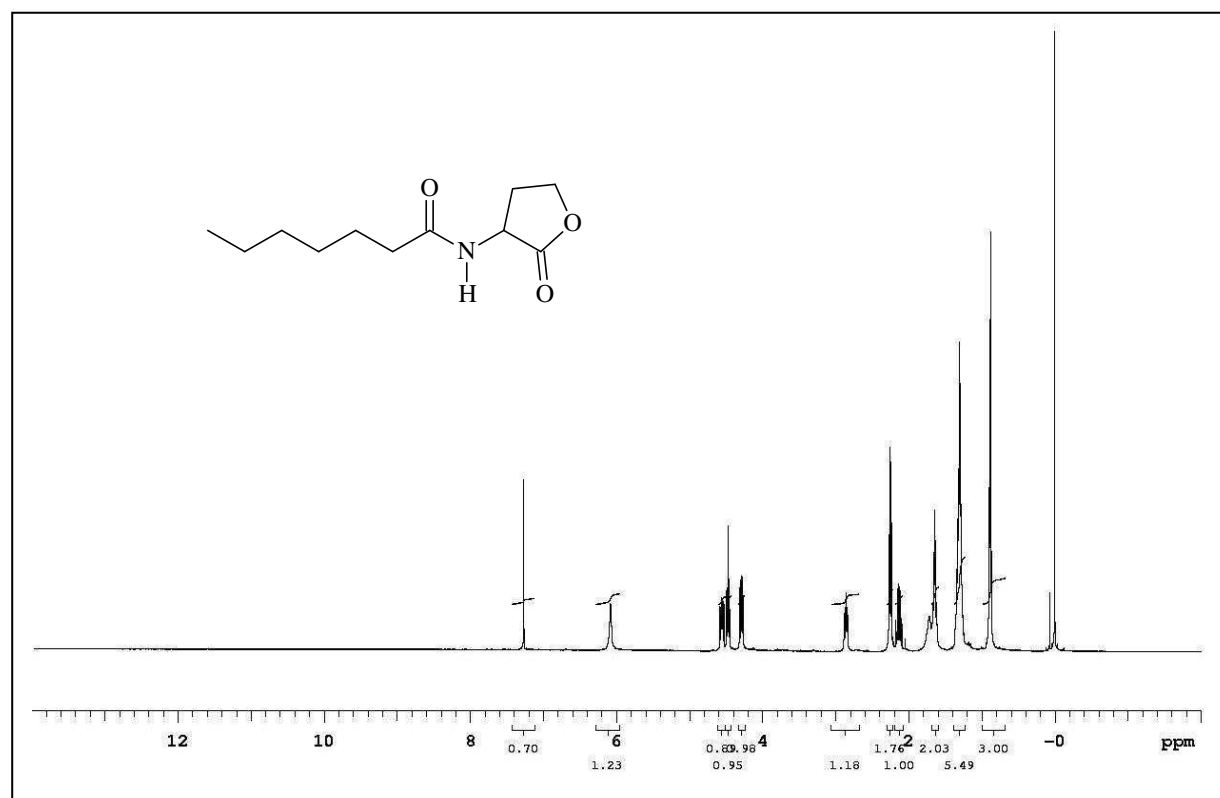
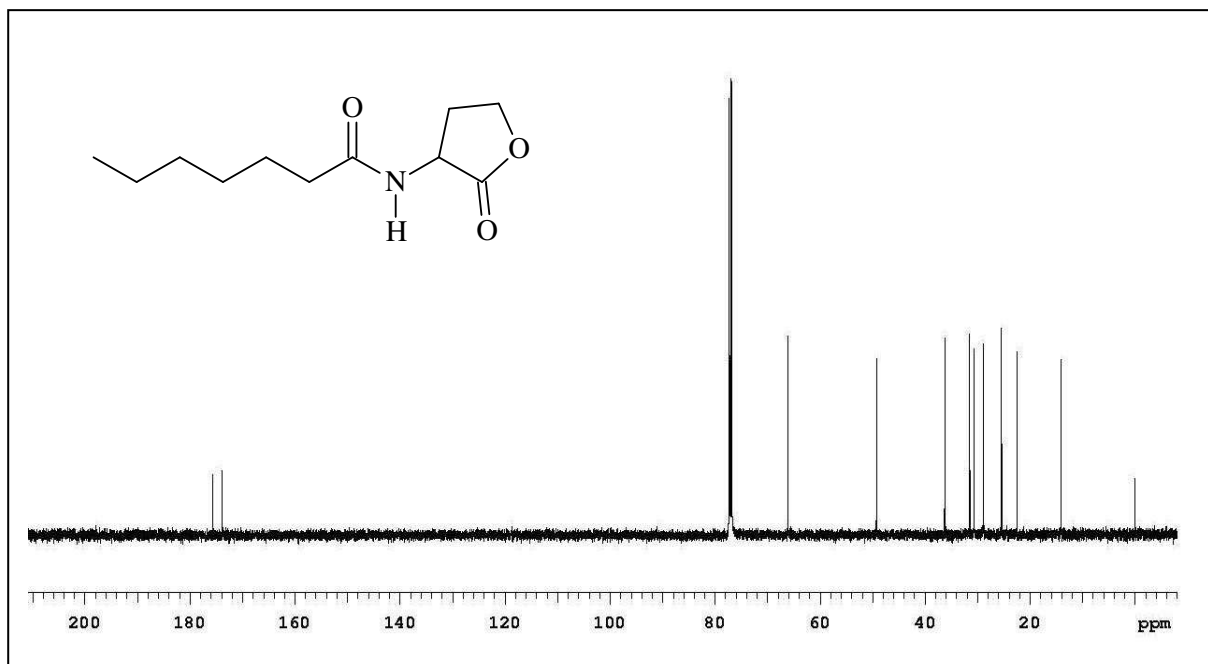
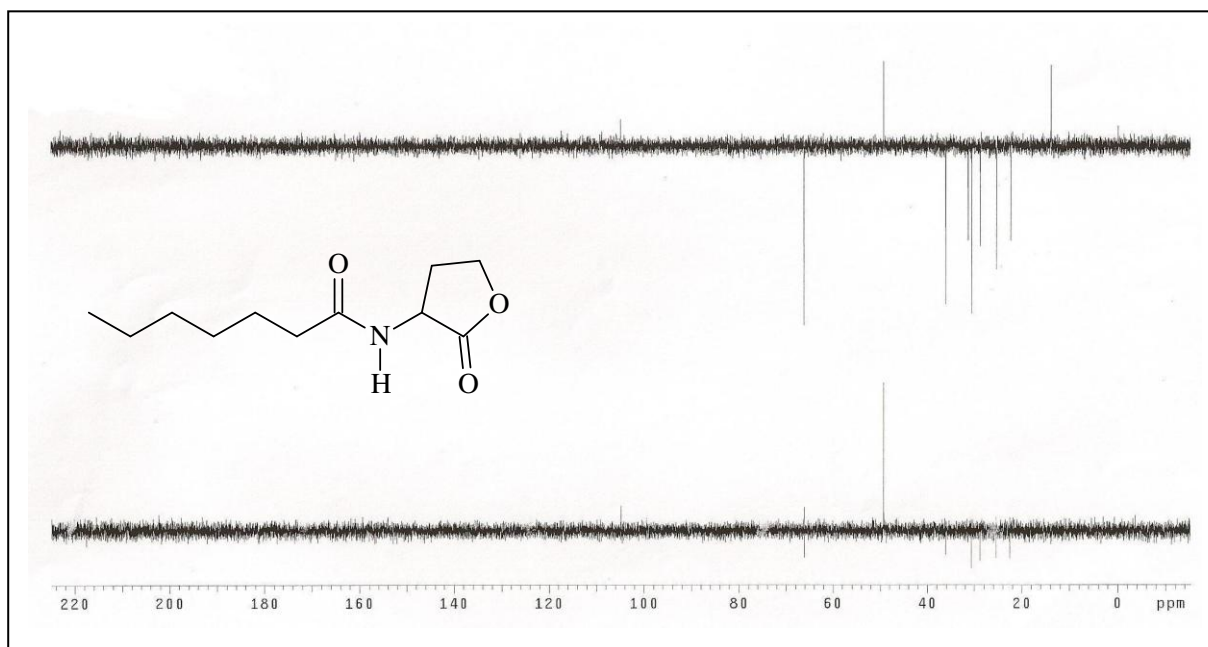


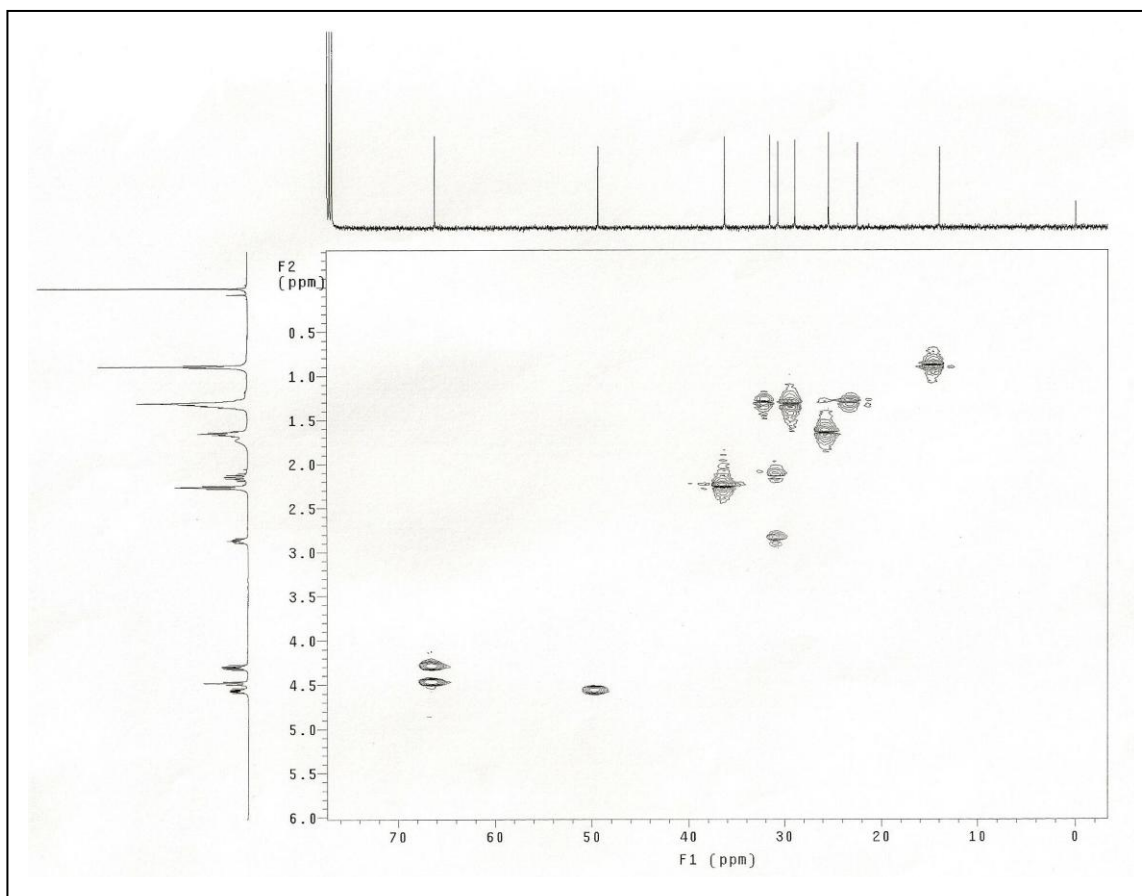
Figura 2A. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (499,88 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) da (±)-N-heptanoil-HSL sintética.



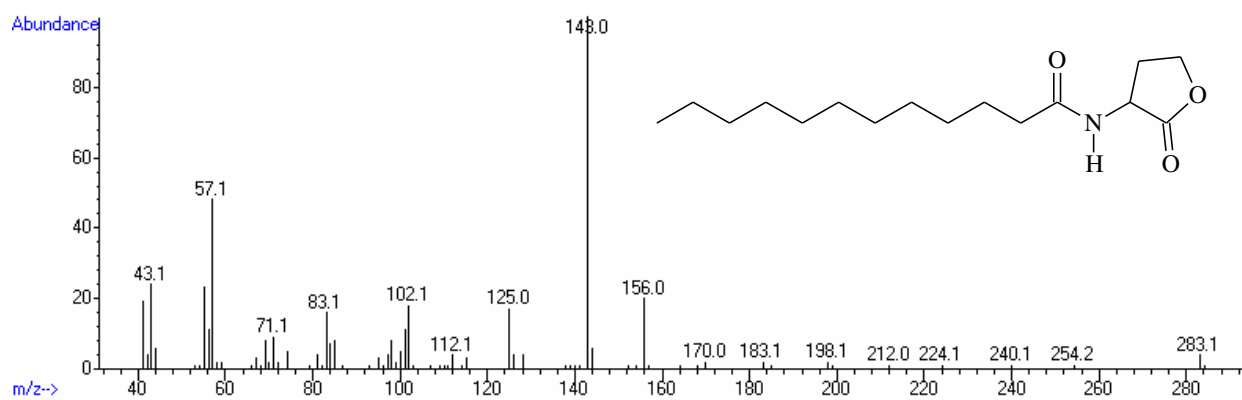
**Figura 3A.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125,71 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) da  $(\pm)$ -N-heptanoil-HSL sintética.



**Figura 4A.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° e DEPT 90° (125,71 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) da  $(\pm)$ -N-heptanoil-HSL sintética.



**Figura 5A.** Mapa de contornos de RMN 2D (CDCl<sub>3</sub>, TMS) de correlações <sup>1</sup>H (499,88 MHz); <sup>13</sup>C (125,71 MHz) <sup>1</sup>J HSQC da (±)-*N*-heptanoil-HSL sintética.



**Figura 6A.** Espectro de massas (IE 70 eV) da (±)-*N*-dodecanoil-HSL sintética.

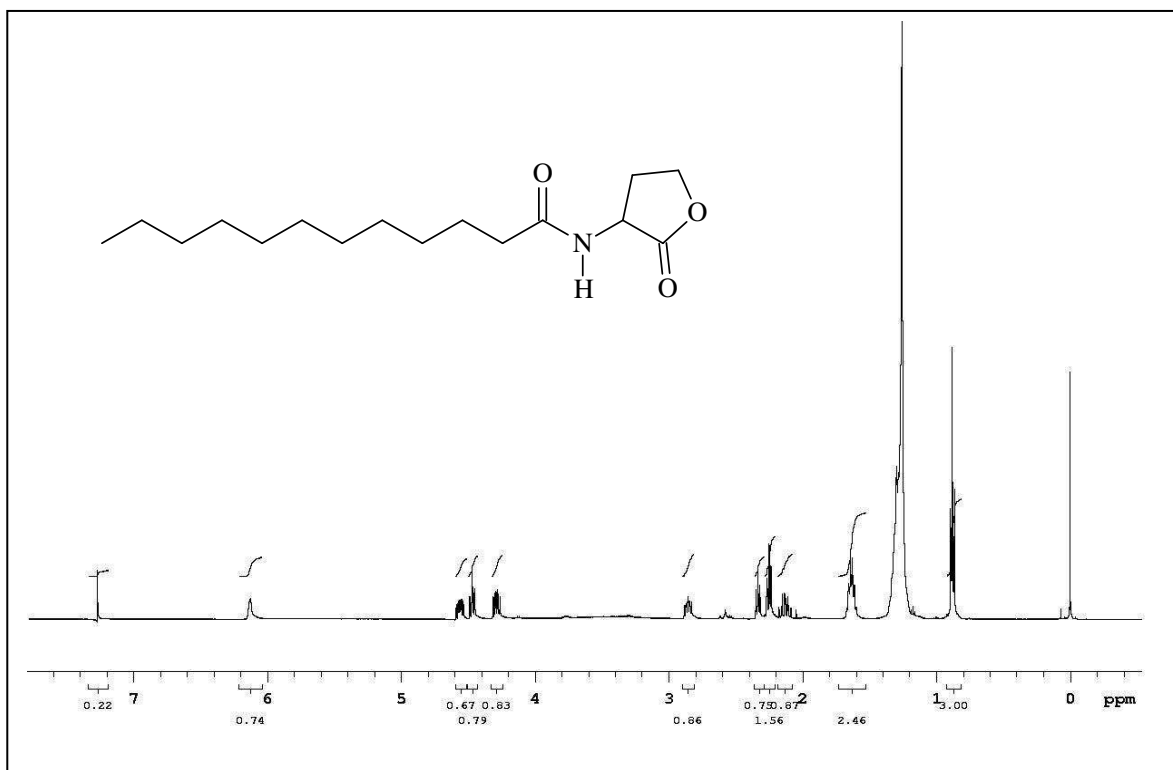


Figura 7A. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) da (±)-*N*-dodecanoil-HSL sintética.

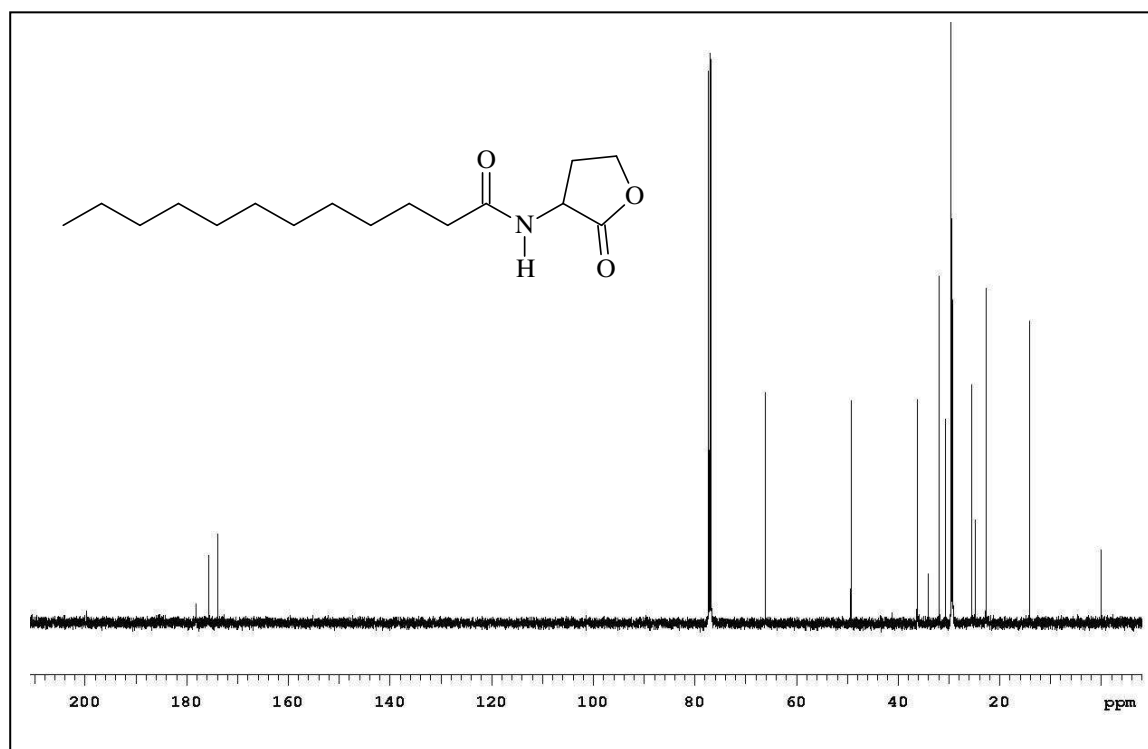
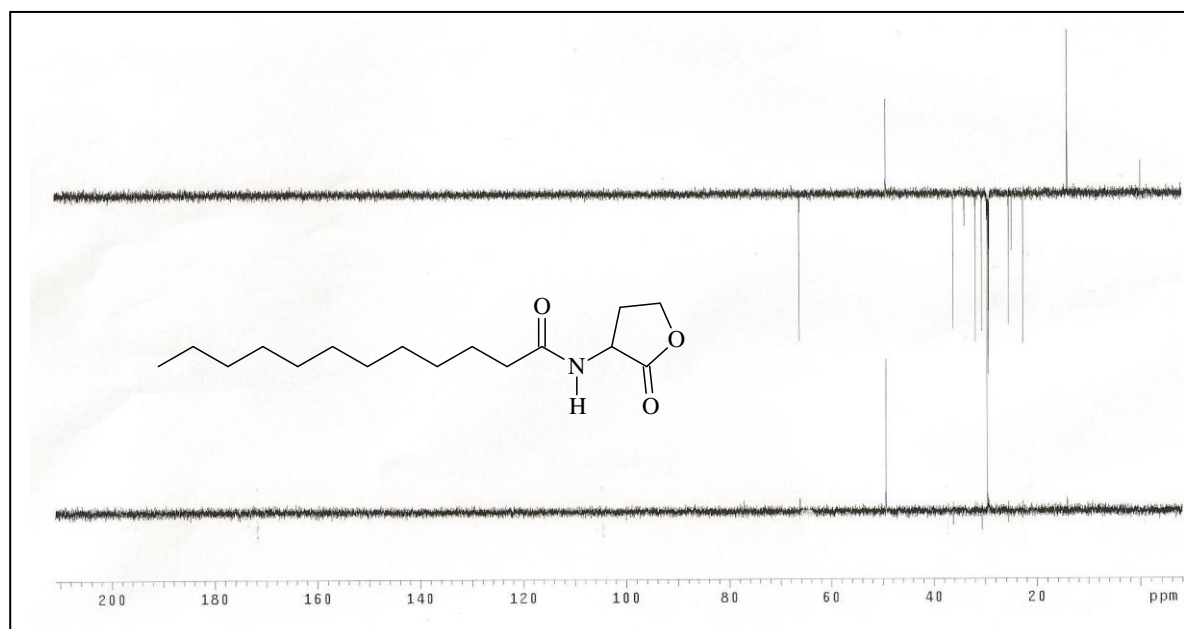
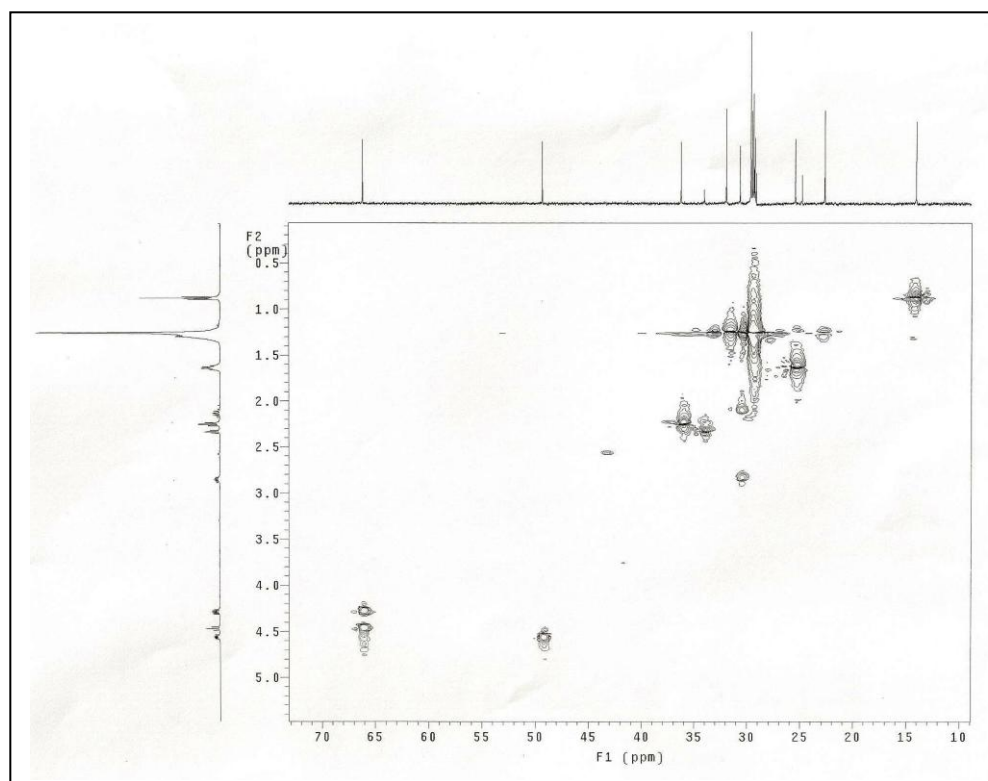


Figura 8A. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (125,71 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) da (±)-*N*-dodecanoil-HSL sintética.



**Figura 9A.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° e DEPT 90° (125,71 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) da (±)-*N*-dodecanoil-HSL sintética.



**Figura 10A.** Mapa de contornos de RMN 2D ( $\text{CDCl}_3$ , TMS) de correlações  $^1\text{H}$  (499,88 MHz);  $^{13}\text{C}$  (125,71 MHz)  $^1J$  HSQC da (±)-*N*-dodecanoil-HSL sintética.



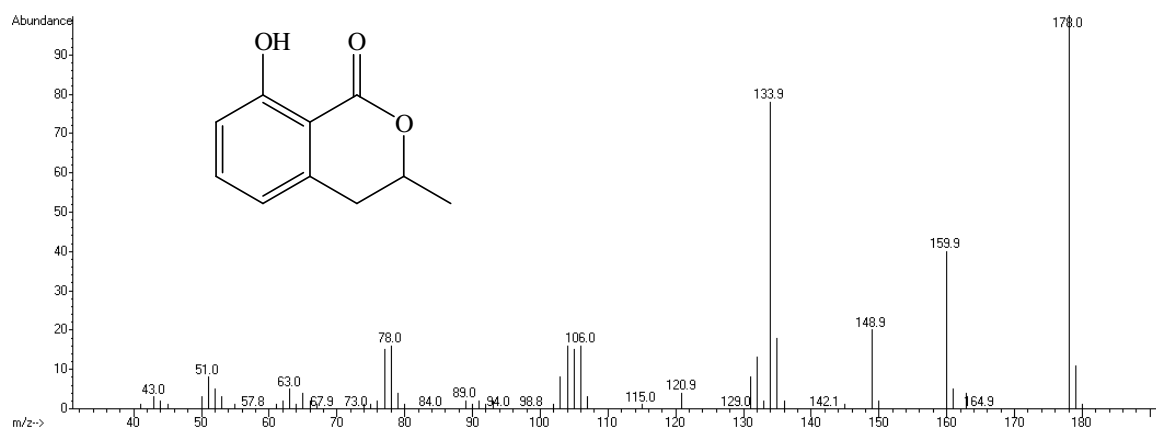


Figura 11A. Espectro de massas (IE 70 eV) da mefenáca.

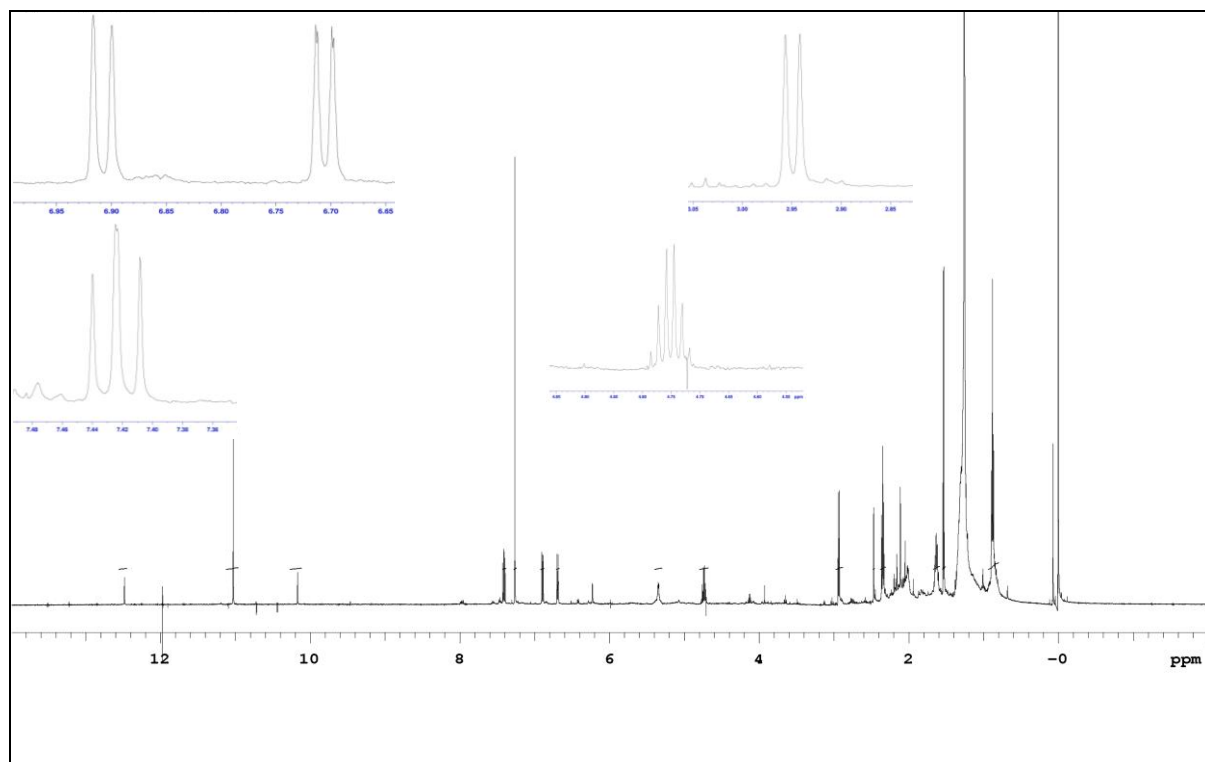


Figura 12A. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) da mefenáca (impura).

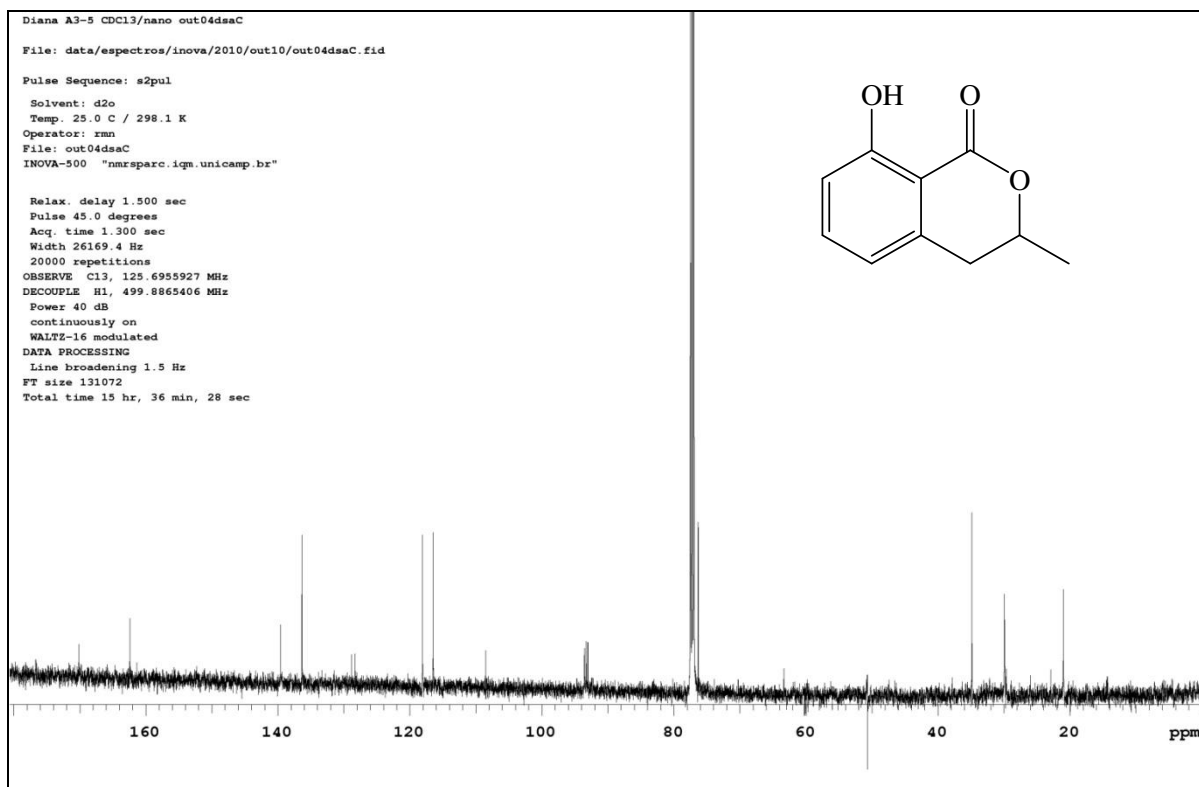


Figura 13A. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125,71 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) da meleína pura (nanosonda).

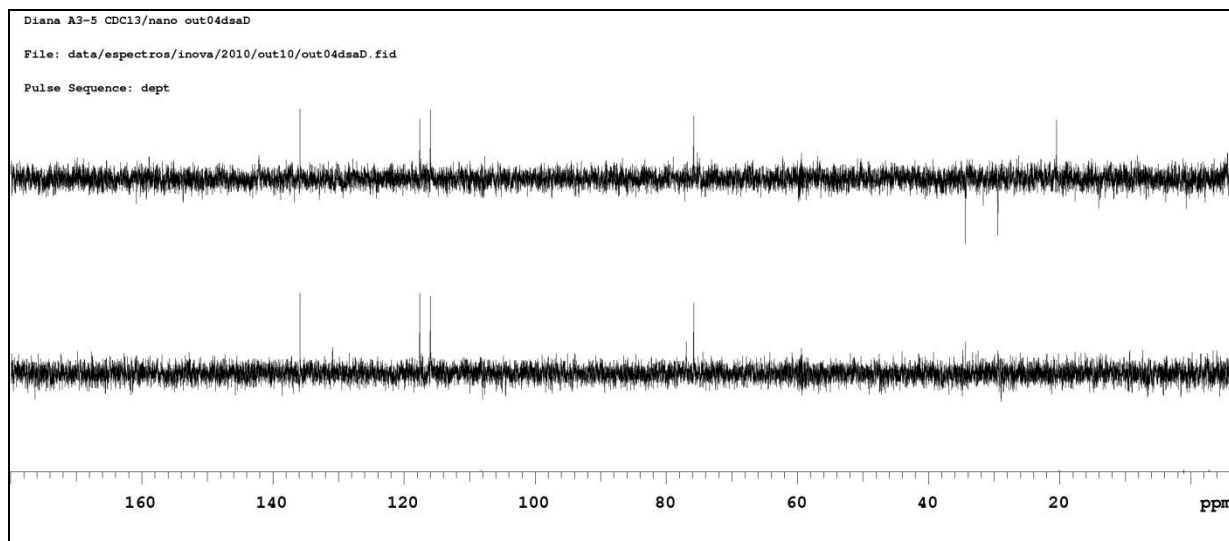
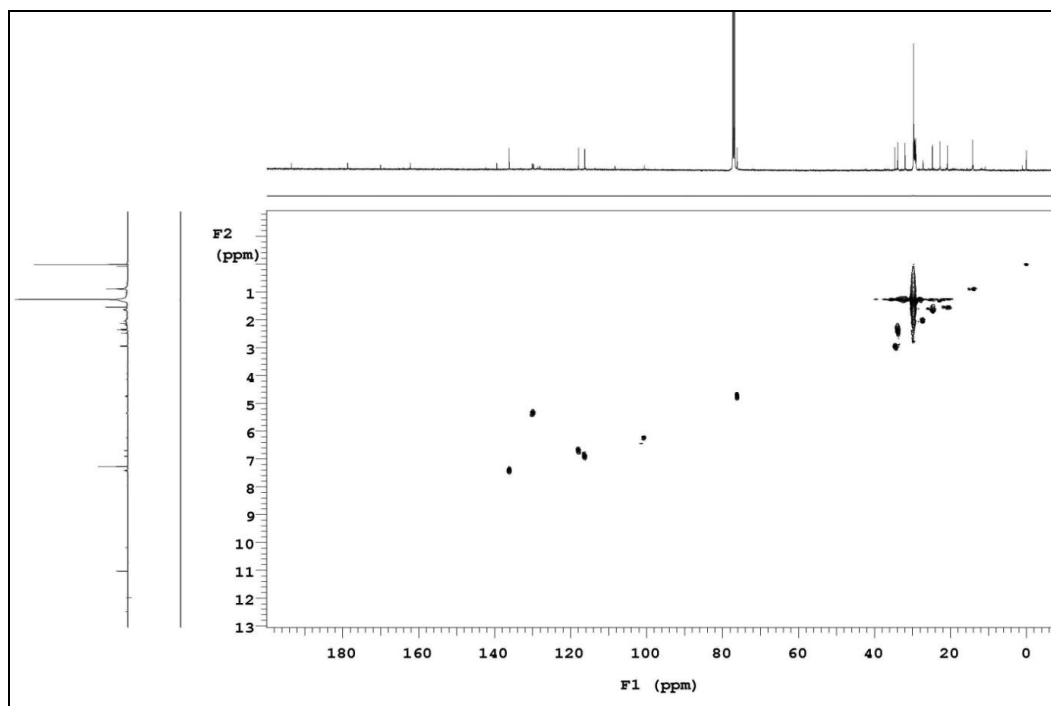
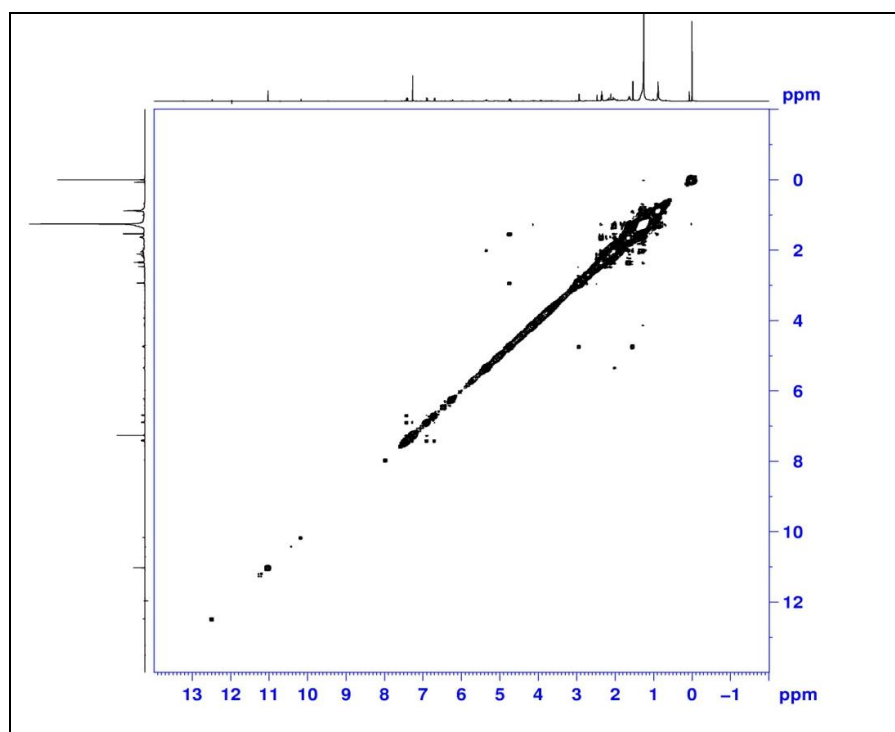


Figura 14A. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° e DEPT 90° (125,71 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) da meleína pura (nanosonda).



**Figura 15A.** Mapa de contornos de RMN 2D ( $\text{CDCl}_3$ ) de correlações  $^1\text{H}$  (499,88 MHz);  $^{13}\text{C}$  (125,71 MHz)  $^1J$  HSQC de meleína (impura).



**Figura 16A.** Mapa de contornos de RMN 2D ( $\text{CDCl}_3$ ) de correlações  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$   $^1J$  (gCOSY) (499,88 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) da meleína (impura).

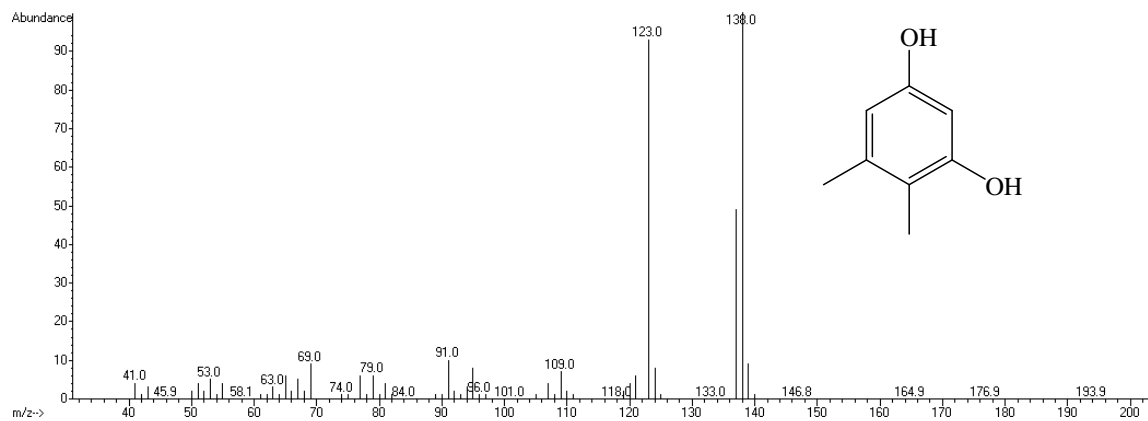


Figura 17A. Espectro de massas (IE 70 eV) de 4,5-dimetil-resorcinol.

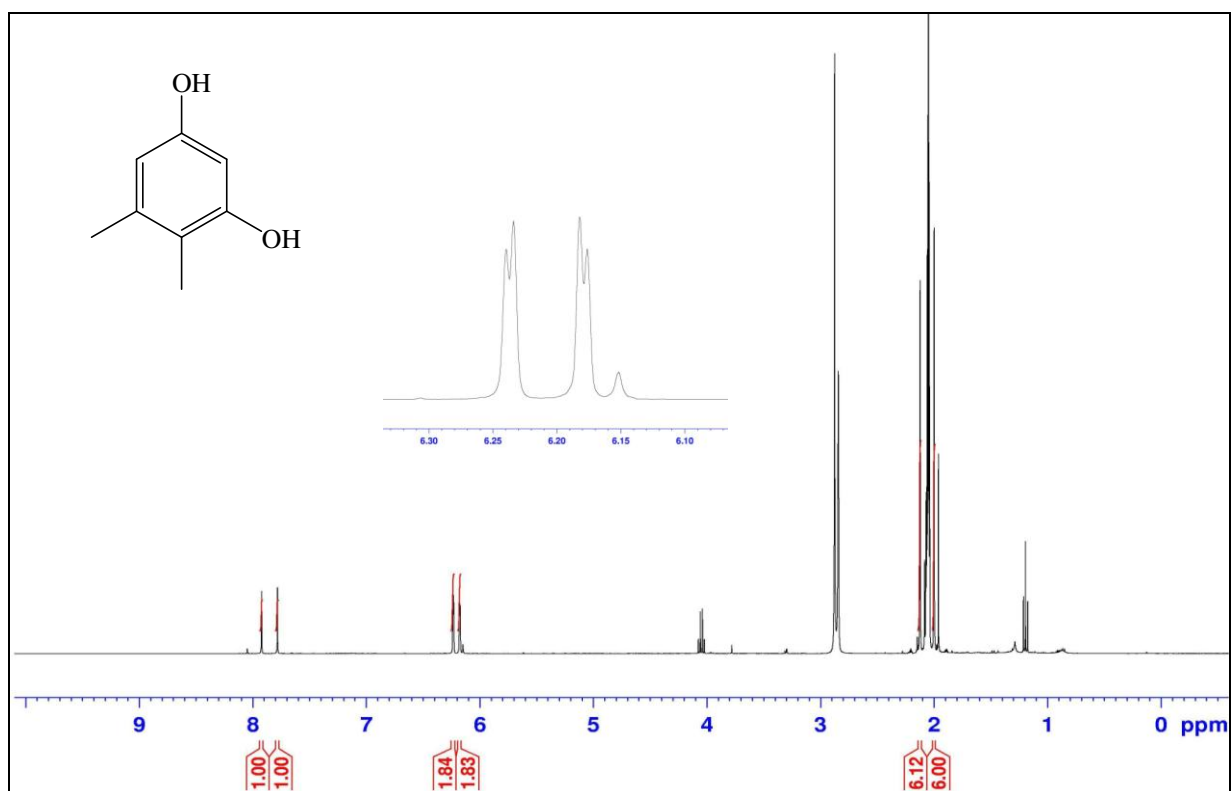


Figura 18A. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (499,88 MHz, acetona-d<sub>6</sub>) de 4,5-dimetil-resorcinol puro.

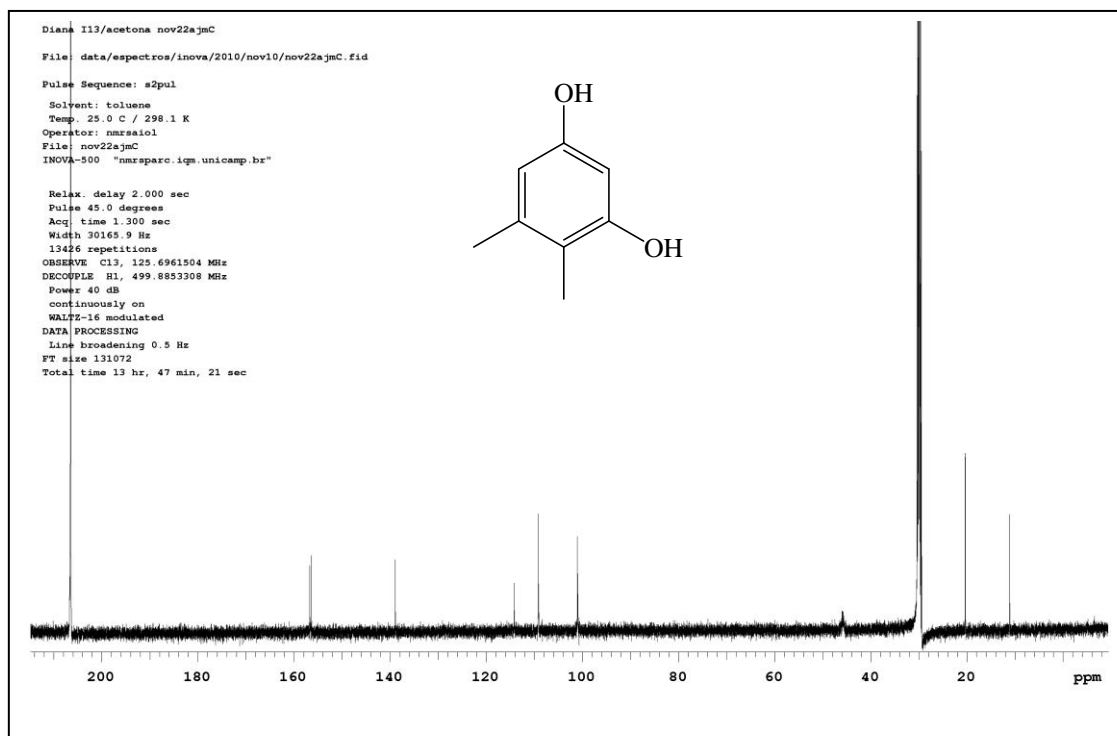


Figura 19A. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (125,71 MHz, acetona-d<sub>6</sub>) do 4,5-dimetil-resorcinol puro (nanosonda).

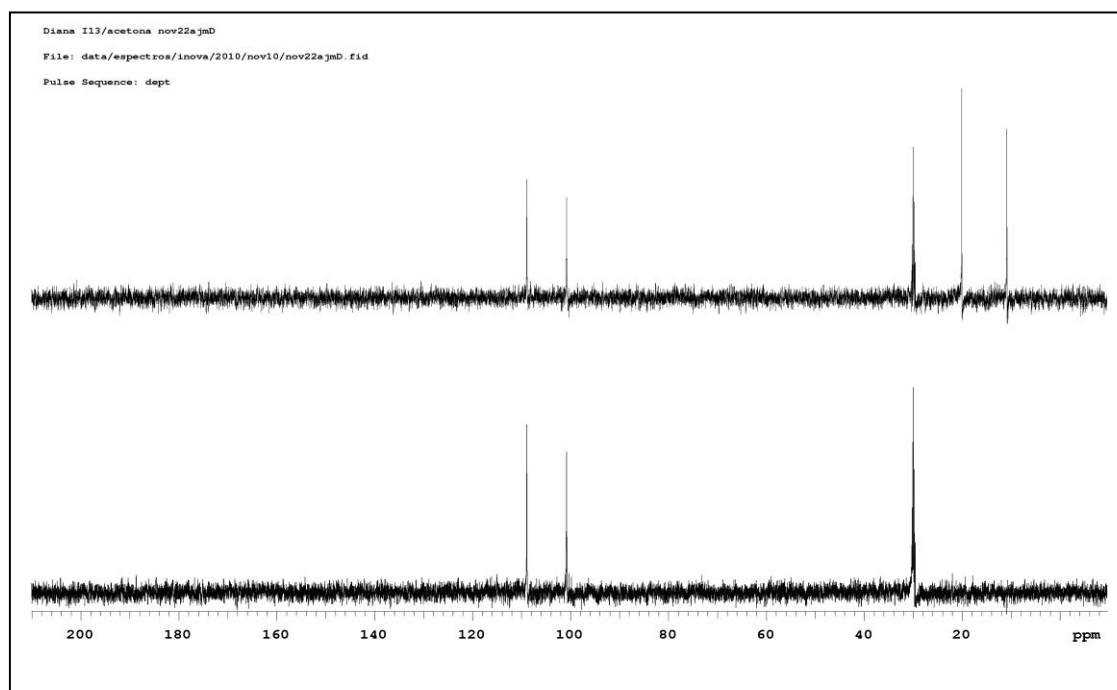
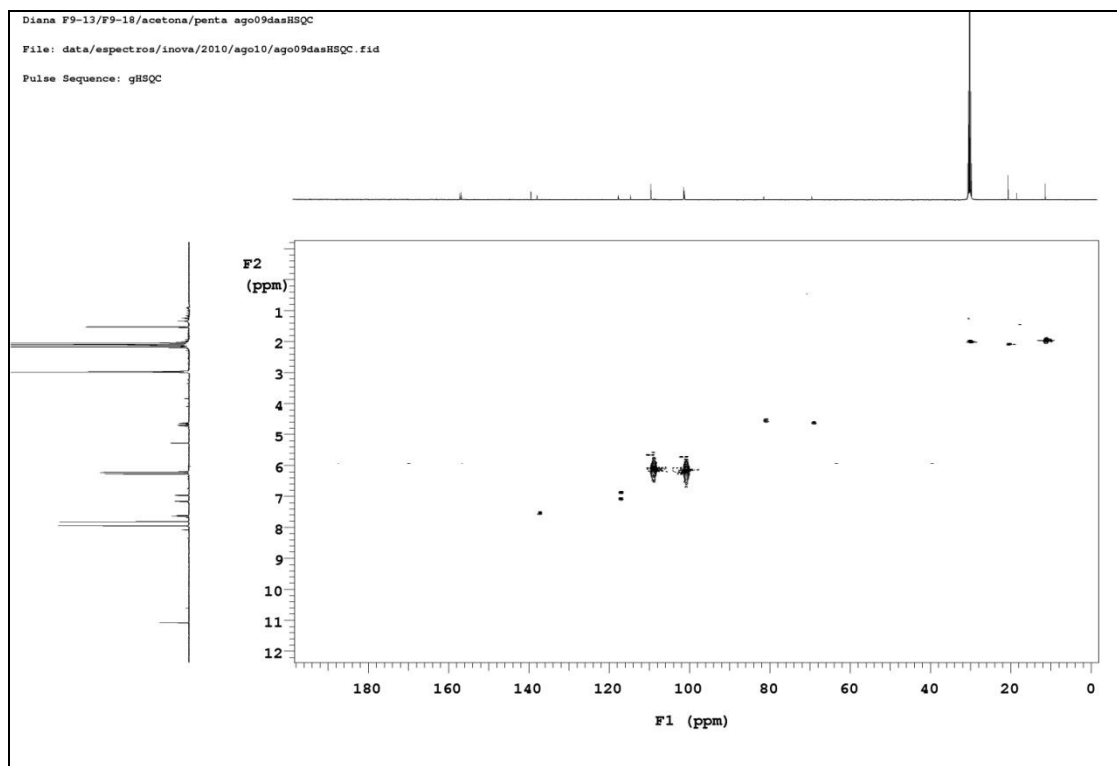
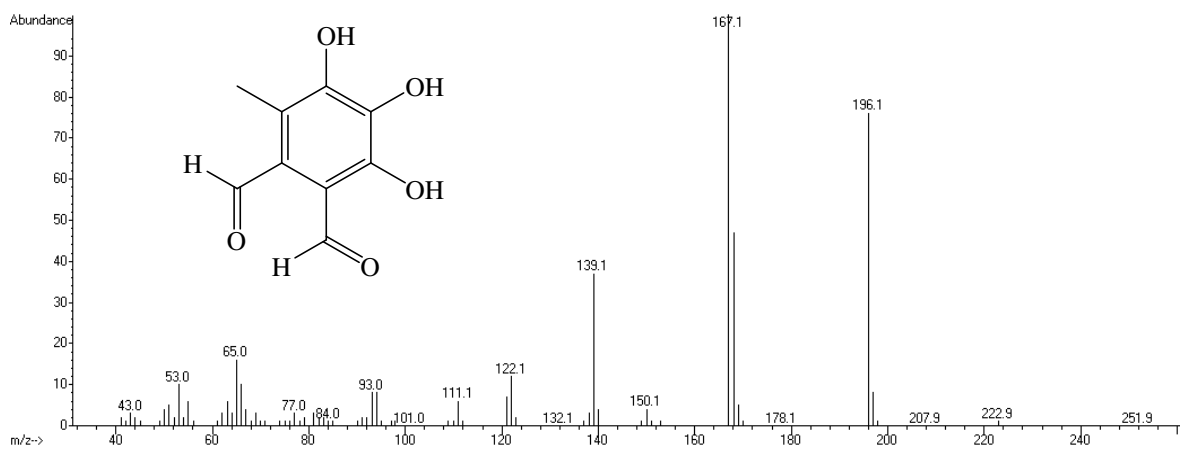


Figura 20A. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C DEPT 135° e DEPT 90° (125,71 MHz, acetona-d<sub>6</sub>) 4,5-dimetil-resorcinol puro (nanosonda).



**Figura 21A.** Mapa de contornos de RMN 2D (acetona- $d_6$ ) de correlações  $^1\text{H}$  (499,88 MHz);  $^{13}\text{C}$  (125,71 MHz)  $^1J$  HSQC do 4,5-dimetil-resorcinol impuro.



**Figura 22A.** Espectro de massas (IE 70 eV) da flavipina.

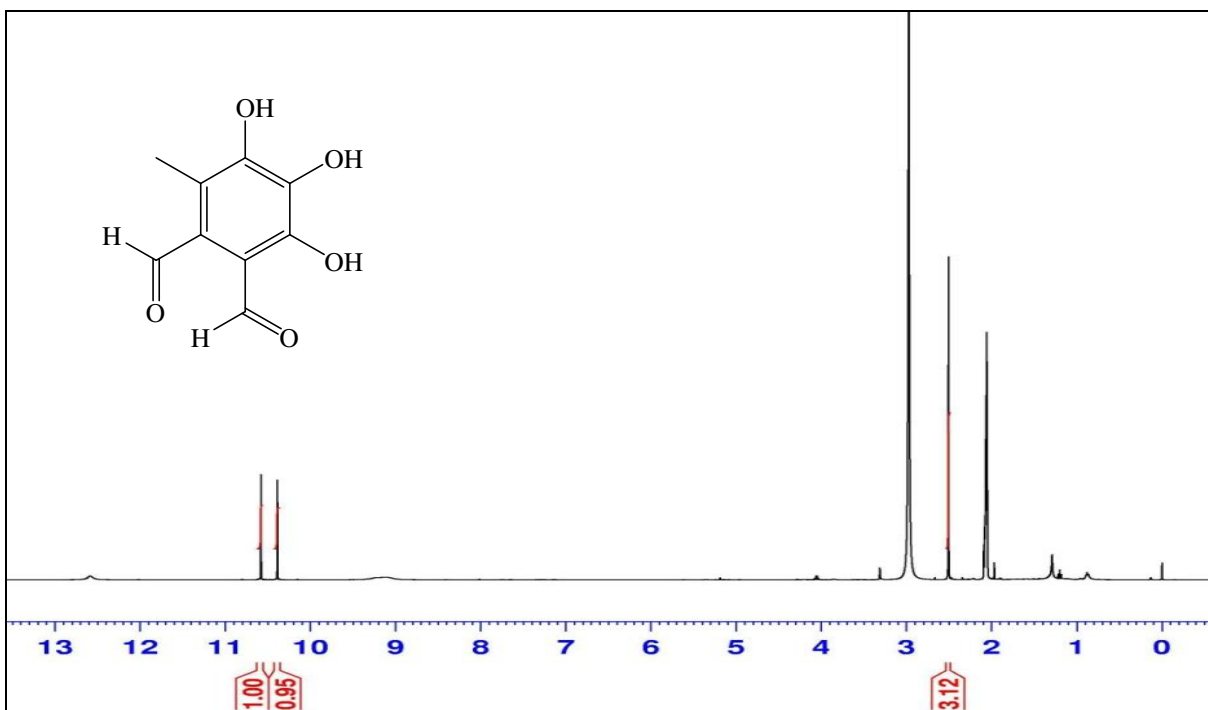


Figura 23A. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz, acetona- $\text{d}_6$ ) da flavipina.

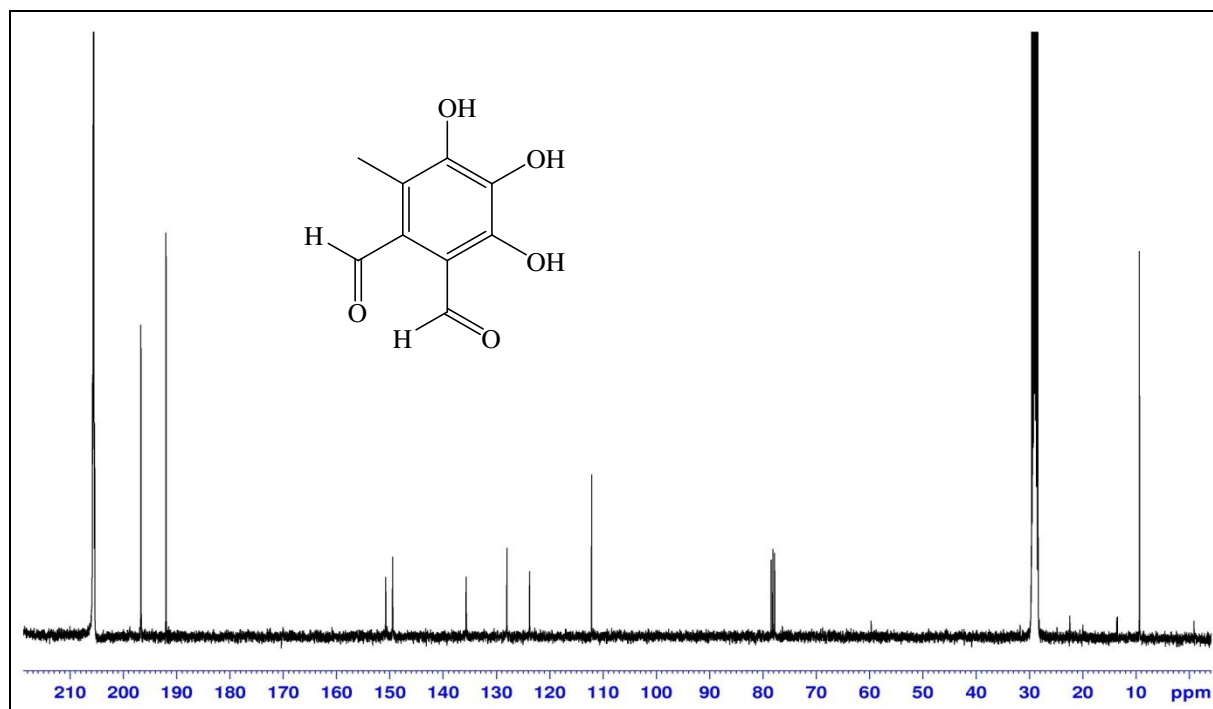
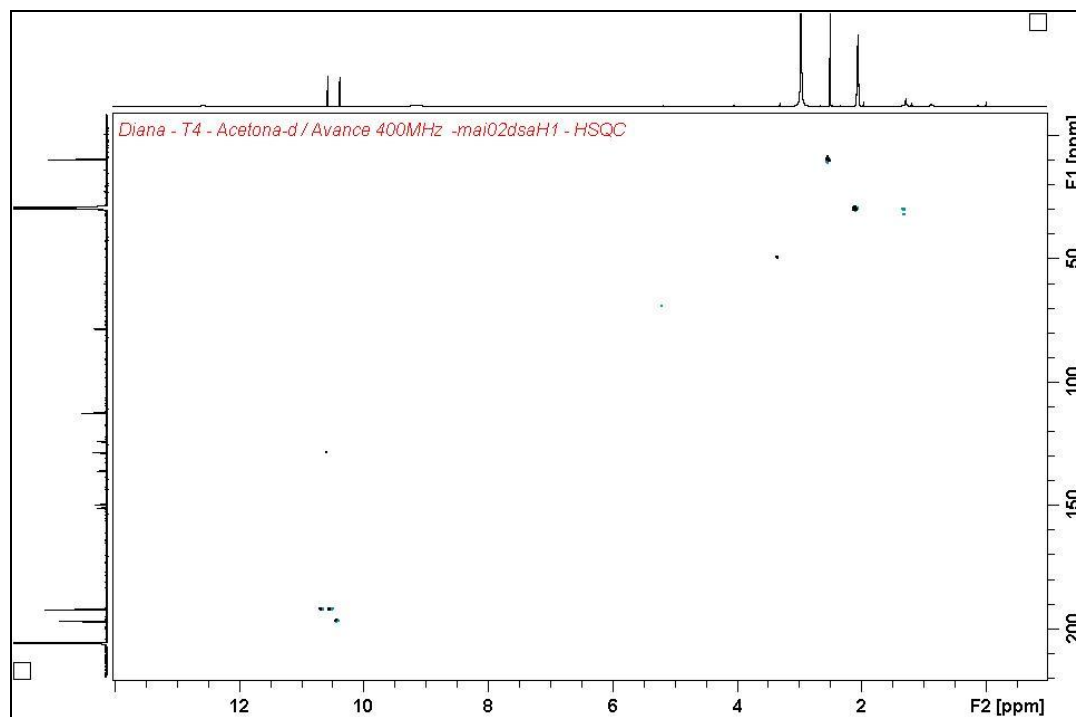
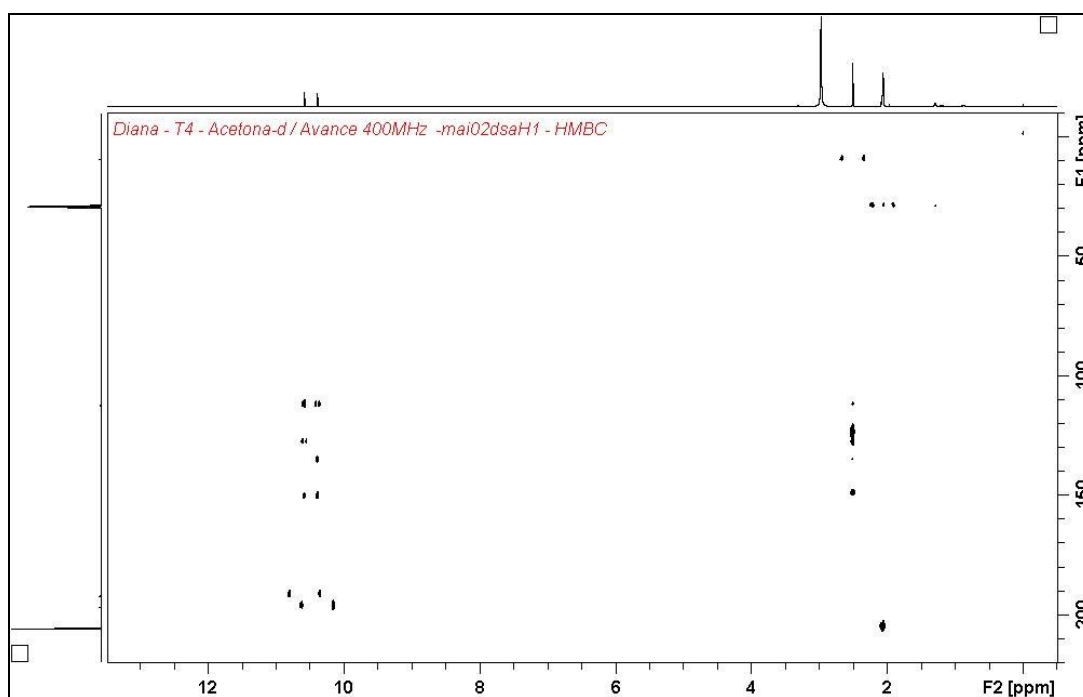


Figura 24A. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz, acetona- $\text{d}_6$ ) da flavipina.

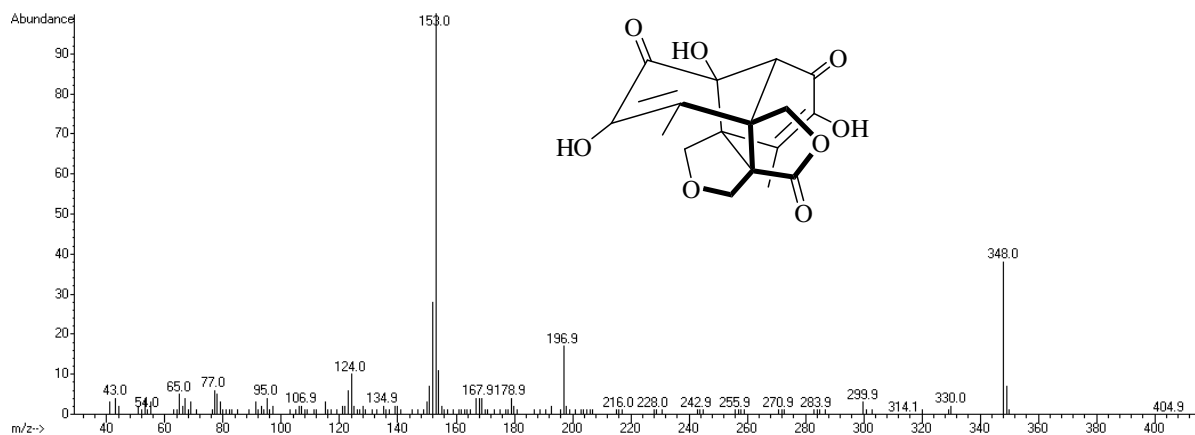


**Figura 25A.** Mapa de contornos de RMN 2D (acetona- $d_6$ ) de correlações  $^1\text{H}$  (400,13 MHz);  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz)  $^1J$  HSQC da flavipina.

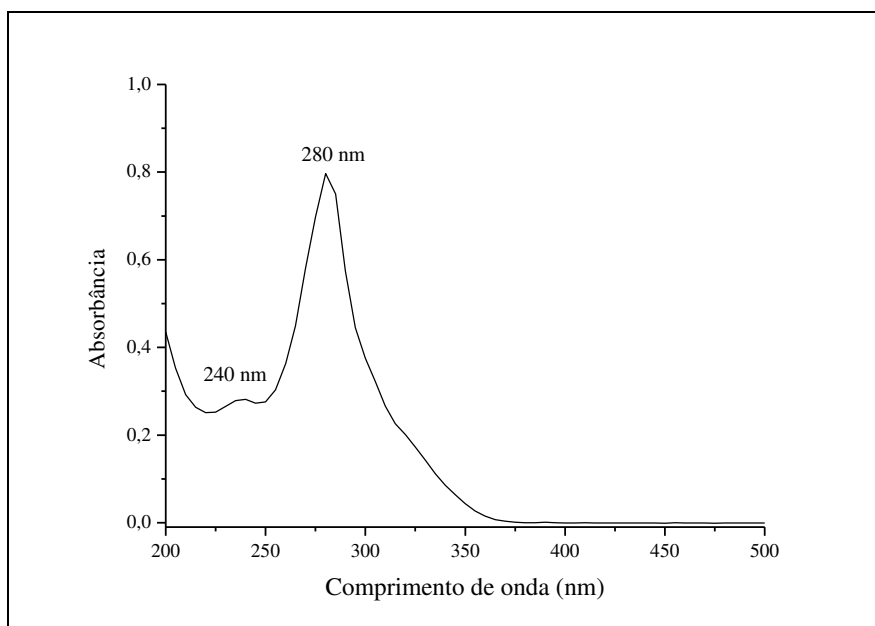


**Figura 26A.** Mapa de contornos de RMN 2D (DMSO- $d_6$ ) de correlações  $^1\text{H}$  (400,13 MHz);  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz) HMBC da epicolactona.





**Figura 27A.** Espectro de massas (IE 70 eV) da epicolactona.



**Figura 28A.** Espectro na região de ultravioleta-visível da epicolactona.

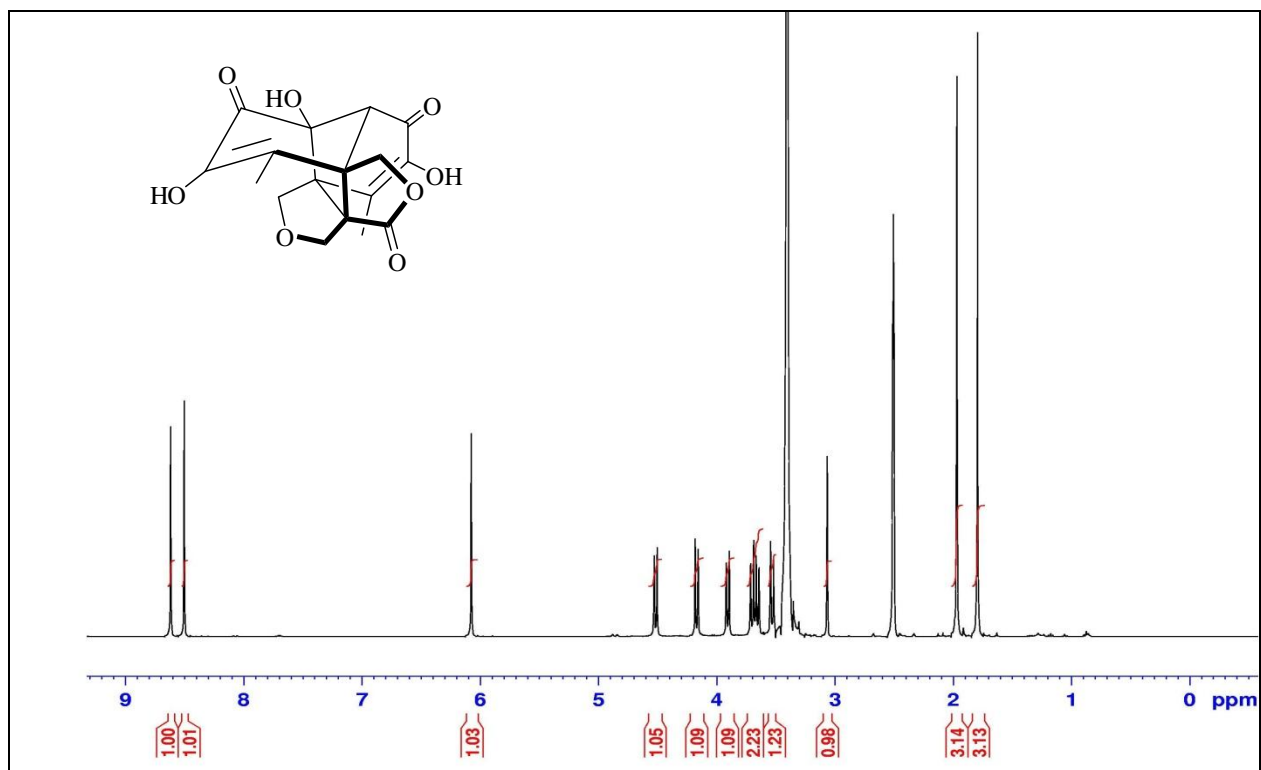


Figura 29A. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) da epicolactona.

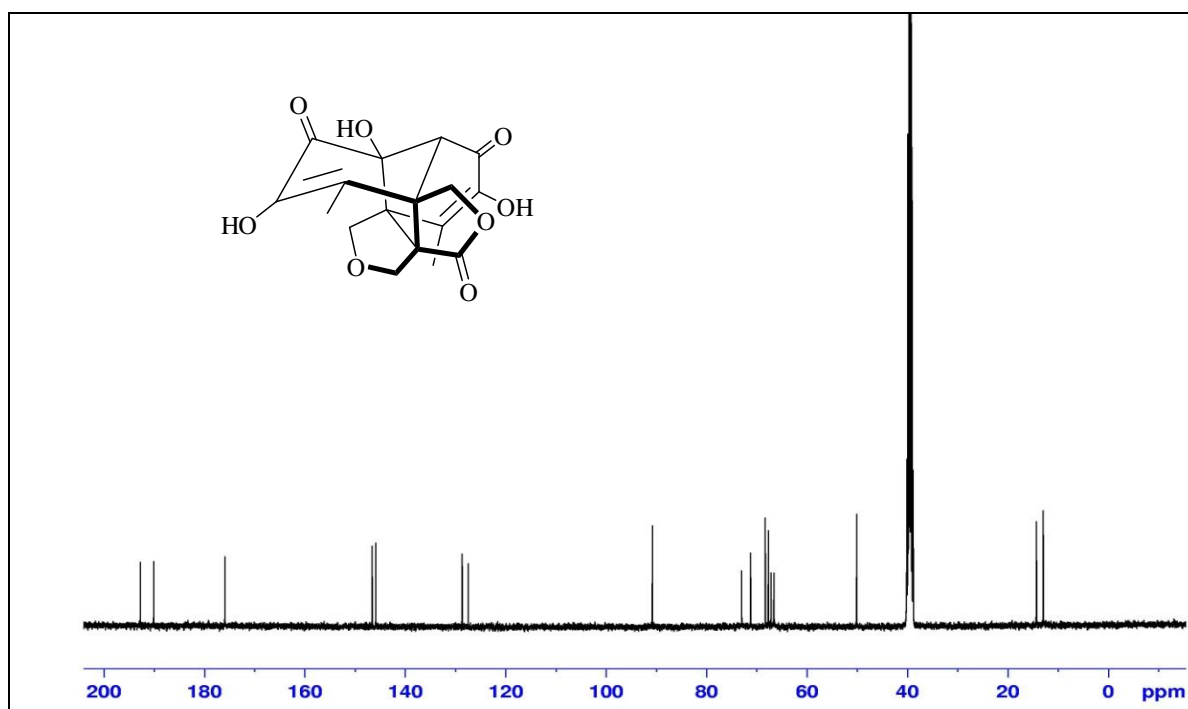


Figura 30A. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) da epicolactona.

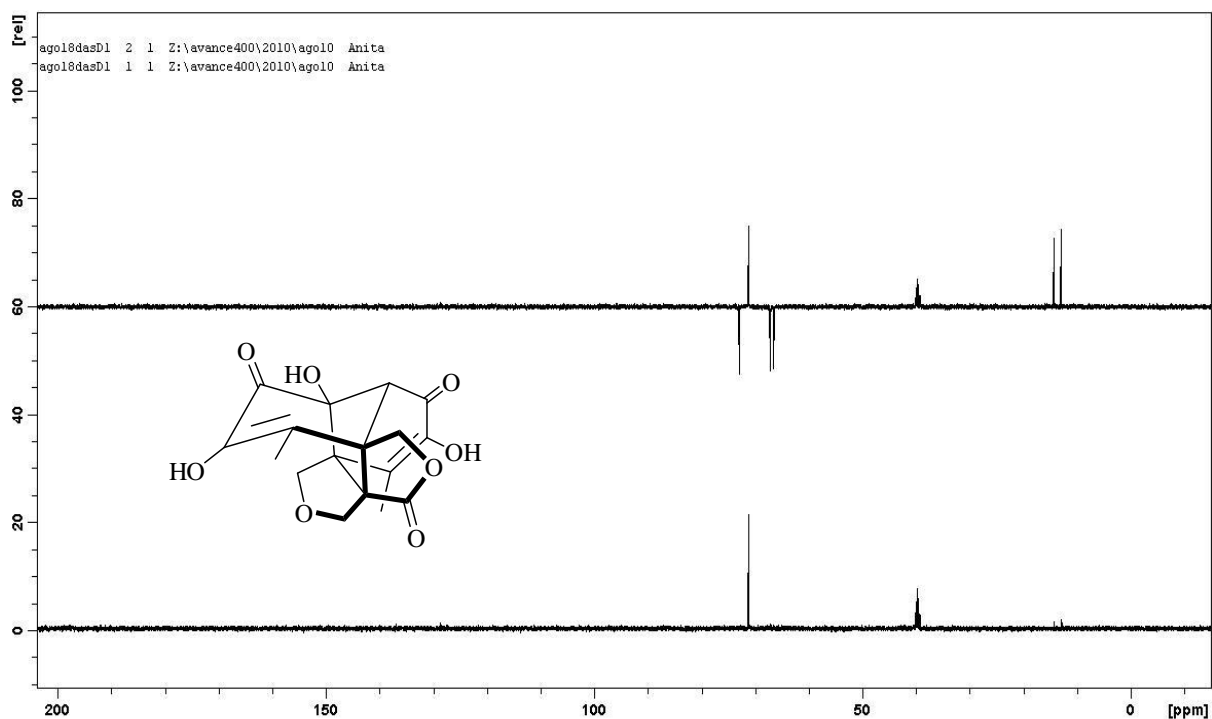


Figura 31A. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° e DEPT 90° (100,61 MHz, DMSO- $d_6$ ) da epicolactona.

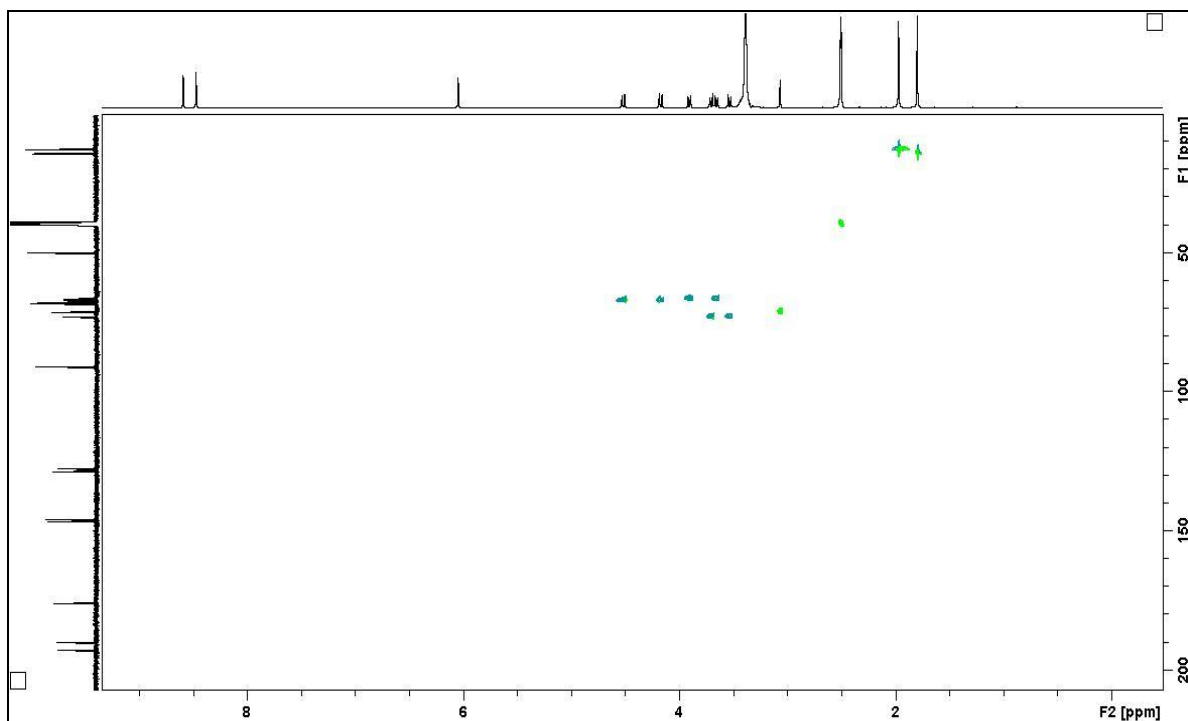
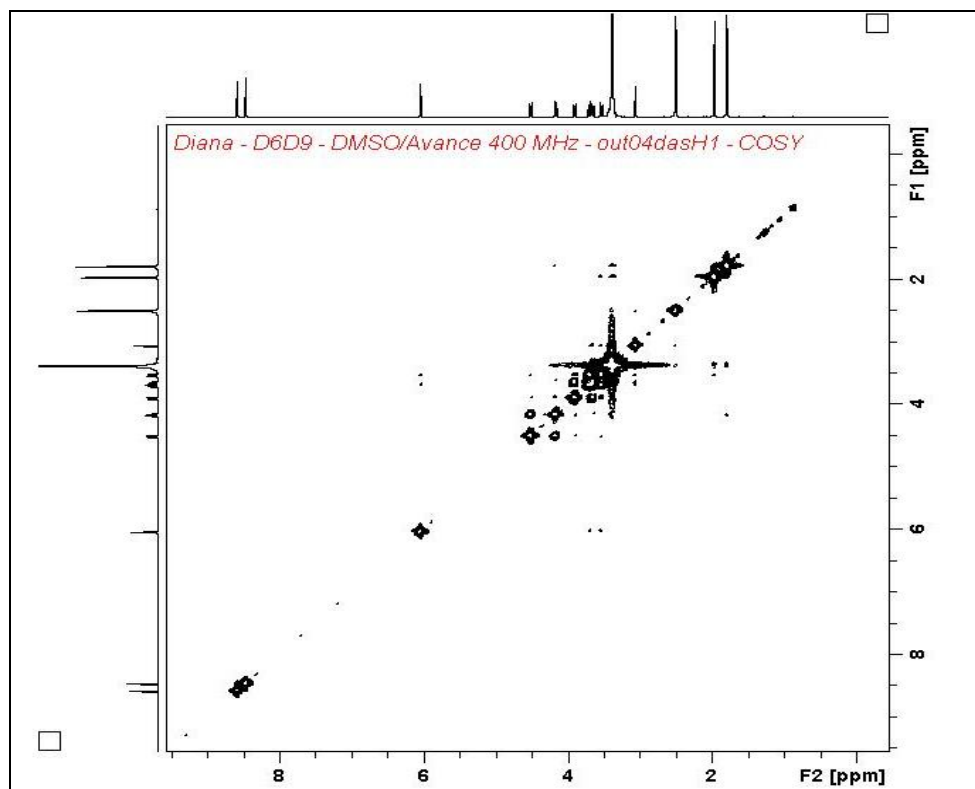
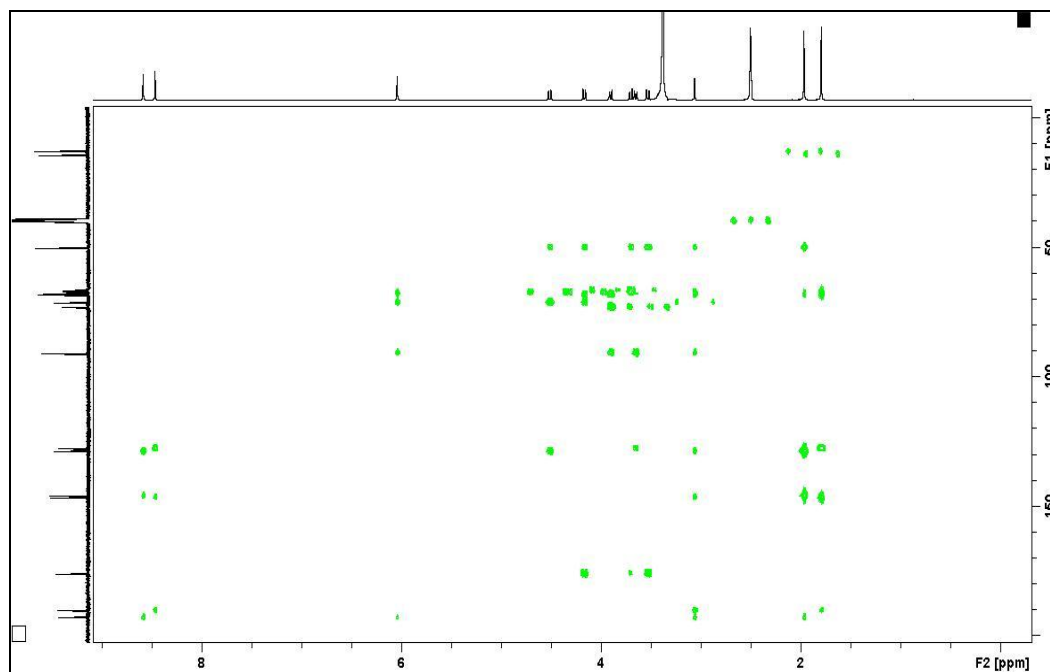


Figura 32A. Mapa de contornos de RMN 2D (DMSO- $d_6$ ) de correlações  $^1\text{H}$  (400,13 MHz);  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz)  $^1J$  HSQC da epicolactona.



**Figura 33A.** Mapa de contornos de RMN 2D (DMSO- $d_6$ ) de correlações  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$   $^1J$  (gCOSY) (400,13 MHz) da epicolactona.



**Figura 34A.** Mapa de contornos de RMN 2D (DMSO- $d_6$ ) de correlações  $^1\text{H}$  (400,13 MHz);  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz) HMBC da epicolactona.

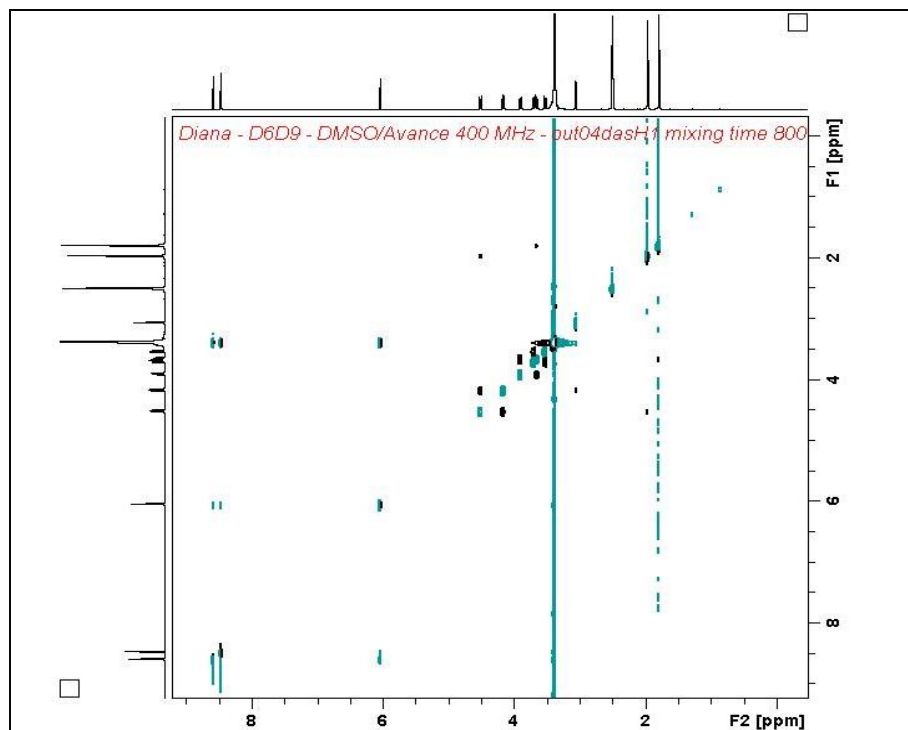


Figura 35A. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (NOESY 2D) (499,88 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) da epicolactona.

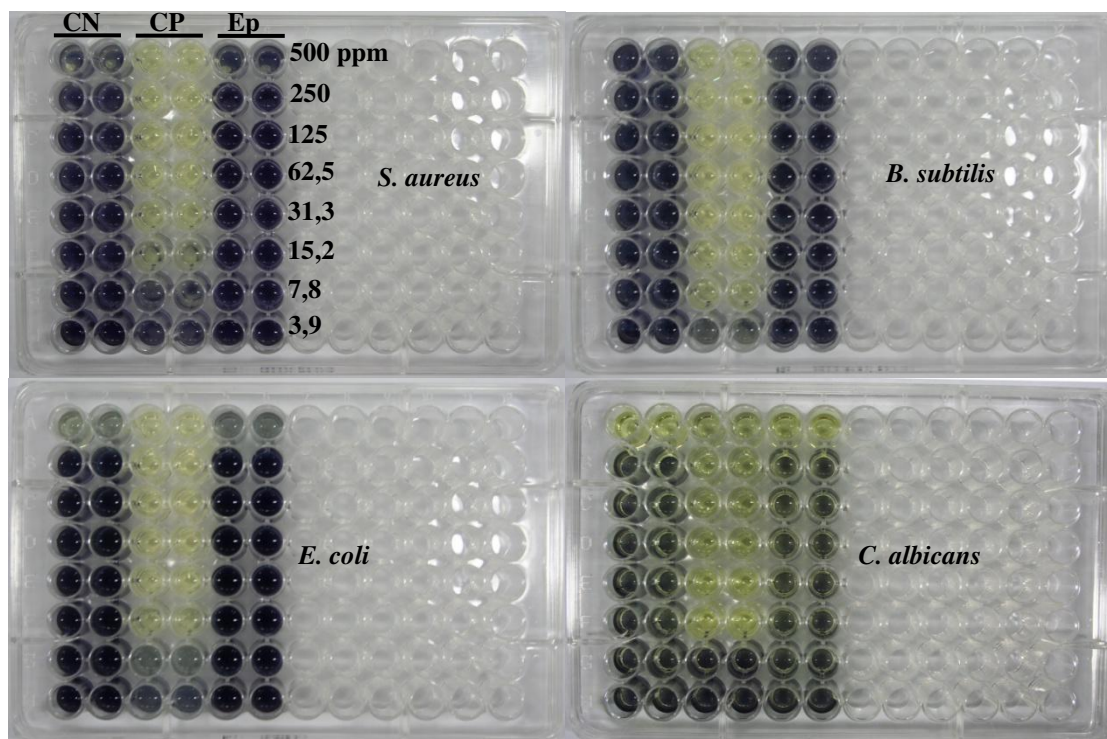


Figura 36A. Determinação da concentração mínima inibitória da epicolactona (Ep) contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *C. albicans*. CP: controle positivo. CN: controle negativo

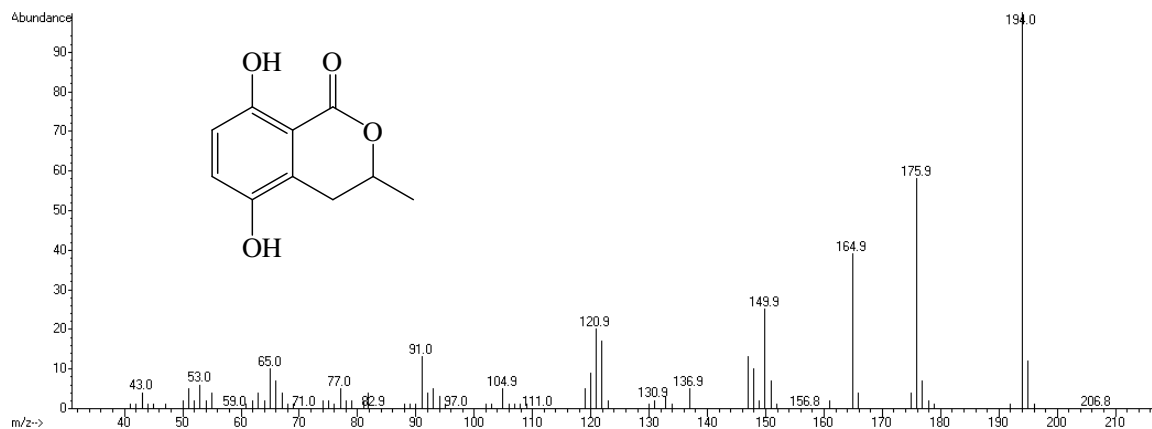


Figura 37A. Espectro de massas (IE 70 eV) da 5-hidroxi-meleína.

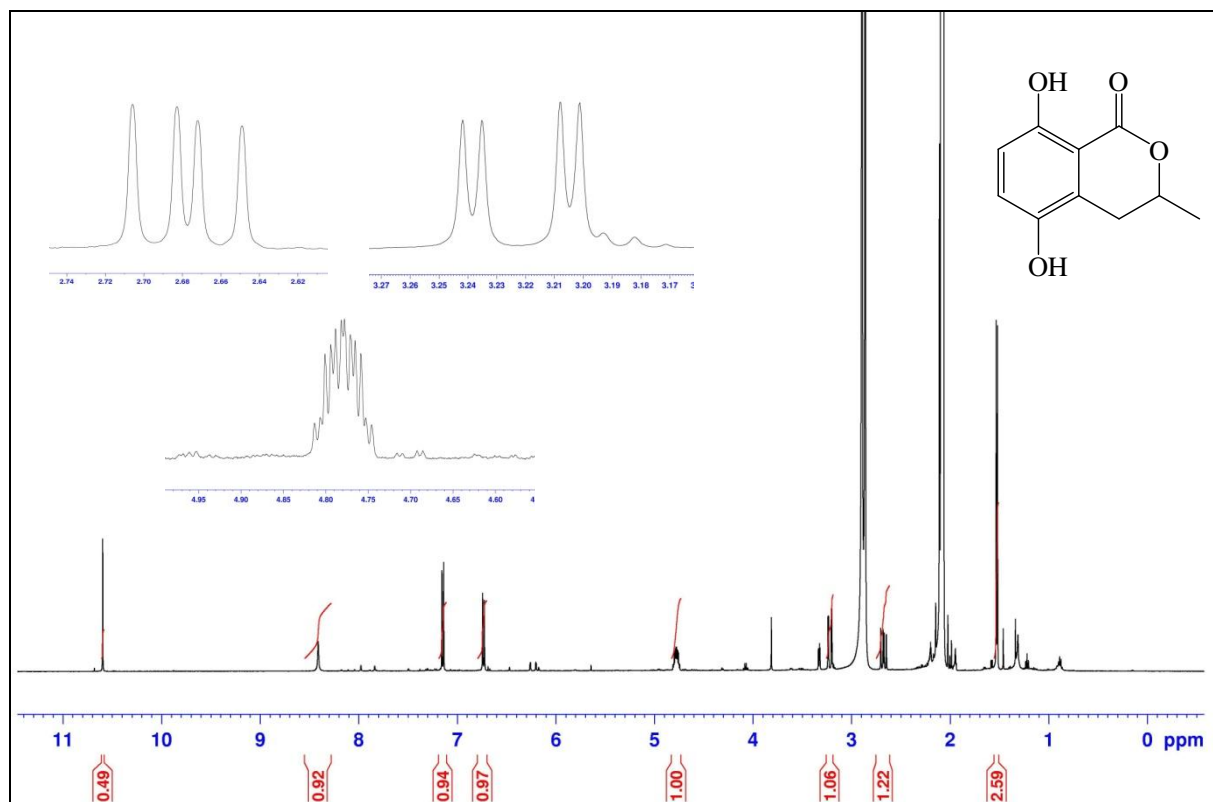


Figura 38A. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400,13 MHz, acetona- $d_6$ ) da 5-hidroxi-meleína.

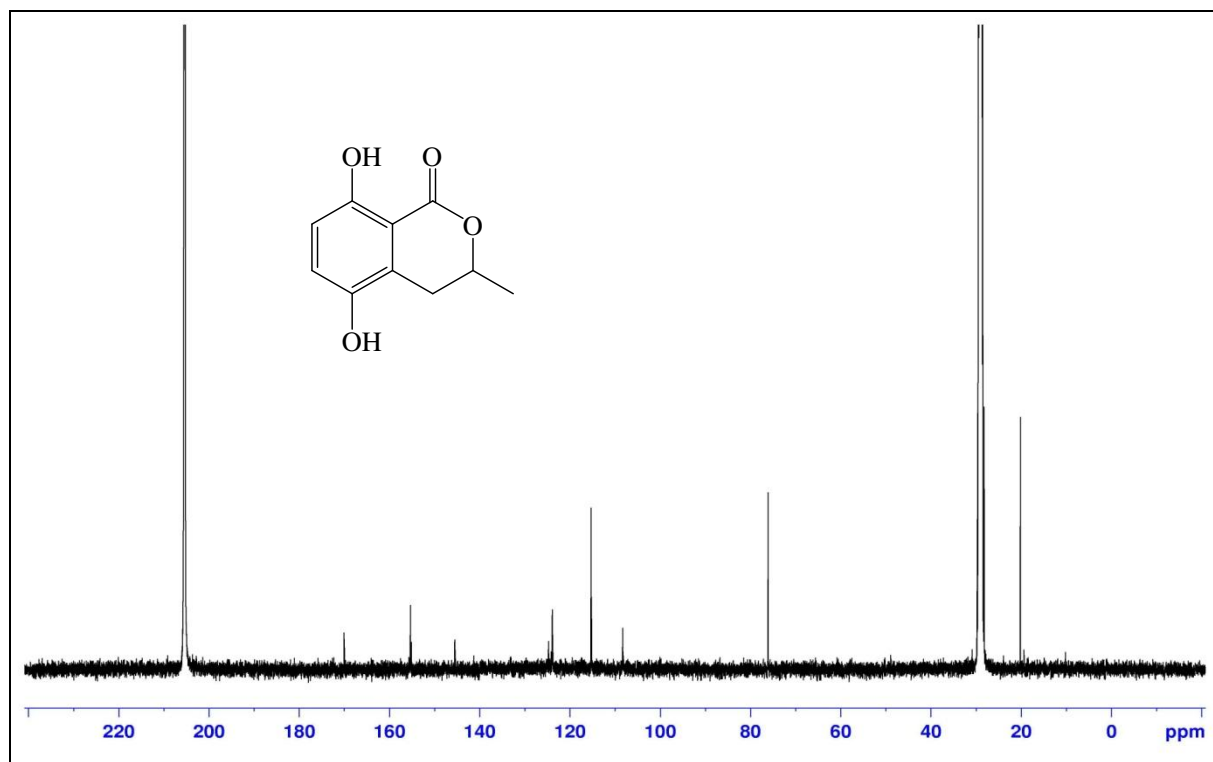


Figura 39A. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz, acetona- $d_6$ ) da 5-hidroxi-meleína.

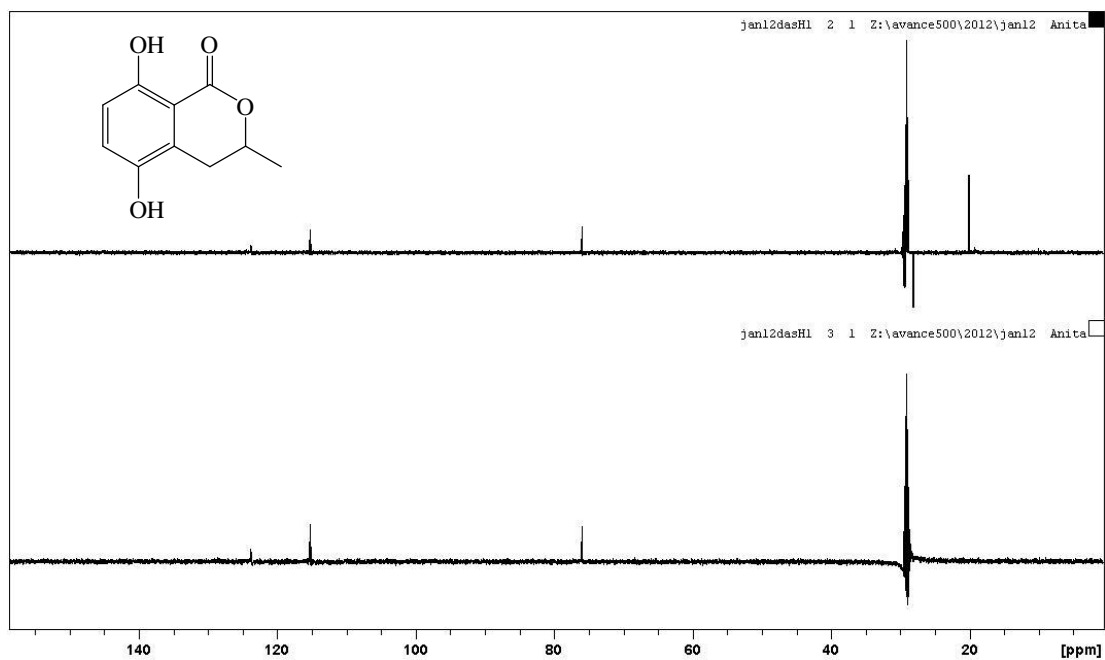
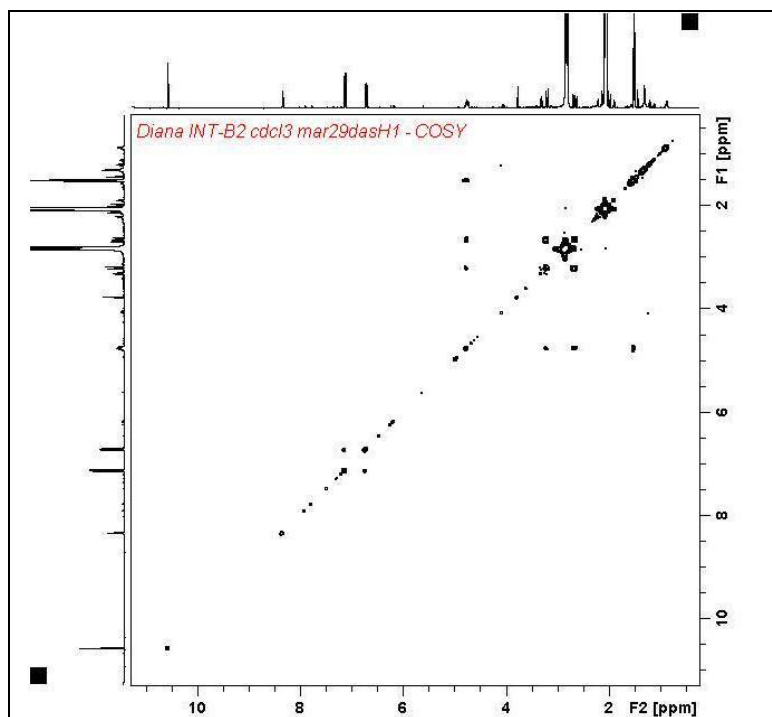
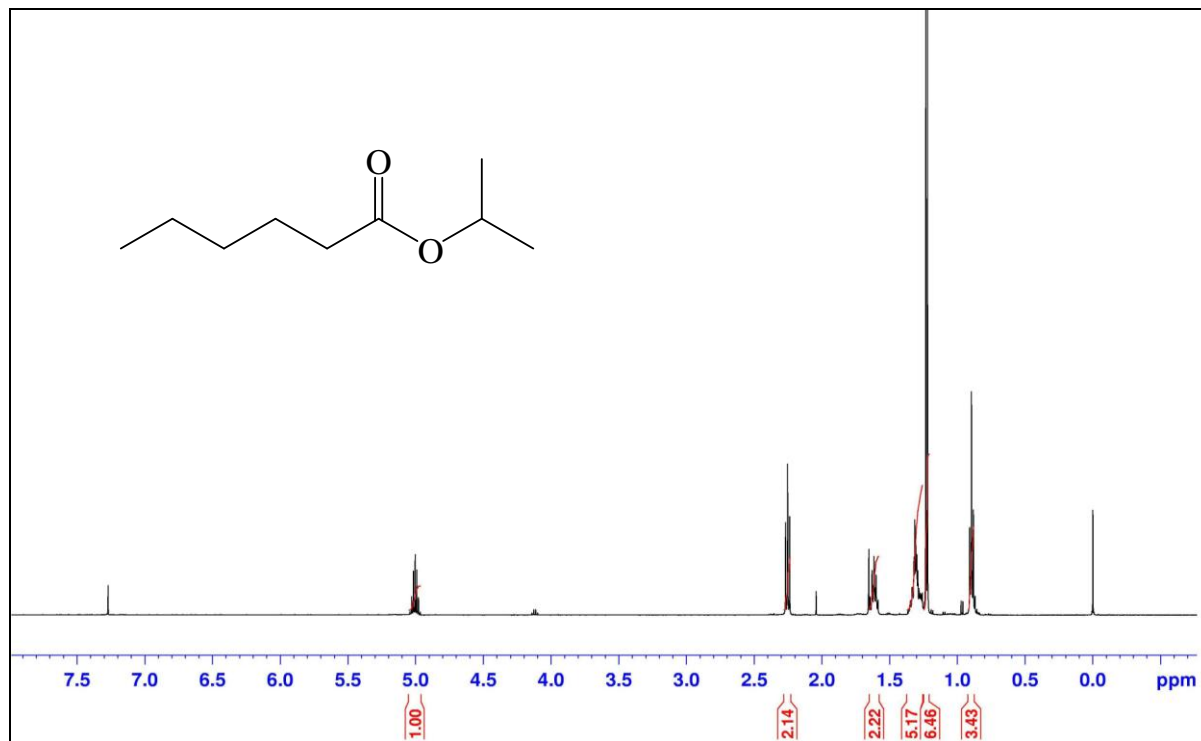


Figura 40A. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° e DEPT 90° (100,61 MHz, acetona- $d_6$ ) da 5-hidroxi-meleína.



**Figura 41A.** Mapa de contornos de RMN 2D (acetona-d<sub>6</sub>) de correlações <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H <sup>1</sup>J (gCOSY) (400,13 MHz) da 5-hidroxi-meleína.



**Figura 42A.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) do hexanoato de isopropila.



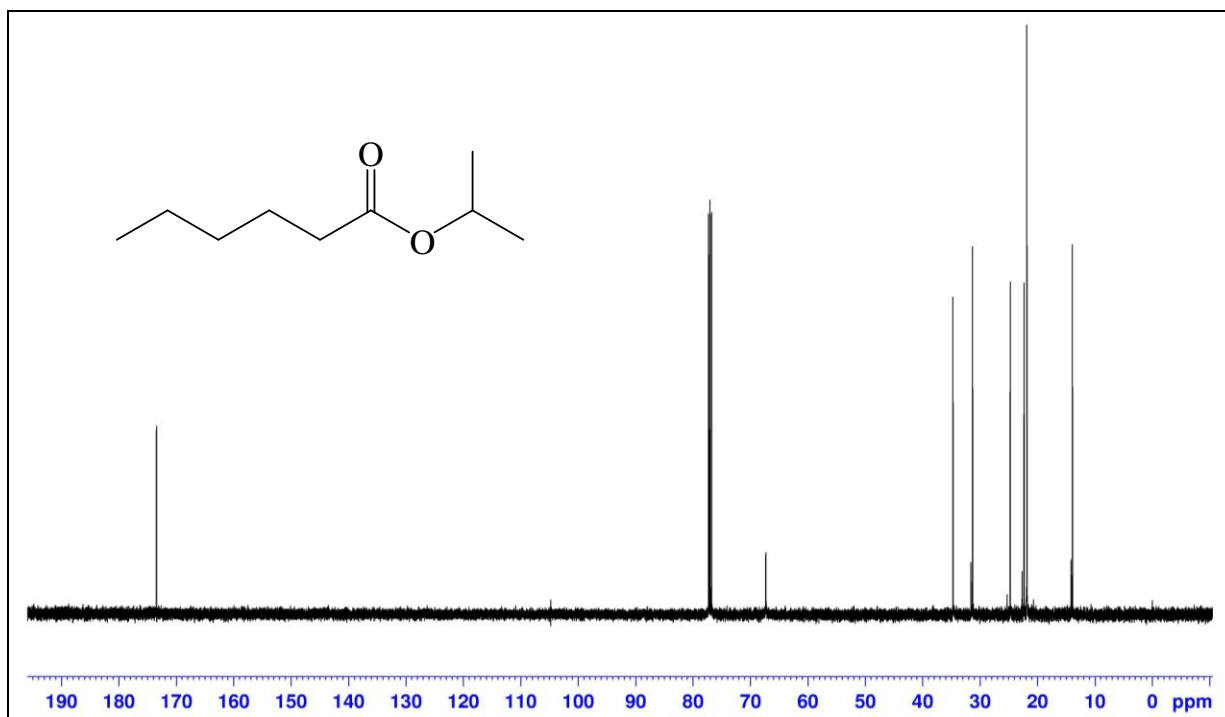


Figura 43A. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125,71 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) do hexanoato de isopropila.

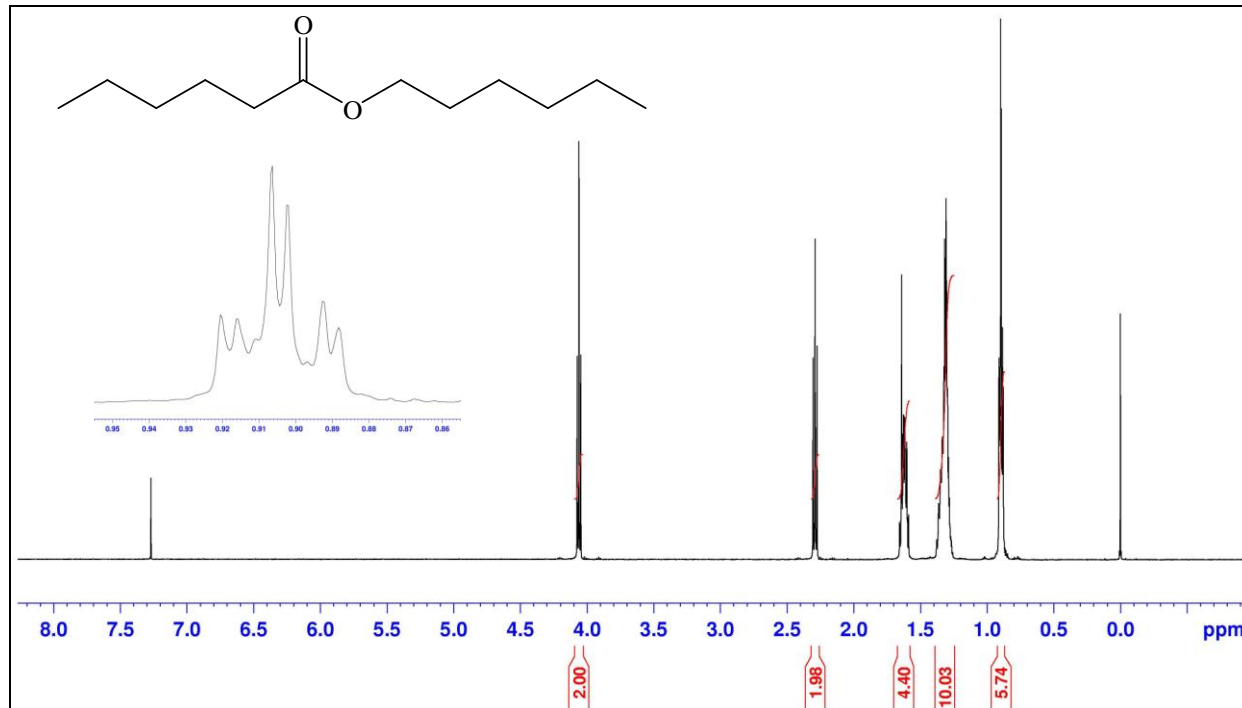
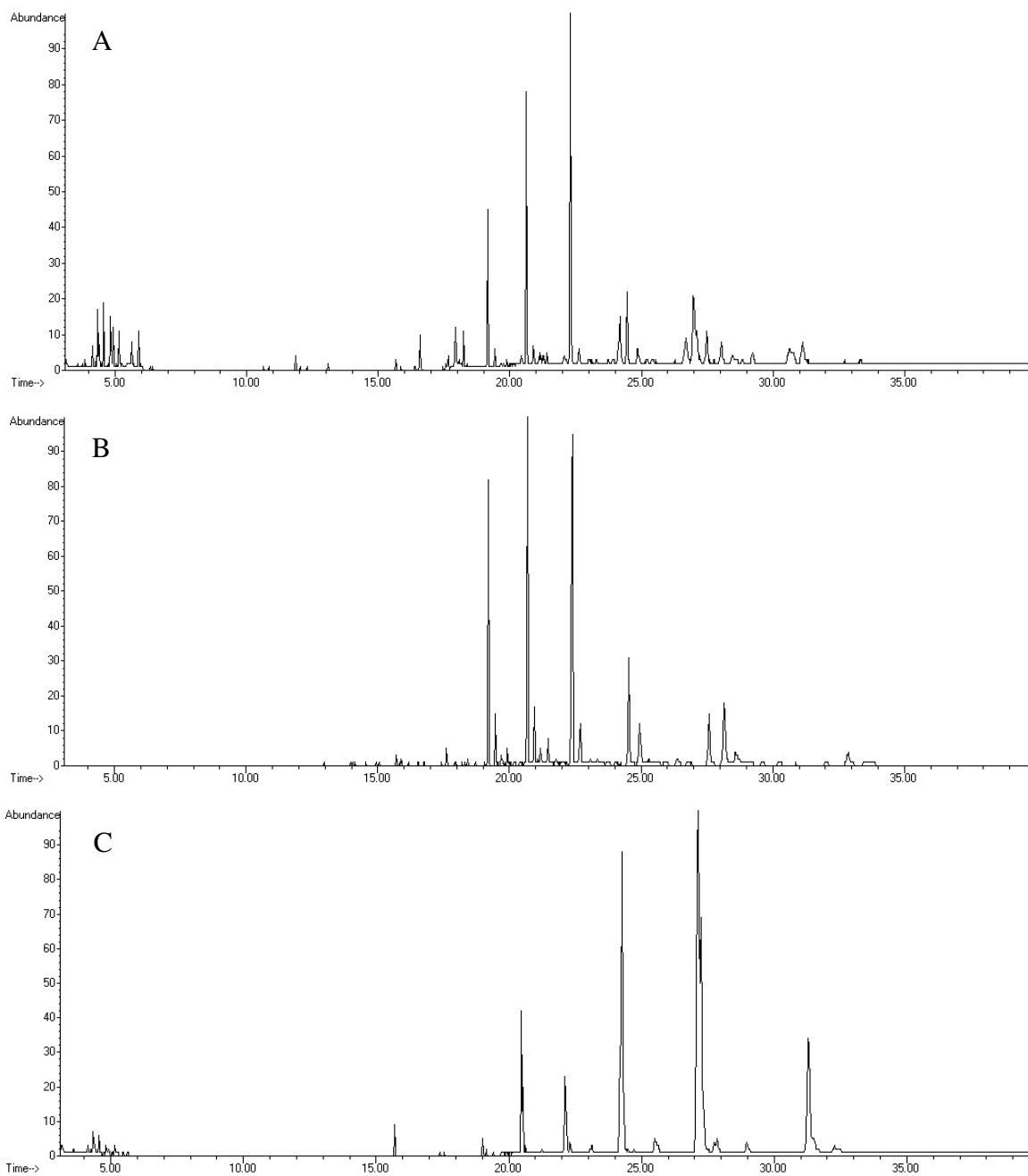


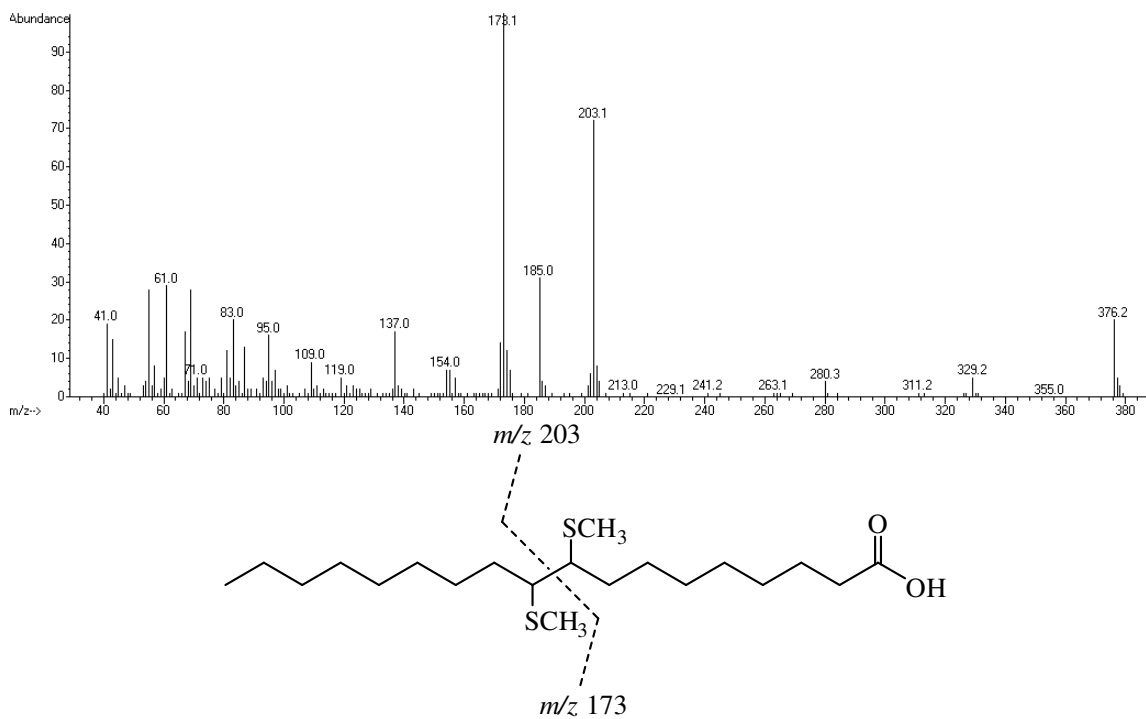
Figura 44A. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (499,88 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) do hexanoato de hexila.



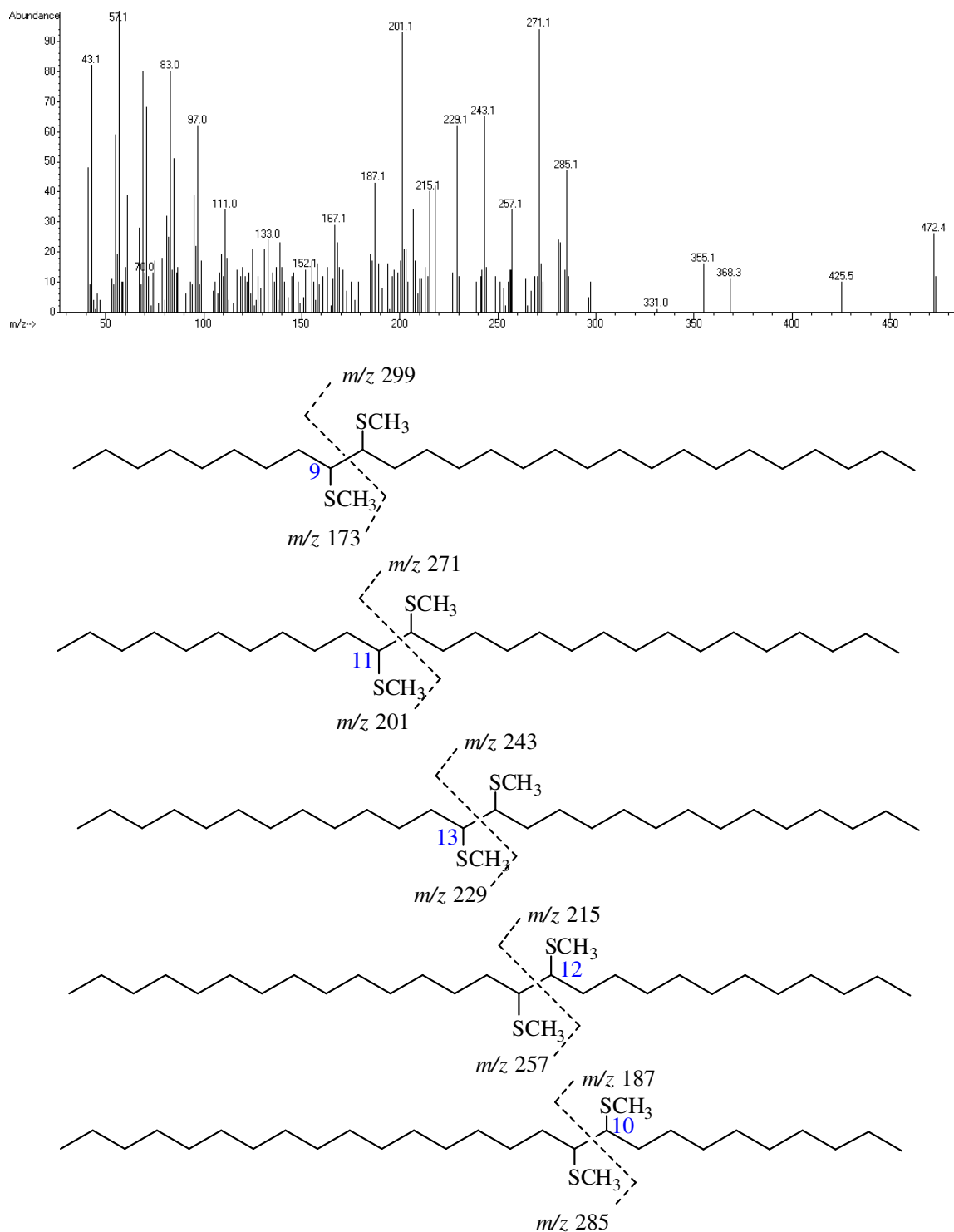
**Figura 45A.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125,71 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS) do hexanoato de hexila.



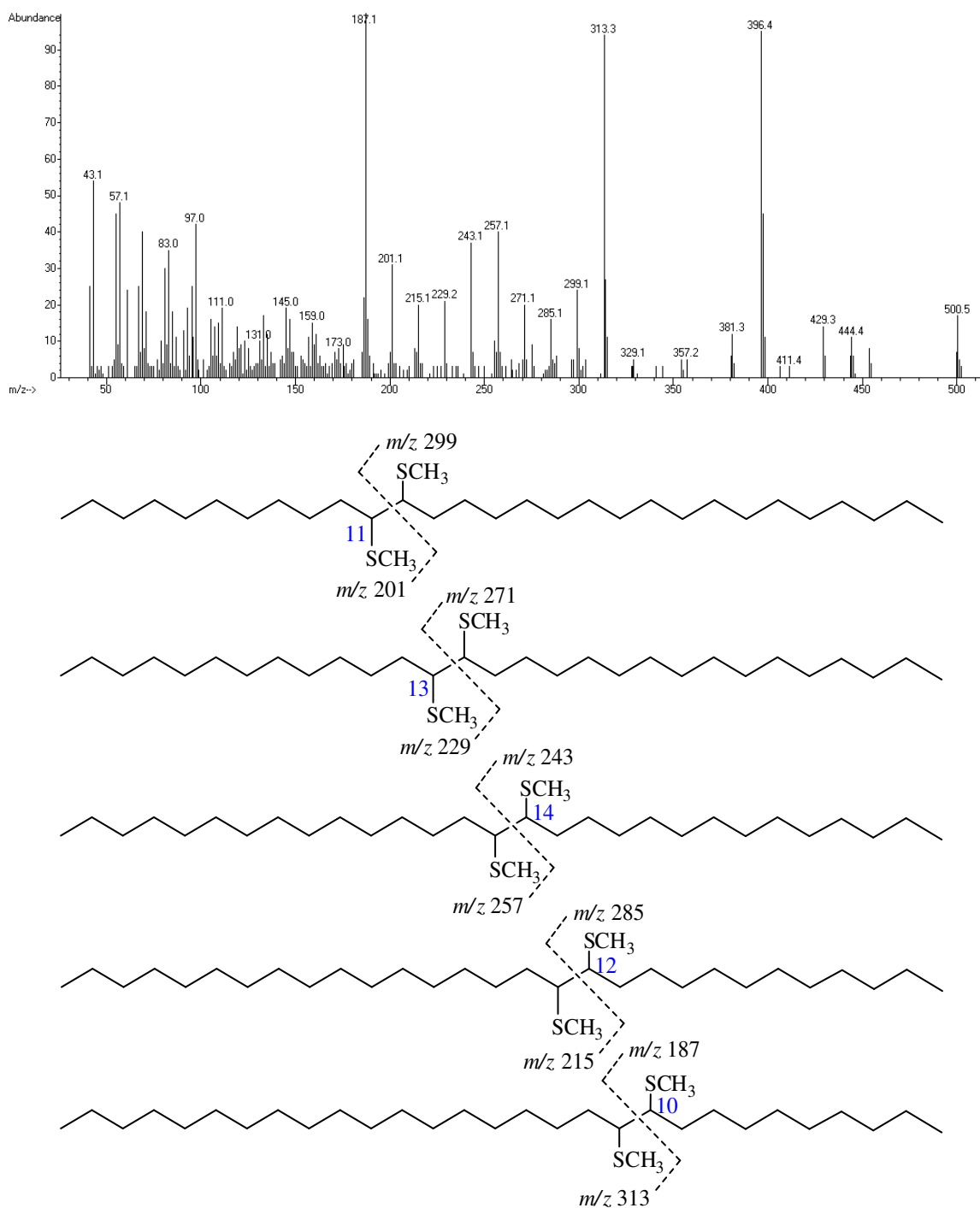
**Figura 46A.** A. Cromatograma de íons totais (IE, 70 eV) do extrato de lipídios cuticulares da rainha fisogástrica de *T. angustula*. B. Fração da mistura de alcanos e monometil-alcanos. C. Fração da mistura de alcenos.



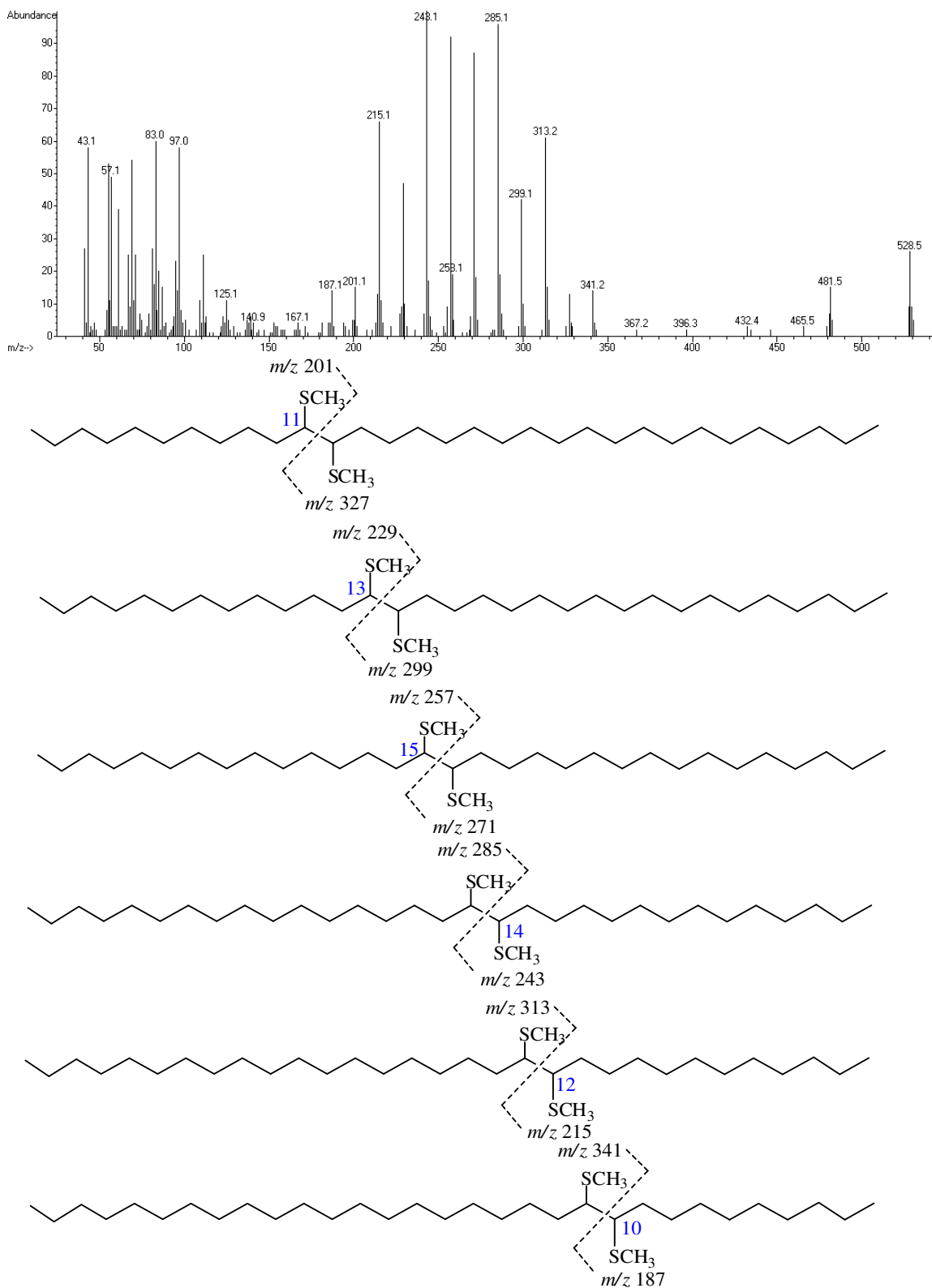
**Figura 47A.** Espectro de massas e fragmentação do derivado DMDS do ácido 9-oléico.



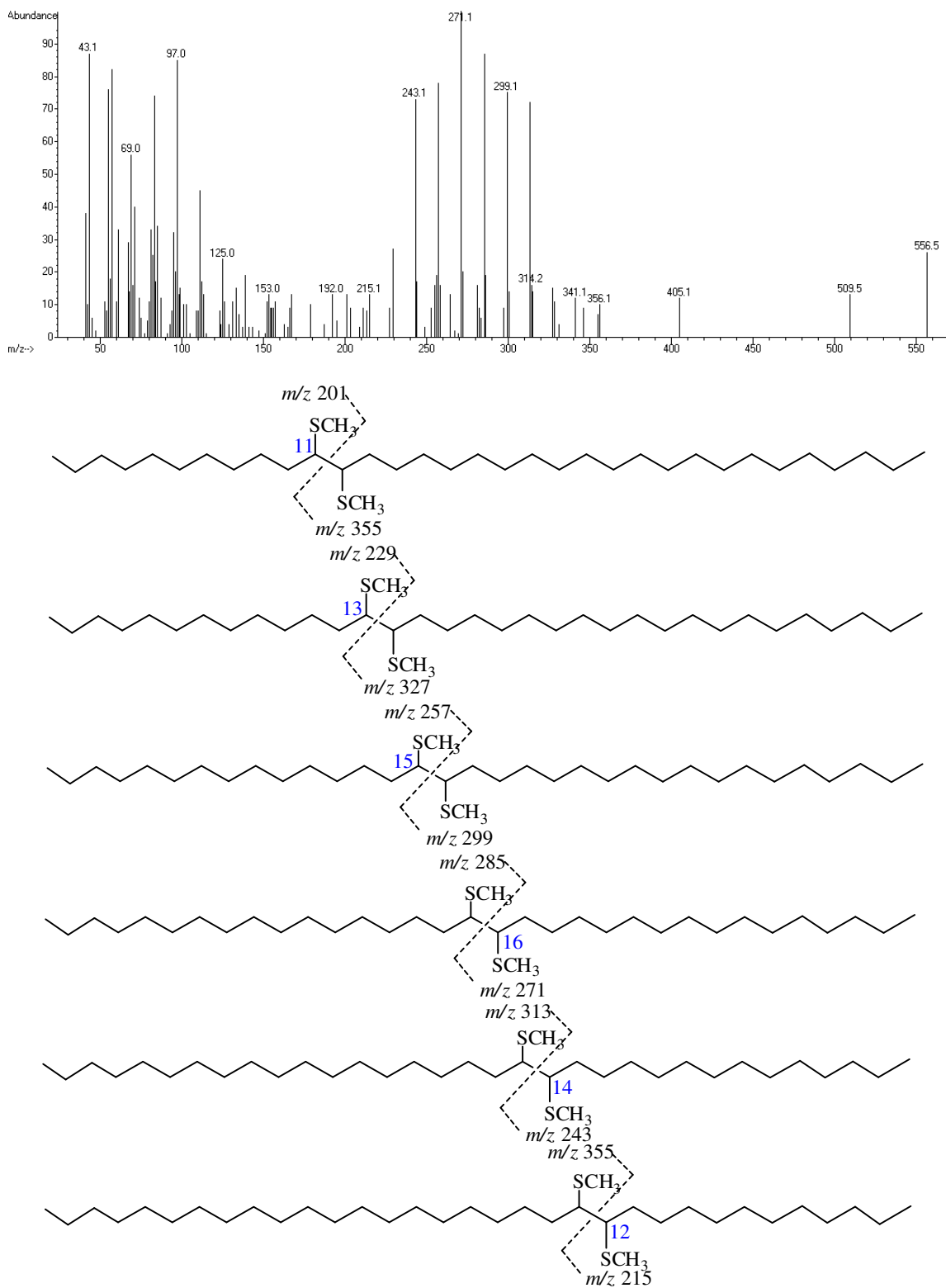
**Figura 48A.** Espectro de massas e fragmentações dos derivados DMS dos isômeros 9-, 10-, 11-, 12- e 13-heptacoseno.



**Figura 49A.** Espectro de massas e fragmentações dos derivados DMDS dos isômeros 10-, 11-, 12-, 13- e 14-nacoseno.

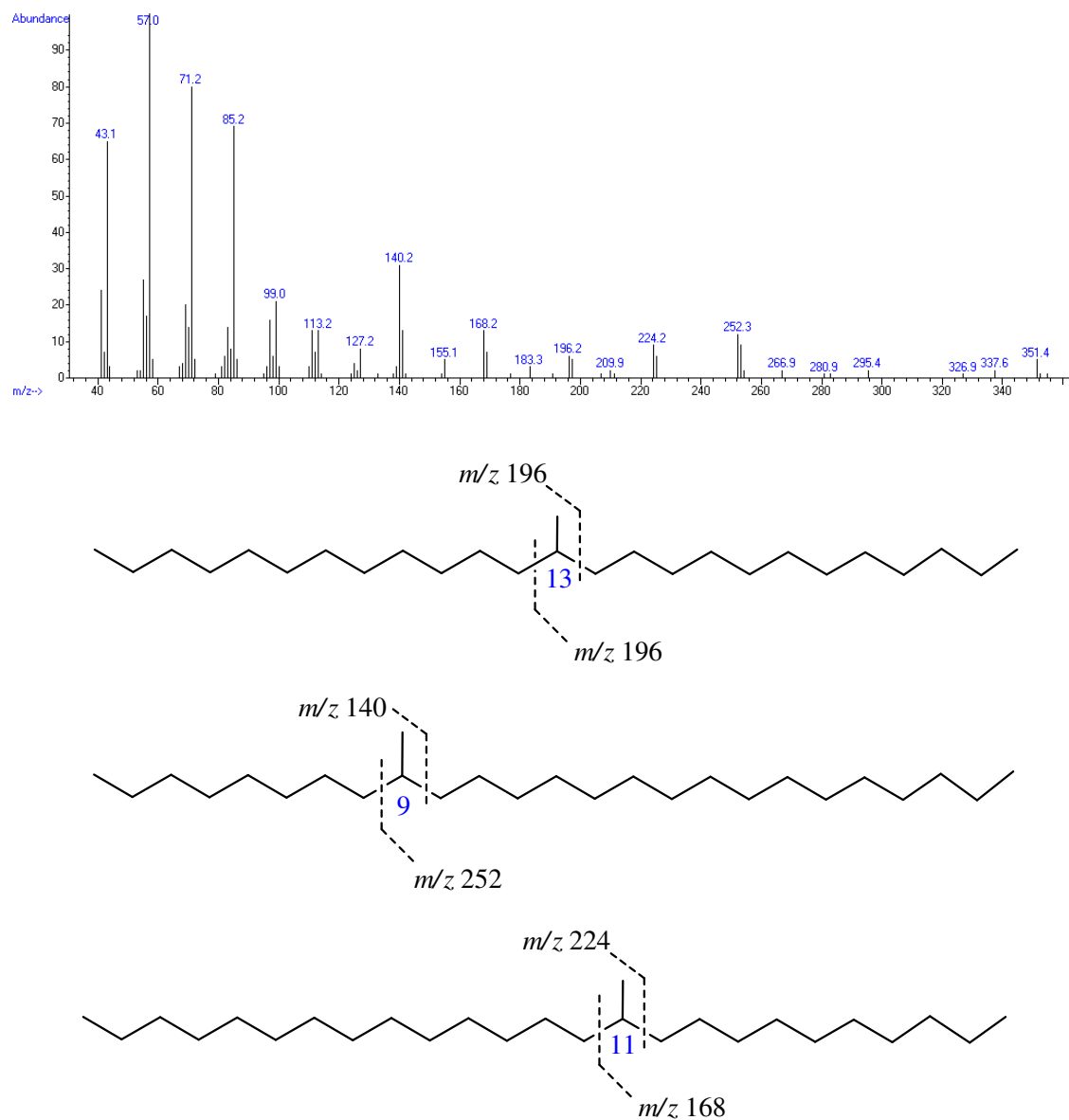


**Figura 50A.** Espectro de massas e fragmentões dos derivados DMDS dos isômeros de 10-, 11-, 12-, 13-, 14- e 15-hentriaconteno.

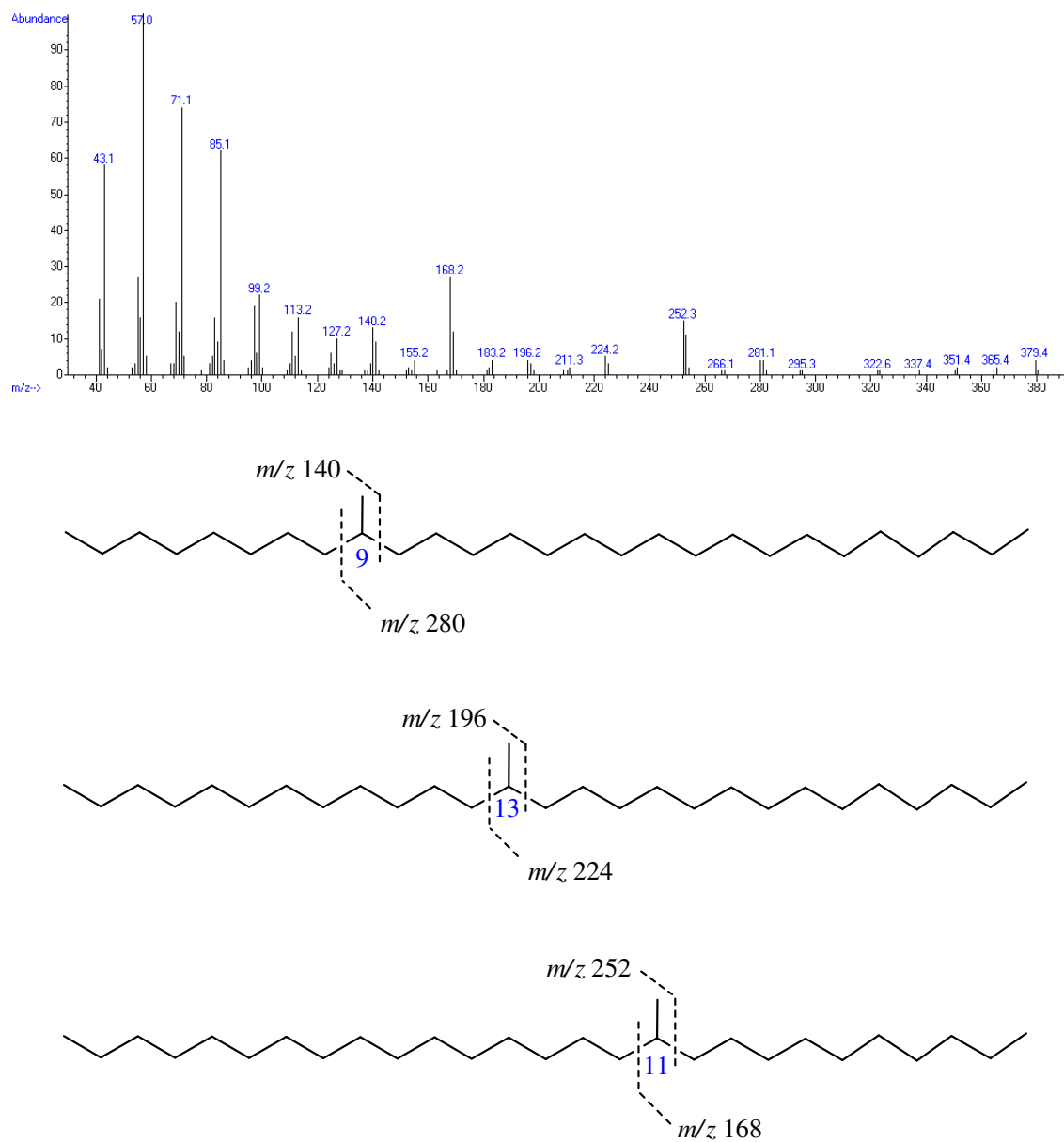


**Figura 51A.** Espectro de massas e fragmentões dos derivados DMDS dos isômeros de 11-, 12-, 13-, 14-, 15- e 16-tritriaconteno.

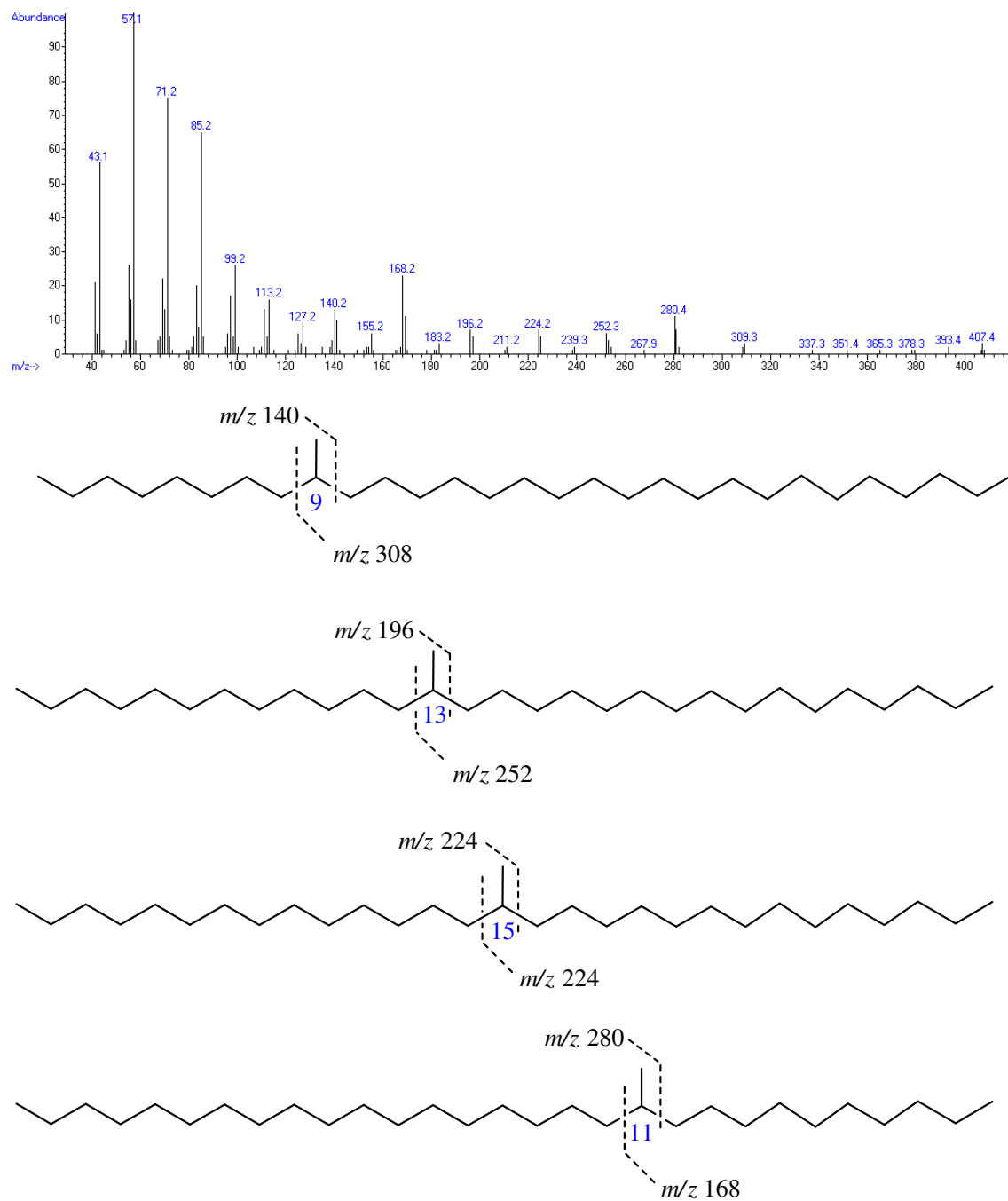




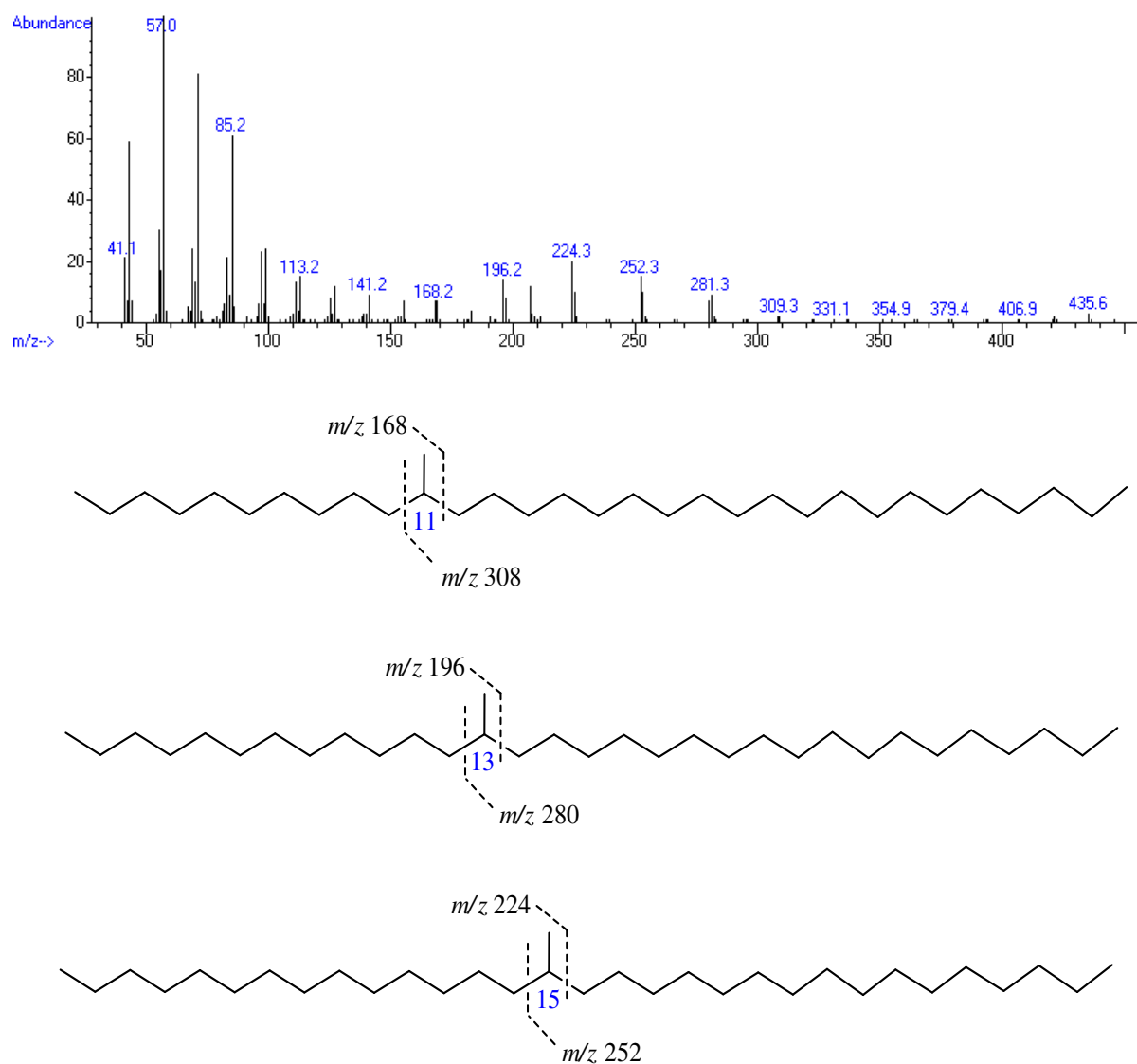
**Figura 52A.** Espectro de massas e fragmentações dos isômeros 9-metil-pentacosano, 11-metil-pentacosano e 13-metil-pentacosano



**Figura 53A.** Espectro de massas e fragmentações da mistura isomérica de 9-metil-heptacosano, 11-metil-heptacosano e 13-metil-heptacosano.

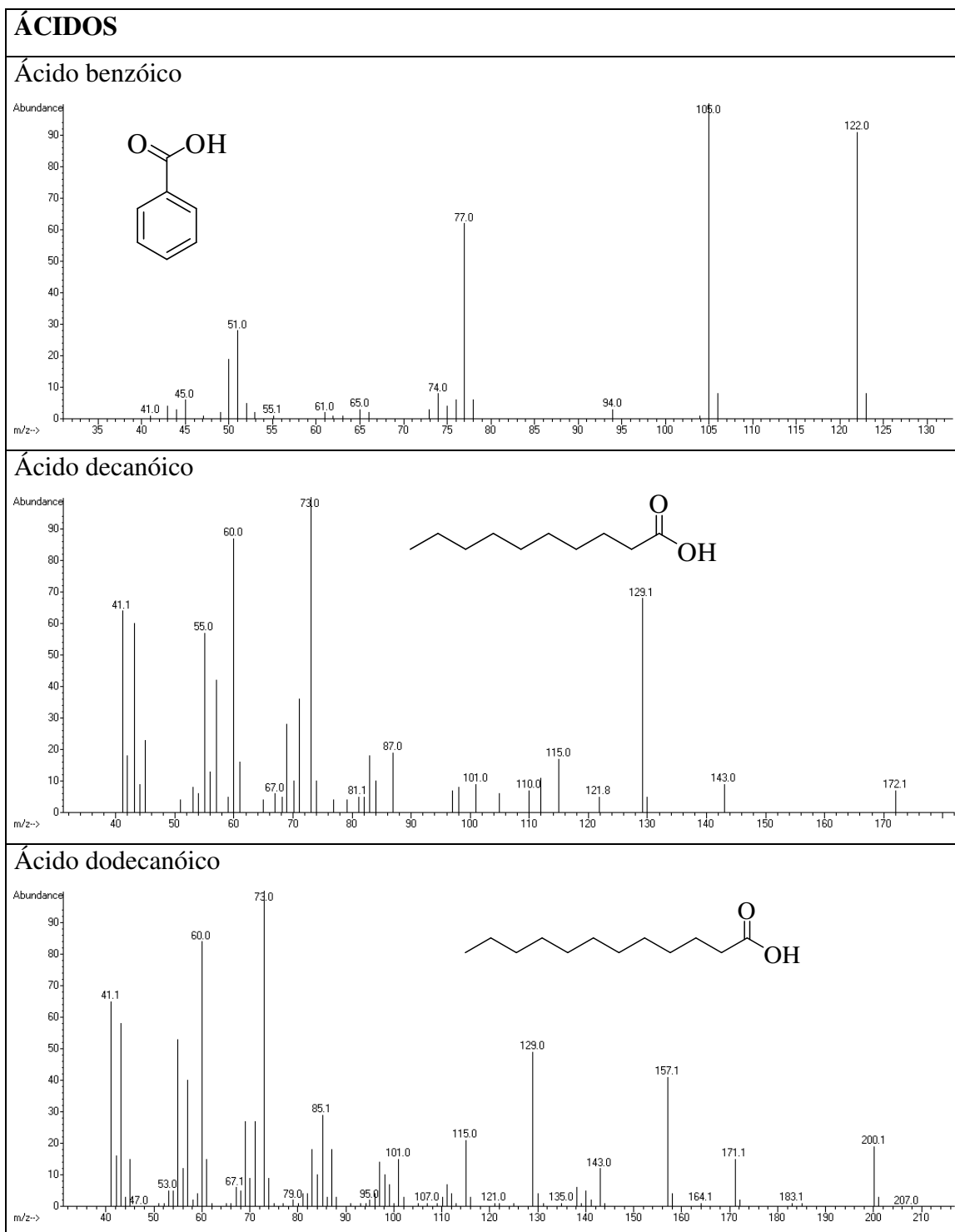


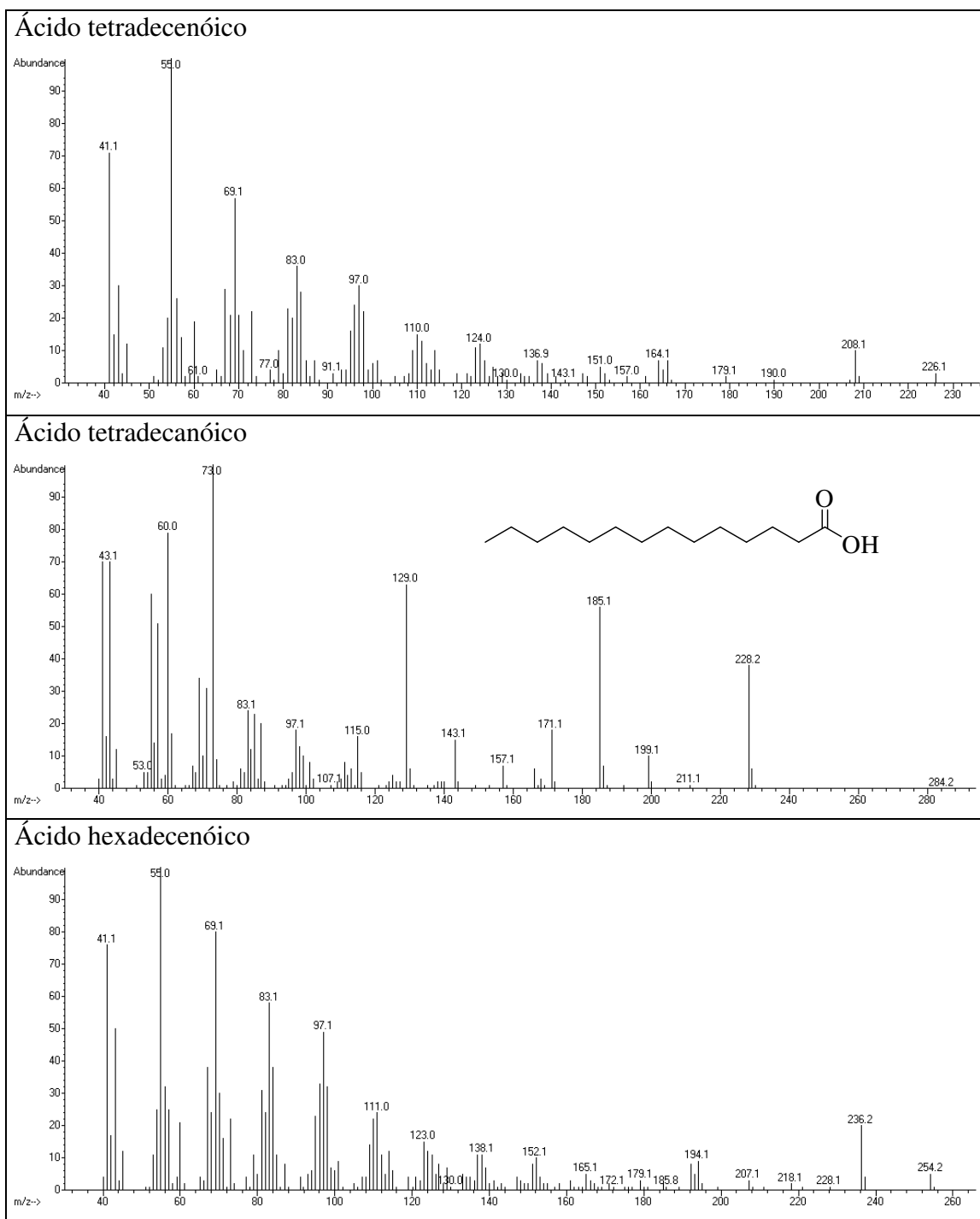
**Figura 54A.** Espectro de massas e fragmentações da mistura isomérica de 9-metil-nonacosano, 11-metil-nonacosano, 13-metil-nonacosano e 15-metil-nonacosano.

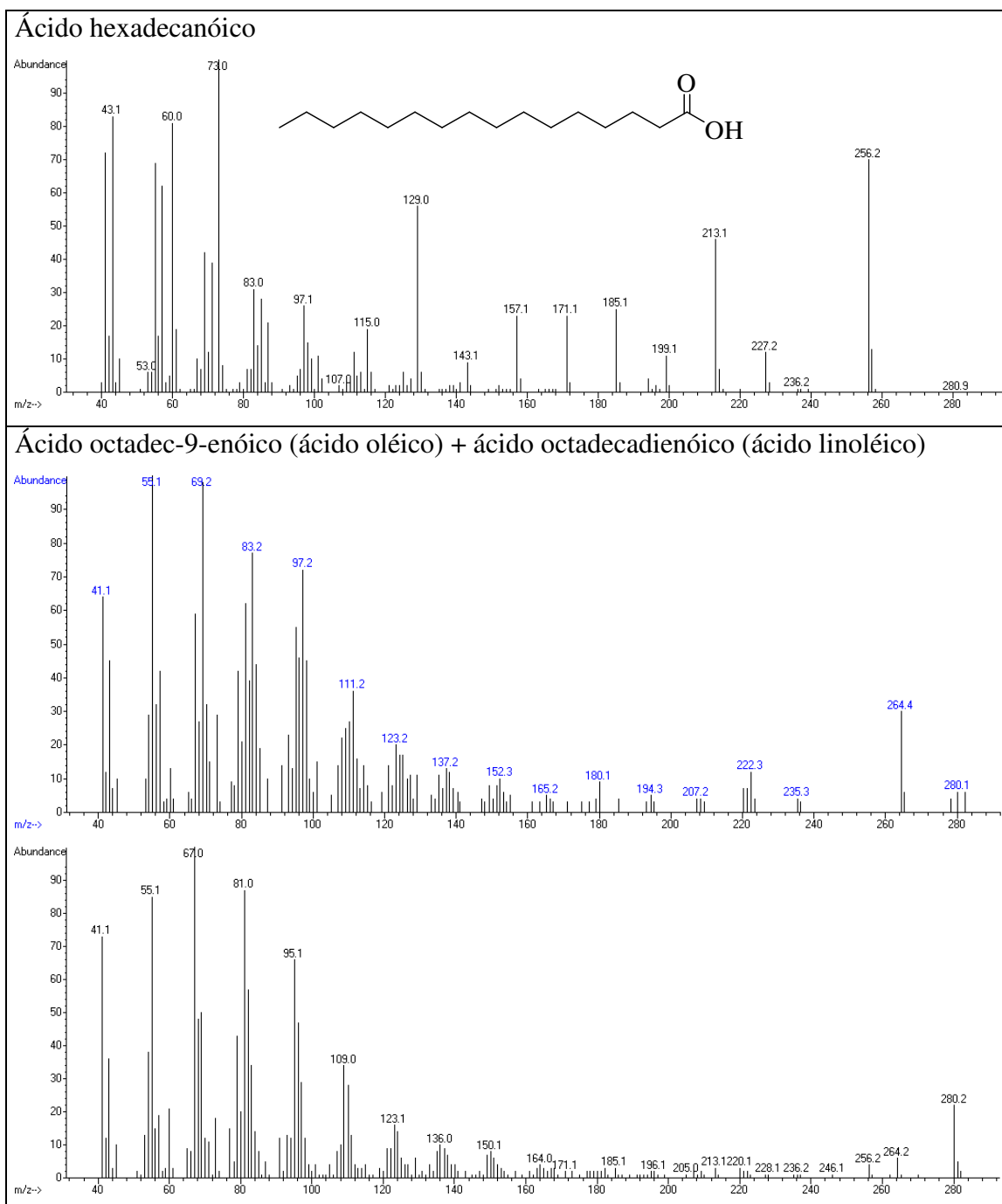


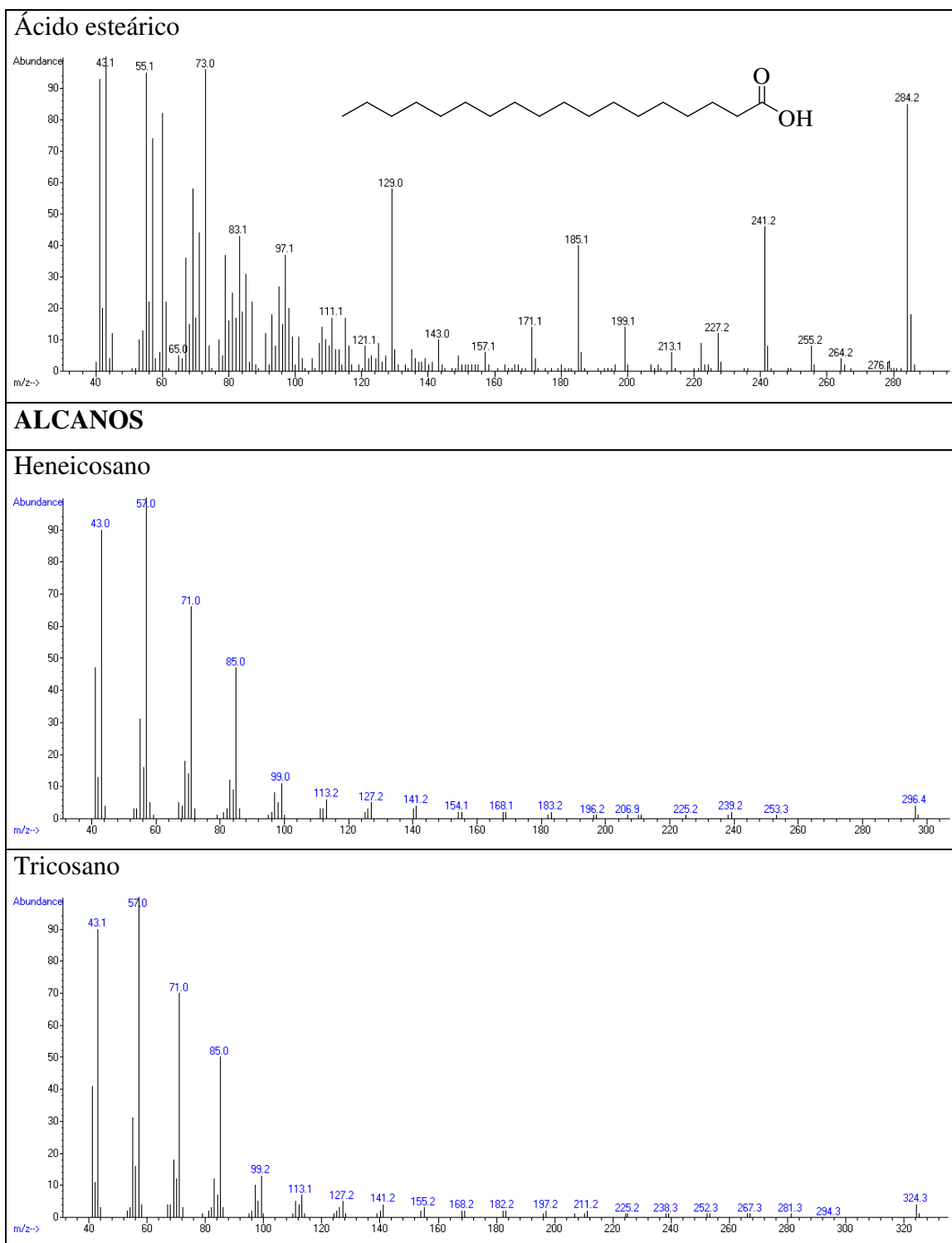
**Figura 55A.** Espectro de massas e fragmentações da mistura isomérica de 11-metil-hentriacontano, 13-metil-hentriacontano e 15-metil-hentriacontano

**Tabela 1A.** Espectros de massas dos compostos encontrados nas rainhas, operárias e machos de *Tetragonisca angustula*.

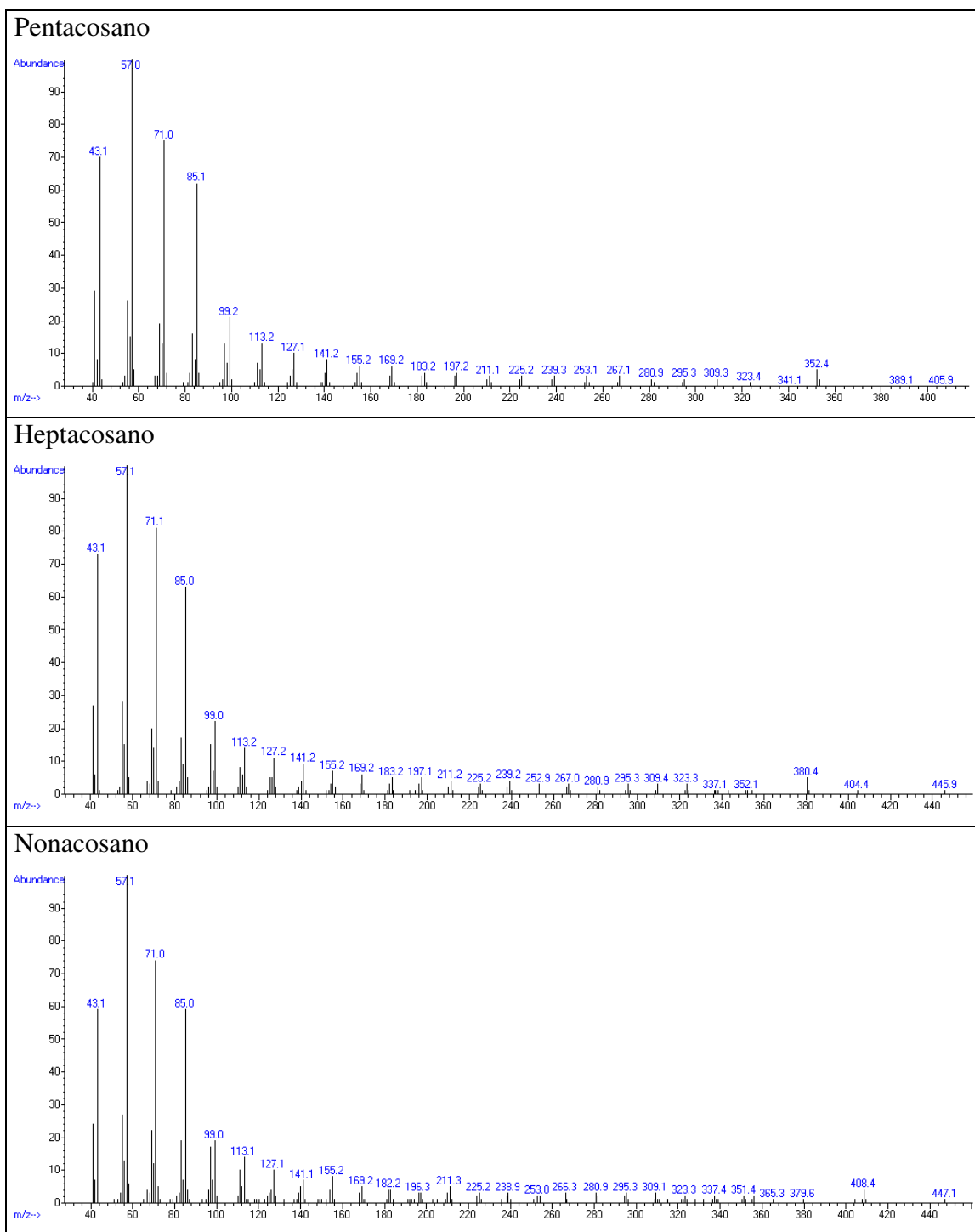


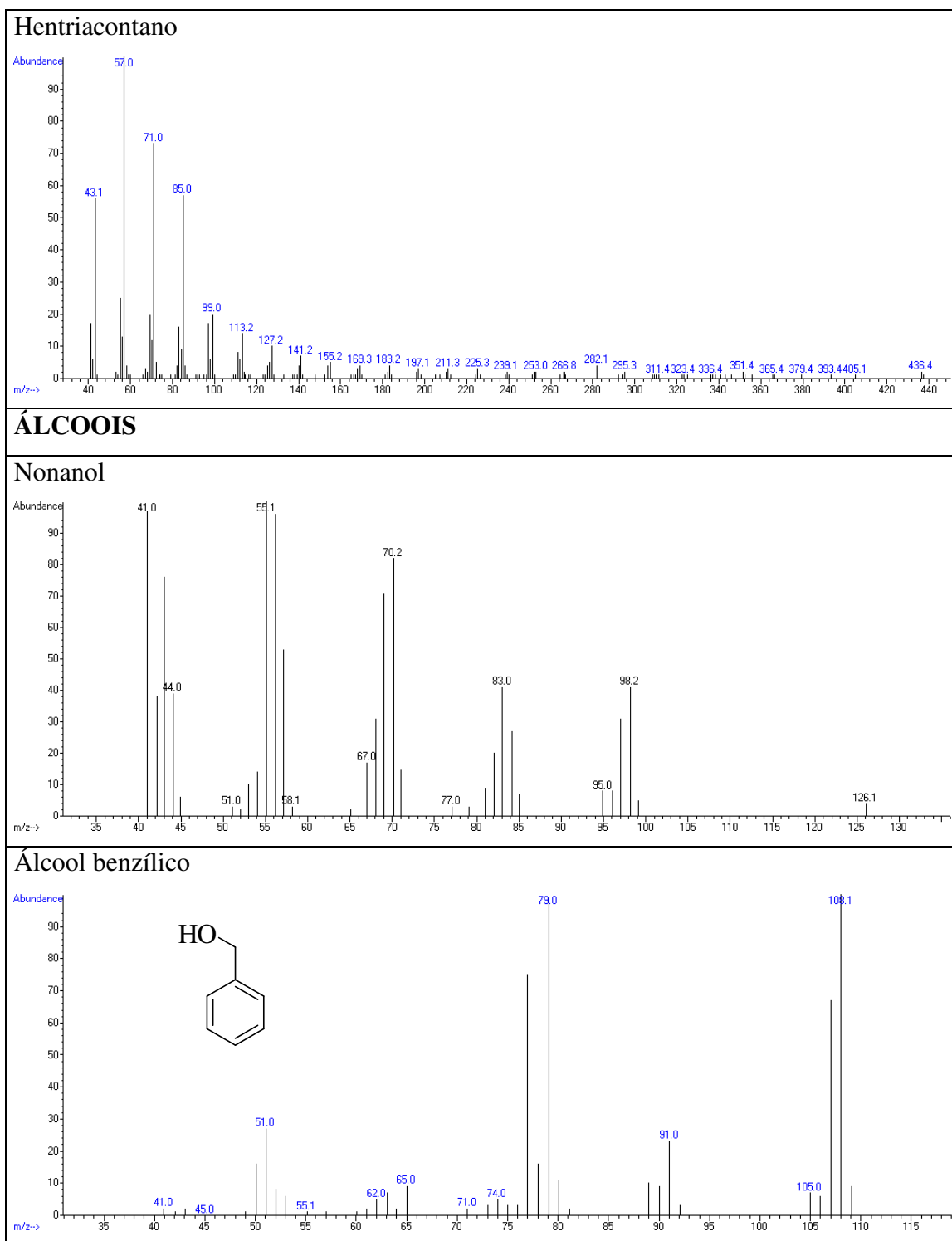


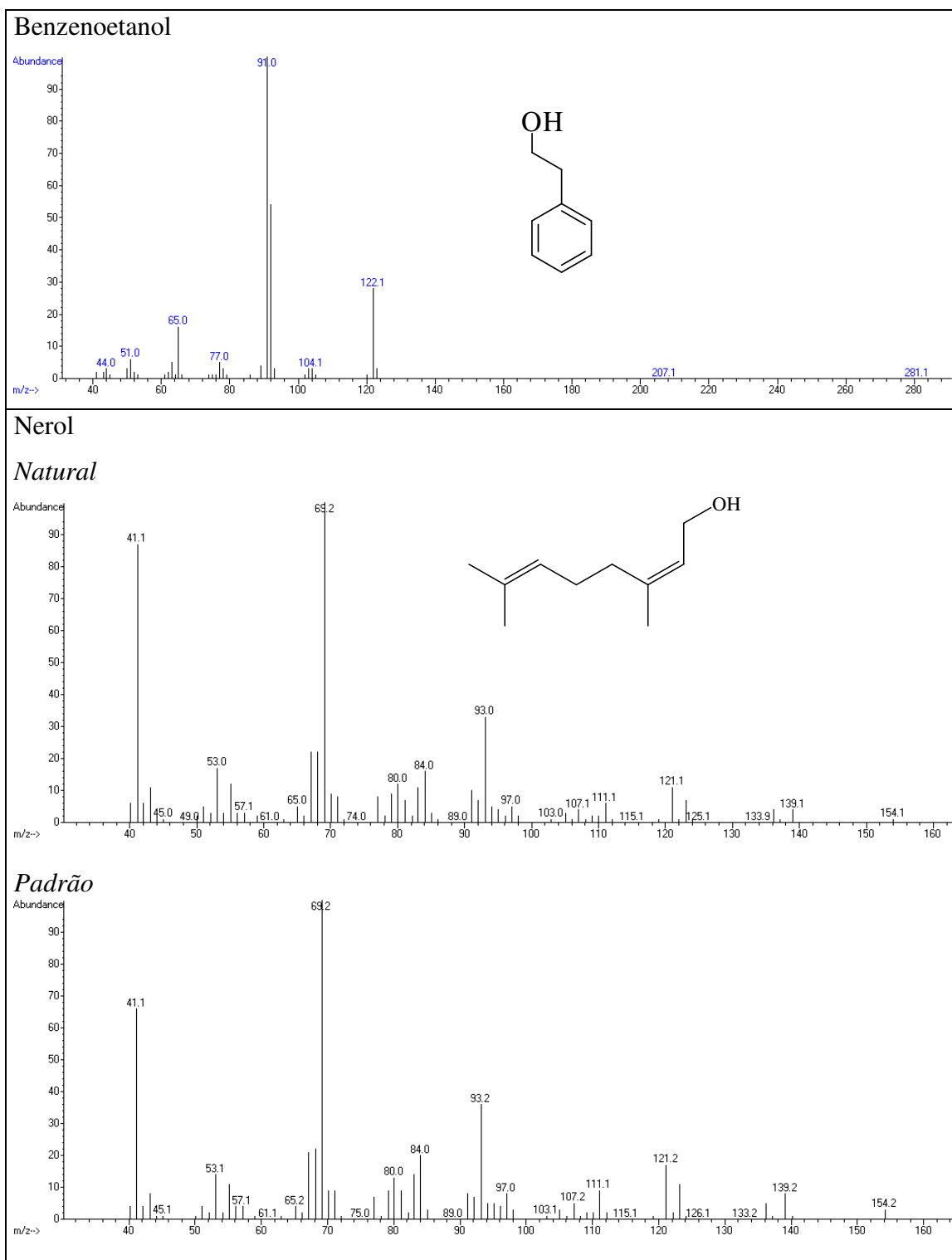


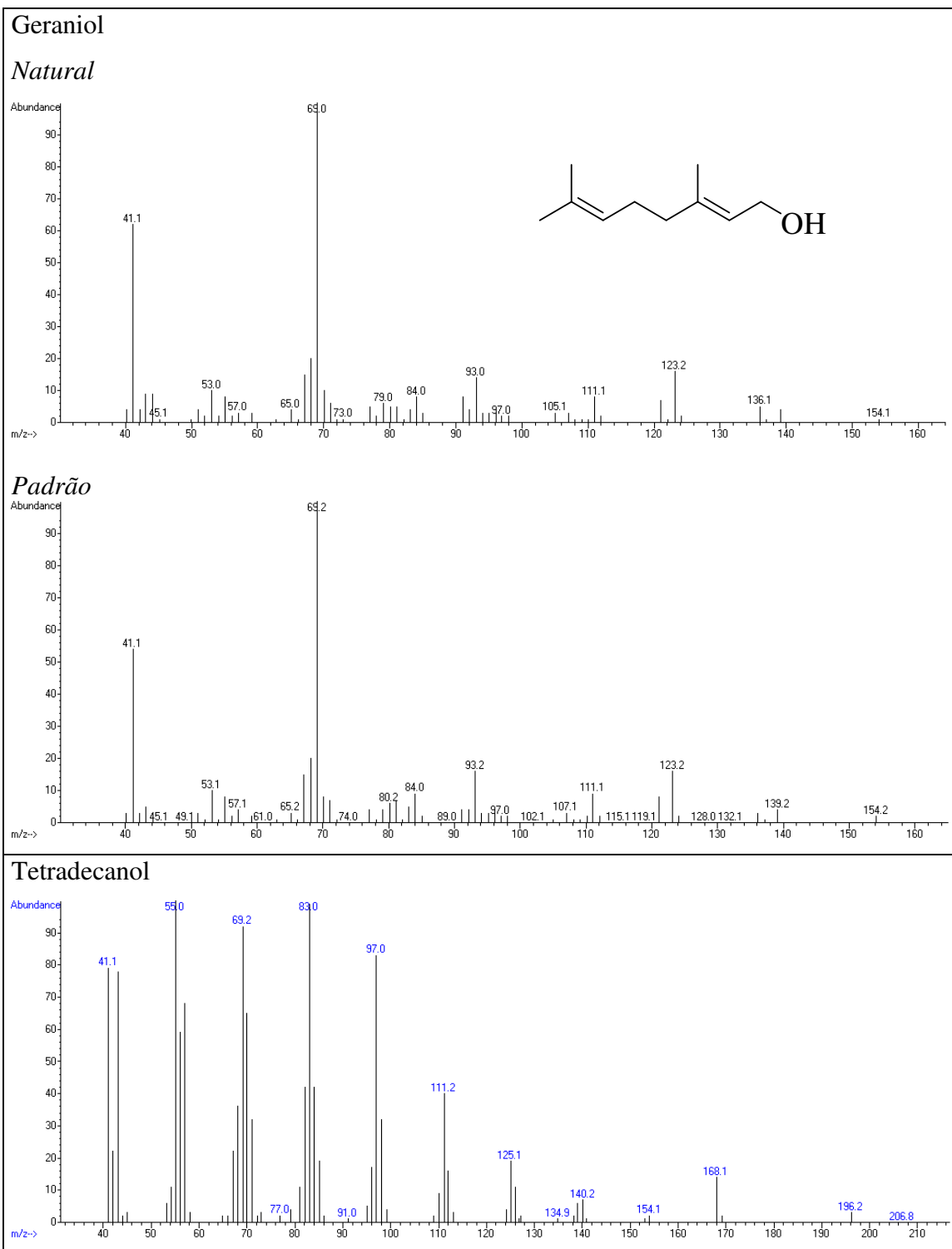


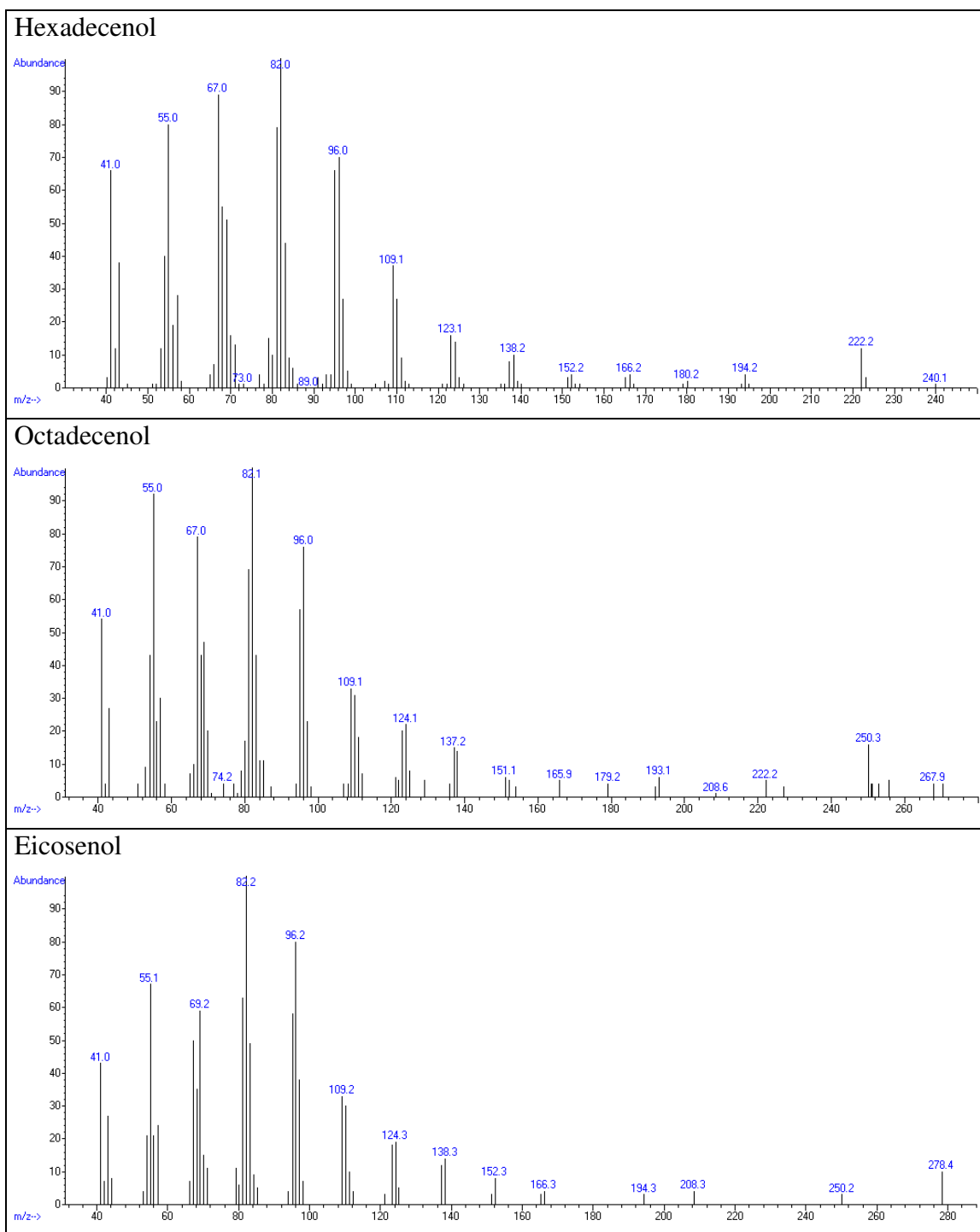


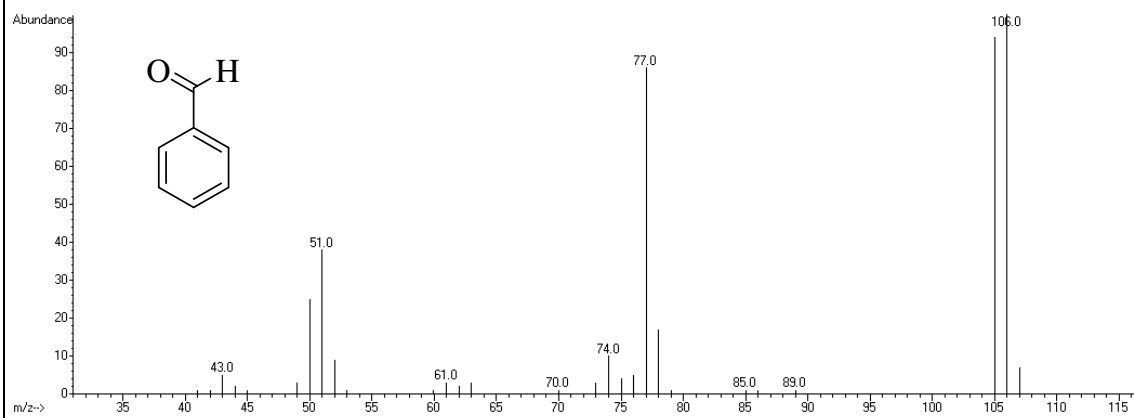
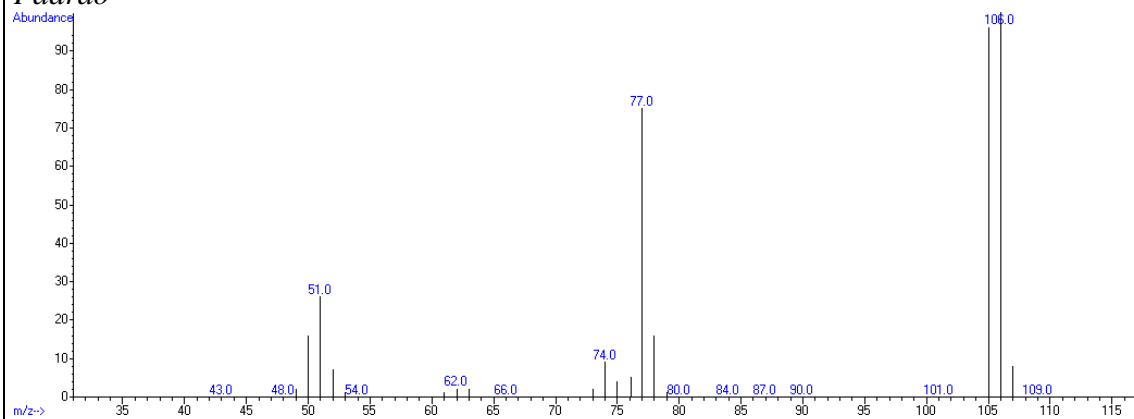
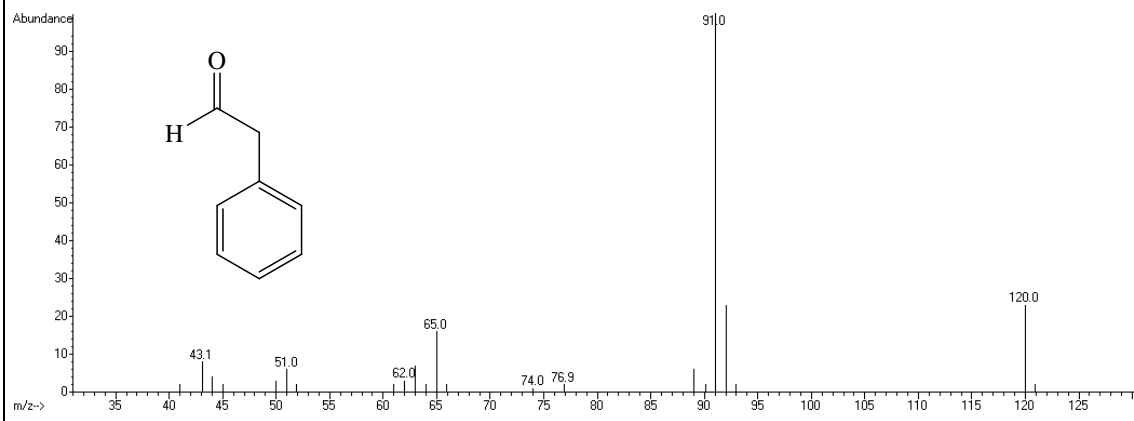


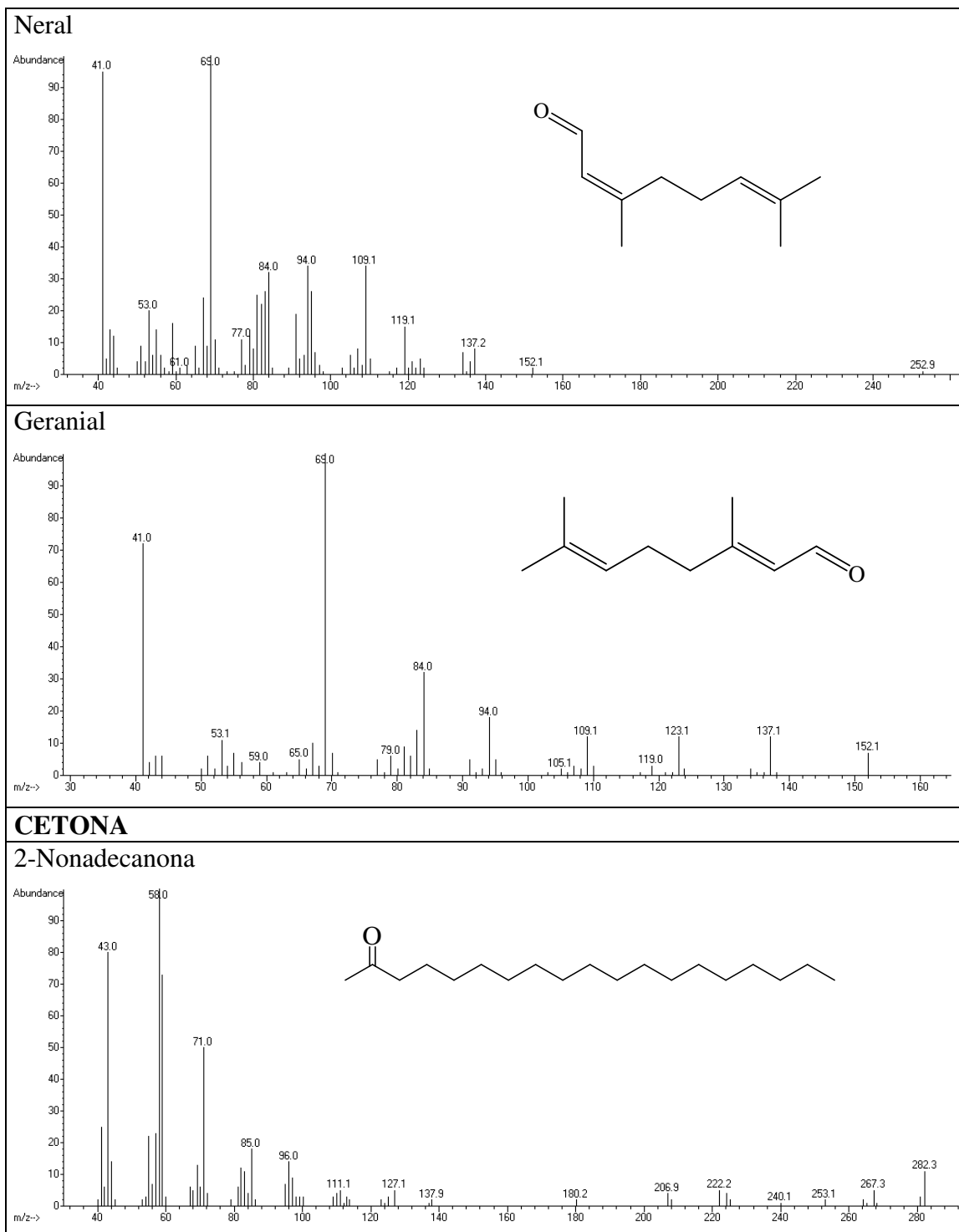


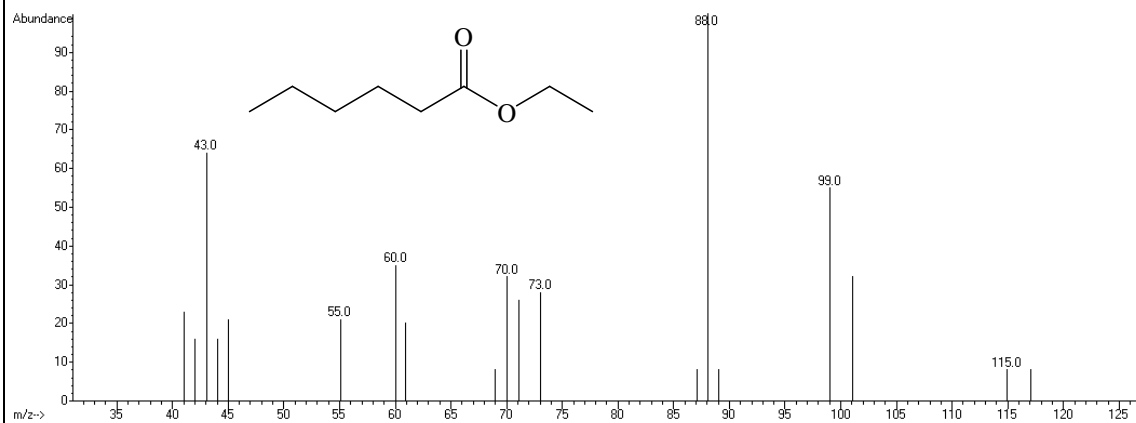
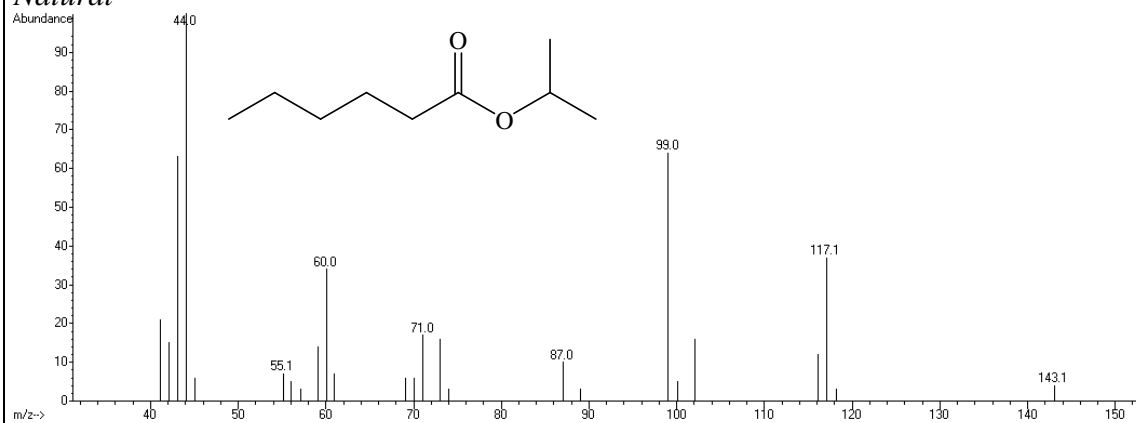
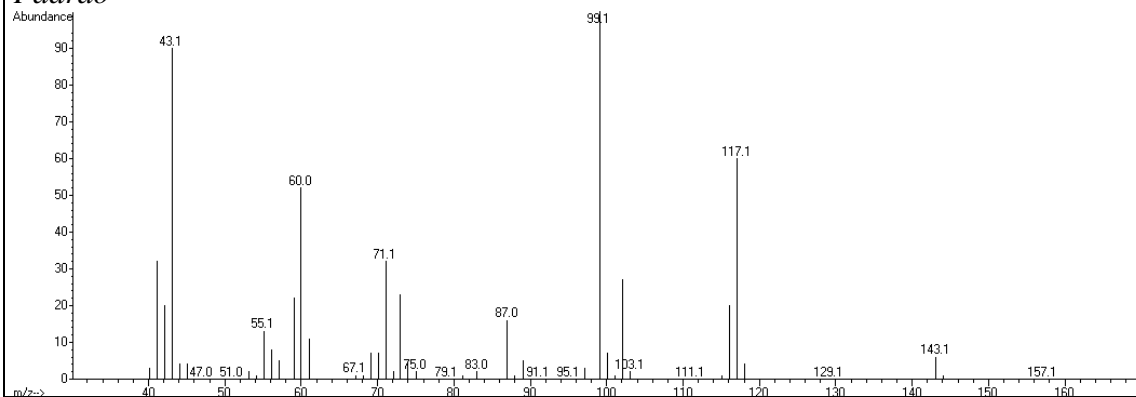






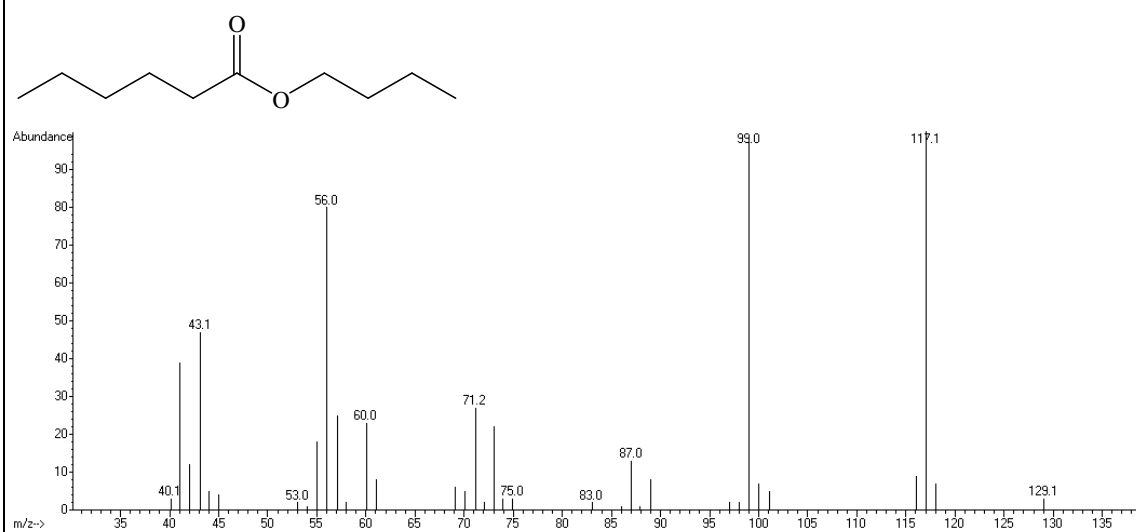
**ALDEÍDOS****Benzaldeído***Natural**Padrão***Benzenoacetaldeído**



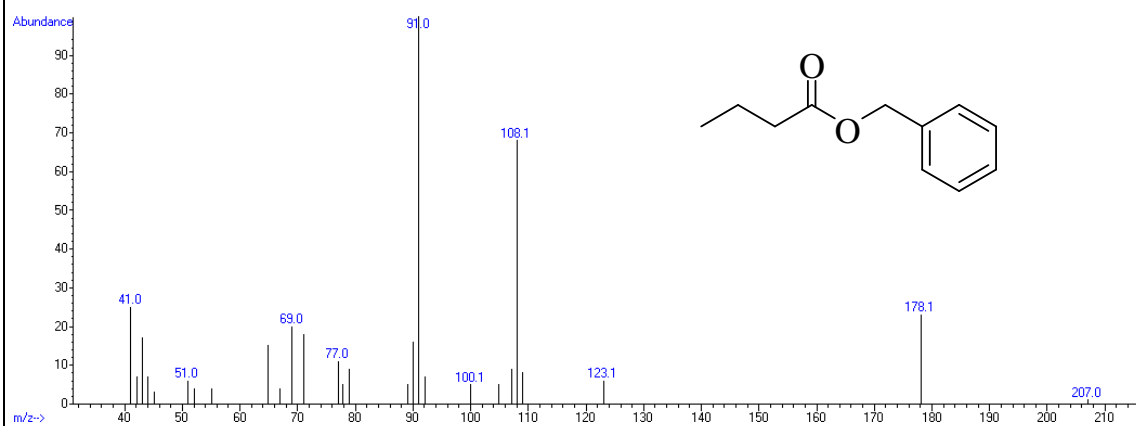
**ÉSTERES****Hexanoato de etila****Hexanoato de isopropila***Natural**Padrão*



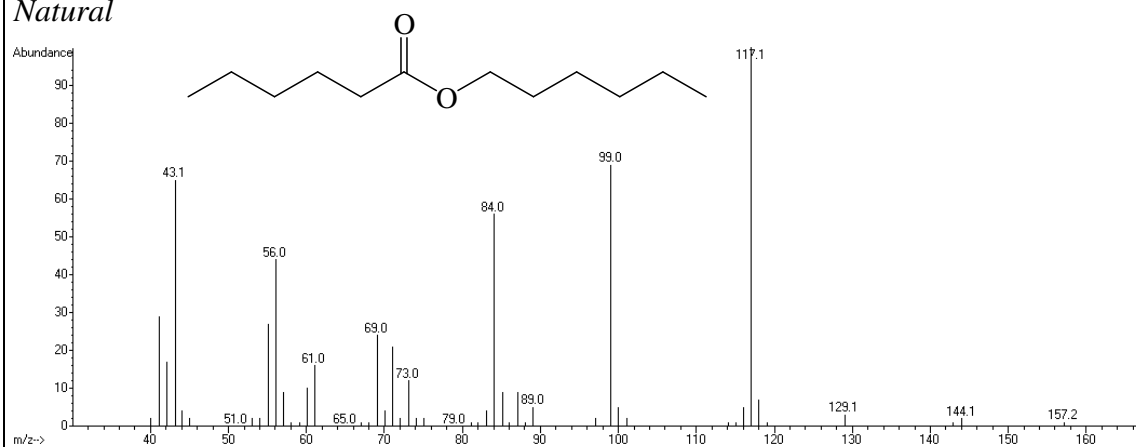
## Hexanoato de butila

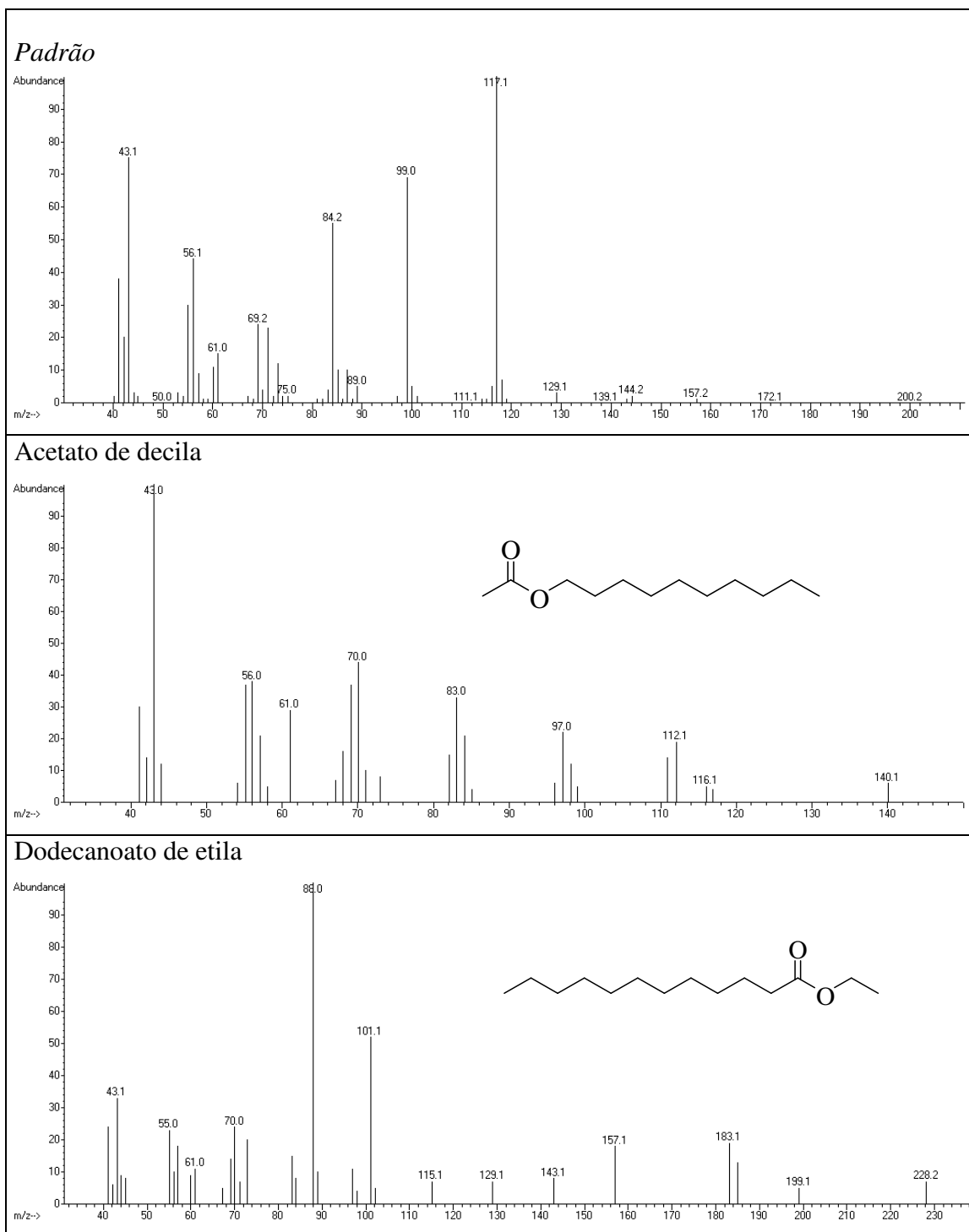


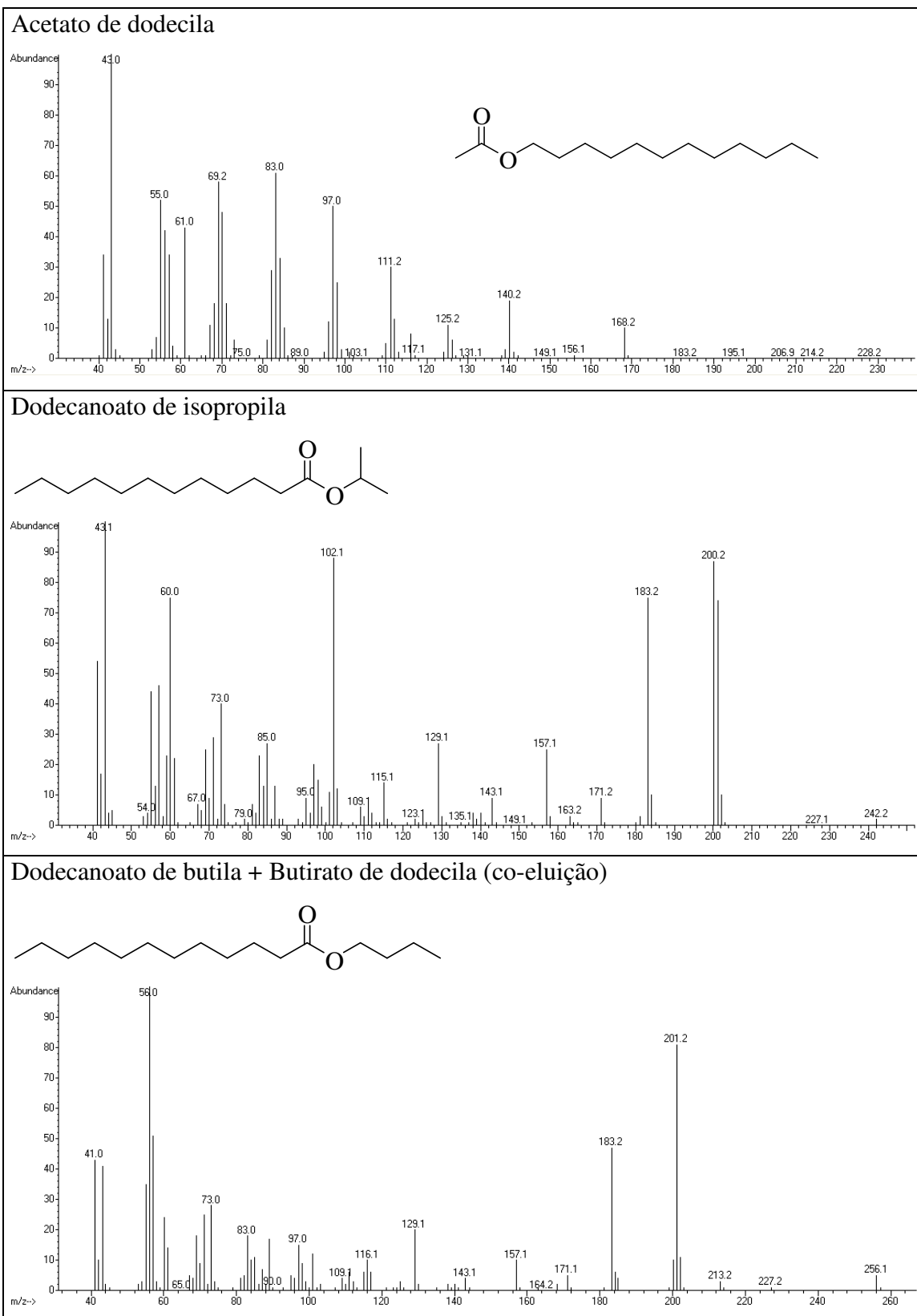
## Butirato de benzila

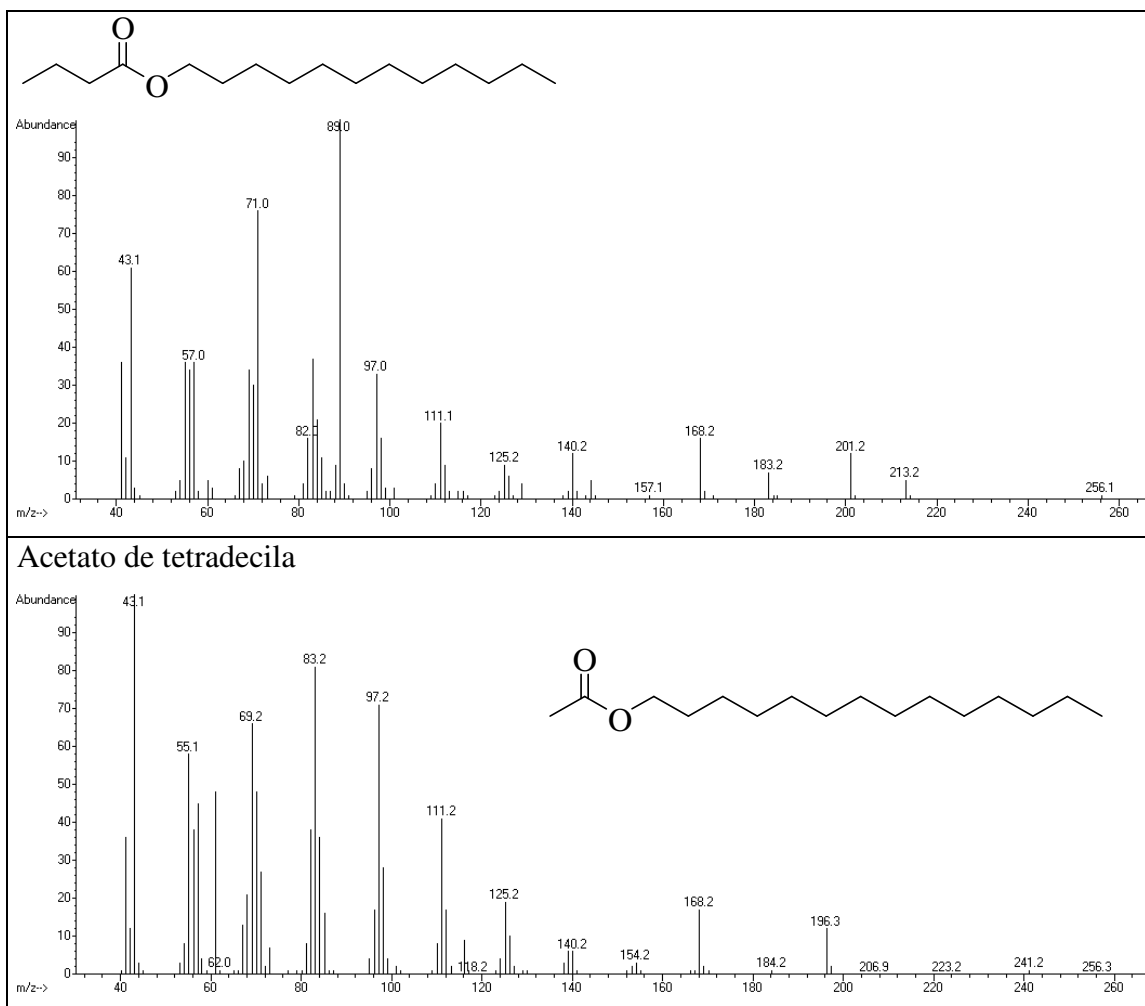


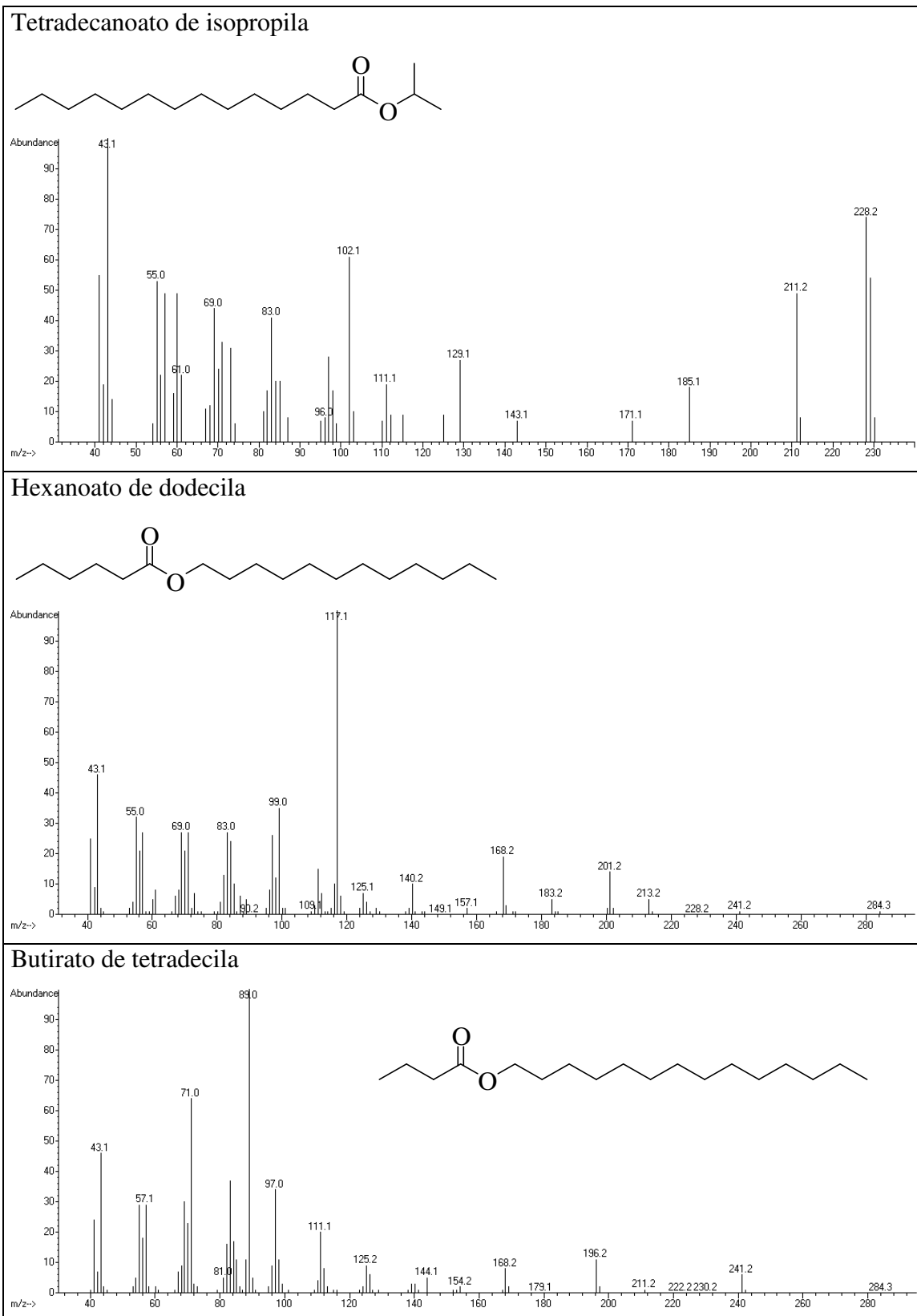
## Hexanoato de hexila

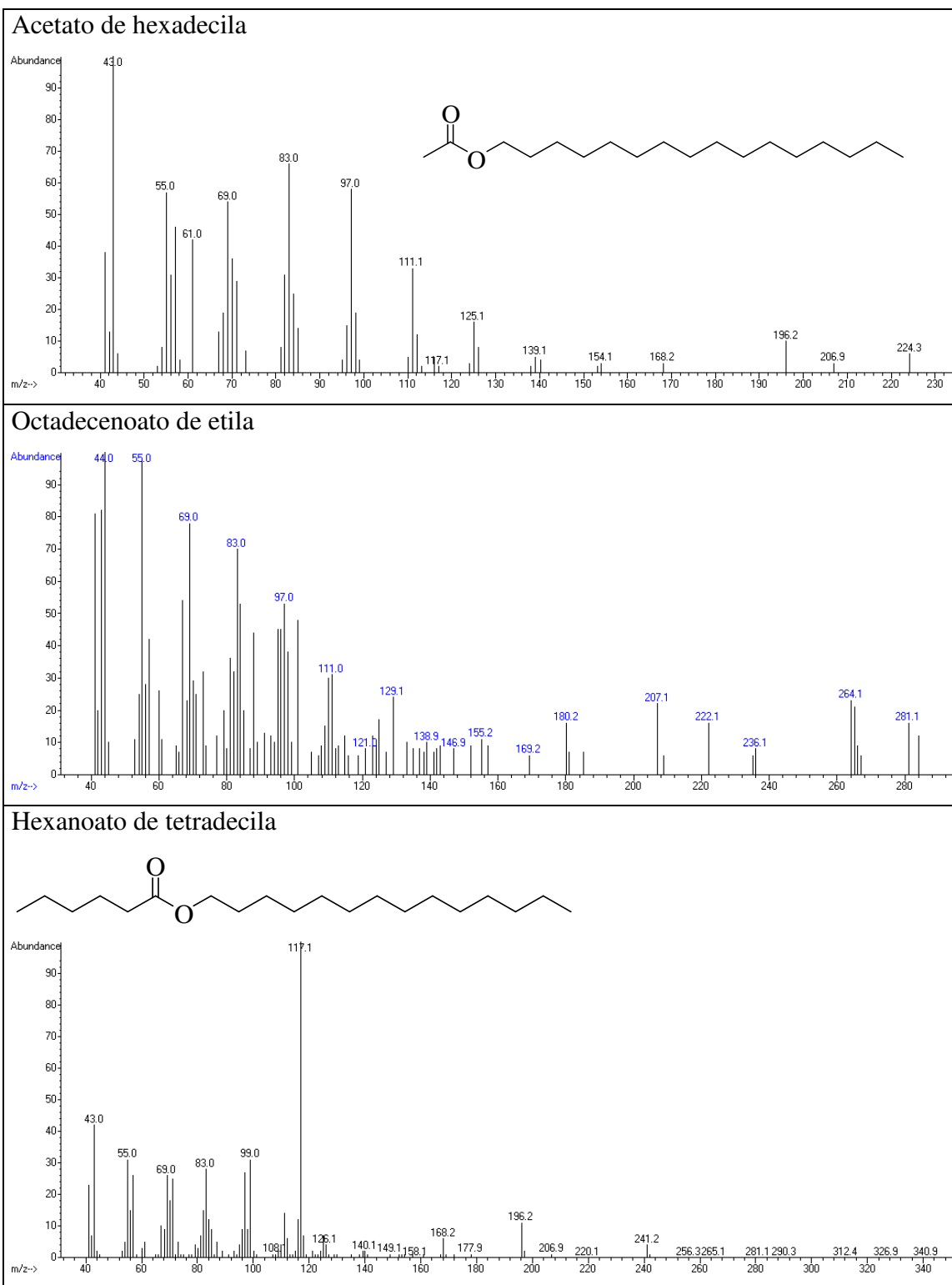
*Natural*

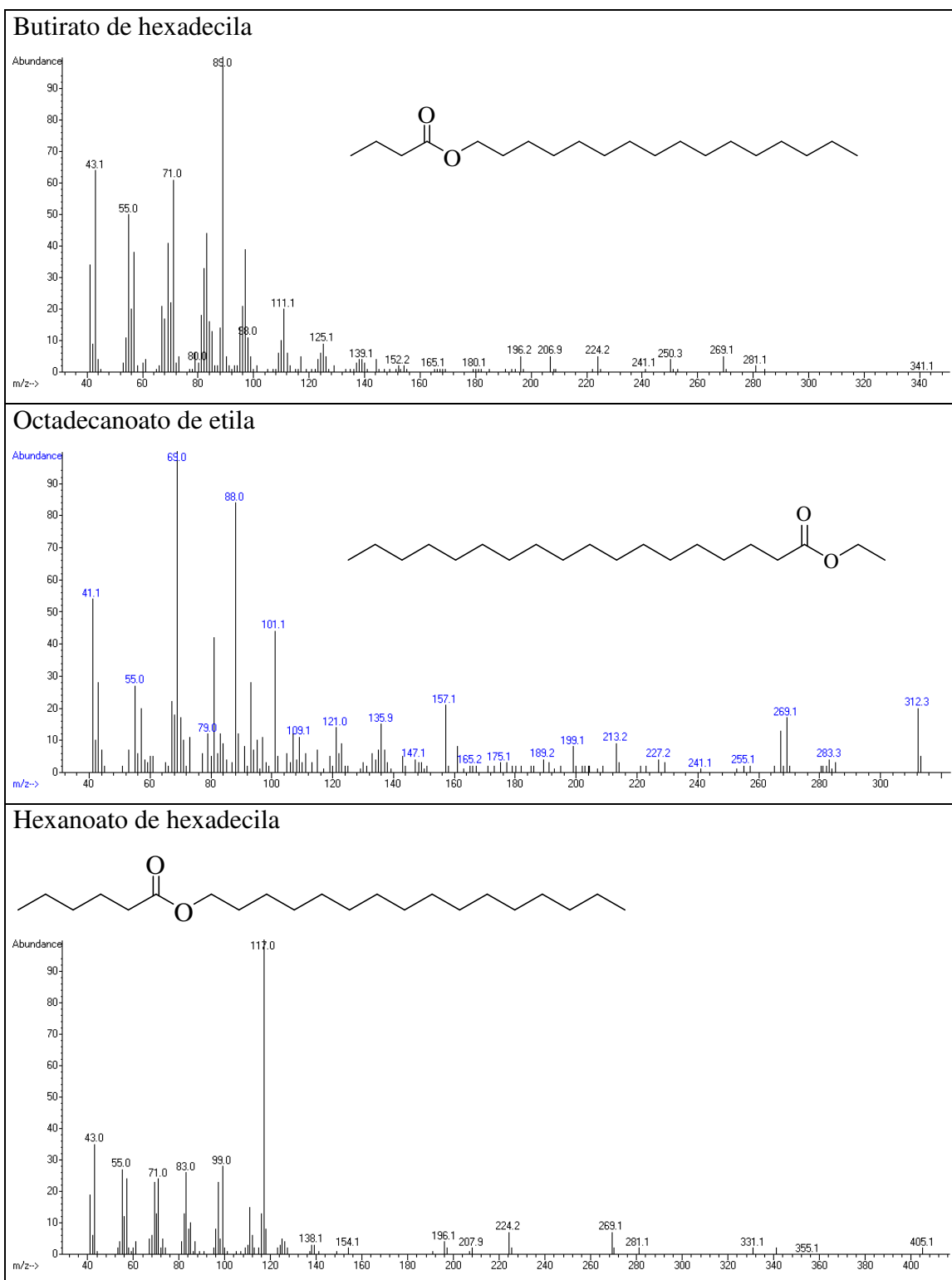




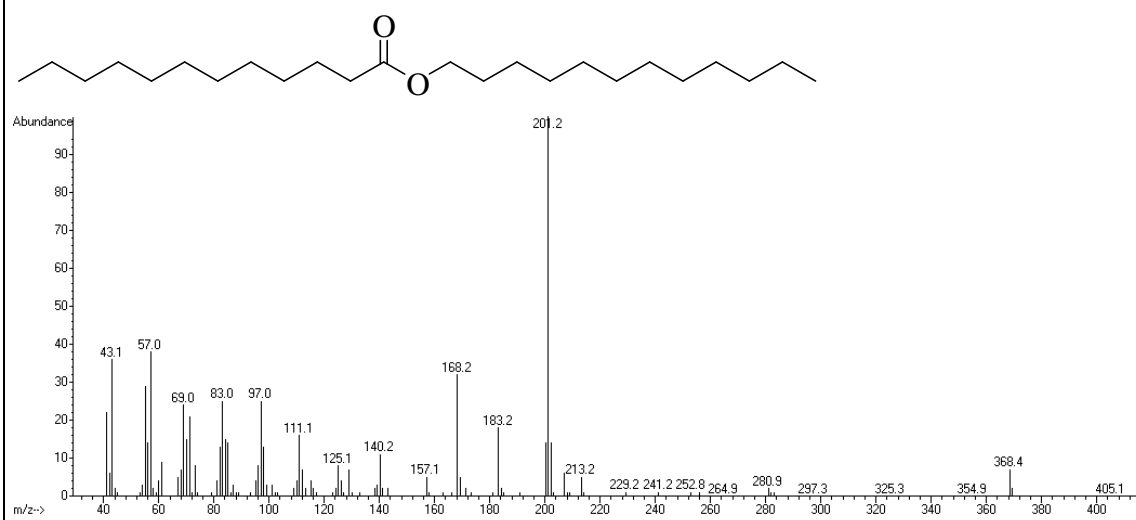








## Dodecanoato de dodecila



## Dodecanoato de tetradecila

