



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CAMPUS I
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

MARIA DO SOCORRO LACERDA ROLIM

**POTENCIAL BACTERICIDA DA ATRANORINA SOBRE SIMBIONTES
INTESTINAIS DE *Constrictotermes cyphergaster* (TERMITIDAE,
NASUTITERMINAE)**

**CAMPINA GRANDE
2018**

MARIA DO SOCORRO LACERDA ROLIM

**POTENCIAL BACTERICIDA DA ATRANORINA SOBRE SIMBIONTES
INTESTINAIS 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.

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

**CAMPINA GRANDE
2018**

É expressamente proibido 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 do trabalho.

R748p Rolim, Maria do Socorro Lacerda.
Potencial bactericida da atranorina sobre simbioses intestinais de *Constrictotermes cyphergaster* (Termitidae, Nasutiterminae) [manuscrito] / Maria do Socorro Lacerda Rolim. - 2018.
24 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.
"Orientação : Profa. Dra. Maria Avany Bezerra Gusmão, Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA."
1. Cupins. 2. Simbioses bacterianos. 3. Substância líquênica. 4. Atividade bactericida. I. Título
21. ed. CDD 595.736

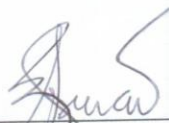
MARIA DO SOCORRO LACERDA ROLIM

**POTENCIAL BACTERICIDA DA ATRANORINA SOBRE SIMBIONTES
INTESTINAIS DE *Constrictotermes cyphergaster* (TERMITIDAE,
NASUTITERMITINAE)**

Artigo 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.

Aprovada em: 05/12/2018

BANCA EXAMINADORA



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



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



Prof. Dr.^a Liziane Maria de Lima
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Ao meu Deus, pelo Seu amor, cuidado e força em tantos momentos em que a minha maior vontade foi desistir, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus que, durante toda a caminhada, seja antes do meu engajamento no curso de ciências biológicas ou em qualquer outro momento da minha vida ao longo desses quatro anos, sempre permaneceu Fiel, e esteve me dando forças, conforto, consolo e ânimo para que eu permanecesse até o fim, sem olhar para as circunstâncias, fossem estas grandes ou não. Que me deu amor e consolo quando não entendia o Seu querer e Sua vontade de Soberana, me fazendo entender que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus e seguem os Seus propósitos.

Aos meus pais, Manoel Lacerda Rolim e Maria da Penha Silva, minha irmã Raquel Emanuelle e sobrinha Anna Letícia, que são os principais responsáveis na busca dos meus objetivos. Eles estiveram comigo em todo tempo e compreenderam toda a minha ausência, correria e estresse durante todo este tempo. Eu amo vocês com um amor puro!!!

À minha orientadora, a Professora Dra. Maria Avany Bezerra Gusmão, com quem eu trago laços que vão além do horizonte acadêmico, um sentimento fraterno profundo. Posso sem dúvidas afirmar que é uma das principais responsáveis por construir quem eu sou hoje. Instruiu-me a ser aluna nas disciplinas de Zoologia dos Invertebrados I e II, a ser pesquisadora durante os três anos de Laboratório de Ecologia de Térmitas e não bastasse isto, me compreendeu quando a dor era intensa por algumas limitações frente aos experimentos. Palavras faltam para agradecer por todas as correções, oportunidades, conselhos, abraços e muuuuito carinho; por todas as conversas, por todo o incentivo, por toda referência como mulher, profissional, amiga, mãe e conselheira, por ser guerreira e não deixar a toalha cair, por não desistir até conseguir!

À minha professora de monitoria, Dra. Beatriz Susana Ovruski de Ceballos, por todo o conhecimento perpassado, por todas as experiências, palavras de conforto, incentivo e pela atenção em sanar todas as dúvidas que pudesse ter, pelas correções, pelo amor, carinho e cuidado, por me fazer amar a microbiologia a cada dia e por me instigar em ser a melhor nisso.

À minha parceira de PIBIC, Estefany Gabriela Luiz de Araújo, que durante dois anos esteve compartilhando todos os infortúnios, tristezas, mas também as alegrias em cada procedimento feito, em cada passo dado na nossa pesquisa; por me acompanhar nas coletas, viagens, pelas palavras de apoio, pelo “Maria, vai dá certo, vamos vencer isso”, pelas risadas, pela praia (e precisamos repetir, kk); pelo cuidado, pelas caronas, pelas vergonhas compartilhadas, por tudo. Eu amo você e não poderia ter tido uma parceira melhor.

À minha amiga, irmã, conselheira, Mikaely da Silva Lima, pelas orações, intercessões, apoio e por ser um instrumento de Deus na minha vida, por cada abraço, palavra, mensagem, compreensão e amor.

Também para minha amiga, irmã e principal intercessora, Raquel Diniz, por cada palavra acerca das promessas de Deus, por cada ligação no quintal da minha casa acreditando que eu passaria no vestibular e cursaria Ciências Biológicas; por orar pela minha vida, por acreditar no meu potencial quando nem eu acreditava, por ter fé suficiente em me contagiar, por não me deixar baixar a cabeça, por ser a mulher de Deus, missionária, levita e serva que és.

Aos meus amigos irmãos, Sonale Araújo e Tcharlys Lopes, uma branca e um negro, por terem orgulho de quem estou me tornando, por me amarem verdadeiramente, por me apoiarem mesmo que tudo parecesse loucura ou até fosse, por entenderem meus furos de compromisso, muito embora a vontade maior fosse me matar, por quem são profissionalmente e por estarem sempre disponíveis em me ouvir, principalmente na aflição do meu coração, por acreditarem que a jornada não é fácil, mas que no fim vale a pena, pelo temor que vocês possuem ao Senhor e por verem na minha trajetória coisas que muitas vezes eu não quis enxergar.

À minha amiga Claudilene Correia, por todo o carinho, amor, conselho e parceria; pelas placas de Petri lavadas, pelos fins de semana na Uepb e nas Três Marias, pelas extirpações, que foram muitas; pelas coletas, pelo pão de São José da Mata, pelo sorriso, pelas piadas. É certo, não teria sido possível desenvolver tudo isto sem a tua ajuda.

Aos meus amigos de graduação, Luana Silveira, Stephanie Evelyn, Yorran Montenegro, Joanna Rayelle e Laissa Karolline, por acreditarem no meu potencial e torcerem para que eu conquiste tudo àquilo que almejo como estudante e pesquisadora, vocês são os remanescentes daqueles que amam o que fazem.

Em especial aos meus amigos de pizza, de vida, Antônio Marques e Juliane Gomes, por sempre se fazerem presente, por suportarem todo o meu abuso e cobrança, por estarem comigo em momentos difíceis da minha vida, por fazerem do meu aniversário neste ano algo singular, simplesmente por estarem comigo, estamos seguindo caminhos diferentes, mas que eu espero que se cruze o mais rápido possível, eu já sinto saudades de estar sempre com vocês.

Aos meus amigos do laboratório de Ecologia de Térmitas, Mário Oliveira, Jéssica Albuquerque e Igor Eloi, por cada trocadilho, sorriso, palavra, alfinetada, carinho e muuuuuuuita análise de dados. E sim, as bactérias existem, e são muito lindinhas.

Ao moço, Wellisson Glauber, que chegou à minha vida de uma forma singular, em um momento inesperado e que a cada dia tem sido instrumento de edificação na minha vida espiritual e emocional; por cada palavra, oração e amor; por cada mensagem, cada abraço e compreensão em toda correria acadêmica.

Aos funcionários da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Fábيا Suely e Terezinha Duarte e aos amigos Wandré Guevara, Silmara Chaves e ao Técnico Luiz Augusto, do Laboratório de Microbiologia (UEPB) pela presteza e atendimento quando nos foi necessário.

Aos parceiros de pesquisa, Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota – Laboratório de Bacterioses dos Animais Domésticos, do Departamento de Medicina Veterinária (Universidade Federal Rural de Pernambuco), a Profa. Dra. Liziane Maria de Lima – Laboratório de Biotecnologia (Embrapa Algodão), a Profa. Dra. Eugenia Cristina Gonçalves Pereira, Laboratório de Geografia Ambiental, do Departamento de Ciências Geográficas, (Universidade Federal de Pernambuco/UFPE) e o Prof. Dr. Atzel Candido Acosta Abad – Laboratório de Bacterioses dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina Veterinária, (Universidade Federal Rural de Pernambuco) por toda contribuição no desenvolvimento desta pesquisa. A todos, muito obrigada!

A universidade Estadual da Paraíba, ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica (CNPq) e a Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa/PROPESC pelo apoio financeiro no desenvolvimento da pesquisa e concessão de bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) e transporte para coleta de dados.

“O papel dos infinitamente pequenos na natureza é infinitamente grande.” Louis Pasteur.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 METODOLOGIA	13
2.1 Área de estudo	13
2.2 Isolamento, cultivo e caracterização bacteriana	14
2.3 Extração e Amplificação do DNA por PCR	15
2.4 Análise das sequências nucleotídicas	16
2.5 Identificação dos fungos liquênicos	16
2.6 Atividade da atranorina	16
2.7 Análise de crescimento bacteriano	17
3 RESULTADOS	17
4 DISCUSSÃO	18
5 CONCLUSÃO	21
ABSTRACT	21
REFERÊNCIAS	22

**POTENCIAL BACTERICIDA DA ATRANORINA SOBRE SIMBIONTES
INTESTINAIS DE *Constrictotermes cyphergaster* (TERMITIDAE,
NASUTITERMITINAE)**

*
Maria do Socorro Lacerda Rolim

RESUMO

Os cupins apresentam uma dieta diversa, rica em polissacarídeos, cuja hidrólise é realizada por bactérias associadas ao seu trato intestinal. Um dos itens alimentares de *Constrictotermes cyphergaster* são os fungos liquenizados, os quais produzem cerca de 1050 substâncias liquênicas, como a atranorina, com comprovada atividade bactericida. Este estudo testou atuação dessa substância no desenvolvimento das bactérias intestinais de *C. cyphergaster*. Os tubos digestivos de 50 soldados e 50 operários foram extirpados, e seu conteúdo foi ressuspenso em água destilada estéril, posteriormente 100 µl dessa mistura foi inoculado sobre meio LB, em triplicatas. O DNA bacteriano foi amplificado usando os primers 27F e 1389R, sequenciado e posteriormente identificado no NCBI, com similaridade acima de 90%. A atranorina inibiu o crescimento de *Bacillus flexus*, *B. thurigiensis*, *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. siamensis*, *B. simplex*, *B. cereus* e *Shingomonas paucimobilis*, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) variando de 5,0 a 250 µg/ml. Houve diferença significativa entre as concentrações testadas em t0 ($\chi^2=278,36$; g.l =7. P<0.001) e t12 ($\chi^2=205,73$; g.l = 7. P<0.001), detectado por densidade ótica – Elisa. Verificou-se potencial atividade bactericida da atranorina com o tempo, principalmente sobre Gram-positivos, associando-se a ausência de membrana externa que confere maior resistência a antibiótico. A atividade bactericida da atranorina no presente estudo contribui para avanço acerca da compreensão do consumo de líquens por *C. cyphergaster*, abrangendo o conhecimento acerca do papel dessa substância no controle do crescimento de isolados bacterianos desse cupim, especialmente aqueles potencialmente patogênicos, o que em grande escala poderia acarretar grandes prejuízos à colônia.

Palavras-chave: Cupins. Simbiontes bacterianos. Substância liquênica.

1 INTRODUÇÃO

Os cupins apresentam uma alimentação bem diversa, composta especialmente por substratos ricos em polissacarídeos. Essa dieta pode ser consumida em vários estágios de desenvolvimento, desde matéria em decomposição, madeira viva, e ainda gramíneas, plantas

*Aluna de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Estadual da Paraíba – Campus I.
Email: socorrolacerda@gmail.com

herbáceas, serapilheira, excrementos e carcaças de animais; líquens e até mesmo material orgânico presente no solo (LEE e WOOD, 1971; EGGLETON, 2000;). Todavia, apesar de os cupins produzirem celulases, os polissacarídeos ingeridos em sua dieta são resistentes à degradação e, juntamente com os demais insetos, sozinhos não secretam todas as enzimas digestivas para hidrolisar as β - ligações dos polímeros. Pelo contrário, grande parte da hidrólise dessas moléculas é realizada por enzimas produzidas pelos simbiossiontes microbianos intestinais (BRUNE e FRIEDRICH, 2000; WENZEL et al., 2002).

A presença dos simbiossiontes no trato digestivo classifica os cupins filogeneticamente em inferiores, associados a protozoários flagelados, e superiores, ligados às bactérias e fungos (OHKUMA, 2003). Além disso, os cupins superiores possuem o trato digestivo mais alongado e compartimentalizado, com condições físico-químicas totalmente diferenciadas para o trato digestivo daqueles inferiores (MIYATA et al., 2007; KÖHLER et al., 2012; TOKUDA et al., 2012; BRUNE, 2014). Os procariotos simbiossiontes intestinais dos cupins podem estar ligados com o epitélio intestinal, onde são livre-natantes, ou associados com protozoários intestinais (BRUNE, 2006).

Para os cupins superiores tem sido descrito grupos de bactérias pertencentes aos filos Firmicutes, Spirochaetes, Bacteroidetes e Proteobactérias (SU et al., 2016). Também são encontradas Actinobactérias, Fibrobacteres e TG3 (MYKAELYAN et al., 2015), destacando-se alguns gêneros bem comuns, como *Treponema*, *Dygonomonas*, *Tannerella*, *Lactococcus* e *Pseudomonas* associados aos cupins *Mironasutitermes shangchengensis* e *Odontotermes formosanus* (SU et al., 2016). A alta diversidade microbiana intestinal associada aos cupins superiores quando comparada aos cupins inferiores está ligada à dieta dos mesmos e às condições de anatomia e fisiologia de seu trato digestivo, em que a microbiota desempenha múltiplas funções para os hospedeiros, como fixação de nitrogênio e degradação de polímeros de carboidratos (BRUNE, 2014; SU et al., 2016).

Dentre os cupins superiores, *Constrictotermes cyphergaster* (Silvestri, 1901), com abundância de ninhos em área de Caatinga e Cerrado brasileiro, possui uma vasta dieta alimentar, incluindo os fungos liquenizados (MATHEWS, 1977; DONOVAN et al., 2001; MÉLO, 2004; MOURA et al., 2006; BARBOSA-SILVA et al., 2014). Os fungos liquenizados são encontrados em muitos substratos naturais (HAWKSWORTH e HILL, 1995; OTÁLORA et al., 2010), os quais possuem diversas substâncias com atividades biológicas, entre elas ação anti-inflamatória, antitumorais e antimicrobianas, e ainda muitas dessas utilizadas na fabricação de antimicóticos, antibióticos, perfumes e tinturas (WALKER e JAMES, 1980;

HUNECK e YOSHIMURA, 1996; NASH, 2008).

As substâncias dos fungos liquenizados são divididas em metabólitos primários e secundários, ocorrendo esses últimos na porção extracelular do talo liquênico, os quais podem variar qualitativa e quantitativamente em uma mesma espécie, dependendo das condições ambientais (RIBEIRO et al., 2005). Aproximadamente 1050 compostos secundários são conhecidos (HAUCK et al., 2010; MOLNÁR e FARKAS, 2010), e entre esses destaca-se a substância atranorina (C₁₉H₁₈O₈), isolada pela primeira vez por Hesse em 1898. Essa substância está presente em muitas famílias de fungos liquenizados, apresentando atividade de inibição no controle do crescimento de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e ácido-álcool-resistentes como o bacilo da tuberculose, além de indicar falta de toxicidade em animais testados (FALCÃO et al., 2002; STUDZINSKA-SROKA et al., 2017).

A atranorina tem mostrado efeito bactericida contra microrganismos como *Mycobacterium tuberculosis* (HONDA et al., 2010), *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (FALCÃO et al., 2002), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus faecalis* (NEERAJ et al., 2011), verificando-se diferentes concentrações inibitórias mínimas (MIC), que variaram de 5.0 µg/ml a 250 µg/ml. Além disso, os compostos liquênicos mostram uma inibição máxima do crescimento microbiano que varia de 00h até 24h do período de incubação (NEERAJ et al., 2011). Todavia, estudos que mostram efeito dessas substâncias sobre os simbiontes bacterianos intestinais de cupins são inexistentes.

Dessa forma, entendendo que os fungos liquenizados estão presentes na dieta de *C. cyphergaster*, testou-se a hipótese de que a substância atranorina tem potencial efeito de inibição no controle de simbiontes intestinais desse cupim, verificando-se a concentração mínima inibitória sobre os isolados.

2 METODOLOGIA

2.1 Área de estudo

A coleta dos cupins foi realizada na Estação Experimental de São João do Cariri (EESJC), vinculada ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba/UFPB - 7°23'48"S/36°31'55"W (BARBOSA et al., 2007). A área tem 381 ha, altitudes entre 400 e 700 m, média anual de precipitação entre 641 e 995 mm, umidade

relativa média de 70%, e temperatura variando de 28.5 a 35 °C (ATLAS GEOGRÁFICO DA PARAÍBA, 1985; ARAÚJO et al., 2005; Na região predomina a fitofisionomia de Caatinga (ANDRADE; SILVA, 2013), com vegetação xerófita arbustivo-arbóreo-aberta, com predominância de *Poncianela pyramidalis* Tul., *Croton blanchetianus* Mull. Arg., *Combretum leprosum* Mart., *Jatropha molíssima* (Pohl) Baill, *Aspidosperma pyriformium* Mart. e *Tacinga palmadora* (Britton e Rose) (BARBOSA et al., 2007).

2.2 Isolamento, cultivo e caracterização bacteriana

Os simbiossiontes bacterianos foram isolados a partir de indivíduos pertencentes às castas soldados (N=50) e operários (N=50), oriundos de cinco ninhos de *C. cyphergaster*. Os cupins foram esterilizados superficialmente via imersão em solução de 0,5% de Hipoclorito de sódio (NaClO) e Etanol (C₂H₆O) 70% por até 5min, seguido de lavagem sucessiva em água destilada estéril por 5 min cada. Os tubos digestivos dos cupins foram extirpados e transferidos para tubos contendo 100 µl de solução fisiológica a 0,8% para assepsia, de acordo com Oliveira (2016). Após a esterilização, as secções papo e pança de cada casta foram macerados separadamente (Fig. 1), incluindo seu conteúdo alimentar, e submersos em alíquotas contendo 1mL de água destilada estéril, que então foi ressuspensão em 9,0 ml de água destilada (diluição 1:10) com agitação manual de 2 min. Em seguida, 100 µL dessa mistura foram inoculadas nas concentrações de 10⁻⁶ a 10⁻⁸ sobre o meio de cultivo LB (Ágar e Broth, 16.0 e 8.0 g, respectivamente) (Fig.1). Depois as placas foram colocadas em estufa de crescimento com temperatura variando de 28 a 31 °C, e cultivadas até o surgimento das colônias bacterianas, em até 72h. O tratamento foi realizado em triplicata (ARAÚJO, 1998).

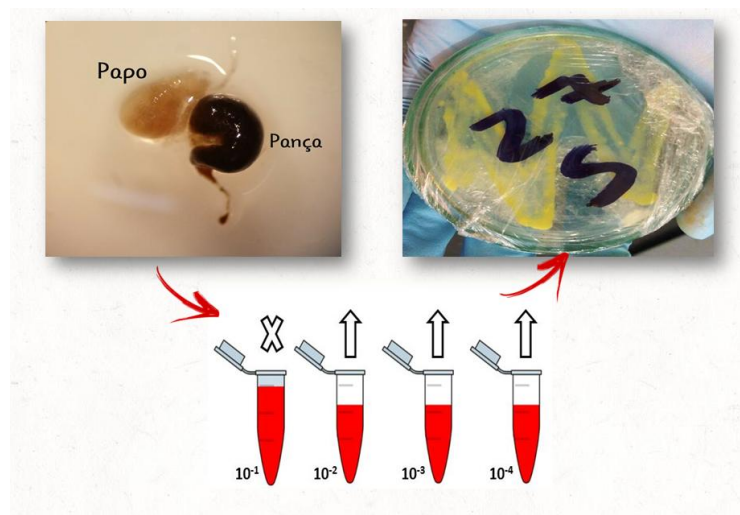


Figura 1 – Extirpação e isolamento de microrganismos simbiossiontes do trato digestivo de *Constrictotermes cyphergaster*.

2.3 Extração e Amplificação do DNA por PCR

O material genético foi extraído das amostras bacterianas usando o protocolo CTAB, adaptado de Doyle e Doyle (1987), em que a biomassa bacteriana presente em meio nutritivo LB (Ágar e Broth) foi raspada e posteriormente colocada em tubos estéreis de microcentrífuga (1.5 mL). O tampão foi aquecido a 65 °C, adicionando-se 1 mL desse tampão por tubo e 10 µL de Proteinase K, seguido de incubação no banho-maria a 65 °C por 1 hora, invertendo os tubos a cada 10 min. Em seguida as amostras são retiradas e colocadas em 520 µL do tampão após resfriamento. A lise celular teve auxílio de microesferas dentro dos tubos contendo o material, e invertidos em movimentos leves durante aproximadamente 1 min e centrifugados a 13.200 rpm por 5 minutos. 500 µL do sobrenadante é então transferido para um novo tubo, em que será acrescentado 500 µL acetato de amônio e 500 µL de isopropanol gelado. Os tubos são novamente invertidos (20x) e deixados para descansar por 20 minutos em temperatura ambiente, quando então serão centrifugados por 10 minutos a 13.200 rpm. O sobrenadante é descartado e o precipitado lavado com 500 µL de etanol gelado. Em seguida, despreza-se o sobrenadante e seca o precipitado a temperatura ambiente, até que seja evaporado o álcool. O DNA extraído é ressuspensão adicionando-se de 30 a 50 mg/mL de TE em cada tubo. A integridade do DNA foi analisada em corridas eletroforéticas em géis de agarose a 0.8% e tampão TBE 10X contendo Brometo de Etídio, aplicando-se 2 µL de DNA genômico diluído em tampão de corrida durante, aproximadamente, 1h em tensão de 80V. As bandas resultantes nos géis foram visualizadas em fotodocumentador.

O DNA bacteriano foi amplificado através de PCR usando termociclador PTC-200 (MJ Research), com a enzima Taq polymerase (Ludwig), seguindo o programa: 5 min de desnaturação inicial a 95 °C, seguido de desnaturação (1 min a 95 °C); anelamento (2 min a 55 °C); extensão (2 min a 72 °C), com extensão final a 72 °C por 10 min. A quantidade de DNA para cada amostra foi de 1 µl, e para o tampão (5x), enquanto os primers foram de 5 µl e 1 µl, respectivamente. O volume final de cada reação correspondeu a 25 µl por 30 ciclos. Os primers utilizados na amplificação foram o 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e o 1389R (ACGGGCGGTGTGTACAAG) para o gene rRNA 16S, e os produtos de PCR obtidos (~1,5 pb) foram confirmados em gel de agarose 0,8% e quantificados com marcador molecular. O material genético foi sequenciado na Plataforma de Sequenciamento de DNA (RPT 01B) CPqGM/Fiocruz, Salvador, BA. O alinhamento das sequências 5' - 3' (Forward) e 3' - 5' (Reverse) de cada isolado gerou uma sequência "*fulllength*" de todo o segmento gênico, abrangido pelo respectivo par de primers.

2.4 Análise das sequências nucleotídicas

A análise das sequências geradas através do sequenciamento genético foi feita no banco de dados do NCBI, através de pesquisa BLAST nucleotídeo (BLASTn) selecionando-se amostras com identidade acima de 90%.

2.5. Identificação dos fungos liquênicos

As amostras de líquens produtoras da atranorina consumidas pelos cupins (BARBOSA-SILVA et al. *in press*) foram submetidas à extração orgânica, em temperatura ambiente (28 ± 3 °C), utilizando-se sucessivamente éter dietílico, clorofórmio e acetona. Os extratos foram evaporados e submetidos à cromatografia em camada delgada, utilizando-se cromatoplasmas Merck (254+366), desenvolvidas em sistema A de solventes (Tolueno: Dioxano: Ácido acético, 180:45:5, v/v), segundo Culberson (1972).

O isolamento e purificação da atranorina seguiu metodologia de cristalizações sucessivas proposta por Asahina e Shibata (1954) com modificações de Pereira (1998). O extrato foi obtido a partir de extração em soxhlet, com éter dietílico, mantido sob refluxo por 4h a 40 °C. Em seguida o mesmo foi filtrado e evaporado até secar e ressuspensão em clorofórmio. Posteriormente, passou por banho maria sob refluxo por 4h a 60 °C. O extrato filtrado foi concentrado à metade do volume e precipitado com etanol absoluto gelado, em seguida foi mantido a 4 °C durante 2h. Os cristais retidos foram dissolvidos em clorofórmio e recristalizados em etanol absoluto gelado. Em seguida, por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi avaliado o grau de pureza e o tempo de retenção das substâncias. A atranorina foi utilizada como padrão de pureza para a identificação dos picos cromatográficos.

2.6 Atividade da atranorina

A atividade bactericida da atranorina foi avaliada pelo método da microdiluição em placa de 96 poços. Os microrganismos isolados do trato digestivo dos cupins foram cultivados em meio LB por 24h a 37 °C. Após isso as bactérias foram preparadas em suspensão (inóculo), usando uma solução estéril de cloreto de sódio (0,9%) até alcançar uma turbidez equivalente ao padrão 0,5 McFarland. A suspensão de aproximadamente 1×10^8 UFC/mL (equivalente a uma densidade óptica de 0,08 – 0,13 a 625 nm) foi inoculada em caldo Mueller

Hinton (Mueller Hinton Broth -MGB- SIGMA-ALDRICH), verificando-se a concentração final das bactérias de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL.

A atranorina foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) (10% do volume final) e diluído em caldo MGB a uma concentração inicial de 0,2 mg/mL. Em seguida, foram feitas diluições seriadas para as concentrações de 100 µg , 50 µg , 25 µg , 12,5 µg , 6,25 µg e 3,125µg /mL foram usadas nos bioensaios de crescimento bacteriano. Todo o experimento foi realizado em triplicata incluindo amostras controles (B = meio; C(+) = meio+microrganismo), distribuídas num volume de 100µL em cada poço. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 12h, e o crescimento bacteriano foi detectado por densidade ótica usando o leitor de microplacas de ELISA (Multiskan Go Thermo Scientific) em dois momentos (0h e 12h).

O valor da concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de atranorina que inibiu mais do que 75% (CIM75) do crescimento bacteriano, enquanto a concentração bactericida mínima (CBM) foi associada como a mínima concentração que resultou na inativação de 99% das células bacterianas, determinada a partir do método de repique em placa de ágar Mueller Hinton, não observando crescimento bacteriano visível.

2.7 Análise de crescimento bacteriano

O crescimento bacteriano foi avaliado nos tempos t_0 e t_{12} . Os dados foram submetidos ao teste de normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk e, quando não constatada a normalidade dos dados ($P < 0.001$), foi usado o teste de Kruskal-Wallis para detectar se havia diferença entre as concentrações. Foram utilizadas as variáveis t_0 e t_{12} como resposta e as concentrações como fatores. A posteriori foram realizadas comparações par-a-par usando o teste de Dunn, com p-valores de correção usando o método de Benjamini-Hochberg, através do pacote agricolae para realizar o agrupamento por letras.

Todas as análises foram realizadas usando o pacote estatístico R versão 3.2.3.

3 RESULTADOS

Dentre os isolados identificados (N=26), registraram-se bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* (22), *Sphingomonas* (3) e *Microbacteriaceae* (1) (Tab. 1), apresentando tamanho de 1500 pb. Amostras de *Bacillus* foram mais abundantes no papo de operários

(n=6), seguido de pança de soldados (n=8), papo de soldados (n=5) e pança de operários (n=3).

Houve maior abundância de simbioses na porção final do intestino de soldados (n=9), seguido por papo de operários (n=8), papo de soldados (n=5) e pança de operários (n=4). Entre os isolados, 21 cepas bacterianas eram Gram-positivas e cinco Gram-negativas (Tab. 1).

Verificou-se diferença significativa entre as concentrações testadas em t0 ($\chi^2=278,36$; g.l =7. $P<0.001$), bem como em t12 ($\chi^2=205,73$; g.l = 7. $P<0.001$), notando-se potencialidade da atividade bactericida da atranorina sobre os isolados intestinais dos cupins com o tempo (Fig. 4). A concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentou maior inibição dos isolados testados no t0 (Fig. 4). No t12 todas as concentrações apresentaram atividade bactericida frente os isolados, contudo a concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentou a maior inibição.

4 DISCUSSÃO

Nosso estudo verificou a atividade bactericida da atranorina através dos halos de inibição presentes nas colônias de bactérias Gram-positivas submetidas ao teste de sensibilidade antibiótica, pertencentes ao gênero *Bacillus* e suas diferentes cepas como *B. flexus*, *B. thurigiensis*, *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. siamensis* e *B. cereus* e ainda o bacilo Gram-negativo *Sphingomonas paucimobilis*. Nossos dados corroboram estudos prévios acerca da ação da atranorina sobre tais micro-organismos (FALCÃO et al., 2002; NEERAJ et al., 2011; STUZZINSKA-SROKA et al., 2017).

Algumas das principais infecções bacterianas são associadas à família Bacillaceae, incluindo espécies dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, dentre as quais estão *B. thurigiensis*, *B. cereus*, *C. brevifaciens* e *C. malacosomae* (GOULLI et al., 2011). König (2006) aponta as cepas de *Bacillus* como uma porção significativa da comunidade microbiana intestinal de invertebrados. *S. paucimobilis* é um patógeno oportunista, não fermentativo, amplamente encontrado no ambiente natural (água e solo), e outras fontes, que está associado com muitos casos de infecções nosocomiais (RYAN e ADLEY, 2010).

A atranorina tem sido reportada como eficiente contra bactérias Gram-positivas (FALCÃO et al., 2002) e menos eficaz contra bactérias Gram-negativas. Essa menor sensibilidade antibiótica pode ser explicada pela estrutura da parede celular, composta por uma camada externa menos permeável a moléculas hidrofóbicas ou anfipáticas, conferindo efetiva barreira de permeabilidade e restringindo a penetração de alguns compostos (TEGOS. 2002; CARVALHAL e ALTERTHUM. 2004; MOLNÁR e FARKAS, 2010). No entanto,

avanços nos estudos acerca das propriedades biológicas dos compostos bioativos liquênicos também têm permitido demonstrar a atuação dessas substâncias frente ao desenvolvimento de bactérias Gram-negativas e fungos, como *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Aeromonas hydrophila*, *Candida albicans* e *C. glabrata* (YILMAZ et al., 2004).

Tabela 1- Identificação molecular dos simbiontes bacterianos intestinais de *Constrictotermes cyphergaster* por percentual de semelhança através de pesquisa BLAST.

ACESSO	ESPÉCIES	% SIMILARIDADE	GRAM	LOCAL	CIM
KR149272.1	<i>Bacillus flexus strain vitij6</i>	97	+	I	0.0065- 0.1
KR077814.1	<i>Bacillus sp. fjat-25723</i>	97	+	IV	0.0065- 0.1
CP015911.1	<i>Bacillus velezensis strain ls69</i>	96	+	IV	0.025-0.1
AB301018.1	<i>Bacillus pumilus gh18</i>	97	+	I	0.0125- 0.1
KY671142.1	<i>Bacillus thuringiensis strain u15_29</i>	97	-	I	X
DQ520823.1	<i>Microbacteriaceae bacterium nr172</i>	97	-	III	X
KY807037.1	<i>Bacillus siamensis strain fh-1</i>	93	+	IV	X
CP003752.1	<i>Bacillus thuringiensis hd-771.</i>	96	+	IV	0.0125- 0.1
MG704147.1	<i>Bacillus sp. strain t149-19</i>	96	+	IV	0.0125- 0.1
KU597564.1	<i>Bacillus sp. rd_mopep_06</i>	96	+	II	0.1
CP003687.1	<i>Bacillus thuringiensis mc28</i>	94	+	III	X
KT719709.1	<i>Bacillus cereus strain mer_132</i>	96	+	II	0.0125- 0.1
KJ767337.1	<i>Bacillus simplex strain ihb b 7173</i>	96	+	IV	0.0125- 0.1
KX242264.1	<i>Bacillus cereus strain os8.2</i>	96	+	I	0.00625- 0.1
KX129840.1	<i>Bacillus velezensis strain js4s</i>	96	+	III	0.00125- 0.1
NC_023073.1	<i>Bacillus velezensis strain ls69</i>	96	+	II	0.00625- 0.1
EU184084.1	<i>Bacillus sp. psb7</i>	95	+	I	0.00625-0.1
MF179866.1	<i>Bacillus sp. (in: bacteria) strain dek9b</i>	98	+	I	X
MK039414.1	<i>Sphingomonas paucimobilis strain tm.vt-se.ab03</i>	99	-	IV	X
MK039414.1	<i>Sphingomonas paucimobilis strain tm.vt-se.ab03</i>	90	-	I	0.05- 0.1
KY908413.1	<i>Bacillus sp. strain krjp</i>	90	+	III	0.05- 0.1
HQ238891.1	<i>Bacillus cereus strain z2b-73</i>	90	+	II	0.05- 0.1
MG309328.1	<i>Bacillus sp. (in: bacteria) strain 201705cjkop-15</i>	90	+	IV	0.1
EF113689.1	<i>Bacillus thuringiensis strain ggds2</i>	93	+	IV	0.05- 0.1
JQ765577.1	<i>Bacillus methylotrophicus strain brhs/p91</i>	92	+	II	0.025- 0.1
MK039414.1	<i>Sphingomonas paucimobilis strain tm.vt-se.ab03</i>	94	-	I	0.0625- 0.1

Legenda: Papo de operário – I; Papo de soldado – II; Pança de operário – III; Pança de soldados – IV; X - Insensível à inibição. CIM- Concentração Inibitória Mínima.

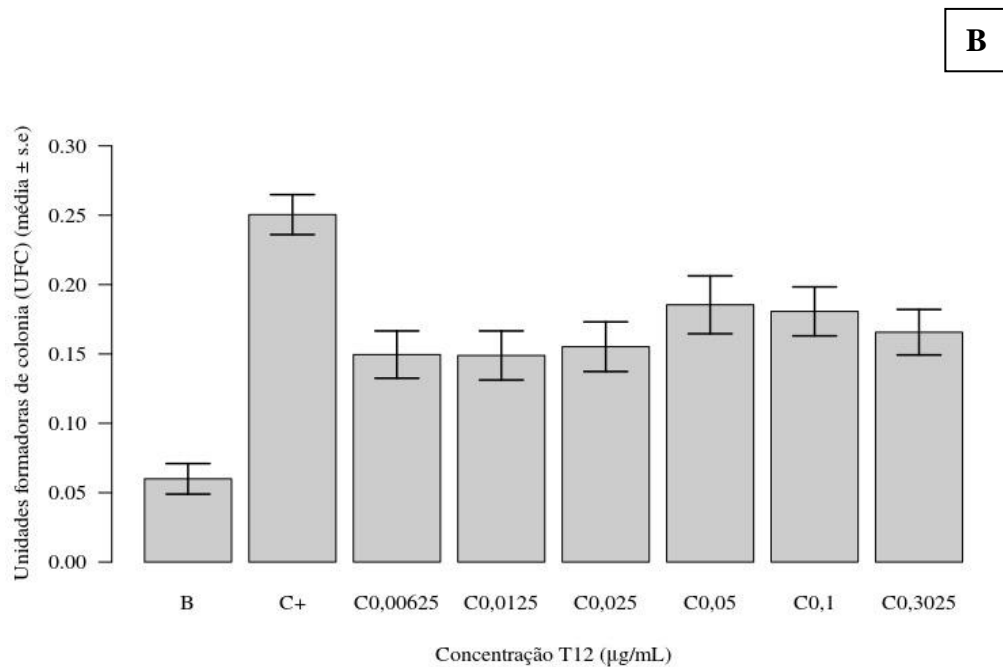
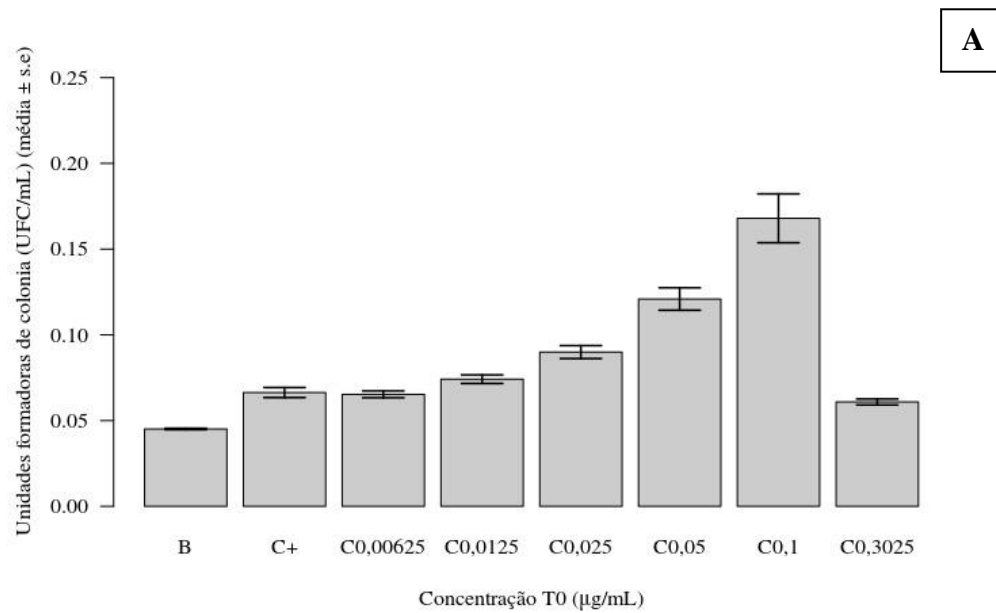


Figura 4: Crescimento de isolados bacterianos intestinais de *Constrictotermes cyphergaster* detectado por densidade ótica utilizando a substância líquênica atranorina. A- Tempo 0h e B-Tempo 12h. B- Controle negativo; C+: Controle positivo

As bactérias pertencentes à família Microbacteriaceae abrange um grande grupo de bactérias Gram-positivas predominantemente aeróbicas, que estão em vários ecossistemas terrestres e aquáticos, podendo estar associada clinicamente com plantas, fungos e animais. As espécies dessa família são reportadas como patogênicas oportunistas (CARVALHO, 2012). A bactéria Gram-positiva *B. licheniformes* teve seu crescimento inibido pelo metabólito secundário ácido úsnico (OLIVEIRA, 2016), também produzidos por fungos liquenizados consumidos por *C. cyphergaster* (BARBOSA-SILVA et al., 2014). Estudo realizado por Agerholm et al. (1997) considerou todas as cepas (n=13) experimentadas de *B. licheniformes* como patogênicas.

As variações referentes à determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) nos diferentes isolados bacterianos podem ser atribuídas a diferentes fatores, como a origem das estirpes testadas, do método utilizado ou mesmo da pureza da substância testada, sendo necessário maior número de microrganismos testados (STUDZINSKA-SROKA et al., 2017). Estudos mostraram variações de CIM variando de 5.0 µg/mL (NEERAJ et al., 2011) a 250 µg/mL (FALCÃO et al., 2002; HONDA et al., 2010).

5 CONCLUSÃO

A comprovada atividade bactericida da atranorina no desenvolvimento dos simbiosites intestinais de *C. cyphergaster* permite confirmar nossa hipótese, contribuindo nos avanços acerca da relação ecológica de simbiose existente entre estes organismos. Este estudo ajudou a entender melhor o papel deste composto bioativo, o qual é de fundamental relevância no estudo dos fungos liquenizados, no controle do crescimento de isolados bacterianos, que são potencialmente patogênicos, o que em grande escala poderia acarretar grandes prejuízos a colônia.

BACTERICIDE POTENTIAL OF ATRANORIN OVER THE GUT SYMBIONTS OF *Constrictotermes cyphergaster* (Termitidae, Nasutitermitinae)

ABSTRACT

The termites display a diverse polysaccharides rich diet, in which hydrolysis is realized by bacterial symbionts associated to its gut. One of the main feeding items of the *Constrictotermes cyphergaster* termites are lichenized fungi, which product around 1050 lichenic substances, such as atranorin, with attested bactericide activities. This essay tested the negative effect of this substance on the development of bacterial gut symbionts from *C. cyphergaster*. The gut of 50 soldiers and 50 workers were extirpated and its content suspend

in distilled sterile water. Posteriorly, 100 µl of this mixture was inoculated on culture medium, in triplicates. The bacterial DNA was amplified using 27F and 1389R primers, sequenced and posteriorly identified using *NCBI*, with over 90% similarity. Atranorin inhibited the growth of *Bacillus flexus*, *B. thurigiensis*, *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. siamensis*, *B. simplex*, *B. cereus* and *Sphingomonas paucimobilis*, with minimal inhibitory concentration ranging between 5 to 250 µg/ml. There was significant differences among the tested concentration in t0 ($\chi^2=278.36$; df=7. P<0.001) and t12 ($\chi^2=205.73$; df = 7. P<0.001), detected by optical density – Elisa. It was verified the bactericide potential of atranorin in response to time, mainly over Gram-positive isolates, associating the lack of an external membrane which grant major antibiotic resistance. The bactericide activity of atranotin in the present essay contributes to the advances on the insights surrounding the feeding relationship of *C. cyphergaster* and a series of lichen species, embracing the knowledge surrounding the role of this bioactive compound on the growth control of bacterial isolates from this termite, specially those potentially pathogenic, which in great-scale could deal grate prejudice to colony.

Keywords: Termite, bacterial symbionts, lichenic substances

REFERÊNCIAS

- AGERHOLM et al. A preliminary study on the pathogenicity of *Bacillus licheniformis* bacteria in immunodepressed mice. **Apmis**, v. 105, n. 1-6, p.48-54, 1997. Wiley.
- ANDRADE, R.; SILVA, F. Comportamento energético do sistema vegetação – atmosfera no bioma caatinga. **Sociedade e Território**, Natal, v. 25, n. 2, p.17-28, 2013.
- ARAÚJO, K. et al. Análise das condições meteorológicas de São João do Cariri no semiárido paraibano. **Revista do Departamento de Geociências**, v.14, 2005.
- ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. **Chemistry of Lichen Substance**, Tokio, Japanese. Society for the Promotion of Science, p. 240, 1954.
- ARAÚJO, J. Estratégias para isolamento seletivo de actinobactérias. In: MELO, I. S. de, AZEVEDO, J. (Ed). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p. 352-367, 1998.
- ATLAS GEOGRÁFICO DA PARAÍBA. Governo do estado da Paraíba. João Pessoa: Grafset. p. 100, 1985.
- BARBOSA, M.; LIMA, I.; CUNHA, J.; AGRA, M.; THOMAS, W. Vegetação e flora no cariri paraibano. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, p.313-322, 2007.
- BARBOSA-SILVA, A.M. **RIQUEZA LIQUÊNICA ASSOCIADA Á ALIMENTAÇÃO DE *Constrictotermes cyphergaster* (SILVESTRE, 1901) (ISOPTERA, TERMITIDAE) NO SEMIÁRDO BRASILEIRO**. 2014. 46 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ecologia e Conservação, Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.
- BRUNE, A; FRIEDRICH, M. **Microecology of the termite gut: structure and function on a microscale. Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam. v. 3. p. 263–269, 2000.
- BRUNE, A. **Symbiotic Associations Between Termites and Prokaryotes**. *Prokaryotes*. v.1, p. 439-474, 2006.
- BRUNE, A. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 3, p.168-180, 2014. Springer Nature.

- CARVALHO, E. Identificação fenotípica e molecular de bactérias patogênicas associadas à criação de peixes amazônicos. 2012.
- CARVALHAL, M.; ALTERTHUM, F. Morfologia e estrutura da célula bacteriana. In: TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 7- 19, 2004
- CULLBERSON, C.F. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thinlayer-chromatographic method. **Journal of Chromatography**, v.72, p.113-125, 1972.
- DONOVAN, S.; EGGLETON, P.; BIGNELL, D. Gut content analysis and a new feeding group classification of termites. **Ecological Entomology**, v. 26, n. 4, p.356-366. 2001.
- DOYLE, J; DOYLE, J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, p.11-15. 1987
- EGGLETON, P. Global patterns of termite diversity. IN: ABE, T.; BIGNELL, D.E.; HIGASHI, M. (EDS.). **TERMITES: EVOLUTION, SOCIALITY SYMBIOSES, ECOLOGY**. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p. 25-52, 2000
- FALCÃO et al. Atividade Antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta Farm. Bonaerense**, Buenos Aires, v. 21, n. 1, p.43-49, 2002.
- GOULI, V.; GOULI, S.; MARCELINO, J. Common Infectious Diseases of Insects in Culture: Diagnostic and Prophylactic Methods. Netherlands: **Springer Netherlands**, p. 54, 2011.
- HAUCK, M.; JURGENS, S.; LEUSCHNER, C. Norstictic acid: Correlations between its physico-chemical characteristics and ecological preferences of lichens producing this depsidone. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, p. 309–313, 2010.
- HAWKSWORTH, D.; HILL, D. The lichen forming fungi. New York: **Blackie e Son Limited**, p. 158, 1995.
- HONDA et al. Antimycobacterial activity of lichen substances. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p.328-332, 2010. Elsevier BV.
- HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. Identification of lichen Substances. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**. Germany. p. 493, 1996.
- KÖHLER et al. High-Resolution Analysis of Gut Environment and Bacterial Microbiota Reveals Functional Compartmentation of the Gut in Wood-Feeding Higher Termites (*Nasutitermes* spp.). **Applied And Environmental Microbiology**, v. 78, n. 13, p. 4691-4701, 2012. American Society for Microbiology.
- KONIG, H.. Bacillus species in the intestine of termites and other soil invertebrates. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 620-627, 2006. Wiley.
- LEE, K. E.; WOOD, T. G. Termites and soils. London: **Academic Press of London**, 1971.
- MATHEWS, A.G.A. Studies on termites from the Mato Grosso State, Brazil. **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro. 267p. 1977.
- MÉLO, B. A qualitative and quantitative survey of termites (Isoptera) in an open shrubby caatinga in northeast Brazil. *Sociobiology*, v. 44, p. 707-716, 2004.
- MIYATA et al. Influence of Feed Components on Symbiotic Bacterial Community Structure in the Gut of the Wood-Feeding Higher Termite *Nasutitermes takasagoensis*. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, v. 71, n. 5, p. 1244-1251, 2007.
- MIKAELIAN, A. et al. Diet is the primary determinant of bacterial community structure in the guts of higher termites. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 20, p.5284-5295, 2015.

MOLNÁR, K.; FARKAS, E. Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review. **Zeitschrift Für Naturforschung C**, [s.l.], v. 65, n. 3-4, p. 157-173, 2010.

MOURA et al. Feeding habit of *Constrictotermes cyphergaster* (Isoptera, Termitidae) in an area of Caatinga, northeast Brazil. *Sociobiology*, 2006.

NASH, T.. **Lichen Biology**. 2o ed. Cambridge: University Press. 2008.

NEERAJ et al. Bactericidal Activity of Some Lichen Secondary Compounds of *Cladonia ochrochlora*, *Parmotrema nilgherrensis* & *Parmotrema sancti-angelii*. **International Journal of Drug Development and Research**. 3. p.222-232.2011.

OLIVEIRA, M. **EFEITO DO ÁCIDO ÚSNICO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE SIMBIOTES BACTERIANOS DE *Constrictotermes cyphergaster* (TERMITIDAE, NASUTITERMITINAE)**. 2016. 37 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Biologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

OHKUMA, M. Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 61, n. 1, p. 1-9, 2003. Springer Nature.

OTÁROLA et al. Phylogeography and divergence date estimates of a lichen species complex with a disjunct distribution pattern. **American Journal of Botany**, v. 97, p. 216–223, 2010.

PEREIRA, E.C. Lichens from Brazilian Northeast (NE) - studies and applications. In: **Lichenology in Latin America** (MARCELLI, M. P.; SEAWARD, M. R. D., eds), Grupo Latino Americano de Liquenólogos (GLAL). International Association for Lichenology (IAL)/CNPq/CETESB. Brasil, p. 65-70, 1998.

R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RIBEIRO et al. Produção de metabólito bioativos pelo líquen *Cladonia substellata* Vainio. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 265-272, 2005.

RYAN, M.; ADLEY, C. *Sphingomonas paucimobilis*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. **Journal of Hospital Infection**, v. 75, n. 3, p.153-157, 2010. Elsevier BV.

SU et al. Comparative Gut Microbiomes of Four Species Representing the Higher and the Lower Termites. **Journal of Insect Science**, v. 16, n. 1, p.97-99, 2016. Oxford University Press (OUP).

STUDZINSKA-SROKA, E.; GALANTY, A.; BYLKA, W. Atranorin - An Interesting Lichen Secondary Metabolite. **Mini-reviews In Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 17, p. 1633-1635, 2017.

TEGOS et al. Multidrug pump inhibitor uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 46, p. 3133-3141, 2002.

TOKUDA et al. Cellulolytic environment in the midgut of the wood-feeding higher termite *Nasutitermes takasagoensis*. **Journal Of Insect Physiology**, v. 58, n. 1, p. 147-154, 2012.

WALKER, F. JAMES, P. A revised guide to microchemical techniques for the identification of lichens products. **Bulletin of the British Lichen Society**, v.46, p. 13-29, 1980.

WENZEL et al. Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 92. p. 32–40. 2002.

YILMAZ, M; TURK, A; KIVANÇ, M. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents. **Z Naturforsch**, v.59, p. 249-254. 2004.