

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO ANTIMICROBIANO DE COMPOSTOS
PRODUZIDOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE ABELHAS SEM
FERRÃO NATIVAS DO BRASIL

TAINÁ LONGAREZI MANO

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

UBERLÂNDIA – MG

AGOSTO – 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO ANTIMICROBIANO DE COMPOSTOS
PRODUZIDOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE ABELHAS SEM
FERRÃO NATIVAS DO BRASIL

TAINÁ LONGAREZI MANO

DRA. RAQUEL CRISTINA CAVALCANTI DANTAS

MA. ANA CAROLINA COSTA SANTOS

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

UBERLÂNDIA – MG

AGOSTO – 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO ANTIMICROBIANO DE COMPOSTOS
PRODUZIDOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE ABELHAS SEM
FERRÃO NATIVAS DO BRASIL

TAINÁ LONGAREZI MANO

DRA. RAQUEL CRISTINA CAVALCANTI DANTAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

MA. ANA CAROLINA COSTA SANTOS
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em ___/___/___.

DR. NILSON NICOLAU JÚNIOR

UBERLÂNDIA – MG

AGOSTO – 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO ANTIMICROBIANO DE COMPOSTOS
PRODUZIDOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE ABELHAS SEM
FERRÃO NATIVAS DO BRASIL

TAINÁ LONGAREZI MANO

Aprovado pela Banca Examinadora em: 19/08/2022 Nota: 100



Profa. Dra. Raquel Cristina Cavalcanti Dantas

Uberlândia, 19 de agosto de 2022

Dedico aos meus avós, Maria José Maturano, Antônio Longarezi, Luiz Carlos Mano e, principalmente, em memória a Zilda Fiorele. Por me permitirem a vida e me ensinarem sobre o amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Raquel Cristina Cavalcanti Dantas pela orientação, suporte e confiança. À Ana Carolina Costa Santos, pela coorientação, dedicação, companheirismo, amizade, por pensar e executar comigo. Vocês são grandes exemplos de mulheres na ciência.

À banca examinadora, Dr. Carlos Ueira-Vieira e Dr. Edgar Silveira Campos, por aceitarem meu convite e pelas contribuições. À Iara Rossi pela disposição.

Agradeço aos meus pais, Andrea Maturano Longarezi e Marcel Mano, por serem além das minhas maiores inspirações de pesquisadores, meus exemplos de perseverança, força e humildade. Serei eternamente grata por toda a dedicação, amor, segurança e suporte que sempre recebi de vocês. Ao meu irmão, Caê Longarezi Mano, por andar ao meu lado, me apoiar e ser meu grande companheiro. Vocês são a razão de tudo.

À minha família estendida, que sempre se fizeram presente em minha vida, me apoiando, me compreendendo e me acolhendo, em especial a Nanda, Luisa, Mariana, Rogério e Dona Gislene. Vocês fazem parte da minha história e serei eternamente grata por tê-los em minha vida.

Agradeço às minhas irmãs de vida, Luciana e Ana Laura, por estarem sempre ao meu lado acompanhado cada uma das minhas etapas, vendo as minhas evoluções e crescendo junto a mim. Ao Alexandre, por se manter ao meu lado até nos dias mais difíceis, por vibrar com cada vitória minha como se fosse dele e por confiar em mim. Ao Bruno, pela amizade, compreensão e apoio que garantiram que eu pudesse desenvolver o presente trabalho. Vocês tornam a minha vida mais leve e mais feliz.

À 17ª turma de Biotecnologia, por tornarem a minha trajetória durante a graduação mais divertida, proveitosa e enriquecedora. Principalmente a Ana Luiza, Ludmilla, Pedro e Victor, que se tornaram meus grandes amigos e confidentes. À Empresa Júnior Sinérgica, por me ensinar sobre o mercado de trabalho e seus desafios. Em especial a Laura, Sabrinna, Matheus e Thomas, por serem pessoas tão especiais. Carrego vocês para além do meio acadêmico.

Agradeço à todos os Professores que tive a honra de ter durante toda a minha formação acadêmica, pela dedicação e pelos conhecimentos compartilhados. Vocês foram essenciais para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje.

À toda a equipe do Laboratório de Genética de Biotecnologia da UFU por permitirem que eu realizasse meus experimentos com todo o suporte, apoio e infraestrutura necessária. E por, acima de tudo, me acolheram como parte deles, em especial ao Professor Dr. Carlos Ueira. Ao Laboratório de Microbiologia Molecular da UFU, principalmente a Professora Dra. Rosineide Ribas e ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFU, sobretudo ao Professor Dr. Foued Espindola que me forneceram amparo durante minhas pesquisas.

Por fim, agradeço a todos que acreditaram em mim e que participaram, direta ou indiretamente da execução do presente trabalho.

RESUMO

Diante da preocupação mundial com as dificuldades no combate a patógenos resistentes, a busca por novos fármacos com função antimicrobiana torna-se uma emergência. Este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de biomoléculas produzidas por fungos filamentosos isolados do alimento larval de abelhas sem ferrão em bactérias multirresistentes. Para isso, o teste em bloco de gelose foi utilizado para triar os fungos produtores de biomoléculas antimicrobianas. O teste de concentração inibitória em placa foi aplicado para verificar a atividade antimicrobiana dos compostos produzidos por esses microrganismos. Com base nesses procedimentos, verificou-se que o sobrenadante total foi capaz de impedir o crescimento das bactérias multirresistentes *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii*. Os sobrenadantes foram fracionados e as frações proteicas e metabólicas também exibiram efeito antimicrobiano nas bactérias testadas. Indicando uma possível alternativa para o tratamento de bactérias multirresistentes.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, fungos filamentosos, bactérias multirresistentes, abelha sem ferrão.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA.....	4
3. OBJETIVO.....	5
3.1. Objetivo Geral.....	5
3.2. Objetivos Específicos.....	5
4. MATERIAL E MÉTODOS	5
4.1. Isolados fúngicos.....	5
4.2. Microrganismos-teste.....	6
4.3. Teste primário em bloco de gelose.....	6
4.4. Produção do sobrenadante.....	7
4.5. Concentração Inibitória em Placa (CIP).....	8
4.6. Obtenção das frações proteicas e metabólicas dos sobrenadantes	9
4.7. Análises Estatísticas	9
5. RESULTADOS	10
5.1. Teste primário em bloco de gelose.....	10
5.2. Concentração Inibitória em Placa (CIP).....	10
5.2.1. Sobrenadante Total.....	10
5.2.2. Fração Proteica e Metabólica do Sobrenadante para <i>Staphylococcus aureus</i>	12
5.2.3. Fração Proteica e Metabólica do Sobrenadante para <i>Acinetobacter baumannii</i> ...	16
6. DISCUSSÃO.....	20
7. CONCLUSÃO	255
8. REFERÊNCIAS	25
APÊNDICE 1.....	35
APÊNDICE 2.....	36

LISTA DE FIGURAS

1. Esquema do teste em bloco de gelose.....7
2. Processo de produção do sobrenadante fúngico.8
3. Frações proteicas com efeito antimicrobiano em *Staphylococcus aureus* em pelo menos um dos tempos de tratamento. Frações proteicas dos fungos filamentosos: (A) SFv01, (B) SFv05, (C) SMs35 e (D) SMq03. Os dados mostram a média SEM de três réplicas independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$15
4. Frações metabólicas com efeito antimicrobiano em *Staphylococcus aureus* em pelo menos um dos tempos de tratamento. Frações metabólicas dos fungos filamentosos: (A) SFv01, (B) SMq03, (C) SFv05 e (D) SMs35. Os dados mostram a média SEM de três réplicas independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$16
5. Frações proteicas com efeito antimicrobiano significativo em *Acinetobacter baumannii* em pelo menos um dos tempos de tratamento. Frações proteicas dos fungos filamentosos: (A) SMq05, (B) SFv10 e (C) SMs46C. Os dados mostram a média SEM de três réplicas independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$18
6. Frações metabólicas com efeito antimicrobiano significativo em *Acinetobacter baumannii* em pelo menos um dos tempos de tratamento. Frações metabólicas dos fungos filamentosos: (A) SMq05, (B) SFv10 e (C) SMs46C Os dados mostram a média SEM de três réplicas independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$19

LISTA DE TABELAS

1. Codificação dos fungos filamentosos da Coleção de Microrganismos Isolados de Abelhas sem ferrão do Laboratório de Genética de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia e suas respectivas abelhas.....	6
2. Análise estatística do teste de Concentração Inibitória em Placa do sobrenadante total em <i>Acinetobacter baumannii</i>	11
3. Análise estatística do teste de Concentração Inibitória em Placa do sobrenadante total em <i>Staphylococcus aureus</i>	12
4. Análises estatísticas do teste de Concentração Inibitória em Placa das frações proteicas e metabólicas em <i>Staphylococcus aureus</i>	14
5. Análises estatísticas do teste de Concentração Inibitória em Placa das frações proteicas e metabólicas em <i>Acinetobacter baumannii</i>	17

1. INTRODUÇÃO

Os meliponíneos, também conhecidos como abelhas sem ferrão, são o maior grupo de abelhas eussociais do mundo. Mais de 600 espécies foram descritas, sendo encontradas em áreas tropicais e subtropicais do mundo. Mais de 200 espécies, distribuídas em 29 gêneros diferentes, já foram descritas em todo o Brasil (LAVINAS *et al.*, 2019). Segundo Pedro e colaboradores (2014), cerca de 89 espécies são endêmicas no país, o que representa cerca de 20% do número total de abelhas sem ferrão neotropicais. Entre os gêneros com maior número de espécies conhecidas destacam-se: *Plebeia*, *Trigona*, *Melipona*, *Scaptotrigona* e *Trigonisca*.

A relevância ecológica das abelhas sem ferrão é inegável, pois esses insetos são polinizadores naturais de plantas nativas de diferentes biomas (FELIPE NETO, 2015). A polinização garante a manutenção da biodiversidade terrestre, e as abelhas sem ferrão, principalmente do gênero *Melipona*, destacam-se como as principais polinizadoras do bioma amazônico (KERR *et al.*, 1996). A espécie *Melipona subnitida* é endêmica do Nordeste brasileiro, mais especificamente do semiárido, onde é um dos mais importantes polinizadores do bioma Caatinga (FELIPE NETO, 2015). Além disso, a importância das abelhas sem ferrão no Brasil não se restringe somente a polinização da flora natural, culturas agrícolas de alto valor econômico também são beneficiadas por esses insetos (SLAA *et al.*, 2006).

Além do uso para polinizar diversas espécies de plantas cultiváveis, a importância socioeconômica das abelhas sem ferrão brasileiras se destaca pela obtenção de diversos produtos a partir da meliponicultura: incluindo mel, geoprópolis, pólen e cera (MARÇAL, 2017). Os produtos fornecidos pelas abelhas possuem alto potencial energético, sendo utilizados para fins alimentícios, além de possuírem conhecidas propriedades medicinais,

estando inseridos, há séculos, na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças (FÉAS *et al.*, 2012).

As abelhas sem ferrão, assim como a maioria dos organismos vivos, possuem relações simbióticas e mutualísticas com diversos microrganismos. Essas relações, muitas vezes, afetam diretamente a nutrição e saúde dos organismos (MARÇAL, 2017). A microbiota associada aos ninhos de abelhas sem ferrão inclui vírus, bactérias, leveduras e fungos filamentosos (De PAULA *et al.*, 2019). Bactérias e leveduras são metabolicamente ativas nas colmeias, e suas características fisiológicas, incluindo a produção de enzimas, fermentação de açúcar e produção de ácido orgânico, são fundamentais na transformação do pólen e do néctar, proporcionando mudanças bioquímicas que proporcionam benefícios nutricionais para as larvas e abelhas adultas (SOUZA *et al.*, 2021).

Os fungos filamentosos associados às abelhas sem ferrão e suas colmeias normalmente apresentam hábito de vida saprófita, mas também já foram relatados fungos patogênicos oportunistas em diferentes espécies de abelhas (De PAULA *et al.*, 2019). Barbosa e colaboradores (2018) observaram 21 espécies de *Penicillium* spp. e 6 de *Talaromyces* spp. em ninhos de *Melipona scutellaris*, verificando também a produção de metabólitos bioativos. No entanto, os benefícios de tais compostos para seus hospedeiros ainda não foram determinados. Paludo e colaboradores (2018) relataram, pela primeira vez, um caso de associação mutualística entre um fungo, identificado como *Monascus* sp. e uma abelha social. Os autores demonstraram que os micélios fúngicos devem ser transferidos de uma geração para a próxima, e as abelhas parecem se beneficiar de microrganismos que preservam seus alimentos armazenados e as protegem de outros microrganismos nocivos.

A partir da descoberta da penicilina, em 1929 por Alexander Fleming, as pesquisas com biomoléculas de origem fúngica se expandiram no mundo todo (HYDE *et al.*, 2019). De maneira geral, os fungos filamentosos se destacam pela capacidade de produzir

diferentes metabólitos secundários de interesse farmacêutico (BUDHIRAJA *et al.*, 2013). Compostos extracelulares secretados no meio de cultura que podem ser classificados como: antibióticos, toxinas, pigmentos e/ou hormônios (CHEN; HU, 2021). Além disto, os metabólitos secundários são produtos de alto valor econômico, que muitas vezes, podem ser isolados e caracterizado por apresentam inúmeras aplicações industriais (POLETO *et al.*, 2021). Em abelhas sem ferrão, os estudos têm focado principalmente na taxonomia e biodiversidade da microbiota fúngica, e o potencial biotecnológico dos fungos filamentosos permanece pouco explorado.

Nesse contexto, a busca por compostos fúngicos com ações antibióticas tem ganhado notória importância, uma vez que pode representar a solução para a disseminação de bactérias resistentes a maioria dos fármacos comercialmente disponíveis, conhecidas como bactérias multirresistentes (CANTO, 2020). A disseminação desses microrganismos é, atualmente, um dos principais problemas de saúde pública global, pois resulta no aumento considerável do tempo de hospitalização de pacientes internados, além da maior morbimortalidade e, paralelamente, contribui na elevação dos custos hospitalares (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013).

Além disso, os fármacos atualmente disponíveis no mercado já não apresentam a mesma eficiência no combate dessas bactérias. Os antibióticos utilizados para o tratamento de infecções bacterianas podem ser divididos em grupos com base no mecanismo de atividade antimicrobiana. Os principais grupos são: agentes que inibem a síntese da parede celular, despolarizam a membrana celular, inibem a síntese de proteínas, inibem a síntese de ácidos nucleicos e inibem as vias metabólicas em bactérias (VELÔSO; CAMPELO, 2017). Por outro lado, as bactérias podem apresentar diferentes mecanismos de resistência a estes agentes antimicrobianos, sendo os principais: limitação na absorção do fármaco, modificação de um alvo do fármaco, inativação ou efluxo ativo do fármaco

(CANTO, 2020). Esses mecanismos podem ser nativos dos microrganismos ou adquiridos de outros microrganismos, por meio de transferência horizontal de genes de resistência e recombinação genética (BAPTISTA, 2013).

Nesse contexto, a identificação de novos compostos com atividade antimicrobiana, capazes de superar os atuais mecanismos de resistência aos fármacos comercialmente disponíveis, torna-se essencial. Perante o exposto, o presente trabalho visa estudar o potencial biotecnológico de compostos fúngicos com atividade antimicrobiana a partir de microrganismos isolados de abelhas sem ferrão nativas do Brasil.

2. JUSTIFICATIVA

Diante da preocupação mundial com as dificuldades no combate a patógenos resistentes, a busca por novos fármacos com função antimicrobiana torna-se uma emergência.

Apesar de estudos recentes demonstrarem a biodiversidade fúngica em abelhas sem ferrão, pouco tem-se investigado o potencial biotecnológico que estes microrganismos possuem. Compostos produzidos por fungos filamentosos isolados de abelhas sem ferrão podem representar uma fonte promissora para descoberta de novas moléculas com ação antimicrobiana.

Este estudo aprimorará o conhecimento do potencial biotecnológico da microbiota das abelhas sem ferrão e fortalecer a pesquisa de metabólitos secundários produzidos por microrganismos no Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial antimicrobiano de compostos produzidos por fungos filamentosos isolados de abelhas sem ferrão nativas do Brasil sobre bactérias multirresistentes.

3.2. Objetivos Específicos

- Selecionar fungos filamentosos com potencial antimicrobiano sobre bactérias multirresistentes *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) e *Acinetobacter baumannii* (Gram-negativa), por meio da realização do teste primário em bloco de gelose.
- Verificar a atividade antimicrobiana do sobrenadante total das culturas fúngicas, em diferentes dias de fermentação, a partir do teste de Concentração Inibitória em Placa.
- Observar a existência da ação antimicrobiana das frações proteicas e metabólicas dos sobrenadantes das culturas fúngicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolados fúngicos

Os fungos filamentosos deste estudo foram isolados de *Melipona quadrifasciata*, *Melipona scutellaris*, *Frieseomelitta varia* e *Tetragonisca angustula* da Coleção de Microrganismos Isolados de Abelhas sem ferrão do Laboratório de Genética de Biotecnologia da UFU (CoMISBee), gentilmente cedidos para o estudo pelo Professor Dr. Carlos Ueira. Estes fungos encontram-se preservados em caldo Luria-Bertani (LB)

acrescido de glicerol (20%) em ultrafreezer a temperatura de -80 °C. Os fungos, indicados na tabela 1, foram reativados em meio sólido, Ágar Batata Dextrose (BDA) e posteriormente incubados a 30°C durante cinco dias. A tabela 1 demonstra a codificação dos fungos selecionados a partir da coleção CoMISBee. No total, foram selecionados 15 fungos filamentosos que apresentaram aspecto macroscópico diverso, incluindo 6 fungos isolados de *F. varia*, 5 de *M. quadrifasciata*, 2 de *M. scutellaris*, e 2 de *T. angustula*.

Tabela 1. Codificação dos fungos filamentosos da Coleção de Microrganismos Isolados de Abelhas sem ferrão do Laboratório de Genética de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia e suas respectivas abelhas.

Abelhas	Código dos Fungos Filamentosos					
<i>Frieseomelitta varia</i>	Fv01	Fv05	Fv06	Fv08	Fv09	Fv10
<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mq03	Mq05	Mq14	Mq20	Mq23	-
<i>Melipona scutellaris</i>	Ms35	Ms46C	-	-	-	-
<i>Tetragonisca angustula</i>	Ta26	Ta28	-	-	-	-

4.2. Microrganismos-teste

As bactérias patogênicas multirresistentes utilizadas nesse trabalho foram cedidas pelo grupo de pesquisa da professora Dra. Rosineide Marques Ribas do Laboratório de Microbiologia Molecular da UFU (MICROMOL), incluindo uma Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e outra Gram-negativa (*Acinetobacter baumannii*).

4.3. Teste primário em bloco de gelose

Neste teste descrito por Ichikawa e colaboradores, (1971), com algumas modificações, 0,5 mL das suspensões dos fungos filamentosos (em água destilada) foram plaqueadas em meio BDA (Batata Dextrose Ágar), seguindo-se de incubação por cinco dias a 30°C para o desenvolvimento do micélio. Após este período, blocos de 6 mm de diâmetro do

crescimento fúngico foram retirados e transferidos para placas de Petri contendo meio Ágar Müeller Hinton já semeados com 0,1 mL de suspensão (em água destilada) de cada microrganismo-teste, com turbidez da escala 0,5 de Mcfarland. As placas contendo o inóculo fúngico e a suspensão bacteriana foram incubadas a 37°C por, 24 a 48 horas, conforme figura 1. Após este período, os fungos que apresentaram halos de inibição ao redor do crescimento bacteriano, foram selecionados para a produção de sobrenadante e testes posteriores. O teste primário em bloco de gelose foi realizado em triplicata.

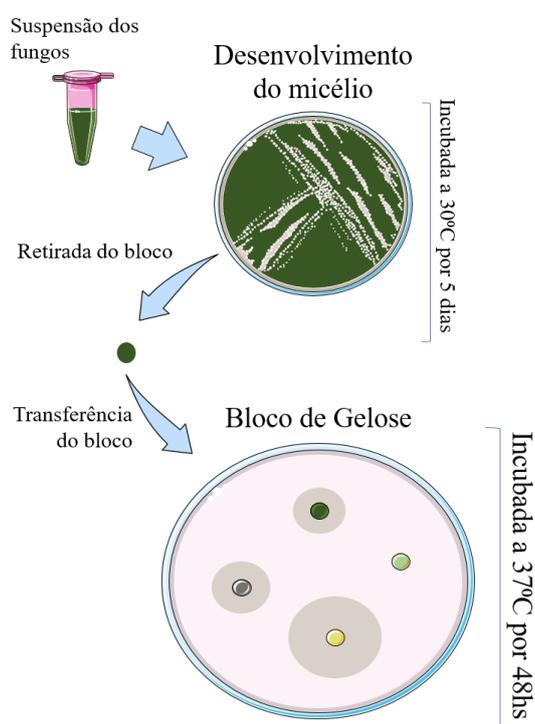


Figura 1: Esquema do teste em bloco de gelose.

4.4. Produção do sobrenadante

Os fungos com melhor atividade no teste primário em bloco de gelose foram selecionados para fermentação e produção do sobrenadante. Como descrito por Druzian e colaboradores (2020), com algumas modificações, um bloco de gelose de cada crescimento fúngico foi inoculado em 60 mL de caldo BD (Batata-Dextrose), mantidos sob agitação a 180 rpm a $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 5 dias. A cada 24 horas, uma alíquota de 10

mL do caldo fermentado foi coletada e centrifugada a 10.000 rpm por 4 minutos para recuperação do sobrenadante. Os sobrenadantes foram coletados até o 5º dia de fermentação e armazenados em freezer a -20 °C até o momento dos testes posteriores (figura 2).

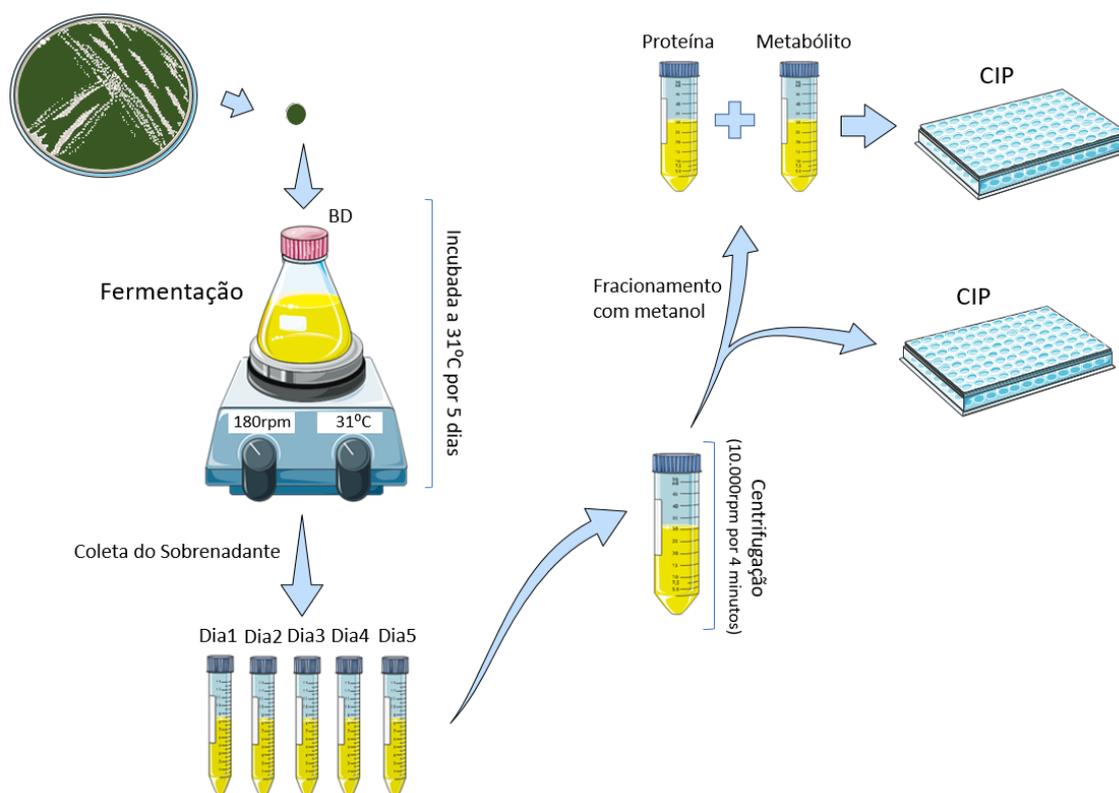


Figura 2: Processo de produção do sobrenadante fúngico.

4.5. Concentração Inibitória em Placa (CIP)

A concentração inibitória em placa foi conduzida para avaliar a capacidade dos sobrenadantes em inibir o crescimento das bactérias multirresistentes. Para isso, uma suspensão bacteriana de 10^4 células/mL de *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii* foi preparada em caldo Luria-Bertani (LB), e incubada a 37 °C por 24 horas. Em uma placa de 96 poços, transferiu-se 50 µL de cada sobrenadante juntamente com 50 µL da suspensão bacteriana. A placa foi incubada a 37 °C por 24 horas e o crescimento

bacteriano foi analisado em leitor de microplacas a 595 nm, nos tempos: 0, 6, 12 e 24 horas. A suspensão bacteriana livre de sobrenadante foi utilizada como controle positivo, e o caldo LB livre de suspensão bacteriana e sobrenadante como controle negativo, ambos com volume de 100 μ L por poço. O teste foi realizado em triplicata (SANTOS *et al.*, 2022).

4.6. Obtenção das frações proteicas e metabólicas dos sobrenadantes

Para a obtenção da fração proteica e metabólica, os sobrenadantes produzidos foram liofilizados e posteriormente solubilizados em 3 mL de metanol, seguido de incubação a 4 °C por 3 horas e centrifugação a 8.000 g por 5 minutos (JUNIOR, 2017). O precipitado proteico foi separado do sobrenadante metabólico, e o solvente evaporado em *speed vaco*. Para avaliar a atividade antimicrobiana as frações proteicas e metabólicas foram ressuspendidas em 3 mL de água destilada e o teste de CIP descrito no item 4.5 foi realizado com ambas as frações dos sobrenadantes.

4.7. Análises Estatísticas

Os dados obtidos a partir dos testes CIP com sobrenadante total e frações (proteicas e metabólica) foram expressos como médias aritméticas \pm erro padrão da média, e foram analisados de acordo com a variância para duas vias (ANOVA), seguida de pós-teste de Dunnet usando o software GraphPad Prism versão 8.0.2. A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$ (SANTOS *et al.*, 2022).

5. RESULTADOS

5.1. Teste primário em bloco de gelose

A partir do teste em bloco de gelose, observou-se que dos 15 fungos testados, sete apresentaram formação de halos inibitórios. Sendo, Fv10, Mq05 e Ms46C para *A. baumannii* e Fv01, Fv05, Mq03 e Ms35 para *S. aureus*. Diferentes fungos filamentosos isolados de *Frieseomilitta varia*, *Melipona quadrifasciata* e *Melipona scutellaris* apresentaram halos inibitórios para as bactérias multirresistentes, e nenhum fungo isolado de *Tetragonista angustula* apresentou formação de halo.

5.2. Concentração Inibitória em Placa (CIP)

5.2.1. Sobrenadante Total

Os três fungos filamentosos (Fv10, Mq05 e Ms46C) com ação inibitória em *A. baumannii*, e os outros quatro (Fv01, Fv05, Mq03 e Ms35) com ação em *S. aureus*, comprovada pelo teste primário em bloco de gelose, tiveram os sobrenadantes produzidos e testados na CIP. Os sobrenadantes foram retirados a cada 24 horas durante dos 5 primeiros dias de produção e os valores de p para os resultados de CIP (nos tempos 6, 12 e 24 horas) em *A. baumannii* e *S. aureus* encontram-se, respectivamente, nas tabelas 2 e 3. Para melhor entendimento, a codificação dos sobrenadantes encontra-se descrita conforme apêndice 1.

É importante ressaltar que, tanto para *A. baumannii* (tabela 2) quanto para *S. aureus* (tabela 3), 6 horas de tratamento com o sobrenadante total foi suficiente para inibição do crescimento microbiano para a maioria dos sobrenadantes testados, permanecendo com ação significativa até o tempo de 24 horas. Dos 15 sobrenadantes testados para *Acinetobacter baumannii*, apenas 2, obtidos de fungos isolados de *M. quadrifasciata* dos dias 1 e 4 de fermentação (SMq05D1 e SMq05D4, respectivamente), não demonstraram

efeito inibitório significativo em nenhum tempo de tratamento. Dos 20 sobrenadantes testados para *Staphylococcus aureus*, apenas SFv05D5, sobrenadante obtido de fungo isolado de *F. varia*, no quinto dia de fermentação, não demonstrou ação inibitória significativa em nenhum dos tempos de tratamento.

Tabela 2. Análise estatística do teste de Concentração Inibitória em Placa do sobrenadante total em *Acinetobacter baumannii*.

Abelha	Sobrenadante	Tempo de Tratamento (horas)		
		6	12	24
<i>Frieseomelitta varia</i>	SFv10D1	0.0013	0.0001	0.0044
	SFv10D2	0.0021	0.0001	0.0005
	SFv10D3	0.0133	0.0085	0.0047
	SFv10D4	0.0003	0.0122	0.0027
	SFv10D5	0.0171	0.0122	0.0283
<i>Melipona quadrifasciata</i>	SMq05D1	0,2910*	0,2950*	0,3149*
	SMq05D2	0.0001	0.0096	0,1392*
	SMq05D3	0.0001	0.0017	0.0066
	SMq05D4	0,1043*	0,9659*	0,9998*
	SMq05D5	0.0006	0,1318*	0.0273
<i>Melipona scutellaris</i>	SMs46CD1	0.0415	0.0437	0.0316
	SMs46CD2	0.0005	0.0037	0.0023
	SMs46CD3	0.0001	0.0001	0.0014
	SMs46CD4	0.0008	0,0810*	0.0016
	SMs46CD5	0.0045	0.0102	0,0836*

Os dados mostram a média do desvio padrão de três amostras. *Dados não significativos: $p > 0,05$

Tabela 3. Análise estatística do teste de Concentração Inibitória em Placa do sobrenadante total em *Staphylococcus aureus*.

Abelha	Sobrenadante	Tempo de Tratamento (horas)		
		6	12	24
<i>Frieseomelitta varia</i>	SFv01D1	0.0082	0.0093	0.0114
	SFv01D2	0.0068	0.0007	0,0521*
	SFv01D3	0.0008	0.0008	0.0097
	SFv01D4	0.0140	0.0058	0.0241
	SFv01D5	0,0572*	0.0170	0.0197
<i>Frieseomelitta varia</i>	SFv05D1	0.0003	0.0002	0.0001
	SFv05D2	0.0014	0.0001	0.0120
	SFv05D3	0.0040	0.0001	0.0184
	SFv05D4	0.0479	0.0092	0,1044*
	SFv05D5	0,1221*	0,0638*	0,1106*
<i>Melipona quadrifasciata</i>	SMq03D1	0.0243	0.0157	0.0193
	SMq03D2	0.0031	0,0731*	0,1186*
	SMq03D3	0.0007	0.0005	0.0227
	SMq03D4	0.0009	0.0002	0,0648*
	SMq03D5	0,1799*	0.0084	0.0006
<i>Melipona scutellaris</i>	SMs35D1	0.0011	0.0001	0.0030
	SMs35D2	0.0047	0.0001	0.0003
	SMs35D3	0.0182	0.0023	0.0197
	SMs35D4	0,0531*	0.0364	0,1906*
	SMs35D5	0.0362	0.0090	0.0003

Os dados mostram a média do desvio padrão de três amostras. * Dados não significativos: $p > 0,05$

5.2.2. Fração Proteica e Metabólica do Sobrenadante para *Staphylococcus aureus*

Para melhor entendimento, a codificação das frações proteica e metabólica dos sobrenadantes de todos os fungos filamentosos encontra-se descrita conforme apêndice 2.

A partir da tabela 4, nota-se que nenhuma das 20 frações proteicas testadas para *S. aureus* apresentou efeito significativo no tempo de 6 horas. Porém, nos tempos de 12 e 24 horas foi possível observar ação inibitória significativa da maioria das frações proteicas, exceto SFv01D5P, SFv05D2P, SFv05D5P e SMs35D5P, que não tiveram

efeito antimicrobiano em nenhum período do tratamento. Assim como para as frações proteicas, verificou-se que a maioria das 20 frações metabólicas também não apresentou ação antimicrobiana no tempo 6 horas de tratamento, com exceção apenas da fração SMq03D1M, obtida no 1º dia de fermentação a partir de fungo isolado de *M. quadrifasciata*. Além disso, de maneira semelhante às frações proteicas, a ação antimicrobiana significativa começa a ser percebida nos tempos de 12 horas e 24 horas de tratamento.

Tabela 4. Análises estatísticas do teste de Concentração Inibitória em Placa das frações proteicas e metabólicas em *Staphylococcus aureus*.

Fungo (abelha)	Fração Proteica (valor p)				Fração Metabólica (valor p)			
	Código Fração Proteica	Tempo de Tratamento (horas)			Código Fração Metabólica	Tempo de Tratamento (horas)		
		6 horas	12 horas	24 horas		6 horas	12 horas	24 horas
Fv01 (<i>F. varia</i>)	SFv01D1P	0,1226*	0.0011	0.0002	SFv01D1M	0,0875*	0.0030	0.0001
	SFv01D2P	0,1804*	0.0018	0.0003	SFv01D2M	0,2079*	0.0065	0.0008
	SFv01D3P	0,1845*	0.0206	0,6550*	SFv01D3M	0,0661*	0.0046	0.0014
	SFv01D4P	0,0905*	0.0013	0,5214*	SFv01D4M	0,0501*	0.0015	0.0001
	SFv01D5P	0,5563*	0.2936*	0,4049*	SFv01D5M	0,8832*	0,0769*	0.0279
Fv05 (<i>F. varia</i>)	SFv05D1P	0,1261*	0.0079	0.0001	SFv05D1M	0,0700*	0.0027	0.0001
	SFv05D2P	0,4668*	0,1567*	0,0520*	SFv05D2M	0,1165*	0.0046	0.0005
	SFv05D3P	0,4365*	0,0641*	0.0223	SFv05D3M	0,1028*	0.0025	0.0156
	SFv05D4P	0,1041*	0.0066	0.0010	SFv05D4M	0,0610*	0.0007	0.0004
	SFv05D5P	0,4020*	0,0733*	0,0080*	SFv05D5M	0,0692*	0.0008	0.0003
Mq03 (<i>M. quadrifasciata</i>)	SMq03D1P	0,1248*	0.0012	0.0002	SMq03D1M	0.0391	0.0048	0.0035
	SMq03D2P	0,2801*	0.0235	0.0108	SMq03D2M	0,0734*	0.0040	0.0010
	SMq03D3P	0,2007*	0.0042	0.0005	SMq03D3M	0,0654*	0.0064	0.0001
	SMq03D4P	0,1158*	0.0053	0.0009	SMq03D4M	0,0596*	0.0005	0.0088
	SMq03D5P	0,0847*	0.0021	0,1943*	SMq03D5M	0,0610*	0.0004	0.0006
Ms35 (<i>M. scutellaris</i>)	SMs35D1P	0,1917*	0.0153	0.0007	SMs35D1M	0,0677*	0.0061	0.0002
	SMs35D2P	0,1893*	0.0017	0.0002	SMs35D2M	0,0783*	0.0035	0.0003
	SMs35D3P	0,1041*	0.0085	0.0131	SMs35D3M	0,0608*	0.0008	0.0003
	SMs35D4P	0,1620*	0.0109	0.0033	SMs35D4M	0,0531*	0.0034	0.0017
	SMs35D5P	0,9679*	0,9994*	0,9877*	SMs35D5M	0,0687*	0.0036	0.0014

Os dados mostram a média do desvio padrão de três amostras. *Dados não significativos: $p > 0,05$

A figura 3 demonstra as frações proteicas com ação antimicrobiana significativa em *S. aureus*. De maneira geral, é possível observar ação inibitória das frações proteicas obtidas até o 4º dia de fermentação, que exibiram ação antimicrobiana em pelo menos um dos tempos de tratamento, e as frações que não demonstraram efeito foram aquelas do 5º dia de fermentação, com exceção da fração SMq03D5P no tempo de 6 horas de tratamento. Além disso, a fração SFv05D2P, obtida do 2º dia que também não apresentou efeito antimicrobiano significativo (Figura 3B).

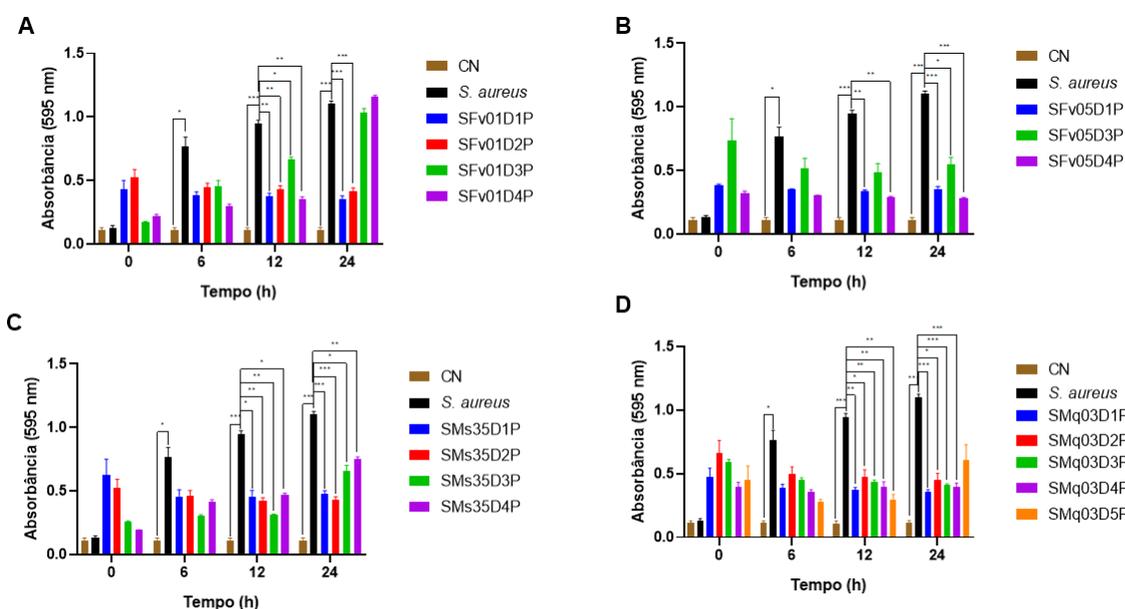


Figura 3: Frações proteicas com efeito antimicrobiano em *Staphylococcus aureus* em pelo menos um dos tempos de tratamento. Frações proteicas dos fungos filamentosos: (A) SFv01, (B) SFv05, (C) SMs35 e (D) SMq03. Os dados mostram a média SEM de três réplicas independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A figura 4 representa todas as frações metabólicas com ação antimicrobiana significativa em *S. aureus* em pelo menos um dos tempos de tratamento. É possível observar efeito inibitório das frações metabólicas obtidas desde o 1º dia de fermentação até o 5º dia e, quando comparado à ação das frações proteicas, podemos observar que a

parte metabólica do sobrenadante reduziu consideravelmente melhor o crescimento microbiano, com destaque para os fungos isolados de abelhas do gênero *Melipona* (Figura 4B e 4D).

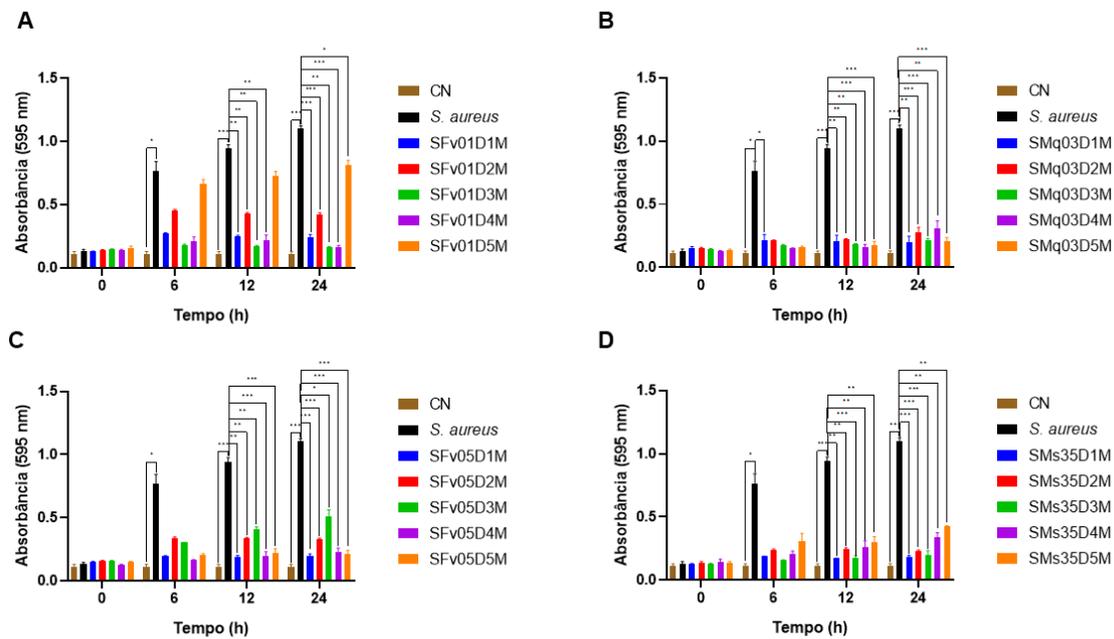


Figura 4: Frações metabólicas com efeito antimicrobiano em *Staphylococcus aureus* em pelo menos um dos tempos de tratamento. Frações metabólicas dos fungos filamentosos: (A) SFv01, (B) SMq03, (C) SFv05 e (D) SMs35. Os dados mostram a média SEM de três réplicas independentes. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

5.2.3 Fração Proteica e Metabólica do Sobrenadante para *Acinetobacter baumannii*

Ao contrário do observado para *S. aureus*, é possível visualizar que das 15 frações proteicas e metabólicas testadas em *A. baumannii* (tabela 5), a maioria apresentou ação antimicrobiana significativa, desde o tempo de 6 horas de tratamento, porém muitas perderam este efeito no tempo de 24 horas.

Tabela 5. Análises estatísticas do teste de Concentração Inibitória em Placa das frações proteicas e metabólicas em *Acinetobacter baumannii*.

Fungo (abelha)	Fração Proteica (valor p)				Fração Metabólica (valor p)			
	Código Fração Proteica	Tempo de Tratamento (horas)			Código Fração Metabólica	Tempo de Tratamento (horas)		
		6 horas	12 horas	24 horas		6 horas	12 horas	24 horas
Fv10 (<i>F. varia</i>)	SFv10D1P	0.0244	0,0797*	0,0634*	SFv10D1M	0,1196*	0.0344	0,0575*
	SFv10D2P	0.0036	0.0062	0,0959*	SFv10D2M	0.0321	0.0167	0,0540*
	SFv10D3P	0.0350	0.0199	0,8868*	SFv10D3M	0.0253	0,1182*	0,5856*
	SFv10D4P	0.0440	0,0991*	0,0707*	SFv10D4M	0.0006	0.0039	0.0138
	SFv10D5P	0.0013	0.0043	0.0248	SFv10D5M	0.0001	0.0001	0.0021
Mq05 (<i>M. quadrifasciata</i>)	SMq05D1P	0,0730*	0,5084*	0,0814*	SMq05D1M	0.0015	0.0262	0,0759*
	SMq05D2P	0.0016	0.0210	0,2554*	SMq05D2M	0.0026	0,1252*	0,1737*
	SMq05D3P	0.0071	0.0007	0.0427	SMq05D3M	0.0083	0.0030	0.0389
	SMq05D4P	0.0008	0,1202*	0,9732*	SMq05D4M	0.0002	0.0026	0,4049*
	SMq05D5P	0,0572*	0.0047	0,0581*	SMq05D5M	0.0001	0.0001	0.0087
Ms46C (<i>M. scutellaris</i>)	SMs46CD1P	0.0047	0.0418	0,9999*	SMs46CD1M	0.0017	0.0235	0.0358
	SMs46CD2P	0.0146	0,4074*	0,9970*	SMs46CD2M	0,0875*	0,1476*	0,2096*
	SMs46CD3P	0.0104	0,1354*	0.0028	SMs46CD3M	0.0001	0.0007	0.0133
	SMs46CD4P	0.0006	0.0007	0.0061	SMs46CD4M	0.0006	0.0001	0.0016
	SMs46CD5P	0.0024	0.0011	<0.0001	SMs46CD5M	0.0001	0.0013	0.0033

Os dados mostram a média do desvio padrão de três amostras. *Dados não significativos: $p > 0,05$

A figura 5 representa todas as frações proteicas com efeito antimicrobiano significativo para *A. baumannii* em pelo menos um dos tempos do experimento. É possível notar que, diferente do observado para *S. aureus*, as frações proteicas obtidas até o 5º dia de fermentação demonstraram efeito antimicrobiano significativo para *A. baumannii*, em pelo menos um dos tempos de tratamento, com exceção da fração SMq05D1P, obtida do 1º dia e sem efeito significativo (Figura 5A).

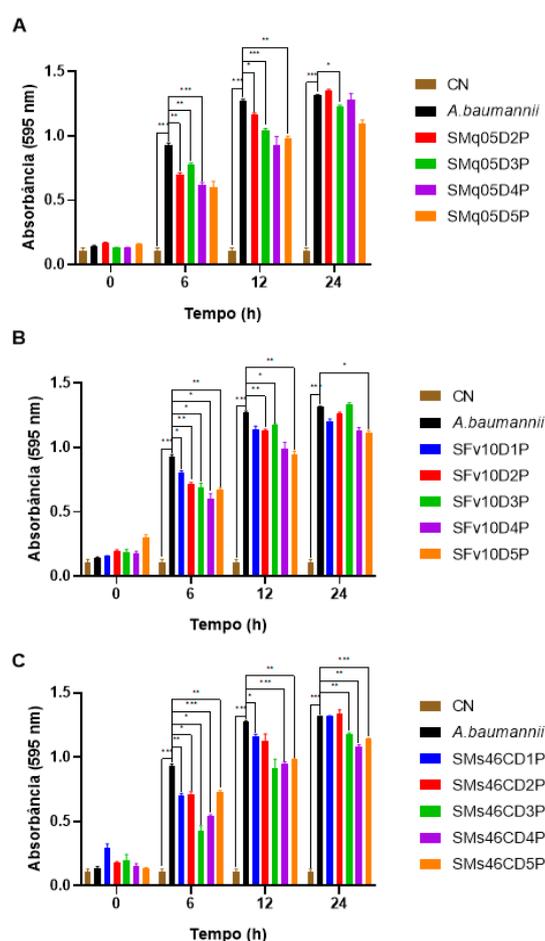


Figura 5: Frações proteicas com efeito antimicrobiano significativo em *Acinetobacter baumannii* em pelo menos um dos tempos de tratamento. Frações proteicas dos fungos filamentosos: (A) SMq05, (B) SFv10 e (C) SMs46C. Os dados mostram a média SEM de três réplicas independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Por fim, a maioria das 15 frações metabólicas testadas em *A. baumannii* apresentaram poder inibitório significativo, com poucas exceções (figura 6). Foi observado ação inibitória de frações metabólicas produzidas desde o 1º dia de fermentação até o 5º dia, e é possível notar que, assim como para *S. aureus*, a parte metabólica dos sobrenadantes sobre *A. baumannii* inibiu melhor o crescimento bacteriano quando comparado ao efeito da fração proteica.

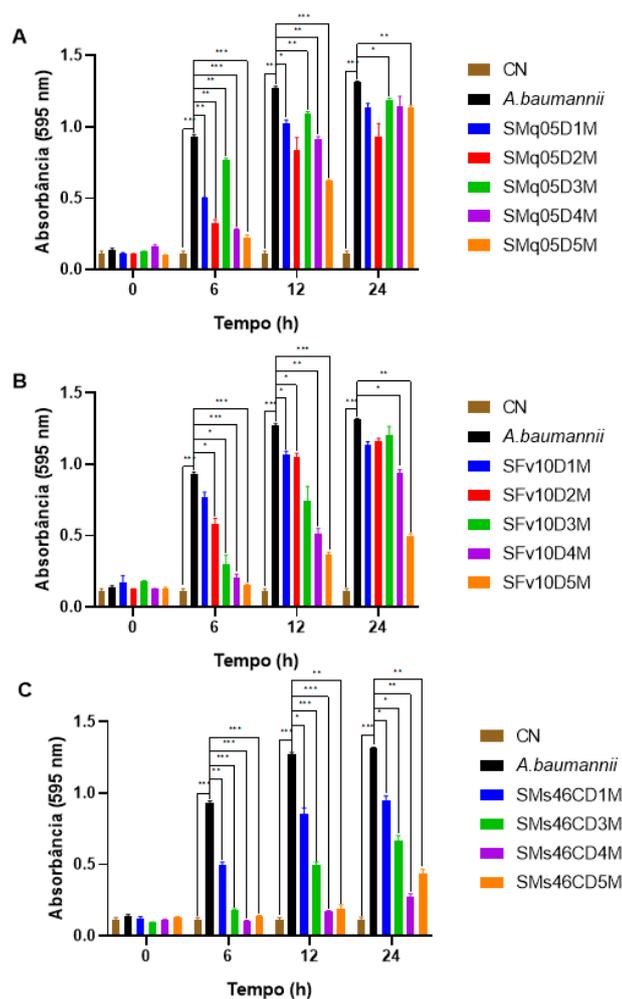


Figura 6: Frações metabólicas com efeito antimicrobiano significativo em *Acinetobacter baumannii* em pelo menos um dos tempos de tratamento. Frações metabólicas dos fungos filamentosos: (A) SMq05, (B) SFv10 e (C) SMs46C. Os dados mostram a média SEM de três réplicas independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6. DISCUSSÃO

Diante do cenário atual, com o aumento do número de infecções causadas por bactérias multirresistentes, a busca por novos antibióticos tem sido um dos grandes desafios da medicina moderna (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013). A preocupação com a falta de opções terapêuticas para tratar infecções bacterianas é crescente, uma vez que as indústrias farmacêuticas não investem os recursos necessários para o desenvolvimento de novos fármacos, capazes de combater essas infecções graves (ALANIS, 2005). Neste cenário, muitos pesquisadores têm buscado por biomoléculas, produzidas por microrganismos, para o desenvolvimento de novos antibióticos, mais eficazes ou superiores aos existentes (FALAGAS *et al.*, 2008). Dentre os microrganismos estudados, os fungos filamentosos se destacam pela elevada capacidade em produzir metabólitos secundários (CHEN; HU, 2021; POLETO *et al.*, 2021). Neste trabalho, identificamos fungos filamentosos capazes de inibir o crescimento de bactérias, indicando a presença de compostos secundários com ação antimicrobiana no sobrenadante desses fungos.

Devido à alta diversidade de espécies existentes de fungos, há também, uma grande diversidade de metabólitos secundários com ação antimicrobiana. Uma vez que, os agentes antimicrobianos sintetizados pelos fungos são uma ferramenta de sobrevivência. Entre os anos de 1982 e 2002, 70 dos 90 antibióticos comercializados originaram-se de produtos naturais, tendo como exemplo: a penicilina, a cefalosporina e o ácido fusídico produzidos, respectivamente, pelos fungos do gênero *Penicillium*, *Cephalosporium* e *Fusidium* (PELÁEZ, 2006).

Muitos estudos demonstram a ação antimicrobiana de metabólitos obtidos de fungos filamentosos isolados de diversas amostras ambientais, incluindo solo, sedimentos marinhos, ecossistemas florestais e sedimentos fluviais (SVAHN *et al.*, 2012; DAVI *et al.*, 2017; ALKHULAIFI *et al.*, 2019; YURCHENKO *et al.*, 2021). No entanto, a maioria

dos estudos relacionados à microbiota das abelhas sem ferrão se concentra na identificação dos microrganismos, alguns consideram as contribuições bioquímicas dos micróbios (GILLIAM *et al.*, 1990; TEIXEIRA *et al.*, 2003; PROMNUAN *et al.*, 2009; KROISS *et al.*, 2010), e poucos investigam a biologia ou função dos microrganismos, que permanecem pouco esclarecidos (HERBERT e SHIMANUKI, 1978; LOPER *et al.*, 1980; STANDIFER *et al.*, 1980; FERNANDES-DA-SILVA e SERRÃO, 2000; ANDERSON *et al.*, 2011). Neste estudo, o potencial biotecnológico antimicrobiano foi acessado a partir de compostos produzidos por fungos filamentosos isolados do alimento larval de abelhas sem ferrão nativas do Brasil, que por ser um ambiente ainda pouco explorado, pode ser promissor para obtenção de novos compostos.

Sabe-se que o alimento larval de abelhas sem ferrão é rico em bactérias, leveduras e fungos filamentosos (SANTOS *et al.*, 2022), que fornecem enzimas digestivas, ácidos orgânicos e antibióticos, que auxiliam na pré-digestão dos estoques de alimentos e inibem o crescimento de microrganismos contaminantes (GILLIAM, 1989). Estudos realizado por Pires e Paiva (2018) com fungos endofíticos isolados da floresta tropical seca brasileira (Caatinga), mostrou que dos 30 isolados, oito demonstraram ação antimicrobiana sobre microrganismo patogênico, entre eles *S. aureus*, com formação de halos que variaram de 10,0 a 22 mm. Já o nosso trabalho demonstrou efeito antimicrobiano a partir de halos de inibição do crescimento bacteriano para 47% (15/7) dos fungos utilizados inicialmente.

Além disso, em nosso estudo, foi observado que os fungos Fv01; Fv05; Mq03 e Ms35 produziram moléculas com ação antimicrobiana contra a bactéria *S. aureus* (Gram-positiva) mas não apresentam a mesma ação na bactéria *A. baumannii* (Gram-negativa). E as moléculas, que foram sintetizadas pelos fungos Fv10; Mq05 e Ms46C, apresentaram efeito sobre a Gram-negativa, sem ação em *S. aureus*. Este resultado estaria dentro do

esperado, uma vez que, considerando as grandes diferenças anatômicas entre as células bacterianas, os estudos demonstram que moléculas que atuam sobre as Gram-positivas, geralmente, não possuem efeito significativo sobre as Gram-negativas, e vice-versa (RICHTER; HERGENROTHER, 2019).

Muitos antibióticos, atualmente disponíveis para tratamento de infecções, atuam sobre a parede celular bacteriana e são mais eficazes contra bactérias Gram-positivas, que possuem uma camada muito mais espessa de peptidoglicano em sua parede celular do que bactérias Gram-negativas (BLAIR *et al.*, 2015). Um exemplo clássico é a penicilina, antibiótico β -lactâmico produzido por fungos do gênero *Penicillium*, que atua inibindo a formação da camada de peptidoglicano, impedindo a síntese da parede celular bacteriana, levando a bactéria a lise osmótica e morte. As primeiras penicilinas naturais utilizadas na medicina têm ação principalmente em bactérias Gram-positivas e possuindo baixa toxicidade às células humanas (SOUZA *et al.*, 2022).

A busca de novos antimicrobianos tem mostrado que há maior dificuldade na descoberta de novos compostos bioativos contra bactérias Gram-negativas do que contra as Gram-positivas. Segundo Motamedi (2010) e Darabpour *et al.*, (2012), este fato pode ser explicado por mecanismos de escape aos antimicrobianos em Gram-negativas, tais como: a baixa permeabilidade, devido a presença de múltiplas membranas, bombas de efluxo, que ejetam o antibiótico para fora da célula, e secreção de enzimas no espaço periplasmático, que inativam moléculas estranhas ao microrganismo. Isso reafirma a importância da descoberta de novas moléculas com ação antimicrobiana, principalmente com ação em bactérias multirresistentes Gram-negativas. Em nosso estudo, dos 7 fungos selecionados para a produção de sobrenadantes, 4 demonstraram ação sobre *S. aureus* (Gram-positiva) e 3 em *A. baumannii* (Gram-negativa), dados importantes na busca por possíveis alternativas ao combate a resistência bacteriana.

No estudo de Cruz e colaboradores (2014), méis de espécies das abelhas sem ferrão, *Melipona compressipes*, *M. seminigra* e *Apis mellifera*, demonstraram ação antibacteriana contra patógenos humanos importantes, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Chromobacterium violaceum* e *Candida albicans*. Na pesquisa de Svahn e colaboradores (2012), 20 fungos filamentosos isolados de sedimentos fluviais altamente contaminados por antibióticos apresentaram ação antimicrobiana contra as bactérias restantes *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. No trabalho de David *et. al.* (2017) foi observado a atividade antimicrobiana dos fungos *Fusarium proliferatum* e *Penicillium janthanellum*, isolados do ecossistema florestal do nordeste da Índia, contra as bactérias *S. aureus*, *B. anthracis*, *S. typhimurium* e *E. coli*. No entanto, pesquisas que avaliam o potencial antimicrobiano de fungos filamentosos isolados de abelhas sem ferrão são escassos.

Nosso estudo mostrou, por meio do teste de CIP, que os sobrenadantes produzidos por fungos isolados do alimento larval das abelhas *Melipona quadrifasciata*, *Melipona scutellaris* e *Frieseomelitta varia* apresentam ação antimicrobiana contra bactérias multirresistentes Gram-positivas e Gram-negativas, assim como as frações proteicas e metabólicas destes sobrenadantes. Sendo assim, pode-se constatar que todos os fungos filamentosos selecionados foram capazes de produzir moléculas proteicas e metabólicas com efeito antimicrobiano. De forma semelhante, a pesquisa de Rosa (2018) foi capaz de identificar frações fúngicas com atividade antimicrobiana contra as bactérias *S.aureus*, *Salmonella sp.*, *E. coli* e *V. parahaemolyticus*. Já no estudo de Medina (2015), duas frações provenientes de fungos marinhos apresentaram ação antimicrobiana contra a linhagem de *E. coli*.

Neste trabalho, em *S. aureus*, foi possível observar ação inibitória das frações proteicas obtidas até o 4º dia de fermentação, não observando efeito dessa parte proteica

a partir do 5º dia de produção do sobrenadante. A parte proteica do sobrenadante pode ser constituída por peptídeos, toxinas ou enzimas com ação antimicrobiana, cuja produção pode estar associada ao crescimento vegetativo do micélio fúngico (TORTORA *et al.*, 2017). Atualmente, muitos estudos têm buscado por metabólitos peptídicos, compostos valiosos no que diz respeito às propriedades citotóxicas e descoberta de drogas antibióticas (MOJSOSKA; JENSSEN, 2015).

Apesar dos efeitos individuais significativos dos sobrenadantes fracionados, o sobrenadante fúngico total foi mais efetivo em *S. aureus*, uma vez que apresentou atividade antimicrobiana desde o início do teste CIP, e as frações iniciaram seus efeitos somente a partir de 12 horas de tratamento. Sendo assim, sugere-se que a interação entre as biomoléculas proteicas e metabólicas potencializa a atividade antimicrobiana, produzindo um resultado mais efetivo no combate a *S. aureus*. O mesmo não foi verificado para a bactéria *A. baumannii*.

O uso concomitante de antibióticos, conhecido como terapia combinada, é a conciliação de dois ou mais antibióticos no tratamento de uma única infecção e se constitui como uma alternativa para o combate de bactérias multirresistentes, pois amplia o espectro de ação destes fármacos. Um dos efeitos dessa linha terapêutica é a potencialização do efeito dos antibióticos quando comparado com suas administrações individuais. Em terapias alternativas a combinação do mel de manuka com a rifampicina melhorou sua efetividade contra biofilmes de *S. aureus* (SULLIVAN, 2020).

Este trabalho traz novas perspectivas para produção de antimicrobianos a partir de fungos filamentosos isolados de abelhas sem ferrão nativas do Brasil. Trazendo a público a existência de moléculas capazes de inibir o crescimento de bactérias multirresistentes Gram-positivas e Gram-negativas.

7. CONCLUSÃO

A partir deste estudo foi possível selecionar 7 fungos filamentosos isolados do alimento larval de abelhas sem ferrão, com potencial biotecnológico antimicrobiano em bactérias patogênicas multirresistentes *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii*.

Foi possível verificar ação antimicrobiana a partir do sobrenadante total, e também de frações proteicas e metabólicas, cumprindo com os objetivos propostos para o presente trabalho.

A continuidade dos estudos faz-se necessária uma vez que os resultados apresentados indicam uma possível alternativa para o combate à resistência bacteriana aos fármacos atualmente disponíveis no mercado. Dentre as perspectivas futuras estão a identificação dos fungos filamentosos utilizados; a determinação das moléculas proteicas e metabólicas que apresentaram ação antimicrobiana; e a realização do teste de concentração inibitória mínima para definir a menor concentração destas substâncias capaz de impedir o crescimento das bactérias multirresistentes.

8. REFERÊNCIAS

ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?. **Archives of medical research**, v. 36, n. 6, p. 697-705, 2005.

ALKHULAIFI, M. M. *et al.* Evaluation of antimicrobial activity of secondary metabolites of fungi isolated from Sultanate Oman soil. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 3, p. 401-405, 2019.

ALMEIDA, R. S. *et al.* GC-MS Profile and Enhancement of Antibiotic Activity by the Essential Oil of *Ocotea odorifera* and Safrole: Inhibition of *Staphylococcus aureus* Efflux Pumps. **Antibiotics**, v. 02, p. 1-15, mai. 2020.

ANDERSON, K. E. *et al.* An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). **Insectes Sociaux**, v. 58, n. 4, p. 431-444, 2011.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de resistência aos antibióticos**. 2013 51 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.

BARBOSA, R. N. *et al.* New *Penicillium* and *Talaromyces* species from honey, pollen and nests of stingless bees. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, p. 1883–1912, abr. 2018.

BAUER, A. W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BLAIR, J. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

BUDHIRAJA, A. *et al.* Bioactive metabolites from an endophytic fungus of *Aspergillus* species isolated from seeds of *Gloriosa superba* Linn. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, p. 323–329, mar. 2012.

CANTO, E. S. M. **Diversidade e produção de antimicrobianos dos fungos decompositores de madeira submersa em lagos da região do baixo rio Tapajós - Pará.** 2020 117 p. Dissertação (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Programa de pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, 2020.

CHEN, W.; HU, Q. Secondary metabolites of *Purpureocillium lilacinum*. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 18, 2021.

CRUZ, C. B. N. *et al.* Antimicrobial activity of honeys from two stingless honeybee species and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) against pathogenic microorganisms. **Acta Amazonica**, v. 44, p. 287-290, 2014.

DARABPOUR, E. *et al.* Isolation of a potent antibiotic producer bacterium, especially against MRSA, from northern region of the Persian Gulf. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 12, n. 2, p. 108, 2012.

De PAULA, G. T. *et al.* Stingless bees and microbial interactions. **Current Opinion in Insect Science**, v. 44, p. 1-7, 2020.

DEVI, S. I. *et al.* Bio-mining the forest ecosystem of North East India for identification of antimicrobial metabolites from fungi through submerged fermentation. **Bioresource technology**, v. 241, p. 1168-1172, 2017.

DRUZIAN, S. P. *et al.* Production of metabolites with antioxidant activity by *Botryosphaeria dothidea* in submerged fermentation. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 43, n. 1, p. 13-20, 2020.

FALAGAS, M. E.; GRAMMATIKOS, A. P.; MICHALOPOULOS, A. Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 6, n. 5, p. 593-600, 2008.

FÉAS, X. *et al.* Organic bee pollen: Botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 8359–8377, 2012.

FELIPE NETO, C. A. L. **Influência da estrutura da paisagem sobre a produção e qualidade de mel da abelha jandaíra (*Melipona subnitida*, Apidae: Meliponini) na Caatinga**. 2015. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2015.

FERNANDES-DA-SILVA, P. G.; SERRÃO, J. E. Nutritive value and apparent digestibility of bee-collected and bee-stored pollen in the stingless bee, *Scaptotrigona postica* Latr.(Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 39-45, 2000.

GILLIAM, M.; ROUBIK, D. W.; LORENZ, B. J. Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. **Apidologie**, v. 21, n. 2, p. 89-97, 1990.

GILLIAM, M.; ROUBIK, D. W.; LORENZ, B. J. Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. **Apidologie**, v. 21, n. 2, p. 89-97, 1990.

HERBERT Jr, E. W.; SHIMANUKI, H. Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. **Apidologie**, v. 9, n. 1, p. 33-40, 1978.

HYDE, K. D. *et al.* The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. **Fungal Diversity**, v. 97, p. 1 – 136, jul. 2019.

ICHIKAWA, T.; DATE, M.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of Kasugamycin-producing Strain by the Agar Piece Method and Prototroph Method. **Folia Microbiológica**, v. 16, p. 218 - 224, 1971.

JUNIOR, A. G. S. *et al.* Avaliação de métodos para obtenção de proteínas recombinantes. **Science And Animal Health**, v. 5, n. 2, p. 166-177, 2017.

KERR W E, CARVALHO G A, NASCIMENTO V A, **Abelha uruçú**: biologia, manejo e conservação. Belo Horizonte: Fundação Acangaú, 1996.

KROISS, J. *et al.* Symbiotic streptomycetes provide antibiotic combination prophylaxis for wasp offspring. **Nature Chemical Biology**, v. 6, n. 4, p. 261-263, 2010.

LAVINAS, F. C. *et al.* Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 29, p. 389-399, 2019.

LAXMINARAYAN, R. *et al.* Antibiotic resistance-the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057–1098, 2013.

LOPER, G. M. *et al.* Biochemistry and microbiology of bee-collected almond (*Prunus dulcis*) pollen and bee bread. I-Fatty Acids, Sterols, Vitamins and Minerals. **Apidologie**, v. 11, n. 1, p. 63-73, 1980.

MARÇAL, L. N. **Comunidades bacterianas associadas a colônias de abelhas amazônicas sem ferrão da espécie *Melipona Seminigra*: diversidade e potencial enzimático.** 2017. 134 p. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) - Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.

MEDINA, R. P. **Prospecção química e biológica das algas vermelhas *Asparagopsis taxiformis* e *Pyropia spiralis* e seus fungos endofíticos.** Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista. Araraquara, São Paulo, p. 430, 2016.

MOHAMED, S. *et al.* Antibacterial effects of antibiotics and cell-free preparations of probiotics against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* associated with conjunctivitis. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, p. 1558–1565, out. 2020.

MOJSOSKA, B.; JENSSEN, H. Peptides and peptidomimetics for antimicrobial drug design. **Pharmaceuticals**, v. 8, n. 3, p. 366-415, 2015.

MOTAMEDI, H. Antibacterial activity of hydroalcoholic extract of *Callistemon citrinus* and *Albizia lebbek*. **American Journal of Applied Sciences**, v. 7, n. 1, p. 13-16, 2010.

PEDRO, S. R. M. The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348-354, dez. 2014.

PALUDO, C. R. *et al.* Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products—can history repeat?. **Biochemical pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 981-990, 2006.

PIRES, I. M. O.; PAIVA, L. M. Potencial Antimicrobiana de Endofítico de Plantas da Caatinga contra Bactérias Patogênicas ao Homem. **Anais do XXIII CONIC VII CONITI e IV ENIC** p. 1-4, 2008.

POLETO, L. *et al.* Production of antimicrobial metabolites against pathogenic bacteria and yeasts by *Fusarium oxysporum* in submerged culture processes. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 6, p. 1321-1332, 2021.

PROMNUAN, Y.; KUDO, T.; CHANTAWANNAKUL, P. Actinomycetes isolated from beehives in Thailand. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 1685-1689, 2009.

RICHTER, M. F.; HERGENROTHER, P. J. The challenge of converting Gram-positive-only compounds into broad-spectrum antibiotics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1435, n. 1, p. 18-38, 2019.

ROSA, B. M. P. **Potencial Antimicrobiano de Fungos no Controle de Microorganismos Contaminantes de Pescado**. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Pesca) - Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Piúma. Piúma, p. 76, 2018.

SANTOS, A. C. C. *et al.* Antimicrobial activity of supernatants produced by bacteria isolated from Brazilian stingless bee's larval food. **BMC microbiology**, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2022.

SLAA, E. J. *et al.* Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie**, v. 37, p. 293-315, 2006.

SOUZA, E. C. A.; MENEZES, C.; FLACH A. Stingless bee honey (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a review of quality control, chemical profile, and biological potential. **Apidologie**, v. 52, p. 113-132, 2021.

SOUZA, J. F.; DIAS, F. R.; ALVIM H. G. O. Resistência Bacteriana aos Antibióticos. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos** v. 5, n.10, p. 281-293, 2022.

STANDIFER, L. N. *et al.* Biochemistry and microbiology of pollen collected by honey bees (*Apis mellifera* L.) from almond, *Prunus dulcis*. II. Protein, amino acids and enzymes. **Apidologie**, v. 11, n. 2, p. 163-171, 1980.

SULLIVAN, G. J. *et al.* How antibiotics work together: Molecular mechanisms behind combination therapy. **Current opinion in microbiology**, v. 57, p. 31-40, 2020.

SVAHN, K. S. *et al.* Antimicrobial activity of filamentous fungi isolated from highly antibiotic-contaminated river sediment. **Infection ecology & epidemiology**, v. 2, n. 1, p. 11591, 2012.

TEIXEIRA, A. C. P. *et al.* *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 339-343, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE C. L. **Microbiologia**, 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2017.

VELÔSO, D. S.; CAMPELO V. Incidência de infecções bacterianas e o perfil antimicrobiano utilizado no tratamento dos pacientes de um hospital de ensino. **Revista Interdisciplinar Ciência e Saúde**, v. 4, n. 2, p. 19-28, 2017.

YURCHENKO, A. N.; GIRICH, E. V.; YURCHENKO, E. A. Metabolites of marine sediment-derived Fungi: Actual trends of biological activity studies. **Marine Drugs**, v. 19, n. 2, p. 88, 2021.

APÊNDICE 1

Tabela da Codificação dos sobrenadantes produzidos por fungos filamentosos isolados de diferentes espécies de abelhas sem ferrão referentes a cada dia de fermentação.

Abelha	Fungo Filamentoso	Dia de Fermentação	Código do Sobrenadante
<i>F. varia</i>	Fv01	D1	SFv01D1
		D2	SFv01D2
		D3	SFv01D3
		D4	SFv01D4
		D5	SFv01D5
	Fv05	D1	SFv05D1
		D2	SFv05D2
		D3	SFv05D3
		D4	SFv05D4
		D5	SFv05D5
	Fv10	D1	SFv10D1
		D2	SFv10D2
		D3	SFv10D3
		D4	SFv10D4
		D5	SFv10D5
<i>M. quadrifasciata</i>	Mq03	D1	SMq03D1
		D2	SMq03D2
		D3	SMq03D3
		D4	SMq03D4
		D5	SMq03D5
	Mq05	D1	SMq05D1
		D2	SMq05D2
		D3	SMq05D3
		D4	SMq05D4
		D5	SMq05D5
<i>M. scutellaris</i>	Ms35	D1	SMs35D1
		D2	SMs35D2
		D3	SMs35D3
		D4	SMs35D4
		D5	SMs35D5
	Ms46C	D1	SMs46CD1
		D2	SMs46CD2
		D3	SMs46CD3
		D4	SMs46CD4
		D5	SMs46CD5

Para entendimento da codificação lê-se, como exemplo, SFv01D1: Sobrenadante do fungo Fv01, isolado de *F. varia*, do primeiro dia de fermentação (D1).

APÊNDICE 2

Codificação das frações proteicas e metabólicas dos sobrenadantes produzidos por fungos filamentosos isolados de abelha sem ferrão.

Código Sobrenadante	Código Fração Proteica	Código Fração Metabólica
SFv01D1	SFv01D1P	SFv01D1M
SFv01D2	SFv01D2P	SFv01D2M
SFv01D3	SFv01D3P	SFv01D3M
SFv01D4	SFv01D4P	SFv01D4M
SFv01D5	SFv01D5P	SFv01D5M
SFv05D1	SFv05D1P	SFv05D1M
SFv05D2	SFv05D2P	SFv05D2M
SFv05D3	SFv05D3P	SFv05D3M
SFv05D4	SFv05D4P	SFv05D4M
SFv05D5	SFv05D5P	SFv05D5M
SFv10D1	SFv10D1P	SFv10D1M
SFv10D2	SFv10D2P	SFv10D2M
SFv10D3	SFv10D3P	SFv10D3M
SFv10D4	SFv10D4P	SFv10D4M
SFv10D5	SFv10D5P	SFv10D5M
SMq03D1	SMq03D1P	SMq03D1M
SMq03D2	SMq03D2P	SMq03D2M
SMq03D3	SMq03D3P	SMq03D3M
SMq03D4	SMq03D4P	SMq03D4M
SMq03D5	SMq03D5P	SMq03D5M
SMq05D1	SMq05D1P	SMq05D1M
SMq05D2	SMq05D2P	SMq05D2M
SMq05D3	SMq05D3P	SMq05D3M
SMq05D4	SMq05D4P	SMq05D4M
SMq05D5	SMq05D5P	SMq05D5M
SMs35D1	SMs35D1P	SMs35D1M
SMs35D2	SMs35D2P	SMs35D2M
SMs35D3	SMs35D3P	SMs35D3M
SMs35D4	SMs35D4P	SMs35D4M
SMs35D5	SMs35D5P	SMs35D5M
SMs46CD1	SMs46CD1P	SMs46CD1M
SMs46CD2	SMs46CD2P	SMs46CD2M
SMs46CD3	SMs46CD3P	SMs46CD3M
SMs46CD4	SMs46CD4P	SMs46CD4M
SMs46CD5	SMs46CD5P	SMs46CD5M

Para entendimento da codificação lê-se, como exemplo, SFv01D1P: Sobrenadante do fungo Fv01, isolado de *F. varia*, dia 1 de fermentação (D1), fração Proteica (P); ou SFv01D1M: Sobrenadante do fungo Fv01, isolado de *F. varia*, dia 1 de fermentação (D1), fração Metabólica (M).