



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Estudos químicos e atividade antimicrobiana de bactérias  
associadas à abelha sem ferrão *Scaptotrigona depilis***

**Marina Cusinato**

**Ribeirão Preto**  
**2020**



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Estudos químicos e atividade antimicrobiana de bactérias associadas à abelha sem ferrão *Scaptotrigona depilis***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

**Orientada:** Marina Cusinato

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mônica Tallarico Pupo

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 11/03/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

**Ribeirão Preto**

**2020**

## RESUMO

CUSINATO, M. **Estudos químicos e atividade antimicrobiana de bactérias associadas à abelha sem ferrão *Scaptotrigona depilis***. 2020. 87f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Seres vivos interagem entre si vivendo em ambientes naturais e são capazes de produzir metabólitos secundários que desempenham papel importante na mediação das interações entre espécies. Os micro-organismos estão presentes em muitos ambientes e estabelecem diferentes tipos de associações com outros organismos, incluindo relações mutualísticas. Recentemente uma simbiose envolvendo abelhas nativas sem ferrão e micro-organismos foi relatada envolvendo o mecanismo de simbiose nutricional entre abelhas sem ferrão *Scaptotrigona depilis* e um fungo que cresce dentro das células de cria, fornecendo precursores esteroidais essenciais para a completa metamorfose das larvas. Ainda estão presentes outros fungos nas células de cria, que modulam o crescimento deste fungo alimento. A literatura mostra que a associação protetora entre insetos *Hymenoptera* e actinobactérias é amplamente distribuída. No entanto, nenhuma associação protetora entre actinobactérias e *S. depilis* foi descrita ainda. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi isolar as actinobactérias associadas a *S. depilis* e verificar suas propriedades antimicrobianas. Foram isolados 130 micro-organismos associados às abelhas da espécie *S. depilis* e de sua colônia, totalizando 26 actinobactérias. Ensaio de antagonismo foram realizados contra três diferentes micro-organismos entomopatogênicos - *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paenibacillus larvae*. Os resultados indicaram cinco linhagens de actinobactérias interessantes, das quais foram obtidos extratos das culturas em acetato de etila a fim de isolar os compostos bioativos. Do extrato obtido de *Streptomyces* sp. ICBG 2041 foi isolado e identificado o composto bioativo antimicina A, comumente isolado de actinobactérias do gênero *Streptomyces* sp. e conhecido por sua atividade antifúngica. O fracionamento dos extratos obtidos de *Micromonospora* sp. ICBG 2040 possibilitou o isolamento de algumas bandas cromatográficas, porém não permitiu a identificação dos compostos bioativos devido ao baixo rendimento obtido, o qual não foi satisfatório para análises espectroscópicas. Análises espectrométricas dos extratos brutos de *Bacillus* sp. ICBG 2045 permitiram identificar o composto bioativo surfactina, comumente isolado de bactérias e conhecido por sua capacidade antimicrobiana. Ensaio biológicos e análises filogenéticas das linhagens de actinobactérias selecionadas foram realizados, ampliando o conhecimento sobre a relação existente entre abelhas *S. depilis* e seus micro-organismos associados. Este trabalho relata pela primeira vez uma possível relação simbiótica protetiva existente entre bactérias e abelhas sem ferrão *S. depilis*, que podem auxiliar no controle de patógenos dentro das colônias.

Palavras-chave: bactérias simbiotes, abelhas sem ferrão, atividade antimicrobiana, surfactinas, antimicinas.

## ABSTRACT

CUSINATO, M. **Chemical study and antimicrobial activity of bacteria associated with the stingless bee *Scaptotrigona depilis***. 2020. 87f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

All living organisms interact in their natural environments, and secondary metabolites play an important role in mediating these interactions. Microorganisms are ubiquitous and establish different types of associations with other organisms, including mutualistic relationships. Recently, an unprecedented symbiosis involving Brazilian stingless bees and microorganisms was described, involving the molecular mechanism underpinning the nutritional mutualism between the stingless bee *Scaptotrigona depilis* and a fungus that grows inside the brood cells, providing steroidal precursors essential to complete larvae metamorphosis. Other fungi in the brood cell seem to control the development of the fungal food source. Literature has also shown that the protective association between Hymenopteran insects and actinobacteria seems to be widespread. However, no protective association between actinobacteria and *S. depilis* has been described. Therefore, the aim of the current work was to recover actinobacterial symbionts associated with *S. depilis* and to test their antimicrobial properties. As a result, 130 microbial strains were isolated from parts of the colony and from the bees, being 26 predicted as actinobacteria. Antagonism assays against pathogenic microorganisms - *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paenibacillus larvae* - were performed. Five strains were selected and their extracts presented antimicrobial activity against the pathogens. The ethyl acetate extracts from selected actinobacteria were obtained for the isolation of bioactive compounds. *Streptomyces* sp. ICBG 2041 yielded one bioactive compound identified as antimycin A, a known antifungal natural product isolated from actinobacteria of the genus *Streptomyces* sp. *Micromonospora* sp. ICBG 2040 allowed the isolation of some chromatographic bands, but it was not possible to identify the compounds due to the low yields obtained, which are not satisfactory for spectroscopic analyses. Biological assays and phylogenetic analyses were performed, improving the knowledge about the relationship between *S. depilis* bees and their associated microorganisms. This work reports for the first time a possible protective symbiotic association between *S. depilis* bees and its associated bacteria that might control microbial pathogens within the colony.

Keywords: symbiont bacteria, stingless bees, antimicrobial activity, surfactins, antimycins.

# INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO:

### 1.1. Produtos Naturais como fonte de metabólitos bioativos

Produtos naturais desempenham um papel fundamental na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que são moléculas com atividades farmacologicamente relevantes, especialmente em infecções bacterianas (NEWMAN; CRAGG, 2016). Além disso, inspiram o desenvolvimento de análogos farmacêuticos com propriedades farmacológicas melhoradas, assim são reconhecidos como a base de fármacos bem sucedidos, pois através da aplicação de várias técnicas é possível sintetizar derivados de produtos naturais e patentearlos como novos compostos (HARVEY, 2008). Até 2016, os produtos naturais e seus derivados semissintéticos representavam 73% dos 112 antibióticos aprovados pelo órgão fiscalizador americano *Food and Drug Administration* (FDA) (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Infecções bacterianas e fúngicas são uma ameaça para a saúde humana, principalmente por causa de sua resistência aos antibióticos, por isso é muito importante a descoberta e desenvolvimento de novos compostos com atividade antimicrobiana. Ao longo dos anos, inúmeros compostos novos foram descritos desde a penicilina, primeiro antibiótico descoberto, porém a partir de 1970 essa taxa diminuiu significativamente (KOLTER; VAN WEZEL, 2016). Nos últimos anos, dados do FDA mostram que produtos naturais e seus análogos semissintéticos são essenciais e desempenham papel significativo na terapêutica antimicrobiana e também anticâncer (NEWMAN; CRAGG, 2016; PUPO; CURRIE; CLARDY, 2017).

As fontes de produtos naturais podem incluir variados organismos aquáticos e terrestres como os anfíbios, insetos, plantas e micro-organismos, sendo que estes últimos se destacam pela produção de pequenas moléculas farmacologicamente importantes, com destaque para actinobactérias e fungos filamentosos, fontes de metabólitos secundários que podem fornecer novos compostos com variadas atividades biológicas (BAKER; ALVI, 2004). A diversidade química dos metabólitos produzidos pelos micro-organismos é um grande atrativo dessa fonte de produtos naturais para o desenvolvimento de

fármacos, pois apresentam propriedades biológicas altamente seletivas e específicas. Estes produtos do metabolismo são diversos e podem agir como agentes antibacterianos, imunossupressores, agentes redutores de colesterol, anti-helmínticos e anti-parasitários (CRAGG; NEWMAN, 2013).

### **1.2. Produtos naturais envolvidos na associação simbiótica entre insetos sociais e actinobactérias**

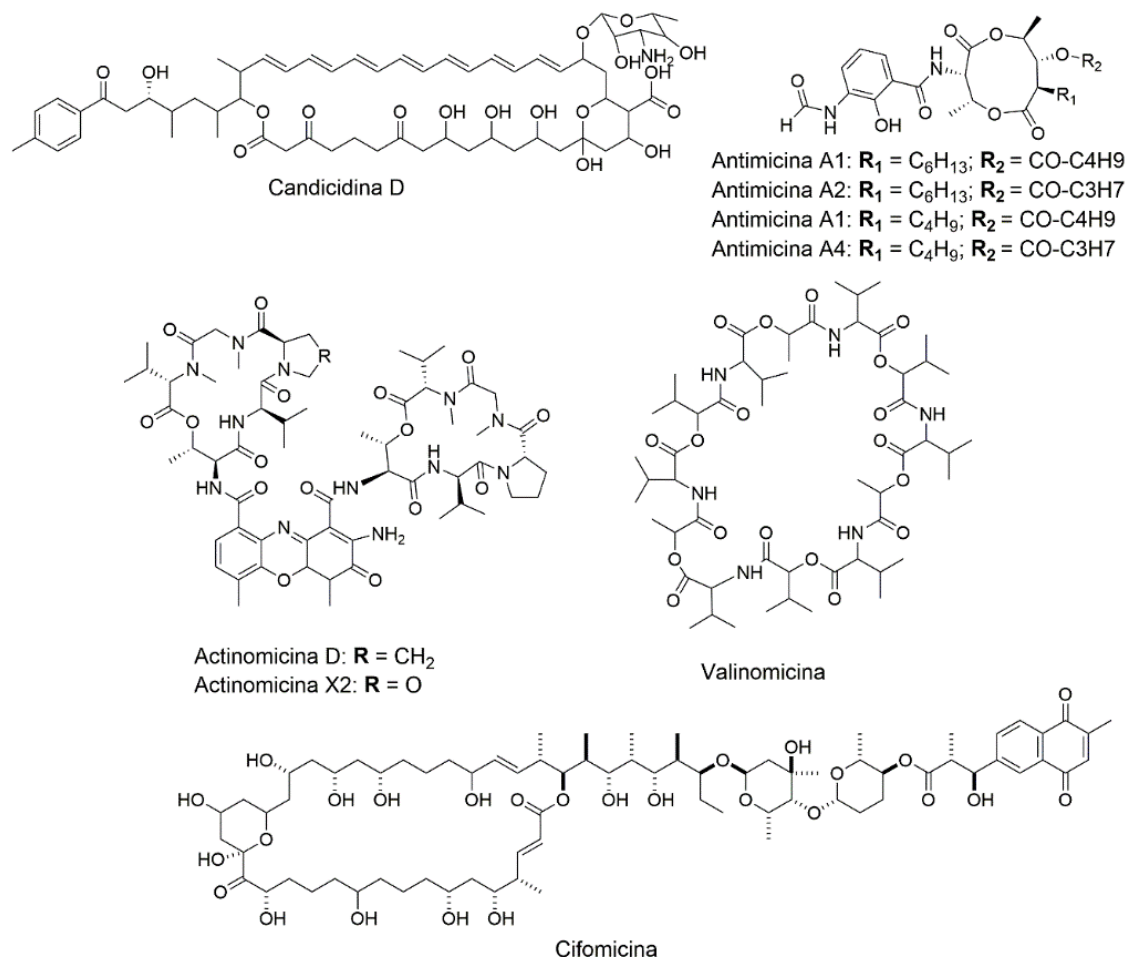
No meio ambiente ocorre constante pressão de seleção natural e com isso, competição pela sobrevivência entre os organismos, resultando em grande diversidade biológica e química e, conseqüentemente, novas descobertas de potenciais candidatos a fármacos (SINGH; MACDONALD, 2010). Além disso, no ecossistema há muitos casos de associação entre os inúmeros organismos, que estabelecem relações mutualísticas obrigatórias. A associação simbiótica entre alguns insetos e bactérias é uma das mais sofisticadas, pois o hospedeiro e seu simbiote são incapazes de sobreviver de forma independente (HOSOKAWA et al., 2016).

Estudos recentes têm revelado a importância da associação entre insetos da ordem Hymenoptera e actinobactérias, demonstrando que esta é uma associação mais comum do que estava previsto até o presente momento. Entre as actinobactérias isoladas da associação com insetos como abelhas, formigas e vespas, as mais comuns são do gênero *Streptomyces* sp., enquanto *Pseudonocardia* sp. e *Amycolatopsis* sp. são menos comumente isoladas (MATARRITA-CARRANZA et al., 2017). A ordem Hymenoptera desperta grande interesse na investigação de associações com outros organismos, uma vez que possuem variados estilos de vida e uma grande importância ecológica, principalmente quando trata-se de formigas, vespas e abelhas (KALTENPOTH; ENGL, 2014).

Entre os exemplos de associações simbióticas envolvendo micro-organismos e insetos, uma importante descoberta foi entre formigas da tribo Attini e actinobactérias. Estabeleceu-se por microscopia eletrônica de varredura que formigas da tribo Attini apresentam seu exoesqueleto coberto por actinobactérias do gênero *Pseudonocardia* sp. Essas actinobactérias têm a capacidade de

biossintetizar compostos antimicrobianos contra fungos do gênero *Escovopsis* sp, patógeno específico do ninho das formigas cortadeiras. Essa relação de simbiose auxilia a sobrevivência dos ninhos das formigas (CURRIE et al., 1999).

Diferentes linhagens de *Streptomyces* foram isoladas de três espécies de formigas do gênero *Acromyrmex*, e biossintetizaram o antibiótico macrolídeo candidicina D, responsável por inibir fortemente o crescimento do fungo patógeno *Escovopsis* sp. (HAEDER et al., 2009). Ainda envolvendo a simbiose de formigas da tribo Attini e actinobactérias, são exemplos de produtos naturais isolados de *Streptomyces* sp. apresentando atividade antimicrobiana: antimicinas, actinomicinas, valinomicina e cifomicina. (CHEVRETTE et al., 2019; SCHOENIAN et al., 2011). (Figura 1).

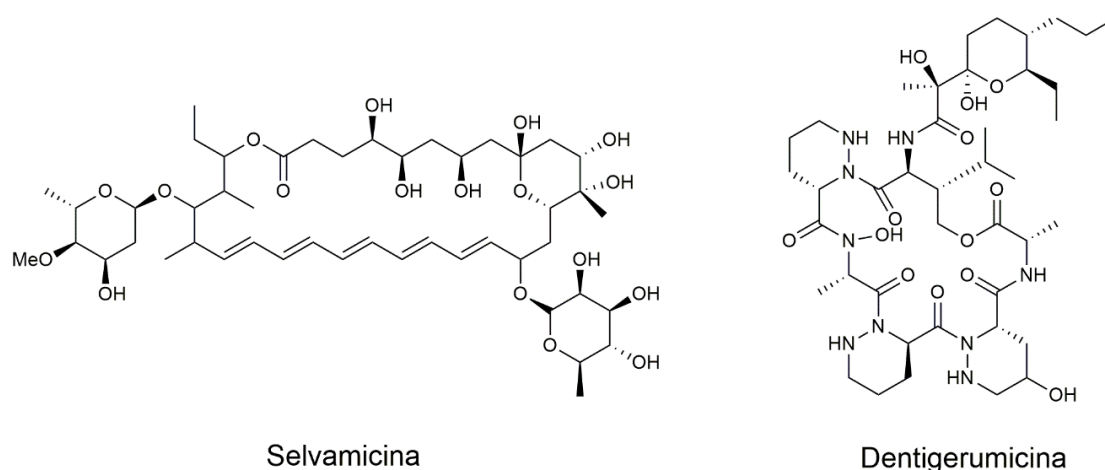


**Figura 1.** Produtos naturais microbianos envolvidos na simbiose de *Streptomyces* sp. com formigas da tribo Attini.

Da associação entre formigas da espécie *Apterostigma dentigerum* e *Pseudonocardia* sp. foi obtido o depsipeptídeo cíclico dentigeromicina, com

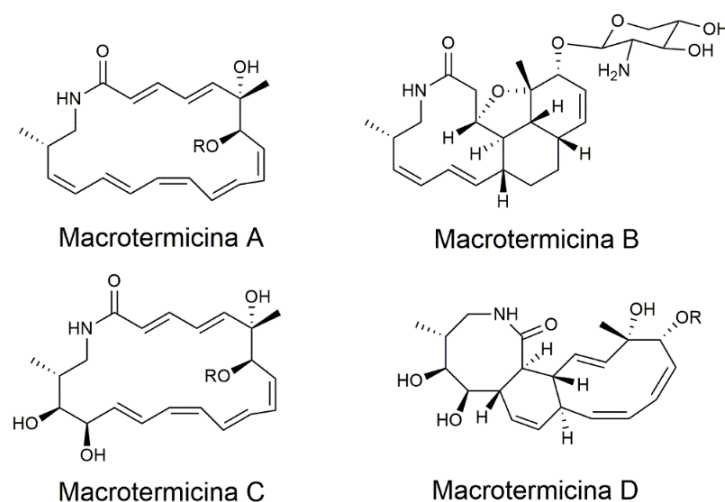


atividade antifúngica seletiva contra o fungo parasita *Escovopsis* sp. e outros patógenos (OH et al., 2009). Ainda de estudos envolvendo a associação de *Pseudonocardia* sp. e formigas do gênero *Apterostigma* sp. foi isolado e identificado um novo antifúngico poliênico, selvamicina, com atividade antimicrobiana contra o patógeno humano *Candida albicans*, e contra outras espécies de fungos, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus fumigatus* e *Trichoderma harzianum*. (VAN ARNAM et al., 2016) (Figura 2).



**Figura 2.** Produtos naturais microbianos envolvidos na simbiose de *Streptomyces* sp. e *Pseudonocardia* sp. com insetos.

A actinobactéria *Amycolatopsis* sp. M39, associada ao cupim africano *Macrotermes natalensis*, produziu quatro novas macrolactamas policetídicas (macrotermicinas A–D). Macrotermicinas A e C apresentaram atividade antibacteriana contra o patógeno humano *Staphylococcus aureus*. Ainda, com maior relevância ecológica, também apresentaram atividade antifúngica seletiva contra o fungo parasita *Pseudoxyllaria* sp., patógeno do fungo simbiote *Termitomyces* sp., esse último cultivado como fonte de alimento pelos cupins (BEEMELMANN et al., 2017) (Figura 3).



**Figura 3.** Estruturas das macrotermicinas A-D. (Adaptado de BEEMELMANNNS et al., 2017).

Exemplos como estes evidenciam a importância dos estudos de associação de actinobactérias com insetos, uma vez que essas produzem compostos específicos capazes de eliminar os entomopatógenos. Compostos estes que, pela atividade antimicrobiana que possuem no ambiente natural, podem ter aplicação farmacêutica, contribuindo para desenvolvimento de novos antibióticos, com habilidade de combater a crescente resistência microbiana.

### 1.3.A espécie *Scaptotrigona depilis* e a simbiose de abelhas

As abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) são o maior grupo de abelhas eussociais do mundo, compreendendo mais de 500 espécies descritas na literatura. A tribo Meliponini compreende cerca de 60 gêneros distribuídos pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Essas abelhas recebem este nome popular, pois o ferrão se encontra atrofiado ou somente vestigial, sem funcionalidade (VIT; ROUBIK; PEDRO, 2012).

As abelhas são insetos importantes na manutenção dos ecossistemas, além de manterem a cadeia alimentar, atuam como fonte de alimento e dispersam sementes e pólen, através da polinização, (DE MENEZES PEDRO, 2014). Por isso são chamadas de insetos polinizadores, e entre estes se encontra a espécie *Scaptotrigona depilis*, que conforme Camargo & Pedro (2012), é uma espécie comum em regiões neotropicais, como Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil, com

prevalência nos estados de Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo. Seus ninhos são constituídos de cera, resina e cerúmen, e são construídos em cavidades abandonadas, com uma arquitetura elaborada na entrada envolvendo uma estrutura longa e circular em forma de tubo, responsável pelo seu nome popular “canudo” (FIGUEIREDO-MECCA; BEGO; NASCIMENTO, 2013; MICHENER, 2000; NOGUEIRA-NETO, 1997) (Figura 4).



**Figura 4.** Colônia de abelhas *Scaptotrigona depilis*. (Colônias mantidas no DB-FFCLRP-USP) – arquivo pessoal.

As abelhas melíferas (*Apis mellifera*) são mais estudadas sob o ponto de vista de doenças microbianas, pois suas colônias são acometidas pelas bactérias patogênicas gram-positivas *Paenibacillus larvae* e *Melissococcus plutonius*, causadoras das doenças bacterianas cria pútrida americana (*American foulbrood disease*) e cria pútrida européia (*European foulbrood disease*), respectivamente (VANENGELSDORP; MEIXNER, 2010), que impactam negativamente a produção de mel. Já foi relatado que bactérias do gênero *Bacillus* componentes da flora intestinal de abelhas melíferas são capazes de inibir estes patógenos (EVANS; ARMSTRONG, 2006). Algumas dessas bactérias também possuem propriedades antimicrobianas contra micro-organismos provenientes do pólen e do néctar de flores que as abelhas polinizam. Esses agentes antimicrobianos podem ser ácidos orgânicos comuns, peptídeos e bacteriocinas produzidos por bactérias do ácido láctico, presente no intestino das abelhas melíferas (ARNAM et al., 2017; VÁSQUEZ et al., 2012).

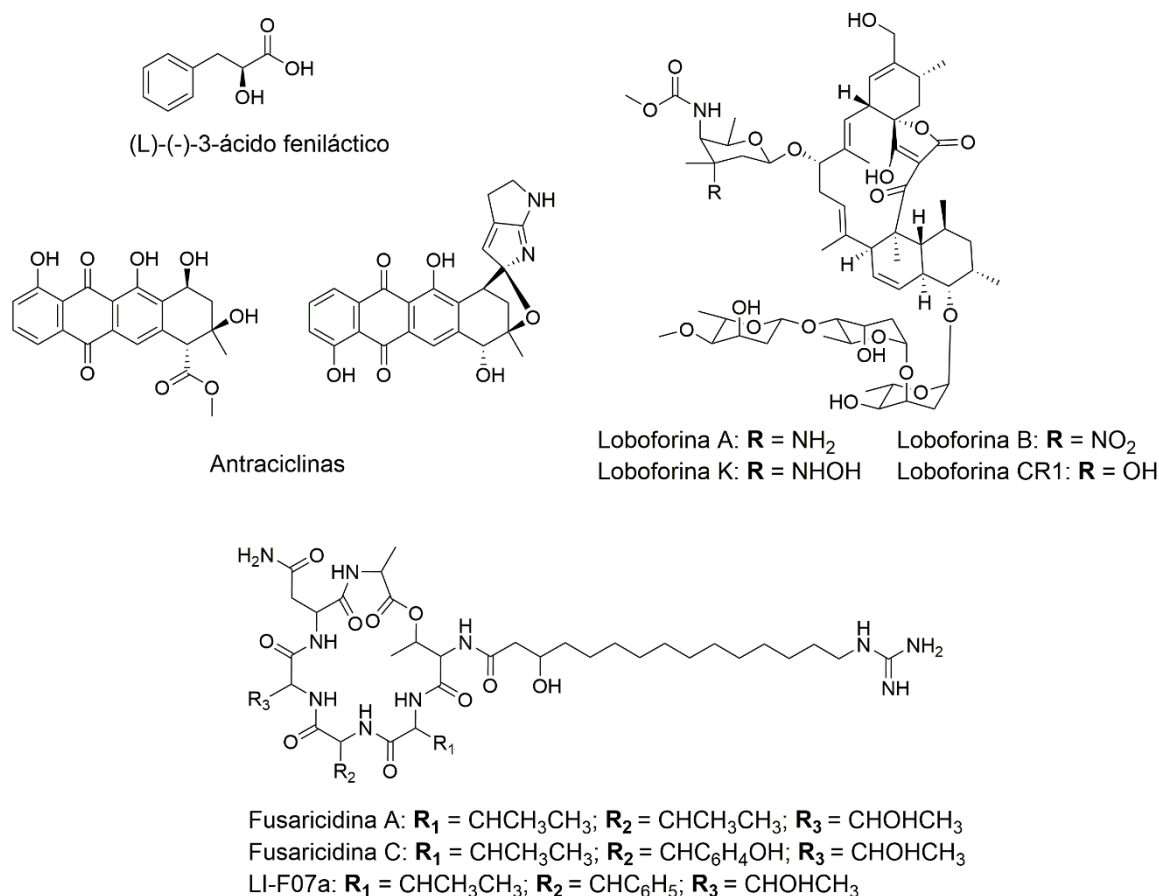
Apesar da escassez de trabalhos envolvendo a microbiota associada a abelhas sem ferrão e seu potencial para a produção de metabólitos secundários, a

literatura registra alguns dados interessantes. Em estudo envolvendo a capacidade de micro-organismos associados a abelhas dos gêneros *Apis* e *Trigona* produzirem antibacterianos contra os patógenos *P. larvae* e *M. plutonius*, responsáveis respectivamente pelas doenças cria pútrida americana e européia, três linhagens isoladas da espécie de abelha sem ferrão *Trigona laeviceps* apresentaram atividade inibitória contra *M. plutonius*, e uma linhagem isolada da espécie *Trigona fuscobalteata* registrou inibição do crescimento do patógeno *M. plutonius* e outra linhagem foi capaz de dificultar o desenvolvimento dos dois patógenos estudados (PROMNUAN; KUDO; CHANTAWANNAKUL, 2009).

O primeiro relato de associação simbiótica nutricional entre abelhas sem ferrão e micro-organismos foi descrito em 2015, envolvendo o gênero de abelha *Scaptotrigona depilis* e um fungo que cresce dentro de suas células da cria (MENEZES et al., 2015). Este fungo foi descrito como pertencente ao gênero *Zygosaccharomyces* sp., e a simbiose entre eles é fundamental para a pupação das larvas. O fungo atua como fonte de ergosterol para as larvas de *S. depilis*, hormônio precursor para a biossíntese de ecdisteróides, essencial para a metamorfose completa. Os insetos não biossintetizam esses hormônios e necessitam obter os precursores esteroidais da dieta (PALUDO et al., 2018). Além disso, a presença de outros micro-organismos no cerúmen da célula de cria dessas abelhas estabelece um ambiente de modulação do crescimento do fungo alimento, para que as larvas das abelhas se desenvolvam de maneira controlada. A levedura pertencente ao gênero *Candida* sp. é responsável pela produção de compostos voláteis, como etanol e álcool isoamílico, os quais estimulam o crescimento de *Zygosaccharomyces* sp., utilizado como fonte de alimento. Por outro lado, o fungo *Monascus ruber* produz monascina e lovastatina, metabólitos secundários que exercem efeito antagonista sobre *Candida* sp. e *Zygosaccharomyces* sp., respectivamente, controlando o desenvolvimento das larvas das abelhas de *S. depilis* (PALUDO et al., 2019).

Alguns trabalhos sugerem uma associação de proteção envolvendo abelhas sem ferrão e micro-organismos isolados de seus ninhos. Fusaricidinas e (L)-(-)-3-ácido feniláctico isolados de bactérias pertencente a espécie *Paenibacillus polymyxa*, presente no alimento larval de abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris*, apresentaram atividade antimicrobiana contra os patógenos *Beauveria bassiana* e

*Paenibacillus larvae* (MENEGATTI et al., 2018), assim como quatro compostos macrolídeos: lobofoquinas A, B, K e CR1, isolados de actinobactéria do gênero *Streptomyces* sp. associada com essa mesma espécie de abelha. Além disso, a associação de *M. scutellaris* com *Micromonospora* sp. possibilitou o isolamento de 11 compostos pertencentes a família das antraciclina (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019) (Figura 5).



**Figura 5:** Produtos naturais envolvidos na associação de actinobactérias com abelha sem ferrão *M. scutellaris*.

Os exemplos citados sugerem que as abelhas sem ferrão e seus micro-organismos simbiotes podem representar uma nova fonte para descoberta de produtos naturais bioativos. Contudo, trabalhos envolvendo as diferentes espécies de abelhas sem ferrão e sua relação ecológica e química, ainda são escassos. Por isso, é importante nos aprofundarmos cada vez mais sobre o assunto, visando obter um melhor entendimento da organização social desses insetos e principalmente a relação química com os micro-organismos envolvidos e a capacidade antimicrobiana dos mesmos, importante para manter a saúde das colônias.

## **CONCLUSÕES**

---

## 5. CONCLUSÕES

O principal foco do presente trabalho foi estudar a associação entre bactérias, especialmente actinobactérias, e a abelha sem ferrão *Scaptotrigona depilis*. Um total de 26 actinobactérias e uma bactéria foram isoladas de uma única colônia de *S. depilis*. As actinobactérias foram testadas por ensaios de antagonismo contra os patógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paenibacillus larvae*, sendo que 10 isolados apresentaram atividade antimicrobiana positiva frente a pelo menos um dos entomopatógenos. Entre essas linhagens, algumas se destacaram por apresentarem maior halo de inibição e sugeriram acentuada atividade antimicrobiana.

As linhagens selecionadas foram identificadas por sequenciamento do gene 16S rRNA e três delas foram identificadas como pertencente ao gênero *Streptomyces* sp. (ICBG 2041, 2042 e 2043), outra pertencente ao gênero *Micromonospora* sp. (ICBG 2040) e uma linhagem foi identificada como bactéria do gênero *Bacillus* sp. (ICBG 2045). Segundo relatos da literatura, esses gêneros são importantes produtores de metabólitos secundários bioativos, incluindo agentes antimicrobianos. Porém não há descrições do isolamento dessas espécies em associação à abelha sem ferrão *S. depilis*, dessa forma esse trabalho possibilitou a primeira descrição dos gêneros de bactérias associados a essa abelha, assim como seus respectivos metabólitos secundários que foram identificados com ação antimicrobiana.

Análises espectrométricas do extrato bruto de *Bacillus* sp. ICBG 2045, isolado da cutícula de abelhas cuidadoras, detectaram a presença de surfactinas, compostos antimicrobianos já previamente descritos na literatura. Estes resultados sugerem uma possível relação ecológica de proteção entre abelhas *S. depilis* e o micro-organismo *Bacillus* sp. ICBG 2045.

Como parte de um dos objetivos do trabalho e compreensão do metabolismo das actinobactérias selecionadas para estudos químicos, os extratos em acetato de etila foram purificados. Do extrato em meio de cultivo sólido de *Streptomyces* sp. ICBG 2041 foi isolado o composto bioativo antimicina A, o qual possui conhecida atividade antifúngica e é relatado na literatura como comumente isolado de actinobactérias do gênero *Streptomyces* sp. Entretanto, não há

descrições da relação desse gênero de actinobactéria com abelhas da espécie *Scaptotrigona depilis*, sendo este trabalho responsável pela hipótese de que é possível que actinobactérias do gênero *Streptomyces* sp. contribuam para a proteção de colônias de abelhas sem ferrão *S. depilis*, protegendo a prole e presumindo que exista uma estreita relação simbiótica entre estes dois organismos.

Os estudos químicos dos extratos em acetato dos meios de cultivo sólido e líquido de *Micromonospora* sp. ICBG 2040 não permitiram a identificação de nenhum dos possíveis compostos bioativos isolados. Foram realizadas três tentativas de aumento de escala, incluindo uma coluna cromatográfica Sephadex LH-20 como mudança de estratégia de isolamento, porém o rendimento da extração continuou baixo e não foi possível a identificação de metabólitos. Já existem relatos na literatura indicando a capacidade desse gênero de actinobactéria em produzir metabólitos antimicrobianos, seletivamente ao patógeno de abelhas melíferas *P. larvae*.

Apesar da identificação de compostos já conhecidos, é a primeira vez que é relatado o isolamento e identificação de surfactinas e antimicinas associados a *S. depilis*. Assim, este trabalho sugere que existe uma relação ecológica protetiva entre abelhas sem ferrão da espécie *Scaptotrigona depilis* e os micro-organismos *Micromonospora* sp. ICBG 2040, *Streptomyces* sp. ICBG 2041 e *Bacillus* sp. ICBG 2045 contra patógenos de seus ninhos.



## **REFERÊNCIAS**

---

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELINI, T. E. et al. Bacillus subtilis spreads by surfing on waves of surfactant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 43, p. 18109–18113, 2009.
- ANGOLINI, C. F. F. et al. Genome Mining of Endophytic Streptomyces wadayamensis Reveals High Antibiotic Production Capability. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 27, n. 08, p. 1465–1475, 2016.
- ARNAM, E. B. VAN et al. Chem Soc Rev Defense contracts : molecular protection in insect-microbe symbioses. 2017.
- BAKER, D. D.; ALVI, K. A. **Small-molecule natural products: New structures, new activities, Current Opinion in Biotechnology**, 2004.
- BARKA, E. A. et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–43, 2016.
- BEEMELMANNNS, C. et al. Natural products from microbes associated with insects. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 12, p. 314–327, 2016.
- BEEMELMANNNS, C. et al. Macrotermycins A-D, Glycosylated Macrolactams from a Termite-Associated Amycolatopsis sp. M39. **Organic Letters**, 2017.
- BÉRDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1–26, 2005.
- BERDY, J.; PAUNCZ, J. K. Vol. xxx no. 11. v. XXX, n. 11, 1977.
- BRADY, S. F. Construction of soil environmental DNA cosmid libraries and screening for clones that produce biologically active small molecules. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1297–1305, 2007.
- CAMBRONERO-HEINRICHS, J. C. et al. Phylogenetic analyses of antibiotic-producing Streptomyces sp. isolates obtained from the stingless-bee Tetragonisca angustula (Apidae: Meliponini). **Microbiology (United Kingdom)**, v. 165, n. 3, p. 292–301, 2019.
- CHEVRETTE, M. G. et al. The antimicrobial potential of Streptomyces from insect microbiomes. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2019.

- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. **Natural products: A continuing source of novel drug leads***Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 2013.
- CURRIE, C. R. et al. Fungus-growing ants use antibiotic producing bacteria to control garden parasites. **Nature a weekly journal of science**, v. 398, n. April, p. 701–704, 1999.
- DE MENEZES PEDRO, S. R. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348–354, 2014.
- DUNSHEE, B. R. et al. The Isolation and Properties of Antimycin A. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, n. 7, p. 2436–2437, 1949.
- EVANS, J. D.; ARMSTRONG, T.-N. Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. **BMC ecology**, v. 6, p. 4, 2006.
- FIGUEIREDO-MECCA, G.; BEGO, L. R.; NASCIMENTO, F. S. Foraging behavior of *scaptotrigona depilis* (hymenoptera, apidae, meliponini) and its relationship with temporal and abiotic factors. **Sociobiology**, v. 60, n. 3, p. 277–282, 2013.
- GOND, S. K. et al. Endophytic *Bacillus* spp . produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. v. 172, p. 79–87, 2015.
- HAEDER, S. et al. Candicidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 12, p. 4742–4746, 2009.
- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19–20, p. 894–901, 2008.
- HIRSCH, A. M.; VALDÉS, M. Micromonospora: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 536–542, 2010.
- HOCKETT, K. L.; BALTRUS, D. A. Use of the Soft-agar Overlay Technique to Screen for Bacterially Produced Inhibitory Compounds. **Journal of Visualized Experiments**, n. 119, p. 1–5, 2017.
- HOSOKAWA, T. et al. Obligate bacterial mutualists evolving from environmental bacteria in natural insect populations. **Nature Microbiology**, 2016.
- JEONG, H. et al. Draft genome sequence of the plant growth-promoting bacterium

- Bacillus siamensis* KCTC 13613T. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 15, p. 4148–4149, 2012.
- KALTENPOTH, M. Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects? **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 12, p. 529–535, 2009.
- KALTENPOTH, M.; ENGL, T. Defensive microbial symbionts in Hymenoptera. **Functional Ecology**, v. 28, n. 2, p. 315–327, 2014.
- KOLTER, R.; VAN WEZEL, G. P. Goodbye to brute force in antibiotic discovery? **Nature Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 2015–2016, 2016.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.
- LIU, J. et al. Antimycin-type depsipeptides: Discovery, biosynthesis, chemical synthesis, and bioactivities. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 10, p. 1146–1165, 2016.
- LUDWIG, W. Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 3, p. 225–236, 2007.
- MADDEN, A. A. et al. Actinomycetes with Antimicrobial Activity Isolated from Paper Wasp (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae) Nests. **Environmental Entomology**, v. 42, n. 4, p. 703–710, 2013.
- MATARRITA-CARRANZA, B. et al. Evidence for widespread associations between neotropical hymenopteran insects and Actinobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 1–17, 2017.
- MENEGATTI, C. et al. *Paenibacillus polymyxa* Associated with the Stingless Bee *Melipona scutellaris* Produces Antimicrobial Compounds against Entomopathogens. **Journal of Chemical Ecology**, v. 44, n. 12, p. 1158–1169, 2018.
- MENEZES, C. et al. A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. **Current Biology**, 2015.
- MICHENER, C. D. **The bees of the world**. [s.l: s.n.].
- MORGAN, M. C. et al. Comparison of the Biolog OmniLog Identification System and 16S ribosomal RNA gene sequencing for accuracy in identification of atypical

- bacteria of clinical origin. **Journal of Microbiological Methods**, v. 79, p. 336–343, 2009.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014**, **Journal of Natural Products**, 2016.
- NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. [s.l.: s.n.].
- OH, D. C. et al. Dentigerumycin: A bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 6, p. 391–393, 2009.
- ONDREJÍČKOVÁ, P. et al. Endophytic *Streptomyces* sp. AC35, a producer of bioactive isoflavone aglycones and antimycins. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 9, p. 1333–1344, 2016.
- PALUDO, C. et al. Microbial community modulates growth of symbiotic fungus required for stingless bee metamorphosis. p. 1–12, 2019.
- PALUDO, C. R. et al. Social Bee *Scaptotrigona depilis*. v. 4, n. 2, p. 2014–2015, 2016.
- PALUDO, C. R. et al. Stingless Bee Larvae Require Fungal Steroid to Pupate. n. January, p. 1–10, 2018.
- PARASZKIEWICZ, K.; KU, A.; CHOJNIK, J. Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains grown on the media obtained from renewable natural resources. v. 209, 2018.
- PATEL, S.; AHMED, S.; ESWARI, J. S. Therapeutic cyclic lipopeptides mining from microbes: latest strides and hurdles. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 1177–1193, 2015.
- PROMNUAN, Y. et al. *Streptomyces* *chiangmaiensis* sp. nov. and *Streptomyces* *lannensis* sp. nov., isolated from the South-East Asian stingless bee (*Tetragonilla collina*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART 5, p. 1896–1901, 2013.
- PROMNUAN, Y.; KUDO, T.; CHANTAWANNAKUL, P. Actinomycetes isolated from beehives in Thailand. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 1685–1689, 2009.
- PUPO, M. T.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Microbial Symbionts of Insects are the

Focus of the First International Cooperative Biodiversity Group (ICBG) in Brazil. v. 28, n. 3, p. 393–401, 2017.

QIU, D.; RUAN, J.; HUANG, Y. Selective isolation and rapid identification of members of the genus *Micromonospora*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5593–5597, 2008.

REN, J. et al. *Micromonospora wenchangensis* sp. nov., isolated from mangrove soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART7, p. 2389–2395, 2013.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, D. et al. Actinobacteria associated with stingless bees biosynthesize bioactive polyketides against bacterial pathogens. **New Journal of Chemistry**, v. 43, n. 25, p. 10109–10117, 2019.

SARMIENTO-VIZCAÍNO, A. et al. Pharmacological Potential of Phylogenetically Diverse Actinobacteria Isolated from Deep-Sea Coral Ecosystems of the Submarine Avilés Canyon in the Cantabrian Sea. **Microbial Ecology**, v. 73, n. 2, p. 338–352, 2017.

SCHOENIAN, I. et al. Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 5, p. 1955–1960, 2011.

SHARMA, A. D. .; SINGH, J. A nonenzymatic method to isolate genomic DNA from bacteria and actinomycete. **Analytical Biochemistry**, v. 337, n. 2, p. 354–356, 2007.

SINGH, B. K.; MACDONALD, C. A. **Drug discovery from uncultivable microorganisms** *Drug Discovery Today*, 2010.

SUMPAVAPOL, P. et al. *Bacillus siamensis* sp. nov., isolated from salted crab (poo-khem) in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 2364–2370, 2010.

THOMAS A. HALL. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series.**, n. 1979–2000, p. 95–98, 1999.

VAN ARNAM, E. B. et al. Selvamycin, an atypical antifungal polyene from two alternative genomic contexts. **Proceedings of the National Academy of**

**Sciences**, v. 113, n. 46, p. 12940–12945, 2016.

VANENGELSDORP, D.; MEIXNER, M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, n. SUPPL. 1, p. 80–95, 2010.

VANNER, S. A. et al. Chemical and biosynthetic evolution of the antimycin-type depsipeptides. **Molecular BioSystems**, v. 9, n. 11, p. 2712–2719, 2013.

VÁSQUEZ, A. et al. Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

VIT, P.; ROUBIK, D. W.; PEDRO, S. R. M. **Pot-Honey: A legacy of stingless bees**. [s.l: s.n.].

YANG, L. et al. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* strain YB-05 and its antifungal substances showing antagonism against *Gaeumannomyces graminis* var . *tritici*. v. 85, p. 52–58, 2015.

YOON, S. H. et al. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 1613–1617, 2017.

ZHANG, Z. et al. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, n. 1–2, p. 203–214, 2000.