

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação do potencial antioxidante de sobrenadantes produzidos por fungos filamentosos isolados do alimento de larvas de abelhas sem ferrão

Luiz Fernando Covizzi Castilho

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

Uberlândia – MG
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação do potencial antioxidante de sobrenadantes produzidos por fungos filamentosos isolados do alimento de larvas de abelhas sem ferrão

Luiz Fernando Covizzi Castilho

Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Bonetti / IBTEC – UFU
Orientadora

Dr^ª Ana Carolina Costa Santos / IBTEC– UFU
Co-orientadora

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

Uberlândia – MG

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação do potencial antioxidante de sobrenadantes produzidos por fungos filamentosos isolados do alimento de larvas de abelhas sem ferrão

Luiz Fernando Covizzi Castilho

Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Bonetti / IBTEC – UFU
Orientadora

Dr^ª Ana Carolina Costa Santos / IBTEC– UFU
Co-orientadora

Homologado pela coordenação do Curso de
Biotecnologia em __/__/__

Nilson Nicolau Junior
Coordenador do curso de Biotecnologia

Uberlândia – MG
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação do potencial antioxidante de sobrenadantes produzidos por fungos filamentosos isolados do alimento de larvas de abelhas sem ferrão

Luiz Fernando Covizzi Castilho

Aprovado pela banca examinadora em: / / Nota: _____

Nome e assinatura do presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de

AGRADECIMENTOS

A graduação foi uma longa e difícil caminhada em que muitas pessoas fizeram parte, me dando apoio emocional e moral. Muitas vezes eu pensei que seria impossível continuar e estas pessoas estavam comigo me incentivando e me dando forças, fazendo o possível e o impossível pra que meu sonho se tornasse realidade. Por isso, deixo aqui os agradecimentos a todos que participaram desta caminhada, direta ou indiretamente.

Agradeço à Dra. Ana Maria Bonetti pela orientação, suporte e confiança durante todo o meu caminho na graduação. À minha co-orientadora Ana Carolina Costa Santos, por todos os ensinamentos, companheirismo, dedicação, puxões de orelha, e principalmente amizade. Obrigado por acreditarem em mim e neste projeto, vocês foram essenciais na minha jornada.

À banca examinadora Msc. Matheus Henrique Silva e Dra. Renata Roland Teixeira por aceitarem o convite e contribuírem com suas ideias no trabalho.

Agradeço aos meus pais, Luís Antônio Barbeiro Castilho e Sueli Aparecida Covizzi Castilho por serem as maiores inspirações na minha vida, vocês são exemplos de perseverança, humildade, força de vontade. Obrigado por todo amor e suporte, sem vocês eu não seria nada hoje, tudo isso é por vocês. Obrigado por passarem horas comigo no telefone perguntando sobre meu projeto, isso me deu forças pra continuar. Obrigado por toda preocupação, por cada ensinamento, por cada palavra de apoio. Agradeço a minha irmã Rafaela Covizzi Castilho por me apoiar nos momentos difíceis e ser minha companheira. Amo muito vocês.

Aos meus avós, Aparecida Fávero Covizzi†, Anides Covizzi† por desde criança me apoiarem em todos meus sonhos. Agradecer por todas as conversas que tive com a “vó pina” enquanto estávamos trancados fazendo os procedimentos da diálise, sempre me ensinando sobre a vida. Ao “vô nide” por ser o um retrato de amor e companheirismo em todos os momentos. Carrego vocês em meu coração pra todo sempre. E também para minha avó Elza Pelizer Castilho, pelo companheirismo e por todo apoio me dado até hoje. Vocês todos são exemplos de missão cumprida.

Quero agradecer a todos os professores que conheci durante toda a minha graduação, pela dedicação e por me agregarem tanto conhecimento e me fazerem a pessoa que sou hoje.

À equipe do Laboratório de Genética (LabGen), a prof. Ana Maria Bonetti, que além de me orientar me tratou como filho, me deu vários puxões de orelha e “tirou suco”; a minha amiga e

companheira de trabalho Tainá Longarezi Mano que sempre esteve muito disposta a me ajudar, e conseguiu tornar o trabalho mais leve com as nossas rodinhas de conversas. À Carol que me introduziu neste universo da microbiologia e reascendeu a minha vontade de fazer ciência, que sempre foi minha companheira, me dando dicas e ensinamentos que vou carregar para sempre na minha vida. E principalmente a Serena, que desde o início do meu período como estagiário fez com que eu me sentisse parte do laboratório, sempre me ajudando nos momentos em que eu mais precisei, muito obrigado pela sua amizade, sou muito grato por tudo que fez por mim.

Ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFU, sobretudo ao Professor Dr. Foued Espindola e Renner que me forneceram amparo durante meus ensaios antioxidantes.

À turma B18 e “agregados” por tornarem a minha trajetória mais leve, divertida e enriquecedora. Principalmente a Ludmilla, Gabriela e Lúrian, guardo vocês no coração. Aos meus amigos que mesmo estando em outras cidades sempre me acompanharam, apoiaram, e acreditaram no meu potencial, André Castelucci, Eduardo Zacarin, Giane Braitte, Hélio Passareli, Aron Contatore, Guilherme Bernussi, Gustavo Lopes, Eduardo Abich, Natanael de Oliveira, Rafael de Oliveira, Sairã Alberto, Gustavo Araújo e Rafael Pohlmann, obrigado por estarem comigo, por todos os conselhos e noites viradas.

Meus amigos André, Eduardo e Giane, que mesmo de longe e eu não conseguindo manter contato constantemente não deixaram nossa amizade abalar. Sempre me dando puxões de orelha quando precisavam, dicas, conselhos (que eu quase nunca seguia) mas principalmente eles estavam lá nos momentos mais difíceis e eram meus refúgios, obrigado por tanto. Hélio, Aron, Guilherme e Gustavo foram pessoas que surgiram na minha vida recentemente, mas acrescentaram tanto que nem sei como explicar. Obrigado por todas as noites e fofocas, por me ajudarem a dar continuidade nesse trabalho, saibam que eu carrego vocês pra sempre no meu coração. Agradeço ao Gustavo Lopes por todas as chamadas do Discord até de madrugada escrevendo junto comigo enquanto você escrevia seu mestrado, a troca de conhecimentos foi algo essencial e você sabe o quanto a sua presença me ajudou a dar continuidade neste TCC.

Agradeço a todos que, apesar de não se encontrarem aqui nomeados, serão sempre lembrados.

RESUMO

As abelhas sem ferrão apresentam grande relevância ecológica, econômica e social. Estas abelhas apresentam relações com diversos microrganismos, sendo as relações estabelecidas com fungos filamentosos as mais importantes, devido à capacidade de produzir metabólitos secundários de grande interesse para indústria farmacêutica. Devido à busca por novos fármacos que tenham efeito sobre o estresse oxidativo, que pode desencadear diversas patologias, o estudo tem como objetivo avaliar o potencial antioxidante do sobrenadante produzido por fungos isolados de abelhas sem ferrão nativas do Brasil. Para isso, o sequenciamento de DNA foi realizado para identificar os fungos isolados e testes *in vitro* foram realizados para avaliar a ação antioxidante, FRAP, DPPH e ORAC, dos sobrenadantes e de suas frações. Observou-se que os fungos pertencem aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Os sobrenadantes foram fracionados e as frações proteicas, metabólicas e fracionamento líquido-líquido foram testados novamente nos ensaios *in-vitro*. Foi possível concluir que tais sobrenadantes estudados apresentam atividade antioxidante em testes distintos, representando uma alternativa eficaz na busca e identificação de compostos para superar os mecanismos de danos causados pelo estresse oxidativo.

Palavras-chave: fungos filamentosos, atividade antioxidante, abelhas sem ferrão.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO	4
2.1	Objetivo geral	4
2.2	Objetivos específicos	4
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	4
3.1	Isolados fúngicos	4
3.2	Extração de DNA.....	5
3.3	Amplificação das amostras de DNA (PCR)	6
3.4	Sequenciamento.....	6
3.5	Produção de sobrenadante	6
3.6	Capacidade Antioxidante Total (FRAP).....	6
3.7	Ensaio DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).....	7
3.8	Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC).....	8
3.9	Fracionamento do sobrenadante	9
3.10	Fracionamento da porção metabólica	9
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
4.1	Identificação dos fungos	10
4.2	Ensaio bioquímicos	11
4.3	Capacidade Antioxidante Total (FRAP).....	11
4.4	Ensaio DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).....	12
4.5	Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC).....	14
4.6	FRAP, DPPH e ORAC das frações metabólicas e proteicas	16
4.7	Fracionamento líquido-líquido	19
4.6.1	Capacidade Antioxidante Total (FRAP).....	19
4.6.2	DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	21
4.6.3	Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC).....	23
5	CONCLUSÃO	25
6	REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão são insetos eusociais membros da classe Insecta, família Apidae e superfamília Apoidea (BRADBEAR, 2009). Adaptaram-se à áreas tropicais e subtropicais do mundo, contabilizando mais de 600 espécies de abelhas sem ferrão descritas. No território brasileiro, mais de 200 espécies foram identificadas e são distribuídas em 29 gêneros (LAVINAS *et al.*, 2019).

Essas abelhas organizam-se em colmeias permanentes, que podem possuir poucas dúzias até 100.000 ou mais operárias (SILVEIRA *et al.* 2002; MICHENER, 2007). Os favos de cria são empilhados horizontalmente e construídos com cera e cerume (cera e própolis). Algumas espécies de abelhas sem ferrão produzem geoprópolis (barro adicionado de resina com o intuito de impermeabilizar o ninho). Outros materiais, como fezes secas de mamíferos, barro, vegetais, entre outros, também podem ser utilizados para a construção do ninho dessas abelhas (MICHENER, 2007). O alimento (mel e pólen) é armazenado em potes de cera, dispostos ao redor dos favos.

As abelhas sem ferrão apresentam relevância em vários aspectos, sendo polinizadores naturais de plantas de diferentes biomas (FELIPE NETO, 2015). De acordo com Kerr e colaboradores (1996), as abelhas sem ferrão, principalmente as do gênero *Melipona*, destacam-se como as principais polinizadoras do bioma amazônico. Já no nordeste brasileiro *Melipona subnitida* é endêmica e representa um dos mais importantes polinizadores do bioma Caatinga (FELIPE NETO, 2015). Além disso, no Brasil, a importância dessas abelhas é cada vez mais reconhecida, visto que culturas agrícolas de alto valor econômico dependem da polinização por esses insetos (SLAA *et al.*, 2006).

No âmbito socioeconômico, o interesse por essas abelhas vem crescendo constantemente pela procura dos subprodutos tais como, mel, própolis, geoprópolis, cera e pólen (MARÇAL, 2017; ALMANAA *et al.*, 2022). O mel é produzido a partir do néctar das flores e é composto, principalmente, por glicose e frutose, minerais, vitaminas e outros nutrientes (KWAPONG *et al.*, 2010). O mel e outros produtos das abelhas são utilizados há séculos na medicina tradicional de diversos povos devido as suas propriedades (FÉAS *et al.*, 2012).

Estudos demonstram os benefícios do mel da abelha sem ferrão devido a suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-obesidade, anticancer e antimicrobiana (MOHAMMAD *et al.*, 2020; AL-HATAMLEH *et al.*, 2020). O mel foi utilizado em um estudo anti-envelhecimento

de tratamento de pele, com células humanas (fibroblastos dermais) e aumentou a expressão de colágeno nas células fibroblásticas envelhecidas e regulou negativamente a expressão da metaloproteinase associada a degradação do colágeno, sugerindo que o mel é um potencial agente anti-envelhecimento (CUI *et al.*, 2010).

Além disso, o mel das abelhas sem ferrão possui, também, a capacidade de aumentar a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o receptor Inositol 1,4,5- trisfosfato (ITPR1) que estão envolvidos na função sináptica (CUI *et al.*, 2009; AL-HATAMLEH *et al.*, 2019, SCHORGE *et al.*, 2010).

A atividade antioxidante está diretamente relacionada com propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, anticâncer e atividade anti-obesidade enquanto o estresse oxidativo pode resultar em diversas condições, como doenças neurodegenerativas, diabetes, doenças cardiovasculares, artrites e respostas inflamatórias severas. (AVILA *et al.*, 2019; FANG *et al.*, 2014; AZIZ *et al.*, 2017, BONAMIGO *et al.*, 2017).

As moléculas antioxidantes não se limitam a eliminar radicais livres, mas também agem como moduladores de vias de transdução afetadas por radicais livres durante o estresse oxidativo, responsáveis por certas respostas celulares como inflamação, morte celular, proliferação, entre outros (DZIALO *et al.*, 2016; DHARMARAJA *et al.*, 2017).

A atividade antioxidante de um produto pode ser avaliada por meio de um ensaio baseado na capacidade do produto de inibir a oxidação, reduzindo assim a produção de radicais livres que resultam em uma cadeia que causaria danos e alterações celulares (CORMET *et al.*, 2018). Radicais livres, produzidos por vias endógenas em concentrações limitadas, são essenciais para a manutenção e regulação da maturação celular porém, quando a concentração ultrapassa o limite pode resultar em doenças e levar ao dano oxidativo (um desequilíbrio entre a concentração de radicais livres e antioxidantes).

Assim como vários outros seres vivos, as abelhas sem ferrão possuem relações com diversos microrganismos, seja de forma simbiótica ou mutualística e tais relações afetam diretamente a imunidade, a nutrição e até mesmo a saúde dos organismos envolvidos (MARÇAL, 2017). De acordo com De Paula e colaboradores (2019), estão associados às colméias de abelhas sem ferrão vírus, bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Nas colméias, as bactérias e leveduras possuem a função de produzir enzimas ativas que fermentam o açúcar, além de produzir ácidos orgânicos que são fundamentais para a transformação do pólen e néctar. Esta transformação microbiana provê

benefícios para as larvas e abelhas adultas (SOUZA *et al.*, 2020; TONG *et al.*, 2022; NGALIMAT *et al.*, 2019, SUPHAPHIMOL *et al.*, 2020, DANIEL *et al.*, 2013).

Os fungos filamentosos associados às colméias de abelhas sem ferrão, normalmente, apresentam estilo de vida saprófita, absorvem substâncias orgânicas provenientes de matéria em decomposição. Barbosa e colaboradores, em 2018, relataram 21 espécies de fungos *Penicillium* e 6 de *Talaromyces* em mel, pólen e no interior da colméia de *M. scutellaris*. Os pesquisadores verificaram que tais espécies de fungos produzem compostos bioativos mas não chegaram à conclusão dos benefícios que eles traziam para seus hospedeiros.

Em 2018, foi reportado pela primeira vez um caso de mutualismo entre a espécie do fungo *Monoascus sp.* e a abelha *Scaptotrigona postica*. Os pesquisadores demonstraram que o crescimento do micélio deste fungo no alimento larval é essencial para o crescimento de novos indivíduos dessa espécie de abelha social. (BARBOSA, 2018).

No ano de 1928, o pesquisador Alexander Fleming notou que sua cultura de bactérias do gênero *Staphylococcus* tinha sido contaminada por algum tipo de bolor e descobriu que aquele fungo era do gênero *Penicillium* e produzia uma substância que era capaz de inibir o crescimento bacteriano. Surgiu neste momento, a penicilina. A partir desta descoberta, as pesquisas por compostos ativos derivados de fungos com possíveis utilizações biotecnológicas se expandiu mundialmente (HYDE *et al.*, 2019).

Os fungos filamentosos produzem metabólitos secundários que interessam à indústria farmacêutica, como antimicrobianos, enzimas, aminoácidos, esteróides (BUDHIRAJA *et al.*, 2013). Esses metabólitos secundários são compostos extracelulares sintetizados e secretados no meio de cultura quando o crescimento microbiano se encontra na fase estacionária, sendo, de modo geral, bioativos e de baixa massa molecular (DREYFUSS *et al.*, 1994; TAN *et al.*, 2001; SCHULZ *et al.*, 2002; STROBEL *et al.*, 2003). Naturalmente, os metabólitos secundários funcionam como (i) hormônios sexuais, (ii) ionóforos, (iii) formas de competição contra microrganismos, insetos e plantas, (iv) agentes de simbiose, (v) efetores de diferenciação e (vi) demais funções desconhecidas (DEMAIN *et al.*, 2008).

A busca e identificação de novos compostos com atividade antioxidante presentes no sobrenadante produzido por fungos filamentosos isolados do alimento de larvas de abelhas sem ferrão é importante para obtenção de substâncias capazes de prevenir patologias associadas ao estresse oxidativo.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antioxidante de sobrenadantes produzidos por fungos filamentosos isolados do alimento de larvas de abelhas sem ferrão brasileiras.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os fungos presentes no alimento larval de quatro abelhas sem ferrão;
- Avaliar o potencial antioxidante do sobrenadante total produzido pelos fungos através dos ensaios bioquímicos DPPH, FRAP e ORAC;
- Identificar o sobrenadante total com maior potencial antioxidantes e fracionar em porções proteica e metabólica para repetição dos testes bioquímicos.
- Fracionar a porção metabólica utilizando solventes polar e apolar a fim de identificar a molécula bioativa responsável pelo caráter antioxidante do sobrenadante produzido pelo fungo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados fúngicos

Os fungos filamentosos utilizados no presente trabalho foram isolados do alimento de larvas de abelhas sem ferrão *Melipona quadrifasciata*, *Melipona scutellaris*, *Frieseomelitta varia* e *Tetragonisca angustula* e obtidos a partir da Coleção de Microrganismos Isolados de Abelhas Sem Ferrão do Laboratório de Biotecnologia de Genética da UFU (CoMISBee) (Santos, 2022). Os fungos são mantidos em caldo Luria-Bertani (LB) acrescido de glicerol (20%) em ultrafreezer (Panasonic) a -80 °C . Os fungos foram reativados em meio sólido de Batata Dextrose Agar (BDA) e incubados por 5 dias a 30 °C em estufa (Sterilifer Professional Line). No total, 9 fungos filamentosos foram utilizados, 3 fungos isolados de *F. varia*, 3 de *M. quadrifasciata*, 2 de *M. Scutellaris* e 1 de *T. angustula* (Tabela 1).

Tabela 1:Lista de fungos da CoMISBee utilizados nos ensaios de antioxidante.

Abelha sem ferrão	Código do fungo		
	<i>Frieseomelitta varia</i>	Fv01	Fv05
<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mq03	Mq05	Mq20
<i>Melipona scutellaris</i>	Ms35	Ms46c	-
<i>Tetragonisca angustula</i>	Ta26	-	-

3.2 Extração de DNA

Os fungos foram plaqueados em meio BDA e incubados por 5 dias a 30 °C, de acordo com Brandão e Colaboradores, 2019. Após incubação, os fungos foram raspados e transferidos para microtubos contendo 1mL de tampão de extração (Tris-HCL 0,1 M ou 100 mM, NaCL 500 mM, EDTA 50 mM e SDS 0,4%) e agitado em vórtex por 2 minutos. Adicionados ao microtubo 50 µL de proteinase K e as amostras incubadas a 56 °C por 30 minutos; a cada 10 minutos os microtubos foram agitados. Depois deste tempo de incubação, 150 µL de acetato de potássio a 5 mM foram adicionados, agitado por dois minutos e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante coletado (~400 µL) é transferido para um novo microtubo com 330 µL de isopropanol. Os tubos foram invertidos 50x e centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado, 500 µL de álcool 70% foram adicionados, centrifugada por 30 segundos (spin) e o sobrenadante descartado. Para garantir limpeza do DNA, a etapa foi realizada duas vezes. Adicionados 250 µL de álcool absoluto e a amostra centrifugada por 5 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet seco por 60 minutos a temperatura ambiente. O pellet foi ressuspenso em 50 µL de água ultrapura e a qualidade do DNA verificada em espectrofotômetro NanoDrop 2000 e em gel de agarose.

3.3 Amplificação das amostras de DNA (PCR)

1 µg de DNA foi incubado em termomixer a temperatura de 50 °C por 15 minutos. 1 µL das amostras ressuspensas (~50 ng) foi utilizado como molde para as reações de amplificação. As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo DNA, Taq High Fidelity Pol Reaction Buffer Complete (Cellco, São Carlos, SP), 1X, primers ITS1 (Forward, 5' TCCGTAGGAACCTGCGG 3') e ITS4 (Reverse, 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') a 0,5 µM, mistura de dNTPS a 200 µM e Taq High Fidelity Pol (Cellco) (5 U).

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems). Os ciclos seguiram as condições: 1 ciclo de 95 °C por 3 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 47 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 min, 1 ciclo de 72 °C por 7 min e 4 °C por ∞. Os amplicons foram analisados em gel de agarose 1% e os produtos de PCR foram purificados utilizando kit de purificação PCR (Cellco)

3.4 Sequenciamento

20 ng de cada amplicon foram submetidos a sequenciamento pelo método de Sanger. As amostras foram preparadas seguindo as recomendações do fabricante para protocolo BigDie Terminator e o sequenciamento realizado no equipamento ABI3130 (Applied Biosystems). Para cada amostra, dois sequenciamentos foram realizados em direções opostas utilizando os primers ITS1 e ITS4. Os eletroferogramas foram analisados e as sequências consenso de cada amostra foram obtidas e comparadas em bancos de dados pelo BLASTn.

3.5 Produção de sobrenadante

Um bloco de gelose de cada fungo previamente reativado foi inoculado em 60 mL de caldo de Batata-Dextrose (BD) e incubado em agitação constante a 180 rpm na temperatura de 31 °C ± 1 °C por cinco dias. No terceiro e no quinto dias de fermentação, uma alíquota de 30 mL do caldo fermentado foi coletada e centrifugada a 10.000 rpm por 4 minutos para recuperação do sobrenadante. Os sobrenadantes coletados no 3º e 5º dias de fermentação foram mantidos em freezer (Electrolux) a -20 °C até os próximos testes.

3.6 Capacidade Antioxidante Total (FRAP)

Foi preparado um tampão de acetato de sódio a 0,3 M e pH 3,6 dissolvendo 3,1g de acetato de sódio em 16 mL de ácido acético glacial e o volume completado para 1 L com água destilada. Preparada uma solução de HCL 40 mM adicionando 67,23 µL de HCL e o volume completado para 20 mL com água destilada. Tais soluções foram utilizadas no dia do teste.

No dia do experimento foi preparada uma solução de TPTZ 10 mM dissolvendo 0,0625 g de TPTZ em um volume final de 20 mL de HCL 40 mM. Preparada uma solução de cloreto férrico 20 mM dissolvendo 0,108 g de cloreto férrico em um volume final de 20 mL de água destilada.

O ensaio foi realizado com auxílio de uma microplaca de 96 poços translúcidos, com as amostras em triplicata. Em cada um dos poços foram adicionados 10 µL dos sobrenadantes, 25 µL de água destilada e 250 µL de reagente FRAP (10 volumes de tampão acetato + 1 volume de TPTZ + 1 volume de Fe^{3+}). Na mesma placa, também foram preparadas uma curva padrão de antioxidante Trolox, um branco e os controles epigalactocatequina, quercetina e ácido gálico (todas a 0,25 mg/mL).

A placa foi incubada câmara escura por 6 minutos a 37 °C ao abrigo da luz e a absorbância lida em espectrofotômetro no comprimento de 593 nm. As absorbâncias da curva padrão foram plotadas de modo a se obter uma equação da reta e a atividade antioxidante das amostras foi estabelecida em função da concentração de Trolox equivalente (µmol) utilizando a seguinte equação:

$$(\mu\text{M trolox eq}) / L = \frac{(Abs_{amostra} - Branco) - B}{A}$$

Onde A e B correspondem aos valores da equação da curva padrão obtida (equação da reta).

3.7 Ensaio DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O ensaio DPPH utilizado foi adaptado do protocolo proposto por Sharma & Bhat (2009), que avalia a capacidade da amostra de inibir a atividade oxidante do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

O teste foi realizado em microplaca de 96 poços translúcida com as amostras em triplicata. Em cada poço foi adicionado 75 µL dos sobrenadantes ou controles e 225 µL de DPPH a 0,06 mM. Os controles positivos foram epigalactocatequina, quercetina e ácido gálico, todos a 0,25 mg/ml, e o controle negativo, água. A placa foi incubada a 30 °C por 30 minutos ao abrigo da luz e as

absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de 517 nm.

Foi preparada outra placa de 96 poços com o branco para descontar os valores de absorbâncias visto que este é um teste colorimétrico. Na placa branco foi pipetado 50 µL de sobrenadante e 200 µL de metanol em triplicata para cada amostra e a absorbância lida em espectrofotômetro no comprimento de 517 nm.

A atividade antioxidante é obtida em função da porcentagem de DPPH neutralizado, por meio da fórmula:

$$\text{DPPH}(\%) = \left[\frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right] \times 100$$

Onde:

- A_{controle} = absorbância do branco DPPH
- A_{amostra} = absorbância de cada amostra e controle

3.8 Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC)

O ensaio é baseado na inibição da oxidação induzida por radicais peroxil. Foi preparado um tampão fosfato 75mM com : 2g de fosfato de potássio monobásico (KH_2HPO_4) e 3,26g de fosfato de sódio bibásio monohidratado (Na_2HPO_4), 450 mL de água Milli-Q. O pH foi ajustado para 7,4 utilizando NaOH e o volume foi completado para 500 mL (volume final).

A solução de fluoresceína foi preparada em tampão fosfato. A solução mãe I a $4,25 \times 10^{-4} M$ foi preparada pesando-se 0,016g de fluoresceína em 100 mL de tampão fosfato previamente preparado. A solução mãe II foi obtida pipetando 1 mL da solução mãe I e acrescentando 99 mL de tampão fosfato ($4,25 \times 10^{-3} M$). A solução com a concentração utilizada de $8,5 \times 10^{-5} M$ foi obtida pipetando 1 mL da solução mãe II e acrescentando 49 mL de tampão fosfato.

No dia da análise, foi preparado o radical Azobis a 153 mM em tampão fosfato, pesando 0,414g em 10 mL de tampão fosfato. Por ser fotossensível, a solução foi mantida ao abrigo da luz e em geladeira a 4 °C até o momento da análise.

O teste foi realizado com auxílio de microplaca de 96 poços de cor preta com as amostras em triplicata. Em cada poço foram colocados 150 µL da solução de fluoresceína ($8,5 \times 10^{-5} M$) e 25 µL da amostra. O branco foi feito utilizando 150 µL de fluoresceína e 25 µL de tampão fosfato (o branco será descontado da leitura de todas as amostras). Foi realizado também uma curva padrão

com Trolox nas concentrações de 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,62 μM (TROLOX em tampão fosfato).

Imediatamente antes da leitura, 30 μL da solução de Azobis 153 mM foram acrescentados em cada poço e a leitura foi feita em espectrofluorímetro, com excitação a 485 nm e emissão a 528 nm, a temperatura de 37 °C. A leitura foi feita durante 90 minutos com leituras a cada 1 min e 30s.

3.9 Fracionamento do sobrenadante

O sobrenadante total foi separados em eppendorfs no volume de 2 mL e levados ao speed vacuum overnight até a secagem total. Posteriormente, 1 mL de metanol foi adicionado e incubado a 4 °C por 3h, seguido de centrifugação a 8.000 g por 5 minutos (JUNIOR, 2017). O precipitado proteico foi separado do metabólico e o solvente (metanol) evaporado em speed vacuum. As frações proteicas e metabólicas seguiram para os testes antioxidantes.

3.10 Fracionamento da porção metabólica

A porção metabólica seguiu para o fracionamento líquido-líquido utilizando os reagentes na seguinte ordem: Hexano, Diclorometano (DCM), Acetato de Etila e N-Butanol (BATISTA et al., 2021).

O metabólico seco evaporado em speed vacuum foi ressuspenso em 1 mL de água e vortexado por 30 segundos ou até sua homogeneização completa. Após este processo, 500 μL de Hexano foram adicionados a cada eppendorf e vortexado novamente por 30 segundos e duas fases foram formadas (fase hexânica e fase metabólica restante). A fase hexânica foi retirada com auxílio de uma pipeta e o processo foi repetido. Todos os eppendorfs foram lavados 2x com cada um dos reagentes seguindo a ordem e no final do processo, a fase restante que não reagiu com nenhum dos reagentes químicos foi chamada de fase aquosa.

3.11 Análise estatística

Os dados coletados foram analisados no software GraphPad Prism ® (versão 8.0). Todos os dados obtidos nesse trabalho foram submetidos à análise estatística no teste ANOVA sendo em seguida feitas comparações múltiplas por meio do teste de Dunnet (α 0,05).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação dos fungos

Os resultados obtidos após comparação das sequências de DNA consenso de cada amostra de fungo com banco de dados pelo BLASTn estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: identidade dos fungos isolados do alimento larval de abelhas sem ferrão

Identificação do fungo	Identidade (%)	Resultado BLASTn
Fv01	100	<i>Penicillium citrinum</i>
Fv05	100	<i>Penicillium sp.</i>
Fv10	99,8	<i>Aspergillus flavus</i>
Mq03	100	<i>Penicillium citrinum</i>
Mq05	100	<i>Aspergillus sp.</i>
Ms35	100	<i>Penicillium citrinum</i>
Ms46c	100	<i>Aspergillus caelatus</i>
Ta26	100	<i>Aspergillus sp.</i>
Mq20	100	<i>Aspergillus sp.</i>

Os fungos presentes no alimento larval das abelhas utilizados neste trabalho pertencem aos gêneros de *Penicillium* (Fv01, Fv05, Mq03, Ms35) e *Aspergillus* (Fv10, Mq05, Ms46c, Ta26, Mq20). O gênero *Penicillium* é uma importante fonte de antioxidantes naturais, como flavonóides, ácido glicogênico e ácido kójico (TAVARES *et al.*, 2018; FRISVAD *et al.*, 2006). O gênero *Aspergillus* se mostra relevante pela produção de polifenóis, ácido ascórbico e ácido rosmarínico (AURORA *et al.*, 2011; ALMANAA *et al.*, 2022; BANJO *et al.*, 2020).

Espécies do gênero *Aspergillus* podem ser encontradas na natureza e em vários tipos de substratos (XU *et al.*, 2020; KATSURAYAMA *et al.*, 2020; ELODIE *et al.*, 2018; AN *et al.*, 2018; MOUSSA *et al.*, 2020). Atualmente esta espécie de fungo é amplamente estudado e reconhecido como fonte de metabólitos ativos com importância médica, visto que espécies deste gênero são capazes de produzir isocumarinas, pirazinas, esteróides, alcalóides indólicos, dicetopiperazinas, policetídeos, quinonas, benzodiazepínicos e nitro-benzoil sesquiterpenóides, moléculas que demonstraram efeitos antimicrobianos, citotóxicos, antivirais, anti-inflamatórios, antioxidantes, anti-Parkinson, neuroprotetor e também efeito inseticida (DAI *et al.*, 2001; TONG *et al.*, 2022; PENG *et al.*, 2018; CHANG *et al.*, 2016; HU *et al.*, 2021; BELOFSKY *et al.*, 1998; CUI *et al.*, 2009; CUI *et al.*, 2010; FAN *et al.*, 2019; FANG *et al.*, 2014; FUCHSER *et al.*, 1997; GONZÁLEZ-JARTÍN *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2014). Pesquisas recentes indicam que algumas

espécies de *Aspergillus*, como *A. sclerotiorum* e *A. terreus* são capazes de produzir Lovastatina, demonstrando seu potencial anti-lipidêmico e anti-diabetes (IEWKITTAYAKORN *et al.*, 2020; SERAMAN *et al.*, 2010).

O gênero *Penicillium* compreende mais de 200 espécies já catalogadas e a maioria delas de solo (NICOLETTI *et al.*, 2007). Estudos demonstraram que integrantes deste gênero são capazes de produzir biomoléculas ativas com ação antibacteriana, antifúngica, imunossupressora e agente redutor do colesterol (KWON *et al.*, 2002, NICOLETTI *et al.*, 2007). No caso do *Penicillium citrinum* identificado nas amostras Fv01, Mq03 e Ms35, estudos demonstram que estes fungos podem sintetizar policetídeos com ações antitumoral e antioxidantes (SAMANTHI *et al.*, 2015).

4.2 Ensaio bioquímicos

Dentre os controles positivos utilizados, epigalactocatequina, quercetina e ácido gálico, apenas os que apresentaram melhores resultados em cada ensaio foi exibido graficamente.

4.3 Capacidade Antioxidante Total (FRAP)

O ensaio da capacidade antioxidante total, FRAP, dos sobrenadantes revelou baixa atividade antioxidante nas amostras de terceiro dia de fermentação, não mostrando diferença estatística significativa quando comparadas ao controle negativo, de água ($a = ns$). Os sobrenadantes obtidos de fermentação no quinto dia apresentaram atividade antioxidante significativa, principalmente os sobrenadantes Fv05 (5) e Mq03 (5) com os maiores valores de média, 237,44 e 245,22 μM trolox eq/ μL respectivamente, como mostrado na Figura 1.

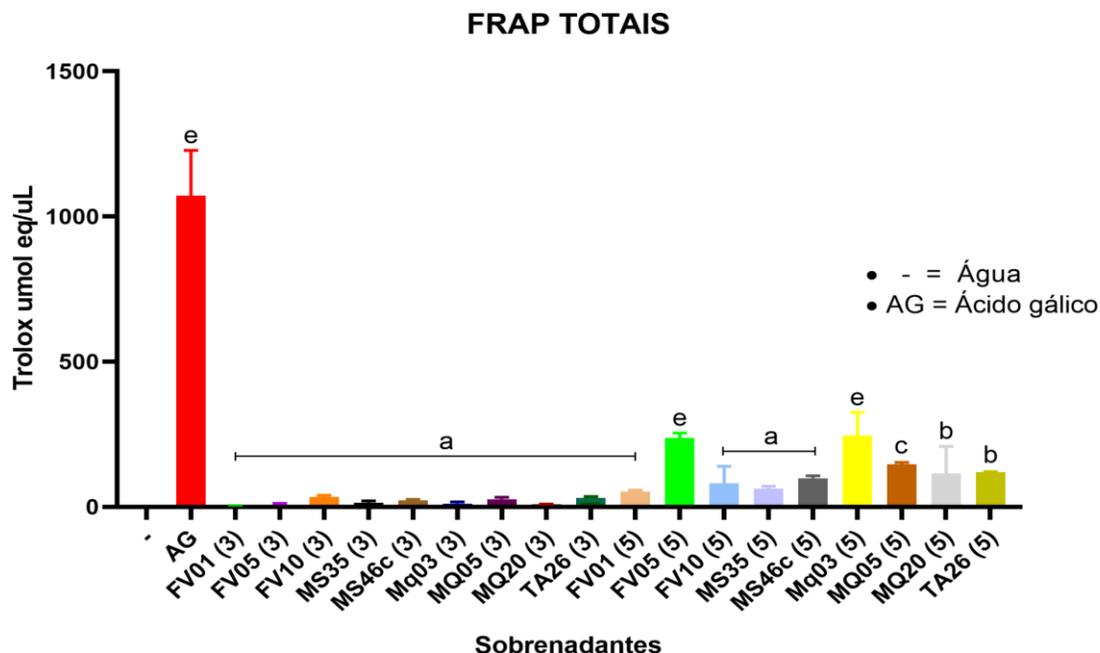


Figura 1: Gráfico FRAP das amostras de sobrenadantes no terceiro e quinto dia de fermentação. As diferenças estatísticas em comparação com controle negativo estão descritas como: a = ns ($p < 1$); b = * ($p < 0,05$); c = ** ($p < 0,01$); e = **** ($p < 0,0001$).

No ensaio FRAP descrito por Benzie e Strain (1996), os antioxidantes presentes na amostra reduzem o Fe^{3+} a Fe^{2+} , que é quelado pelo TPTZ e forma um complexo de coloração azul (OU et al., 2002). Os resultados obtidos no ensaio FRAP das amostras totais demonstram que os sobrenadantes de terceiro dia de fermentação não possuem atividade antioxidante significativa com uma baixa capacidade de reduzir o Fe^{3+} , enquanto os sobrenadantes de quinto dia de fermentação apresentaram maior capacidade antioxidante, como podemos observar as diferenças estatísticas apresentadas pelos sobrenadantes Fv05 (5), Mq03 (5), Mq05 (5), Mq20 (5) e Ta26 (5). Estudos de Aurora e colaboradores (2010) demonstraram que fungos *Penicillium citrinum* produziam compostos fenólicos capazes de reagir com o complexo de triazina tripiridil férrico (Fe^{3+} - TPTZ) e produzir tripiridil triazina ferrosa (Fe^{2+} - TPTZ).

4.4 Ensaio DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

No ensaio de DPPH (Figura 2) os sobrenadantes apresentaram atividade antioxidante significativa no terceiro e quinto dia de fermentação. Com enfoque nos sobrenadantes Ta26 (5),

Mq05 (5), Ms46c (5) e Fv01 (5) que apresentaram médias nas triplicatas de 110,78; 95,62; 81,08 e 69,04%, respectivamente, de capacidade antioxidante quando comparados ao controle negativo de água, enquanto o controle positivo de quercetina apresentou média de 97,85% de capacidade antioxidante.

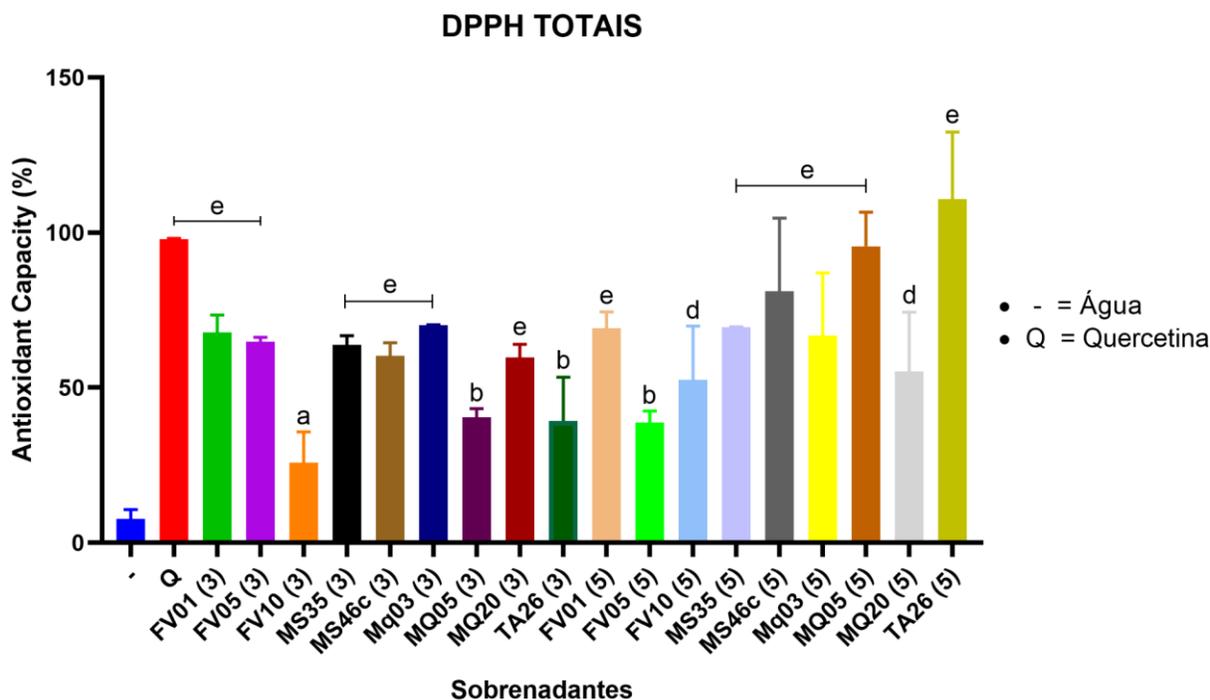


Figura 2: Gráfico DPPH das amostras de sobrenadantes no terceiro e quinto dia de fermentação. As diferenças estatísticas em comparação com controle negativo estão descritas como: a = ns ($p < 1$); b = * ($p < 0,05$); d = *** ($p < 0,001$); e = **** ($p < 0,0001$).

O ensaio de DPPH (Método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (FUKUMOTO; MAZZA, 2000, com adaptações) se baseia na capacidade de uma molécula antioxidante sequestrar o radical DPPH (um radical livre estável devido a movimentação do elétron desemparelhado por toda a molécula), reduzindo-o a hidrazina. Nossos resultados demonstraram alta atividade antioxidante em vários sobrenadantes totais de ambos os dias de fermentação utilizados, ou seja, são capazes de sequestrar o radical DPPH, sendo que um deles atingiu uma média de capacidade antioxidante acima da média do controle positivo da quercetina (97,85%), estamos nos referindo ao sobrenadante Ta26 (5) com uma média de 110,78% de capacidade antioxidante, seguido pelo Mq05 (5) com 95,62%, entre outros. Neste ensaio, muitos sobrenadantes

de terceiro dia também se destacaram por apresentarem grandes potenciais antioxidantes e que necessitam ser estudados após o fracionamento, como por exemplo o Mq03 (3) e o Fv01 (3), com médias de 70,05% e 67,82% de capacidade antioxidante, respectivamente.

No estudo de Chen e colaboradores (2002), culturas de *Penicillium citrinum* F5 apresentaram grande atividade como eliminadores de radical livre no ensaio de DPPH. Almanaa e colaboradores (2022), avaliaram a atividade antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa de metabólito fúngico produzido por *Aspergillus flavus in vitro* e verificaram capacidade de sequestro do radical DPPH no gênero *Aspergillus* e alta concentração de flavonóides no sobrenadante.

Almanaa e colaboradores (2022) e Tenguria e colaboradores (2011), chegaram a conclusão que os fungos do gênero *Aspergillus* foram os mais efetivos nos testes de DPPH.

Os resultados obtidos pelo ensaio em nossa investigação, demonstraram que os sobrenadantes produzidos pelos fungos do gênero *Aspergillus* (Fv10, Mq05, Ms46c, Ta26), no quinto dia de fermentação, apresentaram bons resultados de sequestro de radical DPPH e por isso boa atividade antioxidante neste teste, com médias de 52,5; 95,62; 81,06 e 110,78 respectivamente, próximas ou maiores que o controle positivo de quercetina.

4.5 Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC)

No ensaio de ORAC (Figura 3) todas as amostras de sobrenadantes de terceiro e quinto dia utilizadas apresentaram alta capacidade de absorção do radical oxigênio e diferença significativa quando comparadas ao controle negativo de água, sendo que suas médias variaram entre 157,77 e 254,14 eq/uL, dos sobrenadantes Fv05 (3) e Mq03 (5), respectivamente. Os resultados obtidos das amostras de sobrenadantes ultrapassam o do controle positivo de ácido gálico, 114,74 eq/uL.

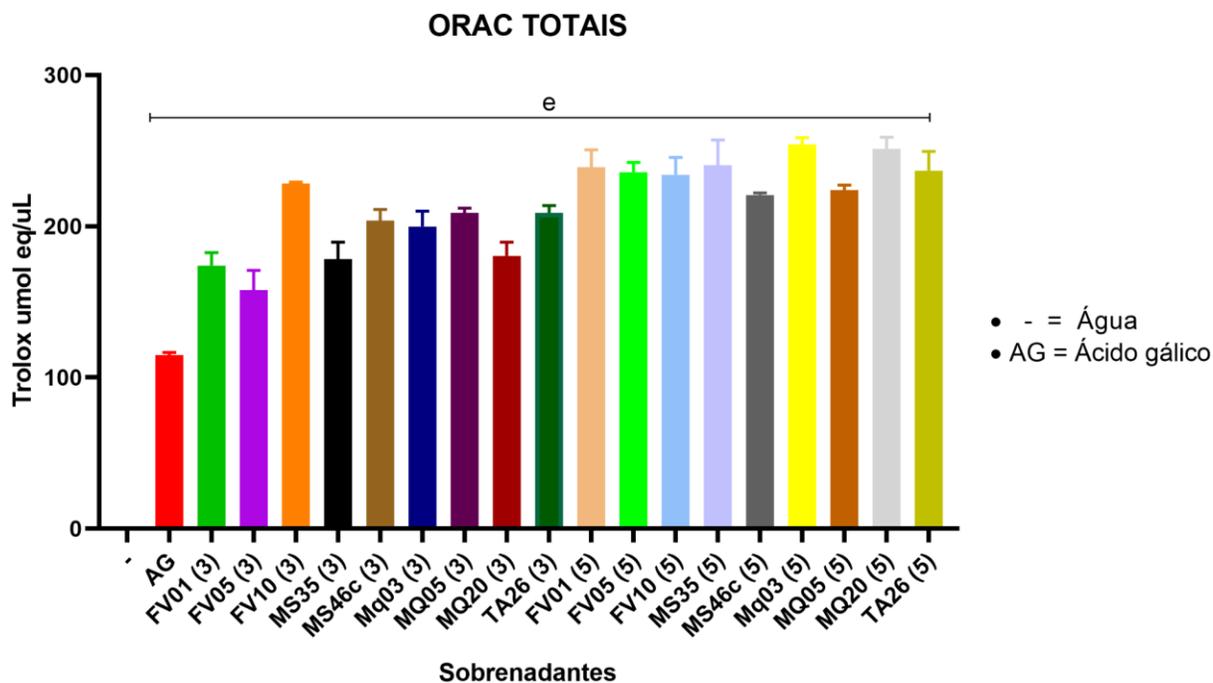


Figura 3: Gráfico de ORAC das amostras de sobrenadantes no terceiro e quinto dia de fermentação. As diferenças estatísticas em comparação com controle negativo estão descritas como $e = ****$ ($p < 0,0001$).

O ensaio ORAC é um método que analisa a capacidade de uma amostra sequestrar radicais livres frente ao radical peroxila, induzido pelo 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina), demonstrando um efeito antioxidante natural da amostra (ADOM *et al.*, 2005; GLAZER, 1990; OU *et al.*, 2002; HAMPSCH-WOODHILL *et al.*, 2001). Nos nossos ensaios, foi demonstrado que todos os sobrenadantes produzidos em ambos os dias de fermentação apresentaram potencial antioxidante significativo em relação ao controle negativo de água, também ultrapassando a capacidade antioxidante demonstrada pelo controle positivo de ácido gálico (114,74 eq/uL).

Na e colaboradores (2019) avaliaram a capacidade antioxidante e anti-inflamatória do ácido ferúlico liberado pela fermentação do *Aspergillus niger* pelo teste ORAC. Os pesquisadores encontraram que o ácido ferúlico produzido possuía capacidade de sequestrar radicais livres mais intensamente que o controle positivo quercetina. Na nossa análise, encontramos que todos os sobrenadantes produzidos pelos fungos do gênero *Aspergillus* apresentaram capacidade antioxidante maior que o ácido gálico utilizado como controle positivo, nos sobrenadantes de terceiro e quinto dia de fermentação.

4.6 FRAP, DPPH e ORAC das frações metabólicas e proteicas

As frações metabólicas e proteicas dos sobrenadantes foram submetidas aos ensaios antioxidantes para identificação da fração responsável pela ação antioxidante no sobrenadante total. Os resultados obtidos (Figura 4) demonstram que na fração metabólica dos sobrenadantes, neste caso entende-se todos os compostos na amostra menos a proteína, é possível observar que no teste FRAP apenas os sobrenadantes provenientes do quinto dia de fermentação apresentaram capacidade antioxidante. No mesmo teste, nenhuma fração proteica foi capaz de reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} , e esse resultado foi observado nas frações proteicas de ambos os dias de fermentação.

Nos ensaios de DPPH e ORAC as amostras do terceiro e quinto dia de fermentação apresentam potencial antioxidante significativo quando comparados ao controle negativo, principalmente as frações metabólicas, onde foi observado as maiores capacidades antioxidantes. Nas frações proteicas, o quinto dia de fermentação se sobressai em relação ao terceiro dia de fermentação nos ensaios de DPPH e ORAC, apresentando capacidades antioxidantes relativamente maiores.

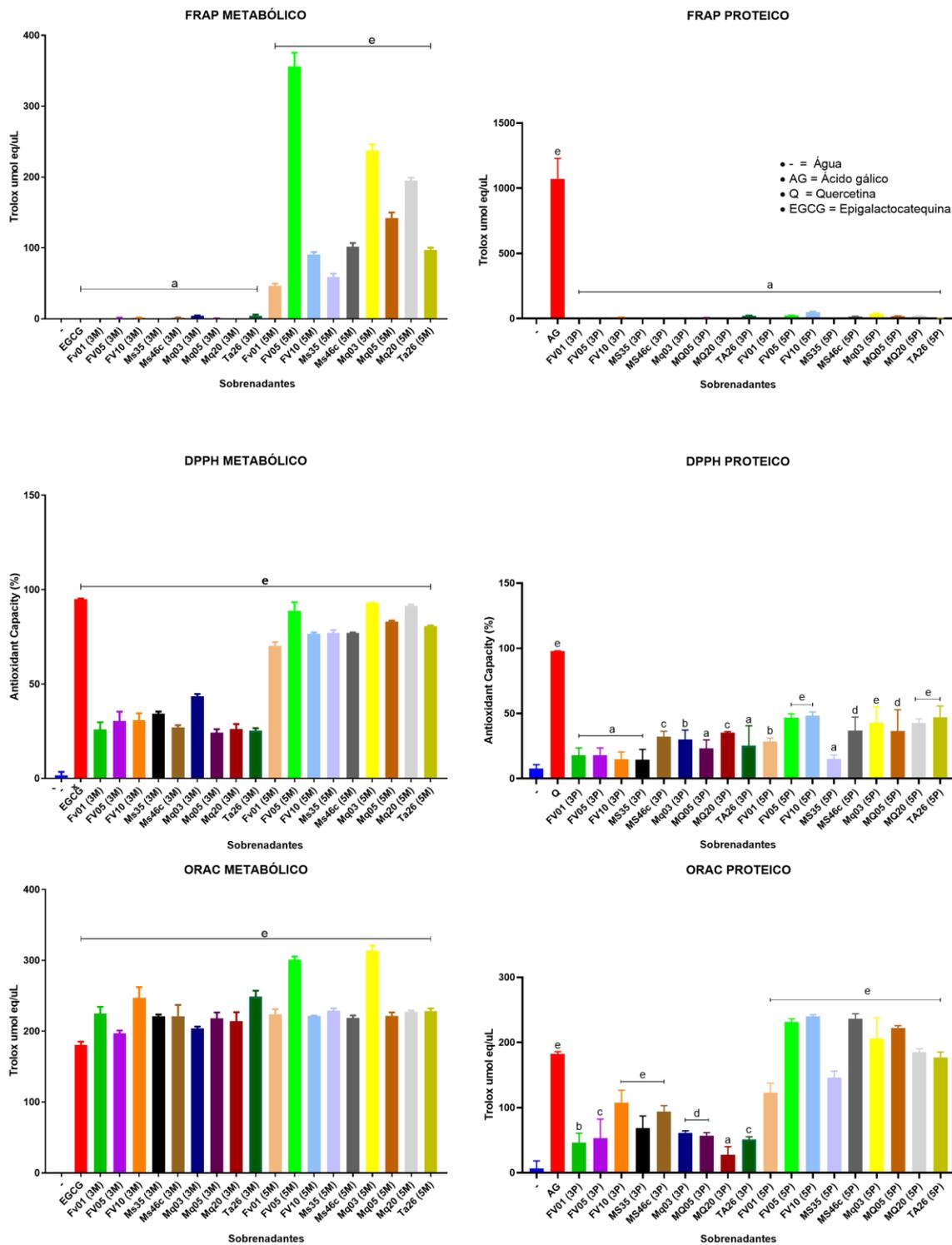


Figura 4: Layout dos gráficos FRAP, DPPH e ORAC das amostras após o fracionamento em fração metabólica e proteica. As diferenças estatísticas em comparação com controle negativo estão

descritas como: a = ns ($p < 1$); b = * ($p < 0,05$); c = ** ($p < 0,01$); d = *** ($p < 0,001$); e = **** ($p < 0,0001$).

Os resultados obtidos no ensaio FRAP após o fracionamento (fração metabólica e proteica) demonstram que os sobrenadantes produzidos pelos fungos no terceiro dia de fermentação não apresentam potencial antioxidante. Porém, é possível identificar que a capacidade de reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} neste ensaio é característico de uma molécula que está encontrada na fração metabólica no quinto dia de fermentação.

O estudo de Wu e colaboradores (2018) com fungos *Aspergillus versicolor* de origem marinha, identificou uma nova xantona (oxisterigmatocistina D) e um novo alcalóide (aspergilusina A), além de três xantonas, oito antraquinonas e quatro alcalóides conhecidos. As moléculas identificadas apresentaram boas capacidades antioxidante representada em TEAC (capacidade antioxidante por equivalentes de trolox). Sendo que, algumas moléculas identificadas foram aproximadamente equivalentes ao controle positivo trolox. A nova xantona oxisterigmatocistina D apresentou capacidade de $0,55 \text{ mmolL}^{-1}$.

O teste de DPPH realizado nas frações nos mostrou que em ambas as frações podemos encontrar ação antioxidante, mesmo que em diferentes proporções. A fração metabólica apresenta capacidade antioxidante maior em comparação à fase protéica, e o quinto dia de fermentação apresenta resultados maiores que controle positivo de EGCG. Muitos fatores podem influenciar na atividade antioxidante de proteínas e peptídeos, como por exemplo o posicionamento dos aminoácidos (SARMADIA; ISMAILA, 2011) e presença de anéis aromáticos e polares, presença de arginina e histidina, presença de aminoácidos de superfície, entre outros. (LUNA-VITAL *et al.*, 2014; RAMAKRISHNAN *et al.*, 2016; UNGCHAROENWIWAT *et al.*, 2015).

De acordo com o trabalho de Chen e colaboradores (2011), a molécula As1-1 produzida por *Aspergillus sp.* apresentou boa atividade antioxidante *in vitro* no teste DPPH. No trabalho de Yun e colaboradores (2011) identificaram um novo glicosídeo, o álcool clorogentisil, que apresentou ótimos resultados *in vitro* com IC_{50} de $1.0 \mu M$, enquanto o controle positivo de L-ácido ascórbico apresentou IC_{50} de $20.0 \mu M$.

No nosso ensaio ORAC, podemos notar que a fração metabólica demonstrou alta capacidade antioxidante, independente do dia de fermentação, porém quando olhamos para o ensaio ORAC proteico, é possível observar resultados promissores nas frações proteicas dos sobrenadantes no

quinto dia de fermentação, resultados diferentes dos observados no FRAP. Em 2009, Gamal-Eldeen e colaboradores estudaram a modulação de enzimas metabolizadoras de carcinógenos por Cromanona A, um derivado de cromona do fungo marinho *Penicillium sp.* Neste estudo, concluíram que a nova molécula Cromanona A é um forte eliminador de OH•, no entanto, apresentou fraca afinidade de eliminação contra ROO•.

4.7 Fracionamento líquido-líquido

Os resultados mostrados anteriormente serviram como ponto de partida para seleção dos sobrenadantes com o melhor potencial antioxidante e que seguiram para a fase do fracionamento líquido-líquido por solvente da fração metabólica. Os sobrenadantes Fv05 (3M), Mq03 (3M), Fv01 (3M), Fv05 (5M), Mq03 (5M), Mq20 (5M) e Ms35 (5M) foram particionados por polaridade e seguiram para os testes antioxidantes in vitro de FRAP, DPPH e ORAC.

4.6.1 Capacidade Antioxidante Total (FRAP)

No ensaio da capacidade antioxidante total, das frações dos sobrenadantes dos fungos selecionados nenhuma apresentou capacidade antioxidante significativa. Na Figura 5, as frações são apresentadas seguindo as siglas: H = Hexano; D = Diclorometano; A = Acetato de etila; N = N-butanol; H₂O = fração aquosa restante.

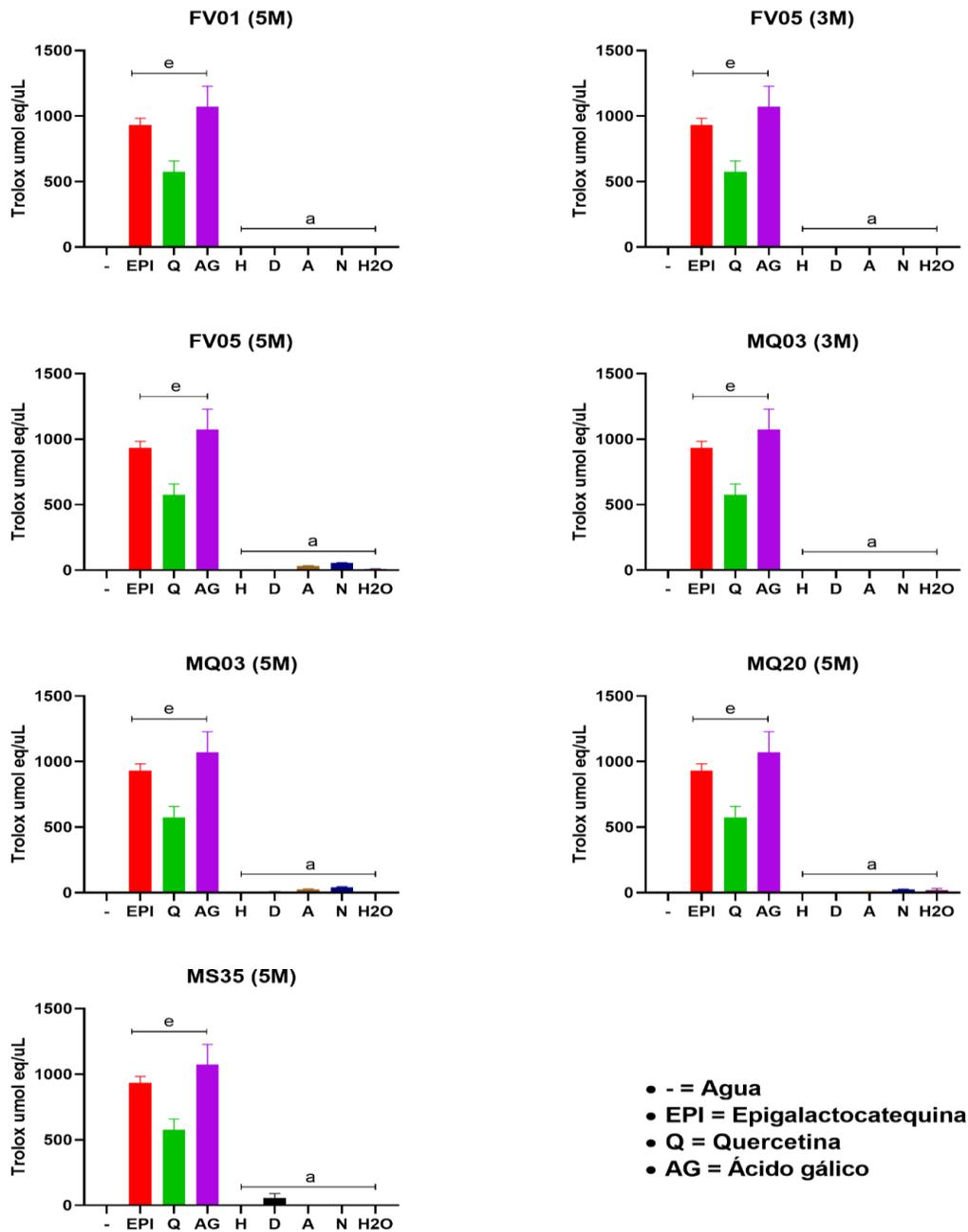


Figura 5: FRAP das frações dos sobrenadantes selecionados. As diferenças estatísticas em comparação com controle negativo estão descritas como: a = ns ($p < 1$); b = * ($p < 0,05$); c = ** ($p < 0,01$); d = *** ($p < 0,001$); e = **** ($p < 0,0001$).

Como podemos observar, nenhum composto foi capaz de reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} após o fracionamento líquido-líquido, resultado que vai contra o esperado, visto que o FRAP dos

metabólitos totais demonstrou alta capacidade antioxidante. Tal resultado pode ser explicado porque o teste FRAP é um ensaio colorimétrico, onde utilizamos um espectrofotômetro para realizar a leitura da placa no comprimento de onda de 593 nm. Por ser um teste envolvendo coloração, qualquer coloração anormal pode gerar falsos positivos e incapacitar o equipamento de percebê-los. O reagente FRAP utilizado para reagir com as nossas amostras gerou uma coloração avermelhada nos poços, intensificando a resposta e podendo gerar um falso negativo para resposta antioxidante, quando na verdade a amostra deveria ficar azul. Alguns dos nossos metabólitos podem estar se comportaram como oxidantes no teste de FRAP, intensificando a oxidação do ferro e gerando os resultados observados.

Organismos capazes de oxidar ferro (Fe^{2+} a Fe^{3+}) são conhecidos como ferrooxidantes e resultam na formação de óxidos de ferro, como óxido férrico Fe_2O_3 . Este processo é realizado por enzimas ferroxidases, e tais organismos utilizam tanto o íon ferroso quanto às formas compostas de enxofre inorgânico, a citar o $FeSO_4$, como fontes de energia para síntese de ATP e NADPH (PELCZAR *et al.*, 1993). Todos estes organismos requerem o ferro nutricionalmente e o utilizam em processos enzimáticos que envolvem transferência de elétrons (EHRlich, 1998).

No estudo feito por Mefteh e colaboradores (2018) a fim de identificar fungos produtores de biomoléculas, dois fungos endofíticos foram isolados *Penicillium citrinum* e *Geotrichum candidum* e avaliados quanto a ação antioxidante. No teste FRAP, os resultados indicaram que extratos de *Geotrichum* apresentam maior atividade antioxidante do que os de *Penicillium*, sendo que o IC50 da fração hexânica do *Penicillium* girou em torno de $370,81 \pm 3,39 \mu\text{g/mL}$, um valor muito alto, visto que quanto menor o número de IC50, maior capacidade antioxidante.

4.6.2 DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

No ensaio de DPPH (Figura 6) realizado com os sobrenadantes particionados por solventes, o sobrenadante FV05, do quinto dia de fermentação apresentou diferença significativa ($p < 0,0001$) em todas as frações solventes (H, D, A, N, H₂O) quando comparados à água. Além dele, as frações A, N e H₂O dos sobrenadantes MQ03 (5M), Mq20 (5M) e MS35 (5M) também apresentaram potencial antioxidante significativo ($p < 0,0001$) in vitro quando comparados ao controle negativo. Na figura 6, as frações são apresentadas seguindo as siglas: H = Hexano; D = Diclorometano; A = Acetato de etila; N = N-butanol; H₂O = fração aquosa restante.

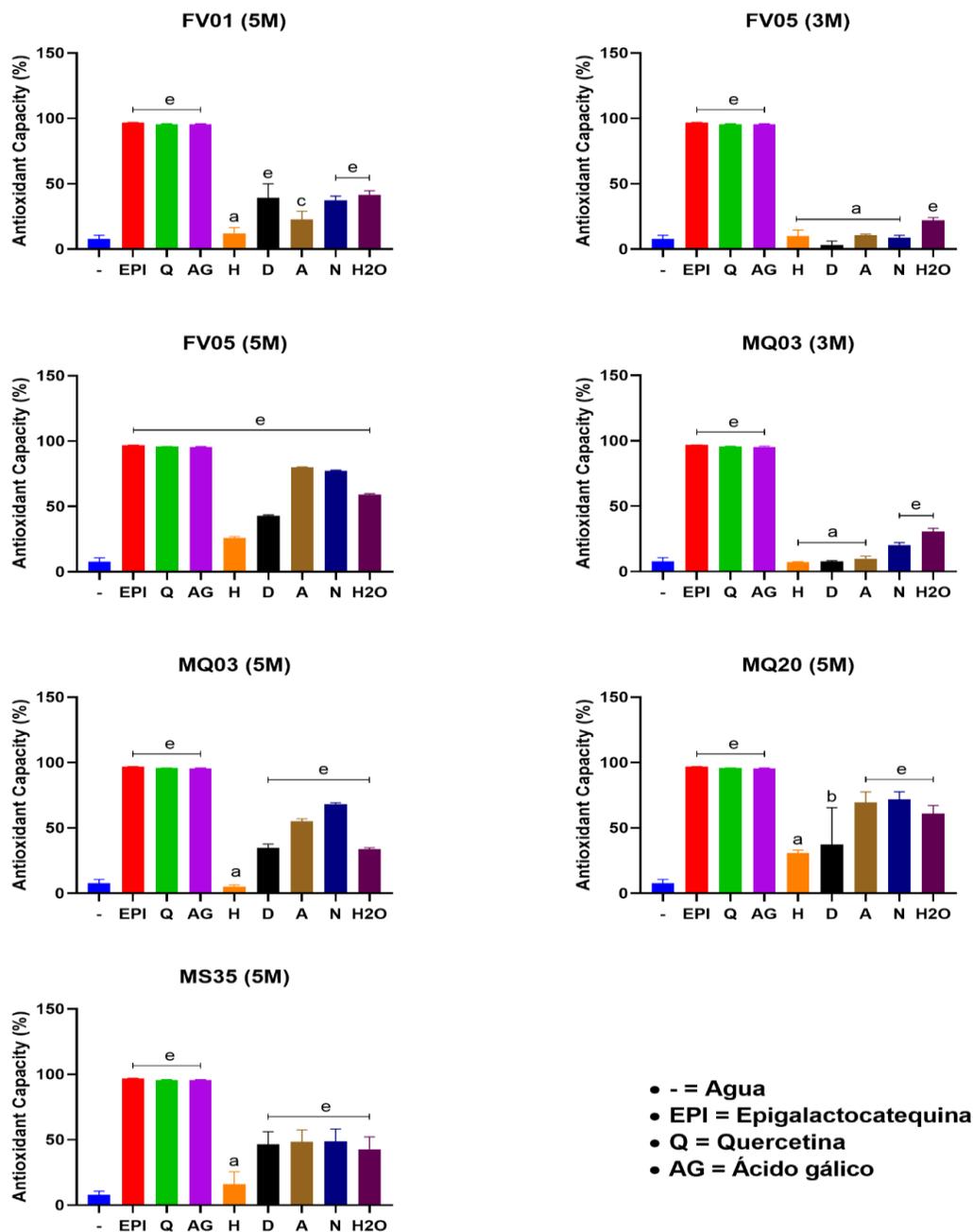


Figura 6: DPPH das frações dos sobrenadantes selecionados. As diferenças estatísticas em comparação com controle negativo estão descritas como: a = ns ($p < 1$); b = * ($p < 0,05$); c = ** ($p < 0,01$); d = *** ($p < 0,001$); e = **** ($p < 0,0001$).

Nossos resultados demonstraram que as frações DCM, acetato de etila, N-butanol e aquosa se

destacam por apresentarem maior capacidade antioxidante. Nessa análise, os resultados permitem verificar que a fração hexânica dos sobrenadantes produzidos por *Penicillium* (Fv01, Fv05, Mq03 e Ms35) são as que mostram menores valores quando comparadas às outras frações estudadas.

Wickramarachchi e colaboradores (2019) testaram um novo composto (PP-PC-03) ativo produzido pelo fungo *Penicillium citrinum* que ocorre no líquen *Parmotrem sp.* e essa molécula, junto às outras PP-PC-01 e PP-PC-02, também isolado do fungo, apresentaram boa capacidade antioxidante com valores de IC50 de 59.6 ± 22.3 , 120.1 ± 11.7 e 68.6 ± 4.3 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. No mesmo estudo, foi demonstrado a capacidade antioxidante da fração hexânica, tendo uma porcentagem de inibição de aproximadamente 10% na concentração máxima de hexano (100 $\mu\text{g/mL}$), representando uma atividade antioxidante baixa em relação ao controle positivo.

No nosso trabalho a fração hexânica do sobrenadante produzido por *Aspergillus* (Mq20) não apresenta diferença estatística ($p > 0,05$) em relação ao controle negativo água, demonstrando que os compostos presentes nesta fração não são capazes de sequestrar com eficiência o radical DPPH. Porém, quando observamos as outras frações podemos ver que tal sobrenadante apresenta moléculas com grande potencial antioxidante e capacidade de sequestrar o radical DPPH.

4.6.3 Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC)

O ensaio de ORAC (Figura 7) com os sobrenadantes fracionados por solvente revelou que os sobrenadantes apresentam capacidade de absorção do radical oxigênio maior do que os controles positivos. Damos enfoque aos sobrenadantes do quinto dia de fermentação, visto que neles a maioria das frações solventes apresentam atividade antioxidante maior que as apresentadas pelos controles de epigalactocatequina, quercetina e ácido gálico.

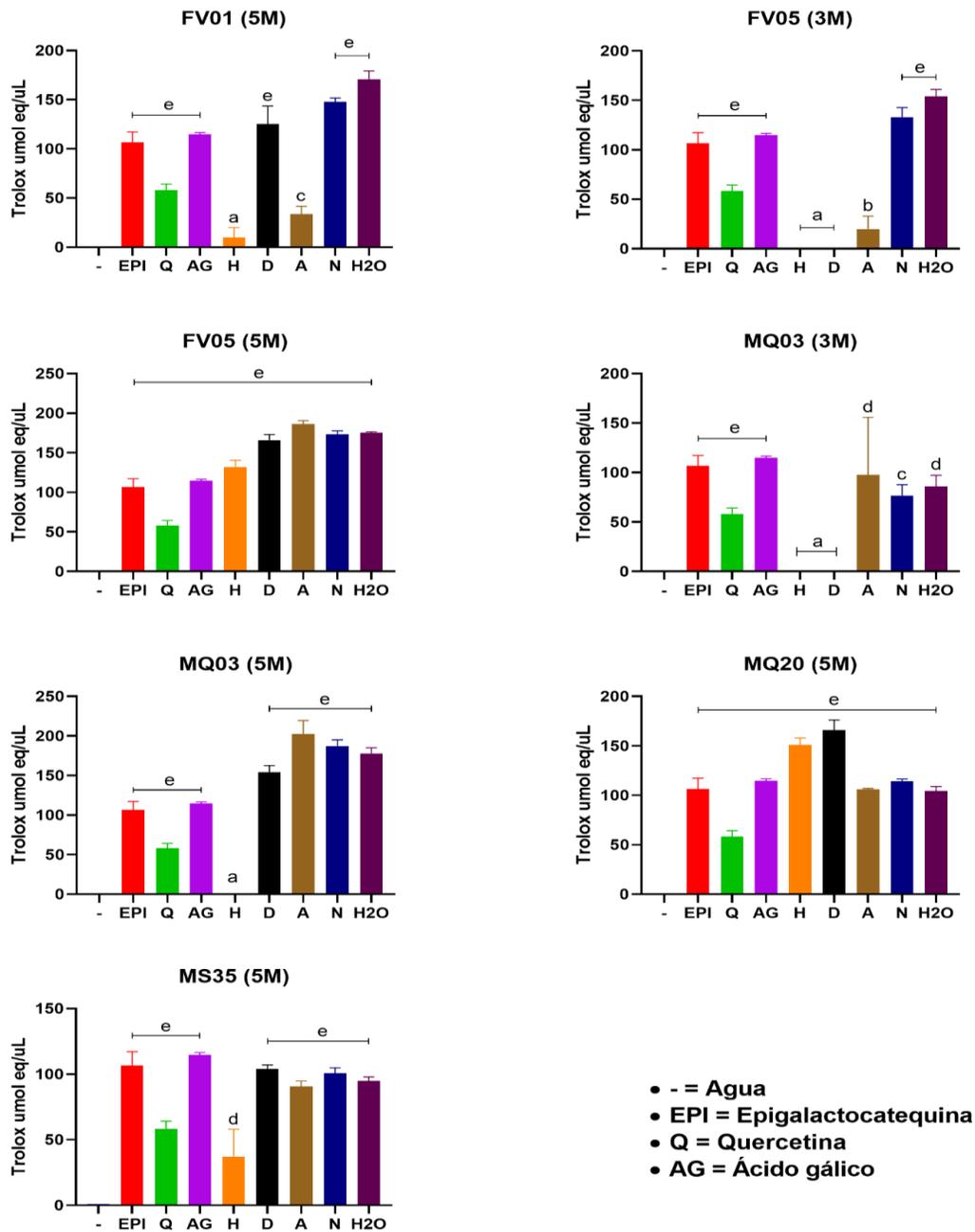


Figura 7: ORAC das frações dos sobrenadantes selecionados. Nos gráficos, H = Hexano; D = Diclorometano; A = Acetato de etila; N = N- butanol; H2O = fração aquosa restante. As diferenças estatísticas em comparação com controle negativo estão descritas como: a = ns ($p < 1$); b = * ($p < 0,05$); c = ** ($p < 0,01$); d = *** ($p < 0,001$); e = **** ($p < 0,0001$).

Como podemos observar, todos os sobrenadantes dessa investigação apresentaram frações com

ótima ação antioxidante *in vitro* no teste ORAC, demonstrando que são capazes de neutralizar o radical peroxila. Não foi possível perceber correlação entre a ação antioxidante, neste teste, entre o potencial antioxidante com a polaridade do reagente utilizado no fracionamento (DCM e Acetato de etila: polares; Hexano e N. butanol: apolares). Em estudo feito por Goh e colaboradores (2010) comparando a atividade antioxidante entre Diatomáceas, *Chaetoceros sp.* e uma microalga verde, *Nannochloropsis sp.* ficou demonstrado que os extratos solventes apolares dos extratos da diatomácea tiveram a maior capacidade antioxidante, enquanto solventes polares e apolares dos extratos de microalgas verdes apresentaram bom potencial antioxidante.

Foi possível observar que as frações acetato de etila, DCM, N-butanol e fase aquosa novamente foram as que apresentaram as melhores capacidades antioxidantes. Cai e colaboradores (2012) identificaram valores de $745.5 \pm 14.6 \mu\text{mol Trolox/g}$ peso seco na aveia sem fermentação e uma variação de 1687.9 ± 40.7 a $1378 \pm 17.2 \mu\text{mol Trolox/g}$ peso seco para as fermentadas por *Aspergillus* nas frações de acetato de etila, sendo estas as frações que continham as maiores atividades antioxidantes encontradas. Na fração n-butanol, a aveia sem fermentação apresentou 2926.6 ± 80.9 e a fração aquosa restante $2296.2 \pm 56.1 \mu\text{mol Trolox/g}$ peso seco. As frações n-butanol fermentadas por *Aspergillus* apresentaram o maior valor de 5062.2 ± 131.8 e a fração aquosa $3632.7 \pm 73.1 \mu\text{mol Trolox/g}$ peso seco.

Nesse estudo, pudemos notar que o sobrenadante produzido pelo fungo *Aspergillus* (Mq20), apresentou médias de 150,98; 165,70; 106,04; 114,40; 104,44 Trolox $\mu\text{mol eq/uL}$ nas frações hexano, DCM, acetato de etila, N-butanol e fração aquosa, respectivamente, sendo a fração DCM a portadora das moléculas com maior atividade antioxidante. Nos sobrenadantes produzidos pelos fungos *Penicillium*, a fase aquosa se destacou por apresentar a maior atividade antioxidante *in vitro*, tendo médias de 170,89; 154,1 Trolox $\mu\text{mol eq/uL}$ nos sobrenadantes Fv01 (5M); Fv05 (3M); respectivamente.

5 CONCLUSÃO

A “Avaliação do potencial antioxidante de sobrenadantes produzidos por fungos filamentosos isolados do alimento de larvas de abelhas sem ferrão brasileiras” permitiu concluir que o estudo das biomoléculas ativas produzidas por estes fungos é uma ferramenta importante para identificação de novos compostos com atividade antioxidante que podem ser aplicados em diferentes áreas da indústria e medicina.

Os resultados indicam que os sobrenadantes investigados apresentam atividade antioxidante em testes distintos, representando uma alternativa eficaz na busca e identificação de compostos capazes de prevenir patologias associadas ao estresse oxidativo.

A perspectiva de continuidade dessa análise baseia-se na validação dos resultados obtidos por meio de testes *in vivo* com *Drosophila melanogaster*, modelo para doenças neurodegenerativas como, doença de Alzheimer e epilepsia e inflamação.

6 REFERÊNCIAS

ABDUL M. N.; MOHAMED, M.; MUSTAFA, M.Z.; ZAINUDDIN, A. In vitro modulation of extracellular matrix genes by stingless bee honey in cellular aging of human dermal fibroblast cells. **J. Food Biochem**, 44, e13098, 2019.

ADOM, K. K., & LIU, R. H. Rapid peroxy radical scavenging capacity (PSC) assay for assessing both hydrophilic and lipophilic antioxidants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 53, 6572–6580, 2005.

AL-HATAMLEH, M, A. I., et al. “Antioxidant-Based Medicinal Properties of Stingless Bee Products: Recent Progress and Future Directions”. **Biomolecules**, vol. 10, no 6, p. 923, 2020.

AL-HATAMLEH, M.A.I.; HUSSIN, T.; TAIB, W.R.W.; ISMAIL, I. The Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) gene Val66Met (rs6265) polymorphism and stress among preclinical medical students in Malaysia. *J. Taibah Univ. Med. Sci*, 14, 431–438, 2019.

ALMANAA, T. N., *et al.* “Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of fungal metabolite produced by *Aspergillus flavus* on in vitro study”. **Food Science and Technology**, vol. 42, p. e01421, 2022.

AN, C.L.; *et al.* Chemical constituents of the marine-derived fungus *Aspergillus* sp. SCS-KFD66, **Mar. Drugs**, 468, 2018.

ARORA, D.S; CHANDRA, P. Antioxidant Activity of *Aspergillus fumigatus*. *ISRN Pharmacol.*

2011:619395. doi: 10.5402/2011/619395. Epub 2011 Apr 11. PMID: 22084718; PMCID: PMC3198597, 2011.

AVILA, S.; HORNUNG, P.S.; TEIXEIRA, G.L.; MALUNGA, L.N.; APEA-BAH, F.B.; BEUX, M.R.; BETA, T.; RIBANI, R.H. Bioactive compounds and biological properties of Brazilian stingless bee honey have a strong relationship with the pollen floral origin. **Food Res. Int.** 123, 1–10, 2019.

AZIZ, M.S.A.; GIRIBABU, N.; RAO, P.V.; SALLEH, N. Pancreatoprotective effects of *Geniotrigona thoracica* stingless bee honey in streptozotocin-nicotinamide-induced male diabetic rats. **Biomed. Pharmacother.** 89, 135–145, 2017.

BARBOSA, R.N; BEZERRA J.D.P; SOUZA-MOTTA; C.M, FRISVAD; J.C; SAMSON; R.A, OLIVEIRA, N.T; HOUBRAKEN, J. New *Penicillium* and *Talaromyces* species from honey, pollen and nests of stingless bees. **Antonie van Leeuwenhoek** 111:1883-1912, 2018.

BATISTA, L.L.; MALTA, S.M., GUERRA SILVA , H.C. *et al.* Kefir metabolites in a fly model for Alzheimer's disease. **Sci Rep** 11, 11262, 2021.

BAWA, K. Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 21: 399-422, 1990.

BRANDÃO, L. T. D. et al. Protocolo de Extração de DNA Genômico para os Principais Fungos Fitopatogênicos do Arroz. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 54, p. 15, 2019.

BELOFSKY, G.N.; JENSEN, P.R.; RENNER, M.K.; FENICAL, W. New Cytotoxic Sesquiterpenoid Nitrobenzoyl Esters from a Marine Isolate of the Fungus *Aspergillus versicolor*. **Tetrahedron**, 54, 1715–1724, 1998.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70 – 76, 1996.

BILUCA, F. C.; DE GOIS, J. S.; SCHULZ, M.; BRAGHINI, F.; GONZAGA, L. V.; MALTEZ, H. F.; RODRIGUES, E.; VITALI, L.; MICKE, G. A.; BORGES, D. L. G.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (Meliponinae). *Journal Food Pomposity Analysis*, 63, 89–97, 2017.

BONAMIGO, T.; CAMPOS, J.F.; ALFREDO, T.M.; BALESTIERI, J.B.; CARDOSO, C.A.; PAREDES-GAMERO, E.J.; DE PICOLI SOUZA, K.; DOS SANTOS, E.L. Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Oxid. Med. Cell. Longev*, 2017, 1038153, 2017.

BRADBEAR, N. Bees and Their Role in Forest Livelihoods: A Guide to the Services Provided by Bees and the Sustainable Harvesting, Processing and Marketing of Their Products; **Food and Agriculture Organization of the United Nations**: Rome, Italy, 2009.

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.

CHANG, Y.; YUAN, C.; ZHANG, J.; LIU, S.; CAO, P.; HUA, H.; DI, Y.; HAO, X. Speramides A–B, Two New Prenylated Indole Alkaloids from the Freshwater-Derived Fungus *Aspergillus ochraceus* KM007. *Tetrahedron. Lett*, 57, 4952–4955, 2016.

COLE, R.J.; MOORE, J.H.; DAVIS, N.D.; KIRKSEY, J.W.; DIENER, U.L. 4-Hydroxymellein. New Metabolite of *Aspergillus ochraceus*. *J. Agric. Food Chem*, 19, 909–911, 1971.

COMERT, E.D.; GOKMEN, V. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. *Food Res. Int*, 105, 76–93, 2018

CUI, C.; LI, X.; LI, C.; SUN, H.; GAO, S.; WANG, B. Benzodiazepine Alkaloids from Marine-derived Endophytic Fungus *Aspergillus ochraceus*. *Helv. Chim. Acta* 92, 1366–1370, 2009.

CUI, C.; LI, X.; MENG, L.; LI, C.; HUANG, C.; WANG, B. 7-nor-Ergosterolide, a Pentalactone Containing Norsteroid and Related Steroids from the Marine-Derived Endophytic *Aspergillus ochraceus* EN-31. **J. Nat. Prod**, 73, 1780–1784, 2010.

DAI, J.; CARTÉ, B.K.; SIDEBOTTOM, P.J.; SEK YEW, A.L.; NG, S.; HUANG, Y.; BUTLER, M.S. Circumdatin G, a New Alkaloid from the Fungus *Aspergillus ochraceus*. **J. Nat. Prod**, 64, 125–126, 2001.

DANIEL H.M.; ROSA C.A.; *et al.* *Starmerella neotropicalis* f. a., sp. nov., a yeast species found in bees and pollen. **Int J Syst Evol Microbiol**, 63:3896-3903, 2013.

DE GUZMAN, F.S.; GLOER, J.B.; WICKLOW, D.T.; DOWD, P.F. New Diketopiperazine Metabolites from the Sclerotia of *Aspergillus ochraceus*. **J. NAT. PROD**, 55, 931–939, 1992.

DE GUZMAN, F.S.; BRUSS, D.R.; RIPPENTROP, J.M.; GLOER, K.B.; GLOER, J.B.; WICKLOW, D.T.; DOWD, P.F. Ochrindoles A-D: New Bis-Indolyl Benzenoids from the Sclerotia of *Aspergillus ochraceus* NRRL 3519. **J. Nat. Prod**, 57, 634–639, 1994

DELGADILLO, I. Isolation of Secondary Metabolites of *Aspergillus ochraceus* by HPLC. **Mycotoxin Res**, 2, 9–17, 1986.

DEMAIN, A.L., ADRIO, J.L. Contributions of microorganisms to industrial biology, *Molecular Biotechnology*, 38:41–55, 2008.

DHARMARAJA, A.T. Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Therapeutics and Drug Resistance in Cancer and Bacteria. **J. Med. Chem**, 60, 3221–3240, 2017.

DÍAZ, S.; *et al.* Report on the microbiota of *Melipona quadrifasciata* affected by a recurrent disease. **J Invert Pathol**, 143:35-39, 2017.

DREYFUSS, M.M; CHAPELA, I.H. Potential of fungi in the discovery of novel, lowmolecular weight pharmaceuticals. In: Gullo VP. The discovery of natural products with therapeutic potential. Boston: Butterworth-Heinemann; 1994.

DZIALO, M.; MIERZIAK, J.; KORZUN, U.; PREISNER, M.; SZOPA, J.; Kulma, A. The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. *Int. J. Mol. Sci*, 17, 160, 2016.

EHRLICH, H.L. Geomicrobiology: it's significance for geology. *EarthScience Reviews*, 45:45–60, 1998.

ELODIE, C.; *et al.* Whole-genome sequencing of *Aspergillus tubingensis* G131 and overview of its secondary metabolism potential, *Mar. Drugs* 200, 2018.

FAN, Y.; ZHOU, Y.; DU, Y.; WANG, Y.; FU, P.; ZHU, W. Circumdatin-Aspyrone Conjugates from the Coral-Associated *Aspergillus ochraceus* LCJ11-102. *Mar. Drugs*, 17, 400, 2019.

FANG, W.; LIN, X.; ZHOU, X.; WAN, J.; LU, X.; YANG, B.; AI, W.; LIN, J.; ZHANG, T.; TU, Z. Cytotoxic and Antiviral Nitrobenzoyl Sesquiterpenoids from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus ochraceus* Jcma1F17. *MedChemComm*, 5, 701–705, 2014.

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.

FUCHSER, J.; ZEECK, A. Aspinolides and Aspinonene/Aspyrone Co-Metabolites, New Pentaketides Produced by *Aspergillus ochraceus*. *Liebig's Ann./Recl*, 1, 87–95, 1997.

FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 3597–3604, 2000.

GAMAL-ELDEEN, A. M., et al. “Modulation of Carcinogen Metabolizing Enzymes by Chromanone A; a New Chromone Derivative from Algicolous Marine Fungus *Penicillium* Sp.” **Environmental Toxicology and Pharmacology**, vol. 28, no 3 , p. 317–22, 2009.

GLAZER, A. N. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. **Methods in Enzymology**, 186, 161–168, 1990

GONZÁLEZ-JARTÍN, J.M.; ALFONSO, A.; SAINZ, M.J.; VIEYTES, M.R.; BOTANA, L.M. UPLC–MS–IT–TOF Identification of Circumdatins Produced by *Aspergillus ochraceus*. **J. Agric. Food Chem**, 65, 4843–4852, 2017.

GUIMARÃES-CESTARO, L.; MARTINS, M.F.; MARTINEZ, L.C.; ALVES, M.L.T.M.; GUIDUGLI-LAZZARINI, K,R,. NOCELLI, R.C.F.; MALASPINA, O.; SERRÃO, J.E.; TEIXEIRA, E.W.: Occurrence of virus, microsporidia, and pesticide residues in three species of stingless bees (Apidae: Meliponini) in the field. **Sci Nat**, 107:16, 2020.

GUO, S.; MAO, W.; YAN, M.; ZHAO, C.; LI, N.; SHAN, J.; LIN, C.; LIU, X.; GUO, T.; GUO, T. Galactomannan with Novel Structure Produced by the Coral Endophytic Fungus *Aspergillus ochraceus*. **Carbohydr. Polym**, 105, 325–333, 2014.

HU, L.; TIAN, S.; WU, R.; TONG, Z.; JIANG, W.; HU, P.; XIAO, X.; ZHANG, X.; ZHOU, H.; TONG, Q. Identification of Anti-parkinson’s Disease Lead Compounds from *Aspergillus ochraceus* Targeting Adenosin Receptors A2A. **ChemistryOpen**, 10, 630–638, 2021.

HUANG, D.; OU, B.; & PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 53, 1841–1856, 2005.

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.

IEWKITTAYAKORN, J.; KUECHOO, K.; SUKPONDMA, Y.; RUKACHAISIRIKUL, V.;

PHONGPAICHIT, S.; CHOTIGEAT, W. Lovastatin production by *Aspergillus sclerotiorum* using agricultural waste. **Food Technol Biotechnol**, 58:230–236, 2020.

KATSURAYAMA, A.M; *et al.* Fungal communities in rice cultivated in different Brazilian agroclimatic zones: from field to market, **Food Microbiol**, 103378, 2020.

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

KWAPONG, P.; *et al.* Stingless Bees IMPORTANCE, MANAGEMENT AND UTILISATION: A Training Manual For Stingless Beekeeping. Ghana: UNIMAX MACMILLAN, 72 p. ISBN 978-9988-0-4496-1, 2010.

KWON, O. E.; RHO, M.C.; SONG, H. Y.; LEE, S. W.; CHUNG, M. Y.; LEE, J. H.; KIM, Y. H.; LEE, H. S.; KIM, K. Phenylpyropene A and B, new inhibitors of acyl- CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Penicillium griseofulvum* F1959. **J Antibiotic**, 55: 1004-1008, 2002.

LAM, K.S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends Microbiol**, 15:279-89, 2007.

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.

LUNA-VITAL, D.A. *et al.* Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): a review. **Food Res. Int.**, v.10, p.1010-1016, 2014.

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.

MEFTEH, B. , *et al.* “Date Palm Trees Root-Derived Endophytes as Fungal Cell Factories for Diverse Bioactive Metabolites”. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 19, no 7, julho de 2018, p. 1986.

MICHENER, D. *The Bees of the World*. Baltimore, The Johns Hopkins. 2007.

MOUSSA, A.Y.; *et al.* Singab, A. Pulchranin, First report of isolation from an endophytic fungus and its inhibitory activity on cyclin dependent kinases, **Nat. Prod. Res**, 2715, 2020.

MUSTAFA, M.Z.; ZULKIFLI, F.N.; FERNANDEZ, I.; MARIATULQABTIAH, A.R.; SANGU, M.; NOR AZFA, J.; MOHAMED, M.; ROSLAN, N. Stingless Bee Honey Improves Spatial Memory in Mice, Probably Associated with Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor Type 1 (Itrp1) Genes. *Evid. Based Complement. Alternat. Med*, 2019, 8258307, 2019.

NGALIMAT, M.S.; *et al.* Characterisation of bacteria isolated from the stingless bee, *Heterotrigona itama*, honey, bee bread and propolis. **Peer J**, 7:e7478, 2019.

NICOLETTI, R.; LOPEZ-GRESA, M.P.; MANZO, E.; CARELLA, A.; CIAVATTA, M.L. Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. **Mycopathologia**, 163: 295-301. 2007.

OU, B.; HAMPSCH-WOODHILL, M.; & PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 49, 4619–4626, 2001.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **J Agr Food Chem**, v. 50, n. 11, p. 3122-3128, 2002.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S. & KRICG, N. R. Microbiology, concepts and applications. **McGraw-Hill Companies**, 6th edition, 483p, 1993.

PENG, X.; WANG, Y.; ZHU, T.; ZHU, W. Pyrazinone Derivatives from the Coral-Derived *Aspergillus ochraceus* LCJ11-102 under High Iodide Salt. *Arch. Pharm. Res*, 41, 184–191, 2018.

RAMAKRISHNAN, V. et al. Extraction and purification of lipase from *Enterococcus faecium* MTCC5695 by PEG/ phosphate aqueous-two phase system (ATPS) and its biochemical characterization. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, v.6, p.19-27, 2016.

RANNEH, Y.; AKIM, A.M.; HAMID, H.A.; KHAZAAI, H.; FADEL, A.; MAHMOUD, A.M. Stingless bee honey protects against lipopolysaccharide induced-chronic subclinical systemic inflammation and oxidative stress by modulating Nrf2, NF-kappaB and p38 MAPK. *Nutr. Metab*, 16, 15, 2019

RANNEH, Y.; ALI, F., ZAREI, M.; AKIM, A. M.; HAMID, H. A.; & KHAZAAI, H. Malaysian stingless bee and Tualang honeys: A comparative characterization of total antioxidant capacity and phenolic profile using liquid chromatography-mass spectrometry. *LWT- Food Science and Technology*, 89, 1–9, 2018.

REINISALO, M.; KARLUND, A.; KOSKELA, A.; KAARNIRANTA, K.; KARJALAINEN, R.O. Polyphenol Stilbenes: Molecular Mechanisms of Defence against Oxidative Stress and Aging-Related Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev*, 2015, 340520, 2015.

SAMANTHI, K.A.U.; WICKRAMAARACHCHI, S.; WIJERATNE, E.M.K.; PARANAGAMA, P.A.: Two new antioxidant active polyketides from *Penicillium citrinum*, an endolichenic fungus isolated from *Parmotrema* species in Sri Lanka. *J Natn Sci Foundation Sri Lanka*; 43(2): 119-26, 2015.

SANTOS, A. C. C. Microbioma do alimento larval de abelhas sem ferrão: diversidade e potencial biotecnológico. (2022) Disponível em

<<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/35627/3/MachadoAssisEnsino.pdf>>

SARMADIA, B.H.; ISMAILA, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, v.31, p.1949-1956, 2010.

SAMANTHI, K.A.U.; WICKRAMAARACHCHI, S.; WIJERATNE, E.M.K.; PARANAGAMA, P.A. Two new bioactive poliketides from *Curvularia trifolii*, an endolichenic fungus isolated from *Usnea* sp., in Sri Lanka. **J Natn Sci Foundation Sri Lanka**, 43(3): 217-24, 2015.

SCHORGE, S.; VAN DE LEEMPUT, J.; SINGLETON, A.; HOULDEN, H.; HARDY, J. Human ataxias: A genetic dissection of inositol triphosphate receptor (ITPR1)-dependent signaling. **Trends Neurosci**, 33, 211–219, 2010.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.K.; KROHN, K. Endophyte fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycol Res**, 106(9):996-1004, 2002

SERAMAN, S.; RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Statistical optimization of anticholesterolemic drug lovastatin production by the red mold *Monascus purpureus*. **Food Bioprod Process**, 88:266–276, 2010.

SHENGBAO, C. et al. “Comparative Study of the Effects of Solid-State Fermentation with Three Filamentous Fungi on the Total Phenolics Content (TPC), Flavonoids, and Antioxidant Activities of Subfractions from Oats (*Avena Sativa* L.)”. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 60, no 1, p. 507–13, 2012.

SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R.; ALMEIDA, E.A.B. *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. Belo Horizonte, Ministério do Meio Ambiente, 2002

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** 2020.

STROBEL, G. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes Infect**, 5:535-44. 2003.

SUPHAPHIMOL, N.; ATTASOPA, K.; PAKWAN, C.; CHANTAWANNKUL, P.; DISAVATHANOOWAT, T. Cultured-dependent and cultured-independent study of bacteria associated with Thai commercial stingless bee *Lepidotrigona terminata*. **J Apic Res**, 2020.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes; a rich source of functional metabolites. **Nat Prod Report**;18:448-59, 2001.

TENGURIA, R. K.; & KHAN, F. N. Distribution of endophytic fungi in leaves of *Azadirachta indica* A. JUSS. (Neem) of Panchrharhi Biosphere Reserve. **Current Biotica**, 2(2), 27-29, 2011.

TONG, Z.; XIAO, X.; LU, Y.; ZHANG, Y.; HU, P.; JIANG, W.; ZHOU, H.; PAN, S.; HUANG, Z.; HU, L. New Metabolites from *Aspergillus ochraceus* with Antioxidative Activity and Neuroprotective Potential on H₂O₂ Insult SH-SY5Y Cells. **Molecules**, 27, 52, 2022

UNGCHAROENWIWAT, P.; H-KITTIKUN, A. Purification and characterization of lipase from *Burkholderia* sp. EQ3 isolated from wastewater from a canned fish factory and its application for the synthesis of wax esters. **J. Mol. Catal. B Enzym.**, v.11, p.96-104, 2015.

WISSELINK, M.; *et al.* The longevity of colonies of fungus-growing termites and the stability of the symbiosis. **Insects**, 11:527, 2020.

WICKRAMARACHCHI, S.; *et al.* A NEW ANTIOXIDANT ACTIVE COMPOUND FROM THE ENDOLICHENIC FUNGUS, *PENICILLIUM CITRINUM* INHABITING THE LICHEN, *PARMOTREMA* SP. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, 2019.

WU, ZE-HONG, *et al.* "Antioxidant Xanthenes and Anthraquinones Isolated from a Marine-

Derived Fungus *Aspergillus Versicolor*”. **Chinese Journal of Natural Medicines**, vol. 16, no 3, p. 219–24, 2018.

XU, C.; *et al.* Characterization of diketopiperazine heterodimers as potential chemical markers for discrimination of two dominant black aspergilli, *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis*, **Phytochemistry**, 2020.

YIN, Z. N.; *et al.* “Antioxidant and Anti-Inflammatory Capacity of Ferulic Acid Released from Wheat Bran by Solid-State Fermentation of *Aspergillus Niger*”. **Biomedical and Environmental Sciences: BES**, vol. 32, no 1, p. 11–21, 2019.

YUN, K.; KONDEMPUDI, C.M.; CHOI, H.D.; KANG, J.S.; SON, B.W. Microbial mannosidation of bioactive chlorogentisyl alcohol by the marine-derived fungus *Chrysosporium synchronum*. **Chem Pharm Bull** (Tokyo), 59: 499–501, 2011.