



UEPB

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

MÁRIO HERCULANO DE OLIVEIRA

**EFEITO DO ÁCIDO ÚSNICO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE SIMBIONTES
BACTERIANOS DE *Constrictotermes cyphergaster* (TERMITIDAE,
NASUTITERMITINAE)**

**CAMPINA GRANDE
2016**

MÁRIO HERCULANO DE OLIVEIRA

**EFEITO DO ÁCIDO ÚSNICO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE SIMBIONTES
BACTERIANOS DE *Constrictotermes cyphergaster* (TERMITIDAE,
NASUTITERMITINAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências biológicas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Avany Bezerra Gusmão.

**CAMPINA GRANDE
2016**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

O48e Oliveira, Mário Herculano de.
Efeito do ácido úsnico sobre o desenvolvimento de simbiontes bacterianos de *Constrictotermes cyphergaster* (Termitidae, Nasutitermitinae) [manuscrito] / Mário Herculano de Oliveira. - 2016.
37 p. : il. color.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.
"Orientação: Profa. Dra. Maria Avany Bezerra Gusmão, Departamento de Ciências Biológicas".

1. Térmitas. 2. Fenol liquênico. 3. Controle bacteriano. 4. *Constrictotermes cyphergaster*. 5. Ácido úsnico. I. Título.

21. ed. CDD 595.736

MÁRIO HERCULANO DE OLIVEIRA

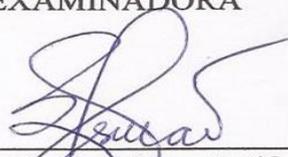
**EFEITO DO ÁCIDO ÚSNICO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE SIMBIONTES
BACTERIANOS DE *Constrictotermes cyphergaster* (TERMITIDAE,
NASUTITERMITINAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Estadual da
Paraíba, como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Ciências biológicas.

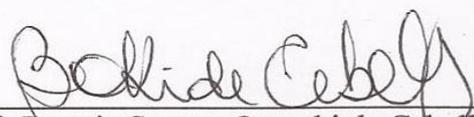
Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Avany Bezerra
Gusmão.

Aprovada em: 30/06/2016.

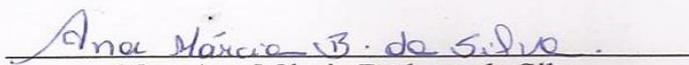
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Maria Avany Bezerra Gusmão (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof^a. Dr^a. Beatriz Susana Ovruski de Ceballos
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Msc. Ana Márcia Barbosa da Silva
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Ao meu Deus, que nunca me abandonou e me fez forte, para que eu pudesse enfrentar todas as adversidades que tive pela frente, Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo suporte dado, por não ter me abandonado em nenhum momento e por ter tornado esse momento de minha vida possível.

Ao meu pai José Orlando, a minha mãe, Luciana Herculano, aos meus avós, pela compreensão em meus momentos de estresse e de ausência nos momentos de descontração e também quando vocês precisaram de mim.

Ao meu avô José Santiago Sobreira (*in memoriam*), embora fisicamente ausente, sei o quanto o senhor ficaria feliz ao saber que consegui essa conquista em minha vida e me presentearia com sua risada inconfundível, que tanto me alegrava.

À minha orientadora, Professora Maria Avany, por cada puxão de orelha, por ser paciente comigo e minha cabeça dura, por me mostrar que sempre podemos evoluir, mesmo que em momentos ruins, pela força de vontade e pela dedicação durante todo o processo de realização desse trabalho.

Aos meus colegas de equipe Igor Eloi e Claudilene, pela disponibilidade e auxílio nos períodos de coleta; a todo o pessoal do Laboratório de Ecologia de Térmitas, que mesmo que indiretamente me auxiliaram de alguma forma. À Ana Márcia, pelo auxílio e ajustes no trabalho; a Arleu, pelo auxílio nas análises estatísticas de dados e, especialmente a Rebeca (Bira) e Hayanne, pelos momentos de amizade e mesmo na “arenga” e nos momentos mais difíceis não abandonarem tudo. Sem vocês duas nada disso teria sido possível! Essa é uma conquista nossa! Agradeço de coração.

Aos meus colegas de curso, em especial a Nathália, Wellerson, Duval e Sinthia, por todo o companheirismo e amizade em todo o decorrer do curso.

Aos meus eternos amigos e companheiros de “zoeira”, Tályson, Felipe, Josoaldo e Carlos Alberto, por me proporcionarem os momentos de descontração que foram mais que necessários para que eu me tranquilizasse até mesmo nas horas mais difíceis.

À Universidade Estadual da Paraíba e ao CNPq, pelo apoio e incentivo à realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Pernambuco, por meio da professora Dra. Eugênia C. Pereira e da Msc. Andrezza Karla de Oliveira Silva; à Universidade Federal Rural de Pernambuco, por meio do prof. Dr. Reinaldo Aparecido Mota e de Atzel Candido Acosta Abad, à EMBRAPA algodão, por meio da profa. Liziane Maria de Lima, e da técnica Fábria

Suely Lima Pinto e do Msc. Vandr  Guevara; ao Instituto Federal da Bahia, por meio do prof. Msc. Ricardo Augusto Nink; ao Campus II da Universidade Estadual da Paraíba, por meio da professora  lida Barbosa Correa, pela forma o das parcerias que foram tão importantes para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores do Curso de Gradua o em Ciências Biológicas da UEPB, que contribuíram de alguma forma para que eu evoluísse e me tornasse apto a essa conquista.

Aos técnicos Tricya e Yuri, da UEPB/Campus II, e Augusto, UEPB/Campus I, pela presteza e atendimento quando nos foi necessário e pela disponibilidade em momentos em que vocês nem tinham obriga o de auxiliar nesse trabalho, mas se fizeram presentes.

E a todas as pessoas que de alguma forma auxiliaram na realiza o do projeto!
Minha total gratidão a todos vocês.

RESUMO

A dieta dos cupins é constituída por uma vasta gama de recursos, como madeira seca, plantas herbáceas, serapilheira, fungos e líquens, e para completar sua digestão, esses insetos dependem da manutenção de associações com microrganismos para obterem sucesso na quebra da celulose e de seus derivados. Os líquens produzem substâncias com propriedades antimicrobianas comprovadas, a exemplo do ácido úsnico que tem influência no controle bacteriano, principalmente bactérias Gram-positivas. O presente trabalho analisou a influência do ácido úsnico sobre os simbioses bacterianos associados ao tubo digestório de *Constrictotermes cyphergaster*. Registrou-se a presença de sete espécies de bactérias associadas ao tubo digestivo de *C. cyphergaster* identificadas pelos primers 27F e 1389R para o gene rRNA 16S. O ácido úsnico mostrou ter efeito nas concentrações 0.05 e 0.1 mg/ml sobre o desenvolvimento de oito morfotipos bacterianos associados ao trato digestivo. Indivíduos dos gêneros *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Methylobacterium* foram identificados como possuidores de representantes potencialmente patogênicos. Os resultados mostram variação da composição de morfotipos bacterianos entre os segmentos do trato digestório, bem como entre as castas estudadas. Essa variação pode ser explicada pelas diferentes condições físico-químicas presentes nos segmentos estudados. O controle do desenvolvimento bacteriano pode não refletir a real concentração de ácido úsnico presente no trato digestivo dos cupins em ambientes naturais, o que resulta na hipótese de que essa substância possa ter relação sinérgica com outros compostos secundários, de forma a otimizar o controle das populações microbianas. Estudos futuros poderão responder como o consumo de líquens pode interferir na composição e densidade de microrganismos presentes no trato digestivo de *C. cyphergaster*, bem como as substâncias líquênicas podem ser utilizadas por este cupim no decorrer de todo o seu processo digestivo.

Palavras-Chave: Térmitas, fenol líquênico, controle bacteriano, patogenicidade.

ABSTRACT

The termite diet consists by a wide range of features such as dry wood, herbaceous plants, burlap, fungi and lichens, and to complete their digestion, these insects depend on maintaining associations with microorganisms to succeed in breaking down cellulose and its derivatives. Lichens produce substances with microbial property proven, such as the usnic acid that has an influence on bacterial control, mainly Gram-positive bacteria. This study examined the influence of usnic acid on bacterial symbionts associated with the digestive tract of *Constrictotermes cyphergaster*. It was registered the presence of seven bacterial species associated with the gut of *C. cyphergaster* identified by 27F and 1389R primers for the 16S rRNA gene. The usnic acid has been shown to have an effect at the highest concentrations (0.05 and 0.1 mg / ml) on the development of eight bacterial morphotypes associated with the digestive tract. Individuals of *Staphylococcus*, *Bacillus* and *Methylobacterium* genera were identified as having potentially pathogenic representatives. The results show variation in the composition of bacterial morphotypes between the segments of the digestive tract, as well as among the studied castes. This variation can be explained by different physicochemical conditions present in the segments studied. Control of bacterial growth may not reflect the actual concentration of usnic acid present in the digestive tract of termites in natural environments, which results in the assumption that the substance may have synergistic relationship with other secondary compounds, in order to optimize the control of microbial populations. Future studies will respond as lichens consumption can influence the composition and density of microorganisms presente in the digestive tract of *C. cyphergaster* as well as the lichenic substances can be used by this termite over its entire digestive process.

Keywords: Termites, lichenic phenol, bacterial control, pathogenicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Oscilações de potencial redox (Eh (mV)), potencial de hidrogênio (pH) e pressões de oxigênio e hidrogênio (P (kPa)) em cupins inferiores (Lowertermites) e cupins superiores (Higher termites). C (papo), M (intestino médio), ms (segmento misto), P1-P5 (segmentos proctodeais) 17
- Figura 2 – Resultado de PCR, 100pb, para os morfotipos bacterianos 1 a 17, isolados do sistema digestório de *Constrictotermes cyphergaster* em região semiárida, NE do Brasil 25
- Figura 3 – Resultado de PCR, 100pb, para os morfotipos bacterianos 18 a 30, isolados do sistema digestório de *Constrictotermes cyphergaster* em região semiárida, NE do Brasil..... 25
- Figura 4 – Relação do efeito das concentrações de ácido úsnico no desenvolvimento de morfotipos bacterianos simbiotes do tubo digestório de *Constrictotermes cyphergaster* em função do intervalo de tempo em região semiárida, NE do Brasil..... 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Abundância colonial dos morfotipos bacterianos registrados no tubo digestivo de <i>Constrictotermes cyphergaster</i> em região semiárida, NE do Brasil.....	24
Tabela 2 - Morfotipos bacterianos do tubo digestivo de <i>Constrictotermes cyphergaster</i> e respectivas espécies de bactérias, identificadas através de sequenciamento.....	25
Tabela 3 - Concentrações inibitórias mínimas (MIC) do ácido úsnico sobre o desenvolvimento de morfotipos bacterianos simbiotes do sistema digestório de <i>Constrictotermes cyphergaster</i> em região semiárida, NE do Brasil.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pb	Pares de bases
NCBI	National Center for Biotechnology Information
µl	Microlitros
ml	mililitros
mg/ml	miligramas por mililitro
Min	Minutos
Ng	Nanogramas
S	Segundos
DMSO	Dimetilsulfóxido
B	Brando
C-	Controle negativo
C+	Controle positivo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca Registrada
°C	Graus Celsius
H ₂	Hidrogênio
CO ₂	Gás Carbônico

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	13
2.0	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	<i>Cupins: sua distribuição e importância ecológica</i>	15
2.2	<i>Associação cupins e microrganismos</i>	15
2.3	<i>Constrictotermes cyphergaster</i>	17
2.4	<i>Líquens e ácidos liquênicos</i>	18
3.0	PERGUNTA E HIPÓTESES	19
3.1	<i>Pergunta</i>	19
3.2	<i>Hipóteses</i>	19
4.0	OBJETIVOS	20
4.1	<i>Geral</i>	20
4.2	<i>Específicos</i>	20
5.0	METODOLOGIA	21
5.1	<i>Caracterização da área de estudo</i>	21
5.2	<i>Procedimentos de coleta, isolamento e cultura de bactérias</i>	21
5.3	<i>Identificação, extração de DNA, amplificação e sequenciamento</i>	22
5.4	<i>Testes com ácidos liquênicos</i>	23
5.5	<i>Análise de dados</i>	23
6.0	RESULTADOS	24
7.0	DISCUSSÃO	28
8.0	CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
9.0	REFERÊNCIAS	31

1.0 - INTRODUÇÃO

Os cupins desempenham um grande papel no ecossistema terrestre através da reciclagem de biomassa celulósica, a qual é a uma mistura de celulose, hemicelulose e lignina (UPADHYAYA et al., 2012). Contudo, essa habilidade dos cupins depende largamente da microbiota presente em seu trato digestivo (OHKUMA, 2008), dividindo-os em cupins superiores e inferiores (TOKUDA et al., 2001). Aqueles chamados de inferiores dependem de sua associação com protozoários flagelados, enquanto os superiores têm associação com bactérias e fungos (RADEK, 1999). A única fonte de celulase dos cupins superiores é a secreção da mesma no intestino médio feita pelos próprios cupins (TOKUDA; WATANABE, 2007).

As associações simbióticas entre cupins e microrganismos compreendem diferentes níveis quanto a sua interação, variando desde a cultura extracorpórea de jardins de fungos, até as mais íntimas associações, com bactérias residindo intracelularmente em definidos bacteriosítios. Entretanto, a maioria dos procariotos simbiontes dos cupins estão localizados em seu trato digestivo, onde são livre-natantes, ligados com o epitélio intestinal, ou associados com protozoários intestinais (BRUNE, 2006). Não obstante, apesar dos muitos estudos sobre a relação de simbiose entre insetos e microrganismos, as informações sobre o papel funcional dessa microbiota intestinal ainda deixam muitos questionamentos, o que explica a grande dificuldade em enumerar os benefícios dessa relação (HONGO, 2011; PERUCHI, 2013).

Fazem parte da dieta dos cupins madeira, gramíneas, plantas herbáceas, serrapilheira, fungos, ninhos construídos por outras espécies de cupins, excrementos e carcaças de animais e líquens, além de material orgânico presente no solo (LEE; WOOD, 1971; LA FAGE; NUTTING, 1978; NOIROT, 1992; SLEAFORD et al., 1996; MIURA; MATSUMOTO, 1997; RESENDE, 2012). Cupins do gênero *Hospitalitermes* tem maior parte de sua dieta composta de líquens, sendo principalmente relacionada a espécies epífitas (LEE; WOOD, 1971; JONES; GATHORNE-HARDY, 1995; MIURA; MATSUMOTO, 1997, 1998; MORAN et al., 2001). Em ambiente de caatinga, 29 espécies de líquens crostosos, distribuídas em 14 famílias e 17 gêneros, foram associadas à alimentação de *Constrictotermes cyphergaster*, cupim também abundante no cerrado brasileiro (MATHEWS, 1997; BARBOSA-SILVA, 2014).

Os líquens são organismos simbióticos compostos por um ou mais fungos (microbionte) e uma ou mais algas (fotobionte) ou cianobactérias (HONDA; VIEGAS, 1998). Esses organismos produzem substâncias com propriedades antibióticas que podem variar qualiquantitativamente em uma mesma espécie, dependendo das condições ambientais

(RIBEIRO et al., 2005). São conhecidos cerca de 630 compostos secundários produzidos por líquens, representados pelos ácidos alifáticos, meta e para-depsídeos, depsidonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenos e derivados do ácido pulvínico (HONDA; VILEGAS, 1998). A atranorina, que demonstra excelente atividade anti-inflamatória (MAIA et. al., 2002) e o ácido úsnico, que destaca-se por sua atividade antimicrobiana ser demonstrada sobre vários microrganismos, principalmente bactérias Gram-positivas (DUARTE, 2002).

O presente trabalho visou testar a influência do ácido úsnico sobre o desenvolvimento de bactérias simbiontes de *Constrictotermes cyphergaster* visando compreender a funcionalidade do consumo de líquens praticado por esses cupins.

2.0 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - *Cupins: distribuição e importância ecológica*

De acordo com Krishna et al. (2013), os cupins compõem a ordem Isoptera, a qual é composta por cerca de 3.105 espécies, entre vivas e fósseis. Contudo, a relação filogenética entre cupins, baratas e mantódeos foi objeto de disputas durante muitos anos. Recentemente, o táxon Dictyoptera foi aceito como grupo natural ou holofilético, apoiado por diversas sinapomorfias morfológicas existentes entre os cupins (Isoptera), o grupo dos louva-a-deus (Mantodea) e as baratas (Blattaria) (WARE et al. 2008; RONDÓN, 2015).

Os cupins fazem parte de um grupo de insetos com comportamento estruturalmente social, organizado pela divisão de castas, as quais diferenciam-se morfológica e funcionalmente em suas atividades na colônia (THORNE, 1996; LIMA-RIBEIRO et al., 2006). Essas castas podem ser polimórficas, com vários subgrupos de indivíduos morfológica e funcionalmente diferentes (ROISIN; PASTEELS, 1985; MIURA; MATSUMOTO, 1995; CONSTANTINO, 2000).

A maioria das espécies de cupins vive nas regiões tropicais e subtropicais, com um aumento gradativo em sua riqueza de gêneros, variando das altas às baixas altitudes (EDWARD; MILL, 1986; EGGLETON et al., 1994). Esses insetos possuem um papel ecológico fundamental para a manutenção do equilíbrio da região a qual habitam, já que desempenham a função de consumidores primários, e também funcionando como decompositores, melhorando a aeração do solo e sua capacidade de drenagem (RADEK, 1999; GUO et al., 2014). Ao ajudar na transformação da matéria fresca para húmus, os cupins podem afetar toda a dinâmica do carbono presente no solo, tanto diretamente, por digestão de celulose, quanto indiretamente, por fazer quebras de matéria morta fresca (DESOUZA; CANCELLO, 2010).

Contudo, para a digestão da celulose, os cupins possuem uma larga dependência de associações com microrganismos em seu trato digestivo, especialmente para a digestão da lignocelulose e outras moléculas que requerem intensa ação enzimática (OHKUMA; BRUNE, 2010).

2.2 - *Associação cupins e microrganismos*

Assim como grande parte dos insetos, os cupins possuem associação com bactérias em sua cutícula, as quais podem agir como oportunistas e se tornarem patógenos, ocasionando

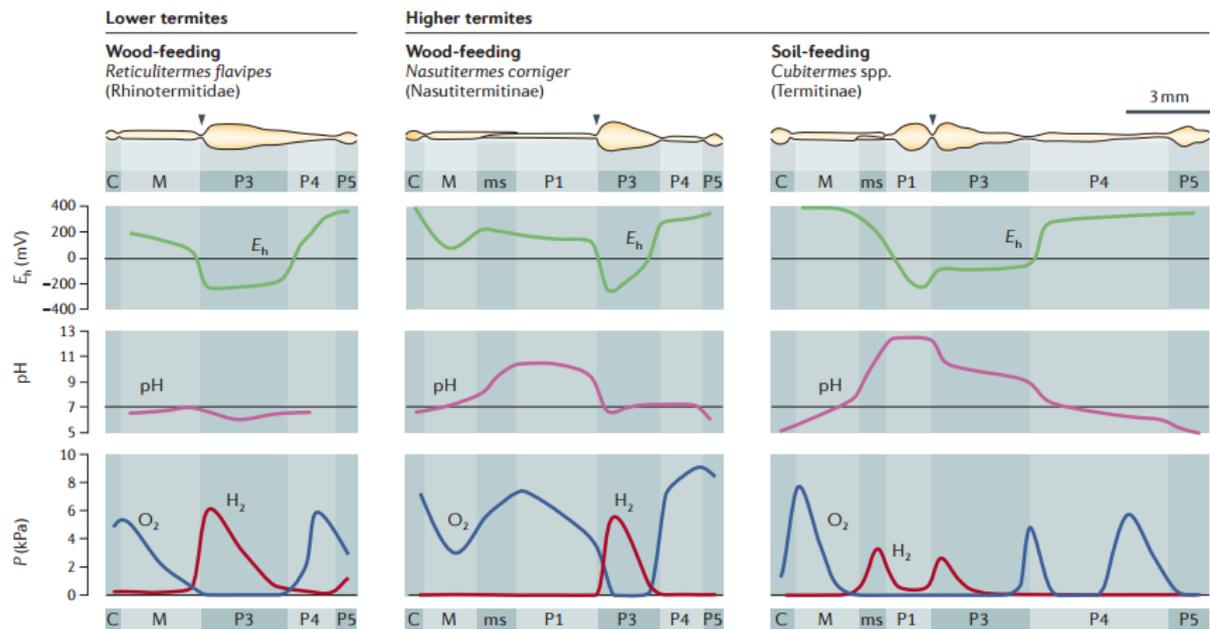
lesões (SILVA, 2002). Ainda em relação a associações externas, cupins da subfamília Macrotermitidae cultivam fungos do gênero *Termitomyces* nos chamados jardins de fungos em seus ninhos, cuja interação representa grande expressividade relativa ao valor nutricional desses fungos e a degradação da celulose feita pelos mesmos (COLLINS, 1980; LIMA; COSTA-LEONARDO, 2007).

Sobre as interações internas, os micro-organismos presentes no trato digestivo dos cupins fazem parte de três domínios de seres vivos e estão presentes tanto em formas aeróbicas, quanto anaeróbicas facultativas (BRAUMAN et al., 2001). Esses agentes podem atuar como simbioses ou como antagonistas para micro-organismos parasitas (CURRIE; STUART, 2001; CURRIE, 2004; NOBRE et al., 2011; MATHEW et al., 2011). É importante frisar que a caracterização taxonômica da microbiota presente no trato digestivo dos cupins ainda continua sendo uma ciência em desenvolvimento (BIGNELL, 2010).

Quanto a presença do tipo de simbiote no tubo digestivo desses insetos, os cupins são classificados em superiores e inferiores. Cupins superiores possuem simbiose com bactérias e são representados apenas por uma única família, os Termitidae, cuja radiação evolutiva tem relação também com sua dieta; enquanto os cupins inferiores têm simbiose com protozoários flagelados (BRAUMAN et al., 2001). A simbiose com bactérias destaca-se também pela presença de um sistema de castas bem definido, possuindo a rainha uma grande dilatação no abdome denominada fisiogastria (GULLAN; CRANSTON, 2012). É importante destacar que condições como o pH e a disponibilidade de O_2 e H_2 , além da complexidade de seu trato digestivo podem interferir na composição da microbiota associada aos cupins. Cupins superiores possuem trato digestivo mais alongado e compartimentalizado que o trato digestivo de cupins inferiores e condições físico-químicas totalmente diferenciadas (EGGLETON, 2011; BRUNE, 2014).

As bactérias associadas ao trato digestivo dos cupins superiores não só participam da degradação da celulose, como também desempenham o papel de utilizar H_2 e CO_2 para aumentar a concentração de acetato no interior do trato digestório, bem como para a metanogênese que ocorre principalmente na parte posterior do trato digestivo do cupim, devido a esses processos serem realizados em ambientes anaeróbios (UPADHYAYA et al., 2012). A diminuição de disponibilidade de O_2 acompanha a diminuição de pH e uma oscilação no potencial redox (Fig. 1). Esse processo ocorre principalmente após a válvula entérica do trato digestivo e varia entre cupins superiores e inferiores (BRUNE, 2014).

Figura 1 – Oscilações de potencial redox (E_h (mV)), potencial de hidrogênio (pH) e pressões de oxigênio e hidrogênio (P (kPa)) em cupins inferiores (Lower termites) e cupins superiores (Higher termites). C (papo), M (intestino médio), ms (segmento misto), P1-P5 (segmentos proctodeais).



Fonte: Brune (2014).

2.3 - *Constrictotermes cyphergaster*

Constrictotermes cyphergaster é um cupim neotropical, conhecido por se distribuir em ambientes do centro do Brasil, Paraguai, Bolívia e norte da Argentina (MATHEWS, 1977; CONSTANTINO, 1998). Também presente na região brasileira de caatinga, esse cupim é apontado como a principal espécie a construir ninhos conspícuos (MÉLO; BANDEIRA, 2004; VASCONCELLOS et al., 2007), é de ser considerada ecologicamente importante devido a sua abundância e a característica de abrigar inquilinos no interior de seus ninhos (ARAÚJO, 1970). As principais espécies de cupins que habitam os ninhos de *C. cyphergaster* são *Inquilinitermes microcerus* e *Inquilinitermes fur* (Termitidae: Termitinae), sendo essas inquilinos obrigatórios, onde as mesmas se distribuem em galerias separadas de seus hospedeiros (CRISTALDO et al., 2014).

Classificada na família Termitidae e subfamília Nasutitermitinae, *C. cyphergaster* ocorre em ambiente de caatinga e cerrado com destaca-se tanto pela abundância de ninhos, quanto pelo seu padrão de distribuição agregado (CUNHA et al., 2003; SENA, 2004; BEZERRA-GUSMÃO, 2008). Em suas colônias já foram registrados valores de até 118.800 indivíduos, com proporções entre operários e soldados de 1:4,5 (CUNHA; BRANDÃO, 2002).

Os operários formam trilhas expostas quando saem para o forrageio em período noturno, sendo estas protegidas pelos soldados (MOURA et al., 2006; CRISTALDO et al., 2012).

Consumidor de itens alimentares que vão de madeira seca e viva a líquens, este cupim é responsável por participar significativamente do ciclo do carbono, de forma a possuir em seus ninhos cerca de 0,5% de biomassa do carbono estocado na parte aérea de sua planta suporte e 0,25% da biomassa de carbono presente na planta, em níveis de 15 centímetros acima do solo, em regiões brasileiras de caatinga (BEZERRA-GUSMÃO et al., 2011).

2.4- *Líquens e ácidos liquênicos*

O grupo dos líquens é extremamente diverso, variando desde formas muito simples até estruturas anatômicas muito complexas (KAFFER et al., 2010). Esses micro-organismos são associações estáveis autossuficientes, resultantes da simbiose entre um fungo e cianobactérias ou uma alga unicelular, um micobionte e um ou mais fotobiontes (FIGUEIRA, 2005). Como resultado dessa simbiose, os líquens têm se espalhado em muitos habitats, desde as regiões tropicais até as polares (HONDA, 1998), isso principalmente devido a sua capacidade de adaptação às adversidades e diferentes ofertas de substratos, o que lhes proporciona uma distribuição considerada como cosmopolita (DUARTE, 2002).

A partir de sua associação, os líquens são capazes de produzir substâncias denominadas “ácidos ou fenóis liquênicos” (CULBERSON, 1970; NASH III, 1996; BARBOSA, 2014), conhecidos como metabólitos secundários de comprovada atividade biológica (NASCIMENTO et al., 1994). O ácido úsnico é o composto liquênico mais extensivamente estudado, desde que foi isolado pela primeira vez em 1843 (BUSTINZA, 1951; LIMA, 2004). Nomeado como dibenzofurano de baixo peso molecular (2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9 b-dimetil-1,3 (2H,9bH)-dibenzofurano) (LIRA, 2007), essa substância teve o seu potencial inibitório comprovado em bactérias do gênero *Mycobacterium* (HONDA et al., 2009), *Pneumococcus*, *Streptococcus* (FALCÃO et al., 2004) e também bactérias *Staphylococcus* spp. e *Microsporium* spp. (MOURA, 2013).

Embora pouco se conheça a respeito das enzimas que sintetizam essas substâncias, bem como os processos metabólicos existentes nessas sínteses, os ácidos liquênicos têm despertado interesse da comunidade científica, tanto para a utilidade terapêutica, quanto pelo seu potencial antibiótico (LIMA, 2004). Tendo em vista isso, é possível inferir que a compreensão da associação entre cupins e líquens é importante para a conservação de ambos os organismos.

3.0 – PERGUNTA E HIPÓTESES

3.1 – Pergunta:

O ácido úsnico pode interferir no desenvolvimento de bactérias presentes no trato digestivo de *Constrictotermes cyphergaster*?

3.2 - Hipóteses

H1 – O desenvolvimento de bactérias encontradas no trato digestivo de *Constrictotermes cyphergaster* é inibido pelo ácido úsnico

H0 – O ácido úsnico não influencia no desenvolvimento de bactérias associadas ao trato digestivo de *Constrictotermes cyphergaster*.

4.0 - OBJETIVOS

4.1 - GERAL

Analisar a influência do ácido úsnico sobre os simbioss bacterianos associados ao tubo digestório de *Constrictotermes cyphergaster*, visando auxiliar na compreensão de aspectos relativos a ecologia nutricional desse inseto.

4.2 - ESPECIFICOS

- ✓ Investigar a riqueza de bactérias endossimbióticas no tubo digestório de *C. cyphergaster*;
- ✓ Verificar a presença de bactérias patogênicas associadas ao trato digestório de *C. cyphergaster* baseando-se em revisão da literatura;
- ✓ Avaliar o efeito do ácido úsnico sobre o desenvolvimento de bactérias encontradas no tubo digestório e conteúdo alimentar de *C. cyphergaster*.

5.0 - METODOLOGIA

5.1 - Caracterização da área de estudo

As amostras de cupins foram coletadas na Estação Experimental de São João do Cariri (EESJC), com área de 381ha, localizada em uma das regiões mais secas do Brasil, vinculada ao Centro de Ciências Agrárias da UFPB; está localizada no município de São João do Cariri na área central do Estado da Paraíba. Inserida na mesorregião da Borborema e Microregião do Cariri Oriental (7°20'34"S e 36°31'50"W). A área tem altitude variando entre 400 e 600 m (ARAÚJO, 1998) e caracteriza-se como área de caatinga, possuindo vegetação predominantemente xerófito, arbustivo arbóreo aberta, com predominância de *Caesalpinia pyramidalis* Tul., *Croton blanchetianus* Mull. Arg., *Combretum leprosum* Mart., *Jatropha molíssima* (Pohl) Baill, *Aspidosperma pyriforme* Mart. e *Tacinga palmadora* (Britton e Rose) (BARBOSA et al., 2007). A taxa de precipitação anual é de 400mm, com média de temperatura de 28.5 a 35°C e umidade de 70% (ARAÚJO et al., 2005).

5.2 - Procedimentos de coleta, isolamento e cultura de bactérias

Os cupins foram coletados nos anos de 2014 e 2015, no período noturno, durante o retorno de seu forrageamento. Os insetos foram coletados com o auxílio de folhas de papel tipo A4 e colocados em sacos de plástico estéreis. O material foi encaminhado para o Campus II da Universidade Estadual da Paraíba imediatamente sua coleta.

Para isolamento da microbiota bacteriana 20 operários e 20 soldados de cupins pertencentes a dois ninhos de *C. cyphergaster*, foram esterilizados superficialmente via imersão em solução de 0,5% de hipoclorito de sódio e etanol 70% por 5 min, sendo então lavados mediante sucessivos banhos de imersão em água destilada estéril durante 5 min. Em seguida, os tubos digestivos desses térmitas foram extirpados sob esteromicroscópio e transferidos para tubos de ensaio contendo 100 µl de solução salina a 0,8% estéril.

Após a esterilização, o tubo digestivo de cada casta foi seccionado em duas partes: papo e pança. O conteúdo alimentar destes segmentos foram, macerados isoladamente com auxílio de um pistilo e utilizados para o isolamento de colônias após diluições seriadas em alíquotas de 50 µl de água destilada. As amostras foram ressuspensas em 9 ml (diluição 1:10) de água destilada estéril e homogeneizadas com agitação manual por 2 minutos. Em seguida foram

feitas diluições seriadas decimais em solução salina estéril (10^{-1} a 10^{-8}), seguido da inoculação de 0,1 ml da amostra diluída sobre o meio de cultivo ágar e semeadas com alça de Drigalski. Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada amostra (ARAÚJO, 1998) e cultivadas até o surgimento das colônias. As colônias que cresceram isoladamente foram repicadas e, em seguida, caracterizadas morfológicamente (cor, formato da colônia e tamanho). A purificação das colônias foi feita por semeadura de estrias compostas, utilizando-se o mesmo meio e condições de cultivo do isolamento, com temperatura de 35° , controlada em estufa bacteriológica (MELO et al., 2006).

5.3 - Identificação, extração de DNA, amplificação e sequenciamento

As amostras foram submetidas ao processo de coloração de Gram para certificação dos procedimentos de extração que deveriam ser adotados para as bactérias Gram negativas ou Gram positivas.

A purificação das amostras ocorreu através de sua repicagem em meio líquido e encubadas para desenvolvimento durante o período de 48 horas. Após esse período as amostras foram centrifugadas para extração do seu DNA, realizado segundo o protocolo para bactérias Gram negativas do kit de extração de DNA PureLink Genomic DNA Kits®.

O DNA bacteriano foi amplificado através de PCR, usando um termociclador PTC-200 (MJ Research), com Ex-Taq polymerase (Takara), seguindo o programa:

- 2 min de desnaturação inicial a 95°C seguido por 12 ou 18 ciclos de desnaturação (30s a 95°C);
- Anelamento (60s a 45°C , 50°C ou 55°C);
- Extensão (4 min a 72°C), com extensão final a 72°C por 10 min.
- As concentrações dos tampões e primers foram de $0.1\text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ e $1\text{ } \mu\text{M}$, respectivamente.

Após a amplificação e confirmação da PCR, feita por gel de agarose, o DNA dos isolados bacterianos foi amplificado com os primers 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1389R (ACGGGCGGTGTGTACAAG) para o gene rRNA 16S. O alinhamento das sequências 5' - 3' (Forward) e 3' - 5' (Reverse) de cada isolado, gerou uma sequência "*full length*" de todo o segmento gênico, abrangido pelo respectivo par de primers. O DNA foi encaminhado para sequenciamento na Plataforma de Sequenciamento de DNA (RPT 01B) CPqGM/Fiocruz, Salvador, BA.

5.4 - Testes com ácidos liquênicos

Os morfotipos bacterianos isolados foram submetidos a tratamentos em placas de elisa contendo meio de cultura líquido do tipo nutrient broth e ácido úsnico, em diferentes concentrações dessa substância (0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 mg/ml), sendo todas as concentrações analisadas em intervalos de tempo de 0, 12, 24, 36 e 48 horas. Os testes foram feitos em triplicatas para cada morfotipo, garantindo a confiabilidade estatística dos testes, quando comparados ao controle. O controle foi feito com apenas o meio de cultura, junto com DMSO (B), os morfotipos suspensos apenas ao meio de cultura líquido (C-) e microrganismos suspensos ao meio, junto com DMSO (C+).

5.5 - Análise de dados

A ação do ácido úsnico no desenvolvimento das bactérias foi avaliada através da análise de variância ANOVA para verificação do nível de significância referente ao controle do crescimento bacteriano pela ação do ácido úsnico. Também foi realizado teste de Tukey, para analisar os níveis de significância existentes entre as comparações dos diferentes grupos de resultados, nas diferentes concentrações do ácido úsnico.

A análise das sequências geradas no sequenciamento genético foi feita no banco de dados do NCBI, onde as amostras com maior pontuação de identidade (acima de 85%) foram selecionadas. A seguir, foi feita uma revisão de literatura para avaliar a patogenicidade das bactérias identificadas.

As análises foram feitas no Software R Development Core Team (2011).

6.0 - RESULTADOS

Considerando quantitativamente os morfotipos bacterianos do estudo (30), a maior abundância desses simbiontes ocorreu no papo de operários e pança de soldados, enquanto que a maior variedade de morfotipos foi encontrada no papo e pança de operários (Tab. 1).

Os morfotipos bacterianos assinalados de 1 a 17 apresentaram um produto de amplificação entre 1400 e 1500pb, com exceção do morfotipo Bact. 006 (Fig. 2), indicando alta concentração de amplicons. Os demais morfotipos bacterianos não apresentaram boa amplificação, apesar de todas as amostras apresentarem DNA suficiente, com exceção dos morfotipos 019 e 023, com bandas acima de 2071 pb (Fig. 3). Todos os morfotipos que mostraram efeito significativo de inibição do seu desenvolvimento pelo ácido úsnico obtiveram produto de amplificação de 1500bp (Tab. 3).

Tabela 1 - Abundância colonial dos morfotipos bacterianos registrados no tubo digestivo de *Constrictotermes cyphergaster* em região semiárida, NE do Brasil.

Morfotipos	Soldados		Operários	
	Papo	Pança	Papo	Pança
1	5	-	12	1
2	-	-	2	-
3	-	-	1	-
4	2	14	13	-
5	-	3	-	1
6	-	-	1	-
7	-	-	1	-
8	-	3	-	-
9	-	-	1	-
10	-	-	-	2
11	-	-	-	1
12	1	-	-	-
13	-	1	-	-
14	-	2	-	2
15	-	-	-	1
16	-	-	-	1
17	-	-	-	1
18	-	-	27	-
19	-	-	6	-
20	-	-	2	1
21	-	-	2	-
22	-	1	1	-
23	-	-	-	1
24	3	-	-	-
25	2	20	1	-
26	-	1	1	2
27	-	-	2	1
28	-	-	-	1
29	-	-	1	-
30	7	-	2	1

Abundância total	20	45	76	16
Riqueza total	6	8	17	13

O sequenciamento permitiu apenas obter sete sequências com tamanho superior a 1000 pb e cuja cobertura no Blast (Query-Cover) estivesse acima de 65%. Para este critério registrou-se os gêneros *Staphylococcus*, *Terrabacter*, *Bacillus* e *Methylobacterium* (Tab. 2). Não foi possível obter sequenciamento com grau de confiabilidade considerável para se afirmar a quais espécies/gêneros de bactérias as demais amostras seriam correspondentes.

Figura 2 – Resultado de PCR, 100pb, para os morfotipos bacterianos 1 a 17, isolados do sistema digestório de *Constrictotermes cyphergaster* em região semiárida, NE do Brasil.

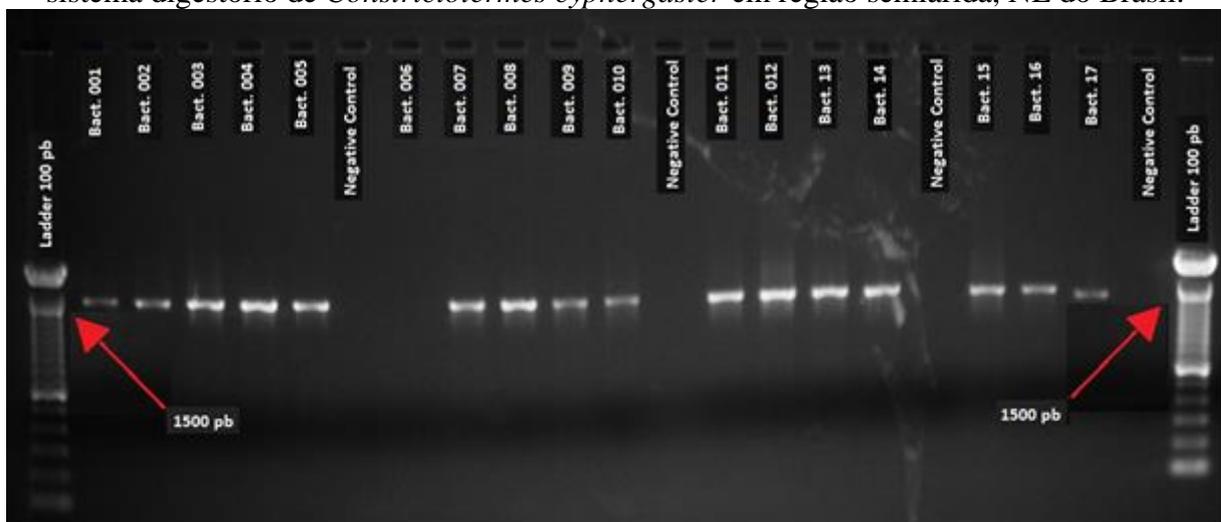


Figura 3 – Resultado de PCR, 100pb, para os morfotipos bacterianos 18 a 30, isolados do sistema digestório de *Constrictotermes cyphergaster* em região semiárida, NE do Brasil.

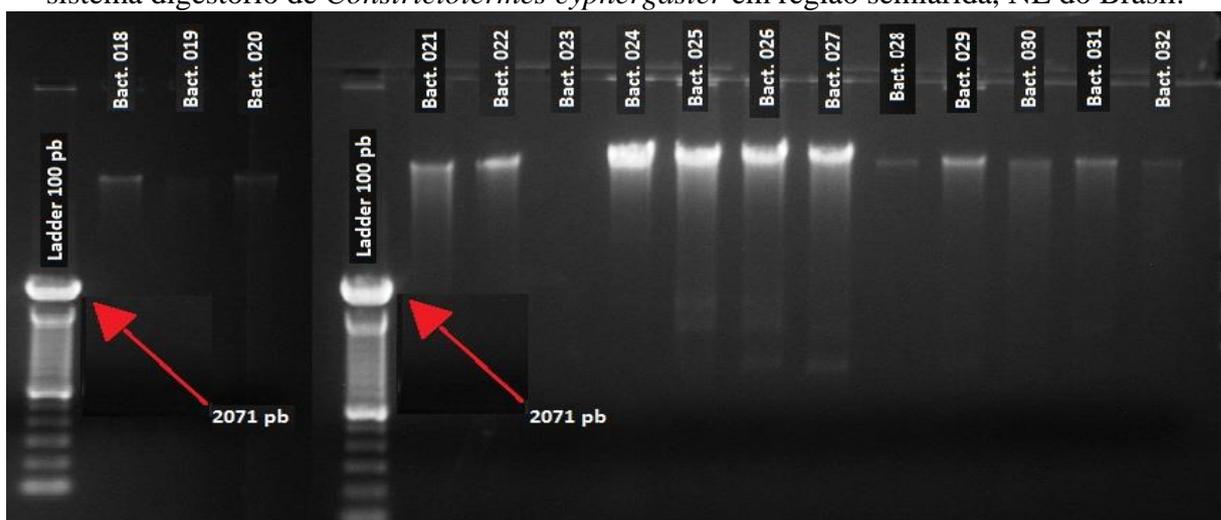


Tabela 2 - Morfotipos bacterianos do tubo digestivo de *Constrictotermes cyphergaster* e respectivas espécies de bactérias, identificadas através de sequenciamento.

Morfotipo	Descrição (NCBI)	Max. Pontuação	Pontuação Total	Query Cover	Ident.	Acesso
22	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> strain SPLN2 16S ribosomal RNA gene, sequência parcial	2270	2270	96%	99%	KT818801.1
23	<i>Terrabacter sp.</i> THG-e54 16S ribosomal RNA gene, sequência parcial	2141	2141	95%	98%	KF314196.1
24	<i>Bacillus cereus</i> strain LW30 16S ribosomal RNA gene, sequência parcial	2204	2204	94%	98%	KT803098.1
26	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> strain P 16S ribosomal RNA gene, sequência parcial	1748	1748	99%	92%	AY616142.1
3	<i>Bacillus licheniformis</i> strain V39.29f 16S ribosomal RNA gene, sequência parcial	599	1100	73%	88%	KT720302.1
27	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. bovis strain W12B_6.2 16S ribosomal RNA gene, sequência parcial	780	1076	67%	94%	KT720173.1
29	<i>Bacillus cibi</i> strain ASR-5 16S ribosomal RNA gene, sequência parcial	2006	2006	93%	95%	KP866879.1

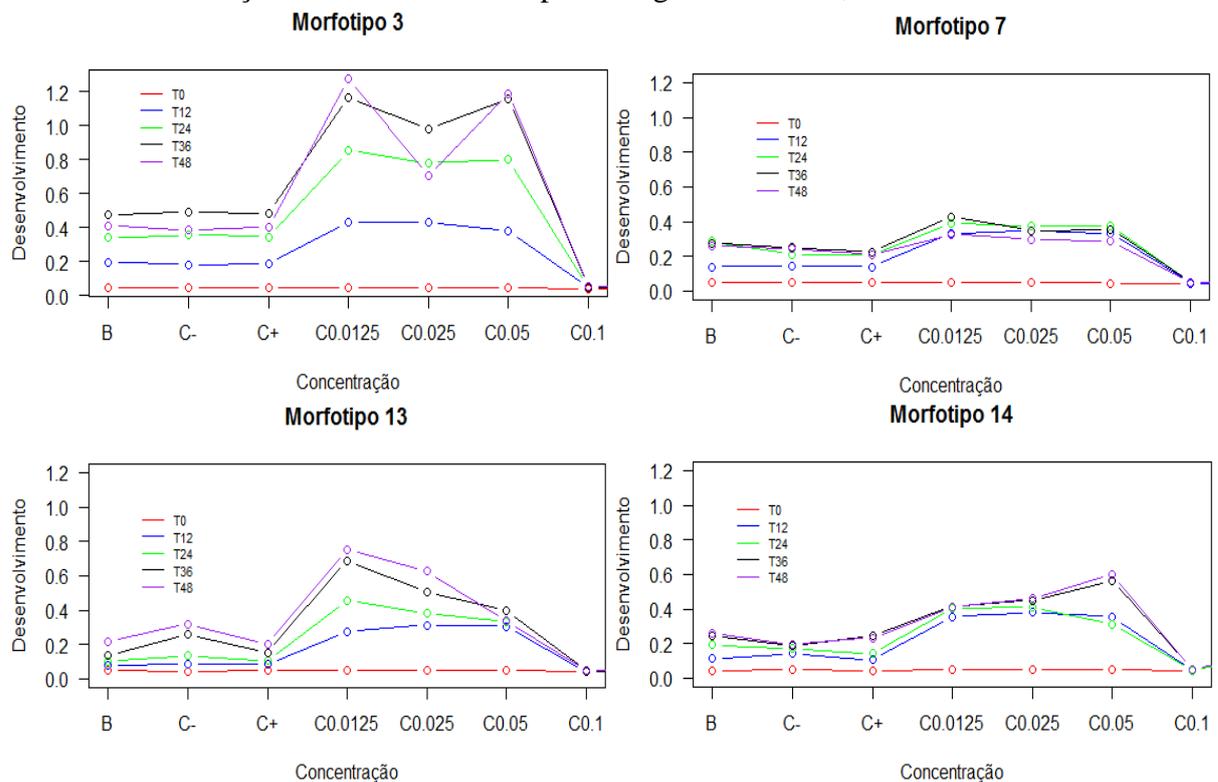
Tabela 3 – Concentrações inibitórias mínimas (MIC) do ácido úsnico sobre o desenvolvimento de morfotipos bacterianos simbiotes do sistema digestório de *Constrictotermes cyphergaster* em região semiárida, NE do Brasil.

Morfotipo	MIC (mg/ml)	Dv	P
3	0.025	0.00819	0.02114
3	0.05	0.00773	0.00137
3	0.1	0.0077	0.00852
4	0.05	0.00792	0.00315
4	0.1	0.00776	0.00063
5	0.025	0.00762	0.00224
5	0.0125	0.00796	0.00129
5	0.05	0.0076	0.00201
5	0.1	0.00758	0.00126
7	0.0125	0.00849	0.01287
7	0.025	0.00813	0.00205
7	0.05	0.00794	0.00048
7	0.1	0.0078	0.00018

8	0.025	0.00798	0.00046
8	0.1	0.00763	0.00185
11	0.0125	0.00854	0.00755
11	0.05	0.00761	0.00734
11	0.1	0.00759	0.00363
11	0.025	0.00758	0.00109
13	0.05	0.00758	0.00032
13	0.025	0.00758	0.00105
14	0.025	0.00764	0.00042
14	0.1	0.00758	0.00362

Observou-se efeito positivo do ácido úsnico na inibição do desenvolvimento de oito morfotipos bacterianos simbiotes, registrando-se o morfotipo 4 como o mais frequente entre as castas analisadas (Tab. 1). Houve variação do efeito das concentrações do extrato testado em diferentes morfotipos de bactérias (Tab. 3), verificando-se que os morfotipos 5, 7 e 11 foram inibidos significativamente em todas as concentrações testadas de ácido úsnico. Na figura 4 destacam-se os morfotipos bacterianos que foram inibidos com maior significância, ou seja, que tiveram menor desenvolvimento quando expostos ao ácido úsnico.

Figura 4 – Relação do efeito das concentrações de ácido úsnico no desenvolvimento de morfotipos bacterianos simbiotes do tubo digestório de *Constrictotermes cyphergaster* em função do intervalo de tempo em região semiárida, NE do Brasil.



7.0 - DISCUSSÃO

A variação morfológica de microrganismos que ocorreu tanto em diferentes secções do trato digestivo dos cupins, quanto entre as castas estudadas, pode ser explicada pelas diferentes condições do ambiente no qual os microrganismos se distribuíam. Sabe-se que condições físico-químicas e morfológicas do trato digestivo dos cupins interferem na composição e organização da microbiota ali presente (OHKUMA; BRUNE, 2011). Entretanto, é preciso destacar que se faz necessário maior número de amostras para se verificar maior número de variações das que foram registradas.

A inibição significativa de crescimento dos oito morfotipos bacterianos nas diferentes concentrações de ácido úsnico talvez não traduza a real concentração dessa substância no trato digestivo dos cupins no momento em que se alimentam dos líquens, tendo em vista que diversos fatores (como a disponibilidade de líquens e o tempo de forrageio) podem interferir na quantidade do ácido liquênico ingerido por cada indivíduo.

Barbosa-Silva (2014) mostrou uma concentração maior de ácido úsnico no trato digestivo dos indivíduos de *C. cyphergaster* quando comparada a encontrada nos 29 líquens consumidos por essa espécie, em diferentes períodos do ano. É possível que não apenas uma substância, em determinada concentração, atue no controle da população bacteriana presente no trato digestivo dos cupins, mas várias substâncias em sinergia. Falcão et al. (2002) atribuíram atividade antibiótica do ácido úsnico quando em associação sinérgica com o ácido salazínico, sendo esses ácidos extraídos de *Ramalina solediosa*.

O consumo dos líquens pode ter uma relação direta com as substâncias as quais os mesmos produzem, sendo essas possivelmente necessárias para o controle da população bacteriana do trato digestivo de *C. cyphergaster*. Moura (2013) verificou a atividade antimicrobiana do ácido úsnico puro e extrato liquênico de *Cladonia substellata* sob o desenvolvimento bacteriano de amostras de *Staphylococcus*, registrando atividade antimicrobiana em todos os isolados estudados com concentração inibitória mínima 0,25-0,0019mg/ml.

O efeito antibacteriano do ácido úsnico também foi registrado para isolados de várias bactérias dos gêneros *Pneumococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* (MARSHAK, 1947; MARSHAK et al., 1947; BARRY et al. 1947; BUSTINZA, 1951; XAVIER-FILHO; RIZZINI, 1976). Diante dos resultados aqui observados, hipotetiza-se que o controle de microrganismos feito pelo ácido úsnico seja importante para a manutenção da simbiose existente entre os cupins

e esses microrganismos, na medida em que a redução da população bacteriana acaba por reduzir as chances de patologias advindas desses microrganismos.

Entre as sete bactérias identificadas no sequenciamento, seis foram classificadas como organismos que podem possuir patogenicidade, Finkler (2011) aponta bactérias do gênero *Bacillus* como um dos grupos de bactérias entomopatogênicas mais conhecidos, enquanto que o gênero *Staphylococcus* não é citado como um gênero de entomopatogenicidade conhecida e necessita de uma medição de sua toxicidade, para definir um nível aceitável para aplicação no inseto susceptível. A bactéria *Bacillus cereus* caracteriza-se como um entomopatógeno, devido ao seu hábito saprofítico no solo e parasita em algumas linhagens de insetos (HABIB; ANDRADE, 1998; AZAMBUJA et al., 2009). Enquanto isso, Yoon et al. (2005) não encontraram informações sobre a entomopatogenicidade de *Bacillus cibi*, além de isolados bacterianos de *Terrabacter*, diferente do observado para *B. licheniformis*, que é encontrada ocasionalmente como patógeno de bovinos e ovinos (GOMES, 2013). Além disso, bactérias do gênero *Methylobacterium* foram descritas como causadoras de infecções associadas a humanos (RIT et al. 2015; LAI et al., 2011). Quanto a *Terrabacter*, não foram encontrados registros de patogenicidade referente às bactérias desse gênero.

8.0 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Espécies dos gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Terrabacter* e *Methylobacterium* foram identificadas e associadas à riqueza bacteriana do trato digestivo de *C. cyphergaster*.
- De acordo com registro da literatura, os isolados bacterianos encontrados associados ao trato digestivo de *C. cyphergaster* têm status patogênico;
- O ácido úsnico pode agir no controle de bactérias presentes no trato digestivo de *C. cyphergaster*.
- Os dados obtidos destacam a necessidade de estudos posteriores com maior universo amostral, de forma a possibilitar a determinação do efeito de substâncias liquênicas na riqueza bacteriana associada ao trato digestivo de *C. cyphergaster*.

9.0 - REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, K. D.; ANDRADE, A. P.; RAPOSO, R. W. C.; ROSA, P. R. O.; PAZERA JR. E. Análise das condições meteorológicas de São João do Cariri no semiárido paraibano. *Revista do Departamento de Geociências*, v.14, 2005.
- ARAÚJO, J. M. Estratégias para isolamento seletivo de actinobactérias. In: MELO, I. S. de, AZEVEDO, J. L. (Ed). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA. p. 352-367. 1998.
- ARAÚJO, R. L. Termites of the Neotropical Region. In: Krishna, K. & F. M. Weesner (eds.). *Biology of Termites*. **New York, Academic Press**, v.2, p.527-276, 1970.
- AZAMBUJA, A. Oliboni de; ALLES, G. C.; FRITZ, L. L.; RECBE, M. H. R.; FIUZA, L. M. Ecolocia de *Bacillus* Entomopatogênicos. **Biociência**, v.38, p.14-23, 2009.
- BARBOSA, H. M. da Silva. Intemperismo biogeoquímico e ciclagem de nitrogênio pela interação do líquen *Cladonia substellata* *vainio* com granito e basalto. Recife, 2014. 233p. (Tese, Doutorado em Geografia) Universidade Federal de Pernambuco. 2014.
- BARBOSA, M. R. V.; LIMA, I. B.; LIMA, J. R.; CUNHA, J. P.; AGRA, M. F.; THOMAS, W. W. Vegetação e Flora no Cariri Paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, v.11, p.313-322, 2007.
- BARBOSA-SILVA, A. M. Líquens Associados à Alimentação de *Constrictotermes cyphergaster* (SILVESTRE, 1901) (ISOPTERA, TERMITIDAE) No Semiárido Brasileiro. Campina Grande, 2014. 47 p. (Dissertação, Mestrado de Ecologia e Conservação) Universidade Estadual Da Paraíba. 2014.
- BARRY, V.C.; O'ROURKE, L. & TWOMEY, D. Antitubercular Activity of Diphenil Ether And Related Compounds. **Nature**. v.160, p.800,1947.
- BEZERRA-GUSMÃO, M. A. História natural de *Constrictotermes cyphergaster* (Silvestri, 1901) (ISOPTERA; TERMITIDAE) Em Uma Área de Caatinga do Cariri Paraibano, no Nordeste do Brasil. João Pessoa, 2008. 130p. (Tese, Doutorado em Zoologia) Universidade Federal da Paraíba. 2008.
- BEZERRA-GUSMÃO, M. A.; BARBOSA, J. R. C.; BARBOSA, M. R. de V.; BANDEIRA, A. G.; SAMPAIO, E. V. S. B. Are nests of *Constrictotermes cyphergaster* (Isoptera, Termitidae) important in the C cycle in the driest area of semiarid caatinga in northeast Brazil? **Applied Soil Ecology**, v.47, p.1-5, 2011.
- BIGNELL, David E. Morphology, Physiology, Biochemistry and Functional Design of the Termite Gut: Na Evolutionary Wonderland. In: BIGNELL, D. E.; Roisin, Yves; Lo, N. (eds.) *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Vancouver: **Springer**, 2010, v.2, p.375-412.
- BRAUMAN, Alain; DORÉ, Joel; EGGLETON, Paul; BIGNELL, David; BREZNAK, J. A.; KANE, M. D. Molecular phylogenetic profiling of prokaryotic communities in guts of termites with different feeding habitats. **FEMS Microbiology Ecology**, v.23, p.27-36, 2001.

- BRUNE, Andreas. Symbiotic Associations Between Termites and Prokaryotes. **Prokaryotes**. v.1, p. 439-474, 2006.
- BRUNE, Andreas. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. **Nature Reviews**, v.12, p.168-180, 2014.
- BUSTINZA, F. Contribuicion al estudio de las propiedades antibacterianas y antifungicas del acido usnico y algunos de sus derivados. **Annales del Instituto Botanico A.J. Cavanilles**. v.10, p.157-175, 1951.
- COLLINS, N. M. The effect of logging on termite (Isoptera) diversity and decomposition process in lowland dipterocarp forests. In: Tropical ecology and development FURTADO, J. I. (ed.). **International Society for Tropical Ecology**, Kuala Lumpur, 1980, p.113-121.
- CONSTANTINO, R. Catalog of the living termites of the new world (Insecta: Isoptera). **Arq. Zool.** v.35, p.135-231, 1998.
- CONSTANTINO, R. Key to the soldiers of South American *Heterotermes tenuis* with a new species from Brasil (Isoptera: Rhinotermitidae). **Insect Systematics & Evolution**, n.31, p.463-472, 2000.
- CRISTALDO, P. F.; DESOUZA, O.; KRASULOVÁ, J.; JIROSOVÁ, A.; KUTALOVÁ, K.; LIMA, E. R.; SOBOTNÍK, J.; SILLAN-DUSSÈS, D. Mutual Use of Trail-Following Chemical Cues by a Termite Host and Its Inquiline. **Plos One**, v.9, n.1, e85315, 2014.
- CRISTALDO, P. F.; ROSA, C. S.; FLORENCIO, D. F.; MARINS, A; DESOUZA, O. Termitarium volume as a determinant of invasion by obligatory termitophiles and inquilines in the nests of *Constrictotermes cyphergaster* (Termitidae, Nasutitermitinae). **Insectes Sociaux**, 2012.
- CULBERSON, W. L. Chemosystematics and ecology of lichen-forming fungi. **Annu. Ver. Ecol. Syst.**, v.1, p.153-170, 1970.
- CUNHA, H.; BRANDÃO, D. Multiple reproductives in nests of the Neotropical termite *Constrictotermes cyphergaster* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.46, p.21–24, 2002.
- CUNHA, H. F.; COSTA, D. A.; SILVA, K. do E. S. F. L. O.; BRANDÃO, D. Relations between *Constrictotermes cyphergaster* and Inquiline Termites in Cerrado (Isoptera: Termitidae). **Sociobiology**, v.42, n.3, p.761-770, 2003.
- CURRIE, C. R. Ants, agriculture and antibiotics. In: SECKBACH, J. (ed.). Symbiosis: Mechanisms and Model Systems Series: Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology. Berlin: **Springer-Verlag**, 2004, v.4, p.685-699.
- CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeing and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proc. R. Soc. Lond. B.** v.268, p.1033-1039, 2001.

DESOUZA, Og; CANCELLO, E. M. Termites and Ecosystem Function. p.16, 2010. Disponível em: <http://www.isoptera.ufv.br/pluginfile.php?file=/8/mod_page/content/14/ourPapersPdf/2010DeSouzaCancelloEolss.pdf>. Acesso em: 18/12/2015.

DUARTE, Brígida R. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana do ácido úsnico com sua forma nanocapsulada. Recife. 2002. 40p. (Dissertação, Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. 2002.

EGGLETON, P.; WILLIAMS, P. H.; GASTON, K. Explaining global diversity: Productivity or history?. **Biodiversity and Conservation**. v.3, p.318-330, 1994.

EGGLETON, P. An Introduction to Termites: Biology, Taxonomy and Functional Morphology. In: BIGNELL, D. E.; Roisin, Yves; Lo, N. (eds.) *Biology of Termites: A Modern Synthesis*, Vancouver: **Springer**, 2010, v.2, p.1-26.

FALCÃO, E. P. da Silva; SILVA, N. H. da; GUSMÃO, N. B. de; RIBEIRO, S. M.; PEREIRA, E. C. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) Laundron. **Acta Bot. Bras.** v.18, n.4, p.911-918, 2004.

FALCÃO, E. P. da Silva; SILVA, N. H. da; GUSMÃO, N. B. de; RIBEIRO, S. M.; HONDA, N. K.; PEREIRA, E. C. Atividade Antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 1, p. 43-49, 2002.

FIGUEIRA, R. Introdução a biologia dos líquens. 2005. Disponível em: <http://biomonitor.ist.utl.pt/biomonitor/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=7> Acesso em: 21/12/2015.

FINKLER, C. L. L. Controle de insetos: Uma breve revisão. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**. vols. 8 e 9, p.169-189, 2011.

GOMES, M. J. P. Gênero *Bacillus spp.* **Temas de Bacteriologia Veterinária**, p.49, 2013. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Bacillus%204-2013-1%20vers%C3%A3o%202013.pdf>. Acesso em: 12/01/2016.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. Sociedades de insetos. In: GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. (Eds.) *Os Insetos: um resumo de entomologia*. Brasil: **Roca**, 2012, v.4, p.267-292.

GUO, C.; SUN, L.; KONG, Di; SUN, M.; ZHAO, Kai. *Klebsiella variicola*, a nitrogen fixing activity endophytic bacterium isolated from the gut of *Odontotermes formosanus*. **African Journal of Microbiology Research**, v.12, n.8, p.1322-1330, 2014.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias Entomopatogênicas. In: *Controle Microbiano de Insetos*. São Paulo: **FEALQ**, 1998, p. 383-446.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química de líquens. **Química Nova**, v.22, n. 1, p. 25-55, 1998.

HONGO, Y. Toward the the functional analysis of uncultivable, symbiotic microorganisms in the termite gut. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, n.68, p.1311-1325, 2011.

JONES, D.T; GATHORNE-HARDY, F. Foraging activity of the processional termite *Hospitalitermes hospitalis* (Termitidae: Nasutitermitinae) in the rain forest of Brunei, north-west Borneo. **Insectes Sociaux**, n.42, p.359-369, 1995.

KAFFER, M. L.; CÁRCERES, M. E. da Silva; VARGAS, V. M. F.; MARTINS, S. M. de Azevedo. Novas ocorrências de líquens corticícolas crostosos para a região sul do Brasil. **Acta. Bot. Bras.**, v.24, n.4, p.948-951, 2010.

KRISHNA, Kumar; GRIMALDI, David A.; KRISHNA, Valerie; ENGEL, Michael S. Treatise on the Isoptera of the world. Bulletin of the American Museum of Natural History, Lawrence, Kansas, v. 1, p. 377, 2013.

LAI, Chih-Cheng; Cheng, A.; LUI, Wei-Lun; TAN, Che-Kim; HUANG, Yu-Tsung; CHUNG, Kuei-Pin; LEE, Meng-Rui; HSUEH, Po-Ren. Infections Caused by Unusual *Methylobacterium* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, n.9, 3329-3331, 2011.

LA FAGE, J. P.; NUTTING, W. L. Nutrient dynamics of termites. Production ecology of ants and termites, p. 165-232, Cambridge. Edited by M. V. Brian.

LEE, K. E.; WOOD, T. G. Termites and soils. London: **Academic Press of London**, 1971.

LIMA, J. T.; COSTA-LEONARDO, A. M. Recursos alimentares explorados pelos cupins (Insecta: Isoptera). **Biota Neotropica**, v.7, p. 243-250, 2007.

LIMA, M. J.G. Produção de Ácido Úsnico de *Cladonia substellata* Vainio (Líquén) Por Imobilização Celular, Utilizando Diferentes Métodos. Recife, 2004. 63p. (Dissertação, Mestrado em Bioquímica) Universidade Federal de Pernambuco. 2004.

LIMA-RIBEIRO, M. de S.; PINTO, M. P.; COSTA, S. S.; NABOUT, J. C.; RANGEL, T. F. L. V. B.; MELO, T. L. de; MOURA, I. O. de. Associação de *Constrictotermes cyphergaster* Silvestri (Isoptera: Termitidae) com Espécies Arbóreas do Cerrado Brasileiro. **Neotropical Entomology**. v.35, n.1, p.049-055, 2006.

LIRA, M. C. de Britto. Complexo de inclusão Ácido Úsnico β - ciclodextrina: preparação, caracterização e nanoencapsulação em lipossomas. Recife, 2007. 89p. (Dissertação, Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco. 2007.

MAIA, M. B. S.; SILVA, N. H.; SILVA, E. F.; CATANHO, M. T. J.; SCHULER, A. R. P.; PEREIRA, E.C. G. Antinociceptive activity of crude extracts and atranorin obtained from the lichen *Cladonia dendroides* (des Abb.) Ahti. **Acta Farm. Bonaerense**, Argentina, v. 21, n. 4, p.259-264, 2002.

MARSHAK, A. A Crystalline Antibacterial Substance From The Lichen *Ramalina reticulata*. **Public Health Reports**. v.62, p.3-19, 1947.

MARSHAK, A.; BARRY, G.T.; GRAIG, L.G. Antibiotic Compound Isolated From The Lichen *Ramalina reticulata*. **Science**. v.106, p.394-395, 1947.

MATHEW, G. M.; JU, Yu-Ming; LAI, Chi-Yung; MATHEW, D. C.; HUANG, C. C. Microbial community analysis in the termite gut and fungus comb of *Odontotermes*

formosanus: the implication of *Bacillus* as mutualists. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v.79, n.2, p.504-517, 2011.

MATHEWS, A.G.A. Studies on termites from the Mato Grosso State, Brazil. Rio de Janeiro, **Academia Brasileira de Ciências**, p.267, 1977.

MÉLO, A.C.S.; BANDEIRA, A.G. A qualitative and quantitative survey of termites (Isoptera) in an open shrubby caatinga in northeast Brazil. **Sociobiology**, v.44, p.707-716, 2004.

MELO, F. M. Pereira; MELO, I. S.; TEODORO, M. G.; SCRAMIN, Shirlei. Diversidade de Actinobactérias da Rizosfera do Milho (*Zea mays* L.) e Potencial de Controle Biológico de *Fusarium moniliforme* e *Pythium aphanidermatum*. Anais da jornada acadêmica da embrapameio ambiente, 2006, Jaguariúna. Anais... Jaguariúna, EMBRAPA, 2007. P. 24-28.

MIURA, T.; MATSUMOTO, T. Diet and nest material of the processional termite *Hospitalitermes*, and cohabitation of *Termes* (Isoptera, Termitidae) on Borneo Island. **Insectes Sociaux**, v.44, p. 267 – 275, 1997.

MIURA, T, MATSUMOTO, T. Foraging organization of the open-air processional lichen-feeding termite *Hospitalitermes* (Isoptera, Termitidae) in Borneo. **Insectes-Sociaux**, v.45, p.17-32, 1998.

MIURA, T., MATSUMOTO, T. Worker polymorphism and division of labor in the foraging behavior of the black marching termite *Hospitalitermes medioflavus*, on Borneo Island. **Naturwissenschaften**, v.82, n.12, p.564–567, 1995.

MORAN, J. A.; MERBACH, M. A.; LIVINGSTON, N. J.; CLARKE, C. M.; BOOTH, W. E. Termite Prey Specialization in the Pitcher Plant *Nepenthes albomarginata* – Evidence from Stable Isotope Analysis. **Annals of Botany**, n.88, p.307-311, 2001.

MOURA, F. M. S.; VASCONCELLOS, A.; ARAÚJO, V. F. P.; BANDEIRA, A. G. Feeding habitat of *Constrictotermes cyphergaster* (Isoptera, Termitidae) in a area of Caatinga, Northeast Brazil. **Sociobiology**, v.48, p.21-26, 2006.

MOURA, J. B. Atividade Antimicrobiana in vitro do Extrato Orgânico de *Cladonia substellata* Vainio e do Ácido Úsnico Frente *Staphylococcus spp.* E *Microsporium spp.* Obtidos de Cães e Gatos. Petrolina. p. 89, 2013.

NASCIMENTO, S. C.; PEREIRA, E. C.; OLIVEIRA, A. F. M.; Silva, N. Henrique da; BOITARD, M.; BÉRIAL, H. Screening de Atividade Citotóxica de Extratos Liquênicos: Cladoniaceae. **Acta. Bot. Bras.**, v.8, n.1, p.97-108, 1994.

NOBRE, T.; ROULAND-LEFEVRE, C.; AANEN, D. K. Comparative biology of fungus cultivation in termites and ants. In: BIGNELL, D. E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Eds). *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Berlin: **Springer-Verlag**, 2011, p.413-438.

NOIROT, C. From wood to humus feeding: an importante trend in termite evolution. **Biology and evolution of social insects**, p. 107-119, 1992. Edited by J. Billien. Leuven: Leuven University Press.

OHKUMA, M.; BRUNE, A. Diversity, Structure, and Evolution of the Termite Gut Microbial Community. In: BIGNELL, D. E.; Roisin, Yves; Lo, N. (eds.) *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Vancouver: **Springer**, 2010, v.2, p.413-438.

OHKUMA, M.; NODA, S.; KUDO, T. Phylogenetic Diversity of Nitrogen Fixation Genes in The Symbiotic Microbial Community in the Gut of Diverse Termites. **Applied And Environmental Microbiology**, v.65, n.11, p.4926-4934, 1999.

OHKUMA, Moriya. Symbioses of flagelates and prokaryotes in the gut of lower termites. **Trends in Microbiology**, Wako, Saitama, v. 16, n. 07, p. 345 - 352, 2008.

PERUCHI, Aline. Caracterização e avaliação do potencial de aplicação bioindustrial da bacteriofauna intestinal de *Armitermes euamignathus* Silvestri, 1901 (Isoptera: Termitidae) e *Coptotermes gestroi* (Wasmann, 1896) (Isoptera: Rhinotermitidae). 74f. Dissertação (Mestrado) – Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba. 2013. CDD 632.736.

RADEK, Renate. Flagelates, bacteria, and fungi associated with termites: Diversity and function in nutrition - A review. **Ecotropica**, Heildeberg, Germany, v.5, p.183-196, 1999.

R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

REZENDE, P B. Hábitos alimentares de cupins Sul-Americanos da família Termitidae (Insecta: Isoptera). Brasília, 2012, 46p. (Dissertação, mestrado em biologia animal), Universidade de Brasília, 2012.

RIBEIRO, Sheyla Mara; PEREIRA, Eugênia Cristina; GUSMÃO, Norma Buarque; FALCÃO, Emerson Peter; SILVA, Nicácio Henrique. Produção de metabólitos bioativos pelo líquen *Cladonia substellata* Vainio. **Acta bot. bras.**, v. 20, n. 2, p. 265-272, 2005.

RIT, Kalidas; CHAKRABORTY, B.; MUKHERJEE, T.; CHAKRABARTY, P. A Case Report of *Methylobacterium Radiotolerans* Bacteremia in a Hemodialysis Patient Successfully Treated by Combination Therapy of Levofloxacin and Meropenem. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.4, n.1, p.1369-1372, 2015.

ROISIN, Y., PASTEELS, J.M. A new *Nasutitermes* species from New Guinea (Isoptera: Termitidae). **Indo Malayan Zoology**, v.2, p.325–330, 1985.

RONDÓN, Antonio A. A. Filogenia de photininae (dictyoptera: mantodea: mantidae) baseada em dados morfológicos e moleculares. Manaus, 2015, 223p. (Tese, doutorado em entomologia), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2015.

SENA, J. M. Cupins construtores de ninhos conspícuos em caatinga: distribuição espacial, população e policalismo. João Pessoa - PB, UFPB, p.28, 2004.

SILVA, C. C. A. da. Aspectos do Sistema Imunológico dos Insetos. **Biociência & Desenvolvimento**, n.24, p.68-72, 2002.

SLEAFORD, F.; BIGNELL, D. E.; EGGLETON, P. A pilot analysis of gut contents in termites from the Mbalmayo Forest Reserve, Cameroon. **Ecological Entomology**, v. 21, p. 279-288, 1996.

THORNE, B. L. Termite Terminology. **Sociobiology**. v. 28, p. 253-263, 1996.

TOKUDA, G.; NAKAMURA, T; MURAKAMI, R.; YAMAOKA, I. Morphology of the digestive system in the wood-feeding termite *Nasutitermes takasagoensis* (shiraki) (Isoptera: Termitidae). **Zoological Science**, Tokyo, v,18, p. 869-877, 2001.

TOKUDA, Gaku; WATANABE, Hirofumi. Hidden celulasas in termites: revision of an old hypothesis. **Biology Letters**, v. 3, p. 336-339, 2007.

UPADHYAYA, Subodh K.; MANANDHAR, Anuroop; MINALI, Hemanta; POKHREL, Anaya R.; RIJAL, Anurag; PRADHAN, Barun; KOIRALA, Bhaduk. Isolation and characterization of cellulolytic bacteria from gut of termite. **Rentech Symposium Compendium**, v.1, p. 14-18, 2012.

VASCONCELLOS, A.; ARAÚJO, V. F. P.; MOURA, F. M. S.; BANDEIRA, A. G. Ecology, Behavior and Bionomics: Biomass and Population Structure of *Constrictotermes cyphergaster* (Silvestri) (Isoptera: Termitidae) in the Dry Forest of Caatinga, Northeastern Brazil. **Neotropical Entomology**, v.36, n.5, p.693-698, 2007.

WARE, J.L., LITMAN, J., KLASS, K.D.; SPEARMAN, L.A. Relationships among the major lineages of Dictyoptera: The effect of outgroup selection on dictyopteran tree topology. **Systematic Entomology**, v.33, n.3, p.429–450, 2008.

XAVIER-FILHO, L.; RIZZINI, C. T. Manual de Liquenologia Brasileiro. Recife: **UFPE**, 1976. 431p.

YOON, Jung-Hoon; LEE, Choong-Hwan; OH, Tae-Kwang. *Bacillus cibi* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.733-736, 2005.