UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PRPGP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO – PPGEC

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICÓTICA DA SECREÇÃO DEFENSIVA DE *Nasutitermes corniger* (ISOPTERA: NASUTITERMITINAE)

ANTONIO PAULINO DE MELLO

Campina Grande
2014

ANTONIO PAULINO DE MELLO

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICÓTICA DA SECREÇÃO DEFENSIVA DE *Nasutitermes corniger* (ISOPTERA: NASUTITERMITINAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Estadual da Paraíba, como um dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Orientadora: Profª Drª Maria Avany Bezerra-Gusmão (UEPB)
Co-orientador: Prof. Dr. Neucírio Ricardo de Azevedo (UFG)

CAMPINA GRANDE
2014

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.

M527c Mello, Antônio Paulino de.
Composição química e atividade antimicótica da secreção defensiva de Nasutitermes corniger (Isoptera: Nasutitermitinae) [manuscrito] / Antônio Paulino de Mello. - 2014.
63 p. : il. color.

Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação, 2014.
"Orientação: Prof. Dr. Maria Avany Bezerra Gusmão, Departamento de Biologia".
"Co-Orientação: Prof. Dr. Neucírio Ricardo Azevedo, Departamento de Química".
1. Cupins. 2. Terpenos. 3. Defesas químicas. 4. Fungos. I. Título.

21. ed. CDD 595.736

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICÓTICA DA SECREÇÃO DEFENSIVA DE *Nasutitermes corniger* (ISOPTERA: NASUTITERMITINAE)

Antonio Paulino de Mello

Aprovado em 27 de Fevereiro de 2014.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Maria Avany Bezerra Gusmão (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba –UEPB/CCBS/DB

Prof. Dra. Flávia Maria da Silva Moura (Titular)
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/CSTR/UACB

Prof. Dra.Vírginia Farias Pereira de Araújo (Tituluar)
Universidade Estadual da Paraíba –UFPB/CCEN/DSE

Prof. Dr. Eduardo Barbosa Beserra (Suplente)
Universidade Estadual da Paraíba –UEPB/CCBS/DB

Prof. Dra. Hélida Ferreira Cunha (Suplente)
Universidade Estadual de Goiás – UEG/UnUCET

A Deus, à minha família,
à todos os meus amigos e a todas as pessoas
que contribuíram direta ou indiretamente
para a construção deste trabalho,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus que com sua infinita sabedoria conduziu meus passos durante minha trajetória acadêmica. A ele eu dedico toda conquista alcançada na minha vida.

A minha querida família, meus pais, meus irmãos e sobrinhos, por todo amor, incentivo e compreensão.

A Profª. Drª. Maria Avany Bezerra-Gusmão por ter me apresentado à vida acadêmica e a Termitologia, por ter me orientado desde a graduação com uma relação de amizade, respeito, responsabilidade, e ter colaborado de forma tão definitiva para a minha formação profissional e início da carreira acadêmica.

Aos amigos que me auxiliaram nos trabalhos de campo: Mirele Cavalcante, Ana Márcia Barbosa, Gesilândia Santos, Bruno Guedes, Kátia Cristina, Rebeca Kianny e Amanda Cosme.

A querida Profª. Drª. Élida Barbosa Correa pela disponibilidade e orientação nos procedimentos de isolamento, identificação e bioensaios utilizando-se os fungos isolados dos ninhos.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do CCAA/UEPB: Alisson Queiroz, Antonio Manoel, Yuri Santos e Tricya Farias, por todo companheirismo, auxílio e momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Neucírio Ricardo Azevedo e ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, pela orientação e apoio dado a pesquisa.

Aos grandes amigos do mestrado: Ana Márcia Barbosa, Bruno Guedes e Raiane Santos, por estarem sempre por perto buscando auxiliar uns aos outros quando necessário e pelos momentos de desconcentração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação e todos os professores e funcionários, em especial: Drª. Maria Avany Bezerra-Gusmão, Drª. Joseline Molozzi, Drª. Thelma Dias, Dr. Eduardo Barbosa Beserra, Dr. Sérgio de Faria Lopes e Dr. José Etham Barbosa Lucena, pelas sugestões e ensinamentos.

Aos professores: Dr. Eduardo Barbosa Beserra, Drª. Hélida Ferreira Cunha, Drª. Virgínia Farias P. de Araújo e a Drª. Flávia Maria da Silva Moura, por aceitarem participar da banca examinadora e pelas contribuições futuras.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos meu eterno agradecimento!

RESUMO GERAL

Os fungos constituem um dos micro-organismos entomopatógenos mais impactantes à sanidade das colônias termíticas. A capacidade de controlar o crescimento microbiano, especialmente de fungos patogênicos e competidores, pode ser benéfica para os cupins. A secreção defensiva dos Nasutitermitinae apresenta indícios de atuar neste controle, porém esta secreção apresenta variações químicas intraespecíficas na sua composição. O estudo avaliou a variabilidade das substâncias encontradas em 20 populações de *Nasutitermes corniger* de área urbana, 10 ninhos em áreas de Brejo de altitude e 10 em Caatinga no Nordeste do Brasil. Também verificou-se a riqueza fúngica associada aos ninhos, e a ação antimicótica dos compostos químicos majoritários (α-pineno, β- pineno e Limoneno) produzidos por *N. corniger* frente à colonização de fungos patógenos isolados dos ninhos. A identificação da composição química foi realizada por cromatrografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Para os bioensaios, os fungos foram isolados do material do ninho, diluindo-se 1 g de cada amostra até 10^{-4}, em seguida semeada em placas de Petri, sob o meio BDA. O ensaio foi realizado com quatro réplicas e as placas incubadas durante cinco dias à temperatura ambiente. Das 18 substâncias foram identificadas, α-pineno representou 64,89% em uma das populações. A análise de PCA mostrou que os dois primeiros componentes foram responsáveis por 95,43% da variância total. E a análise de agrupamento classificou as populações em dois grupos principais: O grupo I, área de Brejo de altitude, revelou elevadas quantidades de α-pineno, β- pineno, 2-hexanol e 3-hexanol, enquanto o grupo II, área de caatinga, mostrou elevadas quantidades de α-pineno, β- pineno e limoneno. Registrou-se 23 morfotipos de fungos, distribuídos em oito gêneros. Os ninhos localizados nas duas áreas de Brejo de Altitude apresentaram maior riqueza (A1: 17 e A2: 12) e diversidade de fungos (H=1,04 e H=0,92, respectivamente). *Penicillium* sp.1, *Aspegillus flavus* e *A. niger* estiveram presentes em todos os ninhos estudados. Os gêneros *Penicillium, Cladosporium* e *Aspergillus* (*A. flavus* e *A. niger*) foram os isolados mais frequentes e abundantes nos quatro pontos de coleta. O α-pineno, principal componente da secreção defensiva, apresentou eficiência de contato e volátil nas fases vegetativa e reprodutiva dos fungos testados, verificando-se variações conforme a fase de desenvolvimento e a espécie do fungo. Contudo, os testes do efeito sinergético mostraram os melhores resultados de inibição, com eficiência das substâncias em todas as concentrações testadas, mesmo em baixas concentrações. Sugere-se que as pressões ambientais e os fatores climáticos de cada ecorregião influenciem nos padrões ecológicos de riqueza, abundância e diversidade micótica nos ninhos de *N. corniger,* e ainda na caracterização dos padrões fenotípicos da secreção defensiva, resultando na formação de dois ecótipos. No entanto, esta afirmação deve ser reforçada por estudos futuros, com ampliação do esforço amostral e análise de um possível efeito sazonal.

Palavras-chave: Cupim, terpenos, defesa química, fungos.

ABSTRACT

Fungi are one of the most impactful to sanity termíticas colonies of entomopathogenic microorganisms. The ability to control microbial growth, especially pathogenic fungi and competitors, it can be beneficial to termites. The defensive secretion of Nasutitermitinae show evidence of working in this control, but this secretion has intraspecific variation in their chemical composition. The study evaluated the variability of the substances found in 20 populations of *Nasutitermes corniger* urban area, 10 nests in areas of heath altitude and 10 in Caatinga in northeastern Brazil. Also there was a fungal richness associated with nests, and antimycotic action of the major chemical compounds (α - pinene, β - pinene and limonene) produced by *N. corniger* front of the colonization of pathogenic fungi isolated from nests. The identification of the chemical composition was performed by mass spectrometer coupled to cromatrografia gas. For bioassays, the fungi were isolated from the nest material, diluting 1 g of each sample to 10^{-4} then sown in Petri dishes on PDA medium. The assay was performed with four replicas and the plates incubated for five days at room temperature. Of the 18 substances have been identified, α - pinene accounted for 64.89 % in one population. The PCA analysis showed that the first two components accounted for 95.43% of the total variance. And cluster analysis classified the populations into two main groups: Group I, altitude heath area revealed high amounts of α - pinene, β - pinene, 2 - hexanol and 3 - hexanol, whereas group II area caatinga showed high amounts of α - pinene, β - pinene and limonene. Registered 23 morphotypes of fungi, belonging to eight genera. Nests located in two areas of heath Altitude higher richness (A1: A2 17 and 12) and fungal diversity (H = 1.04 and H = 0.92 , respectively) . *Penicillium* sp.1, *Aspergillus flavus* and *A. niger* were present in all nests studied. *Penicillium* , *Cladosporium* and *Aspergillus* (*A. flavus* and *A. niger*) genera were the most frequent and abundant isolates in the four collection points. The α - pinene, the main component of the defensive secretion, showed efficiency of contact and volatile during vegetative and reproductive stages of the fungi tested, verifying changes according to the stage of development and species of the fungus. However, the synergistic effect tests showed the best results in inhibition efficiency with the substances in all concentrations tested, even at low concentrations. It is suggested that environmental stress and climatic factors of each ecoregion influence on ecological patterns of richness, abundance and fungal diversity in the nests of *N. corniger*, and also to characterize the phenotypes of the defensive secretion, resulting in the formation of two ecotypes. However, this statement should be strengthened by future studies with larger samples and analysis effort of a possible seasonal effect.

Keywords: Termite, chemical defense terpenos, fungi.

LISTA DE FIGURAS – Manuscrito 1

Fig.01. Locais de coleta dos ninhos em áreas de Brejo de Altitude: Areia (**A**) e Bananeiras (**B**), e Semiáridas: Pocinhos (**C**) e Campina Grande (**D**), no Agreste paraibano, Nordeste do Brasil.....21

Fig.02. Análise de Componentes Principais dos constituintes químicos da secreção defensiva de populações de *Nasutitermes corniger* em áreas urbanas de regiões de Brejo de Altitude (A1, A2, A3, A4, A5, B1, B2, B3, B4 e B5) e Semiáridas (P1, P2, P3, P4, P5, CG1, CG2, CG3, CG4 e CG5), NE do Brasil, 2013. A – Areia; B – Bananeiras; P – Pocinhos; CG – Campina Grande.....24

Figura 3- Ordenação da análise de escalonamento multidimensional não métrica (n-MDS) das similaridades entre as populações de *Nasutitermes corniger* com relação à sua composição química da secreção defensiva em área urbana de Brejo de altitude e semiárida no NE do Brasil, 2013. (Áreas de Brejo de altitude: A1, A2, A3, A4, A5, B1, B2, B3, BA e B5; Áreas de Caatinga: P1, P2, P3, P4, P5, CG1, CG2, CG3, CG4 e CG5).....25

Figura 4. Análise de agrupamento (UPGMA) das populações de *Nasutitrmes corniger* com relação à sua composição química da secreção defensiva em área urbana de Brejo de altitude - Grupo I (A1, A2, A3, A4, A5, B1, B2, B3, BA e B5) e de Caatinga - Grupo II (P1, P2, P3, P4, P5, CG1, CG2, CG3, CG4 e CG5) no NE do Brasil, 2013.....25

Figura 5. Análise de correlação entre a matriz dos constituintes voláteis da secreção defensiva de *Nasutitermes corniger* e as variáveis ambientais (temperatura, precipitação, umidade do ar e do solo, percentuais de areia, argila, silte, matéria orgância, carbono e ph do solo) no Agreste paraibano, 2013.....27

LISTA DE TABELAS – Manuscrito 1

Tabela 1- Composição percentual média (± desvio-padrão) de substâncias identificadas na secreção de defesa de *Nasutitermes corniger* em área urbana de Brejo de Altitude e Semiárida no NE do Brasil, 2013.....23

LISTA DE FIGURAS - Manuscrito 2

Figura 1. Locais de coleta dos ninhos em áreas de Brejo de Altitude: Areia (**A**) e Bananeiras (**B**), e Semiáridas: Pocinhos (**C**) e Campina Grande (**D**), no Agreste paraibano, Nordeste do Brasil.....39

Figura 2. Ordenação da análise de escalonamento multidimensional não métrica (n-MDS) da similaridade micótica isolada de ninhos de *Nasutitermes corniger* entre as áreas urbanas de Brejo de altitude e Caatinga, NE do Brasil, 2013.....44

Figura 3. Ordenação da análise de escalonamento multidimensional não métrica (n-MDS) da similaridade entre as áreas de coleta, com base nas variáveis climáticas (temperatura, precipitação, umidade do ar) e edáficas (Percentual de areia, silte, umidade do solo, pH, matéria orgânica e carbono) das áreas de Brejo de altitude e Semiárido, no Agreste paraibano, NE do Brasil, 2013.....45

Figura 4. Efeito dos monoterpenos: a-pineno nas médias de crescimento radial (A) e produção de esporos (B); b-pineno nas médias de crescimento radial (C) e produção de esporos (D); Limoneno nas médias de crescimento radial (E) e produção de esporos (F); e efeito sinergético de a-pineno+b-pineno+limoneno nas médias de crescimento radial (G) e produção de esporos (H).....48

LISTA DE TABELAS – Manuscrito 2

Tabela 1 - Fungos em ninhos de cupins *Nasutitermes corniger* em áreas de Brejo de altitude e Semiáridas, Nordeste do Brasil, 2013.....43

Tabela 2. Riqueza de espécies (S), número total de colônias fúngicas (N), dominância (D), índice de diversidade de Shannon (H'), equitabilidade (E) de fungos isolados dos ninhos de *Nasutitermes corniger*, em região semiárida do Nordeste do Brasil, 2013.....44

Tabela 3. Efeito do α-pineno sob o crescimento radial, a produção e germinação de esporos de fungos isolados de ninhos de *Nasutitermes corniger* em área urbana de Brejo de altitude e semiárida, NE do Brasil, 2013. (PA= *Paecilomyces* sp.; PE= *Penicillium* sp.; CL= *Cladosporium* sp.).....49

Tabela 4. Efeito do β -pineno sob o crescimento radial, a produção e germinação de esporos de fungos isolados de ninhos de *Nasutitermes corniger* em área urbana de Brejo de altitude e semiárida, NE do Brasil, 2013. (PA= *Paecilomyces* sp.; PE= *Penicillium* sp.; CL= *Cladosporium* sp.).....49

Tabela 5. Efeito do Limoneno sob o crescimento radial, a produção e germinação de esporos de fungos isolados de ninhos de *Nasutitermes corniger* em área urbana de Brejo de altitude e semiárida, NE do Brasil, 2013. (PA= *Paecilomyces* sp.; PE= *Penicillium* sp.; CL= *Cladosporium* sp.).....50

Tabela 6. Efeito sinergético dos monoterpenos α-pineno, β- pineno e Limoneno sob o crescimento radial, a produção e a germinação de esporos de fungos isolados de ninhos de *Nasutitermes corniger* em área urbana de Brejo de altitude e semiárida, NE do Brasil, 2013. (PA= *Paecilomyces* sp.; PE= *Penicillium* sp.; CL= *Cladosporium* sp.).....50

SUMÁRIO

1.Introdução geral 12

2.Objetivos

2.1.Geral.....14

2.2.Específicos.....15

3.Perguntas e Hipóteses.....15

4.Área de estudo.....16

Manuscrito 1 - Composição e variabilidade química dos constituintes da secreção defensiva de *Nasutitermes corniger* (Isoptera:Nasutitermitinae), semiárido brasileiro.....17

Resumo/Abstract.....17
Introdução.....18
Material e Métodos.....20
Área de estudo.....20
Procedimentos de amostragem.....20
Resultados.....23
Discussão.....27
Referências.....30

Manuscrito 2 - Efeito dos monoterpenos majoritários da secreção defensiva de *Nasutitermes corniger* (Isoptera:Nasutitermitinae) sob fungos isolados de ninho.....35

Resumo/Abstract.....35
Introdução.....36
Material e Métodos.....38
Área de estudo.....38
Procedimentos e amostragem.....39
Resultados.....42
Discussão.....51
Referências.....54

5. Conclusão.....59

6. Referências.....60

INTRODUÇÃO GERAL

Os cupins são insetos eussociais da ordem Isoptera e estão entre os artrópodes mais abundantes nos ecossistemas tropicais. São considerados organismos que atuam na manutenção da integridade funcional dos ecossistemas (HOLT e COVENTRY, 1990; MARTIUS, 1994; BIGNELL e EGGLETON, 2000).

A vida em sociedade favorece diversos benefícios aos insetos que assim se organizam, como maior eficiência na defesa contra predadores e tornando-os mais competitivos. Contudo, este estilo de vida também oferece alguns problemas, como o aumento do risco de transmissão de parasitas e patógenos (SCHMID-HEMPEL, 1998). Esse risco ocorre em função de os insetos sociais viverem em colônias densamente povoadas, e frequentemente ocorrer alimentação por trofalaxia (ROSENGAUS e TRANIELO, 1997; SCHMID-HEMPEL, 1998). Por isso, os cupins necessitaram desenvolver técnicas defensivas que fossem além da estrutura física dos seus ninhos, desenvolvendo mecanismos de defesa ativa contra estas situações.

Os ninhos dos cupins são considerados como uma das construções mais elaboradas em termos de complexidade estrutural e funcional, atuando como uma barreira física contra possíveis predadores (NOIROT, 1970; GRASSE, 1984; NOIROT e DARLINGTON, 2000). Entretanto, essa estrutura não apresenta funcionalidade defensiva nos momentos de forrageio e até mesmo nos riscos promovidos por uma vida em sociedade.

Para a execução de uma defesa ativa da colônia, os soldados de cupins desenvolveram adaptações morfofisiológicas para execução da defesa da colônia (THORNE, 1982; BINDER, 1988). Dentre essas, observa-se o armamento mecânico, com a cabeça alargada e as mandíbulas fortemente esclerosadas (DELIGNE et al., 1981; PRESTWICH, 1984). E de forma complementar, os soldados ainda dispõem do armamento químico, assegurado pelas glândulas exócrinas: as glândulas labiais, a labral, e, principalmente, a glândula frontal, a primeira das quais evoluiu como uma modificação de estruturas glandulares existente nos insetos, enquanto os outros dois representam órgãos secretores, exclusivos dos cupins (SˇOBOTNI'K et al., 2010).

Os cupins da subfamília Nasutitermitinae, a maior e mais especializada da família Termitidae, difere das demais subfamílias termíticas no que se refere a sua completa dependência química para fins de defesa (NOIROT, 1969). Assim, quando a colônia é

estimulada, seus soldados ejetam seu armamento químico por meio de uma estrutura denominada *nasuto*, localizada na fronte e conectada com a glândula frontal.

O complexo de secreção da glândula frontal dos Nasutitermitinae é constituído basicamente por diterpenos oxigenados, monoterpenos e sesquiterpenos que apresentam uma gama de funções, podendo atuar como uma solução viscosa e irritante, bloqueando os movimentos, além de atuar como repelente, feromônio de alarme para atividades defensivas de coordenação (MOORE, 1964; 1968; VRKOČ et al., 1974; PRESTWICH, 1975, 1977; PRESTWICH et al., 1981; DELIGNE et al., 1981; PRESTWICH, 1984; EVERAERTS et al., 1988; ROISIN et al., 1990; ERNST, 1959; STUART, 1973; EISNER et al., 1976). Essa secreção também parece atuar na inibição do crescimento de fungos, provavelmente pela ação dos monoterpenos α-pineno e limoneno (ROSENGAUS et al., 2000; ZHAO et al., 2004; FULLER, 2007).

Nasutitermes corniger (Motschulsky) é uma das principais espécies dentro do gênero devido aos danos econômicos que provoca e é caracterizada como uma praga de comportamento generalista em relação à escolha de madeiras de distintas espécies (BUSTAMANTE, 1988; REINHARD e KAIB, 1995; REINHARD et al., 1997; REINHARD e KAIB, 2001). Contudo, apesar das inúmeras atribuições à secreção defensiva dos cupins, e da grande importância econômica e ecológica de *N. corniger*, poucos estudos foram realizados com esta temática, principalmente no Brasil, destacando apenas os manuscritos de BEZERRA-GUSMÃO, com.pessoal, e AZEVEDO e OLIVEIRA-NETO (2007). Ampliando-se os conhecimentos sobre tais secreções é possível estabelecer novos avanços nos estudos das relações destes insetos com os fungos frequentemente encontrados nos ninhos (COOK; SCOTT, 1933; HENDEE, 1933, 1934; HUNGATE, 1940; SANDS, 1969; PASSOS, 2009).

Os fungos constituem um dos mais importantes patógenos de insetos e muitos possuem a capacidade de prosperarem em ambientes quentes e úmidos, assim como os cupins (BATRA e BATRA, 1979). Devido às condições de temperatura e umidade do interior dos ninhos, os cupins são expostos constantemente a fungos patogênicos. Sendo assim, a capacidade de controlar o crescimento microbiano, especialmente de fungos patogênicos e competidores pode ser altamente benéfica para esses insetos (BECKER e LENZ, 1976; BATRA e BATRA, 1979).

Vários estudos explanaram sobre esta temática e mostraram diferentes respostas dos cupins frente às infecções fúngicas, que vão desde a ação fumigante observada nos ninhos de

Coptotermes formosanus, comportamento de alarme entre *Zootermopsis angusticollis* quando na presença de conídios, até a inibição do crescimento de fungos entomófagos, como o *Metarhizium anisopliae,* por meio de secreções glandulares e esternal de *Z. angusticollis* (CHEN, et al., 1998; ROSENGAUS, et al., 2004).

Não obstante, poucos estudos têm examinado o potencial antimicrobiano dos cupins superiores, mesmo estes correspondendo 85% das espécies de cupins descritos (KAMBHAMPATI e EGGLETON, 2000). Os terpenóides encontrados nas glândulas frontais de soldados de cupins *Nasutitermes* inibiram a germinação do fungo *M. anisopliae* (Rosengaus et al., 2000). Nesse estudo, os autores avaliaram o efeito das substâncias majoritárias (α- pineno e limoneno) em percentuais semelhantes ao observado nas glândulas de cupins *N. nigriceps*, *N. costalis* e *N. acajutlae*, constatando um efeito positivo.

Em se tratando de estudos que versem sobre a composição micótica dos ninhos de cupins no Brasil, conta-se apenas com o estudo de Barbosa-Silva et al. (in preparação), onde os autores registraram, em ambiente natural de caatinga, 12 espécies fúngicas em ninhos ativos de *Constrictotermes cyphergaster,* nove em ninhos ativos de *Microcerotermes* spp. e oito em *Nasutitetmes* spp. Já em relação a estudos que versem sobre a inibição do crescimento de fungos isolados dos cupinzeiros por ação dos compostos da secreção defensiva dos cupins, são ausentes.

Diante das várias lacunas em torno desta temática e considerando-se a importância ecológica da análise da defesa química e das relações entre cupins e fungos em seus ninhos, o presente estudo teve como objetivo conhecer e verificar a existência da variabilidade química na defesa de *N. corniger,* observando a atuação de alguns desses componentes em isolados fúngicos patogênicos obervados em seus ninhos.

OBJETIVOS

GERAL

Identificar os componentes químicos da secreção defensiva de *Nasutitermes corniger*, objetivando-se verificar a existência de variabilidade química interpopulacional e o efeito antifúngico destes componentes presentes em área urbana de Brejo de altitude e Semiarido.

ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar os constituintes químicos presentes na secreção defensiva de populações de *N. corniger* coletados em áreas de Brejo de altitude e Semiarido;
- ✓ Observar se existe similaridade no perfil químico da secreção defensiva dos cupins oriundos de áreas próximas e com características geoclimáticas semelhantes entre si;
- ✓ Verificar a riqueza micótica presente nos ninhos de *N. corniger* observados no estudo;
- ✓ Analisar o efeito dos terpenóides majoritários da secreção defensiva de *N. corniger* em colônias de fungos com potencial patogênico isoladas dos ninhos.

PERGUNTAS

Existe variabilidade na composição química da secreção defensiva de *N. corniger* distribuídos em área urbana do Agreste paraibano com distintas condições climáticas?

Qual o efeito dos componentes majoritários da secreção defensiva de *N. corniger* sob fungos entomopatógenos presentes no seu ninho?

Existe variabilidade na composição fúngica associada aos ninhos de *N. corniger* em áreas de Brejo de altitude e Caatinga?

HIPÓTESES

Há menor similaridade entre os componentes químicos da secreção defensiva de *N. corniger* oriundos de área urbana do Agreste paraibano que apresentem maior distância e diferenças climáticas entre si.

Os compostos majoritários presentes na secreção defensiva do cupim *N. corniger* controlam o desenvolvimento de fungos patogênicos presentes dentro do ninho.

As áreas de Brejo e altitude apresentam maior riqueza e abundânica de colônias de fungos associados aos ninhos de *N. corniger*.

ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi desenvolvido na mesorregião do agreste paraibano, uma região semiárida, sendo o bioma predominante à caatinga. Foram coletadas amostras de *Nasutitermes corniger* a partir de cinco ninhos localizados no perímetro urbano de quatro cidades: Areia (06º57´42” S/35º41´43”O) e Bananeiras (06° 45' 00" S/35° 37' 58" O), com uma distância de 45 km elas; e Campina Grande (7° 13' 50" S/35° 52' 52" O) e Pocinhos (07° 04' 37" S/36° 03' 39" O), que distam 35 km entre si, totalizando uma amostra de 20 ninhos (Fig. 01).

É importante destacar que algumas regiões do Agreste paraibano apresentam trechos quase tão úmidos quanto às áreas da zona da mata, como a microrregião na qual estão localizadas as cidades de Areia (altitude entre 650 a 1.000 m e temperatura 19º a 28ºC e média pluviométrica anual de 1.194 mm) e Bananeiras (altitude entre 650 a 1.000 m, e temperatura média de 10° a 28°C e média pluviométrica anual de1.174 mm), caracterizadas como Brejos de Altitude (WORLDCLIM, 2012). Estas áreas normalmente apresentam solos mais úmidos, maior cobertura vegetal, e índices superiores de umidade do ar, considerado como resquícios do complexo vegetacional que ligava a Amazônia e a Floresta Atlântica (VIVO, 1997; COSTA, 2003; SANTOS et al., 2007).

Em contraste, as outras duas cidades se encontram numa região de clima muito seco, com temperaturas mais elevadas, padrão irregular de precipitação e menor índice de cobertura vegetal como a região da cidade de Pocinhos (500 a 640 m de altitude, com temperatura média anual variando de 21º a 30º C, e 382,2 mm de precipitação) e Campina Grande (500 a 600m de altitude, com temperatura média anual entre 19º e 27,5ºC e média pluviométrica anual de 802mm) (SUDENE, 1990).

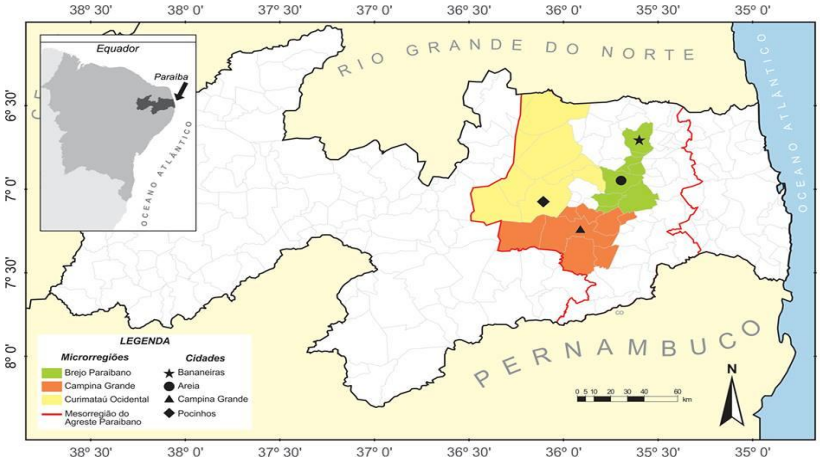

Fig.01. Mapa da área de estudo, com destaque para o Brejo de altitude e região semiárida no Agreste paraibano, NE do Brasil.

Composição e variabilidade química dos constituintes da secreção defensiva de *Nasutitermes corniger* (Isoptera:Nasutitermitinae) no semiárido brasileiro

AP Mello[1], NR Azevedo[2], MA Bezerra-Gusmão[1]

1- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande - PB, Brasil
2- Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO, Brasil

Corresponding author: Antonio Paulino de Mello - Laboratório de Ecologia de Térmitas do Departamento de Biologia da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brasil, 58109-753. E-Mail: antonio.pmello@hotmail.com

RESUMO

A secreção defensiva dos Nasutitermitinae apresenta variações químicas intraespecíficas na sua composição. Analisou-se a variabilidade das substâncias químicas encontradas em vinte populações de *Nasutitermes corniger*, 10 em áreas de Brejo de altitude, e 10 em áreas Caatinga. Dezoito substâncias foram identificadas por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. α-pineno representou 64,89% em uma das populações. A PCA mostrou que os dois primeiros componentes foram responsáveis por 95,43% da variância total. E a análise de agrupamento classificou as populações em dois grupos principais: O grupo I, área de Brejo de altitude, revelou elevadas quantidades de α-pineno (43.83±18.39), β- pineno (15.09±9.85), 2-hexanol (8.9±12.21) e 3-hexanol (7.7±10.31), enquanto o grupo II, populações da Caatinga, mostrou elevadas quantidades de α-pineno (39.34±11.83), β- pineno (34.94±11.09) e limoneno (7.55±1.82). Verificou-se diferença significativa entre as médias de precipitação ($F = 45.7$; $p<0,01$) e temperatura ($F = 71.1$; $p<0,01$) das áreas de Brejo de altitude e Caatinga. Não se verificou diferença significativa entre a composição física, umidade, ph, matéria orgânica e quantidade de carbono dos solos das áreas estudadas ($F = 20,66$; $p = 0,33$), registrando-se maiores quantidades de argila, matéria orgânica e carbono nos solos do Brejo de altitude. Sugere-se que as pressões ambientais e os fatores climáticos de cada ecorregião influenciem na caracterização dos padrões fenotípicos da secreção defensiva, resultando na formação de dois ecótipos, o que deve ser investigado com ampliação do esforço amostral e análise de um possível efeito sazonal.

Palavras-chave: Cupim, defesa química, monoterpenos

Abstract

The defensive secretion of Nasutitermitinae shows intraspecific variation in their chemical composition. We analyzed the variability of the chemicals found in twenty

populations of *Nasutitermes corniger*, 10 in areas of heath altitude, and 10 in caatinga areas. Eighteen compounds were identified by mass spectrometry coupled to gas chromatography. α - pinene accounted for 64.89 % in one population. The PCA showed that the first two components accounted for 95.43 % of the total variance. And cluster analysis classified the populations into two main groups: Group I, altitude heath area revealed high amounts of α - pinene (43.83 ± 18.39) , β - pinene (9.15 ± 9.85) , 2 - hexanol (8.9 ± 12.21) and 3 - hexanol (7.7 ± 10.31) , whereas the second group , the caatinga populations showed high amounts of α - pinene (39.34 ± 11.83) , β - pinene (34.94 ± 9.11) and limonene (7:55 ± 1.82). There was a significant difference between the mean precipitation ($F = 45.7$, $p < 0.01$) and temperature ($F = 71.1$, $p < 0.01$) in the areas of heath altitude and caatinga. There was no significant difference between the physical composition, moisture, pH, organic matter and soil carbon amount of the areas studied ($F = 20.66$, $p = 0.33$) , enrolling larger amounts of clay, organic matter and carbon in soils of heath altitude. It is suggested that environmental stress and climatic factors influence each ecoregion in the characterization of phenotypes of the defensive secretion, resulting in the formation of two ecotypes, which should be investigated with larger samples and analysis effort of a possible seasonal effect.

Keywords: Termite, chemical defense, monoterpenes

Introdução

Os cupins são insetos eussociais da ordem Isoptera e estão entre os artrópodes mais abundantes nos ecossistemas tropicais (Martius, 1994). Ao longo da sua história evolutiva desenvolveram técnicas de defesa coletiva que se manifestam nas elaboradas construções dos seus ninhos, além das adaptações anatômicas e comportamentais para a defesa da colônia (Deligne et al., 1981; Grasse, 1982; Crespi, 1994).

Dentre as adaptações morfofisiológicas para a defesa da colônia, a casta dos soldados apresenta além de um aparato mandibular para a defesa mecânica, um eficiente armamento químico, especialmente nas famílias Rhinotermitidae, Serritermitidae e Termitidae, apresentando um órgão único defensivo, a glândula frontal, produtora de diversos compostos químicos (Deligne et al., 1981; Prestwich, 1984; Quennedey, 1984; Šobotník et al., 2010).

A diversidade química produzida pela glândula frontal dos cupins foi descoberta ao longo das últimas quatro décadas (Šobotník et al., 2010), e apresenta várias substâncias sintetizadas a partir das diversas classes químicas, incluindo alcoóis, monoterpernos, diterpernos, sesquiterpenos, compostos heterocíclicos e aromáticos, dentre outros, que

compõe a secreção defensiva (Prestwich, 1984; Šobotník et al., 2010; Krasulová et al., 2012).

Esta secreção em soldados com mandíbulas vestigiais é expelida pelo *nasuto* e apresenta importante diversidade funcional, atuando como uma solução viscosa e irritante, bloqueando os movimentos, e como repelente e feromônio de alarme para atividades defensivas de coordenação (Moore, 1964, 1968; Vrkoč et al., 1974, 1978; Prestwich, 1975; Prestwich et al., 1981, 1984; Deligne et al., 1981; Everaerts et al., 1988; Roisin et al., 1990). Além disso, parece atuar na inibição do crescimento de fungos, provavelmente pela ação dos monoterpenos α-pineno e limoneno (Rosengaus et al., de 2000; Zhao et al., 2004; Fuller, 2007). Estudos discutem a existência de variações interespecíficas, e até mesmo intercoloniais na composição dessas substâncias, tanto em termos de diversidade química como nos seus percentuais de concentração (Goh et al., 1984; Bagnères et al., 1990, Quintana et al., 2003; Azevedo et al., 2006; Perdereau et al., 2010).

A subfamília Nasutitermitinae (Termitidae) difere das demais subfamílias termíticas no que se refere a sua completa dependência química para fins de defesa (Noirot, 1969), e conta com registros de análises da defesa química em 15 gêneros e 74 espécies, 43 dessas pertencentes ao gênero *Nasutitermes* (Prestwich & Collins, 1981; Prestwich, 1979; Gush et al., 1985; Valterova et al., 1992, 1993).

O gênero *Nasutitermes* é um dos gêneros mais ricos em diversidade termítica, com registro de 74 espécies descritas apenas na região neotropical (Constantino, 2002). No Brasil, este gênero está representado por aproximadamente 47 espécies, distribuindo-se em ambientes de matas tropicais, cerrados e caatingas (Zorzenon & Potenza, 1998; Constantino, 1999). *Nasutitermes corniger* (Motschulsky), uma das principais espécies do gênero, destaca-se devido aos danos econômicos que provoca, e é caracterizada como uma praga de comportamento alimentar generalista (Bustamante, 1988; Reinhard & Kaib, 1995; Reinhard et al., 1997; Reinhard & Kaib, 2001).

A caracterização do perfil químico e os fatores que influenciam nas variações de composição da secreção defensiva dos cupins, consistem em uma ferramenta interessante para estudos sobre taxonomia, biogeografia e ainda a cerca da ecologia populacional e das estratégias defensivas destes insetos (Nelson, et al., 2001). Neste estudo analisou-se a composição química da secreção defensiva e avaliou-se a existência de variação intercolonial no perfil químico de populações de *N. corniger* localizadas em área urbana do agreste paraibano com diferenças climáticas.

Material e Metódos

Área de Estudo – O estudo foi desenvolvido na mesorregião do agreste paraibano, uma região semiárida, do Brasil. Foram coletadas amostras de *Nasutitermes corniger* a partir de cinco ninhos localizados no perímetro urbano de quatro cidades: Areia (06º57´42” S/35º41´43”O) e Bananeiras (06° 45' 00" S/35° 37' 58" O), com uma distância de 45 km elas; e Campina Grande (7° 13' 50" S/35° 52' 52" O) e Pocinhos (07° 04' 37" S/36° 03' 39" O), que distam 35 km entre si, totalizando uma amostra de 20 ninhos (Fig. 01). As cidades de Areia e Bananeiras localizam-se em uma região que apresenta trechos quase tão úmidos quanto às áreas da zona da mata, os chamados Brejo de altitude (altitude entre 650 a 1.000m, temperatura média anual entre 18º a 28ºC e média pluviométrica anual de 1.194 mm). Essas regiões são mais úmidas que as demais áreas do semiárido, devido ao efeito orográfico nas precipitações e na redução dos índices térmicos (Vivo, 1997; Costa, 2003; Barbosa et al., 2006; Santos et al., 2007) (Fig. 1). Em contraste, as cidades de Pocinhos e Campina Grande localizam-se em regiões de Caatinga (altitude entre 500 a 640 m e temperatura 21º a 30ºC e média pluviométrica anual de 382,2 e 802mm) que apresentam climas áridos, com temperaturas elevadas e um padrão irregular de precipitação (Sudene, 1990).

Procedimentos de coleta - Amostras populacionais de cinco ninhos de *Nasutitermes corniger* foram coletadas nas cidades de Bananeiras (06° 45' 00" S/ 35° 37' 58" O), Areia (06º57´42” S/ 35º41´43”O), Campina Grande (7° 13' 50" S/ 35° 52' 52" O) e Pocinhos (07° 04' 37" S/ 36° 03' 39" O), totalizando 20 amostras. Cada amostra foi formada por 50 soldados de cupins, que foram acondicionados em tubos tipo eppendorf e mantidos sob refrigeração até o processamento das análises químicas, objetivando minimizar as perdas dos componentes voláteis presentes na secreção defensiva dos cupins. Coletaram-se também amostras testemunho, consistindo de soldados que foram preservados em álcool para posterior identificação da espécie, realizados com auxílio da literatura especializada, com posterior confirmação dos espécimes pelo Dr. Tiago Carrijo. As amostras enocntram-se depositadas no Laboratório de Ecologia de Térmitas, da Universidade Estadual da Paraíba, Estado da Paraíba, Brasil, local onde estão depositadas.

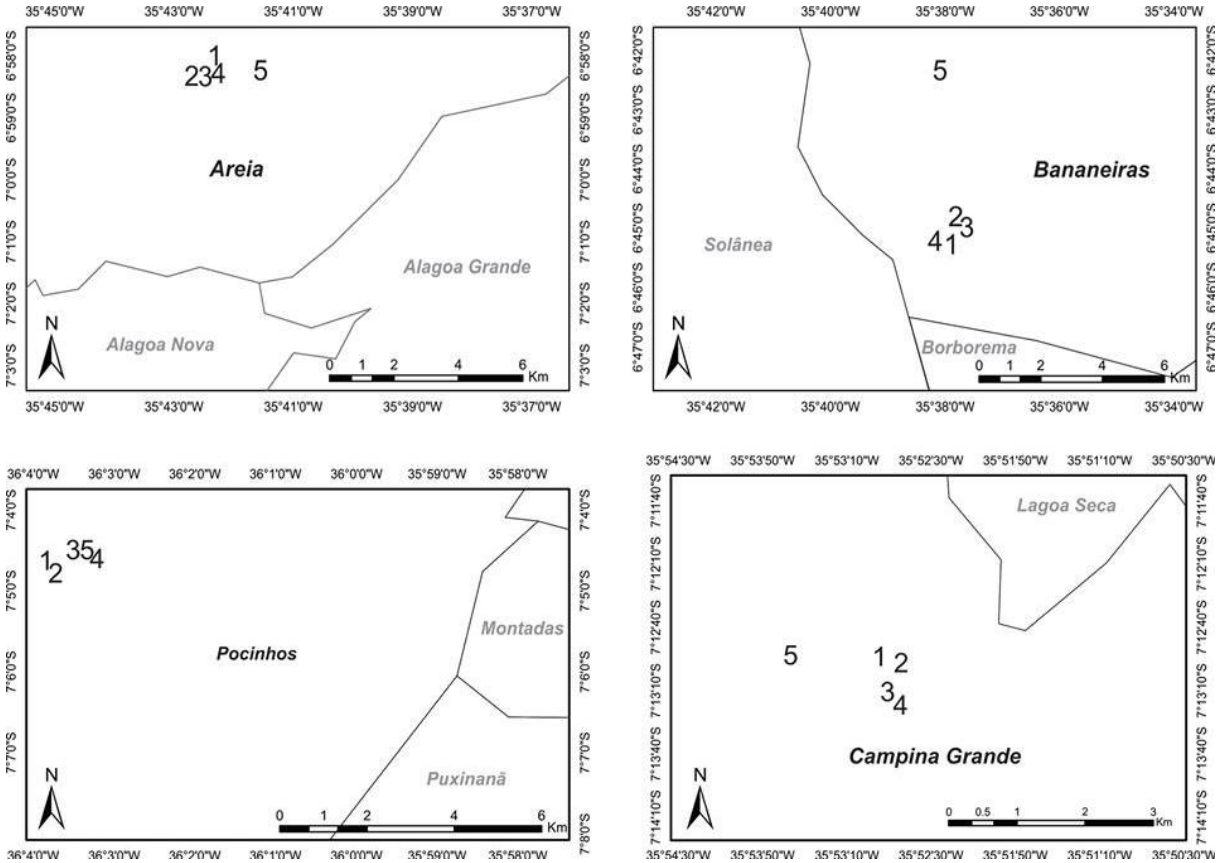

Fig.01. Locais de coleta dos ninhos em áreas de Brejo de Altitude: Areia (**A**) e Bananeiras (**B**), e Semiáridas: Pocinhos (**C**) e Campina Grande (**D**), no Agreste paraibano, Nordeste do Brasil.

Fatores edáfico-climáticos - Os dados climáticos foram obtidos através do Boletim agroclimático mensal do Instituto Nacional de Meteorologia (Inmet, 2012, 2013). No momento da coleta também foram aferidas a temperatura e a umidade relativa do ar local através de um termo-higrômetro. Amostras mistas de solo em torno das árvores que abrigavam os ninhos foram obtidas, cada uma contendo cerca de 200 g, a 20 cm de profundidade, em três pontos equidistantes do vegetal hospedeiro. A composição física (granulometria) pelo método de hidrômetro proposto por Bouyoucos (1951), modificado por Day (1965), conforme descrito por Forsyth (1975). Também foi verificado a umidade, o ph e o percentual de matéria orgânica do solo (MO). Todos os procedimentos foram realizados nos Laboratórios de Química e Física do Solo da Universidade Federal da Paraíba, Campus II.

Análises dos componentes químicos da secreção defensiva – Foram utilizados cinco soldados de cada amostra populacional coletada que foram imersos em 0,5 mL de n-hexano (grau ultra-resíduo, BAKER, EUA) e submetidos a ultra-som (BRANSONIC, EUA) durante 15 segundos

a temperatura ambiente. Utilizou-se um aparelho de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro quadrupolar de massas (CG-EM), Shimadzu QP5050A (Kyoto, Japão). A energia de ionização do detector foi de 70 V, com o volume de injeção da amostra de 0,5 µl e uma razão de injeção de 1:20. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 220°C e 240°C, respectivamente. A análise foi conduzida no modo varredura, a uma velocidade de 1,0 varredura.s^{-1}, com um intervalo de massas de 40-400 m/z. A análise quantitativa foi obtida pela integração do cromatograma total de íons (TIC) e expressa como valores porcentuais médios de duas replicatas. A identificação dos constituintes foi realizada por comparação automática e manual dos espectros de massas com os das bibliotecas NIST/EPA/NHI (1998), por comparação dos espectros de massas e Índices de Retenção (IR) com os da literatura (Adams, 1995; 2001) e co-injeção com padrões. Os Índices de Retenção foram calculados através da coinjeção com uma mistura de hidrocarbonetos, C8–C32 (Sigma, EUA), e com aplicação da equação de Dool e Kratz (DOOL e KRATZ, 1963). Os constituintes majoritários também foram identificados por ressonância magnética nuclear de carbono (RMN-13C), registrado em um espectrômetro Varian Gemini operando a 75 MHz e usando benzeno deuterado como referência interna (128 ppm). A identificação foi realizada pela comparação dos sinais do espectro de RMN 13C do extrato da secreção de defesa, com os da literatura (Kubeczka & Formáček, 2002).

Todo os procedimentos foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, Brasil, nos laboratórios de Cromatografia Gasosa e de Ressonância Magnética Nuclear.

Análise estatística - A matriz dos componentes voláteis foi submetida à Análise por Componentes Principais (PCA) para se verificar a inter-relação entre as populações e seus constituintes químicos, utilizando o pacote estatístico R®. Com o programa Primer® versão 6, os dados foram transformados em Log (X+1) para construção do diagrama de ordenação do MDS (Ordenação multidimensional não métrica) com base na Distância Euclidiana. E posteriormente, realizou-se a Análise por Agrupamento (Cluster - Distância Euclidiana,) utilizando-se o método UPGMA para o estudo da similaridade entre as populações com base na distribuição dos constituintes da secreção de defesa química. Objetivando-se confirmar a existência de diferenças entre o perfil químico das populações de áreas de Brejo de altitude e semiárida, a matriz utilizada para PCA e MDS foi avaliada através do programa

PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance), utilizando-se métodos de (99.999) permutações aleatórias. Os dados ambientais foram analisados de forma separada, sendo a temperatura, a umidade e a precipitação analisados através da análise de variância (ANOVA), e os de dados de composição do solo através da PERMANOVA. E, por fim realizou-se uma análise de correlação canônica entre a matriz dos constituintes voláteis e os dados ambientais (temperatura, umidade, precipitação e composição do solo) objetivando-se verificar a influência ambiental na composição química da secreção defensiva.

Resultados

A composição da secreção defensiva de *N. corniger* mostrou-se ser composta por 18 componentes voláteis, observando-se dissimilaridade qualiquantitativa na composição entre as populações de cada área estudada ($F = 8,29$; $p = 0,0002$). Dentre os componentes identificados, 14 são monoterpenos, com quantidades expressivas de α-pineno e β-pineno na composição majoritária das secreções analisadas de ambas as áreas de estudo (Tab. 1). Os componentes 2-hexanol e o 3-hexanol também apresentaram valores médios percentuais expressivos, mas apenas para populações do brejo de altitude (Tab. 1).

Tabela 1- Composição percentual média (± desvio-padrão) de substâncias identificadas na secreção de defesa de *Nasutitermes corniger* em área urbana de Brejo de Altitude e Semiárida no NE do Brasil, 2013.

Substâncias	**Brejo de Altitude**		**Semiárido**	
	Areia	**Bananeiras**	**Pocinhos**	**Campina Grande**
2-metil-3-heptanona[-]	1.6±1.15	1.08±1.5	0.11±0.07	0.1±0.11
α-pineno[*]	30.36± 24.02	49.94±11.3	39.91±12.87	37.54±10.46
3-hexanol[-]	21.13±11.3	6.18±8.3	0±0	0±0
2-hexanol[-]	11.15±15.2	6.48±1.8	0±0	0±0
Desconhecido[-]	2.37±1.6	1.08±4.5	0±0	0±0
β-pineno[*]	12.71±6.5	24.68±12.6	45.24±15.48	33.85±6.03
β –mirceno[*]	0.25±0.33	0.43±0.23	0.84±0.26	0.45±0.72
Limoneno[*]	3.18±1.66	6.12±2.17	8.38±1.23	6.49±1.81
O-cimeno[*]	1.14±1.08	1.66±0.34	0.1±0.01	0.1±0.0
3-careno[*]	0.1±0	0.1±0.26	0.1±0.5	0.1±0.0
3-careno-2-ol[*]	0.1±1.9	0.1±0.75	0.1±0.24	0.1±0.03
Verbenona[+]	0.1±0.29	0.1±0.08	0.13±0.35	2.97±0.78
Cafeno[*]	0±0	0±0	0.22±1.09	0.1±0.38
4-careno[*]	0±0	0±0	0.1±0.06	0.1±1.05
Octatrieno-3,7-dimetil[*]	0±0	0±0	2.34±0.87	1.47±1.26

Terpinoleno*	0±0	0±0	0.1±0.06	0.1±0.06
Pinocarveol*	0±0	0±0	0.1±0.65	1.93±1.12
L-carveol*	0±0	0±0	0.1±1.2	5.17±1.7

(*)Monoterpenos; (+)Monoterpeno oxigenado; (-) Outros;

Os dois primeiros componentes principais da PCA foram responsáveis por 95,43% da variância total. O PCA mostrou a separação dos pontos de amostragem destacando as variáveis que mais influenciaram na separação, sendo no PC1 ocasionada pela separação entre os monoterpenos a partir dos demais constituintes químicos (Fig. 2), enquanto que no PC2 pela formação de dois grupos principais, um deles composto apenas por monoterpenos, enquanto o outro apresentou monoterpenos e demais substâncias (Fig. 2).

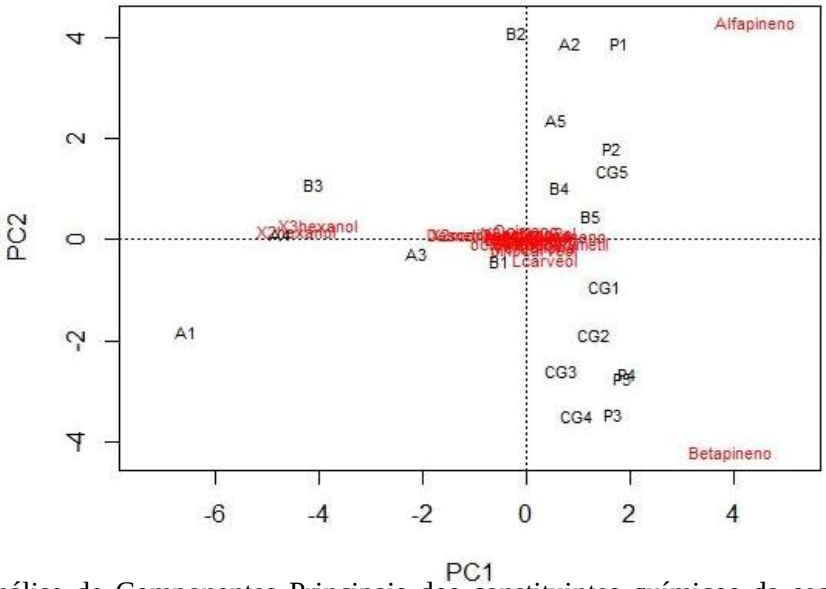

Figura 2- Análise de Componentes Principais dos constituintes químicos da secreção defensiva de populações de *Nasutitermes corniger* em áreas urbanas de regiões de Brejo de Altitude (A1, A2, A3, A4, A5, B1, B2, B3, B4 e B5) e Semiáridas (P1, P2, P3, P4, P5, CG1, CG2, CG3, CG4 e CG5), NE do Brasil, 2013. A – Areia; B – Bananeiras; P – Pocinhos; CG – Campina Grande.

A análise do MDS mostrou um padrão de separação espacial na distribuição das populações de *N. corniger* nas áreas de estudo (Fig. 3), confirmando-se a existência de diferenças significativas entre a composição química da secreção defensiva das populações entre as áreas, através do teste de permutação ANOSIM (R=0.941; p=0.1%).

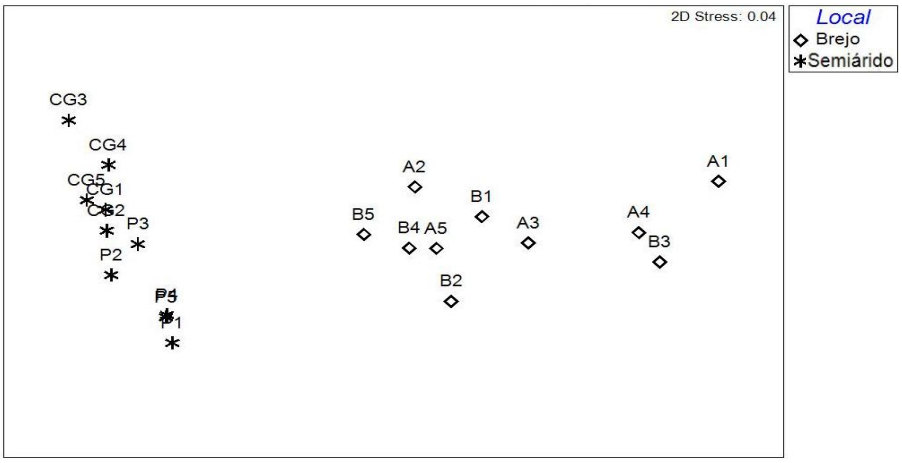

Figura 3. Ordenação da análise de escalonamento multidimensional não métrica (n-MDS) das similaridades entre as populações de *Nasutitermes corniger* com relação à sua composição química da secreção defensiva em área urbana de Brejo de altitude e Semiárida no NE do Brasil, 2013. (Áreas de Brejo de altitude: A1, A2, A3, A4, A5, B1, B2, B3, BA e B5; Áreas de Caatinga: P1, P2, P3, P4, P5, CG1, CG2, CG3, CG4 e CG5).

A análise de agrupamento classificou as populações em dois grandes grupos principais. O grupo I, formado pelas populações de Brejo de altitude, possivelmente apresentou esta formação devido às elevadas quantidades de α-pineno (43.83±18.39), β-pineno (15.09±9.85), 2-hexanol (8.9±12.21) e 3-hexanol (7.7±10.31) presentes na secreção destas populações, enquanto o grupo II, populações do Semiarido, apresentaram elevadas quantidades de α-pineno (39.34±11.83), β-pineno (34.94±11.09) e limoneno (7.55±1.82) (Fig. 4).

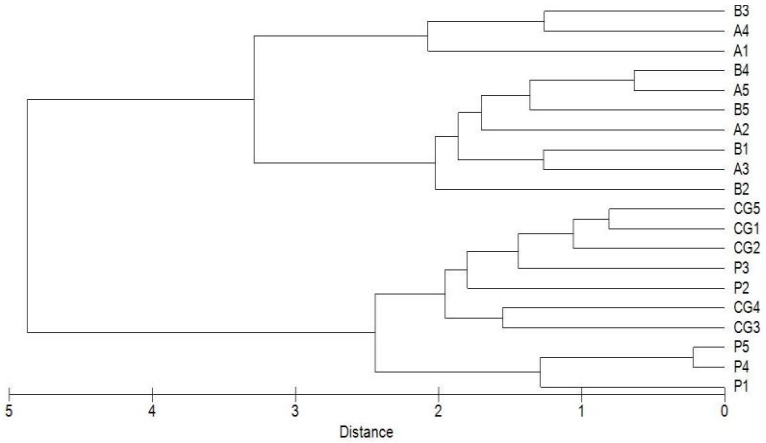

Figura 4. Análise de agrupamento (UPGMA) das populações de *Nasutitrmes corniger* com relação à sua composição química da secreção defensiva em área urbana de Brejo de altitude - Grupo I (A1, A2, A3, A4, A5, B1, B2, B3, BA e B5) e de Semiarida - Grupo II (P1, P2, P3, P4, P5, CG1, CG2, CG3, CG4 e CG5) no NE do Brasil, 2013.

Nos dois grupos foi possível observar três separações principais. No grupo I, a primeira delas agrupa as populações que apresentam os maiores valores de 2-hexanol (B3:

23.48%; A4: 26.48% e A1: 41.15%) e 3-hexanol, (B3: 24.15%; A4: 24.15% e A1: 31.44%). Na segunda separação verifica-se o agrupamento das populações que apresentam altos valores de α-pineno (B4: 49.94%; A5: 56.17% e B5: 50.36%) e limoneno (B4: 6.82%; A5: 4.18% e B5: 6.12%), isolando A2 por apresentar maior valor de α-pineno (62.58%) e B5, com os mais baixos valores de 2-hexanol (3.63%) e 3-hexanol (3.56%) dentre as populações das áreas de brejo de altitude.

A terceira separação mostra o agrupamento das populações que apresentaram valores intermediários de α-pineno, 2-hexanol e 3-hexanol: B1 (37.73%, 10.22% e 8.27, respectivamente) e A3 (30.36%, 11.15% e 21.13%, respectivamente), isolando B2 com maior percentual de α-pineno (55.57%) e menor de 2-hexanol (6.48%) e 3-hexanol (6.18%).

No grupo II, a primeira agrupou as populações que apresentaram altos valores percentuais de α-pineno (CG5: 54.03% e CG1: 43.24%) e L-carveol (CG5: 6%; e CG1: 5.18%), isolando as populações que apresentaram valores inferiores de α-pineno CG2 (37.54%) e P3 (34.37%) e valores superiores de β- pineno (36.04% e 46.86%, respectivamente). Ainda neste agrupamento, a população P2 foi separada das demais por apresentar o maior valor percentual de α-pineno (55.15%) e menor de β- pineno (22.04%).

Na segunda separação, observou-se o agrupamento das populações que apresentaram os menores valores percentuais de α-pineno, CG4: 28.53% e CG:29.90%). A terceira separação agrupou as populações com maiores valores de β-pineno, P5 (45.24%) e P4 (45.55%), isolando a população P1, com o maior percentual de α-pineno dentre as 20 amostras populacionais analisadas (64.89%) e o menor valor percentual de β-pineno dentre as amostras do semiárido (14.17%).

As áreas de estudo apresentaram características ambientais distintas com diferenças nos padrões climáticos e de composição do solo. Verificou-se diferença significativa entre as médias de precipitação ($F = 45.7$; $p<0,01$) e temperatura ($F = 71.1$; $p<0,01$) das áreas de estudo. Entretanto, não houve diferença significativa entre a composição física, a umidade do solo, pH, MO e quantidade de carbono dos solos das áreas estudadas ($F = 20,66$; $p = 0,33$). Contudo, os solos do Brejo de altitude apresentaram maiores quantidades de argila, MO e carbono.

Os componentes principais do Grupo I, 2-hexanol e 3-hexanol, na primeira variável canônica dependente, apresentaram correlação positiva com as variáveis climáticas independentes (precipitação, umidade do solo, percentual de matéria orgânica, carbono e

argila do solo), equanto que o α-pineno apresentou corrrelação inversa com estas variáveis. Já os componentes principais do Grupo II, α-pineno, β- pineno e Limoneno, na primeira variável dependente, apressentou correlação inversa. A primeira correlação explica 78,5% da variância acumulada (Fig. 5).

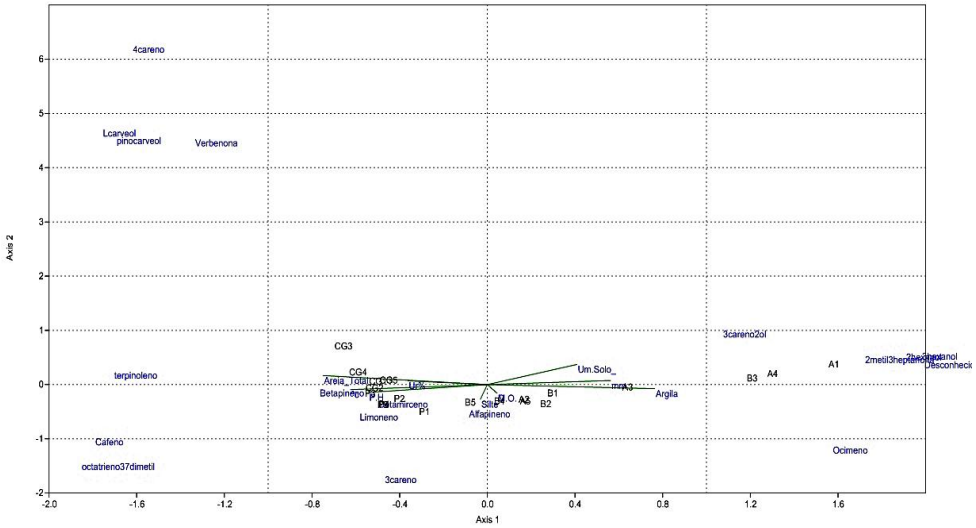

Figura 5. Análise de correlação entre a matriz dos constituintes voláteis da secreção defensiva de *Nasutitermes corniger* e as variáveis ambientais (temperatura, precipitação, umidade do ar e do solo, percentuais de areia, argila, silte, matéria orgância, carbono e ph do solo) no Agreste paraibano, 2013.

Discussão

O fato de a composição química da secreção defensiva apresentar apenas divergências quantitativas entre populações da mesma ecorregião, e qualitativas quando comparadas populações de ecorregiões distintas sugere a existência de uma relação com a expressão gênica das populações para as áreas analisadas. Segundo Prestwich (1982) a biossíntese das substâncias presentes na secreção de defesa dos cupins são de origem endógena, mas fatores externos podem interferir na composição química da defesa desses insetos (Valterová et al., 1989).

O elevado percentual de α-pineno observado na secreção defensiva das populações de *N. corniger* nas áreas de estudo é algo comum entre os Termitidae (Goh et al., 1980; Roisin et al., 1988; Valterová et al., 1993; Azevedo et al., 2006). Este monoterpeno pode ser encontrado tanto em organismos vegetais, presentes em vários óleos essenciais de plantas tais como as coníferas, como o pinheiro (Pinaceae) quanto nos insetos, tais como os cupins e os besouros

(Geron et al., 2000).

Na ecologia dos térmitas, esse composto apresenta alta toxicidade frente aos insetos predadores e competidores, como formigas e besouros (Simões et al., 1999). Além disso, ainda é possível que tenha atividade antifúngica, antibacteriana e antisséptica, atuando de forma a diminuir o risco iminente de doenças dentro da colônia (Rosengaus et al., 2000; Stow & Beattie, 2008).

Apesar dos registros na literatura sobre a presença de sesquiterpenos na secreção defensiva de alguns gêneros da subfamília Nasutitermitinae (*Constrictotermes, Curvitermes, Syntermes* e algumas espécies dos gêneros *Subulitermes* e *Nasutitermes*: *N. infuscatus* e *N. octopilis*) (Prestwich, 1981, 1984; Aezevedo et al., 2006), não se observou esta classe de terpenos em *N. ephratae* (Valterová et al., 1992, 1993), e também nas populações de *N. corniger* analisadas no presente estudo. Julga-se, portanto, que os padrões fenotípicos da secreção de defesa consistem assim em uma valiosa ferramenta de diferenciação e caracterização taxonômica intra e intergenéricos.

A separação das populações em dois grupos, motivadas pelos percentuais das substâncias discriminantes, formando agrupamentos de populações coletadas em uma mesma ecorregião, possivelmente deva-se pela distância entre os pontos de coleta, formando dois ecótipos distintos nas populações. Possivelmente, populações que se localizem em regiões próximas geograficamente e submetidas a condições ecossistêmicas semelhantes apresentem padrão homogêneo em termos qualiquantitativos na composição química da secreção defensiva, corroborando Azevedo et. al. (2006), quando estudaram populações de *C. cyphergaster* e Krasulová et al. (2012), com populações de *Psammotermes hybostoma* (Rhinotermitidae).

A tolerância fisiológica dos insetos é fortemente influenciada pela dinâmica dos ambientes ao qual eles ocorrem (Schowalter, 2006; Panizzi & Parra, 2009), e oscilações dos fatores abióticos como temperatura, precipitação e composição do solo apresentam potencialidades para atuar de forma direta ou indireta na variação percentual das substâncias da secreção defensiva dos cupins (Azevedo et al., 2006; Krasulová et al., 2012). Pode-se aplicar esse conceito ao se observar a população P1 que apresentou o maior percentual de α-pineno entre todas as populações analisadas (64,9%), verificando-se nesta localidade, os menores índices de precipitação e o maior índice de temperatura dentre os pontos de amostragem.

Considera-se também os compostos 2-hexanol e 3-hexanol, exclusivos nas populações de Brejo de altitude, regiões com os maiores índices de precipitação observados, e apreentaram correlação positiva com estas variáreis. Esses dados corroboram Azevedo et al. (2006) que verificaram em populações de *C. cyphergaster* que o principal componente da secreção defensiva deste cupim, o α-pineno, apresentou correlação inversa com as variáveis climáticas, enquanto que o 3-hexanol obteve correlação positiva.

Talvez estes sejam alguns dos fatores que ao longo dos dias motivem as populações de cupins a regularem os percentuais de concentração de cada composto químico, com a possibilidade de redução de algumas substâncias ao ponto da cromatografia gasosa não identificá-las, explicando a ocorrência de compostos exclusivos para as populações de cada ecorregião. A hipótese é baseada no fato das áreas estudadas apresentarem características ambientais diferentes e padrão de dissimilaridade de fatores abióticos, o que resulta em uma comunidade vegetal e animal diferenciada e/ou adaptada para as limitações e heterogeneidade de cada ambiente. Entretanto, estudos futuros são recomendados para confirmação, tendo em vista que tais divergências podem ser produto de efeito sazonal, ou até mesmo da necessidade da colônia no que se refere às atividades de defesa, recrutamento ou feromônio de alarme (Vrkoc et al., 1978).

Convém ressaltar que os resultados deste estudo contrastam os descritos por Prestwich et al. (1985), cuja conclusão foi de que os fatores ambientais não influenciam a composição química da secreção de defesa de *N. corniger*, mas corroboram Azevedo et al. (2006) e Krasulová et al., (2012). Em conclusão, o estudo mostrou que a composição química da secreção defensiva de *Nasutitermes corniger* apresenta variabilidade de acordo com as características do ecossistema na qual ela está inserida. As populações localizadas em regiões com condições ecossistêmicas semelhantes tendem a apresentar maior similaridade química tanto em termos de concentração quanto de composição das substâncias.

Como esperado, as populações das áreas de Brejo de Altitude apresentaram uma composição média percentual diferenciada das populações das demais áreas Semiaridas, provavelmente motivadas pelas pressões ambientais e os fatores climáticos de cada ecorregião, resultando na formação de dois ecótipos. No entanto, esta afirmação deve ser reforçada por estudos futuros, com ampliação do esforço amostral e análise de um possível efeito sazonal.

Agradecimentos

Agradecemos aos pesquisadores Maurícia Mirelle C. da Silva, Ana Márcia B. Silva, Gesilândia S. Santos, e Bruno G. da Costa pelo auxílio no trabalho de campo, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil, pelo apoio financeiro.

REEFERÊNCIAS

Adams, R.P. (1995). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy. Allured, Illinois, 456 p.

Adams, R.P. (2001). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured, Illinois, 468 p.

Azevedo, N.R, Ferri, P.H.,Seraphin, J.C. & Brandão, D. (2006) Chemical Composition and Intraspecific Variability of the Volatile Constituents from the Defensive Secretion of *Constrictotermes cyphergaster* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae).Sociobilogy 47: 1-12.

Azevedo, N.R. & Oliveira-Neto, J.R. (2007). Componentes químicos voláteis (terpenos) da secreção defensiva de *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Termitidae:Nasutitermitinae), coletados na região urbana de Goiânia.In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil. Anais**.** Caxambú.

Barbosa, M. R. V., Agra, M. de F., Sampaio, E. V. S. B., Cunha, J. P., Andrade, L. A. (2004). Diversidade florística na Mata do Pau-Ferro, Areia, Paraíba. In: Porto, K. C., cabral, J. J. P., Tabarelli, M. Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação. (Eds.) Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p.111-122. (Série Biodiversidade, 9).

Bagnères, A. G., Clément, J.L. A., Blum, M. S., Severson, R. F., Joulie, C., & Lange, C. (1990). Cuticular hydrocarbons and defensive compounds of Reticulitermes flavipes (Kollar) and R. santonensis (Feytaud): polymorphism and chemotaxonomy. J. Chem. Ecol. 16:3213–3244.

Bezerra-Gusmão, M.A; Cavalcante, M. M. (2012). Susbtâncias químicas defensivas de cupins *Nasutitermes* no agreste paraibano. Congresso de Pós-Graduação e Pesquisa e XIV Encontro de Iniciação Científica da UEPB.

Bouyoucos, G.J. (1951). A recalibration of the hydrometer methid for making mechanical analyses of soils. Agron. J**.** 43:434-438.

Bustamante, N.C.R. (1988). Preferências alimentares de 5 espécies de cupins *Nasutitermes Dudley*, 1980 (Termitidae: Isoptera) por 7 espécies de madeiras de várzea na Amazônia Central**.** Dissertação de Mestrado, INPA/FUA, Manaus, 151p.

Crespi, B. J. (1994). Three conditions for the evolution of eusociality: Are they sufficient. Insectes Soc. 41:395–400.

Constantino, R. (1999). Chave ilustrada para identificação dos gêneros de cupins (Insecta: Isoptera) que ocorrem no Brasil. Papéis Avulsos de Zoologia, 40 (25):387- 448.

Constantino, R. (2002). The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status**.** J. Appl. Ent., 126:355-365.

Day, P. R. (1965). Particle fractionation and particle size analysis. In: BLACK, C.A. (Ed.). Methods of soil analysis. Madison: América Society of Agronomy. 1: 545-567.

Deligne, J., Quennedey, A., & Blum, M. S. (1981).The enemies and defense mechanisms of termites, p. 1–76, in H. R. Hermann (ed.), Social insects, Vol. 2. Academic, New York, London.

Dool, V.D.H., Kratz, P.D.J.A. (1963). Generalization of the Retention Index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. J. Chromatog., 11: 463-471.

Everaerts, C., Pasteels, J.M., Roisin, Y., Bonnard, O., Braekman, J.C. & Daloze, D. (1988). Morphological and Chemichal Criteria in the taxonomy of *Nasutitermes* from Papua New Guinea (Isoptera:Termitidae). Sociobiology, 14: 193 – 206.

Forsythe, W. M. (1975). Fisica de suelos: manual de laboratório. San José: Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas, 212 p.

Fuller, C.A. (2007). Fungistatic activity of freshly killed termite, *Nasutitermes acajutlae*, soldiers in the Caribbean. Journal of Insect Science 7: 1–8.

Geron, C., Rasmussen, R., Arnts, R.R. & Gueenther, A. (2000) A review and synthesis of monoterpene speciation from forests in the United States. Atmospheric Environment, Oxford, 34: 1761-1781.

Goh, S. H., Chuah, C. H., Tho, Y. P., & Prestwich, G. D. (1984). Extreme intraspecific chemical variability in soldier defense secretions of allopatric and sympatric colonies of Longipeditermes longipes. J. Chem. Ecol. 10:929–944.

Grassé, P. P. (1982). Termitologia**.** International Congress of IUSSI. Paris, França. Masson, 1: 676p.

Gush, T.J., Bentley, B.L., Prestwich, G.D., & Thorne, B.L. (1985). Chemical variation in defensive secretions of four species of Nasutitermes. Biochemical and Systematic Ecology 13: 329–336.

Inmet. (2012). Instituto Nacional de Metereologia: Boletim agroclimatológico. Secção de apoio a agricultura e recursos hídricos.

Inmet. (2013). Instituto Nacional de Metereologia: Boletim agroclimatológico. Secção de apoio a agricultura e recursos hídricos.

Kubeczka, K. H. & Formáček, V. (2002). Essential Oils Analysis by Capillary Gas Chromatography and Carbon-13 NMR Spectroscopy. 2 ed., John Wiley & Sons, NY, 461 p.

Krasulová, J., Hanus, R., Kutalová, K., Šobotník, J., Sillam-Dussès, D., Tichý, M. & Valterová, I. (2012). Chemistry and Anatomy of the Frontal Gland in Soldiers of the Sand Termite Psammotermes hybostoma. J Chem Ecol 38:557–565.

Martius, C. (1994). Diversity and ecology of termites in Amazonian forest. Pedobiology 38:407-428.

Moore, B. P. (1964). Volatile terpenes from *Nasutitermes* soldiers (Isoptera: Termitidae). J. Insect Physiol. 10:371–375.

Moore, B. P. (1968). Studies on the chemical composition and function of the cephalic gland secretion in Australian termites. J. Insect Physiol. 14:33–39.

Nelson, L.J., Cool, L.G., Forschler, B.T. & Haverty, M.I. (2001) Correspondence of soldier defense secretions mixtures with cuticular hydrocarbon phenotypes for chemotaxonomy of the termite genus Reticulitermes in North America. J. Chem. Ecol., 27(7):1449 – 1479.

Noirot, C. & Noirot-Timothée, C. (1969). The digestive system. In: Krishna, K, Weesner, F. M, editors. Academic Press, Biology of Termite p.49-88.

Panizzi, A. R. & PARRA, J. R. P. (2009). Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas. EMBRAPA/CNPQ, Brasília. 1969p.

Perdereau, E., Dedeine, F., Christides, J. P., & Bagnères, A.G. (2010). Variations in Worker Cuticular Hydrocarbons and Soldier Isoprenoid Defensive Secretions Within and Among Introduced and Native Populations of the Subterranean Termite, Reticulitermes flavipes. J. Chem. Ecol. 36:1189–1198.

Prestwich, Y. D. (1975). Chemical analysis of soldier defensive secretions of several species of East African termites. In, Ch. Noirot, P. E. Howse, and G. LeMasne. (Eds.). Pheromones and Defensive Secretions in Social Insects. Pp. 149-152. 1975 Proceedings of the Symposium of the International Union for the Study of Social Insects, Univ. of Dijon, Di- jon, France.

Prestwich, G. D. (1979). Interspecific variation in the defence secretions of *Nasutitermes soldiers*. Biochemical and Systematic Ecology 7: 211–221.

Prestwich, G. D. & Collins, M.S. (1981). Chemotaxonomy of *Subulitermes* and *Nasutitermes* termite soldier defense secretions. Evidence against the hypothesis of diphyletic evolution of the Nasutitermitinae. Biochemical and Systematic Ecology 9: 83–88.

Prestwich, G. D. (1984). Defense mechanisms of termites. Annu. Rev. Entomol. 29:201–232.

Quennedey, A. (1984). Morphology and ultrastructure of termite defense glands, 151–200, in H. R. Hermann (ed.), Defensive Mechanisms in Social Insects. Praeger, New York, Philadelphia.

Quintana, A., Reinhard, J., Faure, R., Uva, P., Bagnères, A. G., Massiot, G., & Clément, J. L. A. (2003). Interspecific variation in terpenoid composition of defensive secretions of European *Reticulitermes* termites. J. Chem. Ecol. 29:639–652.

Reinhard, J., Kaib, M. (1995) Interaction of pheromones during food exploitation by the termite *Schedorhinotermes lamanianus*. Physiol. Entomol. 20: 266-272.

Reinhard, J., Hertel, H., Kai, M. (1997). Feeding stimulating signal in labial gland secretion of the subterranean termite *Reticulitermes santonensis*. J. Chem. Ecol. 23: 2371-2381.

Roisin, Y., Everaerts, C., Pasteels, J.M. & Bonnard, O. (1990). Caste-dependent reactions to soldier defensive secretion and chiral alarm/recruitment pheromone in *Nasutitermes princeps*. Journal of Chemical Ecology 16: 2865–2875.

Rosengaus, R. B., Lefebvre, M. L. &Traniello, J. F.A. (2000). Inhibition of fungal spore germination by *Nasutitermes*: evidence for a possible antiseptic role of soldier defensive secretions. Journal of Chemical Ecology. 26: 21-39.

Santos, A. M. M., Cavalcanti, D. R., Silva, J. M. C. & Tabarelli, M. (2007). Biogeographical relationships among tropical forests in northeastern Brazil. Journal of Biogeography 34: 437-446.

Schowalter, T.D. (2006). Insect ecology: an ecosystem approach. Academic Press. Oxford.

Šobotník, J., Hanus, R., & Jirošová, A. (2010). Chemical warfare in termites. J. Insect Physiol. 56:1012–1021.

Stow, A. & BEATTIE, A. J. (2008). Chemical and genetic defenses against disease in insect societies. Brain, Behavior and Immunity, 22:1009-1013.

Stuart, A. M. (1963). Studies on the communication of alarm in the termite *Zootermopsis nevadensis* (Hagen), Isoptera. Physiological Zoology 36:85–96.

SUDENE. (1990). Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste.

Valterova, I., Vrkocˇ, J., Lindstro, M, M. & Norin, T. (1992). On the natural occurrence of 3-carene, a component of termite defense. Naturwissenschaften 79: 416–417.

Valterova, I., Vrkocˇ, J. & Norin, T. (1993). The enantiomeric composition of monoterpene hydrocarbons in the defensive secretions of *Nasutitermes* termites (Isoptera): inter- and intraspecific variations. Chemoecology 4:120–123.

Vivo M. (1997). Mammalian evidence of historical ecological change in the Caatinga semarid vegetation of Northeastern Brazil. Journal of Comparative Biology 1: 65-73.

Vrkocˇ, J. & Ubik, K. (1974). 1-Nitro-trans-1-pentadecene as the defensive compound of termites. Tetrahedron Letters 15:1463–1464.

Vrkoc, J., Krecek, J. & Hrdy, I. (1978) Monoterpenic alarm pheromones in two *Nasutitermes* species. Acta Ent. Bohemoslov, 75:1-8.

Zorzenon, F. J. & Potenza, M. R. (1998). Cupins: pragas em áreas urbanas**.** São Paulo: Instituto Biológico. Boletim Técnico, 10: 8-20.

Zhao, C., Rickards, R.W. & Trowell, S. C. (2004). Antibiotics from Australian terrestrial invertebrates. Part 1. Antibacterial trinervitadienes from the termite *Nasutitermes triodiae*. Tetrahedron 60:10753–10759.

Efeito dos monoterpenos majoritários da secreção defensiva de *Nasutitermes corniger* (Isoptera:Nasutitermitinae) sob fungos isolados dos ninho

A.P. Mello, E.C. Barbosa, M.A. Bezerra-Gusmão

Corresponding author: Antonio Paulino de Mello - Laboratório de Ecologia de Térmitas do Departamento de Biologia da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brasil, 58109-753.
E-Mail: antonio.pmello@hotmail.com

Resumo

Observou-se neste estudo a riqueza fúngica associada aos ninhos de *Nasutitermes corniger* e a ação antimicótica dos compostos químicos produzidos sob a colonização de fungos patógenos em 20 ninhos, 10 em dois municípios de Brejo de altitude e 10 em dois de Semiárido no Nordeste do Brasil. O ensaio foi realizado com quatro réplicas e as placas incubadas durante cinco dias à temperatura ambiente. Testou-se o efeito de contado e volátil dos componentes químicos majoritários da secreção defensiva de *N. corniger*, α-pineno, β-pineno e Limoneno, de forma isolada e o efeito sinergético destes, em concentrações semelhantes à encontrada na secreção defensiva deste cupim para o combate a proliferação dos fungos entomopatógenos *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. e *Cladosporium* sp. isolados em seus ninhos. Verificou-se eficiência dos compostos nas fases vegetativa e reprodutiva dos fungos. Registraram-se 23 morfotipos de fungos distribuídos em oito gêneros. A riqueza de Brejo de Altitude foi de 17 e 12, e diversidade de H=1,04 e H=0,92, respectivamente. *Penicillium* sp.1, *Aspergillus flavus* e *A. niger* estiveram presentes em todos os ninhos. *Penicillium* sp.3, *Paecilomyces* sp.1 e *Paecilomyces* sp.2 foram comuns aos ninhos do Brejo de altitude. *Trichoderma* sp. foi isolado em ninhos de apenas uma cidade de Brejo e uma de Semiárido, enquanto *Paecilomyces* sp1. foi encontrado no Brejo de altitude e em um dos municípios do seminárido. *Penicillium, Cladosporium* e *Aspergillus* (*A. flavus* e *A. niger*) foram os isolados mais frequentes e abundantes no estudo. Os compostos majoritários da secreção defensiva dos cupins apresentaram efeito antifúngico no controle do desenvolvimento das colônias fúngicas estudadas, com variações conforme a fase do desenvolvimento e a espécie de fungo. O α-pineno apresentou eficiência de contato e volátil tanto nas fases vegetativa quanto reprodutiva dos fungos testados. β-pineno e Limoneno atuaram de forma complementar no combate fúngico. No entanto, foram nos testes do efeito sinergético que se obtiveram os melhores resultados de inibição, obtendo-se eficiência das substâncias em todas as concentrações testadas, mesmo em baixas concentrações.

Palavras-chave: Cupim, monoterpeno, ação antifúngica

Abstract

It was observed in this study fungal richness associated with nests of *Nasutitermes corniger* and antimycotic action of chemical compounds produced in the colonization of fungal pathogens in 20 nests, 10 in two municipalities of altitude heath and 10 in two semiarid Northeast Brazil. The assay was performed with four replicas and the plates incubated for five days at room temperature. We tested the effect of contact of the major chemical and volatile components of the defensive secretion of *N. corniger*, α - pinene , β - pinene and limonene, in isolation and the synergistic effect of these, similar concentrations to that found in the defensive secretion of the termite to combat the proliferation of entomopathogenic fungi *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. and *Cladosporium* sp. isolated in their nests. It was found efficiency of compounds in vegetative and reproductive stages of fungi. We recorded 23 morphotypes of fungi belonging to eight genera. The wealth of heath Altitude was 17 and 12, and diversity of H = 1.04 and H = 0.92, respectively. *Penicillium* sp.1, *Aspergillus flavus* and *A. niger* were present in all nests. *Penicillium* sp.3, and *Paecilomyces* sp.1 and *Paecilomyces* sp.2 nests were common to the altitude heath. *Trichoderma* sp. was isolated from the nests of only a city of Heath and a semiarid while *Paecilomyces* sp1. found in heath and altitude in one of the municipalities seminárido. *Penicillium*, *Cladosporium* and *Aspergillus* (*A. flavus* and *A. niger*) were the most frequent and abundant in the study isolates. The major compounds of the defensive secretion of termites showed antifungal effect in controlling the development of fungal colonies studied, with variations depending on the stage of development and fungal species. The α-pinene showed efficiency of contact and volatile in both vegetative reproductive phases as tested fungi. β-pinene and limonene acted in a complementary way in combating fungal. However, in the tests were the synergistic effect that the best results were obtained inhibition efficiency of obtaining substances at all concentrations tested, even at low concentrations.

Keywords: Termite, monoterpene, antifungal

Introdução

A casta dos soldados dos cupins apresenta inúmeras adaptações morfofisiológicas para atividade de defesa da colônia frente aos seus predadores e competidores, sejam invertebrados, vertebrados ou micro-organismos (Deligne, 1971; Prestwich, 1984).

Os cupins do gênero *Nasutitermes* utilizam uma secreção produzida na glândula frontal composta principalmente por terpenoides que atua na comunicação de alarme, recrutamento para a atividade defensiva e ainda por sua alta toxidade podem atuar no controle

de microorganismos presentes nos ninhos (Moore, 1964, 1968; Eisner et al., 1976; Tranielo, 1981; Prestwich, 1984; Batra & Batra, 1966, 1979; Lutikova, 1990; Ljutikova & Judina, 1996; Rosengaus et al., 1998).

Grande diversidade de fungos são encontrados associados aos cupins e sua presença junto aos térmitas muitas vezes tem sido relatada como benéfica para os cupins (Sands, 1969). Diversos são os tipos de associações entre cupins e fungos, podendo ocorrer relações comensais, parasíticas, predatórias, mutualísticas, de nutrição, saprofitismo e de transporte de fungos pelos cupins (Sands, 1969; Dejean & Bolton, 1995; Dejean et al., 1997; Leponce et al., 1999).

Os fungos constituem um dos microorganismos entomopatógenos mais impactantes à sanidade das colônias termíticas, pelo fato de muitos possuírem a capacidade de prosperarem em ambientes quentes e úmidos, assim como os cupins (Batra e Batra, 1979). Devido às condições de temperatura e umidade do interior dos cupinzeiros, os cupins são expostos constantemente a fungos patogênicos, representando um risco de contaminação em massa da colônia, tendo em vista o modo de vida social e alimentação por trofalaxia (Wilson, 1999).

Na maioria dos casos, os fungos patógenos apresentam alta capacidade de esporulação e dispersão, e atuam penetrando diretamente à cutícula dos insetos (Roberts & Humber, 1981; Gillespie et al., 2000; Wang & St Leger, 2006). Os gêneros *Aspergillus, Cladosporium, Paecilomyces* e *Penicillium* são alguns dos fungos que apresentam espécies entomopatógenas e que tiveram seu potencial avaliado em diversos estudos com insetos (Prates, 1980; Maniania & Fargues, 1992; Laakso & Gloer, 1993, Costa et al., 1998; Alves et al., 2001; Moraes et al., 2001), sendo referidos como fungos de alta toxidade, por causar sérios danos as populações termíticas (Rouland-Lefevre, 2000).

A capacidade de controlar o crescimento microbiano, especialmente de fungos patogênicos e competidores, pode ser altamente benéfica para os cupins (Becker & Lenz, 1976; Batra & Batra, 1979). Dentre as medidas adotadas para o controle de microorganimos fúngicos, os cupins utilizam uma série de combinações complexas de comportamento, estratégias fisiológicas e bioquímicas (Rosengaus et al., 2011). Efeito positivo das substâncias majoritárias dos terpenóides α- pineno e limoneno, em percentuais semelhantes ao observado nas glândulas de *Nasutitermes nigriceps*, *N. costalis* e *N. acajutlae* foram observados na inibição da germinação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Rosengaus et al., 2000).

Entretanto, apesar da grande importância e das inúmeras relações entre cupins e

fungos, muitas vezes benéficas ou não, poucos estudos versam sobre a composição micótica dos ninhos de cupins, havendo maior número de estudos com a subfamília Macrotermitinae (Correia, et al., 2008). Algumas pesquisas avaliaram o uso de fungos entomopatógenos para controle de cupins e os benefícios de fungos decompositores da lignocelulose para estes insetos (Hendee, 1933, 1934; Passos, 2009).

No entanto, poucos são os estudos em relação a testes de eficiência da defesa dos cupins contra micro-organismos (Rosengaus, 2000; Fuller, 2007). Além disso, o efeito dos constituintes da secreção produzida pela glândula frontal no controle de populações de fungos entomopatógenos no interior dos ninhos são ausentes, necessitando-se de maiores esclarecimentos acerca da ação antifúngica da defesa química dos cupins.

O objetivo desse estudo foi verificar a riqueza de fungos associados aos ninhos de *N. corniger* em área urbana e analisar a ação antimicótica dos compostos químicos majoritários da secreção defensiva desse cupim frente à colonização de fungos patógenos em seus ninhos.

Material e Metódos

Área de Estudo - O estudo foi realizado com amostras populacionais de *N. corniger* coletadas na área urbana de quatro cidades do Agreste paraibano, uma região semiárida do NE brasileiro. Algumas áreas apresentam trechos quase tão úmidos quanto às áreas da zona da mata, na qual estão localizadas as cidades de Areia (06º57´42” S/ 35º41´43”O) e Bananeiras (06° 45' 00" S/ 35° 37' 58" O) (Fig. 1), caracterizadas como brejo de altitude (altitude entre 650 a 1.000m, temperatura média anual entre 18º a 28ºC e média pluviométrica anual de 1.194 mm). Ambas as cidades encontram-se circundadas por matas serranas, consideradas área de disjunção ecológica da Mata Atlântica, remanescentes de regiões com elevada biodiversidade. Essas regiões são mais úmidas que as demais áreas do semiárido, devido ao efeito orográfico nas precipitações e na redução dos índices térmicos (Vivo, 1997; Costa, 2003; Barbosa et al., 2006; Santos et al., 2007) (Fig. 1). Em contraste, as cidades de Pocinhos e Campina Grande localizam-se em regiões de Caatinga (altitude entre 500 a 640 m e temperatura entre 21º e 30ºC e média pluviométrica anual de 382,2 e 802mm) que apresentam climas áridos, com temperaturas elevadas e um padrão irregular de precipitação (Sudene, 1990) (Fig. 1).

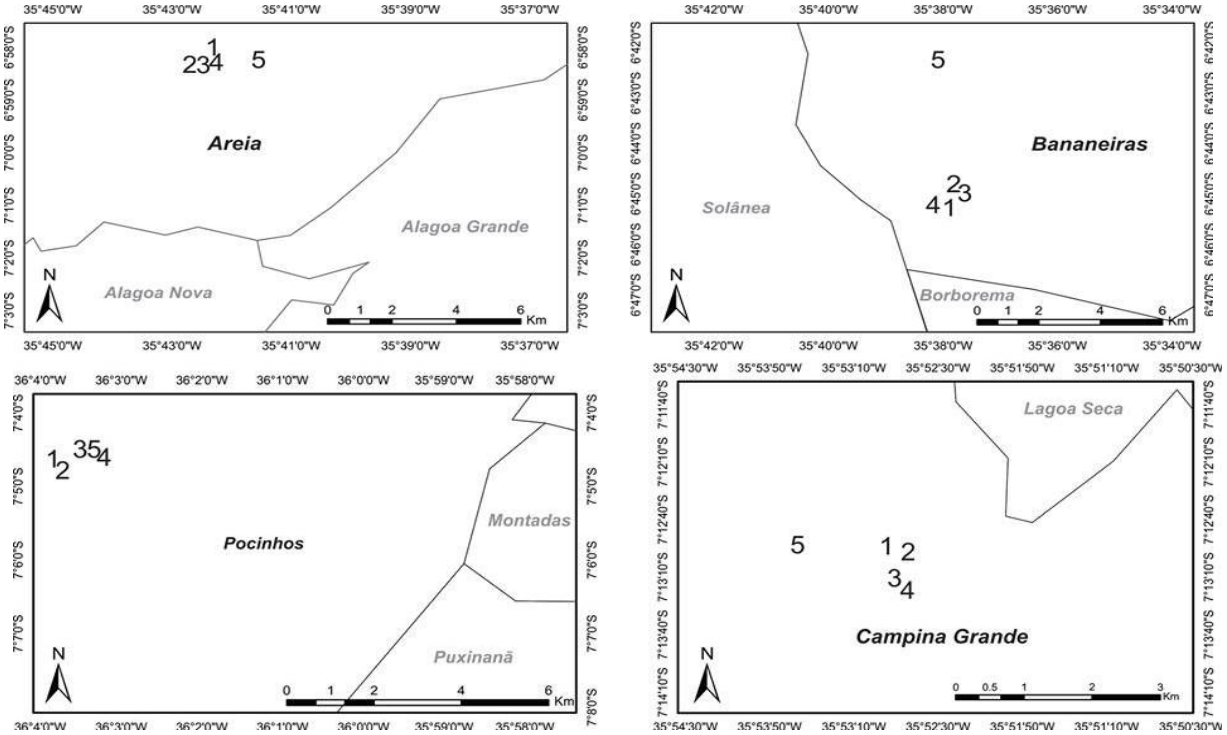

Fig.01. Locais de coleta dos ninhos em áreas de Brejo de Altitude: Areia (**A**) e Bananeiras (**B**), e Semiáridas: Pocinhos (**C**) e Campina Grande (**D**), no Agreste paraibano, Nordeste do Brasil.

Procedimentos e amostragem:

Isolamento das colônias fúngicas e identificação dos fungos – A composição micótica dos ninhos foi avaliada a partir de cinco ninhos de *N. corniger*, coletados nas áreas urbanas de cada cidade em estudo, totalizando 20 amostras. O material foi homogeneizado individualmente retirando-se de cada uma das amostras 1 g de material que foi transferido para tubos de ensaio com 9 ml de água destilada esterilizada. Em seguida, realizaram-se diluições sucessivas até 10^{-4}g/ml. Posteriormente, 100 µl de cada diluição foram distribuídas em placas de Petri esterilizadas, com meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), acrescentando-se imediatamente 40 µl de Sulfato de gentamicina, objetivando-se evitar contaminação bacteriana nos tratamentos. O ensaio foi realizado com cinco réplicas, sendo as placas, após solidificação, incubadas durante seis dias à temperatura ambiente (25±2°C) para o desenvolvimento das colônias. A identificação dos fungos foi realizada a partir da preparação de esfregaços em lâminas de microscopia coradas com azul de Aman. O procedimento de identificação foi realizado com observações de micélio, conídios e esporos, confrontando-as com as descrições de Barnett e Hunter (1972) e Singh et al. (1991).

Avaliação do potencial antifúngico dos componentes químicos da secreção defensiva – Utilizou-se isolados de colônias fúngicas dos gêneros *Penicillium* sp.1, *Cladosporium* sp. e *Paecilomyces* sp.1, fungos com potencial entomopatógeno confirmado na literatura (Gonçalves, 1963; Prates, 1980; Maniania & Fargues, 1992; Laakso & Gloer 1993, Costa et al. 1998; Alves et al. 1998; Moraes et al. 2001). Para isso, utilizaram-se as substâncias sintéticas α-pineno, β- pineno e Limoneno, componentes majoritários da secreção defensiva de *N. corniger* (Mello et al., em preparação). Os testes foram conduzidos com base nas médias das concentrações das substâncias observadas nos cromatogramas pela técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro quadrupolar de massas, e também em quatro concentrações inferiores (α-pineno – 40%, 20%, 10%, 5%, 0,5%), (β- pineno -15%, 7%, 3%, 1,5%, 0,15%), (Limoneno – 4%, 2%, 1%, 0,5%, 0,05%) (Mello et al., em preparação). Também foi conduzido ensaio para verificar o efeito sinergético das substâncias a partir da mistura das três substâncias acima mencionadas (Concentração 1: 40% de α-pineno + 15% de β- pineno + 4% de Limoneno; Concentração 2: 20% de α-pineno + 7% de β- pineno + 2% de Limoneno; Concentração 3: 10% de α-pineno + 3% de β- pineno + 1% de Limoneno; Concentração 4: 5% de α-pineno + 1,5% de β- pineno + 0,5% de Limoneno; Concentração 5: 0,5% de α-pineno + 0,15% de β- pineno + 0,05% de Limoneno). O experimento foi realizado com cinco réplicas e ensaios controle.

Efeito da volatilidade dos monoterpenos sob as colônias fúngicas – Realizaram-se bioensaios com soluções de esporos e a determinação da sua concentração foi determinada com auxílio da Câmara de Neubauer. 50 µl dessa solução foi transferida para placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA) estéril. Papeis filtros medindo 5 cm x 5 cm, impregnados com 200 µl das substâncias majoritárias α-pineno, β- pineno e Limoneno, nas concentrações pré-determinadas de forma isolada, e posteriormente, combinada, foram utilizados para verificar o efeito sinergético das substâncias. Os bioensaios foram avaliados a cada 72 horas, perfazendo 12 dias de avaliação do crescimento das colônias.

Efeito de contato dos monoterpenos majoritários no desenvolvimento de colônias fúngicas - As substâncias foram adicionadas nas concentrações pré-determinadas, de forma isolada e combinada, em tubos de ensaio contendo as soluções de esporos. Após vigorosa agitação dos tubos, 50 µl da solução foi acondicionada em placas de Petri (20 mL/placa-1), segundo Marques et al. (2004). Como controle foram utilizadas placas contendo apenas o meio BDA e

os isolados fúngicos. Todas as placas foram incubadas em temperatura ambiente (25±2°C) durante 12 dias. O experimento foi realizado inteiramente casualizado com cinco réplicas, seguindo proposta de Marques et al. (2004) e Rosengaus et al. (2000). O crescimento radial das colônias (diâmetro médio) e a produção de conídios foram utilizados como parâmetros de avaliação do desempenho dos fungos em relação às diferentes concentrações das substâncias. A avaliação do crescimento radial das colônias foi realizada a cada 72 horas, perfazendo 12 dias. A produção de esporos foi avaliada com 24hs após o plaqueamento, em temperatura ambiente. Todo o experimento foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual da Paraíba, Campus II, localizada na cidade de Lagoa Seca-PB.

Fatores edáfico-climáticos - Os dados climáticos foram obtidos através do Boletim agroclimático mensal do Instituto Nacional de Meteorologia (Inmet 2012, 2013). No momento da coleta foram aferidas a temperatura e umidade relativa do ar local através de um termohigrômetro. Amostras do solo em torno das árvores que continham os ninhos foram coletadas, cerca de 200 g, a 20 cm de profundidade, em três pontos equidistantes do vegetal hospedeiro para compor uma amostra mista. Foram analisads as propriedades físicas (granulometria) pelo método de hidrômetro proposto por Bouyoucos (1951), modificado por Day (1965), conforme descrito por Forsyth (1975), e químicas (matéria orânica, ph, carbono) e umidade do solo.

Análise estatística- Com os dados da frequência absoluta das colônias fúngicas foram realizados testes de riqueza, diversidade de Shanon-Wiener (H') e equitabilidade (J), utilizando o programa DivES (Rodrigues, 2005). Para uma análise comparativa da riqueza, abundância e diversidade de fungos entre os ninhos realizou-se o teste de análise de variância de Friedman (ANOVA de Friedman) com o pacote Bioestat 5.0. As análises da comunidade fúngica (frequência, abundância, dominância e constância) foi realizada por meio do programa AnaFau (MORAES et al., 2003). Com o programa Primer® versão 6, a matriz de dados de abundância foi transformada em Log (x+1) para construção do diagrama de ordenação do MDS (Ordenação multidimensional não métrica), com base na similaridade de Bray Curtis. A matriz de dados ambientais (temperatura, umidade, precipitação e composição do solo) teve sua abundância numérica transformada em raiz quarta para construção de um diagrama de ordenação do MDS (Bray Curtis) objetivando verificar o padrão de dissimilaridade entre as áreas. Posteriormente, os dados ambientais temperatura, umidade do

ar e a precipitação foram analisadas através da análise de variância (ANOVA), e os de dados de composição do solo através da PERMANOVA. Para se avaliar o crescimento das colônias fúngicas, a produção e viabilidade dos esporos tratados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Resultados

Da riqueza micótica associada aos ninhos

Foram registrados 23 morfotipos de fungos distribuídos em oito gêneros, pertencentes ao filo Ascomycota (Tab. 1). Os ninhos coletados no Brejo de Altitude apresentaram maior riqueza e diversidade de fungos, quando comparados aos ninhos do semiárido (Tab. 2). Contudo, apesar da menor riqueza micótica, os ninhos de uma das cidades do semiárido apresentou a segunda maior abundância de colônias do estudo (Tab. 2).

Registrou-se fungos exclusivos para os ninhos de Bananeiras (04), Areia (07) e Campina Grande (02) (Tab. 1). Os fungos *Penicillium* sp.1, *Aspergillus flavus* e *A. niger* estiveram presentes nos ninhos das quatro cidades. *Penicillium* sp.3, *Paecilomyces* sp.1 e *Paecilomyces* sp.2 foram comuns aos ninhos de Areia e Bananeiras. *Trichoderma* sp. foi encontrado nos ninhos de Areia e Campina Grande, enquanto *Paecilomyces* sp1. foi encontrado nos ninhos de Bananeiras, Areia e Campina Grande (Tab. 1).

Tabela 1 - Fungos em ninhos de cupins *Nasutitermes corniger* em áreas de Brejo de altitude e Semiáridas, Nordeste do Brasil, 2013.

Espécies	Abundância											
	Brejo de altitude						Semiárido					
	Bananeiras	Areia	N	F	C	A	Pocinhos	Campina Grande	N	F	C	A
*Penicillium*sp1. -	58	98	156	mf	w	ma	340	78	418	sf	w	sa
Penicillium sp2.	0	104	104	mf	w	ma	0	0				
Penicillium sp3	42	83	125	mf	w	ma	0	0				
Penicillium sp.4 -	106	0	106	mf	w	ma	0	0				
Penicillium sp. 5	0	0	0				0	138	138	mf	w	ma
Verticillium sp1. -	0	24	24	pf	w	d	26	0	26	f	w	c
Verticillium sp.2 -	32	0	32	f	w	c	0	0				
Aspergillus niger	46	45	91	mf	w	ma	37	21	58	f	w	c
Aspergillus flavus c.f	8	26	34	f	w	c	13	85	98	mf	w	ma
Aspergillus fumigatus c.f	4	0	4	pf	w	r	0	0				
Aspergillus sp.1	0	12	12	pf	w	r	0	0				
Aspergillus sp.2	0	18	18	pf	w	r	0	0				
Aspergillus sp.3	0	11	11	pf	w	r	0	0				
Aspergillus sp.4	0	0	0				0	11	11	f	w	c
Cladosporium sp. -	29	17	46	f	w	c	4	9	13	f	w	c
Paecilomyces sp.1	58	18	76	mf	w	ma	0	5	5	pf	w	d
Paecilomyces sp.2	7	6	13	pf	w	r	0	0				
Paecilomyces sp.3	0	4	4	pf	w	r	0	0				
Trichoderma sp.	0	27	27	f	w	c	0	6	6	pf	w	d
Cephalosporium sp.	0	4	4	pf	w	r	0	0				
Fusarium sp.1	16	0	16	pf	w	r	0	0				
S/I 1	0	2	2	pf	w	r	0	0				
S/I 2	3	32	35	f	w	c	0	0				

Número total de colônias fúngicas (N), frequência relativa (F), constância (C) e abundância (A) de fungos isolados dos ninhos de *Nasutitermes corniger*, em região semiárida do Nordeste do Brasil, 2013. S/I 1 e S/I 2= Sem identificação. F = Frequência: mf = muito frequente, f = frequente e pf = pouco frequente. C = Constância: w = constante, y = acessória e z = acidental. A = Abundância: ma = muito abundante, r = rara, c = comum e d = dispersa.

Verificou-se diferenças significativas ao avaliar a abundância e a diversidade micótica entre os ninhos de *N. corniger* dos municípios de Pocinhos (área semiárida) e Areia (área de Brejo de altitude) (Fr = 11,5; p = 0,009) (Tab. 2).

Tabela 2. Riqueza de espécies (S), número total de colônias fúngicas (N), dominância (D), índice de diversidade de Shannon (H'), equitabilidade (E) de fungos isolados dos ninhos de *Nasutitermes corniger*, em região semiárida do Nordeste do Brasil, 2013.

Localidade	**S**	**N**	**D**	**H'**	**E**
Pocinhos	5	420	0,67	0,31	0,44
Bananeiras	12	409	0,14	0,92	0,85
Areia	17	531	0,12	1,04	0,84
Campina Grande	8	353	0,26	0,67	0,74

Penicillium sp., *Cladosporium* sp. e *Aspergillus flavus* e *A. niger* foram os isolados mais frequentes e abundantes entre os ninhos nas áreas de estudo (Tab. 2). *Paecilomyces* (*Paecilomyces* sp.3), *Cephaalosporium*, *Fusarium* e *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *Aspergillus* sp.1, *Aspergillus* sp.2, *Aspergillus* sp.3 e *Aspergillus* sp.4) apresentaram morfotipos com ocorrências pontuais e foram classificados como raros e/ou dispersos (Tab. 1). Nove fungos foram classificados como constantes e os demais apresentaram uma distribuição acessória (Tab. 1).

As amostras isoladas dos ninhos em uma das áreas Semiáridas foram distribuídas a esquerda do diagrama de ordenação do MDS, enquanto que os isolados do Brejo de Altitude distribuíram-se a direita, mostrando dissimilaridade entre as áreas (Fig. 2).

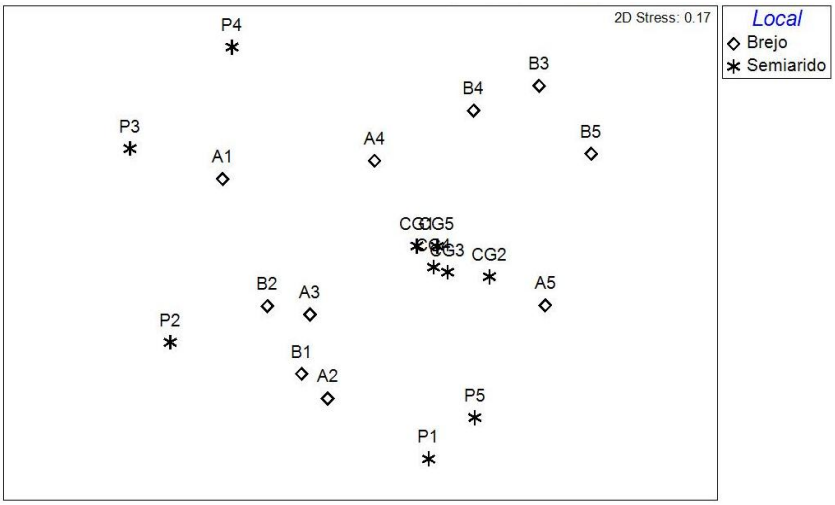

Figura 2. Ordenação da análise de escalonamento multidimensional não métrica (n-MDS) da similaridade micótica isolada de ninhos de *Nasutitermes corniger* entre as áreas urbanas de Brejo de altitude e Caatinga, NE do Brasil, 2013.

As áreas de estudo apresentam características ambientais distintas, com diferenças nos padrões climáticos e de composição do solo, conforme observado na análise do diagrama de ordenação do MDS (Fig.3). Houve diferença significativa entre as médias de precipitação (F=45.7; p<0,01) e temperatura (F=71.1; p<0,01) das áreas estudadas.

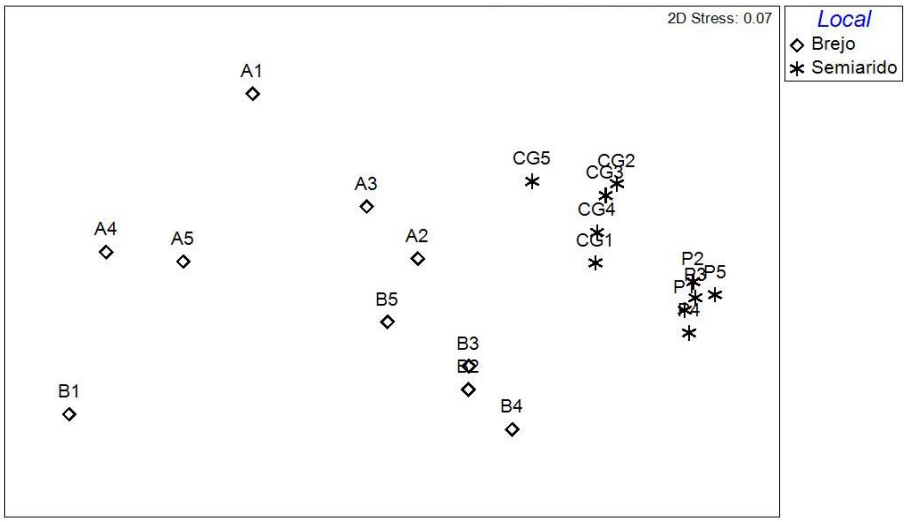

Figura 3. Ordenação da análise de escalonamento multidimensional não métrica (n-MDS) da similaridade entre as áreas de coleta, com base nas variáveis climáticas (temperatura, precipitação, umidade do ar) e edáficas (Percentual de areia, silte, umidade do solo, pH, matéria orgânica e carbono) das áreas de Brejo de altitude e Semiárido, no Agreste paraibano, NE do Brasil, 2013.

Os municípios do semiárido apresentaram solo com característica textural arenosa, enquanto que o solo dos municípios do Brejo de altitude apresentaram maiores quantidades de argila, caracterizando-se como um solo argiloso. A análise de PERMANOVA não mostrou diferenças significativas entre a composição física, umidade, ph, matéria orgânica e quantidade de carbono dos solos entre as áreas (F=20,66; p =0,33). Contudo, os solos do Brejo de altitude apresentaram maiores quantidades de argila, matéria orgânica, carbono e umidade do solo.

Do efeito das substâncias majoritárias no controle do crescimento fúngico

- *α-pineno*

O crescimento radial das colônias de *Paecilomyces* sp.1, *Penicillium* sp.1 e *Cladosporoium* sp. foi afetado pelo α-pineno em ambos os testes contato e volátil até a

concentração de 20%, com melhores resultados no teste volátil (F=5.24; p=0,002) (Tab.3). Verificou-se diferenças entre os testes volátil e contato na eficiência da redução do crescimento radial de *Penicillium* sp.1 (F=54,2; p<0,001) (Fig. 4A).

O α-pineno apresentou efeito significativo tanto no teste volátil quanto no contato com a solução de esporos, reduzindo a esporulação de *Paecilomyces* sp.1, *Penicillium* sp.1, e *Cladosporium* sp. (F= 9,4; p<0,0001). Essa substância apresentou diferença significativa quanto aos testes volátil e contato sob a esporulação de *Paecilomyces* sp.1 (F=51.7; p<0,0001), situação não observada para os fungos *Penicillium* sp.1 e *Cladosporium* sp. Contudo, para os três isolados, em ambos os ensaios, verificou-se redução na produção de esporos até a concentração de 5% (Tab. 3) (Fig. 4B). O α-pineno também apresentou maior eficiência na redução da produção de esporos de *Paecilomyces* sp.1 no teste volátil quando comparado às médias da concentração de 40% e controle, já para *Penicillium* sp.1 e *Cladosporium* sp. este composto atuou de forma mais eficaz no ensaio contato (Tab. 3).

A germinação dos esporos dos três fungos estudados foi afetada pelo α-pineno, apresentando reduções significativas até a concentração de 10%. Alta redução na germinação dos esporos foi observada na concentração de 40% e em menor proporção na concentração de 20% em relação ao controle (F= 54,6; p<0,0001) (Tab. 3).

- *β-pineno*

O crescimento radial das colônias de *Paecilomyces* sp.1, *Penicillium* sp.1 e *Cladosporoium* sp. foi afetado pelo β-pineno em ambos os testes contato e volátil até a concentração de 3% (Tab.4). Verificou-se diferenças entre os testes volátil e contato, sendo no teste contato observado melhores resultados na redução do crescimento radial de *Cladosporium* sp. (F=23.08; p<0,001) (Fig. 4C).

O β-pineno teve efeito significativo em ambos os testes, reduzindo a esporulação dos isolados a concentração de 3% (F=4.7; p=0,003). Verificou-se diferença significativa entre a esporulação de *Paecilomyces* sp.1 e os testes contato e volátil (F=124.5; p<0.0001), sendo para este fungo o teste volátil o mais eficiente na redução da esporulação (Fig. 4D). A germinação dos esporos dos três fungos estudados foi afetada pelo β-pineno, com redução significativa apenas na concentração de 15% (F=5,1; p=0,01) (Tab. 4).

- *Limoneno*

O Limoneno afetou o crescimento radial dos fungos estudados, em ambos os testes até a concentração de 3% (F=36.6; p=0,0001) (Tab.5). Verificou-se diferenças entre os testes volátil e contato, sendo no teste contato observado os melhores resultados na redução do crescimento radial de *Penicillium* sp.1 e *Cladosporium* sp. (F=226.16; p<0,001) (Fig. 4E).

Houve efeito significativo em ambos os ensaios também na redução de esporulação dos isolados em estudo até a concentração de 2% (F=13,2; p<0,0001) (Tab. 5). Observou-se diferenças significativas na esporulação dos três fungos, observando-se melhores resultados no teste volátil para os três isolados (F=23; p<0,0001) (Fig. 4F). Enquanto a germinação dos esporos dos três fungos estudados foi fracamente afetada pelo Limoneno apresentando uma pequena redução apenas na concentração de 4% (F=27,2; p=0,0001) (Tab. 5).

- *Efeito sinergético: α-pineno + β- pineno + Limoneno*

A combinação das substâncias *α*-pineno, *β*-pineno e Limoneno afetaram o crescimento radial dos fungos estudados, em todas as concentrações testadas (F=23.03; p<0,0001) (Tab.6). Entretanto, a eficiência das substâncias no controle do crescimento radial apresentou diferenças de acordo com o teste realizado e a espécie de fungo testada.

Verificou-se diferenças entre os testes volátil e contato para *Penicillium* sp.1, sendo no teste volátil observado os melhores resultados na redução do crescimento radial (F=69.03; p<0,001) (Fig. 4G). No ensaio contato houve redução no crescimento de *Penicillium* sp.1 e *Cladosporium* sp. até a concentração de 5. *Paecilomyces* sp.1 mostrou-se mais resistente ao efeito das substâncias, necessitando de maiores concentrações para inibição do crescimento da colônia, com efeito de controle até a concentração 4.

As substâncias apresentaram efeito significativo sob a redução da produção de esporos, em ambos os ensaios sob os isolados, verificando-se redução da esporulação até a concentração 3 (F= 19,5; p<0,0001) (Tab.6). No entanto, maior redução da produção de esporos foi observada para *Penicillium* sp.1 e *Cladosporium* sp., em ambos os ensaios quando comparados as concentrações 1 e controle (Tab. 6) (Fig. 4H). A germinação dos esporos dos fungos estudados foi afetada pelas substâncias, com melhores resultados até a concentração 2, e prosseguindo com considerável redução até a concentração de 4% (F= 51,1; p<0,0001) (Tab. 6).

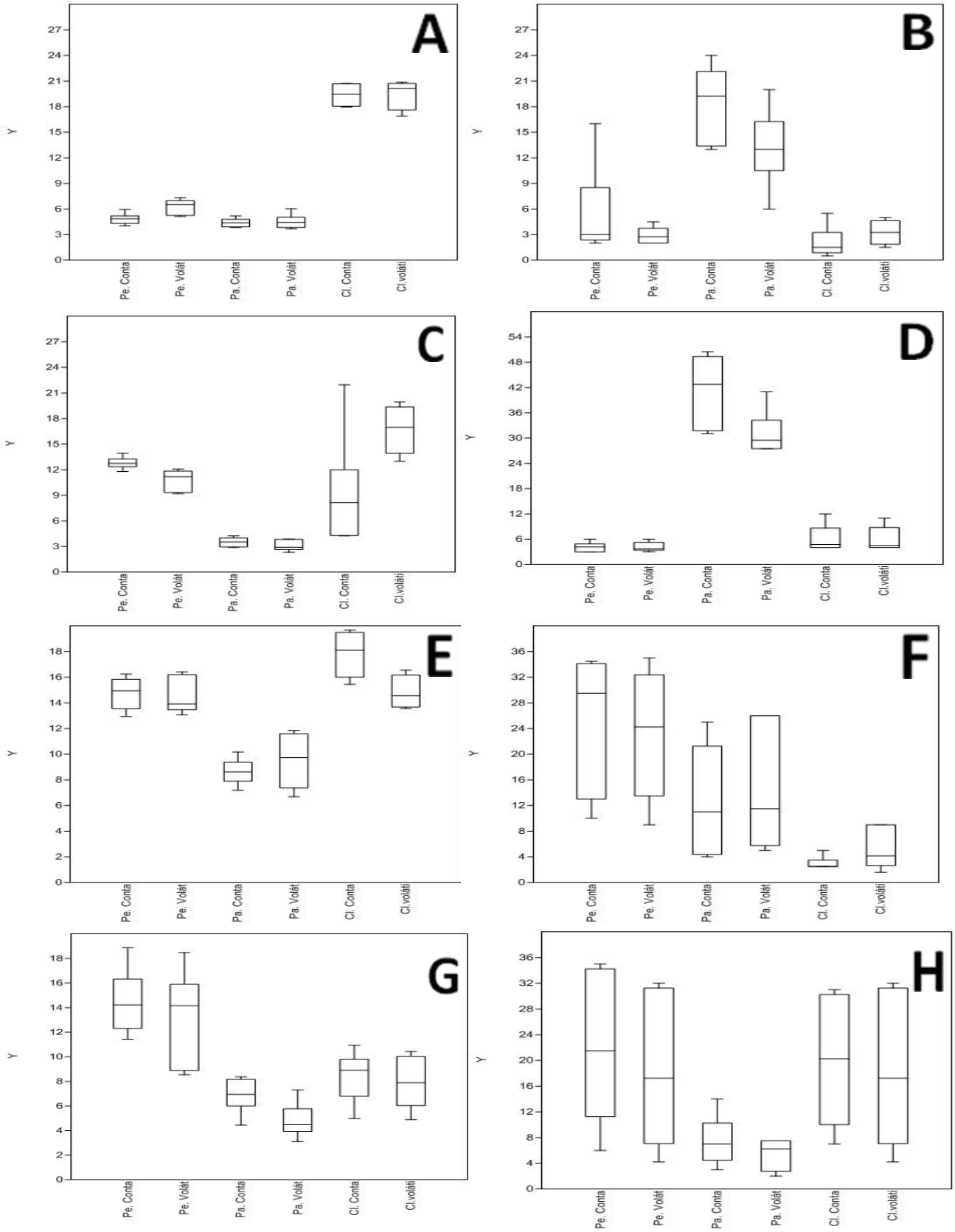

Figura 4: Efeito dos monoterpenos nos testes contato e volátil: a-pineno nas médias de crescimento radial (A) e produção de esporos (B); b-pineno nas médias de crescimento radial (C) e produção de esporos (D); Limoneno nas médias de crescimento radial (E) e produção de esporos (F); e efeito sinergético de a-pineno+b-pineno+limoneno nas médias de crescimento radial (G) e produção de esporos (H). Pe (*Penicillium* sp.1). Pa (*Paecilomyces* sp.1). Cl (*Cladosporium* sp.).

Tabela 3. Efeito do α-pineno sob o crescimento radial, a produção e germinação de esporos de fungos isolados de ninhos de *Nasutitermes corniger* em área urbana de Brejo de altitude e semiárida, NE do Brasil, 2013. (PA= *Paecilomyces* sp.1; PE= *Penicillium* sp.1; CL= *Cladosporium* sp.)

		Crescimento radial						Produção de esporos						Germinação de esporos		
		Penicillium		Paecilomyces		Cladosporium		Penicillium		Paecilomyces		Cladosporium		Pe	Pa	Cl
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2			
A-pineno (%)	40	4.04a	5.29a	3.84a	3.68a	19.35a	16.9a	2a	2a	13a	6a	0.5a	1.5a	10a	4a	6a
	20	4.4a	5.14a	3.93a	3.89a	19.55a	17.87a	2.5a	2a	13.5a	12.5a	1a	2a	18.7a	16a	17.2a
	10	5.95a	6.88a	4.19a	4.22a	20.73a	20.67a	2.5a	2.5a	18.5a	13.5a	1.5a	3a	48.25a	38a	41.3a
	5	4.87b	6.44b	4.64b	4.63b	17.96b	20.88b	3.5b	3b	20b	15b	1.5b	3.5b	80b	86b	80.4b
	0.5	4.86b	6.6b	4.58b	4.72b	18.07b	19.87b	6b	3.5b	21.5b	12b	2.5b	4.5b	89.2b	93b	88.25b
	C	4.96b	7.32b	5.21b	6.03b	20.66b	20.39b	16b	4.5b	24b	20b	5.5b	5b	90.14b	93b	89.12b

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferenciam estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. **(C)** Controle: meio isento de α-pineno.

Tabela 4. Efeito do β-pineno sob o crescimento radial, a produção e germinação de esporos de fungos isolados de ninhos de *Nasutitermes corniger* em área urbana de Brejo de altitude e semiárida, NE do Brasil, 2013. (PA= *Paecilomyces* sp.1; PE= *Penicillium* sp.1; CL= *Cladosporium* sp.)

		Crescimento radial						Produção de esporos						Germinação de esporos		
		Penicillium		Paecilomyces		Cladosporium		Penicillium		Paecilomyces		Cladosporium		Pe	Pa	Cl
		C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V			
B-pineno (%)	15	12.62a	9.21a	2.89a	2.32a	4.31a	13a	2.9ª	3a	18a	19.2a	4a	4a	24a	21.78a	0a
	7	13.06a	11.51a	2.98a	2.74a	4.25a	14.22a	4ª	3.5a	19.5a	22.5a	4a	4a	90a	70.2a	0a
	3	12.85a	9.37a	3.93a	3.02a	7.85a	15.93a	4.25a	3.5a	20.2a	23.2a	4a	4.5a	94.3a	97a	5a
	1.5	12.54a	11.77a	3.62a	2.81a	8.42a	19.16a	4.5ª	5a	22.5a	24.8a	5.5a	4.5a	95.5a	98.45a	20a
	0.15	13.92b	12.09b	3.43b	3.84b	8.68b	18.03b	3b	4b	22.5b	25b	7.5b	8b	95.8b	98.6b	80b
	C	11.8b	10.84b	4.25b	3.87b	21.97b	19.95b	6b	6b	22.6b	25.5b	12b	11b	98b	99.8b	98b

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferenciam estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. **(C)** Controle: meio isento de β -pineno.

Tabela 5. Efeito do Limoneno sob o crescimento radial, a produção e germinação de esporos de fungos isolados de ninhos de *Nasutitermes corniger* em área urbana de Brejo de altitude e semiárida, NE do Brasil, 2013. (PA= *Paecilomyces* sp.1; PE= *Penicillium* sp.1; CL= *Cladosporium* sp.)

		Crescimento radial						Produção de esporos						Germinação de esporos		
		Penicillium		Paecilomyces		Cladosporium		Penicillium		Paecilomyces		Cladosporium		Pe	Pa	Cl
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2			
Limoneno (%)	4	12.94a	13.08a	7.19a	6.68a	15.45a	13.72a	10a	9a	4a	5a	2.5a	1.6a	96a	95a	96a
	2	13.75a	13.75a	8.12a	7.6a	16.19a	13.55a	14a	15a	4.5a	6a	2.5a	3a	97a	98a	98a
	1	14.83a	13.59a	8.5a	8.71a	17.32a	13.97a	25a	21a	11a	10.5a	2.5a	3.5a	98a	99a	98a
	0.5	15.05b	14.1b	8.73b	10.76b	18.9b	15.15b	34b	27.5b	11b	12.5b	2.5b	4.8b	99b	99b	99b
	0.05	15.7b	16.13b	9.1b	11.5b	19.43b	16.04b	34b	31.5b	20b	26b	3b	9b	99b	99b	99b
	C	16.25b	16.41b	10.18b	11.85b	19.68b	16.55b	34.5b	35b	25b	26b	5b	9b	99b	99b	99b

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferenciam estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. **(C)** Controle: meio isento de Limoneno.

Tabela 6. Efeito sinergético dos monoterpenos α-pineno, β-pineno e Limoneno sob o crescimento radial, a produção e a germinação de esporos de fungos isolados de ninhos de *Nasutitermes corniger* em área urbana de Brejo de altitude e semiárida, NE do Brasil, 2013. (PA= *Paecilomyces* sp.1; PE= *Penicillium* sp.1; CL= *Cladosporium* sp.)

		Crescimento radial						Produção de esporos						Germinação de esporos		
		Penicillium		Paecilomyces		Cladosporium		Penicillium		Paecilomyces		Cladosporium		Penicillium	Paecilomyces	Cladosporium
		C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V			
A-pineno+ B-pineno+Limoneno (%)	A	11.43a	8.54a	4.45a	3.1a	4.98a	4.89a	6a	4.2a	3a	2a	7a	4.2a	2a	1a	1a
	B	12.6a	9a	6.53a	4.21a	7.4a	6.42a	13a	8a	5a	3a	11a	8a	4a	2a	3a
	C	13.52a	13.48a	6.81a	4.33a	8.85a	6.7a	16a	10.5a	7a	5.5a	18a	10.5a	10a	19a	22a
	D	14.91a	14.84a	7.08a	4.62a	8.96a	9.09a	27a	24a	7a	7a	22.5a	24a	27a	23a	24a
	E	15.46b	15.03b	8.1b	5.28b	9.42b	9.9b	34b	31b	9b	7.5b	30b	31b	62b	61b	61b
	*C	18.88b	18.48b	8.38b	7.3b	10.94b	10.43b	35b	32b	14b	7.5b	31b	32b	99b	99b	99b

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. (**Concentração A**: 40% de α-pineno + 15% de β- pineno + 4% de Limoneno; **Concentração B**: 20% de α-pineno + 7% de β- pineno + 2% de Limoneno; **Concentração C:** 10% de α-pineno + 3% de β- pineno + 1% de Limoneno; **Concentração D**: 5% de α-pineno + 1,5% de β-pineno + 0,5% de Limoneno; **Concentração E**: 0,5% de α-pineno + 0,15% de β- pineno + 0,05% de Limoneno. ***C:** Controle: isento de substâncias.

Discussão

Da riqueza micótica associada aos ninhos

Os fungos isolados neste estudo pertencem ao filo Ascomycota, micro-organismos abundantes, com cerca de 30.000 espécies, frequentemente encontrados nos solos (Moreira & Siqueira, 2006). Os esporos fungicos provavelmente são aderidos as cutículas dos cupins e assim são transportados para o interior dos ninhos (Sands, 1969; Cavalcanti & Maia, 1994).

Os maiores índices de riqueza, diversidade, e similaridade micótica dos ninhos de *N. corniger* do Brejo de altitude provavelmente possam ser explicados por estas áreas serem consideradas pontos de disjunção ecológica da Mata Atlântica, remanescentes de regiões com elevada biodiversidade (Veloso et al., 1991). Tratam-se de áreas com temperaturas mais amenas e mais úmidas que o semiárido (Barbosa et al., 2006), fatores que aliados ao micro-habitat favorável dos ninhos propiciem condições ótimas ao desenvolvimento das colônias fúngicas.

A análise comparativa dos parâmetros ecológicos da comunidade fúngica entre os isolados das cidades de Pocinhos e Areia, cidades com grandes diferenças climatológicas, exibe o quanto a heterogeneidade do ambiente interfere na diferenciação da composição, riqueza e abundância micótica dos ninhos. Para Magurran (1988) e Gliessmann (2000) regiões mais diversas conduzem a uma maior diferenciação de habitats e aumento na produtividade que, por sua vez, permitem uma diversidade ainda maior de espécies, tornando assim as interações ecológicas próximas a estabilidade.

A baixa riqueza de espécies e a segunda maior abundância de colônias de fungos registrada para a cidade de Pocinhos talvez se explique pelas condições climatológicas e de composição do solo da região, com baixos índices de precipitação, umidade do ar e matéria orgânica do solo. Estes fatores podem proporcionar aumento da competição, e desta forma a riqueza de espécies fúngicas tenderem a um decréscimo, permanecendo apenas espécies com maior potencial competitivo no microhabiatat.

Não obstante, os valores superiores de umidade, matéria orgânica e carbono do solo das regiões de Brejo de altitude possivelmente sejam fatores que favoreceram a uma maior riqueza e diversidade de colônias fúngicas isoladas nos ninhos destas regiões. Embora tenha ocorrido diferenciação na composição micótica associada aos ninhos dos cupins, não se pode afirmar a existência de especificidade micótica em ninhos de uma determinada região, já que

as espécies que apresentaram exclusividade de ocorrência apresentaram-se de forma pontual.

Os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*, os mais frequentes neste estudo, mostram-se consideravelmente adaptados ao microhabitat dos ninhos, pois estes fungos também apresentaram alta frequência em ninhos de *Constrictotermes cyphergaster* em área de caatinga, e em estudos anteriores (Hendee, 1933; Zoberi & Grace, 1990; Barbosa-Silva et al., in preparação).

Além disso, alguns fungos isolados neste estudo, como *Penicillium* sp., *Paecilomyces* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp. e *Trichoderma* sp. apresentam potencial entomopatógeno comprovados (Laakso & Gloer, 1993; Costa et al. 1998, Rouland-Lefevre, 2000; Moraes et al. 2001; Costa et al., 2002), e deste modo, representam risco a integridade da colônia termítica.

Do efeito das substâncias majoritárias no controle do crescimento fúngico

Os melhores resultados de inibição do crescimento no teste volátil observado para o α-pineno e o β-pineno, principais componentes da secreção defensiva de *N. corniger*, indica que esta substância além de servir nas atividades de recrutamento e alarme quando em contato com os esporos de fungos (Rosengaus 1999, 2004), quanto como estratégia de combate a infecções fúngicas, atuando no controle do crescimento micelial.

A literatura relata que os ninhos de muitas espécies do gênero *Nasutitermes* apresentam forte odor de terpenóides, sugerindo que os compostos voláteis presentes na secreção defensiva dos soldados podem impregnar a parede do ninho e torná-lo impróprio para o crescimento de fungos (Rosengaus et al, 2000).

Os presentes dados corroboram Rosengauns et al. (2000) e Fuller et al. (2007) no que se refere à eficiência do α-pineno, componente majoritário da defesa química, na atividade antimicótica da secreção defensiva. Porém, o α-pineno mostrou-se atuar de forma mais tóxica na fase reprodutiva dos fungos, com concentração mínima inibitória de 10%, enquanto que na fase vegetativa de crescimento micelial a concentração mínima necessária foi de 20%. De acordo com Batista Filho et al. (2001), o crescimento vegetativo e a esporulação dos fungos apresenta variações em função da natureza química dos produtos testados, da concentração destes e da espécie do agente microbiano.

Os compostos β-pineno e Limoneno, quando isolados, parecem atuar de forma suplementar no combate a infecções fúngicas, com menor eficiência no controle da produção de esporos e no caso do Limoneno praticamente não apresentando efeito para a inviabilidade da germinação dos esporos tratados.

A eficiência dos compostos com variações quanto aos isolados já era esperado, tendo em vista que os fungos apresentam peculiaridades biológicas de crescimento e reprodução, resultando em diferentes formas de resposta as substâncias testadas (Batista-Filho, 2001). Maior toxidade do α-pineno e o β-pineno na germinação de esporos e a produção de esporos menos afetada verificada para *Paecilomyces* entre os três isolados pode ser devido esse fungo apresentar boa esporulação e um crescimento ótimo até 27ºC, faixa de temperatura no qual os bioensaios deste estudo foram realizados (25 ± 2°C) (Domsch et al., 1980; Alves, 1998).

Os compostos α-pineno, β- pineno e Limoneno apresentam propriedades tóxicas que unidas atuam em todas as concentrações testadas, mesmos em baixas concentrações, mostrando a eficiência sinergética destes compostos tanto na fase vegetativa dos fungos, quanto nos estágios reprodutivos. Estes dados corroboram a afirmação de Prestwich (1975 e 1984), que defende que as diversas substâncias que compõem o armamento químico dos cupins desempenha uma ação, que somadas atuam como um poderoso armamento defensivo (Prestwich, 1975, 1984).

Contudo, é importante destacar que o combate à proliferação fúngica no interior dos ninhos se dá tanto pela ação do armamento químico quanto por aspectos comportamentais preventivos, como o comportamento de *allogrooming* (Rosengaus et al., 2000; Fuller et al., 2007).

Apesar de a literatura apontar que a secreção defensiva dos cupins evoluiu como uma resposta à pressão da predação, é possível que o armamento químico dos cupins tenha atingido uma atividade secundária na ação antimicótica motivada pela pressão de competição e da necessidade de manter a sanidade da colônia, ampliando o leque de defesa também contra fungos patógenos e competidores de recursos alimentares (Becker & Lenz 1976; Rosegauns et al, 2000).

Em conclusão, o estudo mostrou que a composição da microbiota fúngica associada aos ninhos de *N. corniger* apresentou dissimilaridade nos padrões de riqueza e diversidade entre as áreas de Brejo de Altitude e Semiárida, sugerindo-se estar relacionada com as características de climáticas de cada região. As áreas de Brejo de Altitude aliados ao micro-

habitat favorável dos ninhos, provavelmente oferece condições ótimas para o desenvolvimento de uma maior diversidade de fungos. Dentre os isolados, foi observada a colonização de fungos entomopatógenos nos ninhos de ambas as regiões.

Ainda neste estudo, verificou-se que os compostos majoritários da secreção defensiva de *N. corniger* apresentaram potencial antimicótico, controlando o desenvolvimento de colônias fúngicas no interior dos ninhos. Percebeu-se ainda que a eficiência e a fase de atuação dos compostos apresentaram diferenças a depender da espécie de fungo. O α-pineno mostrou-se eficaz no controle fúngico, nos testes de contato e volátil, apresentando alta toxidade tanto na fase vegetativa quanto na fase reprodutiva dos fungos. Enquanto que os compostos β-pineno e Limoneno atuaram de forma suplementar. No entanto, melhores resultados foram observados testando o potencial sinergético das três substâncias, mostrando eficiência no controle da proliferação fúngica em todas as concentrações testadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos pesquisadores Ana Márcia B. Silva, Gesilândia S. Santos, Kátia Cristina B. Ferreira, Yuri Santos e Trycia Frarias pelo auxílio nas atividades de laboratório, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

Alves, S.B. Fungos entomopatógenos. 1998. In: ALVES, S.B. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, cap. 11, 289-371p.

Barbosa, M.R.V., Agra, M.F., Sampaio, E.V.S.B., CUNHA, J.P. and ANDRADE, L.A. 2006. *Diversidade florística na Mata do Pau-Ferro*, Areia, Paraíba.

Barnett, H. L., Hunter, B. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Minnesota: Burgess Publishing Company. 218p.

Batista filho, A., Almeida, M. E. J. and Lamas, C. 2001. Effeedt of Thiamethoxam on Entomopathogenic Microorganismo**.** *Neotropical Entomology*, **30**: 437-447.

Batra, L.R. and Batra, S.W.T. 1966. Fungus-growing termites of tropical India and associated fungi. *Journal of the Kansas Entomological Society* **39**:725-738.

Batra, L.R. and Batra, S.W.T. 1979. Termite-fungus mututalism. In: Batra, L.R, editor. *Insect-fungus symbiosis: nutrition, mutualism, and commensalism*. Halsted Press, 17-163p.

Becker, G. and Lenz, M. 1976. Einfluss von Moderfaulpilzen in Holz auf Frasstatigkeit, Galeriabau und Entwicklung einiger Termiten-Arten. *Angewandet Entomologie* **80**: 232-261.

Bouyoucos, G.J. 1951. A recalibration of the hydrometer methid for making mechanical analyses of soils. *Agron. J.* **43**:434-438.

Büchs, W. 2003. Biodiversity and agri-environmental indicators-general scopes and skills with special reference to the habitat level. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **98**: 35-78.

Cavalcanti, M.A. and Maia, L.C. 1994. Cellulolytic fungi isolated from allluvial soil in semi-arid area of the northeast of Brazil. *Revista de Microbiologia* **25:**251-254.

Correia, M.E.F., Aguiar-Menezes, E. L., and Aquino, A. M. 2008. Associações entre térmitas e microorganismos. *Embrapa Agrobiologia.* Documentos/Embrapa Agrobiologia, ISSN 1517-8498; 254, 20p.

Costa, G. L. and Oliveira, P. C. (1998). Penicillium species in mosquitoes from two Brazilian regions. *J. Basic. Microbiol.* **38**: 343–347, 1998.

Costa, G.L., Moraes, A.M.L. and Galvão, C. 2003. Entomopathogenic effect of *Aspergillus giganteus* and *Penicillium corylophilum* on two triatomine vectors of Chagas disease. *J. Basic Microbiol.* **43**:1 3–7.

Eisner, T., Kriston, I. and Aneshansley, D. J. 1976. Defensive behavior of a termite (*Nasutitermes exitosus*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **1**:83–125.

Day, P. R. 1965. Particle fractionation and particle size analysis. In: BLACK, C.A. (Ed.). Methods of soil analysis. *Madison: América Society of Agronomy* **1**: 545-567.

Deligne, J., Quennedey, A., and Blum, M. S. 1981. The enemies and defense mechanisms of termites, pp. 1–76, in H. R. Hermann (ed.), *Social insects* **2**. Academic, New York, London.

Dejean, A. and Bolton, B. 1995. Fauna sheltered by *Procubitermes niapuensis* termitaries of the African rainforest. *Journal of African Zoology* 109 **5**:481-487.

Dejean, A., Bolton, B., Durand, J. L. 1997. *Cubitermes subarquatus* termitaries as shelters for soil fauna in African rainforests. *Journal of Natural History,* 31 **8**: 1289-1302.

Domsch, K. H., Gams, W. and Traute-Heidi, A. 1980. *Compendium of fungi.* New York: Academic Press, 859p.

Forsythe, W. M. 1975. *Fisica de suelos: manual de laboratório*. San José: Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas, 212p.

Fuller, C.A. 2007. Fungistatic activity of freshly killed termite, *Nasutitermes acajutlae*, soldiers in the Caribbean. *Journal of Insect Science* **7**: 1–8.

Gillespie J.P., Bailey A.M., Cobb, B. and Vilcinskas, A. 2000. Fungi as elicitors of insect immune responses. *Arch. Insect Biochem*. Physiol. **44**: 49-68.

Gliessmann, S. R. 2000. *Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável.* Porto Alegre: Editora Universidade. 653p.

Hendee, E. C. 1933. The asscociation of the termite *Kalotermes minor*, *Reticulitermes hesperus* and *Zootermopsis angusticollis* with fungi. *University of California Publications in Zoology* **39**: 111-134.

Hendee, E. C. 1934. The association of termites and fungi. In: KOFOID, C. A. *Termites and Temite control.* 2º ed. University of California Press, Berkeley, California, 211-213p.

Inmet. 2012. Instituto Nacional de Metereologia: Boletim agroclimatológico. Secção de apoio a agricultura e recursos hídricos.

Inmet. 2013. Instituto Nacional de Metereologia: Boletim agroclimatológico. Secção de apoio a agricultura e recursos hídricos.

Laakso, J. A. and Gloer, J. B. 1993. A new penitrum analog with anti insectum activity from the sclerotia of *Aspergillus sulphureus*. *J. Agric. Food Chem*., **41**: 973–975.

Leponce, M., Roisin, Y. and Pasteels, J. M. 1999. Community interations between ants and arboreal-nesting termites in New Guinea coconut plantations. *Insects Sociaux* **46**:126-130.

Lutikova, L. I. 1990. The influence of soil substrates from the *Anacanthotermes ahngerianus* Jac. termite-house on the development of enthomorathogenic fungi. *Mycol. Physiol.* **24**:520-528.

Ljutikova, L. I. and Judina, T. G. 1996. *Antibacterial activity of some exudates of Anacanthotermes ahngerianus Jacobson (Isoptera: Hodotermitidae).* XX International Congress of Entomology, Firenze, 105p.

Magurran, A. E. 1988. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton, NJ: Princeton University Press, 179p.

Maniania, N.K., Fargues, J. Susceptibility of *Mamestra btassicaceae* (L.), and *Spodoptera littoralis* (Boisid.) larvae (Lep., Noctuidae) to the hyphomycetes *Paecilomyces fumosoroseus* (Brow and Smith) and *Nomuraea rileyi* (Samson) at two temperatures. 1992. *Journal of Applied Entomology* **5**: 518-524.

Marques, R.P., Monteiro, A.C. and Pereira, G.T. 2004. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim *(Azadirachta ind*ica). *Ciência Rural* **6**:1675-1680.

Moore, B. P. 1964. Volatile terpenes from *Nasutitermes* soldiers (Isoptera: Termitidae). *J. Insect Physiol.* **10**:371–375.

Moore, B. P. 1968. Studies on the chemical composition and function of the cephalic gland secretion in Australian termites. *J. Insect Physiol.* **14**:33–39.

Moraes, A. M. L., Costa, G. L., Ziccardi, M. C. B., Lourenço-De-Oliveira, R. and Oliveira, P. C. 2001. The entomopathogenic potential of *Aspergillus* spp. in mosquitoes vectors of tropical diseases. *J. Basic Microbiol.*, **41:** 45–49.

Moreira, F.M.S. and Siqueira, J.O. 2006. *Microbiologia e bioquímica do solo.* Lavras, Universidade Federal de Lavras. 626 p.

Passos, E. M. 2009. *Patogenicidade de fungos do gênero Isaria (persoon) sobre Coptotermes gestroi (Wasmann) (Isoptera: Rhinotermitidae) e aspectos imunológicos*. Dissertação (Mestrado em entomologia agrícola) Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, 55p.

Prates, H.S. 1980. Piolho branco, a praga dos citros. *Agroquímica Ciba-Geigy* **12**,11-13.

Prestwich, Y. D. 1975. Chemical analysis of soldier defensive secretions of several species of East African termites. In, Ch. Noirot, P. E. Howse, and G. LeMasne. (Eds.). *Pheromones and Defensive Secretions in Social Insects*. Pp. 149-152. 1975 Proceedings of the Symposium of the International Union for the Study of Social Insects, Univ. of Dijon, Di- jon, France.

Prestwich, G. D. 1984. Defense mechanisms of termites. *Annu. Rev. Entomol*. **29**:201–232.

Roberts, D.W. and Humber, R.A. 1981. Entomogenous fungi. In: Cole GT, Kendrick B, (Eds.), *Biology of Conidial Fungi*. Academic Press, New York, 201-236.

Rosengaus, R.B., Traniello, J.F.A. 1981. Pathobiology and disease transmission in dampwood termites *Zootermopsis angusticollis* (Isoptera: Termopsidae) infected with the fungus *Metarhizium anisopilae* (Deuteromycotina: Hypomycetes. *Sociobiology* **30**:185-195.

Rosengaus, R.B., Guldin, M.R. and Traniello, J.F.A. 1998. Inhibitory effect of termite fecal pellets on fungal spore germination. *Journal of Chemical Ecology* **24**:1697-1705.

Rosengaus, R.B., Lefebvre, M.L., Jordan, C. and Traniello, J.F.A. 1999. Pathogen alarm behavior in a termite: A new form of communication in social insects. *Naturwissenschaften*, **86**:544-548.

Rosengaus, R.B., Lefebvre, M.L. and Traniello, J.F.A. 2000. Inhibition of fungal spore germination by *Nasutitermes*: evidence for a possible antiseptic role of soldier defensive secretions. *Journal of Chemical Ecology* **26**: 21-39.

Rosengaus, R.B., Traniello, J.F.A., Lefebvre, M.L., and Maxmen, A.B. 2004. Fungistatic activity of the sternal gland secretion of the dampwood termite Zootermopsis angusticollis. *Insectes Sociaux*, 51:1-6.

Rosengaus, R.B., Traniello, J.F.A. and Bulmer M.S. 2011. Ecology, behavior and evolution of disease resistance in termites. In: *Biology of Termites: A Modern Synthesis* (Bignell D.E., Roisin Y. and Lo N., Eds). Springer, London, 165-192.

Rouland-Lefevre, C. Symbiosis with fungi. In: Abe, T., Bignell, D.E. and Higashi, M. *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Kluwer academic publishers, França, 289-305p.

Sands, W. A. The association of termites and fungi. In: Krishna, K., Weesner, F. M. (eds). *Biology of termites*. Academic Press. New York, 495-519 p.

Santos, A.M.M., Cavalcanti, D.R., Silva, J.M.C. and Tabarelli, M. 2007. Biogeographical relationships among tropical forests in northeastern Brazil. *Journal of Biogeography* **34**: 437-446.

Schmitz, J. A. K., Selbach, P. A. and Mielniczuk, J. 2003. *Índice biológico para avaliação da qualidade do solo sob diferentes manejos de cobertura vegetal*. In: Congresso Brasileiro de Agroecologia. PUC/RS: Porto Alegre. Anais.

Singh, K. *An illustrated manual on identification of some seed–borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia and their Mycotoxins*. Lyngby: Institute of Seed Pathology for Developing Countries, 132p.

Souza, F. F. and Brown, V. K. 1994. Effects of habitat fragmentation on Amazoniam termite communities. *Jounal of Tropical Ecology* **10:**197-206.

SUDENE, *Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste*, 1990.

Veloso, H.P., Rangel-Filho, A.L.R.R. and Lima, J.C.A. 1991. *Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal.* IBGE, Rio de Janeiro.

Vivo, M. 1997. Mammalian evidence of historical ecological change in the Caatinga semarid vegetation of Northeastern Brazil. *Journal of Comparative Biology* **1**: 65-73.

Wang, C. and Leger, R.J. 2006. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proc. Natl Acad. Sci.* USA **103**: 6647-6652.

Wilson-Rich, N., Dres, S.T. and Starks, P.T. The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* **54:** 1392–1399.

Zoberi, M.H. and Grace, J.K. 1990. Fungi associated with the subterranean termite *Reticulitermes flavipes* in Ontario. *Mycology* **82:**289–294.

CONCLUSÃO

A composição química da secreção defensiva de *Nasutitermes corniger* apresenta variabilidade de acordo com as características do ecossistema na qual ela está inserida. Populações localizadas em regiões com condições ecossistêmicas semelhantes tendem a apresentar maior similaridade química tanto em termos de concentração quanto de composição das substâncias.

A secreção defensiva das populações das áreas de Brejo de Altitude apresentaram composição média percentual diferenciada das populações das áreas de Semiárido, provavelmente motivadas pelas pressões ambientais e os fatores climáticos de cada ecorregião, resultando na formação de dois ecótipos. No entanto, esta afirmação deve ser reforçada por estudos futuros, com ampliação do esforço amostral, análise da expressão gênica das populações e de um possível efeito sazonal.

A microbiota fúngica associada aos ninhos de *N. corniger* apresentou dissimilaridade nos padrões de riqueza e diversidade entre as áreas de Brejo de altitude e Semiárida, sugerindo relacionamento com as características ambientais de cada região. As condições de clima e geomorfologia das áreas de Brejo de altitude aliados ao micro-habitat dos ninhos ofereçam condições ótimas para o desenvolvimento de maior diversidade de fungos, em relação às áreas Semiáridas. Não obstante, observou-se a colonização de fungos entomopatógenos nos ninhos de ambas as regiões.

Os compostos majoritários da secreção defensiva de *N. corniger* apresentaram potencial antimicótico, controlando o desenvolvimento de colônias fúngicas de *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. e *Cladosporium* sp. A eficiência e a fase de atuação dos compostos apresentaram diferenças a depender da espécie de fungo a ser combatida.

O α-pineno principal componente da defesa química de *N. corniger* mostrou-se eficaz no controle fúngico, tanto em contato direto com as colônias, como também atuou com toxidade volátil nas fases vegetativa e reprodutiva dos fungos. Os compostos β-pineno e Limoneno atuaram de forma suplementar. No entanto, melhores resultados foram observados testando-se o potencial sinergético das três substâncias, mostrando eficiência no controle da proliferação fúngica em todas as concentrações testadas.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, N.R.; OLIVEIRA-NETO, J.R. Componentes químicos voláteis (terpenos) da secreção defensiva de *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Termitidae:Nasutitermitinae), coletados na região urbana de Goiânia.In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil. **Anais.** Caxambú, 2007.

BATRA, L.R; BATRA, SWT.Termite-fungus mututalism. In: BATRA, LR, editor. **Insect-fungus symbiosis: nutrition, mutualism, and commensalism**, p.117-163. Halsted Press, 1979.

BECKER, G; LENZ, M. Einfluss von Moderfaulpilzen in Holz auf Frasstatigkeit, Galeriabau und Entwicklung einiger Termiten-Arten. **Angewandet Entomologie** 80: 232-261, 1976.

BEZERRA-GUSMÃO, M.A; CAVALCANTE, M. M. **Susbtâncias químicas defensivas de cupins *Nasutitermes* no agreste paraibano**. Congresso de Pós-Graduação e Pesquisa e XIV Encontro de Iniciação Científica da UEPB, 2012.

BIGNELL D.E; EGGLETON P. Termites in ecosystems. In: Termites: **Evolution, Sociality, Symbiosis, Ecology** (ABE T.; HIGASHI M. & BIGNELL D.E., Eds.), Kluwer Academic Publications, Dordrecht. pp 363-387, 2000.

BINDER, B.F. Intercolonial aggression in the subterranean termite Heterotermes aureus (Isoptera: Rhinotermitidae). **Psyche** 95, 123–137, 1988.

BUSTAMANTE, N.C.R. **Preferências alimentares de 5 espécies de cupins *Nasutitermes Dudley*, 1980 (Termitidae: Isoptera) por 7 espécies de madeiras de várzea na Amazônia Central.** Dissertação de Mestrado, INPA/FUA, Manaus, 151p, 1988.

COOK, S. F. SCOTT, K. G.. The nutritional requirements of *Zootermopsis angusticollis*. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v.4, n.3, p. 95-111, 1933.

CHEN, J; HENDERSON, G; GRIMM, C.G; LLOYD, S.W; LAINE, R.A. Termites fumigate their nests with naptheline. **Nature**. 392:558-559, 1998.

DELIGNE, J., QUENNEDEY, A., and BLUM, M. S. The enemies and defense mechanisms of termites, pp. 1–76, in H. R. Hermann (ed.), **Social insects**, Vol. 2. Academic, New York, London, 1981.

ERNST, E. Beobachtung beim Spritzakt der Nasutitermes-Soldaten. **Revue Suisse de Zoologie** 66, 289–295, 1959.

EISNER, T., KRISTON, I., and ANESHANSLEY, D. J. Defensive behavior of a termite (*Nasutitermes exitosus*). **Behav. Ecol. Sociobiol**. 1:83–125. 1976.

EVERAERTS, C., PASTEELS, J.M., ROISIN, Y., BONNARD, O., BRAEKMAN, J.C. e DALOZE, D. Morphological and Chemichal Criteria in the taxonomy of Nasutitermes from Papua New Guinea (Isoptera:Termitidae). **Sociobiology**, **14**: pp. 193 – 206. 1988.

FULLER, C.A. Fungistatic activity of freshly killed termite, Nasutitermes acajutlae, soldiers in the Caribbean. **Journal of Insect Science** 7, 1–8, 2007.

GRASSÉ, P.P. Termitologia, **Tome II**. Masson, Paris, 1984.

HENDEE, E. C. The asscociation of the termite *Kalotermes minor*, *Reticulitermes hesperus* and *Zootermopsis angusticollis* with fungi. **University of California Publications in Zoology**, v. 39, p. 111-134. 1933.

HENDEE, E. C. The association of termites and fungi. In: KOFOID, C. A. **Termites and Temite control.** 2º ed. University of California Press, Berkeley, California. p. 211-213, 1934.

HOLT J.A. & COVENTRY R.J. Nutrient cycling in Australian savannas. **Journal of biogeography,** v.17, p.427-432, 1990.

HUNGATE, R. E. Nitrogen Content of Sound and decayed Coniferous woods and its relation to loss in weight during decay. **Botanical Gazette**, v.102, n.2, p.382-392, 1940.

KAMBHAMPATI, S; EGGLETON, P. Taxonomy and phylogeny of termites. In:ABE, T; BIGNELL, D.E; HIGASHI, M, editors. **Termites: Evolution, Sociality, Symbiosis and Ecology**, p. 1-24. Kluwer Academic Press, 2000.

MARTIUS, C. Diversity and ecology of termites in Amazonian forest. **Pedobiology,** v.38, p.407-428, 1994.

MOORE, B. P. Volatile terpenes from *Nasutitermes* soldiers (Isoptera: Termitidae). **J. Insect Physiol.** 10:371–375, 1964.

MOORE, B. P. Studies on the chemical composition and function of the cephalic gland secretion in Australian termites. **J. Insect Physiol**. 14:33–39, 1968.

NOIROT, C; NOIROT-TIMOTHÉE, C. The digestive system. In: Krishna, K, Weesner, F. M, editors. **Biology of Termite** p.49-88. Academic Press, 1969.

NOIROT, C. The Nests of Termites. In: Krishna, K.,Weesner, F.M. (Eds.), **Biology of Termites**, vol. II. Academic Press, New York, pp. 73–125, 1970.

NOIROT, C.; DARLINGTON, J. P. E. C. Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology, Kluwer Academic, chap. **Termite Nest: Architecture, Regulation and Defence**. pp. 121-139, 2000.

PASSOS, E. M. **Patogenicidade de fungos do gênero *Isaria* (persoon) sobre *Coptotermes gestroi* (Wasmann) (Isoptera: Rhinotermitidae) e aspectos imunológicos.** Recife – PE.

2009. 55P. Dissertação (Mestrado em entomologia agrícola) Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, 2009.

PRESTWICH, Y. D. Chemical analysis of soldier defensive secretions of several species of East African termites. In, Ch. Noirot, P. E. Howse, and G. LeMasne. (Eds.). **Pheromones and Defensive Secretions in Social Insects**. Pp. 149-152. 1975 Proceedings of the Symposium of the International Union for the Study of Social Insects, Univ. of Dijon, Di- jon, France, 1975.

PRESTWICH, G.D. Interspecific variation in the defence secretions of Nasutitermes soldiers. **Biochemical and Systematic Ecology** 7, 211–221, 1979.

PRESTWICH, G.D., COLLINS, M.S. Chemotaxonomy of Subulitermes and Nasutitermes termite soldier defense secretions. Evidence against the hypothesis of diphyletic evolution of the Nasutitermitinae. **Biochemical and Systematic Ecology** 9, 83–88, 1981.

PRESTWICH, G. D. Defense mechanisms of termites. **Annu. Rev. Entomol**. 29:201–232, 1984.

REINHARD, J.; KAIB, M. Interaction of pheromones during food exploitation by the termite *Schedorhinotermes lamanianus*. **Physiol. Entomol**. 20: 266-272, 1995.

REINHARD, J.; HERTEL, H.; KAI, M. Feeding stimulating signal in labial gland secretion of the subterranean termite *Reticulitermes santonensis*. **J. Chem. Ecol.** 23: 2371-2381, 1997.

REINHARD, J.; KAIB, M. Food exploitation in termites: indication for a general feeding-stimulating signal in labial gland secretion of Isoptera. **J. Chemo. Ecol**. 27(1):189-201, 2001.

ROISIN, Y., EVERAERTS, C., PASTEELS, J.M., BONNARD, O. Caste-dependent reactions to soldier defensive secretion and chiral alarm/recruitment pheromone in Nasutitermes princeps. **Journal of Chemical Ecology** 16, 2865–2875, 1990.

ROSENGAUS, R.B; TRANIELLO, J.F.A. Pathobiology and disease transmission in dampwood termites *Zootermopsis angusticollis* (Isoptera: Termopsidae) infected with the fungus *Metarhizium anisopilae* (Deuteromycotina: Hypomycetes. **Sociobiology.** 30:185-195, 1997.

ROSENGAUS, R.B; LEFEBVRE, M.L; TRANIELLO, J.F.A. Inhibition of fungal spore germination by *Nasutitermes*: evidence for a possible antiseptic role of soldier defensive secretions. **Journal of Chemical Ecology**. 26: 21-39, 2000.

ROSENGAUS, R.B; TRANIELLO, J.F.A. LEFEBVRE, M.L. MAXMEN, A.B. Fungistatic activity of the sternal gland secretion of the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis*. **Insectes Sociaux.** 51:259-264, 2004.

SANDS, W.A. The association of termites and fungi. In: Krisna, K, Weesner, F.M, editors. **Biology of Termites**, p.495-524, Academic Press, 1969.

SANTOS A.M.M.; CAVALCANTI D.R.; SILVA J.M.C. & TABARELLI M. Biogeographical relationships among tropical forests in northeastern Brazil. **Journal of Biogeography** 34: 437-446, 2007.

SCHMID-HEMPEL, P. **Parasitas em insetos sociais**. Princeton University Press, Princeton, 1998.

ŠOBOTNÍK, J., HANUS, R., and JIROŠOVÁ, A. Chemical warfare in termites. **J. Insect Physiol.** 56:1012–1021, 2010.

SUDENE, **Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste**, 1990.

STUART, A.M. Studies on the communication of alarm in the termite *Zootermopsis nevadensis* (Hagen), Isoptera. **Physiological Zoology** 36, 85–96, 1963.

THORNE, B.L., HAVERTY, M.I. A review of intracolony, intraspecific, and interspecific agonism in termites. **Sociobiology** 19, 115–145, 1991.

THORNE, B.L. Termite-termite interactions: workers as an agonistic caste. **Psyche** 89, 133–150, 1982.

THORNE, B.L., BREISCH, N.L., MUSCEDERE, M.L. Evolution of eusociality and the soldier caste in termites: influence of intraspecific competition and accelerated inheritance. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 100, 12808– 12813, 2003.

VIVO M. Mammalian evidence of historical ecological change in the Caatinga semarid vegetation of Northeastern Brazil. **Journal of Comparative Biology** 2(1): 65-73, 1997.

VRKOCˇ, J., UBIK, K. 1-Nitro-trans-1-pentadecene as the defensive compound of termites. **Tetrahedron Letters** 15, 1463–1464, 1974.

WORLDCLIM. 2012. WorldClim - **Global Climate Data**. Disponível em: <http://www.worldclim.org/>. Acesso em: 01 fev 2012.

ZHAO, C., RICKARDS, R.W., TROWELL, S.C. Antibiotics from Australian terrestrial invertebrates. Part 1. Antibacterial trinervitadienes from the termite Nasutitermes triodiae. **Tetrahedron** 60, 10753–10759, 2004.