



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA



LORENA RIBEIRO CASTRO

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA DE EXTRATOS
PROTEICOS DE CUPINS COM POTENCIAL PARA EMPREGO NA TRIAGEM DE
CUPINICIDAS NATURAIS**

OURO PRETO- MG

2022

LORENA RIBEIRO CASTRO

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA DE EXTRATOS
PROTEICOS DE CUPINS COM POTENCIAL PARA EMPREGO NA TRIAGEM DE
CUPINICIDAS NATURAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como
requisito para obtenção do título de Bacharel em
Farmácia pela Escola de Farmácia da Universidade
Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil

Orientador: Prof. Dr. Wander de Jesus Jeremias

OURO PRETO- MG

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

C355c Castro, Lorena Ribeiro.

Caracterização da Atividade Celulolítica de Extratos Proteicos de Cupins com Potencial para Emprego na Triagem de Cupinçadas Naturais. [manuscrito] / Lorena Ribeiro Castro. - 2022.

34 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Wander de Jesus Jeremias.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Cupim. 2. Extratos proteicos. 3. Celulase. 4. Endoglucanase. I. Jeremias, Wander de Jesus. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 615.45

Bibliotecário(a) Responsável: Angela Maria Raimundo - SIAPE: 1.644.803



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Lorena Ribeiro Castro

Caracterização da atividade celulolítica de extratos proteicos de cupins com potencial para emprego na triagem de cupinídeos naturais

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em 23 de junho de 2022.

Membros da banca

Prof. Dr. Wander de Jesus Jeremias - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Prof. Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga - Universidade Federal de Ouro Preto
Prof. Dr. Fábio Ribeiro Queiroz - Núcleo de Ensino e Pesquisa / Instituto Mário Penna

O Prof. Dr. Wander de Jesus Jeremias, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 11/07/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Wander de Jesus Jeremias, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 11/07/2022, às 21:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0360553** e o código CRC **10D445CC**.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que guiou os meus passos até aqui e a minha família que foi meu aconchego em todos os momentos. Amo vocês!

RESUMO

Dentre os métodos que vêm sendo testados para a eliminação de cupins como pragas destacam-se os cupinídeos de origem natural, feitos à base de plantas produtoras de metabólitos secundários com potenciais padrões moleculares bioativos. Esses cupinídeos apresentam-se como uma boa estratégia para o manejo dos insetos de forma eficaz, acarretando mínimos danos ao meio ambiente e também à saúde do homem, em comparação ao controle químico atualmente realizado com grande frequência. O presente estudo tem como objetivo caracterizar a atividade celulolítica de endoglucanases em extratos proteicos brutos de cupins com vistas à sua utilização na bioprospecção de cupinídeos naturais. Essa caracterização se encontra descrita na literatura como uma ferramenta importante de determinação da atividade enzimática, visto que as endoglucanases estão diretamente envolvidas na catálise da hidrólise da celulose em glicose durante o processo de digestão desse polímero no organismo dos cupins. Para isso, indivíduos adultos, de casta dos operários foram coletados em fragmentos de madeira de um imóvel residencial infestado na região da Pampulha em Belo Horizonte- Minas Gerais, sendo utilizados na produção dos extratos. Parte dos indivíduos tiveram cabeça/tórax e abdômen separados para dar origem a extratos diferentes. Foram preparados dois extratos proteicos: um de corpo inteiro do inseto, a partir da trituração de 45g de cupins inteiros, suspensos em tampão acetato de sódio a 0,1M em pH 5,5 para concentração de 10%. O outro extrato, somente da porção abdominal dos cupins, foi gerado por igual procedimento, a partir de 5g de abdômen. As preparações foram homogeneizadas, centrifugadas e os sobrenadantes foram coletados, gerando os extratos brutos. A concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Lowry. A atividade enzimática das endoglucanases foi mensurada através do ensaio empregando Carboximetilcelulose (CMC) como substrato, o que permitiu estimar a eficiência celulolítica pelo cálculo da sua atividade. O método Glicose-Oxidase (GOD) foi utilizado para a determinação da quantidade de glicose gerada na reação enzimática. No extrato bruto de cupins inteiros obteve-se concentração de proteínas 495 mg/ml e no extrato de abdômen 670 mg/ml. Após calculadas as atividades das celulases, as eficiências de geração de glicose dos dois extratos produzidos foram comparadas diretamente e também a um extrato proteico purificado, obtido do fungo *Trichoderma viride* isolado de térmitas. Embora as atividades celulolíticas dos extratos brutos tenham se mostrado com

menores eficiências que a do extrato purificado do fungo, estas foram seguramente mensuráveis e estáveis, e já permitem sua aplicação em triagem de potenciais cupinidas naturais, visto que o manejo mais utilizado para o controle de cupins atualmente são os inseticidas de origem sintética e estes são responsáveis por diversos danos na saúde do homem e do ecossistema .

Palavras chave: cupim, cupinidas naturais, extratos proteicos; celulase; endoglucanase

LISTA DE ABREVIATURAS

CMC: Carboximetilcelulose

INCA: Instituto Nacional do Câncer

OIT: Organização Internacional do Trabalho

CBA: Controle Biológico Aplicado

EEEC: Extrato Enzimático de Exoesqueleto Completo

EEAB: Extrato Enzimático de Tórax e Abdômen

EETv: Extrato Enzimático de *Trichoderma viride*

ICEB: Instituto de Ciências Exatas e Biológicas

UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto

BSA: Bovine Serum Albumin

IU: Unidades Internacionais

GOD: Glicose-oxidase

POD: Peroxidase

SINITOX: Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Castas de térmitas.....	15
Figura 2- Cupins e seu trato gastrointestinal.....	16
Figura 3- Estrutura molecular da Celulose	17
Figura 4- Modo de ação das celulasas.....	17
Figura 5- Inseticidas Organofosforados.....	19
Figura 6- Separação por diferenciação	21
Figura 7-Trituração e suspensão dos extratos.....	22
Figura 8- Princípio do método enzimático de Glicose-Oxidase.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Diluições testadas dos extratos enzimáticos de cupim para o ensaio usando CMC.....	24
Tabela 2- Resultados Obtidos a Partir da Caracterização da Atividade Catalítica de Celulase.....	28

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Curva de Glicose Padrão.....	26
Gráfico 2- Atividade Catalítica de Endoglucanase presente no Extrato Enzimático de <i>Trichoderma viridae</i>	27
Gráfico 3- Atividade Catalítica de Endoglucanase presente no Extrato Enzimático de Exoesqueleto Completo	27
Gráfico 4- Atividade Catalítica de Endoglucanase presente no Extrato Enzimático de Abdômen	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 CUPINS	14
3.2 CELULASES	16
3.3 CONTROLE DE PRAGAS	18
3.4 INSETICIDAS A BASE DE PRODUTOS NATURAIS	19
4. OBJETIVOS	20
4.1 OBJETIVO GERAL	20
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5. METODOLOGIA	21
5.1 CUPINS	21
5.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS DE CUPIM	22
5.3 ENSAIO DE PROTEÍNAS TOTAIS	23
5.4 ENSAIO COM CARBOXIMETILCELULOSE (CMC)	23
5.5 QUANTIFICAÇÃO DA GLICOSE GERADA	25
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6.1 ENSAIOS DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	26
6.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES CATALÍTICAS DAS CELULASES	26
7. CONCLUSÃO	30
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. INTRODUÇÃO

Os térmitas são insetos popularmente conhecidos como cupins e amplamente encontrados na natureza, principalmente nas regiões tropicais. Pertencem à ordem Isoptera com cerca de 2.600 espécies descritas (LIMA & COSTA-LEONARDO, 2007), sendo 400 destas registradas na América do Sul (CONSTANTINO, 1998). Uma pequena parte dessas espécies são consideradas pragas urbanas e agrícolas, devido à sua alimentação composta basicamente por materiais celulósicos, e o restante desempenha um papel ecológico como consumidores primários e/ou decompositores nos ecossistemas naturais através da trituração, decomposição, humidificação e mineralização em ecossistemas naturais, contribuindo assim para a reciclagem de nutrientes e aeração do solo (FREYMAN et al., 2010).

Embora esses insetos possuam enzimas digestivas próprias, a digestão dos alimentos depende consideravelmente de seus microrganismos intestinais (HONGO, 2011). O mutualismo entre cupins e fungos proporciona aos térmitas um aproveitamento mais eficiente de energia, sem que esta seja completamente dependente dos seus microrganismos intestinais. Alguns fungos são capazes de produzir celulasas, que auxiliam no processo de digestão da matéria. A partir disso os cupins são divididos entre inferiores e superiores onde os inferiores apresentam dependência de protozoários simbiotes para produção da celulase e os cupins superiores, como os da subfamília Macrotermitinae, apresentam fungos que realizam o trabalho da digestão através de suas próprias enzimas. (WOOD & THOMAS 1989, Darlington 1994–LIMA & COSTA-LEONARDO, 2007).

As celulasas são enzimas que realizam a catálise da hidrólise da celulose, um polímero abundante e presente em diversos resíduos agrícolas, que constitui cerca de 40 a 60% da parede celular das plantas juntamente com a hemicelulose. Essas enzimas possuem um papel fundamental na digestão desse polímero que tem como seu subproduto a glicose, uma fonte de energia importante para os térmitas e para outros seres vivos. Nesse sentido, as celulasas vêm sendo empregadas em processos biotecnológicos industriais e também na pesquisa como alvos promissores de substância com potencial cupinícida. (MCCANN e CARPITA 2008 *apud* Singh)

Devido ao vasto material que pode lhe servir de alimento, os cupins são tidos como pragas, tanto no agro ecossistema, quanto em áreas urbanizadas, causando

danos em plantações, edificações e construções (KORB, 2007; PAES et al., 2007). Para minimizar os efeitos causados por esses insetos o controle químico é comumente utilizado. Esse tipo de manejo inclui a aplicação de inseticidas sintéticos, que apesar de apresentarem grande eficiência, geram danos ao serem utilizados de maneira incorreta, levando a bioacumulação tecidual em organismos vivos e a persistência destes no meio ambiente devido a sua alta toxicidade e estabilidade química, necessitando de renovação periódica e alto custo. Além disso, a ampla utilização desses inseticidas tem provocado o aumento de resistência em populações de pragas, resultando em mais dificuldades quanto ao seu controle (BRAGA & VALE, 2007).

Dentre os métodos que vêm sendo testados para a eliminação de cupins, se destacam os cupinídeos de origem natural, feitos à base de metabólitos secundários com potenciais padrões moleculares bioativos. Esses cupinídeos são de origem vegetal e apresentam-se como uma boa estratégia para o manejo de insetos de forma eficaz, acarretando mínimos danos ao meio ambiente e também à saúde do homem, em comparação ao controle químico atualmente realizado.

2. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que apesar dos cupins desempenharem um papel crucial como decompositores de matéria orgânica, sua forma de alimentação acarreta diversos prejuízos econômicos em todo o território nacional, que vão desde o ambiente urbano até o rural. Estima-se um gasto de cerca de US\$ 10 a 20 milhões anuais apenas na cidade de São Paulo, destinado a reformas de materiais danificados, sendo a espécie *Coptotermes gestroi* a que possui maior capacidade de destruição entre os cupins subterrâneos presentes no ambiente urbano (FONTES & MILADO 2002 *apud* BERNARDINI 2005).

No ambiente rural *Cornitermes sp.* é responsável por um dano mecânico às máquinas utilizadas na agricultura, além de tornarem parte da superfície do solo inutilizável, devido a sua capacidade de ferir partes das plantas como as raízes, caules e folhas, podendo ou não levar a uma perda na produção (CONSTANTINO, 2002).

Paralelamente, a utilização de agrotóxicos no manejo de insetos se apresenta como um dos problemas de saúde pública, devido aos índices de intoxicação causados pelo controle químico, sendo o Brasil um grande consumidor desses produtos desde 2008 (INCA, 2022). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer – INCA e a Organização Internacional do Trabalho - OIT são identificados, por ano, 70 mil casos de intoxicação passíveis de evolução para óbito. Além disso, a problemática dos agrotóxicos também se estende ao ecossistema no qual são inseridos, pois o uso inadequado desses agentes químicos resulta em um desequilíbrio na biodiversidade local onde são constantemente utilizados, sendo necessárias outras alternativas de manejo para que esses problemas sejam minimizados. (CHAGNON et al. 2015; LOPES & ALBUQUERQUE, 2018).

Nesse contexto, a indústria farmacêutica voltada para a descoberta de novos medicamentos tornou as substâncias de origem natural alvo de novas pesquisas (O'NEILL & LEWIS, 1993). Dessa forma a triagem de novos inseticidas de origem natural tem sido foco de diversas pesquisas, sendo a caracterização da atividade enzimática das celulasas presentes no organismo do cupim uma etapa importante para o completo entendimento dos mecanismos que envolvem a sua digestão e suas possíveis aplicações nas áreas biotecnológicas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

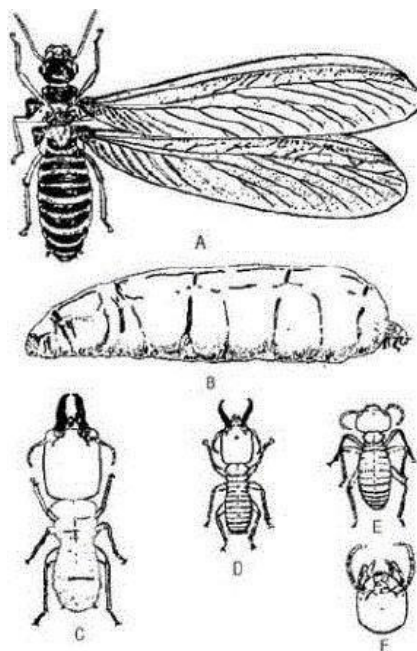
3.1 CUPINS

Os cupins, também conhecidos com térmitas, são insetos da ordem Isoptera que possuem aproximadamente 3000 espécies já descritas e são divididos entre as famílias Mastotermitidae, Kalotermitidae, Termopsidae, Hodotermitidae, Serritermitidae, Rhinotermitidae e Termitidae (SILVA, 2012). Possuem ampla distribuição em regiões de maior temperatura como as tropicais e subtropicais (CONSTANTINO, 1999) e desempenham um papel ecológico como consumidores primários através da reciclagem de diversos nutrientes por meio da decomposição da celulose (TAYASU et al. 1997, COSTA- LEONARDO 2002 *apud* Ferreira, 2011).

Esses insetos vivem em sociedade e são divididos entre diferentes castas sendo os operários e soldados constituintes da casta estéril, que está envolvida em

atividade como a alimentação e defesa da colônia e a casta fértil, composta pelo rei e pela rainha, que exercem atividades reprodutivas e também pelos reprodutores alados, que realizam voos colonizadores para a instalação de novas colônias. (BIGNELL et al. 2010; CONSTANTINO et al. 2014; KRISHNA, 2012).

Figura 1- Castas de térmitas. A: Reprodutor alado; B: Rainha; C: Soldado; D: Soldado de segunda ordem; E e F: Operários



Fonte: SCAGLIA (2018).

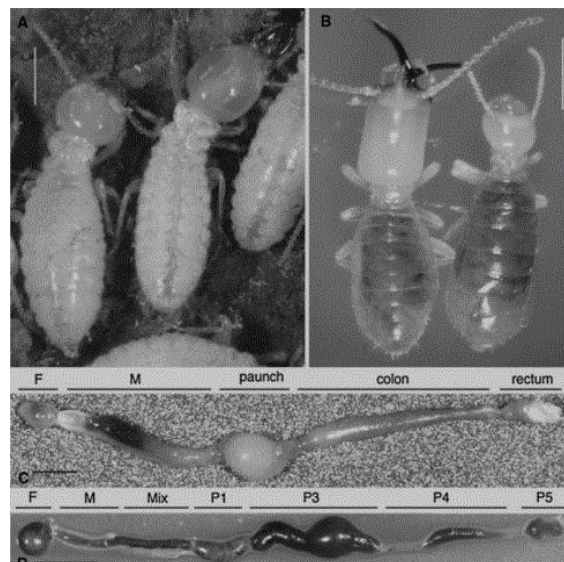
A alimentação dos cupins é composta basicamente por materiais celulósicos advindos de vegetações mortas, como a madeira. O consumo desse tipo de material demandou uma dependência coevolutiva de simbioses do trato digestivo e de suas habilidades celulolíticas (CLEVELAND et al., 1934 apud FERREIRA, 2011).

Além da divisão por castas, os cupins também possuem uma classificação com base nessas dependências, onde são divididos entre inferiores e superiores. Os cupins inferiores dependem de organismos simbióticos para realizar a degradação da celulose, já os cupins denominados superiores têm pouca ou até mesmo nenhuma dependência de protistas para a sua digestão. (HONGO, 2011).

A microbiota intestinal dos cupins inferiores conta com uma grande quantidade de protistas flagelados, que preenchem as barrigas desses cupins,

deixando-a com um aspecto mais dilatado. Já os cupins superiores possuem um intestino compartimentalizado que abriga um número bem menor de protistas intestinais. Independentemente deste auxílio os cupins secretam enzimas digestivas pela glândula salivar ou através do seu intestino médio, o que faz com que a celulose seja hidrolisada em glicose, produto essencial para o ciclo de vida dos cupins (HONGO, 2011)

Figura 2- Cupins e seu trato intestinal. (A) Cupins inferiores da espécie *Coptotermes formosanus*. (B) A interface (madeira e húmus) que alimenta os cupins superiores *Termes comis*. (C) O intestino de *C. formosanus*. (D) O intestino de *T. comis*. (F) intestino anterior, (M) intestino médio. Barras= 1 mm

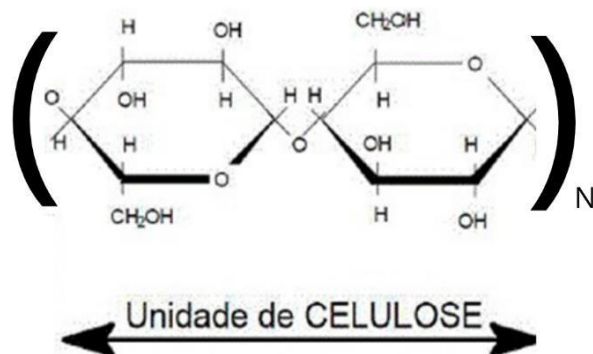


Fonte: HONGO (2011)

3.2. CELULASES

A celulose é um polímero abundante na estrutura dos materiais vegetais, formado por moléculas rígidas e de alta complexidade, como é mostrado na Figura 3. A existência dessa molécula fez com que fosse necessário a presença de enzimas em organismos de seres vivos que fossem dependentes da celulose como fonte alimentar (KEIJSERS, et al. 2013).

Figura 3- Estrutura molecular da Celulose

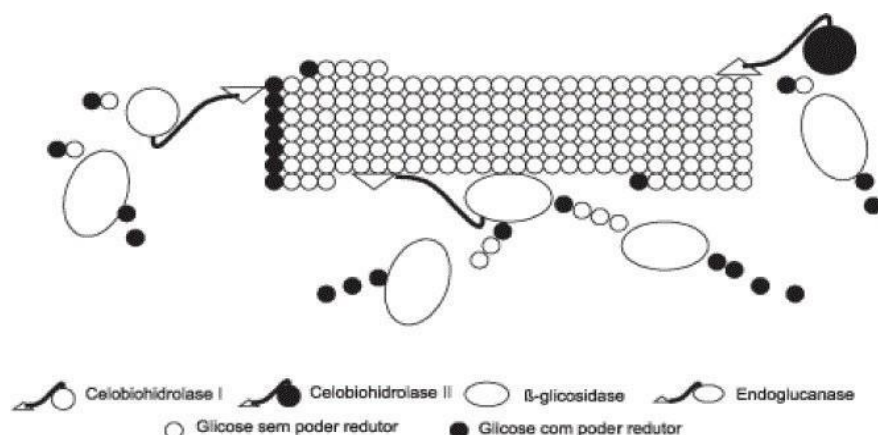


Fonte: Adaptada de SAMPAIO, 2013.

Essas enzimas são classificadas de acordo com o seu modo de ação, sendo elas as Endoglucanases (EC 3.2.1.4), enzima que cliva as ligações internas da celulose; a Exoglucanase (EC 3.2.1.91 e 3.2.1.74) que ataca a extremidade da cadeia de celulose que é originada a partir da ação da endoglucanase, resultando na formação de dissacarídeos ou unidades desacarídeos; e as Beta Glicosidases que quebram a extremidade não redutora da celulose após o segundo ataque da Exoglucanase, gerando unidades monoméricas (VIJAY, et al. 2020).

O conjunto de enzimas atua em sinergismo para a degradação da celulose, que é a despolimerização através da quebra das ligações β -1,4-D-glicosídicas (SINGHANIA, et al. 2010), como é representado na figura 4.

Figura 4- Modo de ação das celulasas



Fonte: CASTRO (2010).

Devido a sua função, as enzimas têm se tornado objeto de estudo em diversas pesquisas que focam na sua aplicação em indústrias biotecnológicas. Essas pesquisas mostram o seu amplo uso nos setores têxteis, indústrias alimentares, extração de petróleo, na fabricação de cerveja, dentre outras atividades como a produção de biocombustíveis (VIJAY, et al. 2020), apresentando-se como uma estratégia econômica, que utiliza fontes de carbono de baixo custo (SHANMUGAPRIYA et al., 2012 *apud* VIJAY, et al. 2020).

3.3 CONTROLE DE PRAGAS

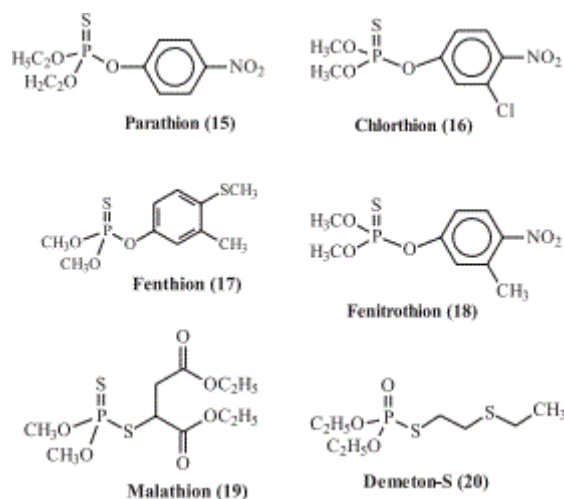
De acordo com Constantino (2002), as plantações de cana de açúcar, arroz de terras altas e o eucalipto são as mais afetadas na Américas do Sul, sendo outros tipos de plantio como milho, algodão, amendoim, soja, café, mandioca, árvores frutíferas e vegetais também afetados pela alimentação dos termitas.

Os cupins subterrâneos, considerados altamente destrutivos, são em sua maior parte pertencentes à família Rhinotermitidae. Estes insetos constroem seus ninhos com materiais fecais ou vegetais, que podem ser observados sob o solo. (GALLO et al., 2002). Para estes, barreiras físicas podem ser utilizadas como um método de prevenção aos ataques em estruturas de madeiras. Esse método pode ser tóxico ou atóxico, sendo no método tóxico realizada a aplicação de pesticidas sintéticos no solo ao redor da barreira e no método atóxico a utilização de substância que impeça a penetração dos cupins, funcionando como uma barreira mecânica para esses animais (VERMA, 2009).

Uma outra alternativa para o controle desses insetos, é a utilização de medidas de controle biológico aplicado (CBA) nos sistemas agrícolas. Nestes métodos uma quantidade elevada de parasitas ou predadores, criados em laboratório, são inseridos no habitat dos cupins com a finalidade de reduzir a sua população rapidamente. (PARRA, 2002).

Contudo, o tratamento a base de produtos químicos ainda continua sendo amplamente utilizado (VERMA et al., 2009). Essa utilização objetiva o controle da população de insetos em desequilíbrio, assim como o controle das ervas daninhas, porém apesar dos inseticidas organossintéticos (Figura 5) serem eficazes no controle de pragas, a sua utilização de forma incorreta acarreta riscos à saúde do homem e ao ecossistema (MOREIRA et al., 1996).

Figura 5- Inseticidas organofosforados



Fonte: SANTOS, 2007

Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas (Sinitox) em colaboração com a Fundação Oswaldo Cruz registraram um somatório de 3.379 casos de Intoxicação Humana por agrotóxicos de uso agrícola e doméstico no Brasil, em 2017, ficando atrás apenas das intoxicações por medicamentos (SINITOX, 2017). Acredita-se que a falta de orientação dos trabalhadores rurais que utilizam os agrotóxicos conduz a um grande número de acidentes, além de levar a contaminação das águas, do solo e dos alimentos (BULL E HATHAWAY, 1988 apud MOREIRA, 1996).

Nesse quesito, outras alternativas de controle têm sido estudadas, sendo os inseticidas de origem natural uma delas. Esses estudos propõem a descoberta de substâncias bioativas que possam ser aplicadas no desenvolvimento de uma substância de controle mais eficaz, com menores impactos à saúde e ao meio ambiente.

3.4 INSETICIDAS A BASE DE PRODUTOS NATURAIS

O uso inadequado dos pesticidas trouxe diversas consequências ao meio ambiente e à saúde humana. A contaminação dos lençóis freáticos, dos alimentos

advindos da agricultura além do acúmulo de alguns compostos químicos nos tecidos de animais que fazem parte da dieta alimentar humana, são exemplos do desfecho de uma utilização irracional dessas substâncias (ALVES, et al. 2020)

Como uma alternativa para o controle das pragas, tem-se estudado a aplicação de alguns compostos de origem natural à base de plantas. Estas, podem conter componentes bioativos em suas folhas, frutos, flores e raízes que possuam aplicação no controle dos cupins, podendo também ser utilizados os óleos essenciais, sementes, cascas, madeira e resina (VERMA, et al. 2009).

Esse tipo de tratamento é denominado como botânico e é baseado na produção de pesticidas ou repelentes naturais, através do metabolismo das plantas. Alguns trabalhos demonstram o potencial cupinícida de produtos fitoquímicos e metabólitos secundários, tais como, alcaloides, terpenoides, flavonoides, dentre outros. Esses inseticidas à base de produtos naturais apesar de não serem tão eficazes quando comparados ao controle químico, possuem maior segurança e agredem menos o meio ambiente (VERMA et al. 2008; KHAN & AHMAD, 2018).

Nesse contexto, um estudo publicado recentemente por Alves e colaboradores (2020), revelou as propriedades das quinoxalinas naturais como alternativa ao manejo químico, uma molécula pertencente ao grupo dos compostos heterocíclicos, e que está presente em uma gama de ingredientes farmacêuticos e produtos naturais. Porém, alguns estudos ainda tem sido realizados a fim de analisar o tempo de exposição e a excreção destes compostos, uma vez que o organismo humano também pode entrar em contato com essas substâncias naturais.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Caracterização da atividade endoglucanase em extratos proteicos brutos de cupins, para a utilização destes como ferramenta na triagem de cupinícidas naturais.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos proteicos brutos de cupins como fonte de celulases, para realizar os ensaios *in vitro* de atividade enzimática;

- Realizar ensaios de atividade enzimática celulolítica de endoglucanases
- Comparar as atividades dos extratos proteicos brutos com a atividade do extrato proteico purificado de *Trichoderma viridae*.

5. METODOLOGIA

5.1 CUPINS

A colônia de indivíduos adultos foi coletada em fragmentos de madeira de um imóvel residencial infestado na região da Pampulha, área urbana de Belo Horizonte, Minas Gerais, em dezembro de 2020. Após a coleta, os indivíduos foram preservados em álcool a 80% e acondicionados em freezer a -20°C, de maneira a preservá-los até seu uso no preparo dos extratos proteicos.

A identificação taxonômica foi realizada através da diferenciação morfológica de soldados e operários em microscópio estereoscópico (Medilux®) com aumento de 80x, utilizando chaves de identificação ilustrativas de acordo com Constantino (1999, 2002). Os cupins da casta operária foram então separados, como mostrado na figura 5, para dar sequência aos ensaios, visto que são considerados reservatórios de celulases devido ao seu papel de consumidor primário da celulose na colônia (ZHOU, et al. 2008).

Figura 6- Separação por diferenciação morfológica dos soldados e operários



5.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS DE CUPIM

Os cupins foram decapitados e dissecados com auxílio de agulhas acopladas a seringas de insulina. Parte dos indivíduos tiveram cabeça/tórax e abdômen separados para darem origem a dois extratos diferentes. Foram preparados dois extratos proteicos: um de corpo inteiro do inseto, a partir da trituração em nitrogênio líquido de 45g de cupins inteiros. A biomassa gerada foi suspensa em 450ml de tampão Acetato de sódio a 0,1M em pH 5,5. O outro extrato, somente da porção abdominal dos cupins, foi gerado por igual procedimento, usando 5g de abdômen, que após trituração foram suspensos em 50ml do mesmo tampão acetato de sódio a 0,1M em pH 5,5, como mostrado Figura 6. As preparações foram homogeneizadas em vórtex, centrifugadas a 14.000 RPM por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram coletados e filtrados, gerando os extratos brutos nomeados como: Extrato Enzimático de Exoesqueleto Completo (EEEC) e Extrato Enzimático de Abdômen (EEAB).

Figura 7- (1) Trituração por meio de maceração; (2) Suspensão em tampão acetato de sódio



Alíquotas de 1,5 mL de cada extrato foram acondicionadas em freezer a -20°C e usadas como fonte de celulasas nos ensaios enzimáticos subsequentes. Outro extrato proteico obtido do *Trichoderma viride*, isolado de térmitas e submetido a procedimentos cromatográficos para enriquecimento da atividade enzimática, foi gentilmente cedido pelo Dr. Élio Hideo Babá (Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular ICEB/UFOP) para auxiliar na comparação dos resultados.

5.3 ENSAIO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A concentração de proteínas totais dos extratos proteicos de cupim (EPC) foi determinada usando o método colorimétrico de Lowry e colaboradores (1951), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e soro albumina bovina (*Bovine Serum Albumin* - BSA) como padrão. Construiu-se uma curva padrão para possibilitar a conversão dos valores de leitura espectrométrica das amostras em respectivas concentrações de proteínas. As concentrações foram: 4,5; 4,0; 3,5; 3,0; 2,5; 2,0; 1,5; 1,0 e 0,5 mg/mL, utilizando água destilada para o espectro zero.

Para a reação colorimétrica, 100µl das amostras (padrões BSA e extratos enzimáticos de cupins) foram adicionados a micro tubos de 2,0mL, juntamente com 1000µl de reagente de cobre (sulfato de cobre a 2%, tartarato de sódio e potássio em solução de carbonato de sódio a 2% em hidróxido de sódio a 0,1 M), por 10 minutos. Em seguida, 100µl do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:3 para água destilada é acrescentado, homogeneizado em vórtex e incubado por 10 minutos ao abrigo da luz. Após a reação de redução sofrida pelos reagentes obtém-se um composto de cor azulada, que foi dosado através de leitura espectrofotométrica a 625nm.

Os extratos proteicos foram diluídos em água destilada por diluição seriada de razão 2 (2x até 128x) em triplicata. A concentração de proteínas totais foi utilizada para calcular a atividade específica de endo- β -1,4-glucanase para cada um dos extratos enzimáticos obtidos utilizando o valor das unidades de atividade enzimática que serão definidas a seguir (SENEESRISAKUL, et al. 2017).

5.4 ENSAIO COM CARBOXIMETILCELULOSE (CMC)

A atividade da endo- β -1,4-glucanase foi mensurada através do ensaio utilizando Carboximetilcelulose (CMC) como substrato, de acordo com Ghose e colaboradores (1987). O procedimento do ensaio envolve encontrar a diluição adequada de forma que 0,5mL da solução contendo celulase seja capaz de produzir 0,5mg de açúcar redutor, em uma conversão de 30 minutos. Assim, foram utilizados 0,5mL de cada um dos extratos enzimáticos de cupim diluídos (as diluições testadas

foram resumidas na tabela 1) a 50°C em eppendorf, com a adição de 0,5mL de solução de CMC a 2% em tampão citrato de sódio a 50 mM em pH 4,8. Após incubação por 30 minutos em banho-maria a 50°C, a reação foi parada pelo aquecimento em banho maria com água em ebulição. O espectro zero foi formado pela substituição do conteúdo enzimático dos extratos de cupim, por 0,5 mL de tampão citrato de sódio.

Tabela 1- Diluições testadas dos extratos enzimáticos de cupim para o ensaio usando CMC

Extratos Enzimáticos	Diluições Testadas
Extrato Enzimático de Exoesqueleto Completo (EEEC)	2,5x, 5x e 7,5x
Extrato Enzimático de Abdômen (EEAB)	5x, 25x e 37,5x
Extrato Enzimático de <i>Trichoderma viridae</i> (EETv)	500x, 750x e 1000x

Os valores de absorbância dos extratos enzimáticos foram convertidos em concentrações de glicose a partir dos dados da curva padrão de glicose, e as diluições testadas foram convertidas em concentração de enzima, usando a equação 1 (GHOSE, et al. 1987).

$$\text{Concentração} = \frac{1}{\text{diluição}} \left(= \frac{\text{Volume da enzima na diluição}}{\text{Volume total da diluição}} \right) \quad (1)$$

Em seguida, a estimativa da concentração dos extratos enzimáticos testados que produziram 0,5mg de glicose foi realizada como descrito anteriormente, uma vez que são cálculos análogos. No entanto, para mensurar a atividade da endo-β-1,4-glucanase em “unidades de CMC”, deve-se utilizar a equação.

$$(2) \quad \text{CMC} = \frac{0,185}{\text{concentração de enzima que produz 0,5 mg de glicose}} \text{ unidade. min}^{-1}$$

Assim como a unidade em papel de filtro, a unidade de CMC é baseada na IU, onde:

1 IU = 1 μmol.min⁻¹ de produto de hidrólise liberado = 0,18 mg.min⁻¹ quando

produto é glicose

A quantidade absoluta de glicose no ensaio CMC é 0,5 mg:

$$0,5 \text{ mg de glicose} = 0,5/0,18 \text{ } \mu\text{mol}$$

Esta quantidade de glicose foi produzida por 0,5 mL em 30 min, ou seja, na reação CMC:

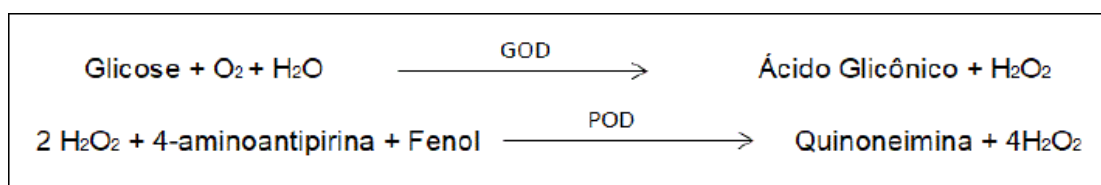
$$\begin{aligned} 0,5 \text{ mg de glicose} &= \frac{0,5}{0,18 \times 0,5 \times 30} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \\ &= 0,185 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} (\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}) \end{aligned}$$

Portanto, a quantidade estimada de enzima (concentração absoluta de enzima) que libera 0,5 mg de glicose na reação CMC contém $0,185 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ corresponde a equação 2.

5.5 QUANTIFICAÇÃO DA GLICOSE GERADA

Para quantificar a concentração da glicose gerada como produto da reação enzimática, foi utilizado o método da glicose-oxidase, baseado na oxidação da glicose pela enzima glicose-oxidase (GOD) em ácido glicônico e peróxido de hidrogênio, seguindo as recomendações do fabricante (Bioclin®). Para tal, 30 µl da mistura reacional final dos ensaios enzimáticos, branco e controle eram incubados a 37°C por 10 minutos em banho-maria com 300 µl de reagente enzimático de cor (tampão fosfato em pH 7,5, fenol a 5,0 mmol/L, glicose-oxidase (GOD) a 10000 U/L, peroxidase (POD) a 1000 U/L, 4-aminoantipirina 0,4 mmol/L e azida sódica a 7,7 mmol/L). Em seguida, era realizada a leitura em Leitor de Elisa (Molecular Devices®) no comprimento de onda $\lambda = 490 \text{ nm}$.

Figura 8 - Princípio do método enzimático de Glicose-Oxidase



Fonte: Bioclin®.

Após o teste realizado foram construídas curvas padrão de glicose usando o

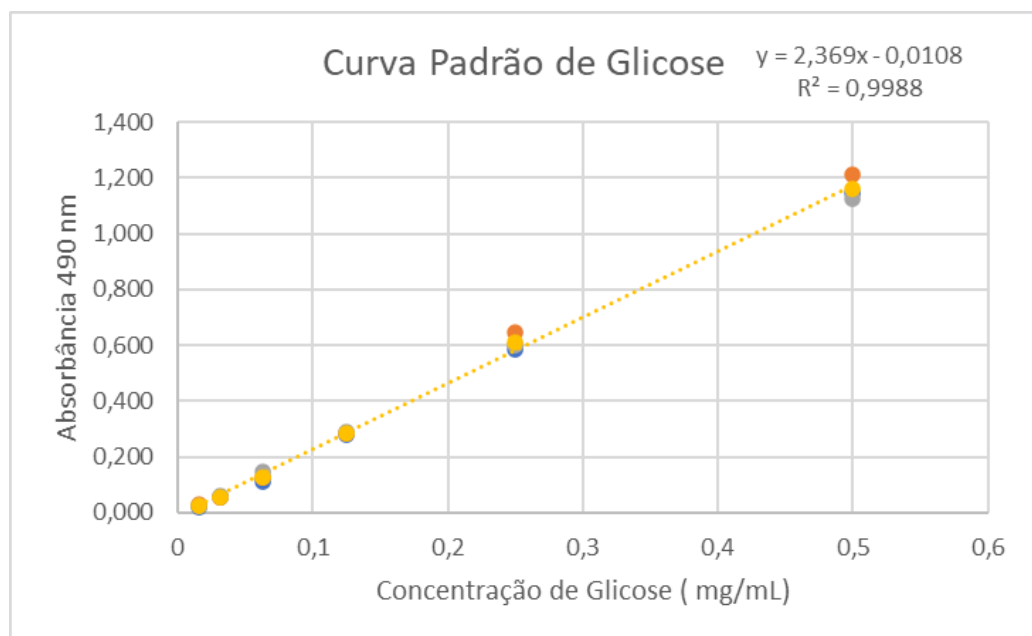
software Excel Microsoft® que possibilitaram a obtenção de uma equação linear, que permitiu converter os valores das leituras de absorbâncias espectrofotométricas obtidas durante as análises em concentrações do produto gerado. O coeficiente de correlação angular (R^2) também foi extraído, possibilitando que a equação fosse empregada para cálculo dos resultados, sendo o coeficiente de correlação sempre igual ou superior a 0,99.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ENSAIOS DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O valor da absorbância de concentrações conhecidas do padrão de Glicose estabelecido no ensaio enzimático foi utilizado para plotar um gráfico de dispersão dos pontos, obtendo-se uma equação, com coeficiente de correlação angular superior a 0,99 (Gráfico 1). A reta obtida foi utilizada para converter os valores da absorbância das amostras em concentrações conhecidas de substrato.

Gráfico 1- Curva de Glicose Padrão



6.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES CATALÍTICAS DAS CELULASES

Foram plotados gráficos (Gráfico 2) de concentração enzimática *versus*

concentração a de glicose gerada a fim de encontrar uma equação da reta que determinasse precisamente a concentração enzimática que seria capaz de gerar 0,5mg de açúcar redutor, em uma conversão de 30 minutos. Após determinadas as diluições para cada extrato os cálculos de atividade enzimática foram realizados.

Gráfico 2- Atividade Catalítica de Endoglucanase presente no Extrato Enzimático de *Trichoderma viridae*

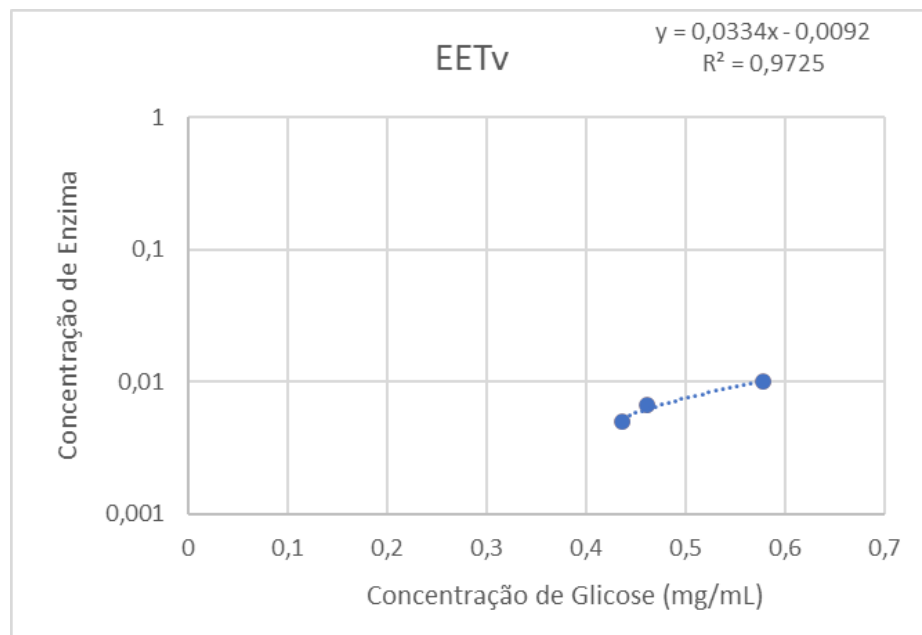


Gráfico 3- Atividade Catalítica de Endoglucanase presente no Extrato Enzimático de Exoesqueleto Completo

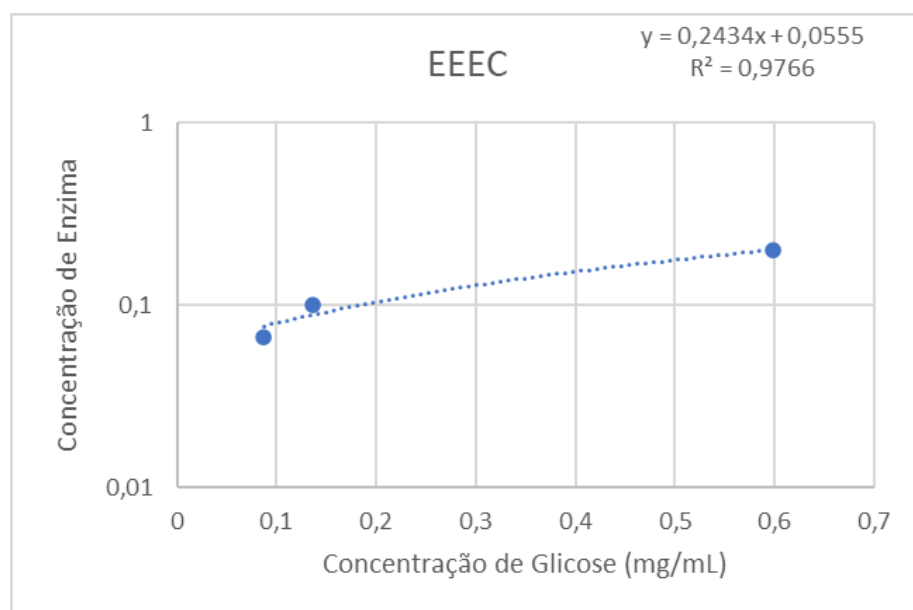
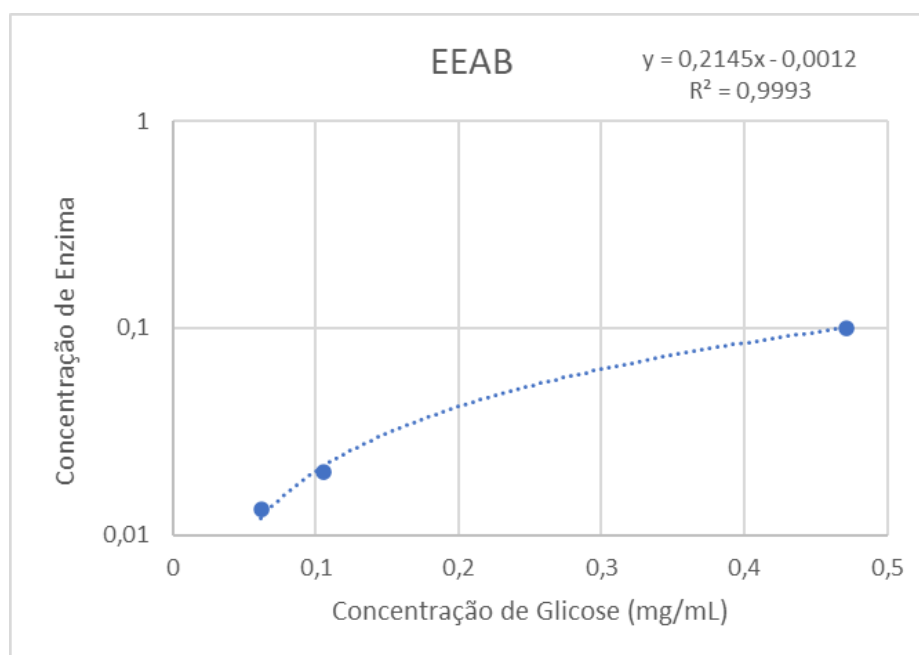


Gráfico 4- Atividade Catalítica de Endoglucanase presente no Extrato Enzimático de Abdômen



A atividade celulítica proveniente dos extratos enzimáticos de cupim (*Coptotermes sp.*) obtidos neste estudo (Extrato Enzimático de Exoesqueleto Completo - EEEC e de Abdômen - EEAB) estão representados na Tabela 2. Pode-se observar que a atividade destes foram menores quando comparadas ao Extrato Enzimático de *T. viride* (EETv), sendo a atividade celulítica total reduzida cerca de 5x e 8x.

O valor de proteínas totais foi medido e utilizado para calcular a atividade específica para cada um dos extratos, levando em consideração o grau de enriquecimento das atividades em função do conteúdo total de proteínas no extrato. Considerando este parâmetro, percebe-se maior atividade catalítica para o EETv. Estes fatos constatados indicam a importância de processos subsequentes de purificação de proteínas como forma de melhorar a eficiência catalítica das enzimas presentes em cada extrato.

Tabela 2- Resultados Obtidos a Partir da Caracterização da Atividade Catalítica de Celulase.

Extratos Enzimáticos	Proteínas Totais (mg/ml)	Unidades de CMCase (U/ ml)	Atividade Específica CMCase (U/mg)
EETv	397,44	23,87	0,06
EEEC	495,36	1,03	0,0021
EEAB	670,08	1,74	0,0026

Somente os operários *Coptotermes* spp. foram selecionados para produção dos extratos proteicos, devido ao fato de possuírem papel como consumidores primários de celulose na colônia, o que os destaca das demais castas em relação a capacidade de digerir materiais celulósicos (ZHOU, et al. 2008). Esses extratos foram usados como fonte de celulasas para o ensaio enzimático subsequente.

É importante ressaltar que a capacidade de digestão completa da celulose, não depende somente das celulasas, mas também, da fisiologia de seu trato digestivo do cupim. A digestão da celulose de cupins inferiores do gênero *Coptotermes* spp. se inicia na boca através da fragmentação enérgica de mandíbulas e trituração na moela, seguida do início de hidrólise catalítica da celulose pelas celulasas endógenas (endoglucanase e β -glicosidase) que são secretadas pelas glândulas salivares no intestino anterior, localizado na cápsula encefálica. A ação sinérgica dessas enzimas continua no intestino médio (tórax/abdômen), de forma que os materiais ainda não foram absorvidos por esse epitélio, se encaminham para serem finalizados no intestino posterior (abdômen) por intermédios de protistas flagelados simbiotes, que secretam além de endoglucanase e β -glicosidase, exoglucanase e hemicelulase para a conversão final de celulose em nutrientes essenciais (KONIG & VARMA, 2006; KHAN & AHMAD, 2018; AHMAD, et al. 2021).

Pode-se notar que as endoglucanases exercem um papel essencial durante o ciclo digestivo da celulose, catalisando uma série de reações subsequentes na formação de um produto, que é a glicose. Ao analisarmos os resultados, foi possível observar que a atividade de endoglucanases do EETv se mostra maior que as dos demais extratos, sendo a atividade do EEAB maior que a do EEEC.

Muitos estudos foram realizados para caracterizar carboidratos como potenciais inibidores da atividade celulolítica de cupins. Dentre eles, ZHOU e

colaboradores (2008) investigaram três carboidratos como protótipos de inibidores de celulasas e, dois deles (Celobioimidazol e Fluorometil Celobiose) se mostraram eficazes para inibir exoglucanase e, principalmente, a β -glicosidase de trato digestivo de *Reticulitermes flavipes*. No estudo de SCHARF e colaboradores (2010), Celobioimidazol também demonstrou inibição para β -glicosidase de intestino de *R. flavipes*. Outro estudo, de ZHOU e colaboradores (2005), avaliou cinco potenciais inibidores da atividade de β -glicosidase em ensaios de alimentação *in vivo* para *Coptotermes formosanus*, sendo que dois deles (1-desoxinojirimicina e gluconolactona) são compostos a base de carboidratos, mostraram-se inibidores reversíveis dessa enzima. Desta maneira, estudos como estes, apontam o potencial de pequenas moléculas como protótipo de inibição para β -glicosidase, sendo necessário chegar ao isolamento desta substância para realizar análises mais adequadas para sua caracterização e potencial farmacológico, como se pretende fazer nos estudos subsequentes de prospecção de cupinídeos naturais.

7. CONCLUSÃO

A busca por cupinídeos naturais vem se apresentando como uma estratégia chave na caracterização de substâncias protótipos que substituam o manejo químico atualmente utilizado com grande frequência. Essa busca é motivada por inúmeras consequências de um manejo realizado sem qualquer capacitação aos trabalhadores agropecuários, que tem a sua saúde comprometida além dos danos que são causados ao ambiente.

A caracterização da atividade celulolítica de enzimas presentes no trato digestivo de cupins, permite a elaboração de estudos de inibição enzimática com substâncias que têm como alvo as celulasas. A modelagem molecular, por exemplo,

permite a síntese de novas moléculas de forma racional, podendo também ser aplicada para moléculas de origem natural, a fim de otimizar a sua relação estrutura atividade e melhorar a interação da substância com o seu receptor alvo (BARREIRO, 1997).

Embora a atividade celulolítica da endoglucanase presente nos extratos brutos estudados se apresente menores em comparação ao extrato purificado de fungo comensal de térmita, estas foram mensuráveis e já permitem a sua aplicação em estudos e triagens de potenciais cupinídeos naturais, feitos a base de plantas produtoras de metabólitos ativos de modo a realizar um controle mais específico e que agrida menos a natureza.

É necessário ressaltar que a aplicação de métodos de purificação dos extratos brutos e sua devida caracterização pode aumentar o potencial desta estratégia como ferramenta biotecnológica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FREYMAN, B. P.; VISSER, S. N.; OLFF, H. Spatial and temporal hotspots of termitel-driven decomposition in the Seregenti. *Ecography*, n. 33, p. 443- 450, 2010.

HONGO, Yuichi. Toward the functional analysis of uncultivable, symbiotic microorganisms in the termite gut. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 68, n. 8, p. 1311-1325, 2011. doi:10.1007/s00018-011-0648-z .

LIMA, J.T. & COSTA-LEONARDO, A.M. Recursos alimentares explorados pelos cupins (Insecta: Isoptera). *Biota Neotropica*, Campinas, v. 7, n. 2, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-06032007000200027> \ lng= en\ nrm=iso>. Acesso em: 14 de maio de 2022. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032007000200027>

SINGH, Vijay Pratap; SHARMA, Divya. Celulase e seu papel nas indústrias: uma revisão. *Revista Internacional de Ciências Agrárias* , v. 11, n. 1, pág. 1 a 7 de 2020.

KORB, J. Termites. *Current Biology*, v. 17, p. R995-R999, 2007.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiologia e Serviços de Saúde, v. 16, n. 4, p. 179-293, 2007.

BERNARDINI, João Fernando. Tratamento químico do solo visando ao controle do cupim *Coptotermes gestroi* (Wasmann, 1896), (Isoptera: Rhinotermitidae). 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CONSTANTINO, R. The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. Journal of Applied Entomology, v. 126, n. 7-8, p. 355-365, 2002. doi:10.1046/j.1439-0418.2002.00670.x

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Intoxicações causadas por agrotóxicos. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/en/node/1909#:~:text=A%20Organiza%C3%A7%C3%A3o%20Internacional%20do%20Trabalho,n%C3%A3o%20fatais%20tamb%C3%A9m%20s%C3%A3o%20registrados>. Acesso em 14 maio, 2022.

OURO PRETO, M. G. CONTROLE BIOLÓGICO DE CUPIM POR MEIO DE MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS. BIGNELL, D. E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Ed.). Biology of termites: a modern synthesis. Springer Science & Business Media, p. 3-5, 2010. DOI 10.1007/978-90-481-3977-4.

ABE, T., BIGNELL, D. E., HIGASHI, M., HIGASHI, T., & ABE, Y. (Eds.). Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology. Springer Science & Business Media. v. 20, n. 2, 2000.

SCAGLIA, J. A. P. Manual de Entomologia Forense. Editora JH Mizuno, p. 15, 2014.

SILVA, L. R.; SILVA-CASTRO, M. M. Da; CONCEICAO, A. De S. Bignoniaceae in the Raso da Catarina Ecoregion, Bahia, Brazil. Biota Neotrop., Campinas , v. 18, n. 4, e20170466, 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-06032018000400306

&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 20 Fevereiro de 2021. Epub Sep 17, 2018.

<http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2017-0466>.

FERREIRA, E. V. D. O., MARTINS, V., JUNIOR, I., VASCONCELLOS, A., GIASSON, E., & NASCIMENTO, P. C. D. Ação dos térmitas no solo. *Ciência Rural*, v. 41(5), p.804-811, 2011.

KEIJSERS, EDWIN RP; YILMAZ, GULDEN; VAN DAM, Jan EG. The cellulose resource matrix. *Carbohydrate polymers*, v. 93, n. 1, p. 9-21, 2013.

DE SAMPAIO, Juliana Abrantes. Caracterização de fibras de celulose recobertas por plasma 2013.

SINGH, VIJAY PRATAP; SHARMA, DIVYA. Cellulase and its role in industries: A Review. *International Journal on Agricultural Sciences*, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2020.

SINGHANIA, R.R; SUKUMARAN, R.K; PATEL, A.K; LARROCHE, C; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production Technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v.46, p.541-549, 2010.

CASTRO, A. M. DE E P.; Jr, NEI. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova* [online]. v. 33, n. 1, pp. 181-99188, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100031>>. Epub 05 Fev 2010. ISSN 1678-7064. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100031>. Acesso em: 02 de maio de 2021.

GALLO, D. et al. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba-SP: FEALQ, 2002, 920pp.

MOREIRA, Leonardo Fernandes et al. Impacto ambiental e administração de problemas toxicológicos na utilização de inseticidas agrícolas. *Organizações Rurais & Agroindustriais*, v. 8, n. 1, 1996.

ALVES, Daniela Ribeiro; DE MORAIS, Selene Maia; MARINHO, Emmanuel Silva. Quinoxalinas naturais em substituição às alternativas semissintéticas e sintéticas como pesticidas: Um estudo in silico. Ambiente: Gestão e Desenvolvimento, 2021.

KHAN, MA.; AHMAD, W. Termites and Sustainable Management || Integrated Termite Management in the Context of Indoor and Outdoor Pest Situation. , 10.1007/978-3-319-68726-1(Chapter 5), 119-135.2018. doi:10.1007/978-3-319-68726-1_5.

CONSTANTINO, R. Catalog of the living termites of the New World (Insecta: Isoptera). Arquivos de Zoologia, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 135-230, 1998. DOI: 10.11606/issn.2176-7793.v35i2p135-230. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/azmz/article/view/1>. 2014. Acesso em: 17 fevereiro 2021.

CONSTANTINO, R. The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. Journal of Applied Entomology, v. 126, n. 7-8, p. 355-365, 2002. doi:10.1046/j.1439-0418.2002.00670.x

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

PACE, M. R., LOHMANN, L. G., OLMSTEAD, R. G., & ANGYALOSSY, V. . Wood anatomy of major Bignoniaceae clades. Plant Systematics and Evolution, v. 301,n. 3, p. 967-995, 2015

SWAMI, H. S., SINGH, K. S. P., GENNARO, L., & DUTT, R. D. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. Trieste: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, v. 200-66, p. 23, 2008.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. de. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. Saúde debate, Rio de Janeiro , v. 42, n. 117, p. 518-534, June 2018 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-11042018000200518

&lng=en&nrm=iso>. access on 19 Feb. 2021.
<https://doi.org/10.1590/0103-1104201811714>

O'NEILL, M. J.; LEWIS, J. A. The renaissance of plant research in the pharmaceutical industry. V. 543, cap. 5, p.48-55 1993. Disponível em: <
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1993-0534.ch005>> Acesso em: 02 de
Fevereiro de 2021. Doi: 10.1021/bk-1993-0534.ch005.

FUNARI, C. S., GULLO, F. P., NAPOLITANO, A., CARNEIRO, R. L., MENDES-
GIANNINI, M. J. S., FUSCO-ALMEIDA, A. M., & SILVA, D. H. S.
Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from
Brazil. Food chemistry, v.135(3), p.2086-2094, 2012.

BIGNELL, D. E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Ed.). Biology of termites: a modern synthesis.
Springer Science & Business Media, p. 3-5, 2010. DOI 10.1007/978-90-481-3977-4.

KRISHNA, K. (Ed.). Biology of termites. Elsevier, 2012. v. 1. p.1-3.

SCAGLIA, J. A. P. Manual de Entomologia Forense. Editora JH Mizuno, p. 15, 2014.

KEIJSERS, Edwin RP; YILMAZ, Gülden; VAN DAM, Jan EG. The cellulose
resource matrix. Carbohydrate polymers, v. 93, n. 1, p. 9-21, 2013.

DE SAMPAIO, Juliana Abrantes. Caracterização de fibras de celulose recobertas
por plasma. 2013.

SINGH, Vijay Pratap; SHARMA, Divya. Cellulase and its role in industries: A Review.
International Journal on Agricultural Sciences, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2020.

SINGHANIA, R.R; SUKUMARAN, R.K; PATEL, A.K; LARROCHE, C; PANDEY, A.
Advancement and comparative profiles in the production Technologies using solid-
state and submerged fermentation for microbial cellulases. Enzyme and Microbial
Technology, v.46, p.541-549, 2010.

PARRA, J. R. P. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. Editora
Manole Ltda, p.8-10, 2002.

WATANABE, Y., MIHARA, R., MITSUNAGA, T., & YOSHIMURA, T. Termite repellent sesquiterpenoids from *Callitris glaucophylla* heartwood. *Journal of Wood Science*, v. 51, n. 5, p. 514-519, 2005.

VERMA, M.; SHARMA, S.; PRASAD, R. Biological alternatives for termite control: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 63, n. 8, p. 959-972, 2009.

ZHOU X., WHEELER M. M., OI F. M., SCHARF M. E. Inhibition of termite cellulases by carbohydrate-based cellulase inhibitors: Evidence from in vitro biochemistry and in vivo feeding studies. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 90, n. 1, p. 31-41, 2008. Disponível em: <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048357507001095>> Acesso em: 21 de março de 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.07.011>.

ZHU, B. C. R.; HENDERSON, G.; LAINE, R. A.. Screening Method for Inhibitors Against *Formosan* Subterranean Termite β -Glucosidases *In Vivo*. *Journal of Economic Entomology*, 98(1), 41-46, 2005. doi:10.1093/jee/98.1.41.

BRASIL, 1993 Rio de Janeiro: FIOCRUZ/CICT/SINITOX; 1995. Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Informação Científica e Tecnológica/Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Disponível em: <https://sinitox.icict.fiocruz.br/dados-de-agentes-toxicos>. Acesso em 10 maio, 2022.

GHOSE, T. K., & BISARIA, V. S. Measurement of hemicellulase activities. Part 1: xylanases. *Pure Appl Chem*, v. 59, n. 12, p. 1739-1751, 1987.

SANTOS, Viviane Martins Rebello dos et al. Compostos organofosforados pentavalentes históricos, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Química Nova*, v. 30, p. 159-170, 2007.