

INSTITUTO FEDERAL DE MINAS GERAIS

IFMG-OP

CURSO: TECNOLOGIA EM CONSERVAÇÃO E
RESTAURO

**CONTROLE BIOLÓGICO DE CUPIM POR MEIO DE MÉTODOS
BIOTECNOLÓGICOS:**

UMA ALTERNATIVA PARA A PRESERVAÇÃO DO PATRIMÔNIO

ALUNA: SUZIMARA REIS DA SILVA

OURO PRETO, MG

30 DE JANEIRO DE 2012

SUZIMARA REIS DA SILVA

CONTROLE BIOLÓGICO DE CUPIM POR MEIO DE MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS:

UMA ALTERNATIVA PARA A PRESERVAÇÃO DO PATRIMÔNIO

Trabalho de Curso submetido ao Instituto Federal de Minas Gerais– IFMG-OP, como parte dos requisitos necessários para a conclusão do curso de Tecnologia em Conservação e Restauro. Sob a orientação dos Professores Juliano Lemos Bicas (UFSJ- Alto Paraopeba) e Rodrigo Otávio De Marco Meniconi (IFMG-OP).

Ouro Preto/MG, 2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Juliano Lemos Bicas do curso de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João Del Rei, que aceitou me apoiar em uma pesquisa sobre o controle de cupim, fundamentada na biotecnologia. Me oferecendo uma bolsa de iniciação científica financiada pela FAPEMIG. Sem o seu apoio não seria possível que essa pesquisa tivesse uma abordagem biotecnológica. Gostaria também de agradecer os professores do IFMG-OP e principalmente ao meu orientador Rodrigo Otávio De Marco Meniconni, por me apoiarem e incentivarem a materializar a idéia de realizar uma pesquisa que buscasse a melhoria para o patrimônio, incorporando bases biotecnológicas. Agradeço a bolsista de iniciação científica Lorena pela colaboração nas atividades da pesquisa. E acima de tudo ao apoio incondicional da minha família e namorado, durante minha trajetória acadêmica.

RESUMO

Introdução: É sabido que os cupins representam uma ameaça ao patrimônio histórico e cultural. Embora a ameaça às áreas urbanas, estudos sobre novas técnicas e produtos são deficientes no Brasil. Esses estudos são mais deficientes ainda quando se trata de bens culturais, pois além do controle dos cupins, os métodos não podem alterar nem eliminar seus elementos. Atualmente o método de controle de cupins é realizado por meio de defensivos sintéticos. Contudo, esse método pode apresentar danos ao meio ambiente e a saúde humana. Já o controle biológico tem se mostrado uma alternativa ambientalmente amigável. Partindo do pressuposto de que os cupins inferiores não são capazes de sobreviver sem a presença de microrganismos celulolíticos simbióticos em seu trato intestinal, o objetivo deste estudo foi isolar do meio ambiente microrganismos produtores de compostos antimicrobianos ativos contra aqueles simbiotes e, assim, avaliar esta estratégia biotecnológica para o controle dos cupins. **Material e métodos:** Inicialmente, foram isolados 44 microrganismos de diversas fontes do ambiente. Paralelamente, microrganismos foram isolados do cupim em meio contendo carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono e, na sequência, estes isolados foram testados quanto à produção de celulase. Foram considerados potencialmente simbiotes aqueles isolados produtores de celulase. Empregando o teste de picada em ágar, foi verificado o potencial antimicrobiano dos microrganismos isolados do meio ambiente contra os simbiotes do cupim. Posteriormente, o potencial antimicrobiano foi quantificado por meio do teste de difusão em ágar com discos de papel embebidos com o composto antimicrobiano. **Resultados:** Das 44 espécies isoladas do meio ambiente, sete se mostraram capazes de inibir um dos três potencialmente simbiotes do cupim, visualizado pela formação de halo de inibição de crescimento ao redor da colônia. A análise quantitativa identificou uma bactéria gram-positiva como sendo a mais ativa contra a bactéria gram positiva isolada do cupim. Os testes de estabilidade mostraram que o composto antimicrobiano em questão apresentou perda de atividade quando submetido a temperaturas de 35°C e 45°C por 30 min e pH de 6,8 e 10. Já em temperatura -18°C por 7 dias observou-se perda de sua estabilidade. **Conclusões:** Os resultados obtidos encorajam experimentos *in vivo* para determinar se os compostos antimicrobianos produzidos pela bactéria Gram-positiva isolada do meio-ambiente apresentam uso potencial no controle de cupins.

Palavras-chave: cupim, preservação, patrimônio histórico, controle biológico, simbiotes do cupim, testes de inibição de crescimento.

1 – INTRODUÇÃO

Os cupins representam uma ameaça ao patrimônio histórico e cultural, principalmente às edificações coloniais e imperiais por apresentarem sistema construtivo constituído por vários materiais celulósicos e lignocelulosicos. A devastação do habitat natural dos térmitas, as florestas, proveniente do processo de urbanização é a principal causa dos cupins serem considerados pragas urbanas (MEDEIROS, 2004).

Entre os sistemas e elementos construtivos que estão suscetíveis aos cupins podemos citar: paus-a-pique da taipa-de-mão, taipa-de-pilão, rebocos que contem esterco curtido, forros de madeira, escadas, balaustradas, tabuados e madeiramento do telhado.

Conforme assinalado por Paulo Duarte (1938), entre as muitas ameaças ao patrimônio histórico edificado, os cupins são uma das mais perniciosas:

“Além da crendice, outro inimigo terrível dos edificios historicos assola S. Paulo. É o cupim, o implacavel termita, nas suas dezenas de especies, que corróe as paredes, pulveriza caibros e esteios, esvurma as talhas e só abandona o campo quando já não resta uma molecula aproveitavel de celulose”. (Duarte, 1938:18).

Um estudo realizado por Norivaldo dos Anjos, professor e chefe do Departamento de Biologia Animal da Universidade de Viçosa (UFV), especialista em manejo de pragas florestais, aponta que cupins e carunchos representam um perigo na totalidade dos monumentos em Ouro Preto.

Apesar da grande ameaça, os estudos sobre novas técnicas e produtos para o controle de cupins são deficientes no Brasil. Boa parte do que é escrito e falado sobre cupins urbanos em nosso país resulta de generalização de informações vindas do exterior, muitas vezes relativas a espécies de cupins que não ocorrem no Brasil (MILANO, 1998). Esses estudos são mais deficientes ainda quando se trata de bens culturais, pois além do controle dos cupins, os métodos não podem alterar nem eliminar seus elementos. Pelo fato dos produtos e técnicas empregadas em intervenções de conservação e restauro não

poderem alterar as características estéticas e dos materiais construtivos, é interessante a participação dos profissionais da área nas pesquisas de novos produtos. Segundo Lelis o Patrimônio Histórico Brasileiro tem importante papel nas pesquisas de novos métodos de controle de cupins. Para o autor é responsabilidade do Patrimônio fornecer meios para que os testes realizados em suas edificações e acervos sejam conduzidos com objetivo e rigor científico, e não como meras descupinizações. E para isso, um dos caminhos seria a busca por solução na forma de “projetos de pesquisa” e não simplesmente como “propostas (comerciais) de controle” (LELIS, 2001).

No Brasil, os ataques mais frequentes têm sido ocasionados por cupins de apenas dois grupos: cupins subterrâneos e cupins de madeira seca (ELEOTÉRIO, 2000). Essas duas espécies têm em comum o fato de serem oriundas de outras regiões do mundo. Elas estão agora perfeitamente radicadas em nosso país e com distribuição geográfica em franca expansão. O cupim de madeira seca mais comum, *Cryptotermes brevis*, ocorre do sul ao nordeste do país especialmente em estados mais centrais como Minas Gerais e Goiás. Essa espécie é estritamente antropófila e infesta apenas as madeiras protegidas nas edificações (FONTES, 1998). Os cupins chamados de subterrâneos pertencem à família Rhinotermitidae e são os que causam danos mais significativos em edificações em áreas urbanas (ELEOTÉRIO, 2000). O cupim subterrâneo *Coptotermes havilandi*, comum nos estados do sudeste, vem gradualmente ampliando seus domínios rumo ao oeste, e infesta grandes centros urbanos (FONTES, 1998). Estima-se que em São Paulo a quantidade de ninhos de *Coptotermes havilandi* instalados cresça em proporção geométrica, a uma taxa de cerca de 10 % ao ano (MILANO, 1998).

Tradicionalmente o controle das pragas urbanas é realizado através do uso de pesticidas sintetizados quimicamente. Desde a década de 1960 tem havido diversos alertas sobre as consequências do uso indiscriminado de tais produtos, como danos aos seres humanos e outros animais e também ao meio ambiente. Os princípios ativos dos pesticidas são compostos xenobióticos, sendo responsáveis por significativos danos ambientais, visto que muitos deles apresentam velocidade de degradação na natureza extremamente lenta. Tal fato ocorre porque esses compostos são estruturalmente muito diferentes de qualquer outro substrato com o qual as bactérias já tenham entrado em contato. Muitos xenobióticos também acarretam efeitos nocivos e/ou mutagênicos aos organismos vivos, podendo levar à eliminação seletiva de indivíduos e ocasionar modificações na estrutura ecológica e funcional da comunidade biológica (GAYLARD, BELLINASCO e MANFIO, 2005).

Da mesma forma, o principal método de controle de cupins tem sido realizado por meio de pesticidas sintetizados quimicamente. Repelentes, como os piretróides, e os não-repelentes, como o fipronil e o imidacloprido são exemplos dos principais grupos químicos disponíveis para o controle de cupins. Estes, por menos nocivos que sejam, ainda apresentam danos ao meio ambiente e a saúde humana, por serem tóxicos e resistentes á degradação e se acumularem em sedimentos e na biota. As principais características nocivas resultantes desses produtos são: toxicidade para peixes, invertebrados aquáticos e abelhas e contaminantes de cursos d'água. No homem, quando em contato, pode provocar irritações na pele e nos olhos causando dermatites e queimaduras na pele. O produto pode ser absorvido pelas vias respiratórias, dérmica e oral. Assim, o tratamento à base de tais produtos é uma ferramenta importante para o controle de infestações, mas pode ser fonte de poluição ambiental e, se mal realizado, apenas diminui os índices momentâneos da infestação, não atingindo os resultados que se propõe (LAERA, 1998).

Já o controle biológico é uma alternativa valiosa de controle da pragas, pois é uma alternativa ambientalmente amigável e pode contornar diversos dos problemas relacionados aos pesticidas convencionais.

Em decorrência dos fatos mencionados verifica-se a necessidade de contribuir com novos controles da praga que possibilitem a preservação íntegra do patrimônio histórico e cultural e que minimizem os impactos causados pela ação humana. Partindo do pressuposto de que os cupins inferiores não são capazes de sobreviver sem a presença de microrganismos celulolíticos (simbiontes) em seu trato intestinal, o projeto em questão teve como objetivo estudar o potencial inibitório de bactérias e fungos isolados do ambiente contra aqueles microrganismos simbiontes.

2 – OBJETIVO

Objetiva-se com esse estudo isolar do meio ambiente microrganismos produtores de compostos antimicrobianos ativos contra os simbiontes do cupim e, assim, avaliar esta estratégia biotecnológica para o controle da praga. Possibilitando uma nova alternativa para a preservação do patrimônio histórico e cultural.

3- REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Cupins

3.1.1 *O térmita*

Os cupins, também chamados de térmitas, siriris ou aleluias, são insetos sociais que apresentam castas reprodutoras e não reprodutoras.

A ordem Isoptera é constituída por 86 gêneros de insetos, apresentando quase 3000 espécies descritas, e é dividida em sete famílias: Mastotermitidae, Kalotermitidae, Termopsidae, Hodotermitidae, Serritermitidae, Rhinotermitidae e Termitidae. As seis primeiras famílias contemplam os denominados “cupins inferiores”, dependentes de protozoários flagelados simbióticos para a digestão da celulose, enquanto que os membros da família Termitidae são denominados “cupins superiores”, onde seus indivíduos apresentam uma digestão mais evoluída e por isso não necessitam desses protozoários para a degradação da celulose. De acordo com Fontes (1998), na América são conhecidas 550 espécies de cupins, sendo que pouco mais de 200 ocorrem no Brasil.

O principal alimento dos cupins é a madeira, mas alimentam-se também de outros materiais formados por celulose como, por exemplo, humus, vegetais vivos, papel, tecidos *etc.* Mesmo que nem todas as espécies sejam responsáveis por danos, os cupins são comumente associados a prejuízos. Apenas 10% das 2.500 espécies já identificadas são consideradas pragas, ou seja, são capazes de danificar móveis e peças de madeira utilizadas em sistemas construtivos, árvores e plantas cultivadas (FONTES, 1998). Em áreas urbanas, os danos causados em construções são atribuídos a cupins pertencentes a três grupos: (i) cupins de solo ou subterrâneos, capazes de transitar e nidificar no solo, nos vãos estruturais das edificações de alvenaria e nas árvores; (ii) cupins de madeira úmida e (iii) cupins de madeira seca. As demais espécies, além de inofensivas, são importantes na reciclagem de nutrientes dos ecossistemas, por meio da degradação da madeira e de compostos celulósicos em geral. São também responsáveis pela melhoria da qualidade do solo, pois promovem a manutenção ou recuperação da porosidade, aeração, umidade e ciclagem de partículas minerais e orgânicas (FONTES, 1998).

3.1.2 *Metabolismo da celulose*

A celulose (Figura 1) é um polissacarídeo de cadeia longa e elevado peso molecular, no qual é composta por um só monômero, a glicose. A estrutura da celulose é

composta por uma sequência linear de unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas tipo $\beta(1\rightarrow4)$. Este carboidrato representa o principal constituinte estrutural da parede celular dos vegetais.

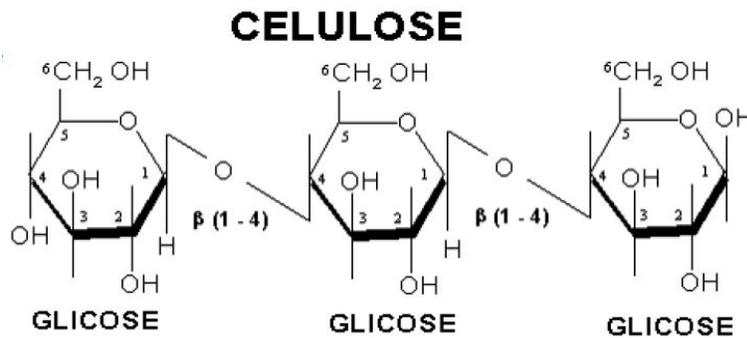


Figura 1 - Estrutura química da celulose (MEDEIROS, 2004).

Os vertebrados não são capazes de digerir a celulose, pois não apresentam enzimas que promovem a hidrólise das ligações $\beta(1\rightarrow4)$. Contudo, alguns herbívoros e cupins conseguem aproveitar a celulose na forma de moléculas de glicose através de relações mutualísticas com bactérias e protozoários produtores de celulases. Protozoários (de modo geral Triconinfas) ou bactérias que habitam o tubo digestivo dos cupins e produzem enzimas (celulases) capazes de digerir a celulose, a qual o cupim é incapaz de degradar (MARTIN, 1991; TOKUDA et al. 1997). Estudos identificaram bactérias isoladas do cupim *Coptotermes curvignathus* capazes de desempenhar papel na digestão da celulose no intestino do térmita. Os isolados foram identificados como *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Chryseobacterium kwangyangense* e *Acinetobacter* (RAMIN, ALIMON e ABDULLAH, 2008).

Se houver um aumento na temperatura ambiente, ou outro fator biológico que culmine na morte dos microrganismos, os cupins também morrerão, pois não serão mais capazes de utilizar a madeira, composta prioritariamente de celulose, como alimento. Como estes organismos vivem no aparelho digestivo dos cupins, eles são eliminados durante o processo de muda e, portanto, após cada ecdise os cupins devem receber novos organismos simbiotes. Para que isso ocorra, os cupins desenvolveram o comportamento de trofalaxia (troca de alimentos entre indivíduos), que pode ser pela boca (alimento estomodeico) ou pelo ânus (alimento proctodeico). Este comportamento e o de canibalismo, que é acentuado, são muito importantes no controle de cupins. Além disso, há um comportamento típico, conhecido como *grooming* (limpeza), através do qual os

indivíduos lambem-se uns aos outros. Esse mecanismo parece funcionar como forma de comunicação, mas, principalmente, agindo na eliminação de partículas estranhas ou patógenos que podem causar doenças em indivíduos de uma colônia, e também deve ser considerado quando da introdução de algum agente de controle destes insetos (NEVES E ALVES, 2000).

3.2 Compostos Antimicrobianos

3.2.1 Conceitos Gerais

Os compostos antimicrobianos são substâncias que, em pequenas quantidades, matam ou inibem o crescimento de um microrganismo. Um antimicrobiano pode ser de origem natural (produzido por bactérias e fungos) ou sintética. Os primeiros têm sido cada vez mais desejáveis, uma vez que são ambientalmente amigáveis: são produzidos em condições mais brandas, geram menores quantidades de resíduos, são normalmente biodegradáveis, entre outros. A sociedade tem buscado cada vez mais produtos rotulados como naturais, o que gera uma vantagem mercadológica importante para estes produtos.

Os agentes microbianos podem agir em várias estruturas celulares dos microrganismos ou interferir os seus processos metabólicos. Os principais mecanismos de ação dos antimicrobianos são (i) Inibição da síntese da Parede Celular: Alguns antibióticos impedem a síntese completa do peptidoglicano, (presente na parede celular de bactérias), conseqüentemente, a parede celular se torna muito frágil, e a célula sofre lise. (ii) Danos à Membrana Citoplasmática: Certos antibióticos, especialmente antibióticos polipeptídicos, promovem alterações na permeabilidade da membrana plasmática. Essas alterações resultam na perda de metabólitos importantes da célula microbiana. (iii) Inibição da tradução: Células eucarióticas apresentam ribossomos 80S, enquanto as células procarióticas possuem ribossomos 70S. Determinados antibióticos reagem com o ribossomo, inibindo a síntese protéica (TORTORA, FUNKE e CASE, 2008).

3.2.2 Testes de atividade antimicrobiana *in vitro*

É possível verificar por meio de teste *in vitro* (antibiograma) o grau de sensibilidade do microrganismo ao antimicrobiano. Esses testes são feitos, com mais frequência, para fins médicos ou de pesquisa científica. O primeiro é usado, por exemplo, para indicar qual agente é mais adequado para combater um patógeno específico num

paciente. No segundo, geralmente, é usado para determinação de atividade de antimicrobianos.

Testes de atividade antimicrobiana podem ser classificados como métodos de difusão, diluição ou bioautográficos (TORTORA, FUNKE e CASE, 2008).

Testes Qualitativos

Os testes de atividade antimicrobiana de caráter qualitativo têm como objetivo identificar se há sensibilidade ou não do microrganismo ao antimicrobiano, não sendo possível medir a “força” do composto. O método de difusão em ágar pela técnica da picagem apresenta esta finalidade, e basicamente consiste em inocular por meio de uma haste tipo agulha o microrganismo com potencial produção de composto antimicrobiano em uma placa de Petri contendo meio ágar sólido e microrganismo teste disposto homogeneamente na superfície do meio de cultura. Durante o processo de incubação, as substâncias antimicrobianas produzidas pelo microrganismo difundem-se para o meio de cultura, inibindo assim, o crescimento do microrganismo teste (Figura 2).

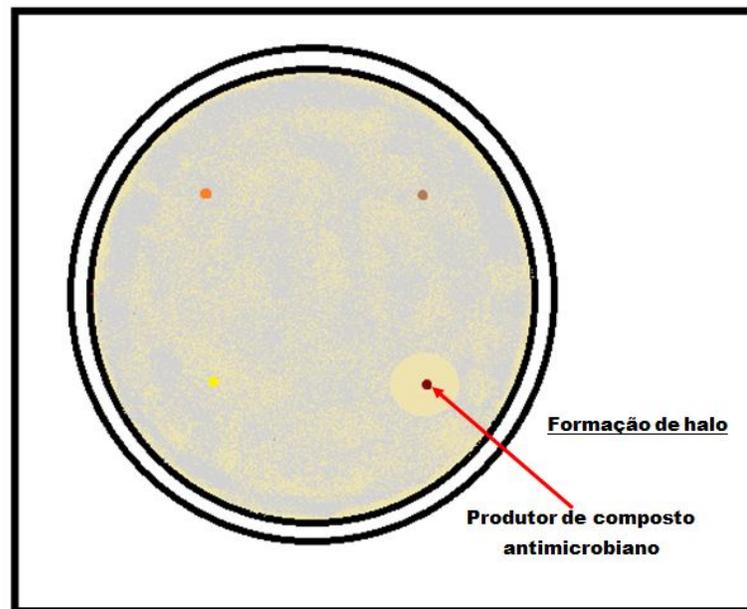


Figura 2 - Esquema do método de difusão em ágar através da técnica de picagem. A presença de halo ao redor da colônia, inoculada por meio da picagem, aponta a capacidade do microrganismo de produzir substâncias de inibição da cultura teste (coloração cinza distribuída na superfície do ágar).

Testes Quantitativos

Em testes qualitativos é medida a “força” do composto antimicrobiano. A pesquisa em questão fez o uso do método de disco-difusão, no qual, é muito empregado para determinação de atividade de antimicrobianos (TORTORA, FUNKE e CASE, 2008), seguido da determinação da UA (unidades arbitrárias). Basicamente o método de disco difusão consiste em inocular uniformemente uma quantidade padronizada do microrganismo teste em uma placa de Petri contendo meio de ágar sólido e, discos de papel filtro embebidos com concentrações conhecidas de antimicrobiano são colocados sobre a superfície do meio. Durante a incubação, as substâncias antimicrobianas difundem-se para o meio de cultura (Figura 3). Esta técnica pode ser empregada para se estimar o potencial de um composto antimicrobiano. Com uma diluição em série, o halo de inibição pode ser medido e “força” do composto, em unidades arbitrárias (UA), pode ser determinada (vide item 4.3.2). Com a UA é possível quantificar matematicamente a atividade antimicrobiana do composto, no qual, é determinada por meio de uma curva padrão da relação linear entre o diâmetro de inibição e o logaritmo da dose construída a partir de diluições seriadas da solução a ser testada (KRIER, REVOL-JUNELLES e GERMAIN, 1998).

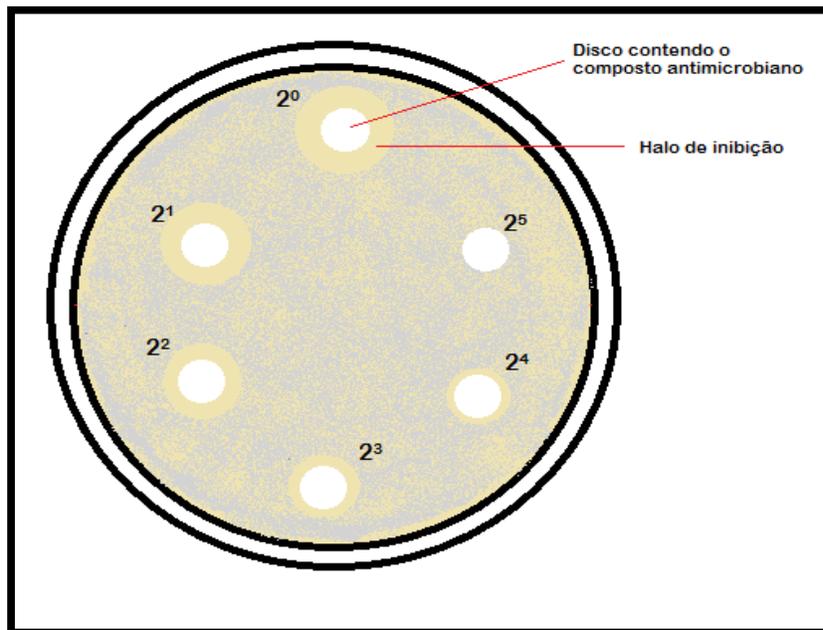


Figura 3 - Esquema da técnica de disco-difusão em ágar. Discos de papel embebidos com o composto antimicrobiano em diferentes concentrações (diluição de razão 2). Maior concentração da substância antimicrobiana resulta em maior zona de inibição.

4- METODOLOGIA UTILIZADA

4.1 Isolamento dos microrganismos

4.1.1 *Microrganismos do cupim (simbiontes)*

Os cupins foram obtidos de madeiras substituídas de uma reforma residencial localizada na cidade de Ouro Preto - Minas Gerais. A espécie do térmita é desconhecida. Contudo seu aspecto é bem semelhante ao cupim de madeira seca. Apresenta como características macroscópicas: cabeça grande e corpo alongado (Figura 4).



Figura 4 - Cupins utilizados como fonte de microrganismos simbiontes, nos quais serão passivos de atividade antimicrobiana.

Os microrganismos alvos dessa pesquisa foram obtidos do interior do inseto e de seus grânulos fecais. Para a obtenção dos microrganismos endógenos do cupim inicialmente foi feita a assepsia dos insetos em álcool 70% por um minuto, hipoclorito de sódio 1% por cinco minutos e então enxaguados com água destilada esterilizada (adaptado de SILVA et al., 2006). Após secagem, os insetos foram rompidos em placa de Petri contendo o meio CMC-ágar (em g.L⁻¹: NaNO₃ 2,0; K₂HPO₄ 1,0; MgSO₄ 0,5; KCl 0,5; carboximetilcelulose 2,0; peptona 0,2; ágar 17,0). Conforme descrição acima, a carboximetilcelulose é a única fonte de carbono presente no meio químico sintético. Os

isolados dos grânulos fecais foram obtidos da inoculação de uma porção da amostra em placa de Petri contendo o meio CMC-ágar, por meio de uma alça de platina.

As placas foram incubadas em estufa por 48 horas a 30°C. Após o desenvolvimento dos microrganismos, verificou-se quais colônias apresentavam características morfológicas distintas. Com o objetivo de obter culturas puras, cada uma dessas colônias foi inoculada em um novo meio CMC-ágar por meio da técnica esgotamento por estrias compostas (Figura 5). Essa técnica foi repetida até a obtenção de colônias com características morfológicas idênticas (cultura pura).

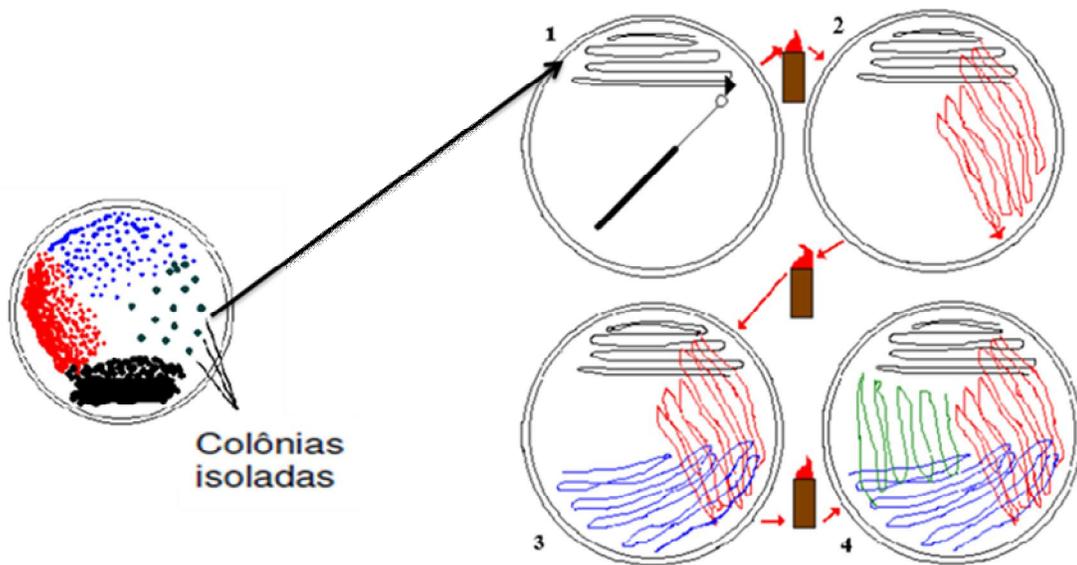


Figura5 - Esquema da técnica de esgotamento por estrias compostas usada para a obtenção de uma colônia derivada de uma única célula ancestral. Através de uma alça de sementeira esgota-se o inóculo por meio de estrias na superfície do meio.

Fonte: dc93.4shared.com/doc/QUssPoIP/preview.html

Para comprovar a existência de culturas puras, bem como, analisar suas características morfológicas foi realizada análise em microscópio óptico após coloração de Gram. As culturas foram armazenadas em tubo contendo o meio inclinado de Ágar Nutriente e mantidas a 4°C.

4.1.1.1 Identificação das linhagens celulolíticas

A confirmação da natureza celulolítica dos isolados do cupim foi realizada segundo a técnica estudada por Kasana et al., 2008: cada microrganismo isolado do cupim foi

inoculado em placa contendo o meio CMC-ágar. Após a incubação a 30°C por 48 horas, as placas foram inundadas com corante Lugol de Gram. A formação de um halo ao redor da colônia sugere a produção de celulase pela mesma (KASANA et al, 2008). Todos os microrganismos selecionados como produtores de celulase foram considerados potencialmente simbióticos do cupim.

4.1.2 Microrganismos do ambiente

Além dos microrganismos associados ao cupim foram isolados microrganismos do ambiente como, por exemplo, em água, solos, folhas e diversos alimentos, a fim de testá-los contra os microrganismos potencialmente simbióticos do cupim. O isolamento foi realizado através da técnica de esgotamento por estrias compostas (Figura 5) (TORTORA, FUNKE e CASE, 2008). Para comprovar a existência de culturas puras, bem como analisar suas características morfológicas foi realizada análise em microscópio óptico após coloração de Gram. As culturas foram armazenadas em tubo contendo o meio inclinado Ágar Nutriente e mantidas a 4°C.

4.2 Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar

A verificação do potencial inibitório de determinadas bactérias e fungos contra os simbiontes do cupim foi realizada através do método de difusão em ágar com base na técnica de picagem (Figura 2). Inicialmente os inóculos dos celulolíticos foram padronizados ($\sim 10^6$ UFC, suspensas em solução 8,75 g.L⁻¹ NaCl). Em seguida semeou-se uniformemente o inóculo padronizado na superfície do ágar Nutriente. Após 30 minutos em estufa a 30°C para secagem da superfície do ágar, microrganismos distintos foram inoculados por meio de picadas no ágar, com o objetivo de verificar a produção de substância antimicrobiana. As placas foram então incubadas em estufa a 30 °C por 24 h. Esse procedimento foi realizado em duas repetições independentes. Os microrganismos do ambiente considerados como produtores de compostos antimicrobianos apresentaram halo de inibição de crescimento dos isolados do cupim. A zona de inibição (diferença entre diâmetro total do halo e o diâmetro do disco) foi determinada para todas as colônias e foram escolhidas para os testes subsequentes todas as culturas que geraram maior dimensão da zona de inibição.

4.3 Seleção dos compostos antimicrobianos

As culturas selecionadas na etapa anterior foram submetidas a uma análise quantitativa, a fim de selecionar um composto antimicrobiano com maior concentração (maior valor em Unidades Arbitrárias - UA). Para a seleção inicialmente realizou-se a produção do extrato antimicrobiano bruto (item 4.3.1).

4.3.1 Produção do composto inibitório

A produção do composto antimicrobiano foi realizada por meio de fermentação submersa. Para tanto, os microrganismos selecionados conforme descrito no item 4.2 foram cultivados em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de Caldo Nutriente por 24h a 30°C e 150 rpm. Após o crescimento, o meio de cultivo foi centrifugado a 3500rpm por 30 min. O sobrenadante gerado (chamado extrato antimicrobiano bruto) foi empregado para avaliar a atividade antimicrobiana, conforme mostrado na sequência (adaptado de MOTTA, CLADERA-OLIVERA e BRANDELLI, 2004).

4.3.2 Análise quantitativa: método de difusão em ágar e determinação da UA

As culturas capazes de formar maior zona de inibição foram submetidas a uma análise quantitativa na qual se mensurou o potencial inibitório das amostras selecionadas. Para tanto, utilizou-se o método de difusão de ágar por meio de discos de papel filtro contendo o extrato antimicrobiano bruto (item 4.3.1) (Figura 3). O procedimento foi realizado da seguinte maneira: semeou-se uniformemente o inóculo padronizado ($\sim 10^6$ UFC dos simbiontes, suspensas em solução 8,75 g.L⁻¹ NaCl) na superfície do Ágar Nutriente. Após 30 minutos em estufa a 30°C para secagem da superfície do ágar foram aplicados discos de papel de filtro estéreis (poros com 14µm com gramatura de 80 g/m²) previamente embebidos com 10 µL do extrato antimicrobiano bruto (MOTTA & BRANDELLI, 2002; WILKINSON et al., 2003). O título da atividade antimicrobiana, expresso como unidades arbitrarias (UA) por mL, foi determinado por meio de uma curva padrão da relação linear entre o diâmetro de inibição e o logaritmo da dose construída a partir de diluições seriadas (razão 2) da solução a ser testada. Uma UA foi definida como a recíproca da maior diluição capaz de mostrar halo de inibição definido (KRIER, REVOL-JUNELLES e GERMAIN, 1998). Todas as amostras foram testadas em 2 replicatas independentes. Para os ensaios subsequentes, considerou-se apenas o extrato antimicrobiano bruto que resultou em maior valor de UA.

4.4 Estabilidade dos compostos antimicrobianos

Com a finalidade de monitorar a estabilidade térmica do composto antimicrobiano, amostras de 1 mL da solução (extrato antimicrobiano bruto) foram tratadas com os seguintes binômios tempo \times temperatura: $-18^{\circ}\text{C}/7$ dias, $35^{\circ}\text{C}/30$ min e $45^{\circ}\text{C}/30$ min. Para o teste de estabilidade frente a diferentes valores pH, as amostras (extrato antimicrobiano bruto) foram diluídas em valores de pH de 6,8 e 10. Após 1h, o pH foi reajustado para o valor de 7,0.

Após os tratamentos aqui mencionados, os compostos antimicrobianos no extrato antimicrobiano bruto foram quantificados conforme apresentado no item 4.3.2. Todas as análises foram realizadas em três replicatas independentes. Os resultados obtidos foram confrontados com o extrato antimicrobiano não tratado e a atividade residual do composto antimicrobiano foi determinada para cada tratamento.

5- ANÁLISE DOS RESULTADOS

5.1 Isolamento dos microrganismos do cupim e de amostras ambientais

Foram isolados do cupim 10 microrganismos. Por meio da análise de microscopia óptica foi constatada a existência de dez culturas puras, sendo todas bacilos Gram-positivo (Tabela 1).

Tabela 1 - Informações sobre os microrganismos isolados do interior e dos grânulos fecais do cupim.

Cultura	Origem da coleta	Caracterização
C1	Interior	bacilos Gram-positivo
C2	interior	bacilos Gram-positivo
C3	interior	bacilos Gram-positivo
C4	interior	bacilos Gram-positivo
C5	interior	bacilos Gram-positivo
C6	interior	bacilos Gram-positivo
C7	grânulos fecais	bacilos Gram-positivo
C8	grânulos fecais	bacilos Gram-positivo
C9	interior	bacilos Gram-positivo
C10	grânulos fecais	bacilos Gram-positivo

Foi criado um banco de cepas totalizando 44 microrganismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos) obtidos de diversas fontes ambientais a fim de testá-los contra os microrganismos simbióticos do cupim. Destes, 26 foram caracterizados como bacilos Gram-negativo e 12 como bacilos Gram-positivo. Foram ainda obtidos quatro fungos filamentosos e duas leveduras.

5.2 Avaliação da produção de celulase pelos microrganismos do cupim

Foi identificado que as culturas C5, C6 e C8 (Tabela 1) apresentaram halo no meio de cultura CMC-ágar quando inundado com corante Lugol de Gram (Figura 6), o que indica produção da enzima celulase por estes microrganismos (KASANA et al, 2008). Como os cupins necessitam de microrganismos celulolíticos para sua sobrevivência (MEDEIROS, 2004), estas três linhagens foram, portanto, selecionadas como potencialmente simbióticas dos cupins.

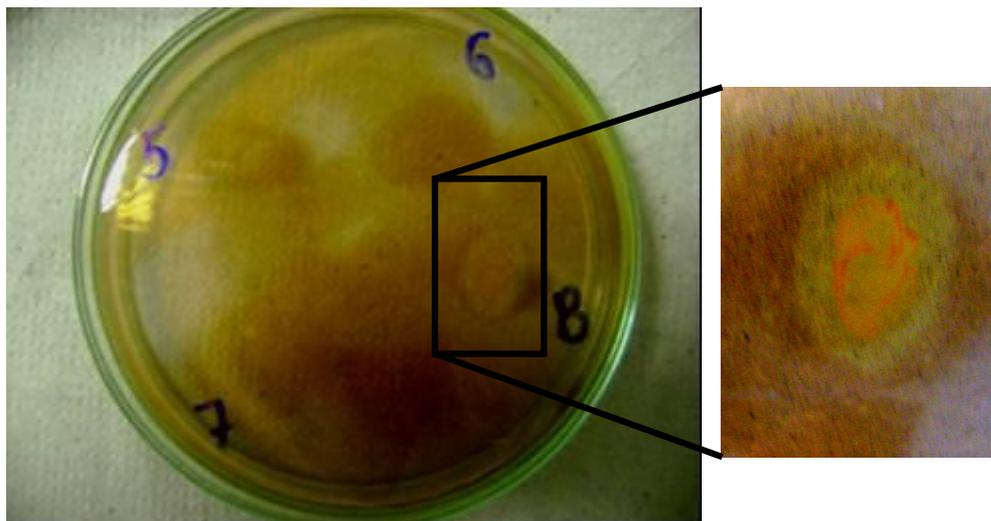


Figura 6 – Identificação das linhagens celulolíticas isoladas do cupim: halo para a cultura C8 no meio de cultura CMC-ágar inundado com iodo.

5.3 Identificação de microrganismos produtores de compostos antimicrobianos

Apenas a cultura C8 se mostrou sensível a alguns microrganismos do isolados do ambiente. Nenhuma das outras linhagens potencialmente simbióticas do cupim (C5 e C6) se mostrou sensível a qualquer linhagem isolada do meio ambiente.

Foram identificados sete microrganismos isolados do meio ambiente (41.001, 31.021, 31.022, 22.025, 31.032, 31.042 e 31.044) capazes de formar halo de inibição de crescimento contra a cultura C8, cuja origem e caracterização estão apresentadas na tabela 2. A tabela 3 apresenta os valores da zona de inibição média dos halos de inibição obtidos para os microrganismos testados.

Tabela 2 – Informações sobre os microrganismos capazes de formar halos de inibição contra a cultura C8 (potencialmente simbiote do cupim) pelo método de difusão em ágar.

Microrganismo do ambiente	Origem da coleta	Caracterização
41.001	folha da laranja	bacilos gram-negativo
31.021	Solo	bacilos gram-positivo
31.022	acerola	bacilos gram-positivo
22.025	queijo	Levedura
31.032	queijo	bacilos gram-positivo
31.042	queijo	bacilos gram-positivo
31.044	queijo	bacilos gram-positivo

Tabela 3 – Valores das médias dos halos de inibição do crescimento microbiano da cultura C8 em cm, pelo método de difusão em ágar – técnica de picagem.

Microrganismo do ambiente	Zona de inibição média do halo (cm)
41.001	0,67
31.021	0,15
31.022	0,12
22.025	0,10
31.032	0,57
31.042	0,53
31.044	0,48

Conforme apresentado na Tabela 3, verificou-se que os microrganismos 41.001, 31.032 e 31.042, isolados do meio ambiente, foram os que se mostraram capazes de formar maior dimensão da zona de inibição, e por isso foram escolhidos para os estudos subsequentes.

5.4 Seleção de compostos antimicrobianos por meio da difusão em ágar

A cultura 31.042 apresentou maior atividade antimicrobiana do que as culturas 41.001 e 31.032, verificada pelo valor de Unidades Arbitrárias de compostos antimicrobianos no extrato antimicrobiano bruto (Gráfico 1 e Tabela 4). Este resultado mostra que o extrato antimicrobiano bruto da linhagem 31.042 pode sofrer uma diluição maior que os demais para atingir o limiar de detecção da técnica (máxima diluição capaz de formar halo de inibição aparente) (KRIER, REVOL-JUNELLES e GERMAIN, 1998). Embora a cultura 31.042 não tenha apresentado maior halo de inibição (tabela 3), não é surpreendente que ela tenha apresentado a maior atividade antimicrobiana, pois esta depende da inclinação da reta mostrada no gráfico 1 e não diretamente da zona de inibição apresentada na tabela 3 (extrato antimicrobiano bruto sem diluição).

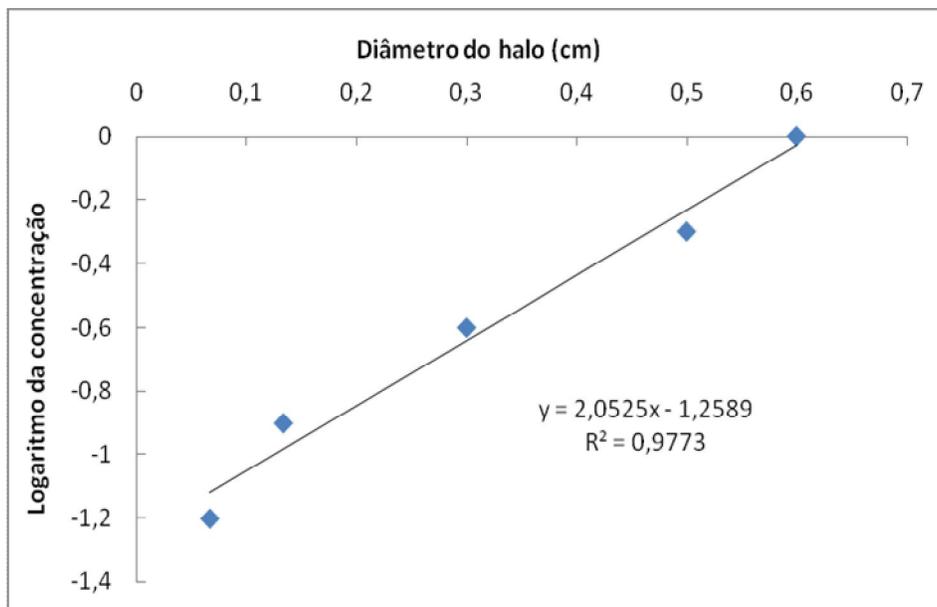


Gráfico 1- Curva padrão para obtenção da UA do extrato antimicrobiano bruto obtido a partir da cultura 31.042: relação linear entre a diâmetro de inibição e o logaritmo da concentração construída a partir de diluições seriadas (razão 2) da solução a ser testada.

Tabela 4 – Resultados dos valores de Unidades Arbitrárias (UA) para as culturas 41.001, 31.032 e 41.042.

Microrganismo do ambiente	UA
41.001	14,5
31.032	17,4
31.042	18,2

5.5 Estabilidade dos compostos antimicrobianos

Nesta etapa foi analisada a estabilidade dos compostos antimicrobianos frente a diferentes condições de pH e temperatura, essa análise é essencial para o desenvolvimento de processos de produção e aplicação do composto de interesse. No quadro a seguir encontram-se os valores de UA para cada tratamento.

Quadro 1- Valores de UA determinados para a cultura 31.042.

TRATAMENTO		UA
Temperatura	Sem tratamento	18,2
	-18°C	0,0
	35°C	25,0
	45°C	38,6
	Congelada	16,3
pH	controle pH	33,1
	6,8	25,2
	10	28,6

Com base nos resultados apresentados acima verifica-se que tratamentos térmicos a 35°C ou 45°C por 30 min não resulta em perda de estabilidade do antimicrobiano (Figura 7). Há indícios que o aumento de temperatura pode promover a atividade antimicrobiana do composto produzido, mas são necessários mais estudos com uma faixa mais ampla de temperatura, para confirmar esta hipótese. Pode-se notar ainda que o composto antimicrobiano produzido não pode ser estocado na forma congelada por sete dias ou mais, visto que ele perde completamente sua atividade com o tratamento de -18°C por 7 dias. O

extrato antimicrobiano bruto, logo após ser produzido, apresenta um pH ~8. A alteração do seu pH para 6,8 e 10 não resultou em perda aparente de atividade.



Figura 7 – Ensaio para triplicata para a determinação da estabilidade do efeito antimicrobiano. A figura mostra as diferentes diluições (10^0 - 10^5) do extrato antimicrobiano bruto tratado a 45°C por 30 min.

6- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos encorajam experimentos *in vivo* para determinar se o composto antimicrobiano produzido pela bactéria Gram-positiva isolada do meio-ambiente apresentam uso potencial no controle de cupins. O antimicrobiano não apresentou perda de atividade quando submetido a temperaturas de 35°C e 45°C por 30 min e pH de 6,8 e 10. Já em temperatura 18°C por 7 dias observou-se perda de sua estabilidade, portanto não pode ser estocado na forma congelada por 7 dias ou mais.

Os testes *in vivo* necessitam de conhecimento intenso sobre a biologia, sociedade e cultivo em laboratório dos cupins. A ausência dessas informações até a entrega do trabalho final impossibilitou testar o antimicrobiano em amostras de madeira infestadas por cupim.

Testes futuros constatarão se o composto antimicrobiano apresenta uso potencial no controle de cupins.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**. v. 94, p. 223– 253, 2004.

ELEOTÉRIO, E. S. R. **Levantamento e identificação de cupins (Insecta: Isoptera) em área urbana de Piracicaba, SP**. Dissertação de mestrado. ESALQ/USP, Piracicaba, SP. 2000.

FONTES, L. R. **Considerações sobre a complexidade da interação entre o cupim subterrâneo, *Coptotermes havilandi*, e a arborização no ambiente urbano**. In: Fontes, L. R.; Berti Filho, E. (Org.). *Cupins: o desafio do conhecimento*. 1ª ed. Piracicaba: FEALQ. p. 109-124. 1998.

GAYLARD, C.C ; BELLINASCO, M.L ; MANFIO, G.P. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação. **Biologia Ciência e Desenvolvimento**. V.34, p. 36-41, 2005

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plate using Gram's iodine. **Current Microbiology**. V. 57, n. 503-507, 2008.

KRIER, F., REVOL-JUNELLES, A.M. and GERMAIN, P. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenterides* subsp. *mesenterides* FR52 during batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. V. 50, n. 359-363, 1998.

LAMBERT, R.J.W.; PEARSON, J. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. **Journal of Applied Microbiology**. V. 88, n. 784-790, 2000.

LAERA, L. H. N. **Cupins na arborização urbana no município do Rio de Janeiro, Brasil**. In: Fontes, L. R.; Berti Filho, E. (Org.). *Cupins: o desafio do conhecimento*. 1ª ed. Piracicaba: FEALQ. p. 125-132. 1998.

LELIS, A. T. O papel do patrimônio histórico na pesquisa de novos métodos de controle de cupins. Boletim da ABRACOR - Mar/Abr/Mai 2001

MARTIN, M. M. The evolution of cellulose digestion in insects. **Philosophical Transactions: Biological Sciences**. V. 33, n. 281-288, 1991.

MEDEIROS, M.B. Metabolismo da celulase em isoptera: como agem os flagelos que nidificam o intestino dos cupins inferiores. **Biologia Ciência e desenvolvimento**. V.33, p. 76-81, 2004

MILANO, S. **Diagnóstico e controle de cupins em áreas urbanas**. In: Fontes, L. R.; Berti Filho, E. (Org.). Cupins: o desafio do conhecimento. 1ª ed. Piracicaba: FEALQ. p. 45-74. 1998.

MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**. V. 92, n. 63-70, 2002.

MOTTA, A. S.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI A. Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon basin. **Brazilian Journal of Microbiology**. V. 35, n. 307-310, 2004.

NEVES, P. M. O. J.; ALVES, S. B. Grooming capacity inhibition in *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) inoculated with entomopathogenic fungi and treated with imidacloprid. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. V. 29, n. 537-545, 2000.

RAMIN, M.; ALIMON, A.R.; ABDULLAH N. Identification of cellulolytic bacteria isolated from the termite *Coptotermes curvignathus* (Holmgren). **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**. V. 17, n.103–116, 2009 .

SILVA, G. H.; TELES H. L., ZANARDI L. M., YOUNG M. C. M., EBERLIN M. N., HADAD R., PFENNING L. H., COSTA-NETO C. M., CASTRO-GAMBOA I., BOLZANI V. S., ARAÚJO A. R. Cadinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). **Phytochemistry**. v. 67, p. 1964-1969, 2006.

TOKUDA, G.; WATANABE, H.; MATSUMOTO, T.; NODA, H. Cellulose digestion in the wood-eating higher termite, *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki): distribution of cellulases and properties of endo- β -1,4-glucanase. **Zoological Science**. v. 14, p. 83-93, 1997.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 894 p.

WILKINSON, J. M.; HIPWELL, M.; RYAN, T.; CAVANAGH H. M. A. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: antibacterial and antifungal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 51, p. 76-81, 2003.