



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

JOSE EWERTON FELINTO DOS SANTOS

**FUNGOS ISOLADOS DE COLMEIAS DE *Melipona scutellaris* E AVALIAÇÃO DA
CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE LIPASES**

RECIFE

2019

JOSE EWERTON FELINTO DOS SANTOS

**FUNGOS ISOLADOS DE COLMEIAS DE *Melipona scutellaris* E AVALIAÇÃO DA
CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE LIPASES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Biodiversidade

Orientadora: Dra. Neiva Tinti de Oliveira

Departamento de Micologia – Universidade Federal de Pernambuco

Co-orientadora: Dra. Marília de Holanda Cavalcanti Maciel

Departamento de Micologia – Universidade Federal de Pernambuco

RECIFE

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Santos, José Ewerton Felinto dos
Fungos isolados de colmeias de *Melipona scutellaris* e avaliação da capacidade de produção de lipases/ José Ewerton Felinto dos Santos – 2019.

75 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Neiva Tinti de Oliveira
Coorientadora: Marília de Holanda Cavalcanti Maciel

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, 2019.

Inclui referências.

1. Fungos filamentosos 2. Abelhas sem ferrão 3. Atividade lipolítica I. Oliveira, Neiva Tinti de (orient.) II. Maciel, Marília de Holanda Cavalcanti (coorient.) III. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020-141

JOSÉ EWERTON FELINTO DOS SANTOS

**FUNGOS ISOLADOS DE COLMEIAS DE *Melipona scutellaris* E AVALIAÇÃO
DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE LIPASES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 07/03/2019.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Neiva Tinti de Oliveira (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Patrícia Vieira Tiago (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Renan do Nascimento Barbosa (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Severina Zoraide e José Carlos, por nunca medir esforços em oferecer uma educação de qualidade e sempre acreditar no meu potencial. Aos meus familiares, agradeço pelo suporte necessário e incentivo, em especial ao meu irmão Elton Carlos, meus primos Jailton Bonfim, Cleiberton Alberto, minha prima Irene Felinto, meus tios Marcos André e Rinaldo Borges, e minha tia Elza Felinto. Também agradeço aos outros familiares que contribuíram nesta minha trajetória.

Ao professor e amigo Bruno Severo Gomes, serei eternamente grato pela oportunidade oferecida de estágio no Departamento de Micologia e por acreditar em meu potencial. Por ter dado primeira oportunidade de participar de projetos de pesquisas e de extensão. E pelo apoio nos momentos mais difíceis. Você foi minha luz durante toda minha trajetória na Universidade Federal de Pernambuco, obrigado!

Agradeço ao Renan Barbosa, pela cobrança, colaboração, confiança, paciência e amizade. Por estar presente em momentos bons e não se ausentar nas dificuldades. Obrigado por ensinar tudo (pesquisar e escrever cientificamente), pelas discussões científicas e incentivos (publicação, eventos, cursos). Sem a sua contribuição eu não teria conseguido alcançar meus objetivos. Obrigado por ter sido determinante na minha formação, e me desenvolver como pesquisador e pessoa. Você é uma de pessoa extremamente ética, justa e um estupendo pesquisador.

À minha orientadora, Prof. Dra. Neiva Tinti de Oliveira, agradeço pela confiança, apoio, conhecimentos e oportunidade de desenvolver meu estudo no Laboratório de Fungos Fitopatogenicos e Biocontrolados (Lab. Fito). Agradeço a minha co-orientadora Marilia Maciel, por não medir esforços para auxiliar no desenvolvimento do meu estudo. Aos integrantes do Lab. Fito, sou grato pela convivência, discussões científicas, pelos eventos e amizade construída, particularmente aos alunos Felipe Barbosa, Amanda Alves, Ana Carla, Athaline Diniz, Daniel Barbosa, João Paulo, Thayza Ribeiro, Nicole Brito e aos professores Dr. Roger Fagner de Melo e Dra. Patrícia Vieira Tiago.

Agradeço a todos os funcionários e Professores do Departamento de Micologia e aos meus amigos da turma de mestrado (2017) pela convivência, desenvolvimento profissional e amizade.

Agradeço também a Associação Pernambucana de Apicultores e Meliponicultores (APIME), em especial ao Thiago Melo, Wal e ao Alexandre Moura, pelo acesso as colmeias das abelhas, apoio e amizade. E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste estudo, muito obrigado!

Ao Programa de Pós-Graduação de Biologia de Fungos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) agradeço pelo incentivo e pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

Melipona scutellaris (Hymenoptera: Apidae: Meliponini), a Uruçu verdadeira, é uma abelha sem ferrão nativa da mata atlântica do nordeste do Brasil. Fungos são cosmopolitas e podem ser isolados dos mais diversos substratos, inclusive mel, pólen e superfície de colmeia de abelhas e são bons produtores de enzimas extracelulares de interesse biotecnológico. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de produção de lipases de fungos isolados do pólen, mel e superfície do ninho no interior das colmeias das abelhas sem ferrão *M. scutellaris* da Mata Atlântica no município de Paulista, Pernambuco, Brasil, utilizando óleo da polpa de Pequi (*Caryocar brasiliense*) como substrato. Os fungos filamentosos foram identificados pelo sequenciamento parcial da região genica ITS, e as leveduras região genica LSU. A produção de lipases foi testada por meio da técnica de fermentação submersa, utilizando o óleo da polpa de Pequi (*C. brasiliense*) como indutor. Foram obtidos 284 isolados (189 fungos filamentosos e 95 leveduras), com maior frequência dos gêneros *Penicillium* (25,3 %), *Candida* (18 %), *Aspergillus* (11,3 %), *Monascus* (9 %), *Cladosporium* (7,1 %) e observadas 10 prováveis espécies novas pertencentes aos gêneros *Candida*, *Castanediella*, *Gjaerumia*, *Penicillium*, *Monascus*, *Oidiodendron*, *Talaromyces* e *Zygosaccharomyces*. Quarenta e oito isolados foram testados para atividade lipolítica, que variou de 3,86 à 20,76 U.mL⁻¹.min⁻¹(U). Os isolados que apresentaram maiores atividades lipolíticas foram *Cladosporium* sp. 1 (FIBIO 002-H1) (20.76 ± 0,03 U); *Cladosporium* sp. 4 (17.06 ± 0,08 U); *Cladosporium* sp. 1 (FIBIO 004-F10) (14.87 ± 0,91 U); *Cordyceps* sp. (12.53 ± 0,12 U); *Microascus* sp. (10.03 ± 0,95 U); *Aspergillus nomius* (9.77 ± 0,24 U) e podem ser indicados para estudos de otimização, imobilização e caracterização das enzimas. Os substratos relacionados às abelhas sem ferrão nativas do Brasil ainda são pouco estudados e contém isolados de espécies fúngicas ainda desconhecidas para a ciência e com potencial utilização em processos biotecnológicos. Todo o conhecimento a respeito das abelhas nativas, contribuirá para a conservação dessas espécies. Estudos futuros sobre as relações estabelecidas entre fungos-abelhas devem ser conduzidos para entendimento das relações ecológicas.

Palavras-chave: Abelhas sem ferrão. Atividade lipolítica. Fungos filamentosos. Leveduras. Micobiota.

ABSTRACT

Melipona scutellaris (Hymenoptera: Apidae: Meliponini), the Uruçu, is a stingless bee native to the Atlantic forest of northeastern Brazil. Fungi are cosmopolitan and can be isolated from the most diverse substrates, including honey, pollen and bee hive surfaces and are good producers of extracellular enzymes of biotechnological interest. The objective of the present study was to evaluate the potential of lipase production from fungi isolated from pollen, honey and nest surface inside the hives of stingless bees from the *M. scutellaris* of the Atlantic Forest in the municipality of Paulista, Pernambuco, Brazil, using oil from the Pequi pulp (*Caryocar brasiliense*) as substrate. The filamentous fungi were identified by the partial sequencing of the ITS genetic region, and the yeasts LSU genetic region. The production of lipases was tested using the submerged fermentation technique, using Pequi pulp oil (*C. brasiliense*) as an inducer. 284 isolates were obtained (189 filamentous fungi and 95 yeasts), most frequently of the genera *Penicillium* (25.3%), *Candida* (18%), *Aspergillus* (11.3%), *Monascus* (9%), *Cladosporium* (7, 1%) and observed 10 probable new species belonging to the genera *Candida*, *Castanediella*, *Gjaerumia*, *Penicillium*, *Monascus*, *Oidiodendron*, *Talaromyces* and *Zygosaccharomyces*. Forty-eight isolates were tested for lipolytic activity, which ranged from 3.86 to 20.76 U.mL⁻¹.min.⁻¹ (U). The isolates that showed the highest lipolytic activities were *Cladosporium* sp. 1 (FIBIO 002-H1) (20.76 ± 0.03 U); *Cladosporium* sp. 4 (17.06 ± 0.08 U); *Cladosporium* sp. 1 (FIBIO 004-F10) (14.87 ± 0.91 U); *Cordyceps* sp. (12.53 ± 0.12 U); *Microascus* sp. (10.03 ± 0.95 U); *Aspergillus nomius* (9.77 ± 0.24 U) and can be indicated for studies of optimization, immobilization and characterization of enzymes. The substrates related to stingless bees native to Brazil are still poorly explored and contain isolates of fungal species still unknown to science and with potential use in biotechnological processes. All knowledge about native bees will contribute to the conservation of these species. Future studies on the relationships established between bee fungi must be conducted to understand the ecological relationships.

Key-words: Filamentous fungi. Lipolytic activity. Micobiota. Stingless bee. Yeasts.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEORICO

Figura 1 - Esquemática dos ninhos das Meliponinis em ambiente natural	17
Figura 2 - Entrada dos ninhos de abelhas da Tribo Meliponini. Entrada do ninho <i>Melipona scutellaris</i>	18
Figura 3 - <i>Melipona scutellaris</i> Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). A: Abelha operária; B: Abelha macho	22
Figura 4 - Reação de hidrólise catalisada pelas Lipases.....	28
Figura 5 - Reações catalisadas pelas lipases em solvente orgânico de interesse industrial	30
Figura 6 - Pequi, fruto do <i>Caryocar brasiliense</i>	34

MATERIAIS E METODOS

Figura 7 - Coleta de mel, pólen e superfície da colmeia em caixas racionais de <i>Melipona scutellaris</i> em fragmento de Mata Atlântica na cidade de Paulista	37
Figura 8 - Representação esquemática da reação de hidrólise do <i>p</i> -nitrofenil palmitato catalisada por lipase.....	40

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 9 - Fungos filamentosos e leveduras isolados de colmeias de <i>Melipona scutellaris</i> . Culturas semeadas em placas de Petri contendo meio Ágar Malte (1ª à 5ª linha) e Batata Dextrose Ágar (6ª e 7ª linha) crescidos por sete dias a 25 °C. 1ª Linha (da Esquerda para direita): <i>Talaromyces pinophilus</i> , <i>T. pigmentosus</i> , <i>Aspergillus lacinosus</i> , <i>Penicillium austrosinicum</i> , <i>A. monius</i> ; 2ª Linha (da Esquerda para direita): <i>T. scorteus</i> , <i>Penicillium brocae</i> , <i>A. sydowii</i> , <i>A. chevalieri</i> , <i>P. steckii</i> ; 3ª Linha (da Esquerda para direita): <i>P. brocae</i> , <i>P. mallochii</i> , <i>T. albobiverticillius</i> , <i>Phaeoacremonium australiense</i> , <i>Zygosporium masonii</i> . 4ª linha (da	
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Esquerda para direita): <i>Starmerella bombicola</i> , <i>Kodamaea ohmeri</i> , <i>Wickerhamiella versatilis</i>	43
Figura 10 - Agrupamento por gênero usando análise de máxima verossimilhança (ML) para região ITS1, 5.8S e ITS2 do rDNA de fungos filamentosos isolados a partir de amostras de mel, pólen e na superfície das colmeias de <i>Melipona scutellaris</i> coletadas no presente estudo. Valores de bootstrap a partir de 1000 repetições são indicados nos nós.....	44
Figura 11 - Agrupamento por gênero usando análise de máxima verossimilhança (ML) para o domínio D1/D2 do gen 26S do rDNA das leveduras isoladas a partir de amostras de mel, pólen e na superfície das colmeias de <i>Melipona scutellaris</i> coletadas no presente estudo. Valores de bootstrap a partir de 1000 repetições são indicados nos nós.....	45
Figura 12 – <i>Castanediella meliponae</i> (Figura 12) J.E. Felinto-Santos, R.N. Barbosa & N.T. Oliveira, sp. nov. A: Superfície do ninho de <i>Melipona scutellaris</i> . B: (esquerda para a direita) Superfície e reverso de crescimento de colônias em PDA. C: Células conidiogênicas e conídios. D: Conidióforo e conídios. E: Conídios. Barras de escala: c – e = 10 µm.	55
Figura 13 - Produção de lipases por isolados de <i>Aspergillus</i> de amostras de colmeia de <i>Melipona scutellaris</i> . A: Controle negativo; B: <i>A. monius</i> ; C: <i>A. sclerotiorum</i>	58
Figura 14 - Produção de lipases por isolados de <i>Cladosporium</i> de amostras de colmeia de <i>Melipona scutellaris</i> . A: Controle negativo; B: <i>Cladosporium</i> sp. 1 (FIBIO 002-H1); C: <i>Cladosporium</i> sp. 4; D: <i>Cladosporium</i> sp. 1 (FIBIO 004-F10)	59

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEORICO

Tabela 1 - Classificação das Abelhas da Tribo Meliponini	16
Tabela 2 - Espécies de Abelhas da Tribo Meliponini nativas da Mata Atlântica brasileira	20
Tabela 3 - Classificação das enzimas de acordo com a União internacional de Bioquímica (IUB)	28
Tabela 4 - Comparação da composição dos Ácidos graxos de diferentes óleos em relação ao óleo de pequi, a cada 100 gramas de parte comestível.....	35

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 5 - Quantitativo de isolados de fungos obtidos do mel, pólen e superfície da colmeia em caixas racionais de <i>Melipona scutellaris</i>	41
Tabela 6 - Espécies de fungos filamentosos e leveduras isoladas de Mel, pólen e superfície da colmeia de <i>Melipona scutellaris</i> . Frequência absoluta (FA) e frequência relativa (FR).	46
Tabela 7 - Atividade lipolítica do fungos filamentosos e leveduras isolados do mel, pólen e superfície colmeia de <i>Melipona scutellaris</i>	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	15
1.1.1 Objetivo geral.....	15
1.1.2 Objetivos específicos.....	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.2 MEL DAS ABELHAS SEM FERRÃO	22
2.3 PÓLEN DOS NINHOS DAS ABELHAS SEM FERRÃO	25
2.4 FUNGOS E AS ABELHAS SEM FERRÃO	26
2.5 ENZIMAS HIDROLÍTICAS: LIPASE.....	27
2.5.1 Lipases de origem microbiana	29
2.6 PEQUI (<i>Caryocar brasiliense</i>).....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 COLETA E ISOLAMENTO DOS FUNGOS.....	36
3.2 PURIFICAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS	37
3.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS.....	37
3.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS	38
3.5 ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	38
3.6 ANALISE DOS DADOS	39
3.7 PRODUÇÃO DE LIPASES PELOS FUNGOS ISOLADOS DE AMOSTRAS DE COLMEIA DE <i>M. scutellaris</i>	39
3.7.1 Fermentação submersa	39
3.7.2 Avaliação da atividade lipolítica.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41

4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ISOLADOS DOS SUBSTRATOS DAS COLMEIAS DE <i>M. scutellaris</i>	41
4.2 PRODUÇÃO DE LIPASES POR FUNGOS ISOLADOS DE AMOSTRAS DE COLMEIA DE <i>M. scutellaris</i>	57
5 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

As abelhas nativas da mata atlântica do Nordeste brasileiro *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) Latreille, 1811 possuem um atrofiamento do ferrão e são conhecidas popularmente como Uruçu verdadeira. São responsáveis pela polinização de mais de 50 % de toda flora nativa brasileira (KERR et al., 1996; SILVEIRA et al., 2002; BALLIVIÁN et al., 2008). Podem ser criadas em caixas racionais sendo esta prática conhecida como Meliponicultura. No Nordeste do Brasil, a meliponicultura possui vários impactos sociais positivos, em especial na produção de mel. A principal abelha domesticada no Nordeste, entre os gêneros de *Melipona*, é a *M. scutellaris* devido a sua alta produção e qualidade do mel (SILVA; PAZ, 2012).

O mel é utilizado para fins terapêuticos desde os primórdios das sociedades humanas. Devido às suas propriedades químicas, pode apresentar atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena, antioxidante, antiviral, entre outras (RAO et al., 2016). As condições químicas do mel, o torna um ambiente inóspito para desenvolvimento e permanência da maioria dos micro-organismos, assim a microbiota do mel, geralmente, encontra-se em estado de latência (SILVA et al., 2017). No entanto, alguns micro-organismos podem crescer sob condições severas, em ambientes extremos, selecionados por pressão de alguns fatores como dessecação, temperatura, pH, salinidade, entre outros (DUARTE, 2014). Os micro-organismos adaptados a ambientes de alta concentração de açúcar são denominados osmofílicos, enquanto que os que sobrevivem em ambientes com baixa atividade de água recebem denominação de xerófilos (DUARTE, 2014).

O mel de *M. scutellaris* apresenta uma alta concentração de açúcar e baixa atividade de água (SOUZA, 2008). Bactérias esporulantes, leveduras e fungos filamentosos podem ser isolados em ninhos de abelha (SILVA et al., 2017). A microbiota presente no mel é oriunda de fontes primárias e secundárias. As fontes microbianas primárias são o pólen, o trato digestivo das abelhas, o ar e as flores, enquanto que, as fontes secundárias incluem a atividade humana, equipamentos e recipientes para colheita (OLAITAN et al., 2007).

Alguns estudos que relataram a diversidade da microbiota em ninhos de diferentes espécies de abelhas (GILLIAM; PREST, 1987; GILLIAM, 1997; FERRAZ et al., 2008; GOIS et al., 2010; BARBOSA et al., 2016; BARBOSA et al., 2017; BARBOSA et al., 2018;

PINHEIRO et al., 2018). Para a abelha *M. scutellaris*, espécies do fungo filamentoso pertencente ao gênero *Monascus* foram isolados em substratos de *M. scutellaris* (BARBOSA et al., 2017). Barbosa et al. (2018) evidenciaram a diversidade de espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* também em substratos de *M. scutellaris*. No entanto, existe uma grande lacuna sobre a microbiota relacionada às abelhas pertencentes da Tribo Meliponini (SILVA et al., 2017), em especial no Brasil.

Neste contexto, o conhecimento desta comunidade micológica do mel e do pólen das abelhas sem ferrão nativas da Mata Atlântica brasileira, além de ser importante para o registro taxonômico da diversidade das espécies, é fundamental para uma possível exploração dessas espécies em processos biotecnológicos, como por exemplo, na produção de enzimas lipolíticas.

As lipases (triacilglicerol Ácil hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas capazes de catalisar reações de hidrólise de lipídeos como os triglicerídeos, e em ambientes com restrição de água, podem catalisar reações de esterificação, interesterificação e transesterificação (STOYTCHIEVA et al., 2012; RODRIGUES, 2015; GEOFFRY; ACHUR, 2018). Grande parte da produção de lipases é obtida a partir de micro-organismos e são amplamente utilizadas nas indústrias alimentícias, de oleoquímica, de cosméticos, farmacêuticas, na produção de detergentes e de biodiesel (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; RODRIGUES, 2015).

As enzimas de origem microbiana apresentam vantagens em relação às de origem animal e vegetal, como, maior variedade de atividades catalíticas, altos rendimentos, a fácil manipulação genética dos organismos produtores, maior regularidade na sua produção, segurança e pureza (HASAN et al., 2006; GEOFFRY; ACHUR, 2018). Os micro-organismos extremo-tolerantes, em decorrência as adaptações morfo-fisiológicas, tendem a produzir novas moléculas ou moléculas modificadas (WILSON; BRIMBLE, 2009). Vários fungos vêm sendo relatados como produtores de lipases, destacando-se os dos gêneros *Aspergillus*, *Candida*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* (SHARMA; CHISTI; BANERJEE 2001; GOPINATH et al., 2004; COLEN, 2006; ROVEDA et al., 2010; FERRAREZI, 2011; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; REINEHR et al., 2014; DUARTE, 2014; RODRIGUES, 2015; DAS et al., 2016; CANSECO-PÉREZ et al., 2018).

A larga utilização das lipases em meio industrial está relacionada à diminuição dos custos de produção. A seleção de novos microrganismos produtores e a utilização de meios

de cultivo de baixo custo são vistas como excelentes alternativas para a diminuição de gastos destes processos (REINEHR et al., 2014). Nesta perspectiva, o óleo de Pequi é considerado um substrato de fácil obtenção. O pequi é o fruto mais consumido, comercializado e estudado na região do Cerrado do Brasil, e também bastante utilizado em alguns estados do Nordeste, como Ceará (SOMCHINDA et al., 2018) e a exploração do Pequizeiro (*Caryocar brasiliens*) é considerada sustentável. O óleo da polpa do Pequi pode ser obtido de forma extrativista, é rico em ácidos graxos insaturados e possui uma coloração amarela (OLIVEIRA; SCARLOT, 2010).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi e avaliar seu potencial de produção de lipases de fungos isolados do pólen, mel e superfície do ninho no interior das colmeias das abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris* da Mata Atlântica no município de Paulista, Pernambuco, Brasil, utilizando óleo da polpa de Pequi (*C. brasiliense*) como substrato.

1.1.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar fungos filamentosos e leveduras em amostras de pólen, mel e superfície das colmeias de *M. scutellaris*;
- Determinar a composição da micobiota de substratos de abelhas sem ferrão em áreas de Floresta Atlântica em Pernambuco;
- Enriquecer as bases de dados genéticos de fungos isolados em ambiente de Floresta Atlântica por meio do sequenciamento e depósito das sequências no National Center for Biotechnology Information (NCBI);
- Selecionar e indicar fungos que apresentam bom potencial de atividade lipolítica para uso biotecnológico.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ABELHAS NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA BRASILEIRA

As abelhas estão difundidas nos mais diversos ecossistemas, elas desempenham um importante serviço de polinização. As abelhas podem ser insetos sociais ou solitários, entre as verdadeiramente sociais encontramos as abelhas melíferas, as mamangavas e as abelhas sem ferrão. As abelhas sem ferrão recebem esse nome, por apresentarem um atrofiamento de seu ferrão (BALLIVIÁN et al., 2008). Constituem um grupo formado por mais de 300 espécies descritas e são classificadas na subfamília Meliponinae e distribuídas na tribo Meliponini (Tabela 1) (MICHENER, 2007; MARTINS et al., 2015). O Brasil possui a maior diversidade de Meliponini, sendo registradas em torno de 240 espécies (HRNCIR et al., 2017; MEIRELES, 2018). Sua distribuição geográfica é observada nas regiões tropicais e subtropicais, com abrangência do Rio Grande do Sul ao Centro do México, e na África, Índia, Malásia, Indonésia e Austrália (KERR et al., 1996; MICHENER, 2007).

Tabela 1 - Classificação das Abelhas da Tribo Meliponini

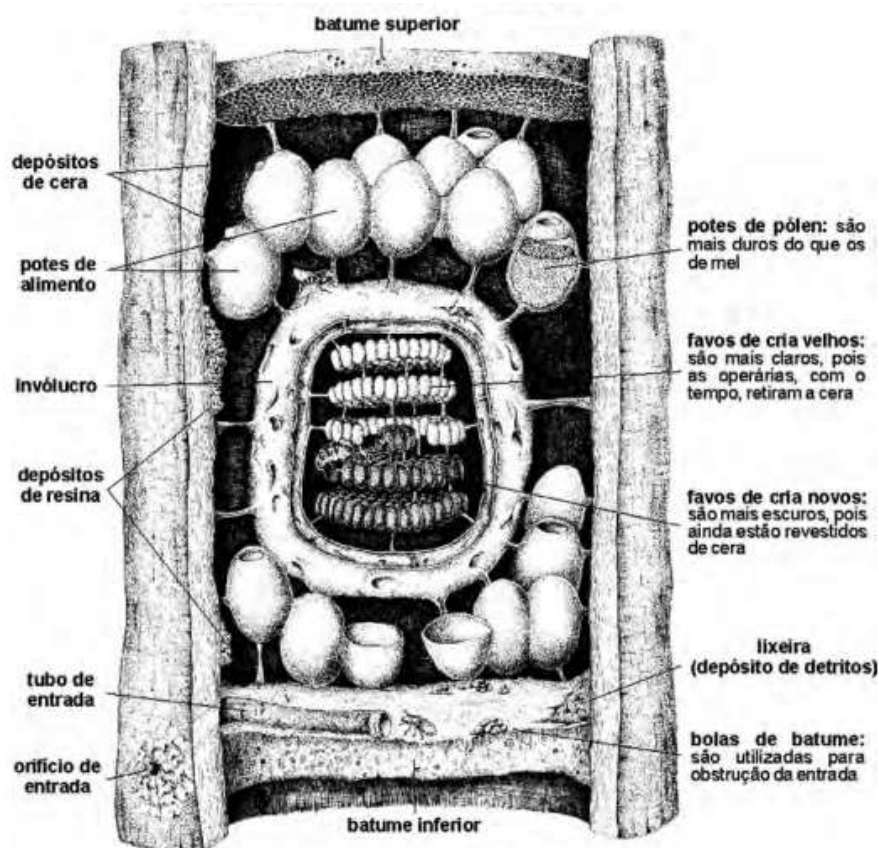
Nível taxonômico	Nome
Classe	Insecta
Ordem	Hymenoptera
Superfamília	Apoidea
Família	Apidae
Subfamília	Apinae
Tribo	Meliponini

Fonte: VILLA-BÔAS, 2012.

A palavra Meliponini é originária de duas palavras do latim, *mellis* e *ponere*, que significam: *mellis* = mel e *ponere* = pôr ou colocar; ou seja, são abelhas que põem o mel em suas colmeias (HRNCIR et al., 2017). Essas abelhas permanecem na mesma colônia por bastante tempo, e suas colônias são compostas, normalmente, por uma única rainha, as abelhas operárias e as abelhas macho. No ambiente natural, as abelhas sem ferrão constroem seus ninhos em cavidades já existentes como, troncos ocos ou ninhos de cupins e formigas abandonados (PEDRO; CAMARGO, 1999; SILVEIRA et al., 2002).

Os meliponíneos possuem um hábito de nidificação, e seus ninhos são construídos pelos materiais coletados pelas abelhas operárias como resina, barro e argila. A resina é importante na nidificação, pelo fato de se misturar com a cera formando o cerume que compõe toda a colmeia (BALLIVIÁN et al., 2008; SILVEIRA; PAZ, 2012). O ninho é composto pelos favos de cria, os potes de mel, potes de pólen, depósitos de cera e resina, batume, invólucro, tubo de entrada e lixeira (Figura 1) (VENTURIERI, 2008). Dentro do ninho, as células da cria podem ser agrupadas em favos horizontais, em cachos, ou até em espiral (VENTURIERI, 2008).

Figura 1 - Esquemática dos ninhos das Meliponinis em ambiente natural



Fonte: VENTURIERI, 2008

A entrada dos ninhos das meliponíneas acontece através de um ducto entre o orifício de entrada e a cavidade no ninho, a estrutura é constituída uma junção de barro ou argila com as resinas coletadas pelas abelhas operárias, comumente, possui formato de vulcão (Figura 2). Este tubo permite a entrada e saída de umas abelhas por vez da colmeia e, na maioria das vezes é controlada por uma abelha operária. Este controle é fundamental na defesa do ninho contra possíveis invasores (VENTURIERI, 2008).

As abelhas sem ferrão são insetos com altíssimo grau de evolução social, vivendo em colônias permanentes e dividindo suas funções por entre as castas da sociedade (BALLIVIÁN et al., 2008). A rainha desempenha o papel de reprodução e perpetuação da espécie, as operárias ficam responsáveis pela construção e manutenção do ninho, atuando na defesa da ninhada e coleta de alimentos, enquanto que, os machos não possuem função bem definida no ninho, em suma, eles aguardam a maturação sexual e vão em busca das abelhas princesas (HRNCIR, et al., 2017). A rainha também realiza ações para manter a coesão da colônia, através de alguns rituais juntos as operárias e pela liberação de feromônio (CÁMARA et al., 2004). As larvas são alimentadas pelas abelhas operárias, que depositam os alimentos nas células da cria. Quando as larvas eclodem, a manutenção é realizada pelas operárias que utilizam o cerume para fechar as células (CÁMARA et al., 2004).

Figura 2 - Entrada dos ninhos de abelhas da Tribo Meliponini. Entrada do ninho *Melipona scutellaris*



Fonte: Próprio autor.

A domesticação dessas abelhas é facilitada devido à falta de ferrão. As meliponinis podem ser criadas em caixas racionais e facilmente multiplicadas sem danos ao meio ambiente (MEIRELES, 2018). A pratica de domesticação das abelhas sem ferrão pelo

método de criação em caixas racionais é fundamental para conservação e importante para exploração comercial que é denominada de meliponicultura (BARBOSA et al., 2018).

As espécies de *Melipona* são bastante dependentes de oco de árvores vivas para construção de seus ninhos, por conta disto, são raros ou ausentes os registros sem áreas urbanizadas ou dominadas pelas agricultura e pecuária (PEDRO; CAMARGO, 1999). As abelhas sem ferrão brasileiras se encontram ameaçadas de extinção, Kerr et al. (2005) elencaram os sete principais fatores que podem estar atrelados a redução populacional dessas abelhas, como desmatamentos, queimadas, ação dos meleiros e serralheiros, isolamento de colmeias, uso de inseticidas.

Outro fator que pode estar relacionado ao declínio dessas abelhas, foi a introdução de *Apis mellífera*, que ocorreu ainda no período colonial (LOPES et. al., 2005; BALLIVIÁN et al., 2008). Atualmente, *A. mellífera* é a abelha mais utilizada para produção de mel no mundo. Em relação às abelhas nativas sem ferrão, a *Apis* tem uma maior produtividade de mel e assim muitos produtores perdem o interesse na meliponicultura, em especial no Sul e Sudeste do país.

Entretanto, no Norte e Nordeste do Brasil a meliponicultura é bastante praticada pelas comunidades tradicionais e camponesas (LOPES et. al., 2005). Segundo, Venturieri (2008), na Amazônia, por exemplo, a pratica da meliponicultura tem sido considerada uma excelente alternativa para geração de renda para o povo nativo, pois se configura como uso sustentável dos recursos naturais sem necessidade de remoção da cobertura vegetal nativa e auxilia na perpetuação e conservação das espécies de meliponíneos.

2.1.1 *Melipona scutellaris* Latreille, 1811

Entre os gêneros das abelhas sem ferrão, *Melipona* é o que apresenta maior número de espécies (SILVEIRA et al., 2002). Desde o período pré-Cabral que as meliponíneas são domesticadas por diversas tribos indígenas, por isto também são chamadas como abelhas indígenas sem ferrão. No Nordeste brasileiro, duas espécies se destacam na domesticação por tribos de índios: *M. compressipes* (Tiúba) pelos Timbira, Tupinambá, Guajajara, Tremembé, Guajá, Urubu, Gavião; e *M. scutellaris* (Uruçu) que foi domesticada principalmente pelas tribos: Potiguara, Kiriri, Xucuru, Pataxo, Paiaku, Tupirucuba, Caete, Aymore (KERR, et al., 1996, ALVES et al., 2011).

Melipona scutellaris (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) é uma abelha nativa da mata atlântica do Nordeste brasileiro (Tabela 2), seu nome popular é uruçu verdadeira, do tupi "eiru'su" que significa "abelha grande" (WEBBEE, 2014). Sua criação é destaque em alguns estados do Nordeste, especialmente Pernambuco e Bahia (CARVALHO; ZANELLA, 2017).

Tabela 2 - Espécies de Abelhas da Tribo Meliponini nativas da Mata Atlântica brasileira

Espécie	Nome popular	Distribuição geográfica
<i>Frieseomelitta varia</i>	Manuel-D'abreu	BA, GO, MG, MT, SP, TO
<i>Melipona bicolor bicolor</i>	Guarupú, Pé-De-Pau	BA, ES, MG, RJ, SP
<i>Melipona bicolor schencki</i>	Eira-Aviyú, Eirû, Guarupú, Guaraipo, Pé-De-Pau, Guaraipo- Negra e Guaraipo- Sulina	PR, RJ, RS, SC, SP
<i>Melipona mondury</i>	Tuiuva, Tjuuva, Tujuba, Monduri, Mondiri	BA, ES, MG, PR, RJ, RS, SC, SP
<i>Melipona obscurior</i>	Manduri	MT, PR, RS, SC, SP
<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	Mandaçaia	AL, BA, ES, GO, MS, MG, PB, PE, RJ, SE, SP
<i>Melipona quadrifasciata quadrifasciata</i>	Mandaçaia	MS, MG, PR, RJ, RS, SC, SP
<i>Melipona scutellaris</i>	Uruçu-do-Nordeste, Uruçu-Verdadeira	AL, BA, CE, PB, PE, RN, SE
<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Tubuna, Enrola- Cabelo, Canudo	AC, CE, MA, MG, PA, PR, RJ, RS, SC

Tabela 2 conclusão

Espécie	Nome popular	Distribuição geográfica
<i>Scaptotrigona aff. depilis</i>	Tombuna, Canudo, Mandaguari, Tubiba	MS, MG, PR, RS, SP
<i>Scaptotrigona xanthotricha</i>	Trompeta, Mandaguari- Amarela, Tujumirim	BA, ES, MG, PR, RJ, SC, SP
<i>Tetragona clavipes</i>	Vorá, vamos- embora, borá	AC, AM, AP, BA, ES, GO, MA, MG, MS, MT, PR, PA, PI, RJ, RS, SC, SP
<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	AM, AP, BA, CE, ES, GO, MA, MG, MS, MT, PR, PB, PA, PE, RJ, RR, RS, SC, SP

Fonte: VENTURIERI et al., 2012

M. scutellaris se diferencia das outras espécies do gênero pelo grande tamanho de seu corpo, por possuir coloração escura em sua face, apresentar linhas brancas nos bordos de sua placa de quitina na parte dorsal, e por apresentar coloração de ferrugínea para amarelada em seus pelos do tórax (Figura 3) (CARVALHO; ZANELLA, 2017). *M. scutellaris* possui enorme importância para o meio ambiente, sendo responsável, por polinizar em torno de 30 % a 90 % da polinização da flora nativa da mata atlântica do Nordeste brasileiro (SILVEIRA et al., 2002; BALLIVIÁN et al., 2008; SANTOS, 2010). No Nordeste, *M. scutellaris* além da importância para o meio ambiente, tem na produção de mel impactos sociais positivos, (SILVEIRA et. al., 2002; SILVA; PAZ, 2012; BARBOSA et al., 2018).

Figura 3 - *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). A: Abelha operária; B: Abelha macho



Fonte: CARVALHO; ZANELLA, 2017

M. scutellaris quando comparada a outras *Meliponas*, se destaca pela alta quantidade de indivíduos no ninho, baixa agressividade, higiene e seletividade de coleta, fazendo que o seu mel seja de excelente qualidade (CAMPOS et al., 2011). O mel da Uruçu é uma iguaria valiosa para a região nordeste, tendo inúmeras finalidades, em especial para fins terapêuticos (WEBBEE, 2014). A produção média de mel por essas abelhas pode alcançar volumes de até 5 até 8 litros por colmeia durante um ano (DRUMOND, 2010) e pode alcançar valores médios de mercado entre R\$ 60,00 e R\$ 300,00.

2.2 MEL DAS ABELHAS SEM FERRÃO

O mel é um produto alimentício líquido e viscoso, produzido pelas abelhas, tendo o néctar das flores como sua principal matéria prima, combinados com substâncias específicas próprias das abelhas, sendo armazenado até madurar nos potes do ninho (BRASIL, 2000). O mel foi um dos primeiros alimentos utilizados pelas sociedades humanas como fonte de açúcar (SOUZA et al., 2006). Em períodos antes de Cristo, os egípcios já praticavam a apicultura (BALLIVIÁN et al., 2008). Na América Latina, os maias da região de Yucatán, tinham o costume de domesticar abelha sem ferrão para o consumo de seu mel, principalmente as espécies *Melipona beecheii* e *Scaptotrigona* spp. (VENTURIERI et al., 2012). O uso do mel e do pólen das abelhas nativas sem ferrão nos períodos pré-hispânicos e pré-Cabral, tinham papel significativo na dieta das comunidades indígenas americanas (BALLIVIÁN et al., 2008).

No Brasil, antes do século XX, o mel e a cera que eram utilizados na alimentação pelo povo indígena, e os colonizadores na confecção de velas pelos padres jesuítas, tinham origem das abelhas sem ferrão (BALLIVIÁN et al., 2008). Além disto, o mel das abelhas sem ferrão era bastante utilizado rituais religiosos, como homenagens a deuses e embalsamento de defuntos (CAMARGO, 2012). Até 1838 no Brasil, as abelhas sem-ferrão eram as únicas produtoras de mel empregadas, até a introdução da *A. melífera* no Brasil. Esta introdução, essencialmente, foi para extração de cera para produção de velas dos jesuítas, pois, segundo os jesuítas, o cerume das abelhas sem ferrão apresentava baixa qualidade (KERR et al., 2005).

O mel das abelhas sem ferrão é considerado um produto especial, orgânico e raro, que possui um aroma e sabor único. Diferente das abelhas europeias, o mel das abelhas nativas é um pouco mais líquido e pode fermentar com certa facilidade e deve ser armazenado em local refrigerado (VENTURIERI, 2008). O caráter físico-químico, o mel das abelhas sem ferrão é definido, em geral, por valores Brix ($^{\circ}$ Brix), atividade de água, concentração de açúcar, pH e acidez. Estudos quantificaram as características físico-químicas do mel das abelhas sem ferrão (SOUZA et al., 2004; SOUZA et al., 2009; SOUZA et al. 2009 (a); ALVES et al., 2011; CAMPOS et al., 2011; CHAVES et al., 2012; SPATH, 2013; JIMENEZ et al., 2016).

O mel das abelhas sem ferrão é caracterizado físico-quimicamente por pH baixo, alta acidez, alta concentração de açúcar e baixa atividade de água. Alguns fatores físicos e químicos, como a acidez e pH, atrelado a outras moléculas presente no mel, atribuem a ele uma atividade antimicrobiana (SOUZA, 2008). O pH e a acidez são considerados importantes fatores antimicrobianos, criando uma barreira, principalmente, contra as bactérias, que tem preferência de meios alcalinos e/ou neutros para seu desenvolvimento (CONTI, 2000).

O mel é utilizado para fins terapêuticos por diversas civilizações humanas, seus efeitos positivos têm sido confirmados por séculos de observações, tornando-se um dos principais agentes terapêuticos da medicina tradicional (SZWEDA, 2017). Os antigos povos Assírios, Chineses, gregos e romanos empregavam mel para feridas e doenças do intestino (AL-JABRI, 2005). No antigo Egito, era bastante comum prescrições medicas baseadas no uso de substâncias comuns como o mel (MADALENO, 2015). No mundo islâmico, o mel é

considerado uma bebida terapêutica, tendo registros de 1000 anos atrás de seu uso no combate de diarreia e tuberculose (ETERAF-OSKOU EI; NAJAFI, 2013).

Atualmente no Brasil, é bastante frequente encontrar xaropes fabricados caseiramente, utilizando o mel como matéria prima básica (MADALENO, 2015). Os estudos de Costa Neto e Pacheco (2005) e Almeida e Albuquerque (2002) observaram que populações de algumas de cidades do Nordeste do Brasil utilizavam o consumo do mel de *M. scutellaris* diretamente no tratamento de doenças ligadas ao sistema respiratório, como gripes, bronquite, tosse, asma, e também e em problemas intestinais.

Na composição do mel podemos encontrar várias moléculas, incluindo frutose e glicose, água, cinza, proteínas e aminoácidos, e traços de enzimas, vitaminas e substâncias como os compostos fenólicos (RAO et al., 2016). Certas substâncias específicas podem ser encontradas no mel, como alguns tipos de ácidos, entre eles: fenólicos, cafeico, elágico, ferúlico e *p*-cumárico; certos flavonóides, como apigenina, crisina, galangina, hesperetina, kaempferol, pinocembrina e quercetina; e substâncias antioxidantes, a exemplos de tocoferóis, ácido ascórbico, superóxido dismutase, catalase e glutathione reduzida (RAO et al., 2016). Esta composição é influenciada por diversos fatores como a composição do néctar, condições climáticas, manejo do produtor e espécie de abelha que o produz (CARVALHO et al., 2005; RAO et al., 2016).

As substâncias que compõem o mel, atrelam a ele propriedades terapêuticas, destacam-se propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes, antiviral, antiparasitária e cicatrizantes (SUBRAHMANYAM, 1993; AL-MAMARY et al., 2002; TOPHAM, 2002; AL-WAILI, 2004; ALNAQDY, et al., 2005; JIMENEZ et al., 2016; SHEHU et al., 2016; PEREIRA, 2018).

Em relação ao mel das abelhas sem ferrão, alguns estudos têm testado suas propriedades terapêuticas. O mel de *M. subnitida* tem sido utilizado para acelerar o processo de cicatrização em pele de ratos. A aceleração do processo cicatricial se deu por conta a atividade antibacteriana do mel que combateu diretamente bactérias Gram-negativas e Gram-positivas que estavam causando o processo infeccioso (ALVES et al., 2008). O mel de abelhas do gênero *Melipona* tem eficácia na atividade antifúngica e antimicrobiana (PIMENTEL et al., 2013; CRUZ et al., 2014; PEREIRA, 2018; também compararam a atividade antimicrobiana e antifúngica e o mel de *Scaptotrigona mexicana* apresenta atividade antioxidante (JIMENEZ et al., 2016). Todos esses estudos confirmaram

algumas de suas propriedades terapêuticas, justificando utilização do mel na medicina popular ao longo dos séculos.

2.3 PÓLEN DOS NINHOS DAS ABELHAS SEM FERRÃO

O pólen é um produto fonte de proteínas, lipídios e sais minerais (CORONEL et al., 2004). As abelhas se alimentam quase que exclusivamente de pólen e néctar, para isso, precisam visitar bastantes flores por dia para suprir suas necessidades individuais e da colmeia. As abelhas operárias realizam a coleta de pólen e néctar dentro de flores, com auxílio da corbícula (BALLIVIÁN et al., 2008).

A corbícula é uma modificação do terceiro par de patas, ela é usada para recolher e transportar o pólen até a colmeia. As abelhas sociais tendem a armazenar alimento, principalmente nos períodos mais frio (FREITAS; SILVA, 2015). O pólen armazenado juntamente com o néctar e secreções das glândulas hipofaríngeas, que contêm enzimas β -glicosidases, são transformadas em alimento e distribuídas para larvas em crescimento e outros membros da colmeia (CARPES et al., 2009; ANDERSON et al., 2014).

No Brasil, os índios utilizam o pólen das abelhas sem ferrão no incremento de sua alimentação (BALLIVIÁN et al., 2008). Comunidades tradicionais da Amazônia utilizam o pólen das abelhas sem ferrão também como alimento e no combate de algumas enfermidades (SOUZA et al., 2004). Estudos têm procurado caracterizar físico-quimicamente o pólen das abelhas sem ferrão do Brasil. Souza et al. em 2004, analisaram amostras de pólen de *Melipona seminigra merrillae*, *M. compressipes manaosensis*, *M. rufiventris paraenses* e verificaram as amostras tinham um valor de concentração de açúcar acima de 30 %, um teor de proteína acima dos 15 % e baixo teor de lipídios apresentando valor médio de 4 %. Bárbara et al. (2018) verificaram que o pólen de ninhos de *M. subnitida*, *M. scutellaris*, *M. mandacaia*, *Scaptotrigona sp.*, *F. varia* apresentou uma alta concentração de açúcar, de flavonoides e alta acidez.

Alguns metabolitos secundários de plantas como flavonoides podem ser encontrados em pólen de abelhas sem ferrão, o que retifica sua utilização para fins terapêuticos (LINS et al., 2003; SILVA et al., 2009). Mas ainda são escassos estudos que acerca das propriedades terapêuticas de pólen dos ninhos das abelhas sem ferrão. O pólen também é considerado uma fonte primária para a composição microbiana nas colmeias das abelhas (OLAITAN et al., 2007).

2.4 FUNGOS E AS ABELHAS SEM FERRÃO

Os fungos são organismos cosmopolitas que podem ser isolados nos mais diversos substratos, inclusive nos produtos das abelhas, como mel e pólen. Devido a seu aparato fisiológico, os fungos filamentosos e leveduras conseguem se submeter a altas pressões osmóticas, e podem se desenvolver em substratos com altas concentrações de açúcares, como exemplo o mel (SOUZA, 2008).

No mel, os organismos tolerantes a alta concentração de açúcar (osmofílicos) conseguem se multiplicar e realizar a fermentação quando há um aumento da umidade (CARVALHO et al., 2005). Os fungos presentes no mel e no pólen tendem a permanecer em latência ou de não se desenvolver, por causa das características físico-químicas desses substratos (SILVA et al., 2017).

Comumente leveduras são isoladas dos favos de mel, esses fungos podem ter origem nas próprias abelhas, matérias-primas (néctar) ou de fontes externas (WHITE JÚNIOR, 1978; OLAITAN et al., 2007). Existe um déficit de informações sobre a microbiota relacionada as abelhas da Tribo Meliponini (SILVA et al., 2017) e apenas alguns estudos relatam a presença de fungos relacionados às abelhas sem ferrão (OLIVEIRA; MORATO, 2000; ELTZ et al., 2002; ROSA et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2003; FERRAZ, et al., 2008; SOUZA et al., 2009; GOIS et al., 2010; DANIEL et al., 2013; BARBOSA et al., 2016, BARBOSA et al., 2017; TIAGO, 2017; BARBOSA et al., 2018; PALUDO et al., 2018, SOUZA et al., 2018).

No geral, os fungos associados a abelhas e ninhos são organismos sapróbios, no entanto, podemos encontrar fungos desenvolvendo interações ecológicas harmônicas, e estabelecendo relações de mutualismo com as abelhas (MENEZES et al., 2015). Os estudos dessas interações ainda são bastante raros (OLIVEIRA; MORATO, 2000). Eltz et al. (2002) relataram que abelhas *Tetragonula collina* estavam recolhendo esporos de *Rhizopus* sp. no lugar do pólen. Oliveira; Morato (2000) observaram que espécies de *Trigona* estavam se alimentando de uma massa mucilagínosa de esporos de cogumelos dos gêneros *Dictyophora* e *Phallus* substituindo o pólen. Em outros estudos foram observados comportamento semelhante das abelhas (ROUBIK, 1989; BURR et al., 1996). A pesquisa de Paludo et al. (2018), elucidou o papel das leveduras do gênero *Zygosaccharomyces* no desenvolvimento para o estágio larval de abelhas da espécie

Scaptotrigona depilis, verificando que este fungo produz moléculas precursoras para a síntese de esteroides.

Poucos estudos abordaram a micodiversidade das abelhas sem ferrão no Brasil (ROSA et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2003; FERRAZ, et al., 2008; GOIS et al., 2010; DANIEL et al., 2013; BARBOSA et al., 2016; BARBOSA et al., 2017; TIAGO, 2017; BARBOSA et al., 2018; SOUZA et al., 2018). Rosa et al. (2003) determinaram a diversidade de espécies de leveduras isoladas de substratos de *T. angustula*, *M. quadrifasciata*, *Frieseomelitta varia*. Teixeira et al. (2003) reportaram uma espécie nova de levedura, *Starmerella meliponinorum* associada a substratos de *T. angustula*, *M. quadrifasciata* e *M. rufiventris*. Daniel et al. (2013), também reporta uma espécie nova de *Starmerella*, associada a *M. quinquefasciata*. Em 2016, Barbosa et al. estimaram a diversidade de leveduras em mel de *M. mandacaia*, *M. asilvai*, *Patarmona* sp. e *Scaptotrigona* sp., relatando a presença de leveduras pertencentes aos gêneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Kloeckera* e *Pichia*. Em outro estudo, Ferraz et al. (2008), identificaram fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia*, *Monilia*, *Nigrospora*, *Trichoderma* isolados no corpo das abelhas *M. subnitida*.

Em relação a *M. Scutellaris*, Gois et al. (2010) relataram a presença de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e leveduras em amostras de mel. Barbosa et al. (2017) registraram a presença de cinco espécies de *Monascus* em mel, pólen e superfície da colmeia de *M. scutellaris*, e relataram três espécies novas para a ciência; Barbosa et al. (2018) evidenciaram diversidade de espécies de *Penicillium* e *Talaromyces*, reportando a presença de 27 espécies sendo sete novas para a ciência.

2.5 ENZIMAS HIDROLÍTICAS: LIPASE

Nos sistemas biológicos, as enzimas são responsáveis por catalisar as reações químicas. Atuam em soluções aquosas, diminuindo a energia de ativação e acelerando as reações, sob condições específicas de substrato, temperatura e pH (NELSON; COX, 2014). São classificadas segundo a União Internacional de Bioquímica (IUB) em função das reações que catalisam e divididas em seis classes: oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (Tabela 3) (SANCHEZ; DEMAIN, 2017).

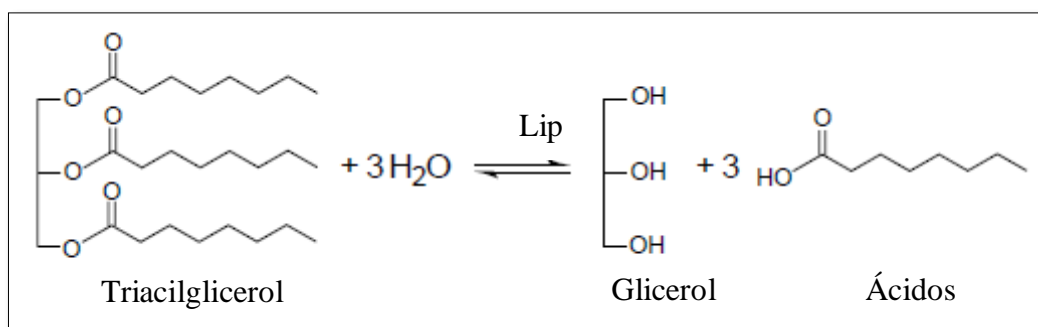
Tabela 3 - Classificação das enzimas de acordo com a União internacional de Bioquímica (IUB)

Classe n°	Nome da classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxirredutases	Transferência de elétrons (íons hídrico ou átomos de H)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água).
4	Liasas	Clivagem de C-C, C-O, C-N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas.
5	Isomerasas	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares

Fonte: NELSON; COX (2014).

As lipases (triacilglicerol-acil hidrolase, EC 3.1.1.3) são enzimas hidrossolúveis que catalisam a reação de hidrólise da ligação éster do triacilglicerol de cadeia longa na interface óleo-água liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (Figura 4) (MESSIAS et al., 2011; COLLA et al., 2012; BINDIYA; RAMANA, 2013; HERMES et al., 2013; MEHTA et al., 2017; PATEL et al., 2018). As lipases são ubíquas em plantas, animais e micro-organismos (GEOFFRY; ACHUR, 2018), nos eucariotos têm função importante em vários estágios do metabolismo lipídico, incluindo digestão de gordura, absorção, reconstituição e metabolismo das lipoproteínas (SHARMA et al., 2001).

Figura 4 - Reação de hidrólise catalisada pelas Lipases



Fonte: JAEGER; REETZ, 1998.

Várias enzimas hidrolíticas são bastante utilizadas em processos industriais, estima-se que de todo comércio enzimático, 75 % das enzimas vendidas são de hidrolases (SAVITHA et al., 2010). O uso da biocatálise nas indústrias tem sido bastante eficiente no desenvolvimento de processos tecnológicos (RODRIGUES et al., 2015), no entanto, a alta demanda por estas enzimas e o alto custo de produção é um grande obstáculo para produção das mesmas em grande escala (DAS et al., 2016).

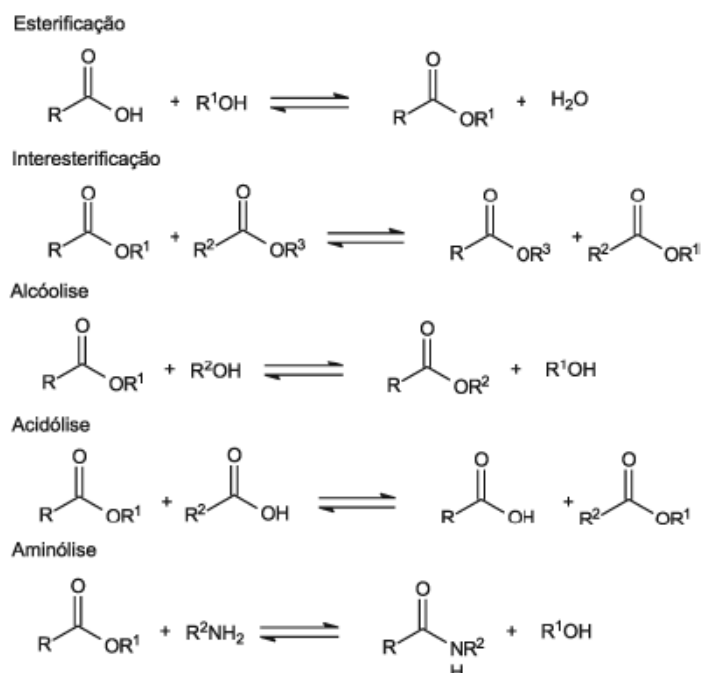
Das mais de 4000 enzimas conhecidas, em torno de 200 são utilizadas comercialmente para uso industrial, e a maioria é de origem microbiana. Aproximadamente 75 % de todas as enzimas industrializadas são hidrolases, e destas, cerca de 90 % são produzidas por micro-organismos através de processos fermentativos (MESSIAS et al., 2011).

2.5.1 Lipases de origem microbiana

Entre as mais diversas enzimas microbianas, as lipases ganham uma atenção especial no mercado industrial. O alto rendimento, facilidade de manipulação genética e rápido crescimento dos micro-organismos, facilidade de otimização da produção, baixo custo e fácil rastreio das enzimas mais adequadas a determinados propósitos, impulsiona a bioprospecção das enzimas microbianas (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; SANCHEZ; DEMAIN, 2017; GEOFFRY; ACHUR, 2018).

As lipases microbianas apresentam as vantagens de permanecerem ativas e estáveis em ambientes de temperaturas extremas, grandes variações de pH, em solventes orgânicos, e por apresentar quimio-seletividade, regio-seletividade e enantio-seletividade, quando comparadas às de origem animal e vegetal. As lipases microbianas podem ainda catalisar uma variedade de reações químicas, são ativadas quando absorvidas em uma interface óleo-água e quando estão imersas em solventes orgânicos, catalisam reações além da hidrólise do triacilglicerol, como a esterificação, interesterificação, acidólise, alcoólise e aminólise (Figura 5) (MEHTA et al. 2017; SANCHEZ; DEMAIN, 2017; PATEL et al., 2018).

Figura 5 - Reações catalisadas pelas lipases em solvente orgânico de interesse industrial



Fonte: FERRAREZI, 2011.

A bioprospecção enzimática de origem fungica é considerada uma opção mais rentável em comparação com a bacteriana. Os fungos produzem enzimas extracelulares com alto teor de pureza e em altas concentrações, o que facilita o isolamento e imobilização (SANCHEZ; DEMAIN, 2017). Alguns isolados fungicos têm sido relatados como bons produtores de lipases. Entre os filamentosos os generos *Acremonium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Beauveria*, *Colletotrichum*, *Geotrichum*, *Humicola*, *Meterhizium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Talaromyces*, *Trichoderma* e entre as leveduras, os gêneros *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Williopsis*, *Yarrowia* (SHAMA et al., 2001; TREICHEL et al., 2010; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; GEOFFRY; ACHUR, 2018).

O crescimento fungico em meio de cultura é influenciado por vários fatores como, temperatura, pH, composição do meio (fontes de nitrogênio e fontes de carbono), tempos de incubação. As condições de cultivo do fungo como temperatura, pH, fontes de carbono e nitrogênio, fontes minerais e fatores vitamínicos podem influenciar diretamente a produção enzimática (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). A lipase microbiana é produzida na presença de um indutor que pode ser o próprio substrato ou o produto da sua hidrólise, que ao ser adicionado no meio de cultivo estimula a produção (ROVEDA et al., 2010).

As lipases fúngicas podem ser produzidas a partir da Fermentação em Estado Sólido (FES) ou da Fermentação Submersa (FSm). FES é o processo de fermentação a partir do cultivo do micro-organismo a partir de um substrato sólido (FARINAS et al., 2014). A FES confere ao fungo maior produtividade em termos de maior concentração enzimática, maior estabilidade da enzima, e menor chance de contaminação com outros micro-organismos (SINGHANIA et al., 2009), além de ter um baixo uso da água no bioprocesso. A FSm é um bioprocesso de fermentação em meio líquido em que os nutrientes necessários para o desenvolvimento dos micro-organismos estarão suspensos ou diluídos no líquido (FARINAS et al., 2014). A FSm é um processo mais caro e requer maior gasto de energia, quando comparado a FES. Apesar de ser um processo mais caro, é a técnica preferida para produção de enzimas em escala comercial, estima-se que em torno de 90 % das enzimas comerciais são produzidas a partir da FSm (HÖLKER et al., 2004). A FSm apresenta algumas vantagens em relação a FES, tem maior controle e temperatura, pH, agitação, regulação de nutrientes, facilitando o processo de otimização da produção, imobilização e purificação das enzimas produzidas.

A baixa toxicidade, a baixa inibição do produto, alto rendimento em meio não aquoso, baixo tempo de reação, resistência a temperatura, pH, álcool e reutilizabilidade da enzima imobilizada, são fatores que favorecem a utilização das lipases em meio industrial. Estas enzimas conseguem catalisar reações em diferentes faixas de pH entre 4 e 11, e temperatura entre 10° C e 96° C, o que reduz a energia que seria necessário para direcionar as reações (MEHTA et al., 2017). As lipases de origem microbiana são uma excelente opção nas reações sob elevadas temperaturas e segundo Hasan et al. (2006), existem algumas vantagens em realizar bioprocessos sob temperaturas elevadas: aumento da difusão; maior solubilidade dos lipídios ou substratos orgânicos, maior solubilidade dos reagentes; maior taxa de reação; reações mais rápidas e menor risco de contaminação microbiana.

A versatilidade de catalisar reações faz com que a lipase possua aplicações promissoras em diversos segmentos industriais como no processamento químico orgânico, nas formulações de detergentes, síntese de biossurfactantes, indústria oleoquímica, indústria láctea, indústria agroquímica, fabricação de papel, nutrição, cosméticos e processamento farmacêutico (STOYTCHIEVA et al., 2012; GEOFFRY; ACHUR, 2018). O setor de fabricação de bebidas e alimentos, é principal comprador de enzimas microbianas,

comercializa, por ano, em torno de US \$ 1,2 bilhão no mercado de enzimas (SANCHEZ; DEMAIN, 2017).

Na indústria de alimentos, as lipases são amplamente usadas para produção de uma variedade de produtos como sucos de frutas, alimentos, produtos farmacêuticos e laticínios. As gorduras, óleos e derivados são os principais alvos de lipases em tecnologia de alimentos. As lipases podem atuar como emulsionantes em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos (SANCHEZ; DEMAIN, 2017). Na área de laticínios as lipases têm um papel importante na produção dos aromas que compõe os derivados e quando há formação de ácidos graxos livres junto a outras substâncias, a produção do aroma é acelerada. As lipases atuam hidrolisando a gordura do leite e promovendo a produção de substâncias voláteis que dão os aromas características em queijos e produtos similares (COLLA et al., 2012). Em outra possibilidade de aplicação para a indústria alimentícia, utilizando para redução do teor de gordura saturada da manteiga de óleo de palma sem haver produção de gordura trans (SHIN; AKOH; LEE, 2010).

Na indústria têxtil, as lipases são utilizadas para auxiliar a remoção de lipídeos para proporcionar ao tecido maior absorvência e melhorar a nivelção no tingimento. Seu uso também é importante para reduzir as estrias e rachaduras nos sistemas de abrasão de brim, e também auxilia na produção e modificação do poliéster (HASAN et al., 2006). As lipases também são aplicadas na indústria farmacêutica, sendo utilizadas para produção de biossensores. Os biossensores, a partir da lipase, funcionam como um dispositivo para detecção quantitativa dos triacilgliceróis. Esses sensores são de baixo custo e mais ágeis que os métodos analíticos padrões (MEHTA et al., 2017). Diferentes lipases imobilizadas em eletrodos do biossensores lipídicos, são utilizadas para determinar quantitativamente triglicerídeos e colesterol (IMAMURA et al., 1985; MASAHIKO et al., 1995; REJEB et al., 2014) contribuindo para diagnóstico clínico, e na detecção de um inseticida Diazinon em meio aquoso (ZEHANI et al., 2014).

O principal mercado da lipase é a produção de detergentes, a venda de lipases para este setor é responsável por uma parcela de 32 % do total da comercialização no mundo (COLLA et al., 2012). Nos detergentes, as lipases catalisam a reação de hidrólise dos lipídios, elas são adicionadas em detergentes para roupas e para o lar. Para eficiência das lipases nos detergentes precisam possuir baixa especificidade de substrato, para ter capacidade de hidrolisar os mais diversos tipos de gorduras; devem suportar lavagens em

pH alcalino e em temperatura de até 60° C; e possuir a capacidade de se manter estável com outros ingredientes importantes que compõem os detergentes, como os sulfonatos, outras enzimas e benzenos (SHARMA et al., 2001). É estimado que cerca de 1000 toneladas de lipases são utilizadas em aproximadamente 13 bilhões de toneladas de detergentes no mundo inteiro (MEHTA et al., 2017).

Na indústria de biocombustíveis, a lipase tem destaque na produção de biodiesel. O biodiesel é um combustível produzido a partir de óleo vegetal sem produzir óxido de enxofre (HASAN et al., 2006). Com a possibilidade de substituição de combustíveis fósseis, o biodiesel tem ganhando bastante importância. Na produção de biodiesel as lipases agem na transesterificação de triacilgliceróis (COLLA et al., 2012).

Alguns estudos testaram e comprovaram o uso de lipases de micro-organismos na produção de biodiesel (NOUREDDINI et al., 2005; SOUZA et al., 2016). As lipases também podem ser utilizadas para remover componentes hidrofóbicos da madeira, como triglicerídeos e ceras (SANCHEZ; DEMAIN, 2017). A ação das lipases na remoção de resíduos de papel, gera o aumento da taxa de polpação, melhora a brancura e intensidade, e auxilia e prolonga a vida do equipamento. A aplicação das lipases na indústria de papeis, também reduz impacto ambiental, pelo processamento de grandes quantidades de celulose e biomassa lignocelulósica (HASAN et al., 2006).

Esse constante crescimento do mercado enzimático microbiano acelera o desenvolvimento e implantação de novas tecnologias para a produção enzimática, como uso da engenharia genética e acelera o surgimento de novos campos de aplicação (COLLA et al., 2012). Apesar da grande importância na indústria, apenas de 2 % dos micro-organismos conhecidos já foram testados para produção enzimática (HASAN et al., 2006). As demandas industriais incentivam a bioprospecção de novas fontes de lipases com diferentes características catalíticas, em diferentes substratos, estimulando a seleção de novas linhagens de micro-organismos de interesse (TREICHEL et al., 2010).

2.6 PEQUI (*Caryocar brasiliense*)

O Gênero *Caryocar* é distribuído em 16 espécies, que são conhecidas por nomes populares, como pequi, piqui, piquiá e piquivinagreiro. Dentre essas, 14 ocorrem no Brasil, e a *Caryocar brasiliense* Cambess que é conhecida como pequizeiro. A palavra pequi vem do tupi (Pyqui que Py =casca e qui=espinho), o pequizeiro (Figura 6) é uma espécie típica

da região do Cerrado, mas pode ser encontrada na Floresta Amazônica, Caatinga e Mata Atlântica. No nordeste do Brasil, é nativa e cultivada nos estados do Piauí, Ceará e Maranhão (LIMA et al., 2007; VERA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2018).

Entre as espécies frutíferas do Cerrado brasileiro, *C. brasiliense* (Figura 6) possui enorme potencial para a exploração sustentável. Suas frutas são excelentes fontes de nutrientes, com propriedades sensoriais diferenciadas, como a cor, aroma e o sabor (BEZERRA; BARROS; COELHO, 2017). O pequi é o fruto mais consumido, comercializado e estudado do Cerrado, nos aspectos nutricional, ecológico e econômico (SOMCHINDA et al., 2018). O pequizeiro produz em média de 500 a 2.000 frutos, por safra, e seu fruto possui alto teor de óleo tanto na amêndoa e quanto na polpa (SEBRAE, 2016).

A Polpa do pequi tem o dobro de vitamina C que a laranja, além disso é importante fonte de vitamina A (OLIVEIRA; SCARLOT, 2010). A polpa do fruto de pequi apresenta uma composição média de lipídeos acima de 30% e desses lipídeos são compostos por ácidos graxos insaturados. Na polpa também é possível encontrar em concentrações acima de 20% os ácidos oleico e palmítico (LIMA et al., 2007).

Figura 6 - Pequi, fruto do *Caryocar brasiliense*



Fonte: OLIVEIRA; SCARLOT, 2010

O óleo extraído das amêndoas se caracteriza por ser um óleo rico em proteínas, tem cor clara cheiro suave bastante peculiar, e é de difícil extração. É considerado um óleo nobre e de excelente qualidade, seu valor de mercado pode chegar até R\$ 60,00/litro. Para

a produção de 1 litro de do óleo das amêndoas é necessário em torno de 2Kg de amêndoas. O óleo da polpa do pequi tem coloração amarela, e é rico em ácidos graxos insaturados.

A extração do óleo acontece na própria residência dos extrativistas e é mais facilmente encontrado no comercio. Em período de colheita, por dia, os agroextrativistas conseguem coletar até 60 kg de caroços de pequi. São necessários em torno de 10 kg de pequi para produzir 1 litro de óleo da polpa. Cada coleta pode render cerca de 6 litros de óleo da polpa. Os óleos da polpa são comercializados em feiras livres e o custo médio do litro de óleo é de cerca R\$ 7,00. Este óleo tem uso potencial para produção de biocombustíveis e lubrificantes para automóveis e geradores de energia elétrica (OLIVEIRA; SCARLOT, 2010). O óleo da polpa de Pequi é de fácil acesso e obtenção, e tem um excelente potencial para teste como substrato para produção de lipases fúngicas.

Tabela 4 - Comparação da composição dos Ácidos graxos de diferentes óleos em relação ao óleo de pequi, a cada 100 gramas de parte comestível

Número do alimento	Descrição dos alimentos	Ácidos Graxos saturados	Ácidos Graxos insaturados	Ácidos Graxos polissaturados
259	Azeite, de dendê	43,1	40,1	16,6
260	Azeite, de oliva, extra virgem	14,9	75,5	9,5
267	Óleo, de babaçu	50,9	18,6	30,2
268	Óleo, de canola	7,9	62,6	28,4
269	Óleo, de girassol	10,8	25,4	62,6
270	Óleo, de milho	15,2	33,4	50,9
271	Óleo, de pequi	39,9	55,8	4,2
272	Óleo, de soja	15,2	23,3	60,0

Fonte: Tabela brasileira de composição de alimentos (2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA E ISOLAMENTO DOS FUNGOS

A coleta foi realizada em colmeias criadas em caixas racionais de *M. scutellaris* em fragmento de Mata Atlântica (7°55'49.8"S e 34°56'37.0"W) localizado na cidade de Paulista, Pernambuco, Brasil entre os meses de novembro 2017 e abril de 2018. Foram realizadas quatro coletas (Figura 7) totalizando 36 amostras compostas do mel, de pólen e da superfície da colmeia armazenadas em tubos tipo Falcon esterilizados.

O isolamento dos fungos foi realizado seguindo as recomendações de Barbosa et al. (2017). Para o mel e pólen, 25 g de cada amostra foram suspensos em 225 mL de água peptonada (0,1 %) esterilizada e submetidas à agitação durante cinco minutos e em seguida realizadas diluições de 1:10 e 1:100 em água peptonada (0,1 %) esterilizada. A partir das diluições, alíquotas de 0,1 mL de cada amostra, separadamente, foram semeadas em placas de Petri contendo meio Ágar Dichloran 18 % Glicerol (DG18) e Ágar Extrato de Malte (MEA) acrescidos de 0,17 g/L de cloranfenicol. As placas de Petri foram incubadas sob temperatura de 27 °C ± 1 °C em estufa do tipo Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) durante um período de 7 a 14 dias. Para a amostra de superfície da colmeia, foi friccionado um swab esterilizado sobre a superfície das células de cria, e dos potes de mel e pólen, o swab colocado em um tubo de ensaio contendo 3 mL de água peptonada (0,1 %) esterilizada e submetido a agitação por cinco minutos. O semeio seguiu o mesmo protocolo citado acima. Todo experimento foi realizado em triplicata.

Figura 7 - Coleta de mel, pólen e superfície da colmeia em caixas racionais de *Melipona scutellaris* em fragmento de Mata Atlântica na cidade de Paulista



Fonte: Próprio Autor

3.2 PURIFICAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados foram purificados em placas de Petri meio DG18 e MEA incubados a temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa do tipo BOD durante 7 a 14 dias, após este período os fungos foram criopreservados. O estoque da solução criopreservante foi composta de por duas soluções: Solução A, contendo 60 mL de Glicerol em 40 mL de água destilada; Solução B, contendo 0,9 g de cloreto de sódio em 100 mL de água destilada. Para criopreservação a biomassa fungica foi transferida para microtubos rosqueáveis de 1,5 mL contendo 1 mL solução criopreservante na diluição 1:1 da Solução A + Solução B, e foram armazenadas no freezer sob temperatura de $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os isolados fungicos estão criopreservados na Fungal Work Collection: Fungos Fitopatogenicos e Biocontrolados (FIBIO) no Laboratório de Fungos Fitopatogênicos e Biocontroladores, Departamento de Micologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco.

3.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

Os isolados de fungos filamentosos foram identificados morfologicamente observando características macroscópicas das colônias (coloração, aspecto, diâmetro das colônias, presença de pigmento) e características microscópicas (microestruturas somáticas e reprodutivas), utilizando metodologia e literatura específica (ELLIS, 1971; ELIS,

1976; CARMICHAEL et al., 1980; SUTTON, 1980; KLICH, 2002; HESSELTINE; FENNEL, 1995; SAMSON; PITT, 2000; SAMSON et al., 2010).

3.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

A extração do DNA genômico e amplificação via PCR foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos do Departamento de Micologia da UFPE. O DNA genômico foi obtido a partir de culturas crescidas em meio MEA por 5 dias a 25 °C. Para extração foi utilizado Kit de Extração Wizard® Genomic DNA Purification, seguindo as instruções do fabricante. Após extração do DNA, todas as amostras de DNA fungos filamentosos foram amplificadas via PCR e sequenciados os fragmentos da região ITS1, 5.8S e ITS2 do rDNA utilizando os primers ITS1 e ITS4 para uma triagem inicial. Para as leveduras, foi amplificada o domínio D1/D2 da região LSU do rDNA utilizando os primers LR0 e LR5, e os fragmentos sequenciados. As condições de amplificação seguiram os protocolos de o Samson et al. (2010) e Houbraken et al. (2012). Os produtos amplificados foram purificados com as enzimas Exonuclease I e Fosfatase Alcalina contidas no kit Illustra ExoProStar 1-Step (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante, e encaminhadas para sequenciamento utilizando os mesmos primers e o kit BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento e Expressão Gênica do Centro de Ciências Biológicas da UFPE.

3.5 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Os cromatogramas do sequenciamento foram analisados utilizando o programa SeqMan v.10.0.1. Após a edição, todas as sequências foram utilizadas para busca das mais similares depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLAST1.2.0 released. As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o programa MAFFT (KATO et al., 2005) e os alinhamentos foram otimizados de forma manual com auxílio do programa MEGA 7 (TAMURA et al., 2011). Os modelos de substituição nucleotídica foram determinados através do jModelTest v. 2.1.7 (POSADA, 2008). Para a análise filogenética de máxima verossimilhança (ML), foi utilizado o software RAxML-VI-HPC v. 7.0.3 (STAMATAKIS, 2006) e para a análise de Bayesian (BI) o programa MrBayes v.3.2.1 (RONQUIST et al., 2012). As árvores filogenéticas foram visualizadas com auxílio do programa FigTree v. 1.1.2 (RAMBAUT, 2009) e editadas no Adobe Illustrator v.CS5.1. Para análises combinadas, os

alinhamentos individuais foram concatenados usando o programa Mesquite v3.04 (MADDISON; MADDISON, 2016).

3.6 ANALISE DOS DADOS

A frequência absoluta (FA) e a frequência relativa (FR) dos fungos isolados das colmeias de *M. scutellaris* foram calculadas seguindo as instruções de Laurran et al. (2002), em que, FA representa a quantidade total de isolados e a FR o número de isolados de cada espécie dividido pelo número total de isolados.

3.7 PRODUÇÃO DE LIPASES PELOS FUNGOS ISOLADOS DE AMOSTRAS DE COLMEIA DE *M. scutellaris*

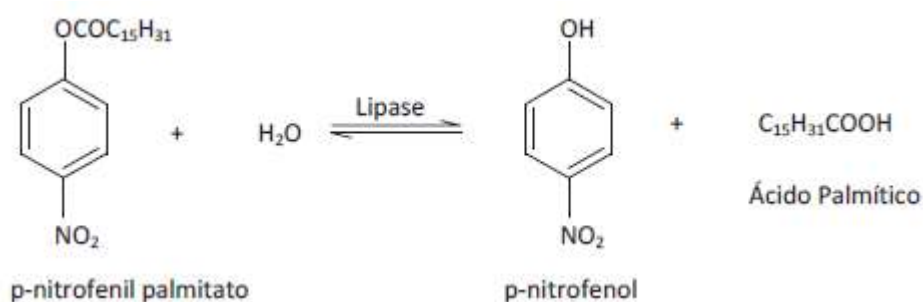
3.7.1 Fermentação submersa

A avaliação da produção de lipases pelos fungos isolados foi realizada em processo de fermentação submersa. Os fungos isolados de colmeias de *M. scutellaris* foram selecionados para análise da produção de lipases com base nos dados obtidos do agrupamento as regiões ITS para os fungos filamentosos e LSU para as leveduras. Os isolados foram inoculados em tubos de ensaio contendo BDA, e o crescimento ocorreu por sete dias para os fungos filamentosos e três dias para as leveduras, a 25 °C. Posteriormente, foi preparada uma suspensão de esporos na concentração de 10^7 esporos/mL, de cada uma dos isolados selecionados, separadamente. Alíquotas de 1 mL de cada suspensão foram transferidas, separadamente, para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 49 mL do meio de cultura, adaptado de Farias (2017). O meio foi constituído por 0,8 g de peptona de carne, acrescido de 0,1% (v/v) de tween 80 e de 1 mL de óleo de pequi, para cada 48 mL de água destilada. Os frascos foram então submetidos à agitação (rotação de 150 rpm) durante 120 horas para fungos filamentosos e 72 horas para as leveduras, sob temperatura de 25° C. Para obtenção do extrato bruto, o conteúdo dos frascos foi filtrado a vácuo e três alíquotas de 1 mL do extrato bruto foram transferidas para tubos de Eppendorf esterilizados, e foram centrifugados a 15000 g por 10 minutos a 4 °C (Hettich Mikro 22R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, D-78532 Tuttlingen), o sobrenadante foi separado, acondicionado em tubos de Eppendorf esterilizados e armazenados sob temperatura de -6 °C.

3.7.2 Avaliação da atividade lipolítica

O substrato para avaliação da atividade lipolítica foi o *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP), preparado em solução, como a seguir: 3 mg de *p*-NPP dissolvido em 1 mL de propanol, diluído em 9 mL de tampão Tris-HCl 50 mM e pH 8.0 contendo 40 mg de Triton X-100 e 10 mg de goma arábica (WINKLER; STUCKMANN, 1979; ROWE; HOWARD, 2002). Amostras de 0,1 mL do sobrenadante resultante da centrifugação foram misturadas com 0,9 mL de solução do substrato. Após incubação a 37° C por 30 minutos foi medida a absorbância por espectrofotometria a 410 nm de comprimento de onda. Uma unidade de atividade lipolítica U ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mol de *p*-nitrophenol por minuto (Figura 8).

Figura 8 - Representação esquemática da reação de hidrólise do *p*-nitrofenil palmitato catalisada por lipase



Fonte: BORGES, 2012

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ISOLADOS DOS SUBSTRATOS DAS COLMEIAS DE *M. scutellaris*

Foi obtido um total de 284 fungos sendo 189 fungos filamentosos e 95 leveduras. Do mel (81) foram isolados, 39 fungos filamentosos e 42 leveduras; do pólen foram obtidos 71 isolados, destes, 50 foram fungos filamentosos e 21 leveduras. Na superfície da colmeia, de um total de 132 isolados de fungos obtidos, 100 foram fungos filamentosos e 32 leveduras (Tabela 5).

Tabela 5 - Quantitativo de isolados de fungos obtidos do mel, pólen e superfície da colmeia em caixas racionais de *Melipona scutellaris*

	Mel	Pólen	Superfície da Colmeia	Total
Fungos filamentosos	39	50	100	189
Leveduras	42	21	32	95
Total	81	71	132	284

Fonte: Próprio autor.

Os fungos são organismos com distribuição cosmopolita e por apresentarem alta adaptabilidade são relatados nos mais diversos substratos, no entanto, relatos relacionados a substratos de abelhas nativas da mata atlântica brasileira são raros ou inexistentes. Em nosso estudo, o número de isolados de leveduras no mel foi superior ao número de fungos filamentosos nesse substrato, no entanto, foi inferior ao número de fungos filamentosos isolados do pólen e da superfície da colmeia. Conforme a literatura disponível, a maior ocorrência de leveduras no mel já era esperada (ROSA et al. 2003; TEIXEIRA et al., 2003; THIAGO-CALAÇA, 2011; DANIEL et al., 2013; BARBOSA et al., 2016). Sabe-se que o mel de *M. scutellaris* possui alta concentração de açúcar, baixa atividade de água e pH ácido (SOUZA, 2008), desta forma, é esperado que os fungos presentes no mel e no pólen tendam a permanecer em latência ou não se desenvolverem; devido às características físico-químicas desses substratos (SILVA et al., 2017). Sendo assim, não há garantia de crescimento dos fungos quando esses substratos são semeados em meio de cultura.

A limitação da identificação dos fungos utilizando apenas análises morfológicas, abre espaço para utilização de ferramentas moleculares que têm sido mais eficientes para determinação taxonômica dos fungos. O sequenciamento do domínio D1/D2 do gen 26S do rDNA região gênica LSU permite verificar diferenciações interespecíficas de leveduras, e tem se mostrado como ferramenta importante para a identificação em nível de espécie (KURTZMAN; ROBNETT; BASEHOAR-POWERS, 2008; KURTZMAN, 2014). A utilização de primers ITS-1 e ITS-4 para amplificação e sequenciamento das regiões ITS1-5.8S e ITS2 do rDNA tem sido utilizado frequentemente na identificação dos fungos filamentosos em nível de espécie (LUPATINI; MELLO; ANTONIOLLI, 2008).

Nas figuras 10 e 11 estão apresentadas a reconstrução filogenética da região ITS do rDNA para os fungos filamentosos e LSU para as leveduras, respectivamente, pois são os barcodes comuns para todos nesses grupos de isolados. Com base nas informações obtidas a partir do sequenciamento parcial ITS1-5.8S-ITS2, e também pela identificação morfológica seguindo as descrições das espécies tipo, os isolados de fungos filamentosos (Figura 9) foram identificados como pertencentes a 67 espécies distribuídas em 26 gêneros: *Acremonium* (4), *Aspergillus* (12), *Castanediella* (1), *Cladosporium* (5), *Cordyceps* (1), *Cyphellophora* (1), *Fusarium* (1), *Microascus* (1), *Monascus* (7), *Neurospora* (1), *Oidiodendron* (1), *Paecilomyces* (1), *Parascedosporium* (1), *Parengyodontium* (1), *Penicillium* (12), *Pestalotiopsis* (1), *Phaeoacremonium* (1), *Phlebia* (2), *Polyporus* (1), *Rasamsonia* (1), *Rhizomucor* (1), *Simplicillium* (1), *Talaromyces* (9), *Verticillium* (1), *Xeronoacremonium* (1) e *Zygosporium* (1). Em relação às leveduras (Figura 9), o sequenciamento do domínio D1/D2 do gen 26S do rDNA região gênica LSU, permitiu a identificação de 32 espécies distribuídas em 12 gêneros: *Bensingtonia* (1), *Blastobotrys* (1), *Candida* (5), *Gjaerumia* (1), *Hyphopichia* (1), *Kodamaea* (1), *Moniliella* (1), *Priceomyces* (1), *Pseudozyma* (1), *Starmerella* (2), *Wickerhamiella* (1) e *Zygosaccharomyces* (1) (Tabela 7).

Alguns isolados não agruparam nos clados de espécies já descritas, então acredita-se que esses isolados sejam espécies novas. Entre os fungos filamentosos, as possíveis novas espécies pertencem aos gêneros *Castanediella*, *Monascus*, *Oidiodendron*, e *Talaromyces*, sendo colocadas ao longo do presente estudo como: *Castanediella meliponae* sp. nov. (1), *Monascus* sp. nov. (1), *Oidiodendron* sp. nov. (1), *Talaromyces* sp. nov. (1) (Tabela 7). Para as leveduras, as possíveis novas espécies isolados pertencem aos gêneros *Candida*, *Gjaerumia*, e *Zygosaccharomyces* sendo colocadas ao longo do

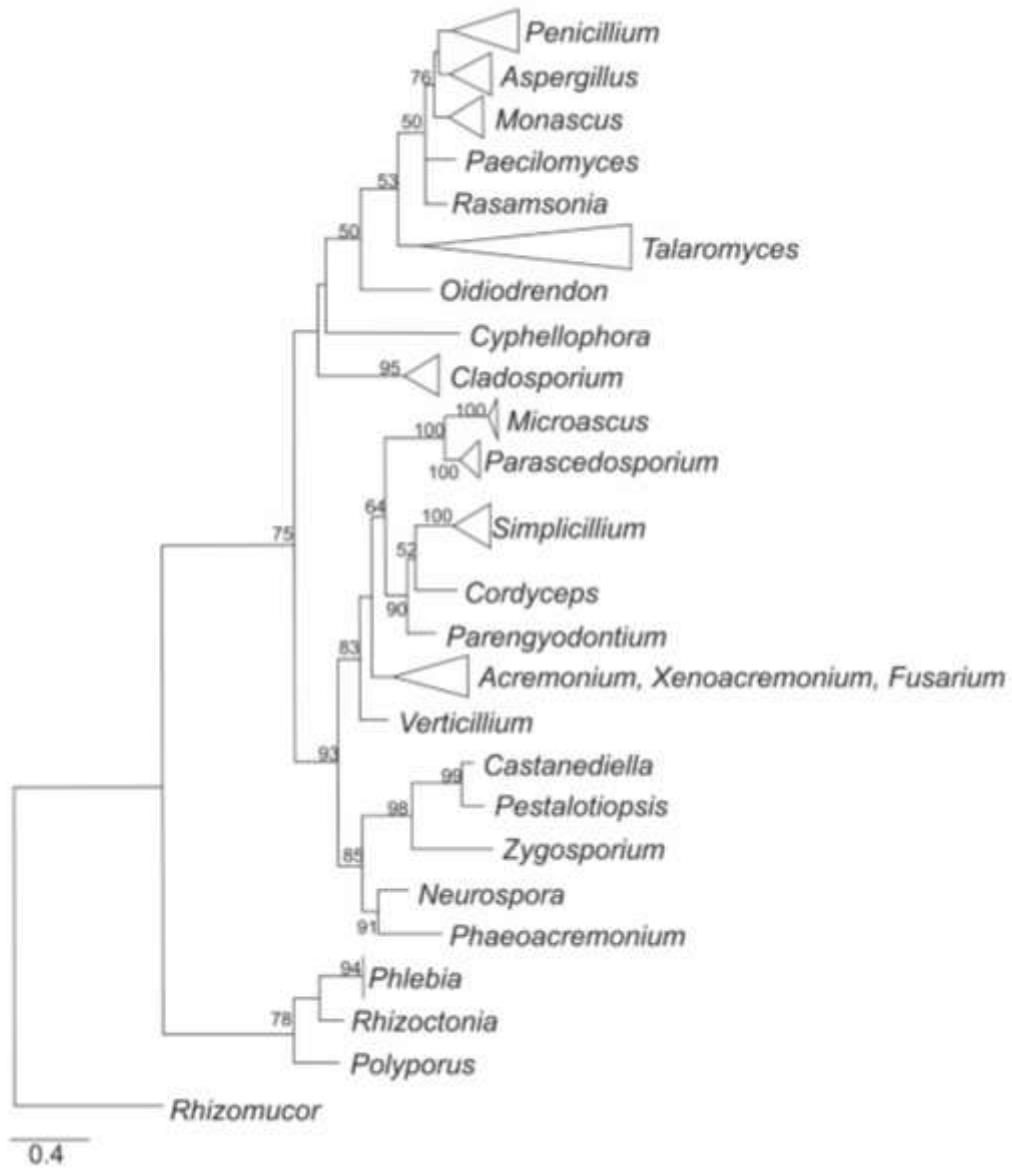
trabalho como: *Candida* sp. nov. 1 (8), *Candida* sp. nov. 2 (2), *Candida* sp. nov. 3 (26), *Gjaerumia* sp. nov. (11) e *Zygosaccharomyces* sp. nov. (1).

Figura 9 - Fungos filamentosos e leveduras isolados de colmeias de *Melipona scutellaris*. Culturas semeadas em placas de Petri contendo meio Ágar Malte (1ª à 5ª linha) e Batata Dextrose Ágar (6ª e 7ª linha) crescidos por sete dias a 25 °C. 1ª Linha (da Esquerda para direita): *Talaromyces pinophilus*, *T. pigmentosus*, *Aspergillus lacinosus*, *Pencillium austrosinicum*, *A. monius*; 2ª Linha (da Esquerda para direita): *T. scorteus*, *Penicillium brocae*, *A. sydowii*, *A. chevalieri*, *P. steckii*; 3ª Linha (da Esquerda para direita): *P. brocae*, *P. mallochii*, *T. albobiverticillius*, *Phaeoacremonium australiense*, *Zygosporium masonii*. 4ª linha (da Esquerda para direita): *Starmerella bombicola*, *Kodamaea ohmeri*, *Wickerhamiella versatilis*.



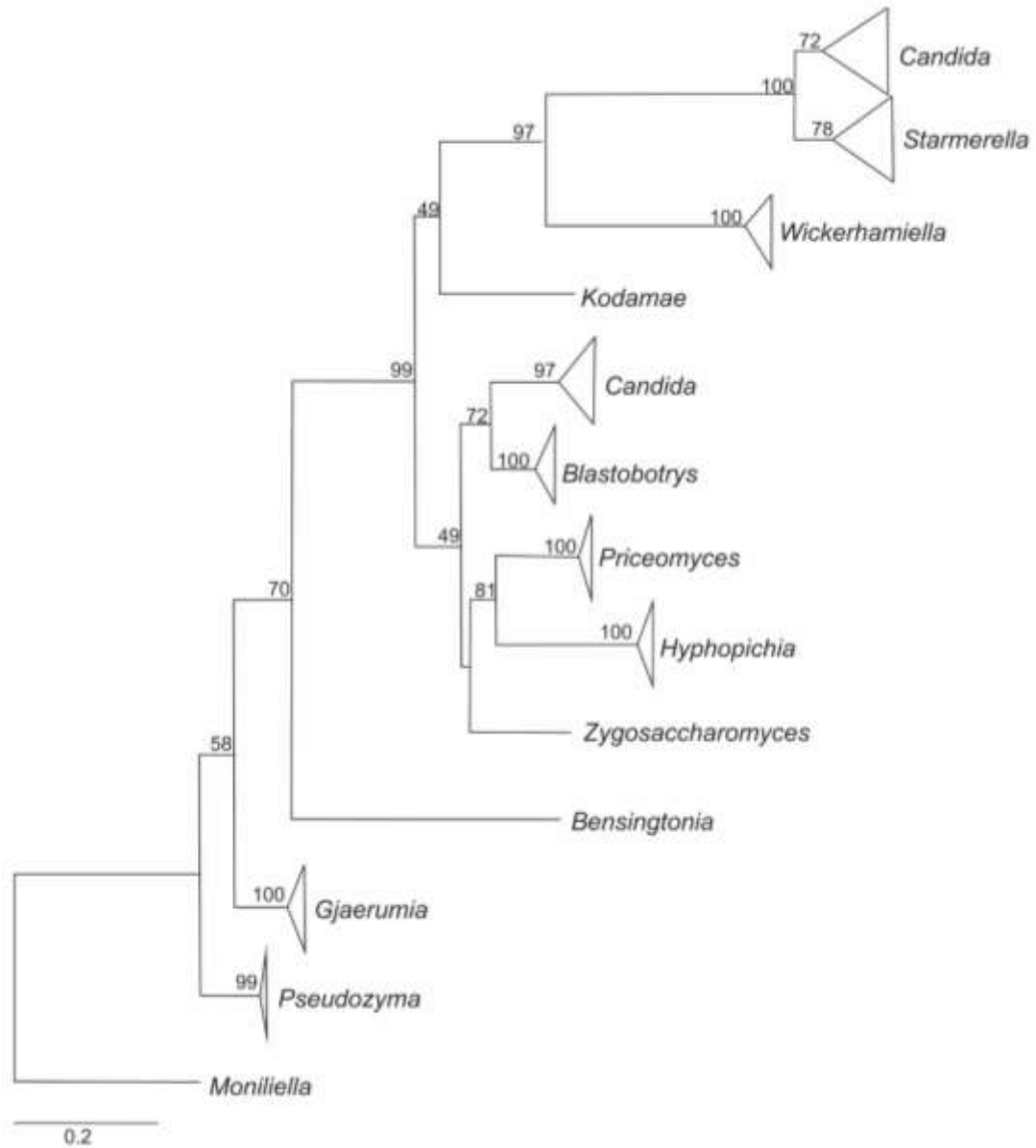
Fonte: Próprio autor.

Figura 10 - Agrupamento por gênero usando análise de máxima verossimilhança (ML) para região ITS1, 5.8S e ITS2 do rDNA de fungos filamentosos isolados a partir de amostras de mel, pólen e na superfície das colmeias de *Melipona scutellaris* coletadas no presente estudo. Valores de bootstrap a partir de 1000 repetições são indicados nos nós



Fonte: Próprio Autor

Figura 11 - Agrupamento por gênero usando análise de máxima verossimilhança (ML) para o domínio D1/D2 do gen 26S do rDNA das leveduras isoladas a partir de amostras de mel, pólen e na superfície das colmeias de *Melipona scutellaris* coletadas no presente estudo. Valores de bootstrap a partir de 1000 repetições são indicados nos nós



Fonte: Próprio Autor

Todos os dados de frequência relativa e absoluta dos fungos isolados do mel, pólen e superfície da colmeia de *M. scutellaris* estão discriminados na Tabela 6. Entre as espécies de fungos filamentosos, *Penicillium citrinum* (6,0 %), *Monascus* sp. 6 (6,0 %) e *Cladosporium* sp. 1 (5,3 %), apresentaram as maiores frequências relativas, seguidos de *Penicillium mallochii* (3,9 %), *Microascus* sp. (2,8 %), *Aspergillus sydowii* (2,5 %), *Aspergillus* sp. 1 (2,1 %), *Cladosporium* sp. 5 (2,1 %), *Penicillium* sp. 8 (2,1 %).

Tabela 6 - Espécies de fungos filamentosos e leveduras isoladas de Mel, pólen e superfície da colmeia de *Melipona scutellaris*. Frequência absoluta (FA) e frequência relativa (FR)

Espécie	Acesso FIBIO	Mel	Pólen	Superfície da colmeia	FR	FA
<i>Acremonium</i> sp. 1	001-A10	1			0,4 %	1
<i>Acremonium</i> sp. 2	002-H9			1	0,4 %	1
<i>Acremonium</i> sp. 3	004-A2			1	0,4 %	1
<i>Acremonium</i> sp. 4	002-C3		1		0,4 %	1
<i>Aspergillus auricomus</i>	001-D8	1			0,4 %	1
<i>Aspergillus chevalieri</i>	003-D5 ; 004-F8; 004-H10	1		2	1,1 %	3
<i>Aspergillus fumigatus</i>	002-I10			1	0,4 %	1
<i>Aspergillus lacinosus</i>	002-H10			1	0,4 %	1
<i>Aspergillus nomius</i>	003-C9	1	1		0,7 %	2
<i>Aspergillus</i> sp. 1	005-A6; 005-A7; 005-A8 005-A9; 005-A10; 005-B1			6	2,1 %	6
<i>Aspergillus</i> sp. 2	004-J5			1	0,4 %	1
<i>Aspergillus</i> sp. 3	004-B10			1	0,4 %	1
<i>Aspergillus</i> sp. 4	003-G9			1	0,4 %	1
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	002-E7; 002-F5; 003 J2; 004-H8		1	3	1,4 %	4
<i>Aspergillus subalbidus</i>	003-D6; 004-I10; 005-C3			3	1,1 %	3

Continua

Tabela 6 continuação

Espécie	Acesso FIBIO	Mel	Pólen	Superfície da colmeia	FR	FA
<i>Aspergillus sydowii</i>	001-A5; 003-A3; 003-D4; 003-J3; 003-J9; 004-A1; 004-A8	2		5	2,5 %	7
<i>Castanediella meliponae</i>	002-B3			1	0,4 %	1
<i>Cladosporium</i> sp. 1	001-A9; 001-H6; 002-C7; 002-D1; 002-D7; 002-F3; 002-G6; 002-G10; 002-H1; 002-J6; 002-J7; 004-F10; 003-H7; 004-H1; 004-H2	6	4	5	5,3 %	15
<i>Cladosporium</i> sp. 2	004-F9			1	0,4 %	1
<i>Cladosporium</i> sp. 3	002-D9; 003-D1		1	1	0,7 %	2
<i>Cladosporium</i> sp. 4	001-A4; 003-F8	2			0,7 %	2
<i>Cladosporium</i> sp. 5	002-A1; 002-A2; 002-F6; 002-J7; 002-J9; 004-C10		2	4	2,1 %	6
<i>Cordyceps</i> sp.	003-G5		1		0,4 %	1
<i>Cyphellophora eucalypti</i>	002-A5			1	0,4 %	1
<i>Fusarium equiseti</i> isolate F17	003-F2		1		0,4 %	1
<i>Microascus</i> sp.	001-B1; 002-B2; 002-I3; 002-I5; 002-I6; 002-I7; 004-C9; 004-D8	3	3	2	2,8 %	8

Continua

Tabela 6 continuação

Espécie	Acesso FIBIO	Mel	Pólen	Superfície da colmeia	FR	FA
<i>Monascus</i> sp. 1	005-C2	1			0,4 %	1
<i>Monascus</i> sp. 2	001-J6	1			0,4 %	1
<i>Monascus</i> sp. 3	001-C7		1		0,4 %	1
<i>Monascus</i> sp. 4	001-J3; 002-A3			2	0,7 %	2
<i>Monascus</i> sp. 5	002-A9; 002-J1			2	0,7 %	2
<i>Monascus</i> sp. 6	001-A2; 001-C3; 001-D1; 001-D9; 001-E4; 001-E5; 001-E6; 001-E9; 002-D2; 002-E2; 002-I8; 002-J2; 003-D9; 003-G7; 003-J6; 004-B3; 004-H9	3	6	8	6,0 %	17
<i>Monascus</i> sp. nov.	003-C3		1		0,4 %	1
<i>Neurospora</i> sp.	004-J1			1	0,4 %	1
<i>Oidiodendron</i> sp. nov.	003-F5		1		0,4 %	1
<i>Paecilomyces formosus</i>	003-H2			1	0,4 %	1
<i>Parascedosporium</i> sp.	002-G2; 002-C4	1		1	0,7 %	2
<i>Parengyodontium album</i>	003-E2	1			0,4 %	1
<i>Penicillium austrosinicum</i>	002-E8; 003-E6			2	0,7 %	2
<i>Penicillium brocae</i>	002-F4; 003-I4; 004-A6; 004-B4			4	1,4 %	4

Continua

Tabela 6 continuação

Espécie	Acesso FIBIO	Mel	Pólen	Superfície da colmeia	FR	FA
<i>Penicillium citrinum</i>	001-A8; 001-C4; 001-C10; 001-D4; 001-E2; 001-F3; 001-F6; 001-F9; 001-F10; 001-G5; 001-H9; 001-H10; 002-C6; 003-F4; 003-D3; 004-C1; 004-D5	4	12	1	6,0 %	17
<i>Penicillium mallochii</i>	002-E4; 002-E10; 002-F8; 002-H2; 003-A8; 003-A9; 003-E7; 003-J5; 004-B7; 004-J3; 005-B7	2		9	3,9 %	11
<i>Penicillium</i> sp. 1	004-A9; 004-C6		1	1	0,7 %	2
<i>Penicillium</i> sp. 3	003-J4			1	0,4 %	1
<i>Penicillium</i> sp. 4	004-A10			1	0,4 %	1
<i>Penicillium</i> sp. 5	001-G8			1	0,4 %	1
<i>Penicillium</i> sp. 6	005-A3			1	0,4 %	1
<i>Penicillium</i> sp. 7	001-D2; 002-H5		1	1	0,7 %	2
<i>Penicillium</i> sp. 8	003-D7; 004-A4; 004-B5; 004-B6; 004-I5; 005-B5	1		5	2,1 %	6
<i>Penicillium steckii</i>	004-A3; 004-A5; 004-C3; 004-I3; 004-J10			5	1,8 %	5
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	004-H7			1	0,4 %	1

Continua

Tabela 6 continuação

Espécie	Acesso FIBIO	Mel	Pólen	Superfície da colmeia	FR	FA
<i>Phaeoacremonium australiense</i>	003-I7			1	0,4 %	1
<i>Phlebia floridensis</i>	003-C8		1		0,4 %	1
<i>Phlebia</i> sp.	004-E4		1		0,4 %	1
<i>Polyporus</i> sp.	001-F8		1		0,4 %	1
<i>Rasamsonia</i> sp.	004-I4		1		0,4 %	1
<i>Rhizoctonia papaya</i>	004-C8			1	0,4 %	1
<i>Rhizomucor</i> sp.	003-G10	1			0,4 %	1
<i>Simplicillium sympodiophorum</i>	001-G7		1		0,4 %	1
<i>Talaromyces albobiverticillius</i>	002-G9; 003- B7	1	1		0,7 %	2
<i>Talaromyces indigoticus</i>	002-E9		1		0,4 %	1
<i>Talaromyces pigmentosus</i>	002-C10; 002- H4; 003-F7; 004-D9; 004- D10	2	3		1,8 %	5
<i>Talaromyces pinophilus</i>	001-D3		1		0,4 %	1
<i>Talaromyces</i> sp. 1	001-A1; 001- A3; 001-A6	3			1,1 %	3
<i>Talaromyces</i> sp. 2	002-B7		1		0,4 %	1
<i>Talaromyces</i> sp. 3	003-F3			1	0,4 %	1
<i>Talaromyces</i> sp. nov.	003-D8	1			0,4 %	1
<i>Talaromyces scorteus</i>	002-H7; 003- D2; 002-I9			3	1,1 %	3
<i>Verticillium</i> sp.	002-E6			1	0,4 %	1
<i>Xenoacremonium</i> sp.	003-J10			1	0,4 %	1
<i>Zygosporium masonii</i>	004-G8		1		0,4 %	1
<i>Bensingtonia</i> sp.	003-H5	1			0,4 %	1
<i>Blastobotrys chiropterorum</i>	002-B9; 002- H6; 003-G3; 003-D10	1		3	1,4 %	4

Continua

Tabela 6 continuacão

Espécie	Acesso FIBIO	Mel	Pólen	Superfície da colmeia	FR	FA
<i>Candida apicola</i>	001-B3; 001-C8; 001-E3; 001-G6; 001-J8; 002-D5; 003-I8; 003-J7; 004-B1; 004-B2; 004-E2; 004-H5; 004-I7	2	4	7	4,5 %	13
<i>Candida cf. etchellsii</i>	003-H3; 004-H3; 004-H4	1		2	1,1 %	3
<i>Candida sp.nov. 1</i>	001-G2; 002-F9; 002-G3; 003-E10; 003-G1; 003-G2; 005-C1	3	1	3	2,4 %	7
<i>Candida sp. nov. 2</i>	001-H4; 002-A8		1	1	0,7 %	2
<i>Candida sp. nov. 3</i>	001-C9; 001-D10; 001-E1; 001-G9; 001-H5; 001-H7; 001-H8; 001-J4; 001-J9; 001-J10; 002-B8; 002-B10; 002-C8; 002-E3; 002-F2; 003-A2; 003-A5; 003-B1; 003-B6; 003-C6; 003-C10; 003-B8; 004-E6; 004-I1	18	4	2	8,4 %	24
<i>Hyphopichia burtonii</i>	002-E1; 004-B9			2	0,7 %	2
<i>Kodamaea ohmeri</i>	002-D10	1			0,4 %	1

Continua

Tabela 6 conclusão

Espécie	Acesso FIBIO	Mel	Pólen	Superfície da colmeia	FR	FA
<i>Moniliella</i> sp.	001-F5; 003-G8; 005-B3	1	1	1	1,1 %	3
<i>Gjaerumia</i> sp. nov.	001-B4; 001-E1; 001-E8; 001-F4; 001-G4; 001-G10; 001-I6; 001-I8; 001-I9; 001-J7; 002-C9	4	5	2	3,9 %	11
<i>Priceomyces melissophilus</i>	003-F6; 004-G6; 005-A1; 005-A5	1		3	1,1 %	4
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	004-C4		1		0,4 %	1
<i>Starmerella bombicola</i>	001-H1; 001-H3; 001-I3 002-C2; 002-D6; 002-F7; 002-H3	5	2		2,5 %	7
<i>Starmerella meliponinorum</i>	002-F10	1			0,4 %	1
<i>Wickerhamiella versatilis</i>	002-B4; 002-C1; 002-D3 003-A4; 003-B3; 003-C1; 003-F4; 003-H4; 003-E9	3	1	5	3,2 %	9
<i>Zygosaccharomyces</i> sp. nov.	003-C4			1	0,4 %	1
Total		81	71	132		284

Fonte: Próprio Autor

Em nosso estudo, os gêneros *Aspergillus* (11,3 %), *Cladosporium* (9,6 %), *Monascus* (9 %), *Penicillium* (25,3 %) e *Talaromyces* (6,7 %) apresentam as maiores frequências. Constatamos a ocorrência de 12 espécies prováveis de *Penicillium* (25,3 %), sendo o gênero mais frequente entre os fungos filamentosos. Destas, cinco foram confirmadas como

P. austrosinicum, *P. brocae*, *P. citrinum*, *P. mallochii*, *P. steckii*. Reportamos a primeira ocorrência de *P. austrosinicum* relacionados à *M. scutellaris*.

Resultados semelhantes foram obtidos por Souza et al. (2018), que isolaram fungos dos corpos de abelhas operárias de *M. seminigra* e *M. interrupta* da Floresta Amazônica (Manaus) e verificaram que isolados de *Penicillium* foram mais frequentes. Foi observado, também, que o alto número de isolados de *P. citrinum* coincide com os dados obtidos por Barbosa et al. (2018) em estudo sobre a presença de fungos em substratos de colmeias da abelha *M. scutellaris*. Barbosa et al. (2018) reportaram a ocorrência de 21 espécies de *Penicillium*, entre elas *P. citrinum*, e seis espécies de *Talaromyces*. *Penicillium citrinum* é comum em solos tropicais e possui alta capacidade de produção de metabólitos secundários, em especial, a micotoxina citrinina (MALMSTRØM; CHRISTOPHERSEN; FRISVAD, 2000).

Relatos sobre a ocorrência de *Talaromyces* em substratos de *M. scutellaris* são raros (BARBOSA et al., 2018). Coincidindo com o estudo de Barbosa et al. (2018), constatamos a ocorrência *Talaromyces scorteus* e *T. pigmentosus*, sendo esta última descrita por Barbosa et al. (2018). Reportamos aqui também como primeira ocorrência em substratos relacionados à *M. scutellaris* as espécies *Talaromyces albobiverticillius*, *T. indigoticus* e *T. pinophilus*.

A alta presença de isolados de *Aspergillus*, *Cladosporium* em nosso estudo é semelhante aos dados obtidos por Souza et al. (2018), Ferraz et al. (2008), Tiago (2017). No entanto, Souza et al. (2018) relataram alta frequência de isolados de *Fusarium*, *Paecilomyces* e *Verticillium*, enquanto que observamos uma baixa frequência desses gêneros. Segundo Souza et al. (2018), alguns fatores como clima, habitat e diferentes regiões podem influenciar na diferença da micodiversidade em substratos de abelhas sem ferrão. Stuart; Lamas; Pimentel (2004) isolaram fungos do corpo de abelhas sem ferrão *Trigona* sp. e verificaram a maior frequência dos gêneros *Rhizopus* e *Aspergillus*. Em 2017, Tiago, determinou a diversidade da microbiota associada às colmeias e castas de *M. interrupta* e *M. seminigra*, e verificou que foi *Aspergillus* o gênero mais abundante. Ferraz et al. (2008) analisaram a microbiota relacionada a substratos de abelhas sem ferrão e verificaram a presença de fungos no corpo de abelhas operárias da espécie *M. subnitida* constatando alta frequência de isolados de *Aspergillus*.

No presente estudo reportamos a primeira ocorrência das espécies de *Aspergillus*, *A. auricomus*, *A. lacinosus*, *A. monius* em substratos de *M. scutellaris*. *Aspergillus* são facilmente encontrados no ar, e tem sido isolado do corpo das abelhas (STUART; LAMAS; PIMENTEL, 2004). Alguns isolados de *Aspergillus* são conhecidos por causarem danos as abelhas. Foley et al. (2014), mostraram a grande quantidade de isolados de *Aspergillus* na superfície de abelhas adultas de *Apis mellifera*, entre eles, *A. fumigatus* e *A. monius*. Esses isolados são conhecidamente oportunistas das larvas de *Apis mellifera*, podendo causar sérios danos as colmeias. No entanto, alguns isolados de *Aspergillus*, como *A. sydowii*, *A. sec. niger*, *A. fumigatus*, e *A. sclerotirum* têm sido relatados compondo a microbiota de substratos relacionados as abelhas (GILLIAM, 1997; GILLIAM et al., 1989; INGLIS; SIGLER; GOETTEL, 1993; KAČÁNIOVÁ et al., 2009; FELSÖCIOVÁ et al., 2012). Em 2010, Gois et al. quantificaram Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de fungos em amostras de mel de *M. scutellaris* e verificaram a ocorrência de *A. flavus*, *Aspergillus* sp., *P. digitatum*, *Penicillium* sp., e concluíram que a presença desses fungos no mel é considerada um fator intrínseco da produção pelas abelhas nativas.

Constatamos baixa frequência de isolados de *Rhizomucor*. Informações sobre fungos Mucolares em substratos de abelhas sem ferrão ainda são escassas. Fungos pertencentes a esta Ordem já foram relatados em substratos de abelhas sem ferrão. Souza et al. (2018) obtiveram isolados de *Rhizopus* a partir de abelhas operárias de *M. seminigra* e *M. interrupta* da Floresta Amazônica (Manaus), e Stuart et al. (2004) relataram alta a presença deste gênero isolado do corpo de abelhas operárias de *Trigona* sp. Em outro estudo, Eltz et al. (2002), observaram o estabelecimento de relação harmônica entre isolados de *Rhizopus* sp. abelhas *T. collina*, e relataram que abelhas da espécie estavam recolhendo esporos de *Rhizopus* sp. no lugar do pólen, e que este fungo quando cultivado por elas, auxiliava na manutenção do pH da ninhada.

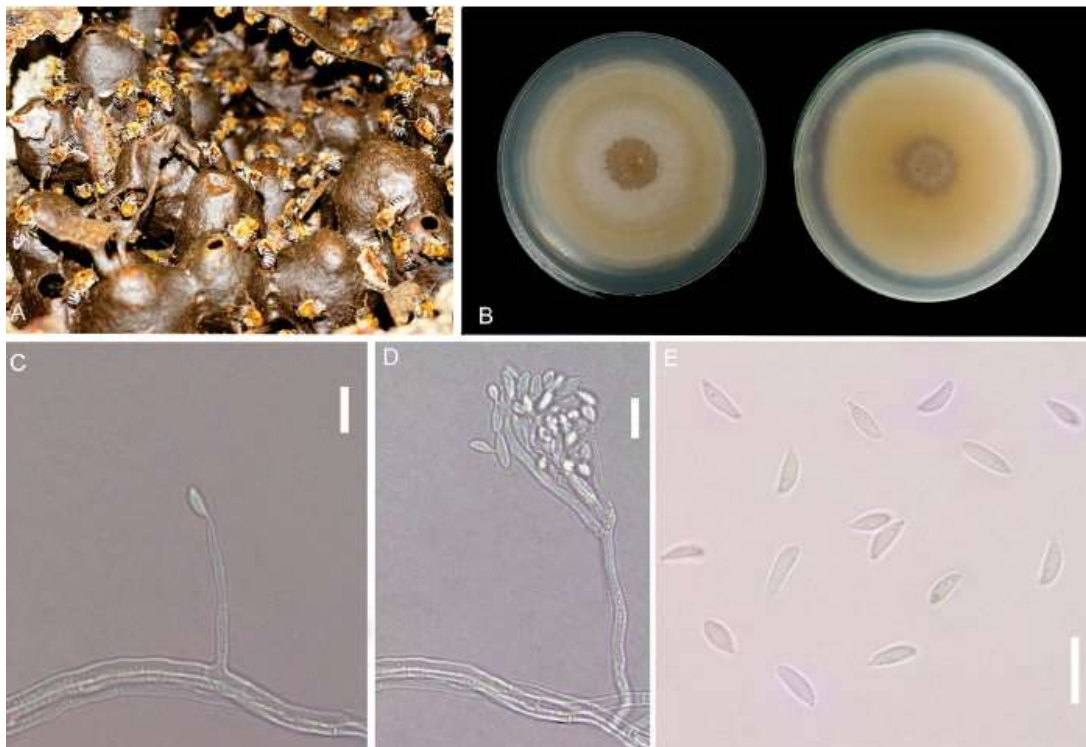
Em nossa pesquisa, foram obtidos isolados de prováveis sete espécies de *Monascus*, sendo como provável espécie nova. Os isolados obtidos provavelmente são espécies já descritas por Barbosa et al. (2017) e análises mais precisas serão necessárias para confirmação desses isolados. Em 2017, Barbosa et al. relataram a presença de cinco espécies pertencentes ao gênero *Monascus*, isoladas de mel, pólen e superfície da colmeia de *M. scutellaris*, e reportaram três novas espécies, *Monascus flavipigmentosus*, *Monascus mellicol* e *Monascus recifensis*.

No presente estudo, ainda foi descrita a espécie *Castanediella meliponae* (Figura 12) J.E. Felinto-Santos, R.N. Barbosa & N.T. Oliveira, sp. nov. (HYDE et al., 2019) com base nos dados do sequenciamento das regiões LSU e ITS do rDNA, isolada da superfície da colmeia de *M. scutellaris*. *Castanediella* é um gênero único pertencente à família Castanediellaceae, ocorre comumente parasitando folhas, e *C. meliponae* é o primeiro registro do gênero *Castanediella* em substratos das colmeias de abelhas.

Os outros gêneros de fungos filamentosos identificados que apresentaram baixa frequência, foram considerados de rara ocorrência ou primeiro relato relacionados à *M. scutellaris* e são os seguintes: *Acremonium*, *Castanediella*, *Cordyceps*, *Cyphellophora*, *Microascus*, *Neurospora*, *Oidiodendron*, *Paecilomyces*, *Parascedosporium*, *Parengyodontium*, *Pestalotiopsis*, *Phaeoacremonium*, *Phlebia*, *Plyporus*, *Rasamsonia*, *Rhizomucor*, *Simplicillium*, *Verticillium*, *Xernoacremonium* e *Zygosporium*.

Figura 12 – *Castanediella meliponae* (Figura 12) J.E. Felinto-Santos, R.N. Barbosa & N.T. Oliveira, sp. nov.

A: Superfície do ninho de *Melipona scutellaris*. B: (esquerda para a direita) Superfície e reverso de crescimento de colônias em PDA. C: Células conidiogênicas e conídios. D: Conidióforo e conídios. E: Conídios. Barras de escala: c – e = 10 µm



Fonte: HYDE et al., 2019.

Entre os gêneros de leveduras identificados, *Bensingtonia*, *Blastobotrys*, *Candida*, *Hyphopichia*, *Kodamaea*, *Moniliella*, *Priceomyces*, *Pseudozyma*, *Starmerella* e *Zygosaccharomyces*, as espécies mais frequentes foram *Candida* sp. nov. 3 (9,2 %), *Candida apicola* (4,2 %), *Gjaerumia* sp. nov. (3,9 %), *Wickerhamiella versatilis* (3,2 %), *Candida* sp. nov. 1 (2,8 %) e *Starmerella bombicola* (2,5 %). Os isolados de *Bensingtonia*, *Gjaerumia* são aqui reportados como primeira ocorrência em substratos de *M. scutellaris*. Resultados semelhantes foram obtidos por Rosa et al. (2003) quando analisaram a diversidade de espécies de leveduras isoladas de substratos das abelhas *Trigona angustula*, *M. quadrifasciata* e *Frieseomelitta varia*, e observaram isolados dos gêneros *Candida*, *Kodamaea*, *Pseudozyma*, *Starmerella* e *Zygosaccharomyces*.

Neste trabalho foram identificadas as espécies de leveduras *Candida apicola*, *Kodamaea ohmeri* e *S. meliponinorum*. Meireles (2018) também isolou leveduras de mel, pólen e células da cria de meliponário das espécies *M. interrupta* e *C. femorata*, obtendo os seguintes gêneros: *Candida*, *Hyphopichia*, *Kodamaea*, *Pichia*, *Wickerhamiella* e *Zygosaccharomyces*, e identificando em nível de espécie *C. apicola*, *K. ohmeri* e *W. versatilis*.

Em nosso estudo, *C. apicola* foi registrada com alta frequência em substratos de *M. scutellaris*. Resultados semelhantes foram obtidos em 2016 por Barbosa et al. em amostras de mel das espécies de abelhas sem ferrão da Caatinga das espécies *M. mandacaia*, *M. asilvai*, *Patarmona* sp e *Scaptotrigona* sp, e verificaram a presença de isolados pertencentes aos gêneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Kloeckera* e *Pichia*. Entre as espécies de *Candida* obtidas, *C. apicola* foi retratada como espécie comum no isolamento em méis destas abelhas.

No presente trabalho as leveduras *Starmerella bombicola* e *S. meliponinorum* foram isoladas em substratos de *M. scutellaris*. Esse gênero já foi encontrado em substratos de outras abelhas sem ferrão. Teixeira et al. (2003) descreveram uma espécie nova de levedura, *S. meliponinorum* sendo isolada de substratos de *T. angustula*, *M. quadrifasciata* e *M. rufiventris*. Daniel et al. (2013) também reportaram uma espécie *Starmerella*, associada à *M. quinquefasciata*.

Segundo Barbosa et al. (2016), as leveduras têm importante papel na cadeia trófica, pela sua proliferação entre os habitats e podem ser carregadas por vetores, como os insetos. Em *Drosophila* spp. as leveduras podem desencadear e manter uma associação

mutualista insetos-leveduras contribuindo de forma direta na nutrição desses insetos. Engel; Martinson; Moran (2012) relataram a relação evolutiva dos microrganismos presentes no intestino de *Apis mellífera*, esta relação pode estar presente em outras abelhas sociais, favorecendo a diversificação de microrganismos específicos nas abelhas.

Metabolicamente as leveduras possuem um papel importante no processamento e transformação do pólen dentro dos ninhos, secretando enzimas que atuam na biodisponibilização de nutrientes do substrato vegetal e melhorando qualidade nutricional do alimento (MEIRELES, 2018). Paludo et al. (2018) estudaram a relação abelha-inseto, verificando que leveduras de espécies *Zygosaccharomyces sp.* produzem moléculas precursoras para a síntese de esteroides importantes para desenvolvimento do estágio larval de abelhas da espécie *Scaptotrigona depilis*

Durante este estudo com *M. scutellaris*, as colmeias foram monitoradas e não foram detectados danos aparentes nas abelhas causados por fungos. As colmeias permaneceram sem manuseio pelos criadores. Segundo Gilliam (1997) os fungos que ocorrem de forma natural não representam ameaças às abelhas. A possível origem dos fungos aqui obtidos deve estar relacionada ao hábito forrageiro das abelhas, como a coleta do néctar, entre outros fatores como vento e chuva (SOUZA et al. 2018).

Apesar dos estudos sobre micodiversidade dos substratos das abelhas sem ferrão do Brasil ainda serem raros, os dados obtidos e comparados com a literatura disponível nos permitem inferir que espécies de *Aspergillus*, *Candida*, *Cladoporium*, *Fusarium*, *Monascus*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Wickerhamiella* e *Zygosaccharomyces* compõem a microbiota das abelhas sem ferrão. Portanto, esses estudos são de fundamental importância para a conservação das abelhas, e para investigação do patrimônio biológico fúngico, inclusive com a descoberta de espécies inéditas para ciência e que tenham potencial biotecnológico.

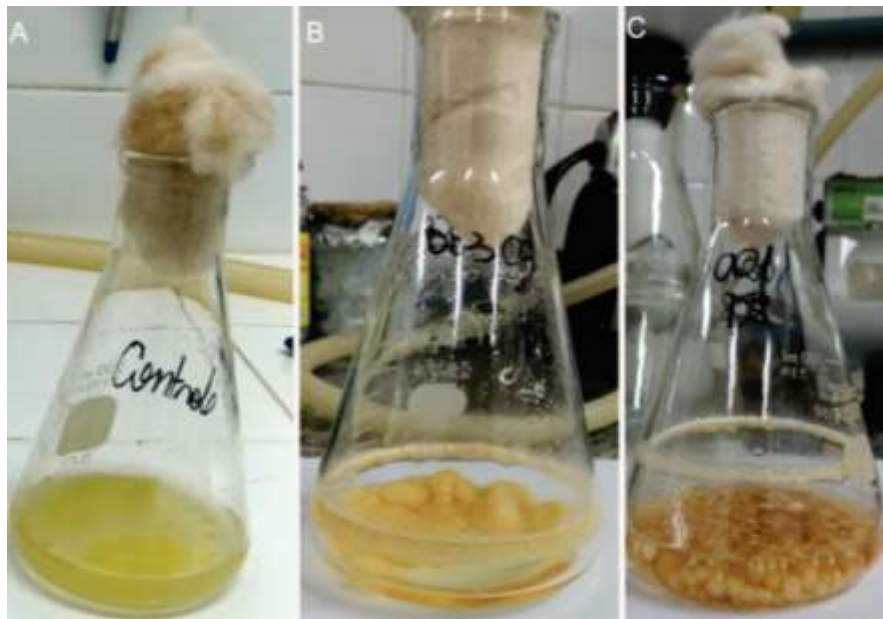
4.2 PRODUÇÃO DE LIPASES POR FUNGOS ISOLADOS DE AMOSTRAS DE COLMEIA DE *M. scutellaris*

De um total de 48 isolados, entre fungos filamentosos e leveduras, todos os isolados foram capazes de produzir lipases (Tabela 7). A atividade lipolítica variou de 3,86 à 20,76 U.mL⁻¹.min⁻¹(U). Entre os fungos filamentosos os isolados *Aspergillus nomius* 9,77 ± 0,24 U; *Aspergillus sclerotiorum* 8,56 ± 0,24 U (Figura 14); *Cladosporium sp.* 1 (FIBIO 002-H1)

$20,76 \pm 0,03$ U; *Cladosporium* sp. 1 (FIBIO 004-F10) $14,87 \pm 0,91$ U; *Cladosporium* sp. 4 $17,06 \pm 0,08$ U (Figura 15); *Cordyceps* sp. $12,53 \pm 0,12$ U; *Microascus* sp. $10,03 \pm 0,95$ U foram os que apresentaram os maiores valores. Entre as leveduras, *Candida* sp. nov. 3 (FIBIO 001-H7) $7,34 \pm 0,74$ U; *Priceomyces melissophilus* $8,46 \pm 0,24$ U foram as que apresentaram os maiores valores.

Figura 13 - Produção de lipases por isolados de *Aspergillus* de amostras de colmeia de *Melipona scutellaris*.

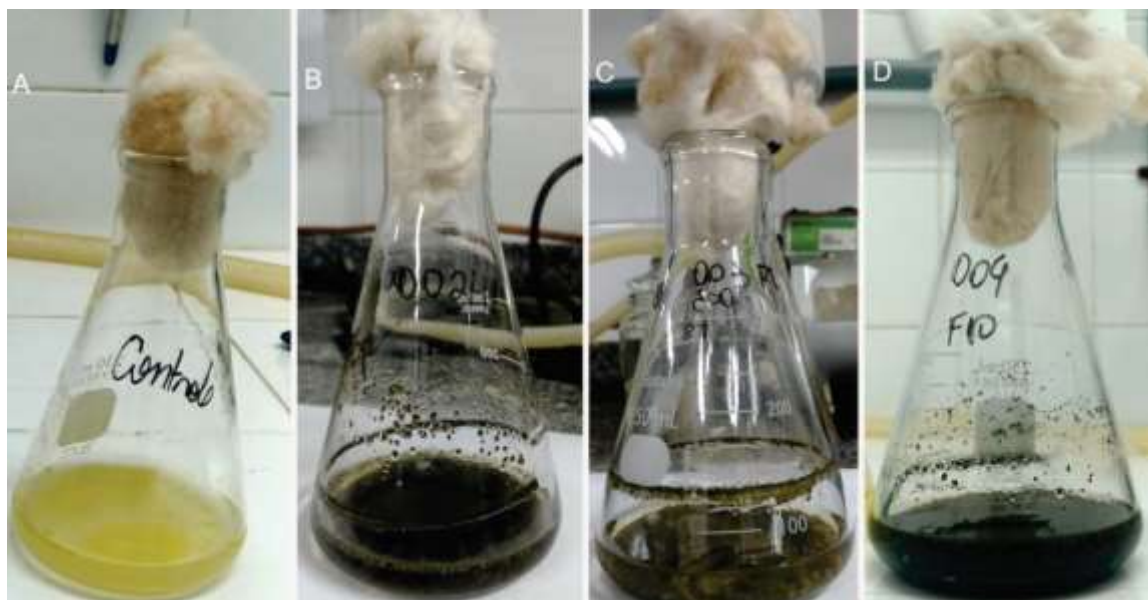
A: Controle negativo; B: *A. monius*; C: *A. sclerotiorum*



Fonte: Autor

Figura 14 - Produção de lipases por isolados de *Cladosporium* de amostras de colmeia de *Melipona scutellaris*.

A: Controle negativo; B: *Cladosporium* sp. 1 (FIBIO 002-H1); C: *Cladosporium* sp. 4; D: *Cladosporium* sp. 1 (FIBIO 004-F10)



Fonte: Próprio Autor

Tabela 7 - Atividade lipolítica do fungos filamentosos e leveduras isolados do mel, pólen e superfície colmeia de *Melipona scutellaris*

Isolado	Número de acesso (FIBIO)	Atividade Lipolítica (U.mL ⁻¹ .min ⁻¹)
<i>Acremonium</i> sp. 1	001-A10	5.39 ± 0,01
<i>Acremonium</i> sp. 3	002-C3	5.29 ± 0,42
<i>Aspergillus auricomus</i>	001-D8	6.30 ± 0,39
<i>Aspergillus</i> sp. 4	003-G9	4.72 ± 0,28
<i>Aspergillus lacinosus</i>	002-H10	6.19 ± 0,19
<i>Aspergillus nomius</i>	003-C9	9.77 ± 0,24
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	003-J2	8.56 ± 0,24
<i>Aspergillus sydowii</i>	003-D4	7.32 ± 0,63
<i>Blastobotrys chiropterorum</i>	002-B9	4.25 ± 0,01
<i>Candida apicola</i>	004-E2	4.07 ± 0,05

Continua

Tabela 7 continuação

Isolado	Acesso FIBIO	Atividade Lipolítica (U.mL⁻¹.min⁻¹)
<i>Candida</i> sp.nov. 1	003-E10	4.28 ± 0,03
<i>Candida</i> sp.nov. 3	004-E6	4.06 ± 0,01
<i>Candida</i> sp.nov. 3	001-H7	7.34 ± 0,74
<i>Candida</i> sp.nov. 3	002-E3	4.42 ± 0,04
<i>Cladosporium</i> sp. 1	002-H1	20.76 ± 0,03
<i>Cladosporium</i> sp. 1	002-C7	7.88 ± 0,37
<i>Cladosporium</i> sp. 1	001-A9	8.08 ± 0,68
<i>Cladosporium</i> sp. 1	002-D7	7.24 ± 0,12
<i>Cladosporium</i> sp. 1	004-F10	14.87 ± 0,91
<i>Cladosporium</i> sp. 1	002-J7	5.56 ± 0,12
<i>Cladosporium</i> sp. 2	004-F9	8.37 ± 0,08
<i>Cladosporium</i> sp. 3	002-D9	5.55 ± 0,37
<i>Cladosporium</i> sp. 4	003-F8	17.06 ± 0,08
<i>Cordyceps</i> sp.	003-G5	12.53 ± 0,12
<i>Fusarium equiseti</i> isolate F17	003-F2	5.62 ± 0,19
<i>Microascus</i> sp.	004-I4	6.13 ± 1,49
<i>Microascus</i> sp.	002-I5	10.03 ± 0,95
<i>Monascus</i> sp. 1	005-C2	4.36 ± 0,12
<i>Monascus</i> sp. 6	001-A2	4.31 ± 0,23
<i>Moniliella</i> sp.	002-G8	5.47 ± 0,21
<i>Oidiodendron</i> sp. nov.	003-F5	3.86 ± 0,11
<i>Paecilomyces formosus</i>	003-H2	4.91 ± 0,15
<i>Parascedosporium</i> sp.	002-C4	6.58 ± 0,09
<i>Penicillium citrinum</i>	001-H10	4.62 ± 0,00
<i>Penicillium mallochii</i>	002-H2	6.84 ± 0,13

Continua

Tabela 7 conclusão

Isolado	Acesso FIBIO	Atividade Lipolítica (U.mL ⁻¹ .min ⁻¹)
<i>Penicillium</i> sp. 8	003-D7	4.27 ± 0,07
<i>Penicillium citrinum</i>	001-F3	6.23 ± 0,19
<i>Polyporus</i> sp.	001-F8	4.54 ± 0,00
<i>Priceomyces melissophilus</i>	001-D3	8.46 ± 0,24
<i>Rhizomucor</i> sp.	003-G10	8.41± 0,51
<i>Simplicillium sympodiophorum</i>	001-G7	4.09 ± 0,08
<i>Starmerella meliponinorum</i>	002-F10	5.18 ± 0,04
<i>Talaromyces albobiverticillius</i>	003-B7	4.96 ± 0,11
<i>Talaromyces pigmentosus</i>	004-D9	6.68 ± 0,00
<i>Talaromyces pigmentosus</i>	002-H4	6.32 ± 0,35
<i>Talaromyces</i> sp. 1	001-A1	5.23 ± 0,32
<i>Wickerhamiella versatilis</i>	003-A4	4.70 ± 0,04
<i>Zygosaccharomyces</i> sp. nov.	003-C4	4.32 ± 0,03

Fonte: Próprio Autor

As lipases (triacilglicerol Ácil hidrolases, E.C. 3.1.1.3) microbianas são enzimas bastante versáteis em ambientes com restrição de água, e catalisam diversas reações de interesse industrial (STOYTCHIEVA et al., 2012; RODRIGUES, 2015; GEOFFRY; ACHUR, 2018). O mercado de lipases microbiana movimenta bilhões de dólares todos os anos. As lipases de origem microbianas são utilizadas em diversas aplicações industriais por exemplo detergentes, síntese de biossurfactantes, indústria oleoquímica, indústria láctea, indústria agroquímica, fabricação de papel, nutrição, cosméticos e processamento farmacêutico (STOYTCHIEVA et al., 2012; GEOFFRY; ACHUR, 2018). Santana (2012) testou o óleo de pequi como fonte alternativa de carbono para produção de biossurfactante por *Candida lipolytica*, e obteve resultados promissores. Gonçalves (2007) isolou 11 cepas de leveduras a partir do óleo de pequi, e testou a produção de lipases usando óleo de azeite como indutor, verificando que *Yarrowia lipolytica* foi a cepa mais produtiva atingindo 3,0

U/ml nas melhores condições testadas. Não há relatos sobre a utilização do óleo de pequi como substrato para produção de lipases por fungos.

Isolados das espécies de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Cordyceps*, *Microascus* e *Rhizomucor* foram boas produtoras de lipases neste trabalho. Vários estudos têm relatado a produção de lipases por fungos (ROVEDA et al., 2010; BINDIYA; RAMANA, 2013; SHOREIT; ISMAIL; MOHAMED, 2013; BINDIYA; RAMANA, 2014; RODRIGUES, 2015; PENHA et al., 2016; MAROTTI et al., 2017).

Os resultados verificados para os isolados *Cladosporium* sp. 1 (FIBIO 002-H1) $20.76 \pm 0,03$ U e *Cladosporium* sp. 4 $17.06 \pm 0,08$ U são bastante promissores para estudos futuros. Shoreit et al. (2013) avaliaram qualitativamente a produção de lipases por três isolados de *C. cladosporioides* e verificaram a produção de lipase apresentando índice enzimático acima de 1. Patil et al. (2015) avaliaram a produção de lipases entre fungos endofíticos, e verificaram que um isolado de *Cladosporium* sp. apresentou a maior produtividade com atividade de $0,72 \text{ U mL}^{-1}$. Chinaglia et al. (2014) analisaram as características de lipases obtidas de *Cladosporium cladosporioides*, e verificaram que as mesmas apresentaram maior estabilidade térmica que as lipases produzidas por *P. solitum*, com preservação da atividade completa até 48°C e sendo mais ativa em reações de ésteres de ácidos de cadeia média.

Aspergillus e *Penicillium* são gêneros que possuem bastante impacto social positivo, pois são amplamente utilizados em estudos de biotecnologia (YILMAZ et al., 2014; TSANG et al., 2018). Rodrigues (2015) isolou fungos de espuma de caixa de óleo, e avaliou produção de lipases utilizando óleo de soja como substrato, e relatou um isolado de *Penicillium* sp. e um de *Rhizomucor* sp. como os melhores isolados na atividade lipolítica. Bindiya; Ramana (2013), verificaram a produção de lipases por *Aspergillus sydowii* e desenvolveram estudo de imobilização enzima, obtendo resultado de produção máxima de 63.936 U/ml. Roveda et al. (2010), testaram a produção de lipases por fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Fusarium* isolados de resíduos de laticínios, eles verificaram, utilizando azeite de oliva como substrato, que dois isolados de *Aspergillus*, e um de *Penicillium* foram os melhores produtores com resultados entre 1.250 e 2.250 U/dia.

Neste trabalho um isolado de *Microascus* sp. apresentou atividade lipolítica de 10,03 U. Roberts et al. (1987) avaliaram quantitativamente a produção de lipases em meio sólido de *Microascus cinere* e não constataram atividade lipolítica. Estudos sobre a atividade

lipolítica de espécies de *Microascus* são raras e o resultado do nosso estudo diverge dos resultados desses autores.

Aqui relatamos a produção de lipases por *Talaromyces pigmentosus*, *Talaromyces albobiverticillius*, *Talaromyces* sp. 1, com a produção variando entre 4.96 e 6.68 U. Segundo Yilmaz et al. (2014), algumas espécies de *Talaromyces* são importantes na produção de enzimas e pigmentos solúveis. Algumas pesquisas têm relatado a produção de lipases pela espécie *T. thermophilus* em termos de imobilização e caracterização dessas enzimas (ROMDHANE et al., 2010).

Os isolados *Candida* sp. nov. 3 (001-H7) e *Priceomyces melissophilus*, alcançaram uma produção de $7.34 \pm 0,74$ U e $8.46 \pm 0,24$ U, respectivamente, e são promissoras para estudos de otimização da produção. Não há referências na literatura de relatos de produção de lipases por isolados de *Priceomyces*.

As leveduras têm grande importância econômica em diversas indústrias. Esses organismos secretam enzimas que hidrolisam uma gama de moléculas e, portanto, têm um grande potencial para produção de lipases no campo das indústrias (CHI et al., 2006). Os gêneros de leveduras *Rhodotorula*, *Candida*, *Pichia* e *Geotrichum*, são os mais utilizados para produção de lipases (ALAMI et al., 2017). Em 2017, Alami et al. verificaram a produção de lipases de *Candida* spp. isoladas de manguezal e após a realização de otimização da produção, conseguiram valores acima de 1000 U/ml nas condições ideais. Yilmaz; Sezgin; Yilmaz (2011) em estudo de imobilização de lipases de *Candida rugosa*, e obteve como melhor resultado uma produção de 212,9 U / g de suporte com 200 % de atividade e a enantiosseletividade com suporte de 98 %.

Estudos sobre prospecção enzimática de fungos isolados a partir de colmeias de *M. scutellaris* na literatura ainda são poucos ou não disponíveis. Em especial, os fungos isolados do mel e do pólen, tendem a ser organismos extremo-tolerantes e podem ser produtores de moléculas novas ou modificadas. Dessa forma, é recomendado que futuras pesquisas sejam desenvolvidas no tocante a biotecnologia desses fungos abordando otimização da produção, caracterização e imobilização de lipases.

5 CONCLUSÕES

- *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Monascus*, *Penicillium* e *Talaromyces* são gêneros de fungos filamentosos frequentes em substratos de *Melipona scutellaris*;
- *Candida*, *Gjaerumia*, *Starmerella* e *Wickerhamiella* são gêneros de leveduras frequentes em substratos *Melipona scutellaris*;
- Todos os isolados testados para produção de lipases são produtores;
- Os fungos isolados de substratos de *M. scutellaris* são promissores para estudos em produção de lipases;
- Os isolados *Aspergillus nomius*, *Cladosporium* sp. 1 (FIBIO 002-H1), *Cladosporium* sp. 1 (FIBIO 004-F10), *Cladosporium* sp. 4, *Cordyceps* sp., *Microascus* sp., *Candida* sp. nov. 3 (001-H7) e *Priceomyces melissophilus* são indicados para estudos de caracterização, imobilização das lipases.

REFERÊNCIAS

- ALAMI, N. H. et al. Lipase production in lipolytic yeast from Wonorejo mangrove area. **AIP Conference Proceedings**. AIP Publishing LLC, 2017.
- AL-JABRI, A. A. Honey, milk and antibiotics. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 13, 2005.
- AL-MAMARY M. et al. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutr Res**, v. 22, p. 1041–1047, 2002.
- ALMEIDA, A. S. et al. Óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) métodos de extração, constituição química e propriedades medicinais. **Diversitas Journal**, v. 3, n. 3, p. 557-563, 2018.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R.; ALBUQUERQUE, U. P. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no Estado de Pernambuco (nordeste do Brasil): um estudo de caso. **Interciência**, v. 27, n. 6, p. 276-285, 2002.
- ALNAQDY, A. et al. Inhibition effect of honey on the adherence of Salmonella to intestinal epithelial cells *in vitro*. **Int J Food Microbiol**, v.103, p. 347– 351, 2005.
- ALVES, D. F. S. et al. Efeitos da aplicação tópica do mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas de ratos. **Rev. Col. Bras. Ci**, v. 35, n. 3, p. 188-193, 2008.
- ALVES, T. T. L. et al. Caracterização físico-química e avaliação microbiológica de méis de abelhas nativas do nordeste brasileiro. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, v. 6, n. 3, p. 91-97, 2011.
- AL-WAILI N. S. Effect of honey on antibody production against thymus-dependent and thymus-independent antigens in primary and secondary immune responses. **J Med Food**, v. 7, p. 491-494, 2004.
- ANDERSON, K. E. et al. Hive-stored pollen of honey bees: many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. **Molecular ecology**, v. 23, n. 23, p. 5904-5917, 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ESTUDO DAS ABELHAS (A.B.E.L.H.A.). 2015. Disponível em < <https://abelha.org.br/wp-content/uploads/2015/09/Mandaguari-Scaptotrigona-depilis-Cristiano-Menezes.jpg>>
- BALLIVIÁN, J. M. P. P.; et al. **Abelhas Nativas Sem Ferrão**. São Leopoldo-RS: Editora Oikos Ltda, 2008.
- BÁRBARA, M. F. et al. Caracterizações microbiológica e físico-química de pólenes armazenados por abelhas sem ferrão. **Braz. J. Food Technol**, v. 2, 2018.
- BARBOSA, R. N., et al. Phylogenetic analysis of *Monascus* and new species from honey, pollen and nests of stingless bees. **Studies in Mycology**, v. 86, p. 29-51, 2017.
- BARBOSA, R. N.; et al. New *Penicillium* and *Talaromyces* species from honey, pollen and nests of stingless bees. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1-30, 2018.
- BARBOSA, R.N.; et al. Prospection on Yeasts from Stingless Bees Honey in Brazilian Tropical Dry Forest (Caatinga). **Gaia Scientia**, v. 10, n. 4, 2016.

- BEZERRA, N. K. M. S.; BARROS, T. L.; COELHO, N. P. M. F. A ação do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) no processo cicatricial de lesões cutâneas em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 875-880, 2015.
- BINDIYA, P. A.; RAMANA, T. Optimization of lipase production from an indigenously isolated marine *Aspergillus sydowii* of Bay of Bengal. **Journal of Biochemical Technology**, v. 3, n. 5, p. 203-211, 2014.
- BINDIYA, P.; RAMANA, T. Production of lipase by repeated batch fermentation using immobilized *Aspergillus sydowii*. **Int. J. Chem. Biochem. Sci.** v. 4, p. 72–78, 2013.
- BORGES, J. P. **Produção de lipases por fungos termofílicos e mesofílicos e uso na produção de biodiesel etílico**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual Paulista, 2012.
- BRASIL. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2000.
- BURR, B. et al. *Saheliomyces* (Phallales) visited by *Trigona* (Apidae): melittophily in spore dispersal of an Amazonian stinkhorn? **Jour. Trop. Eco.** v. 12, p. 441-445, 1996.
- CÂMARA, J. Q. et al. Estudos de meliponíneos, com ênfase a *Melipona subnitida* D. no município de Jandaíra, RN. **Revista de biologia e ciências da terra**, v. 4, n. 1, p. 0, 2004.
- CAMARGO, I. M. **Potencial cicatrizante do mel de abelha (*Apis mellifera* L.) em lesões do tecido cutâneo de ratos wistar**. Trabalho de conclusão de curso – área de farmácia – Faculdade Assis Gurgacz, Cascável, 2012.
- CAMPOS, F. S.; GOIS, G. C.; CARNEIRO, G. G. Parâmetros físico-químicos do mel de abelhas *Melipona scutellaris* produzido no estado da Paraíba. **FAZU em Revista**, v.07, p. 186-190, 2011.
- CANSECO-PÉREZ, M. A. et al. Fungal Screening on Olive Oil for Extracellular Triacylglycerol Lipases: Selection of a *Trichoderma harzianum* Strain and Genome Wide Search for the Genes. **Genes**, v. 9, n. 2, p. 62, 2018.
- CARMICHAEL, J. W. et al. **Genera of *Hyphomycetes***. Canada: University of Alberta Press, 1980.
- CARPES, S. T. et al. Palynological and physicochemical characterization of *Apis mellifera* L. bee pollen in the Southern region of Brazil. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v. 7, p. 667-673, 2009.
- CARVALHO, A.T.; ZANELLA, F. C. V. Espécies de abelhas sem ferrão criadas no estado do Rio Grande do Norte. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; KOEDAM, D.; HRNCIR, M. **A abelha jandaíra no passado, no presente e no futuro**, Mossoró, EdUFERSA, 2017. pp. 41-72
- CARVALHO, C. A. L. et al. **Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química**. Insecta-Núcleo de Estudos dos Insetos, 2005.
- CHAVES, A. F. A. et al. Caracterização físico-química do mel de *Melipona fulva* Lepelletier, 1836 (Himenoptera: Apidae: Meliponinae) utilizada na meliponicultura por comunidades tradicionais do entorno da cidade de Macapá-AP. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2012.

- CHINAGLIA, S. et al. Biochemistry of lipolytic enzymes secreted by *Penicillium solitum* and *Cladosporium cladosporioides*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 78, n.2, p. 245-254, 2014.
- CIHANGIR, N., SARIKAYA, E., 2004. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20:193–197.
- COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206 f. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- COLLA, L. M. et al. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. **Brazilian journal of microbiology**, v. 47, n. 2, p. 461-467, 2016.
- CONTI, M.E. Lazio region (central Italy) honeys: a survey of mineral content and typical quality parameters. **Food Control**, v. 11, n. 6, p. 459-463, 2000.
- CORONEL, B. B. et al. Caracterización bromatológica del pólen apícola Argentino. **Ciência, Docência y Tecnologia**, v. 15, n. 29, p. 141-181, 2004.
- COSTA-NETO, E. M.; PACHECO, J. M. Utilização medicinal de insetos no povoado de Pedra Branca, Santa Terezinha, Bahia, Brasil. **Biotemas**, v. 18, n. 1, p. 113-133, 2005.
- CRUZ, C. B. N. D. et al. Antimicrobial activity of honeys from two stingless honeybee species and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) against pathogenic microorganisms. **Acta Amazonica**, v. 44, n. 2, p. 287-290, 2014.
- DANIEL, H. et al. *Starmerella neotropicalis* fa., sp . nov , a yeast species found in bees and pollen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3896–3903, 2013.
- DAS, A. et al. Purification and characterization of a surfactant-compatible lipase from *Aspergillus tamaris* JGIF06 exhibiting energy-efficient removal of oil stains from polycotton fabric. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 131, 2016.
- DRUMOND, P. *Abelhas indígenas sem ferrão*. Disponível em: <http://ambientes.ambientebrasil.com.br/natural/abelhas/abelhas_indigenas_sem_ferrao.html?query=abelha>, 2010. Acesso em: 29 nov. 2018.
- DUARTE, A.W. F. **Biodiversidade de leveduras derivadas de ecossistemas Antárticos marinhos e terrestres e prospecção de lipases**. 177f. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971.
- ELLIS, M. B. **More Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1976.
- ELTZ, T.; BRUHL, C. A.; GORKE, C. Collection of mold (*Rhizopus* sp.) spores in lieu of pollen by the stingless bee *Trigona collina*. **J Trop Ecol** v. 12, p. 441–445, 2002.
- ENGEL, P.; MARTINSON, V. G.; MORAN, N. A. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 27, p. 11002–11007, 2012.

- FARIAS, C. M. M. **Produção e purificação de lipases a partir de *Aspergillus* seção *terrei* e aplicação em tratamentos de efluentes**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, 2017.
- FARINAS, C. S. et al. Desenvolvimentos em fermentação em estado sólido para produção de enzimas de interesse agroindustrial. In: NAIME, J. M., et al. (Org.). **Conceitos e aplicações da instrumentação para o avanço da agricultura**. 1ed. Brasília: Embrapa, v. 1, p. 211-241, 2014.
- FELSÖCIOVÁ, S., et al. Microscopic fungi isolated from Polish honey. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2, n. 3, p. 1040, 2012.
- FERRAREZI, A. L. **Seleção de fungos termofílicos para produção de lipase e aplicação na produção de biodiesel**. 2011. 167 f. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.
- FERRAZ, R. E. et al. Microbiota fúngica de *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae). **Neotrop Entomol**, v. 37, p. 345–346, 2008.
- FOLEY, K. et al. Nutritional limitation and resistance to opportunistic *Aspergillus* parasites in honey bee larvae. **J Invertebr Pathol** v. 111, p. 68–73, 2014.
- FREITAS, B. M., SILVA, C. I. **O papel dos polinizadores na produção agrícola no Brasil**. In: Associação Brasileira de Estudos das Abelhas - A.B.E.L.H.A (org.). São Paulo: Agricultura e Polinizadores, 2015.
- GEOFFRY, K., ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2018.
- GILLIAM, M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. **FEMS microbiology letters**, v. 155, n. 1, p. 1-10, 1997.
- GILLIAM, M.; et al. 1989 Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds. **Apidologie**, v. 20, p. 53–68
- GILLIAM, M.; PREST, D.B. Microbiology of feces of the larval honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of invertebrate pathology**, v.49, n. 1, p. 70-75, 1987.
- GOIS G.C.; et al. Qualidade microbiológica do mel de abelhas *Melipona scutellaris*. **PUBVET**, v. 4, p. 769, 2010.
- GONÇALVES, F.A.G. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**. Belo Horizonte (2007). Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos). Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 67f.
- GOPINATH, S.C. et al. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, v. 46, n. 2, p. 119-126, 2005.
- HASAN, F., SHAH, A. ALI; HAMEED, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006
- HERMES, E. et al. Isolation of microorganisms of cheese whey with lipolytic activity for removal of COD. **Engenharia Agrícola**, v. 33, n. 2, p. 379-387, 2013.
- HESELTIME, C.W.; FENNEL, D.I. The genus *Circinella*. **Mycologia**, v. 7, p. 193-211, 1995.

- HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175-186, 2004.
- HOUBRAKEN, J. et al. Rasamsonia, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 403–421, 2012.
- HRNCIR, M. et al. 2017. A Jandaíra– Abelha símbolo do sertão In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; KOEDAM, D.; HRNCIR, M. **A abelha jandaíra: no passado, presente e no futuro**. Mossoró: EdUFERSA, 2017.
- HYDE, K. D. et al. Fungal diversity notes 1036–1150: taxonomic and phylogenetic contributions on genera and species of fungal taxa. **Fungal diversity**, v. 96, n. 1, p. 1-242, 2019.
- IMAMURA, S. et al. Method and reagent containing lipases for enzymatic determination of triglycerides. **West Germany Patent** 3.912.226, 1985.
- INGLIS, G. D.; SIGLER, L.; GOETTEL, M. S. Aerobic microorganisms associated with alfalfa leafcutter bees (*Megachile-Rotundata*). *Microb. Ecol*, v. 26, p. 125-143, 1993.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.
- JIMENEZ, M., et al. Physicochemical and antioxidant properties of honey from *Scaptotrigona mexicana* bee. **Journal of Apicultural Research**, v. 55, n. 2, p. 151-160, 2016.
- KAČÁNIOVÁ, M. et al. Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, v. 56, n. 3, p. 285-295, 2009.
- KERR W.K., CARVALHO G.A, NASCIMENTO V.A. **Abelha uruçu: biologia, manejo e conservação**. Paracatu: Acangaú, 1996.
- KERR, W.E., CARVALHO, G.A., SILVA, A.C., ASSIS, M.G.P. **Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica**. Mensagem doce. n.80, 2005.
- KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Centraalbureau vöör: Schimmelcultures, 2002.
- KURTZMAN, C. P. Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 325-332, 2014.
- KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J.; BASEHOAR-POWERS, E. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. **FEMS Yeast**, v. 8, p. 939–954, 2008.
- LARRAN, S. et al. Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 683-686, 2002.

LIMA, A. et al. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 695-698, 2007.

LINS, A.C.S., et al. Flavonóides isolados do pólen coletado pela abelha *Scaptotrigona bipunctata* (canudo). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 40-41, 2003.

LOPES, M. O.; FERREIRA, J. B.; SANTOS, G. Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. **Agriculturas**, v. 2, n. 4, 2005.

LUPATINI, M.; MELLO, A. H.; ANTONIOLLI, Z. I. Caracterização do DNA ribossômico do isolado de *Scleroderma* UFSMSc1 de *Eucalyptus grandis* W. Hill Ex-Maiden **R. Bras. Ciências. Solo**, v. 32, n. 1, p. 2677–2682, 2008.

MADALENO, I. M. Plantas medicinais consumidas em Cochim, no século XVI e na atualidade. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 10, n. 1, 2015.

MALMSTRØM, J.; CHRISTOPHERSEN, C.; FRISVAD, J. C. Secondary metabolites characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. **Phytochemistry**, v. 54, n. 3, p. 301-309, 2000.

MAROTTI, B. S. et al. Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação em hidrólise de óleos vegetais. **Quim. Nova**, v. 40, n. 4, p. 427-435, 2017.

MARTINS, G. et al. Incentivo para o plantio de árvores nativas em áreas urbanas para proliferação de abelhas sem ferrão. **ACTA Apícola Brasilica**, v. 3, n. 2, p. 01-09, 2015.

MASAHIKO, A. Process for preparation of polyol fatty acid ester and glyceride mixture obtained. **Eur Patent**, EP-658629, 1995.

MEHTA, A. et al. Fungal lipases: a review. **Journal of Biotech Research**, v. 8, p. 59-77, 2017.

MEIRELES, S. D. F. **Leveduras associadas ao ninho das abelhas sem ferrão *Melipona interrupta* e *Cephalotrigona femorata* (Apidae: Meliponini): identificação e aspectos biotecnológicos**. 81f. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.

MENEZES, C. et al. A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. **Current Biology**, v. 25, n. 21, p. 2851-2855, 2015.

MESSIAS, J. M., et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina. Ciências Exatas e Tecnológicas*, p. 213-234, 2011.

MICHENER, C. D. **The bees of the world** (Vol. 1). 2 ed. Baltimore: The John Hopkins University Press, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Norouzian, D., 2008. Effect of different factors on fermentative production of enzymes by fungi. *Dyn. Biochem. Process Biochem. Mol. Biol.* 2:14–18.

- NOUREDDINI, H., et al. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource technology**, v. 96, n. 7, p. 769-777, 2005.
- OLAITAN, P. B.; ADELEKE, O. E.; OLA, I. O. Honey: A reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. **Afr Health Sci**, v. 7, p. 159–165, 2007.
- OLIVEIRA, A. D. et al. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 695-698, 2007.
- OLIVEIRA, M. L.; MORATO, E. F. Stingless bees (Hymenoptera, Meliponini) feeding on stinkhorn spores (Fungi, Phallales): robbery or dispersal?. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, n. 3, p. 881-884, 2000.
- OLIVEIRA, W. L. D., SCARIOT, A. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do pequi**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010.
- PALUDO, C. R. et al. Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. **Sci Rep** v. 8, 2018.
- PATEL, U. et al. Screening and isolation of an organic solvent tolerant lipase producing bacteria from various oil contaminated sites. **Indian J. Appl. Microbiol**, v. 21, p. 22-36, 2018.
- PATIL, M. G. et al. Extracellular enzymatic activities of endophytic fungi isolated from various medicinal plants. **Int J Curr Microbiol App Sci**, v. 4, n. 3, p. 1035-1042, 2015.
- PEDRO S. R. M.; CAMARGO J. M. F. *Hymenoptera, Apiformes*. In: JOLY, C.A; BICUDO, C. E. M. (orgs). **Biodiversidade do Estado de São Paulo**. Volume 5. BIOTA/FAPESP, 1999.
- PEREIRA, L. D. L. D. S. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do mel da abelha *Melipona scutellaris* sobre o fungo *Malassezia pachydermatis*. 18f. Trabalho de conclusão de curso. Bacharel em Medicina Veterinária, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2018.
- PIMENTEL, R. B. et al. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manausensis* and commercial honey. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 151, 2013.
- PINHEIRO, C. D. G. M. D.; et al. Microbiological quality of honey from stingless bee, jandaíra (*Melipona subnitida*), from the semiarid region of Brazil. **Ciência Rural**, v. 48, n. 9, 2018.
- RAO, P.V.; et al. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. **Rev Bras Farmacogn** v.26, p. 657–664, 2016. doi: 10.1016/j.bjp.2016.01.012.
- REINEHRA, C. O. et al. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Quim. Nova**, v. 37, n. 3, p. 454-460, 2014.
- REJEB, I. B. et al. Amperometric biosensor based on Prussian Blue modified screen-printed electrode for lipase activity and triacylglycerol determination. **Anal Chim Acta**, v. 594, n. 1, p. 1-8, 2007.

- ROBERTS, R. G., et al. Extracellular lipase production by fungi from sunflower seed. **Mycologia**, p. 265-273, 1987.
- RODRIGUES, C. Crescimento e atividade lipolítica de fungos de escuma de caixa de gordura em fermentação submersa e em estado sólido. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 11, n. 21, p. 3078-3093, 2015.
- RODRIGUES, M. L. F. et al. Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico *Penicillium* sp. isolado das folhas de *Ricinus Communis* L. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, n. 2, 2015.
- ROMDHANE, I. B. B. et al. A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, n. 1, p. 1112-120, 2010.
- ROSA, C. A. et al. Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Res**, v. 4, p. 271–275, 2003.
- ROUBIK, D.W. **Ecology and Natural History of Tropical Bees**. New York: Cambridge Univ. Press, 1989.
- ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 126-131, 2010.
- ROWE, L.; HOWARD, G.T. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 50, n. 1, p. 33-40, 2002.
- SAMSON, R. A. et al. **Food and indoor fungi**. Utrecht, The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. (CBS Laboratory Manual Series; No. 2), 2010.
- SAMSON, R. A.; PITT, J. I. **Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification**. London: Academic, 2000.
- SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. **Useful Microbial Enzymes — An Introduction**. In: BRAHMACHARI, G.; DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. *Biotechnology of Microbial Enzymes Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. London: Academic Press, 2017.
- SANTANA, W. J. D. **Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* (UPC 0988) utilizando óleo de pequi como fonte alternativa de Carbono**. Recife (2012). Tese (Doutorado em Micologia). Universidade Federal de Pernambuco, 2012. 137f.
- SANTOS, A. B. Abelhas nativas: polinizadores em declínio. **Natureza online**, v. 8, n. 3, p. 103-106, 2010.
- SAVITHA, S. et al. Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 2, p. 298-304, 2011.
- SEBRAE. O cultivo e o mercado do pequi, 2016. Disponível em <<http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-do-pequi,0966438af1c92410VgnVCM100000b272010aRCRD>>. Acesso em 10 jan 2019.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

- SHEHU, A et al. Antifungal properties of Malaysian Tualang honey and stingless bee propolis against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 2, p. 044-050, 2016.
- SHIN, J. A.; AKOH, C. C.; LEE, K. T. Enzymatic interesterification of anhydrous butterfat with flaxseed oil and palm stearin to produce low-trans spreadable fat. **Food Chemistry, London**, v. 120, p. 1-9, 2010.
- SHOREIT, A. A. M.; ISMAIL, M. A.; MOHAMED, N. H. Preliminary study on soil microbiota degrading plant latices and their protease and lipase enzymes. **J Basic Appl Mycol (Egypt)**, v. 4, p. 33-45, 2013.
- SILVA, M. S., et al. *Microorganisms in Honey*. In: TOLEDO, V. A. A. **Honey Analysis**. IntechOpen, 2017. doi: 10.5772/67117.
- SILVA, M.S. et al. Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uruçu-amarela). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 2, p. 173-178, 2009.
- SILVA, W. P.; PAZ, J. R. L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza online**, v.10, p. 146-152, 2012.
- SILVEIRA F.A et al. **Abelhas brasileiras: Sistemática e identificação**. Belo Horizonte: IDM, 2002.
- SINGH, A.K., MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 166, p. 486–520, 2012.
- SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.
- SOMCHINDA, A., et al. Prospecção Tecnológica da Produção de Cápsulas Gelatinosas de Polpa de Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) como um novo Nutracêutico. **Cadernos de Prospecção**, v. 11, n. 2, p. 615, 2018.
- SOUZA, B. A. et al. Composition of stingless bee honey: setting quality standards. **Interciencia**, v. 31, n. 12, 2006.
- SOUZA, B. D. A. et al. (a). Avaliação microbiológica de amostras de mel de trigoníneos (Apidae: Trigonini) do Estado da Bahia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 798-802, 2009.
- SOUZA, B. D. A. et al. Caracterização do mel produzido por espécies de *Melipona* Illiger, 1806 (apidae: meliponini) da região nordeste do Brasil: 1. Características físico-químicas. **Quim. Nova**, v. 32, n. 2, p. 303-308, 2009.
- SOUZA, B.A. **Caracterização físico-química e qualidade microbiológica de amostras de mel de abelhas sem ferrão (Apidae, Meliponinae) do Estado da Bahia, com ênfase em *Melipona Illiger, 1806***. 107 f. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- SOUZA, B.A. et al. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae). **Ciênc. Rural**, v. 34, n. 5, p. 1623-1624, 2004.

- SOUZA, J. R. S. et al. Occurrence of filamentous fungi associated with stingless bees *Melipona* in meliponaries at the metropolitan region of Manaus, Amazonas. **Revista da Biologia**, v. 18, n. 1, p. 1-5, 2018.
- SPATH, N. D. C. M. **Avaliação de compostos bioativos em amostras de méis de *Melipona scutellaris***. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade Federal da Bahia, 2013.
- STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, v. 22, p. 2688–2690, 2006.
- STOYTCHIEVA, M., et al. Analytical methods for lipases activity determination: A review. **Current Analytical Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 400-407, 2012.
- STUART, R. M.; LAMAS, C.; PIMENTEL, I. C. *Trigona* sp. como visitante floral e vetor de esporos fúngicos para goiabeira (*Psidium guajava* L.–Myrtaceae). **Estudos de Biologia**, v. 26, n. 55, 2004.
- SUBRAHMANYAM, M. Storage of skin grafts in honey. **The Lancet**, v. 341, n. 8836, p. 63-64, 1993.
- SUTTON, B. C. **The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980.
- SZWEDA, P. Antimicrobial activity of honey. In: Toledo, V. A. A. **Honey Analysis**. IntechOpen, 2017. doi: 10.5772/67117.
- Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 4. ed. rev. e ampl. São Paulo: NEPA-UNICAMP, 2011.
- TEIXEIRA, A. C. P. et al. *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 53, p. 339–343, 2003.
- THIAGO-CALAÇA, P. S. S. **Aspectos da biologia de *Melipona quinquefasciata* Lepeletier (Mandaçaia do chão), características físico-químicas do mel, recursos alimentares e leveduras associadas**. Dissertação de mestrado (Ecologia e Biomas tropicais). Universidade Federal do Ouro Preto, Minas Gerais, 2011.
- Thota, P., Bhogavalli, P.K., Rao, V.P., Sreerangam, V., 2012. Screening and identification of potential fungal strains for the production of extracellular lipase from soil. *Plant Sci. Feed.* 2:79–84.
- TIAGO, M. R. M. **Microbiota fúngica cultivável associada às colmeias e castas de *Melipona interrupta* e *Melipona seminigra* (Apidae, Meliponini)**. 55f. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional De Pesquisas Da Amazônia, Manaus, 2017.
- TOPHAM J. Why do some cavity wounds treated with honey or sugar paste heal without scarring? **J Wound Care** v. 11, p. 53– 55, 2002.
- TREICHEL, H. et al. A review on microbial lipases production. **Food and bioprocess technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.
- TSANG, Chi-Ching et al. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era—Past, present and future. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 16, p. 197-210, 2018.

VENTURIERI, G. C. **Contribuições para a Criação Racional de Meliponíneos Amazônicos**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental (Documentos 330), 2008.

VENTURIERI, G.C. et al. Meliponicultura no Brasil: situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização agrícola. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. et al. (orgs). **Polinizadores no Brasil: Contribuições e Perspectivas para a Biodiversidade, Uso Sustentável, Conservação e Serviços Ambientais**, São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, pp. 213-236, 2012.

VERA, R. et al. Caracterização física e química de frutos do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) oriundos de duas regiões no estado de Goiás, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 2, p. 71-79, 2007.

VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico Mel de Abelhas sem Ferrão**. 1 ed. Brasília: ISPN, p. 100, 2012.

WEBBEE. *A Abelha Uruçu*. Disponível em <<http://www.webbee.org.br/urucu/index.html>>, 2014. Acesso em 29 nov 2018.

WHITE JÚNIOR, J. W. 1978. Honey advances in Food Research. *Academic Press*, 22:287-374.

WILSON, Z. E., BRIMBLE, M. A. Molecules derived from the extremes of life. **Natural Product Report**, v. 26, p.1-140, 2009.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

YILMAZ, E., SEZGIN, M., YILMAZ, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic sol-gel composite supports for enzymatic resolution of (R,S)-naproxen methyl ester. **J. Mol. Catal. B Enzym**, v. 69, p. 35–41, 2011.

YILMAZ, N. et al. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 175-341, 2014.

ZEHANI, N. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on aluminosilicate incorporated in a polymeric membrane for the elaboration of an impedimetric biosensor. **Sensors Transducers**, v. 27, p. 371-373, 2014.