

LILIANE EVANGELISTA VISÔTTO

**CONTRIBUIÇÃO DA MICROBIOTA BACTERIANA PARA O PROCESSO
DIGESTIVO E DESENVOLVIMENTO DA LAGARTA DA SOJA (*Anticarsia
gemmatalis*) E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PROTEOLÍTICAS
ASSOCIADAS AO SEU TRATO INTESTINAL**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica Agrícola,
para obtenção do título de *Doctor
Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

LILIANE EVANGELISTA VISÔTTO

**CONTRIBUIÇÃO DA MICROBIOTA BACTERIANA PARA O PROCESSO
DIGESTIVO E DESENVOLVIMENTO DA LAGARTA DA SOJA (*Anticarsia
gemmatalis*) E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PROTEOLÍTICAS
ASSOCIADAS AO SEU TRATO INTESTINAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de Doctor *Scientiae*.

APROVADA: 15 de agosto de 2007

Prof. Milton H. Guerra Andrade

Thiago Rennó dos Mares-Guia

Prof. Wellington Garcia Campos

Profª Andréa de O. B. Ribon
(Coorientadora)

Profª Maria Goreti Almeida de Oliveira
(Orientadora)

OFEREÇO

Aos meus pais Maria Donizetti E. Visôto e Antônio Claret Visôto

DEDICO

Ao meu amor Pedro e ao meu querido Théo (In Memoriam)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua bondade e grandiosidade infinita. Pela sua proteção, auxílio e conforto nos momentos mais difíceis. Pela oportunidade que me oferece de ver a beleza em cada manhã.

À minha família que mesmo distante me apoiou, incentivando meus desejos e sonhos. Pelo amor e carinho dedicado dos meus pais. Pelo sorriso contagiante do Juninho, pelo abraço afável do Leandro e pela doçura que acalenta da Tatiane.

Ao meu esposo Pedro Ivo, pelo amor, compreensão e carinho indispensáveis, que tornaram a minha vida mais cheia de luz.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

À minha Orientadora Professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pela orientação, compreensão e acima de tudo pela amizade, respeito e confiança demonstrados no correr desses anos.

À Professora Andréa de Oliveira Barros Ribon, pelas sugestões e idéias imprescindíveis no projeto e nas análises microbiológicas, que foram de grande importância na realização deste trabalho.

Ao Professor Raul Narciso de Carvalho Guedes, pela receptividade sempre presente, pela paciência, pela colaboração nas análises estatísticas e principalmente pelo incentivo na execução deste trabalho.

Aos demais Professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela convivência e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Hilário Cuqueto Mantovani, pela colaboração e pelo empréstimo da câmara de anaerobiose.

À Professora Elza Fernandes de Araújo, à Professora Maria Cristina Dantas Vanetti e ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela concessão de alguns reagentes.

Aos estagiários Fabrício, Fernanda e Thiago, pela dedicação e valiosa contribuição aos trabalhos desenvolvidos.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que contribuíram na execução deste trabalho, especialmente ao Eduardo, Aloízio, Denilson e Fausto.

Aos funcionários da casa de apoio, José Carlos e Marcos (In Memoriam) pela ajuda na condução dos experimentos.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, Antônio, Paulo e Pablo, pelos inúmeros favores prestados.

Aos amigos do Laboratório de enzimologia: Lílian, Eduardo, Fabrícia, Angélica, Anderson Pilon, Franciny, Camilla, Ana Paula, Jeanne, Sandra, Fabrício, Fernanda, Thiago, Rita, Denise, Ronnie Vond, Anderson Fazolo e Matheus, pela convivência sempre agradável e pela descontração no trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Virologia: Danielle, Evando e Glória pelas ajudas indispensáveis e pelos ótimos jantares realizados por vocês.

Às amigas do Laboratório de Análises de Sequência de DNA: Beatriz, Cassiana, Polyane, Márcia e Gisele pela ajuda nos experimentos e pelas dicas de beleza.

Aos meus amigos que a muito não vejo e aqueles com quem falo diariamente, obrigada pelo apoio, companheirismo, alegrias e bons momentos de gostosas risadas.

E, finalmente, a todos desejo:

“...que a vida não seja apenas pintada de novo, remendada às carreiras, mas seja nova nas sementinhas do vir-a-ser, nova até no coração das coisas menos percebidas (a começar pelo seu interior), nova espontânea, que de tão perfeita nem se nota, mas com ela se come, se passeia, se ama, se compreende, se trabalha...”

Carlos Drumond de Andrade

Que Deus proteja todos vocês!!!

BIOGRAFIA

LILIANE EVANGELISTA VISÔTTO, filha de Antônio Claret Visôto e Maria Donizetti Evangelista Visôto, nasceu em Itajubá, no Estado de Minas Gerais, no dia 6 de julho de 1976.

Em agosto de 1995, iniciou o curso de Farmácia e Bioquímica na Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, graduando-se em agosto de 2000.

Em abril de 2003, concluiu o Mestrado em Microbiologia Agrícola no Departamento de Microbiologia, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Em 01 de agosto de 2003 iniciou o curso de Doutorado em Bioquímica Agrícola no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, defendendo tese em 15 de agosto de 2007.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1.1. <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae).....	2
1.2. Enzimas digestivas de insetos.....	6
1.2.1. Lipases.....	8
1.2.2. Carboidrases.....	10
1.2.2.1. Amilases.....	10
1.2.2.2. Celulases.....	11
1.2.2.3. Xilanases.....	12
1.2.2.4. Pectinases.....	13
1.2.2.5. Glicosidases.....	13
1.2.4. Proteases.....	14
1.3. Proteases de insetos.....	15
1.4. Inibidores de proteases.....	18
1.5. Microbiota bacteriana de insetos.....	20
1.6. Fatores que influenciam a colonização microbiana do trato intestinal de insetos.....	23
1.7. Importância da Microbiota Bacteriana.....	24
1.7.1. Função nutricional da microbiota.....	24
1.7.2. Resistência à colonização.....	25
1.7.3. Interações multitróficas.....	26
1.7.4. Transferência gênica bacteriana dentro do intestino.....	26
1.7.5. Bactérias intestinais transgênicas no biocontrole.....	27
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

CAPÍTULO I - Contribuição da microbiota bacteriana para o processo digestivo e desenvolvimento de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidóptera).....	47
RESUMO.....	48
1. INTRODUÇÃO.....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1. Dieta artificial.....	52
2.2. Teste <i>in vitro</i> dos antibióticos sobre a microbiota intestinal.....	52
2.3. Tratamento dos insetos.....	53
2.4. Detecção de microrganismos.....	53
2.5. Análises microscópicas.....	54
2.6. Obtenção do extrato enzimático.....	55
2.7. Ensaio enzimático e de proteína.....	55
2.8. Análise da performance do inseto.....	56
2.9. Análises estatísticas.....	56
3. RESULTADOS.....	57
3.1. Antibiógrama.....	57
3.2. Efeitos dos antibióticos sobre a microbiota intestinal.....	57
3.3. Avaliação da presença de bactérias no trato intestinal através de microscopia.....	60
3.4. Efeito dos antibióticos nas atividades enzimáticas.....	62
3.5. Efeito dos antibióticos na performance do inseto.....	68
4. DISCUSSÃO.....	71
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

CAPÍTULO II - Caracterização de bactérias proteolíticas associadas ao trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidóptera).....	81
RESUMO.....	82
1. INTRODUÇÃO.....	83
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	85
2.1. Criação de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	85

2.2. Isolamento de bactérias proteolíticas.....	85
2.3. Extração de DNA genômico.....	86
2.4. Amplificação do gene 16S rRNA bacteriano e análise por RFLP...	86
2.5. Sequenciamento do gene 16S rRNA e análises de dados.....	87
2.6. Testes bioquímicos.....	87
2.7. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos.....	87
2.8. Ensaio enzimáticos.....	87
2.9. Determinação da concentração de proteínas.....	87
3. RESULTADOS.....	89
3.1. Contagem microbiológica e isolamento de bactérias proteolíticas.	89
3.2. PCR-RFLP.....	91
3.3. Caracterização fenotípica e identificação molecular dos isolados..	92
3.4. Análise do perfil de resistência dos isolados aos antimicrobianos.	96
3.5. Análise dos ensaios enzimáticos.....	96
4. DISCUSSÃO.....	99
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
3. CONCLUSÕES.....	108
4. PERSPECTIVAS.....	109
5. AGRADECIMENTOS.....	110

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1: Lagarta da soja (Larva), <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hübner)...	4
FIGURA 2: Lagarta da soja (adulto) <i>Anticarsia gemmatalis</i> .(Hübner)...	5
FIGURA 3: Representação esquemática dos compartimentos do intestino dos insetos.....	7
FIGURA 4: Número de UFC total e proteolítica encontrado no trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	59
FIGURA 5: Micrografias eletrônicas de varredura e de luz do intestino de larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	61
FIGURA 6: Inibição da atividade amidásica em função da concentração de tetraciclina.....	65
FIGURA 7: Inibição da atividade lipásica em função da concentração de tetraciclina.....	65
FIGURA 8: Perfil da atividade proteolítica do extrato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> ao longo do desenvolvimento larval.....	66
FIGURA 9: Perfil da atividade amidásica do extrato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> ao longo do desenvolvimento larval.....	67
FIGURA 10: Perfil da atividade lipásica do extrato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> ao longo do desenvolvimento larval.....	67
FIGURA 11: Variação no tempo de duração do ciclo larval de <i>Anticarsia gemmatalis</i> em função das concentrações de tetraciclina....	69
FIGURA 12: Variação na transformação em pupa de <i>Anticarsia gemmatalis</i> em função das concentrações de tetraciclina.....	69
FIGURA 13: Análise por RFLP do perfil de restrição do gene 16S rRNA de bactérias isoladas do intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> obtidas pela digestão com <i>Hae</i> III (A) e <i>Rsa</i> I.....	91
FIGURA 14: Dendrograma obtido pelo método do vizinho mais próximo com base nos perfis de restrição dos doze isolados proteolíticos, utilizando <i>Hae</i> III e <i>Rsa</i> I.....	92
TABELA 1: volume de antibiótico usado nos três tratamentos testados.....	53
TABELA 2: Efeito dos antibióticos no crescimento de bactérias cultiváveis presentes no intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	58

TABELA 3: Inibição das atividades enzimáticas do intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> criadas com dieta adicionadas de cloranfenicol e de uma combinação de antibióticos.....	63
TABELA 4: Inibição das atividades enzimáticas do intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> criadas com dieta adicionadas de tetraciclina...	64
TABELA 5: Parâmetros biológicos medidos ao longo dos dias do ciclo de vida de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentada com diferentes concentrações de tetraciclina.....	70
TABELA 6: Número de bactérias totais e proteolíticas presentes no trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> criadas com dieta artificial e folhas de soja.....	90
TABELA 7: Identificação dos isolados com base no gene 16S rRNA...	97
TABELA 8: Análises morfológicas e bioquímicas das bactérias proteolíticas isoladas.....	95
TABELA 9: Efeito dos antimicrobianos sobre as bactérias proteolíticas isoladas do intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	97
TABELA 10: Atividade de proteases detectada nos sobrenadantes das culturas das bactérias isoladas do intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	98

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI: infusão cérebro coração
CI₅₀: concentração capaz de inibir 50% da atividade
CMC: carboximetilcelulose
DGGE: gel de eletroforese em gradiente desnaturante
DMF: dimetilformamida
DNA: ácido desoxirribonucléico
dNTP: desoxirribonucleotídeo
EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético
HMDS: hexamethyldisilazane
KDa: Kilodaltons

K_{M app}: constante de Michaelis-Menten aparente
LB: Luria-Bertaini
L-BAPNA: N-benzoil-L-argininil *p*-nitroanilida
L-TAME: N α -tosil-L-arginil metil éster
MAG: monoacilgliceróis

MM: massa molecular

mRNA: ácido ribonucléico mensageiro

Nipagin: metilparabeno
NP β Gal: paranitrofenol- β -galactosídeo
NP β Glu: paranitrofenol- β -glicosídeo
PCR: reação em cadeia da polimerase

pI: ponto isoelétrico
PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil
RAPD: DNA polimórfico amplificado ao acaso
RFLP: reação de polimorfismo de fragmentos de restrição

rRNA: ácido ribonucléico ribossomal

SBTI : inibidor de tripsina da soja
SDS: dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

TAG: triacilgliceróis

Tampão TBE: Tris-Borato-EDTA

Tampão TE: Tris-EDTA

Tampão SET: salina-EDTA-Tris

TLCK: 1-cloro-3-tosilamido-7-amino-2-heptanona

T-RFLP: reação de polimorfismo de fragmentos de restrição terminal

Tris: Tris (hidroximetil) amino metano

UFC: unidade formadora de colônia

RESUMO

VISÔTTO, Liliâne Evangelista, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2007. **Contribuição da microbiota bacteriana para o processo digestivo e desenvolvimento da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*) e caracterização de bactérias proteolíticas associadas ao seu trato intestinal.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-orientadores: Andréa de Oliveira Barros Ribon, Raul Narciso Carvalho Guedes e Joel Antônio de Oliveira.

Interações entre bactérias intestinais e insetos têm sido extensivamente estudadas em alguns sistemas, como cupins e afídeos. Entretanto, pouco é conhecido sobre a associação entre bactéria e Lepidoptera, uma das ordens que compreende os principais insetos fitófagos, responsáveis por grandes perdas na agricultura. Alguns autores acreditam que devido à ausência de estruturas especializadas e ao trânsito alimentar rápido no trato intestinal de Lepidopteras, os microrganismos contribuam pouco com a nutrição e digestão desses insetos. Enquanto outros sugerem que a microbiota fornece nutrientes e contribui com o metabolismo desses insetos. Essas divergências fazem com que estudos da funcionalidade da microbiota associada às Lepidopteras tenham um interesse particular. Portanto, a lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) torna-se um modelo interessante para estudos dos processos fisiológicos envolvidos nessa associação. Neste contexto, esse trabalho buscou compreender melhor se a microbiota afeta as atividades das enzimas hidrolíticas do intestino de *A. gemmatalis*, bem como os seus parâmetros biológicos de desenvolvimento. Tetraciclina, cloranfenicol e uma combinação desses dois antibióticos mais ampicilina foram incorporadas à dieta artificial em cinco doses específicas (0; 30; 40; 50; 60 e 70 µg/mL). Larvas foram alimentadas durante seu ciclo até o instar pupal. O antibiótico mais eficiente na supressão do crescimento bacteriano foi a tetraciclina, que alcançou uma inibição substancial nas doses testadas. Análises microscópicas mostraram que o intestino de *A. gemmatalis* criadas com dieta controle, possui uma abundante microbiota, porém com pouca diversidade. Poucas bactérias foram visualizadas no lúmen de larvas alimentadas com tetraciclina 70 µg/ mL, confirmando o resultado encontrado

pelo método convencional de plaqueamento. Atividades enzimáticas do extrato intestinal de larvas criadas com tetraciclina, sobre quatorze substratos mostraram que a redução da microbiota afetou significativamente a hidrólise de L-BApNA e tributirato ditiopropanol. A concentração que apresentou maior efeito inibitório da atividade foi tetraciclina 70 µg/ mL. Também foi realizada a análise do perfil enzimático ao longo do desenvolvimento pós-embrionário de larvas criadas com dieta controle e dieta com tetraciclina 70 µg/ mL. Observou-se um pico máximo de atividade proteásica, amidásica e lipásica entre os 4º e 6º instars em larvas com a microbiota intacta, enquanto um perfil constante foi verificado em larvas tratadas com tetraciclina. Tais resultados podem estar correlacionados a pupação prematura, a baixa emergência e o aumento da mortalidade em larvas com microbiota reduzida. Esses dados sugerem que a presença da microbiota exerce influência sobre o processo digestivo e desenvolvimento de *A. gemmatalis*, contribuindo possivelmente com a produção de proteases e lipases. Como houve influência na digestão protéica, bactérias cultiváveis com capacidade proteolítica presentes no trato intestinal foram isoladas, identificadas e caracterizadas. Todos os isolados foram Gram positivos e identificados como *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, *Enterococcus sp.* e *Staphylococcus sp.*. Análises das proteases de origem dos isolados foram realizadas utilizando diferentes substratos. Todas as bactérias foram capazes de degradar os substratos testados com eficiência, exceto *Staphylococcus sp.*. Os resultados advindos desse estudo, além de contribuir o conhecimento científico a respeito da interação Lepidoptera-microrganismo, servem como complemento para pesquisas futuras sobre implementação de novos métodos direcionados ao controle de pragas.

ABSTRACT

VISÔTTO, Liliane Evangelista, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2007. **Contribution of the bacterial microbiota to the digestive process and development of velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) and characterization of proteolytic bacteria associated with intestinal tract.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-Advisers: Andréa de Oliveira Barros Ribon, Raul Narciso Carvalho Guedes and Joel Antônio de Oliveira.

Interactions between intestinal bacteria and insects have been extensively studied in systems such as termites and aphids. However, little is known about the association between bacteria and the order Lepidoptera, which comprises major phytophagous insects that cause heavy agricultural losses. A number of authors believe that the lack of specialized structures and the rapid food transit in the intestinal tract of Lepidopteras may cause the little contribution of microorganisms to nutrition and digestion of these insects, whereas other authors suggest that the microbiota provides nutrients and contributes to insect metabolism. This difference raises particular interest in studies on functionality of microbiota associated with Lepidopteras. The velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), becomes therefore a suitable model for studies on physiological processes involved in the association. This work sought to examine whether the microbiota may affect hydrolytic enzyme activity in *A. gemmatalis* intestine, as well as developmental biological parameters. Tetracycline, chloramphenicol and a combination of these two antibiotics along with ampicillin were added to the artificial diet at five specific dose levels (0; 30; 40; 50; 60 and 70 µg/mL). Larvae were fed until reach pupal stage. Tetracycline was found to be the most efficient antibiotic for suppression of bacterial growth, with substantial inhibition at the tested doses. Microscopic analyses showed that the intestine of *A. gemmatalis* fed on control diet harbors abundant but not diverse microbiota. Few bacteria were found in the lumen of larvae fed on 70 µg / mL tetracycline, confirming the result found by the conventional plating method. Enzymatic activities of the intestinal extract from larvae fed on tetracycline, on fourteen substrates, showed that the reduction in microbiota significantly affected the hydrolysis of L-BApNA and dithiopropanol tributyrates. Tetracycline at the dose of 70 µg / mL produced

the largest inhibitory effect. Analysis of enzymatic profile was also carried out over the post-embryonic development of larvae fed on control diet and diet with 70 µg / mL tetracycline. Maximum proteolytic, amidolytic and lipase activities were found between the 4th and 6th instars in larvae presenting intact microbiota, whereas a constant profile was found in larvae fed on tetracycline. These results can be correlated with premature pupation, low emergence and increased mortality in larvae with reduced microbiota. The results suggest that the presence of microbiota exerts influence on the digestive process and development of *A. gemmatalis*, possibly contributing to protease and lipase production. Because protein digestion was affected, culturable bacteria showing proteolytic capacity were isolated from the intestinal tract, identified and characterized. All the isolates were Gram-positive and identified as *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp. and *Staphylococcus* sp.. Analyses of origin proteases from the isolates were carried out with different substrates. All bacteria were efficiently capable of degrading the tested substrates, except *Staphylococcus* sp.. These results, besides contributing to the scientific knowledge on the insect-microorganism interaction, serve as a complement to future research on new methods of pest control.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1. *Anticarsia gemmatalis* (Hübner 1818) (Lepidoptera: Noctuidae)

A. gemmatalis, vulgarmente conhecida por lagarta da soja, é um inseto cosmopolita, nativo das áreas tropicais e subtropicais do hemisfério ocidental sendo permanentemente encontrado nas Américas, desde o Canadá até a Argentina (FORD *et al.*, 1975). No Brasil, o inseto ocorre desde o sul de Goiás e Mato Grosso até o Rio Grande do Sul (PANIZZI *et al.*, 1977). A larva desta espécie é vulgarmente denominada nos EUA de “velvetbean caterpillar” devido aos vários desfolhamentos causados a *Stilozobium deeriugianum* Bort, conhecida como “velvetbean” (feijão veludo). No México ela é conhecida por “gusano terció pelo”, no Brasil é chamada de “lagarta-da-soja” e na Argentina é denominada “oruga das leguminosas” (FORD *et al.*, 1975).

Embora a soja esteja no topo da hierarquia de preferência alimentar de *A. gemmatalis*, a fase imatura do inseto é generalista e pode se alimentar de outras espécies de vegetais incluindo amendoim, kudzu (*Pueraria thunbergiana*), feijão de cavalo (*Cannavalia* sp), algodão (HINDS & OSTERBERGE, 1931), ervilha, erva daninha do café, folhas de trevo, arroz, (TARRAGÓ *et al.*, 1977) e pastagens (WILLE, 1943) dentre outras (WATERS & BARFIELD, 1989).

A lagarta da soja é um inseto desfolhador que começa a se alimentar da epiderme inferior e do mesófilo da folha. A partir do segundo ínstar, a lagarta já consegue se alimentar da folha inteira, chegando a promover a completa desfolhação da planta. O ciclo de vida da lagarta da soja se completa em cerca de quatro semanas durante o verão, tendo sua duração aumentada no outono. Os ovos são brancos, ligeiramente ovais, achatados na superfície inferior, com tamanho variando entre 1 e 2 mm de diâmetro. Os ovos apresentam suportes proeminentes para fixação ao substrato e são de cor branca no intervalo de tempo que precede a eclosão, quando se tornam rosados (WATSON, 1916). Pouco antes da eclosão podem apresentar coloração marrom-avermelhada (ELISOR, 1942). Os ovos colocados nos meses de temperaturas mais altas eclodem em cerca de três dias (ELISOR, 1942). WATSON (1916) relata que os ovos colocados no mês de novembro (época mais fria no Hemisfério Norte) têm um período de incubação de uma semana ou mais, o que pode torná-los

inviáveis. REID (1975) observou que os ovos que foram mantidos a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ eclodem em dois ou três dias. MOSCARDI *et al.* (1981) verificou o efeito da temperatura sobre a oviposição, eclosão de lagartas e a longevidade de *A. gemmatalis*. A fecundidade média variou de 310 ovos por fêmea a $32,2^{\circ}\text{C}$ a 842,16 ovos por fêmea a $26,7^{\circ}\text{C}$. Em temperaturas extremas, a fecundidade foi reduzida, sendo que as fêmeas mantidas a $21,1^{\circ}\text{C}$ apresentaram uma maior capacidade de postura do que as de $32,2^{\circ}\text{C}$. A porcentagem média de eclosão variou de 68,6% a $21,1^{\circ}\text{C}$ para 85,71% em temperaturas não controladas. Os valores obtidos a $21,1^{\circ}\text{C}$ foram significativamente baixos em relação às outras temperaturas. WATSON (1916) observou que *A. gemmatalis* faz postura isolada no lado abaxial das folhas de feijão veludo, sendo menos freqüente nas hastes e nos pecíolos, exceto quando a densidade de ovos é alta. GRENNE *et al.* (1973) verificaram que a postura é realizada durante a noite, sendo que o pico de oviposição ocorre entre 21 e 23 horas e que a postura é maior com o decréscimo da temperatura e o aumento da umidade, diminuindo à medida que o orvalho acumula-se na planta. Após a eclosão, as larvas recém-eclodidas se alimentam da casca dos ovos das quais eclodem (WATSON, 1916).

Em geral, o estágio larval de *A. gemmatalis* consiste de seis instares podendo variar de cinco a oito conforme a temperatura, idade da folha e hospedeiro nas quais o inseto se desenvolve (WATSON, 1916; REID, 1975; NICKLE, 1977). As lagartas criadas em temperaturas acima de $18,3^{\circ}\text{C}$ apresentaram de cinco a seis instares enquanto as que foram criadas em temperaturas inferiores apresentaram de seis a sete instares (REID, 1975).

As lagartas se diferem não só pelo seu tamanho como também por grandes diferenças morfológicas. As larvas de *A. gemmatalis* apresentam variado padrão de manchas e coloração durante todo o ciclo de desenvolvimento. A maioria das lagartas possui uma linha negra longitudinal e um grande número de linhas estreitas brancas, amarelas ou róseas (Figura 1). O primeiro instar tem duração de dois dias e a larva cresce de 2,5 mm a 6 ou 7 mm antes da muda. A cabeça é marrom clara, arredondada e bilobada. O corpo da lagarta é verde claro sem nenhuma mancha e faixa longitudinal e os prolegs do segmento abdominal 3 e 4 são menores do que os dos segmentos 5 e 6. No segundo instar, surge uma linha negra lateral e o primeiro e o

segundo par de prolegs abdominais estão cerca de 25 e 50% maiores que o terceiro par, respectivamente. A duração do segundo ínstar varia de 3 a 4 dias e a larva pode alcançar 9 mm de comprimento. O terceiro instar tem duração de dois dias e a lagarta pode ter 16 mm de comprimento. O quarto e o quinto instares duram entre 3 ou 4 dias e as lagartas alcançam 25 mm de comprimento. No sexto instar a lagarta chega a quase duplicar de tamanho, podendo medir 48 mm. O sexto instar dura cinco dias, completando 25 dias de ciclo larval. No estágio pré-pupal a larva tem seu tamanho reduzido para 25 mm de comprimento, apresentando coloração marrom com poucas linhas longitudinais, com duração de um dia (WATSON, 1916; GUYTON, 1940).



FIGURA 1- Lagarta da soja (Larva), *Anticarsia gemmatilis* (Hübner).

Fonte - http://www.bioteecnologia.com.br/bio/12_h.htm.

No primeiro dia, a pupa da *A. gemmatilis* apresenta coloração verde clara tornando-se marrom brilhante num período de 24 horas. A pupa é obtecta, apresenta textura lisa e mede de 18 a 20 mm de comprimento e de 4 a 6 mm de largura. No campo, as lagartas de *A. gemmatilis* empupam em uma profundidade de cerca de 2 cm da superfície do solo. A duração da fase de pupa varia de sete a 10 dias dependendo da estação do ano (WATSON, 1916). A mariposa adulta apresenta envergadura de 30 a 38 mm e possui asas com distribuição de cores variando de em padrões de cinza, marrom amarelado claro a marrom avermelhado escuro (Figura 2). Uma linha escura estende-se nas duas asas dianteiras e ficam evidentes quando as asas são estendidas. As

pontas das asas têm coloração marrom clara com uma linha de pontos claros próxima às margens (WATSON, 1916).



FIGURA 2 - Lagarta da soja (adulto) *Anticarsia gemmatalis*. (Hübner)

Fonte - <http://www.gaipm.org/top50/velvetbean.html>

As diferenças morfológicas entre os sexos foram descritas por GREENE (1973) baseando-se no comprimento e na forma das escamas das pernas do macho e da fêmea. GREENE *et al.* (1973) estudaram o acasalamento em condições de campo, comprovando a liberação do feromônio sexual pela fêmea como precursor da cópula. O pico de acasalamento ocorreu duas horas após o pôr-do-sol, diminuindo gradativamente dentro de 12 horas. LEPPLA (1976) estudou o acasalamento de *A. gemmatalis* em condições de laboratório ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$), observando que o pico de acasalamento ocorreu durante as primeiras 48 horas após emergências dos adultos, continuando em nível reduzido até o sexto dia. A postura iniciou-se no terceiro dia, com o pico de oviposição ocorrendo no quinto dia.

1.2. Enzimas digestivas de Insetos

Insetos são excelentes modelos para o estudo da função intestinal principalmente porque existem espécies adaptadas a quase todos os tipos de *habitat* e de hábitos alimentares. Além disso, o intestino é a maior interface entre o inseto e o ambiente. Portanto, é essencial o entendimento do processo digestivo para o desenvolvimento de métodos de controle biológico, como é o caso do uso de plantas transgênicas no controle de insetos fitófagos. A ocorrência de diferentes enzimas digestivas no canal digestivo de insetos é principalmente devida à composição química da dieta ingerida por eles. É possível que todos os insetos tenham enzimas digestivas complementares àquelas utilizadas primariamente, em quantidades relativas que mudam em resposta à composição da dieta (TERRA & FERREIRA, 1994).

Cerca de dois terços de todas as espécies de animais do mundo são da classe Insecta. Este fenômeno tem sido explicado pela habilidade que os insetos possuem em utilizar uma gama extensa de materiais orgânicos na sua nutrição (madeira, húmus, cera, sangue, seiva, tecidos animais e vegetais, etc). Além de digerirem materiais refratários (ex. madeira e cera), eles exploram recursos tóxicos não acessíveis a outros animais, como os inibidores de proteases. Essa capacidade digestiva depende das enzimas presentes e compartimentalizadas no intestino do inseto. Por possuírem estas habilidades, alguns podem ser classificados como pragas em culturas agrícolas, em estocagem de alimentos e grãos, das indústrias e da saúde humana (TERRA *et al.*, 1996).

A organização do processo digestivo depende da compartimentalização das enzimas digestivas e do fluxo do intestino médio que são responsáveis pela translocação das enzimas e produtos da digestão. Segundo TERRA *et al.* (1996), a digestão de polímeros dos alimentos (proteínas, amido, celulose e hemicelulose) no intestino dos insetos acontece em três fases:

- Fase Inicial – nesta fase ocorre diminuição da massa molecular dos polímeros através da ação de hidrolases, como tripsina, α -amilase, celulase e hemicelulase;

- Fase Intermediária – os oligômeros resultantes da primeira fase são hidrolisados em dímeros ou em dipeptídeos por hidrolases, tais como a α -amilase e aminopeptidase;

- Fase Final – ocorre na digestão final dos dímeros que são transformados em monômeros por hidrolases, tais como dipeptidases, maltase e celobiase.

Estes mesmos autores propuseram que a digestão inicial ocorre no espaço endoperitrófico, a digestão intermediária e a final ocorrem no espaço ectoperitrófico e nas células do intestino médio, respectivamente (Figura 3).

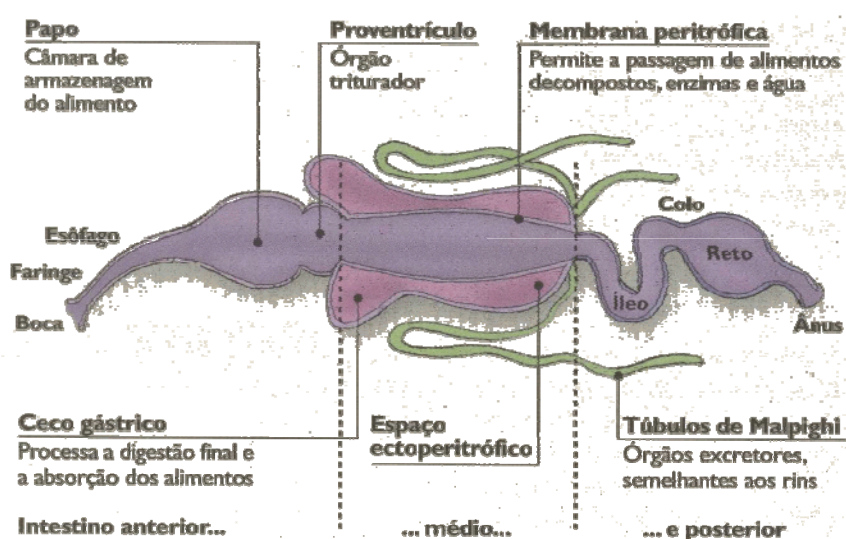


FIGURA 3- Representação esquemática dos compartimentos do intestino dos insetos. (TERRA *et al*, 2000).

Os mecanismos fisiológicos da digestão extra oral e o seu significado na organização dos processos digestivos de percevejos predadores foram avaliados com determinações de pH, temperatura, efeito de substratos, inibidores e parâmetros cinético-enzimáticos (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Isto permitiu concluir que as glândulas salivares de *P. nigrispinus* possuem enzimas hidrolíticas como amilase, lipase e tripsina-like com pronunciada atividade catalítica as quais estão, certamente, envolvidas no processo de predação zoofágica desse inimigo natural.

O intestino médio de Lepidopteras é alvo de vários estudos relacionados ao processo de digestão, mecanismo secretor de enzimas, caracterização de proteases digestivas, absorção e movimento de íons, pois várias espécies desta ordem são insetos de grande interesse econômico, pois atacam variedades de culturas comerciais, como cereais, algodão, leguminosas, dentre outros (TERRA *et al.*, 1994).

SANTOS *et al.* (1986) demonstraram que não existe digestão no intestino anterior em larvas de *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae). A digestão inicial ocorre no espaço endoperitrófico do intestino médio, a digestão intermediária e a final são realizadas por enzimas associadas ao glicocálice das células ou ligadas a membrana microvilar. Em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) foram encontrados resultados similares.

Dados obtidos com larvas de *Manduca sexta* (Sphingidae) mostraram que a atividade da tripsina é recuperada no lúmen do intestino médio anterior, sendo que a maioria do mRNA para tripsina é encontrada na porção mediana do intestino médio. Estes resultados levaram à proposição de que esta enzima é secretada por células da porção mediana do intestino médio e carregada pelo espaço ectoperitrófico para a porção anterior do intestino médio. Esta organização espacial do processo digestivo é provavelmente comum para a maioria das larvas, parecendo também ser similar em Lepidoptera adulta (TERRA *et al.*, 1996).

Os principais grupos de enzimas digestivas de insetos são constituídos pelas lipases, carboidrases e proteases, sendo este último o grupo melhor caracterizado.

1.2.1. Lipases

Lipídeos são importantes para insetos herbívoros como nutrientes e surfactantes intestinais, os quais facilitam a absorção dos nutrientes. Os glicero-fosfolipídeos e os fosfolipídeos das folhas (galactosil diglicerídeo, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e os fosfatidilgliceróis) são enzimaticamente hidrolisados no lúmen intestinal das larvas, sendo liberados resíduos de açúcar, glicerol, ácido fosfatídico, colina e etanolamina. Pouco é conhecido sobre as enzimas responsáveis. Esses componentes lipídicos liberados são absorvidos pelo epitélio do intestino médio para que ocorra a

nova síntese de di- e triglicerídeos, e liberação como diacilgliceróis para as lipoforinas, proteínas de transporte presentes na hemolinfa (CAMPBELL, 1990). Surfactantes presentes no lúmen intestinal solubilizam compostos lipofílicos através da redução da tensão superficial dos fluidos intestinais. Surfactantes produzidos por microrganismos têm sido isolados de intestino médio de alguns insetos, embora suas contribuições *in vivo* não tenham sido demonstradas (CAMPBELL, 1990).

Larvas se alimentam constantemente e esse comportamento somente é interrompido durante a metamorfose (ZIEGLER, 1985). Como resultado, o conteúdo dos corpos gordurosos aumenta de poucos miligramas para mais de 300 mg no final do estágio larval (FERNANDO-WARNAKULASURIYA *et al.*, 1988). Durante o período pupal, esses estoques de lipídeos são usados para ajudar na metamorfose e a mariposa adulta utiliza esses estoques na demanda de energia imposta na reprodução e vôo (ZIEGLER, 1991). Assim, a larva acumula reservas enquanto o adulto a consome. Durante o desenvolvimento, os corpos gordurosos mudam de tecido de reserva de lipídeos para um tecido de mobilização de lipídeos (TSUCHIDA & WELLS, 1988); entretanto, no presente não se tem informação sobre como essa profunda transição em condições metabólicas dos corpos gordurosos é regulada.

De acordo com ARRESE *et al.* (2001), são conhecidos poucos detalhes sobre o processo no qual ácidos graxos da dieta são digeridos e absorvidos dentro do intestino médio e então transportados para os corpos gordurosos para estocagem. Igualmente escasso é o conhecimento sobre como os ácidos graxos são mobilizados dos corpos gordurosos e transportados para os tecidos para utilização.

Uma das maiores funções do intestino médio é digerir lipídeos provenientes da dieta, e absorver e processar os produtos da digestão para exportar para a hemolinfa. O triacilglicerol é o mais abundante componente lipídico da dieta e dos estoques de ácidos graxos (TURUNEN & CRAILSHEIM, 1996).

Sabe-se que a lipase atua hidrolisando os ésteres de glicerol de ácidos graxos de cadeias longas (triacilgliceróis) em diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos livres. O processo digestivo tem sido caracterizado para sugerir

dois modelos de lipólise no lúmen do intestino médio, a completa hidrólise de triacilgliceróis (TAG) a ácidos graxos e glicerol (WEINTRAB & TIETZ, 1973, WEINTRAB & TIETZ, 1978; TSUCHIDA & WELLS, 1988) e a formação de ácidos graxos e monoacilglicerol (MAG) (HOFFMAN & DOWNER, 1979; MALE & STOREY, 1981). A lipase de triacilglicerol tem sido estudada somente em preparações brutas de algumas poucas espécies de insetos. A enzima libera ácidos graxos das posições 1 e 3 e mostra a preferência por ácidos graxos insaturados (WEINTRAB & TIETZ, 1973).

1.2.2. Carboidrases

Enzimas que são capazes de realizar a completa hidrólise dos carboidratos até monossacarídeos são denominadas carboidrases. Elas são classificadas de acordo com a especificidade do substrato. Duas amplas categorias distintas de carboidrases são conhecidas. Uma inclui as despolimerases, enzimas que clivam ligações internas nos polissacarídeos e usualmente possuem o nome do seu substrato específico, por exemplo, amilase, celulase e pectinase. Na segunda categoria estão incluídas as glicosidases, que são enzimas que hidrolisam oligossacarídeos e dissacarídeos.

1.2.2.1. Amilases

Três enzimas são conhecidas por hidrolisar preferencialmente ao longo de cadeias glicosídicas com ligações α -1,4 que ocorrem, por exemplo, no amido e no glicogênio. A α -amilase (EC 3.2.1.1) catalisa a endo-hidrólise das ligações de maneira aleatória, β -amilase remove unidades de maltose sucessivamente e glicoamilase remove sucessivas unidades de glicose a partir da extremidade não redutora da cadeia (TERRA & FERREIRA, 1994).

Muitos insetos dependentes de amido utilizam α -amilases para o metabolismo de carboidratos, liberando misturas de oligossacarídeos para produção de energia. Pela sua importância, diferentes formas de α -amilases podem ser encontradas em uma única espécie de inseto, para garantir um eficiente processo digestivo (BAKER, 1983). Além disso, como esses insetos são totalmente dependentes de α -amilases para sobreviverem, essas enzimas

são boas candidatas a alvo para biopesticidas usando inibidores de α -amilases (FRANCO *et al.*, 2002, SVENSSON *et al.*, 2003).

Inibidores de α -amilase são extensivamente encontrados em muitas sementes de plantas e em tubérculos, sendo particularmente abundantes em cereais e legumes (FRANCO *et al.*, 2002). Essas moléculas desempenham um papel fundamental contra pragas e patógenos, os quais causam grandes danos a plantações e grãos estocados. Ultimamente, inibidores de proteases e de α -amilases estão disponíveis como fonte genética para produção de culturas transgênicas resistentes a insetos (GATEHOUSE & GATEHOUSE, 1998).

1.2.2.2. Celulases

A digestão de celulose é realizada por uma mistura de enzimas com diferentes especificidades. O sistema mais conhecido consiste em três classes de enzimas: (1) exo- β -1,4-glicanases (atividade β -1,4-glicanocelobiohidrolase EC 3.2.1.91), as quais clivam unidades de celobiose nas cadeias finais não redutoras presentes na celulose cristalina; (2) endo- β -1,4-glicanases (EC 3.2.1.4), que clivam aleatoriamente ligações β -1,4-glicosídicas presentes nas cadeias de celulose e (3) β -1,4-glicosidases (celobiases, EC 3.2.1.21), responsáveis pela hidrólise de celobiose e pequenas oligocelodextrinas a glicose (TERRA & FERREIRA, 1994).

A digestão de celulose em insetos é rara, porque o fator da dieta que limita o crescimento dos herbívoros é a qualidade da proteína e não o tipo de carboidrato presente. Assim, a digestão de celulose é improvável por ser desvantajosa para o inseto que pode encontrar requerimentos nutricionais mais fáceis de serem digeridos. Entretanto, a digestão de celulose ocorre em vários insetos que se alimentam de dietas nutricionalmente pobres (CAMPBELL, 1990).

Acreditava-se que insetos eram dependentes de simbiontes para a digestão de celulose (MARTIN, 1983 e 1991), porém existem evidências de que insetos secretam enzimas capazes de hidrolisar celulose cristalina (SLAYTOR, 1992). Várias celulases de insetos têm sido purificadas e caracterizadas. O sistema de celulase de larvas de *Ergates faber* (Coleóptera:

Cerambycidae) foi demonstrado em três enzimas homogêneas. A enzima 1 (MM 25 KDa; pH ótimo 4,5) é uma típica $\text{exo-}\beta\text{-1,4-glicanase}$, enquanto que as enzimas 2 (MM 57 KDa; pH ótimo 5,2), a enzima 3 (MM 70 KDa; pH ótimo 5,2) são ativas contra celobiose, carboximetilcelulose e celulose cristalina (CHACARAS *et al.*, 1983). O papel dos simbiossitos de insetos que digerem celulose está se tornando controverso, embora acredita-se que organismos simbiossitos fixadores de nitrogênio estão certamente envolvidos com o aumento do valor nutritivo da dieta de muitos insetos.

1.2.2.3. Xilanases

Xilana é o segundo principal constituinte da fração hemicelulose presente na parede celular de plantas, depois da celulose. A xilana é constituída por uma cadeia principal de resíduos $\beta\text{-1,4-xilopiranosse}$, que é frequentemente substituída por unidades $\alpha\text{-arabinofuranose}$ e ácido metilglicurônico. Quando ingerido pelo inseto, esse complexo polissacarídico deve ser hidrolisado à monômeros de açúcar para a realização do metabolismo. A degradação da biomassa hemicelulolítica e a recaptura de carbono na natureza é resultado da ação de uma série de enzimas hidrolíticas que sequencialmente reduz o polímero de açúcar à pequenas unidades metabolizáveis. A principal enzima envolvida na clivagem da xilana é a $\text{endo-1, 4 } \beta\text{-xilanase}$ (EC 3.2.1.8) que é responsável pela clivagem aleatória das ligações glicosídicas internas ou em posições específicas. Essa especificidade posicional, análoga à das proteases, leva à hidrólise padrão de polímeros específicos até pequenos oligômeros (BRECCIA *et al.*, 1998).

Recentes estudos permitiram a construção de bibliotecas genômicas de DNA microbiano isolado de tratos intestinais de insetos das ordens Isoptera (termitas) e Lepidóptera (BRENNAN *et al.*, 2004). Essas bibliotecas foram avaliadas para genes que codificam proteínas com atividade de xilanase. Várias novas xilanases com seqüências primárias e novos domínios com funcionalidade desconhecida foram descobertos. A análise filogenética demonstrou uma distância considerável entre a seqüência dessas enzimas e outras xilanases conhecidas.

1.2.2.4. Pectinases

A pectina é um polissacarídeo ramificado constituído principalmente de polímeros de ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose. É um dos principais componentes da parede celular das plantas, o principal componente da lamela média e age como um cimento para agregar as células vegetais. As enzimas pécticas são enzimas capazes de hidrolisar a pectina e são produzidas por bactérias, fungos, leveduras, insetos, nematóides e protozoários. Essas enzimas são classificadas de acordo com sua atividade (SEARLE-VAN LEEUWEN *et al.*, 1992). Não existem relatos da presença de outras enzimas pécticas em insetos, somente de pectinases. As pectinases (Poligalacturonases, EC 3.2.1.15) ocorrem em Orthoptera, Hemiptera, Coleoptera, Diptera e Trichoptera (TERRA & FERREIRA, 1994).

Existem estudos relacionados a simbioses de insetos capazes de degradar pectina e outros carboidratos presentes nas plantas, contribuindo, dessa forma, para a nutrição do inseto. Como é o caso das formigas cortadoras de folhas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, que não são capazes de se alimentar da planta bruta, mas utilizam os nutrientes líquidos que saem das folhas que cortam como também dos fungos, *Leucoagaricus gongylophorus*, que elas cultivam. Esses fungos são capazes de degradar celulose, amido, xilana e pectina. A degradação da pectina separa as células da planta permitindo a invasão do tecido por esses fungos. Assim, as altas concentrações de pectinase e pectina degradada são, primariamente, utilizadas pelo fungo para degradar os tecidos das folhas e posteriormente liberar os nutrientes necessários para as formigas (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

1.2.2.5. Glicosidases

As α -glicosidases (EC 3.2.1.20) catalisam a hidrólise de resíduos não-redutores α -1,4- glicose de aril-glicosídicos, dissacarídeos ou oligossacarídeos. A denominação das glicosidases se baseia no monossacarídeo que doa o grupo redutor para a ligação glicosídica e a configuração (α ou β) dessa ligação (TERRA & FERREIRA, 1994).

As α -glicosidases já foram purificadas de várias ordens de insetos, como Hemiptera, Coleoptera, Hymenoptera, Díptera e Lepidoptera. Várias propriedades das α -glicosidases são similares entre as diferentes ordens,

como inibição pelo Tris, valores de MM que variam de 60 KDa – 80 KDa ou são múltiplos desses valores, sugerindo a presença de enzimas oligoméricas (ERTHAL *et al.*, 2004; TERRA & FERREIRA, 1994).

As β -glicosidases catalisam a hidrólise de resíduos não-redutores β -1,4-monossacarídeos de um determinado glicosídeo. Dependendo do monossacarídeo que será removido, a β -glicosidase é denominada de β -glicosidase, β -galactosidase, β -xilosidase e etc. Frequentemente, a mesma β -glicosidase é capaz de hidrolisar diferentes monossacarídeos presentes nos glicosídeos. Nesse caso, o nome β -glicosidase é usado para todas as enzimas que removem a glicose com eficiência. As β -glicosidases de insetos são divididas dentro de três classes, baseadas na especificidade de seus substratos. A classe 1 inclui enzimas com atividade glicosil β -glicosidase e aril β -glicosidase, que são ativas sobre celobiose, NP β Glu, NP β Gal e lactose. A classe 2 inclui enzimas que possuem somente atividade glicosil β -glicosidase, por exemplo, aquelas que apenas hidrolisam celobiose e lactose com eficiência. Finalmente, a classe 3 que é composta por enzimas com atividade aril β -glicosidase, que atuam somente sobre NP β Glu e substratos similares (ERTHAL *et al.*, 2004; TERRA & FERREIRA, 1994).

1.2.3. Proteases

As proteases são responsáveis pela hidrólise de proteínas, agindo em ligações peptídicas. São classificadas dentro do grupo 3 (hidrolases), subgrupo 4. Elas também são classificadas com base em três critérios: (1) tipo de reação catalizada, (2) natureza química do sítio catalítico e (3) relação evolucionária de acordo com a estrutura (BARETT, 1994).

As proteases são subdivididas em dois principais grupos, exopeptidases e endopeptidase, dependendo do seu sítio de ação. As exopeptidases clivam as ligações peptídicas próximas do grupamento amino ou carboxi terminal no substrato, enquanto as endopeptidases clivam ligações peptídicas distantes do grupo terminal do substrato. Baseado no grupo funcional presente no sítio ativo, as proteases são classificadas dentro de quatro grupos, serino proteases, aspartil proteases, cisteíno proteases e metalo proteases (RAO *et al.*, 1998).

1.3. Proteases de insetos

As proteases digestivas de insetos catalisam a produção de peptídeos e aminoácidos de uma dieta protéica e são encontradas na região do intestino médio do trato digestivo dos insetos. As serino proteases são as enzimas mais estudadas, sendo seus representantes mais conhecidos a tripsina e a quimiotripsina e participam de uma grande diversidade de processos fisiológicos que incluem, além da digestão, ativação de proteínas específicas, como nas cascatas de coagulação, no sistema imune de insetos e plantas (WILSON *et al.*, 1997), desenvolvimento e produção de peptídeos biologicamente ativos (GILL *et al.*, 1996).

Dentro das serino proteases, tripsinas e quimiotripsinas são as enzimas mais encontradas. As tripsinas clivam, preferencialmente, as cadeias protéicas no lado carboxila dos aminoácidos básicos, como arginina e lisina. Essa enzima é inibida por TLCK, que promove a alquilação da histidina. O valor da massa molecular de tripsinas varia entre 20 e 35 KDa e seus valores de pI estão entre 4 - 5. Seu pH ótimo é alcalino, entre 8 e 9 (MARES-GUIA & SHAW, 1965). Contudo, as tripsinas isoladas de Lepidopteras possuem um pH ótimo maior do que os valores de pH encontrados nos intestinos médios de outros insetos (LEMOS *et al.*, 1992).

As atividades de enzimas tripsina-like são amplamente estudadas em várias espécies de Lepidoptera e diversas ordens como Coleoptera, Auchenorrhyncha, Blattodea e Diptera (MUHARSINI *et al.*, 2001; FOISSAC *et al.*, 2002; WAGNER *et al.*, 2002; LOPES & TERRA, 2003, OLIVEIRA *et al.*, 2005; XAVIER *et al.*, 2005). Algumas de suas propriedades assemelham-se às tripsinas de vertebrados. No entanto, determinadas características da tripsina de insetos contrastam com as tripsinas de vertebrados, como pH ótimo, peso molecular, sensibilidade a íon, ponto isoelétrico e sensibilidade aos inibidores de proteases da planta. Foi verificado que os íons cálcio não causaram aumento da atividade ou da estabilidade nas tripsinas de insetos e que elas são instáveis em pH ácido (SAKAL *et al.*, 1988). O efeito de íons cálcio foi avaliado na atividade de protease presente no intestino médio de *A. gemmatilis*, onde foi observado um aumento de atividade na presença de 10 -

30 mM de CaCl_2 (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Em vertebrados o íon cálcio impede a agregação de moléculas da enzima, protegendo-a da autólise e desnaturação por calor, induzindo uma mudança conformacional em sua estrutura para uma forma mais compacta, a qual é necessária para a atividade catalítica (SIPOS & MERKEL, 1970).

Estudos realizados em larvas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) e em *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae) sobre o efeito de íons cálcio na atividade de tripsina em presença de EGTA e/ou EDTA, quelantes de cálcio, demonstraram que esta enzima sofreu pequena queda em sua atividade (5%) (LEE *et al.*, 1995; WAGNER *et al.*, 2002). Esse resultado sugere que o cálcio talvez possa ter uma função na enzima desses insetos, provavelmente, como co-fator.

OLIVEIRA *et al.* (2005) purificaram parcialmente a enzima tripsina-like de *A. gemmatalis*. A fração parcialmente purificada mostrou três bandas com atividade proteolítica e massas moleculares de 66 KDa, 71 KDa e 91KDa em gel SDS-PAGE. Ensaio de especificidade enzimática, usando sete peptídeos sintéticos contendo 13 resíduos de aminoácidos com diferença somente no 5º resíduo foram realizados, tendo tripsina e quimiotripsina como controle. Somente os peptídeos contendo os aminoácidos lisina e arginina (específicos para tripsina) foram clivados por ambas, tripsina e enzima parcialmente purificada. Esses resultados demonstraram que o intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* possui uma serino protease tripsina-like.

XAVIER *et al.* (2005) identificaram e caracterizaram proteases ligadas à membrana, presentes no intestino médio de *A. gemmatalis*. Seus resultados demonstraram que o extrato enzimático insolúvel foi capaz de hidrolisar a caseína e os substratos sintéticos L-BAPNA e L-TAME. Usando L-BAPNA como substrato, a atividade foi investigada na presença de vários inibidores de proteases. Assim, EDTA, PMSF, TLCK, benzamidina e aprotinina, foram todos capazes de inibir a atividade, com maior efeito de inibição observado com o uso de TLCK e benzamidina. De acordo com estes resultados, concluiu-se que o intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* possui tripsina-like ligada à membrana. Com o propósito de caracterizar melhor a atividade tripsina-like, foi determinada a atividade ótima para o extrato insolúvel. O pH ótimo usando L-

BApNA e L-TAME foi 8,5 e 8,0, respectivamente, e a temperatura ótima foi de 50 °C para ambos substratos. O efeito de cálcio na atividade foi investigado usando L-BApNA como substrato. A atividade máxima foi obtida na concentração de 20 mM de cálcio. Valores de K_{Mapp} para L-BApNA e L-TAME foram de 0,23 mM e 95,4 μ M, respectivamente.

Múltiplas isoenzimas de tripsinas têm sido reconhecidas e o seqüenciamento da multifamília de genes codificadores de tripsinas de insetos tem recebido recente atenção (MAZUMDAR-LEIGTON *et al.*, 2000; MAZUMDAR-LEIGTON *et al.*, 2001; DE LEO *et al.*, 2001). As proteases induzidas explicam o desenvolvimento da resistência do inseto aos inibidores de proteases presentes em plantas nativas ou transgênicas (JOGSMA *et al.*, 1995; BROADWAY, 1995, 1996; BROWN *et al.*, 1997; BRITO *et al.*, 2001).

As quimiotripsinas são serino proteases, tripsina-like, que clivam proteínas nos grupos carboxilas presentes nos aminoácidos aromáticos. A quimiotripsina é inibida por TPCK, o qual reage na histidina. A atividade da quimiotripsina é baixa no intestino médio de Lepidoptera. A massa molecular varia de 20 a 30 KDa e seu pH ótimo varia entre 8-9 (TERRA *et al.*, 1994).

A quimiotripsina de Lepidoptera possui uma atividade baixa, o que explica o fato dela ter sido caracterizada com detalhes somente em *Pieris brassicae*. A quimiotripsina dessa Lepidoptera possui um pH ótimo maior, pH 10, sua massa molecular é de 32 KDa e foi inibida eficientemente por DFP e SBTI (LECADET & DEDONDER, 1966). A seqüência da quimiotripsina-like de *Vespa orientalis* foi determinada e mostrou semelhança com a de quimiotripsina de vertebrados (JANY *et al.*, 1983). Ela também age sobre o glucagon e insulina, de maneira similar à quimiotripsina de vertebrados (BAUMANN, 1990). Entretanto possui algumas propriedades diferentes, como sua instabilidade a pH ácido e sua forte inibição por SBTI (SAKAL *et al.*, 1988).

Cisteíno-proteases são enzimas proteolíticas que agem via ataque nucleofílico do ânion sulfeto, no sítio ativo, à ligação peptídica (KUNAKBAEVA *et al.*, 2003). O sítio ativo de uma cisteíno protease é composto por um resíduo de cisteína, um de asparagina e um de histidina na tríade catalítica. O ataque nucleofílico do grupo tiol da cisteína ao carbono da carbonila do substrato, resulta num intermediário tetraédrico. Uma ligação covalente acil-enzima é

formada após a clivagem da ligação peptídica. A hidrólise do acil-enzima leva à regeneração da enzima livre (BAIRD *et al.*, 2006).

1.4. Inibidores de Proteases

É postulado que os inibidores de proteases atuam no mecanismo de defesa de plantas contra ataque de insetos e patógenos. Foi demonstrado em plantas de tomate que quando ocorrem ferimentos em folhas, ocorre rapidamente síntese de inibidores de proteases no local do ferimento (resposta local), como também em folhas mais distantes (resposta sistêmica) (FARMER & RYAN, 1992). Isto também já foi observado por VIEIRA *et al.*, (2001); SILVA *et al.*, (2002) e FORTUNATO *et al.*, (2004 e 2007) utilizando plantas de soja.

Diversos compostos identificados em plantas que podem regular a expressão dos genes que codificam os inibidores de proteases são induzidos por ferimentos; dentre eles estão oligouronídeos, ácido abscísico, metil jasmonatos, ácido jasmônico e a sistemina. Os inibidores de proteases representam cerca de 6% das proteínas presentes no grão de soja (BRANDON *et al.*, 1987)

Os inibidores de proteases exercem uma importante função de defesa das plantas (RYAN, 1990). Os inibidores têm efeito de proteger as plantas contra danos causados por vários tipos de pragas agrícolas, inibindo significativamente atividades proteolíticas no intestino dos insetos (HILDER *et al.*, 1987). Danos causados em folhas de tomateiro por insetos mastigadores ou por outros meios mecânicos resultam numa rápida ativação transcricional de inibidores de proteases. O modelo proposto por FARMER & RYAN (1992) para genes que codificam inibidores de proteases em tomateiro mostra que um sinal sistêmico é aparentemente necessário para a indução desses genes de defesa.

Foi demonstrado o aumento de inibidores de proteases nas folhas ao provocar estresse biótico e abiótico na soja, tais como, ferimento mecânico (VIEIRA *et al.*, 2001), infecção pelo agente causador do cancro da haste (SILVA, *et al.*, 2001), pulverização com ácidos graxos (BATISTA *et al.*, 2002 a e b), ataque por *A. gemmatilis* (SILVA *et al.*, 2002; FORTUNATO *et al.*, 2004 e

2007), pulverização com ácido jasmônico (OLIVEIRA *et al.*, 2002), ataque por mosca-branca (SILVA, *et al.*, 2004), retirada de primórdios florais (FERREIRA *et al.*, 2004, 2005).

Existem quatro famílias de inibidores de proteases que atuam sobre serino, cisteíno, metalo ou aspartil proteases (XAVIER-FILHO & CAMPOS, 1989). As mais estudadas são aquelas capazes de inibir as serino proteases, tripsina e quimiotripsina, enzimas encontradas majoritariamente em insetos da ordem Lepidoptera (TERRA & FERREIRA, 1994) e aqueles que inibem cisteíno proteases comumente encontrados em insetos da ordem Coleoptera (TERRA & FERREIRA, 1994; MATSUMOTO *et al.*, 1997; KOIWA *et al.*, 2000).

Geralmente os inibidores se associam fortemente com as enzimas que eles inibem, com constante de associação da ordem de 10^7 a 10^{14} M^{-1} . Esta relação é do tipo competitiva, abolindo todas as atividades da enzima cognata (LASKOVSKI & KATO, 1980).

Tem sido sugerido que a ingestão de inibidores enzimáticos não elimina a digestão proteolítica no intestino médio dos insetos, mas em vez disto resulta na hiperprodução de enzimas proteolíticas. O efeito adverso ocorre de acordo com a ingestão crônica de inibidores, o que resulta na hiperprodução perniciosa de proteases alimentares, levando à limitação de aminoácidos essenciais para a síntese protéica, e conseqüentemente, redução do crescimento e do desenvolvimento do inseto (BROADWAY & DUFFEY, 1986; BROADWAY, 1995).

PILON *et al.*, (2006) estudaram a determinação da digestibilidade e dos efeitos no crescimento e desenvolvimento de larvas de *A. gemmatilis*, assim como a avaliaram a atividade das proteases digestivas presentes no intestino médio da lagarta, quando alimentadas com o inibidor de tripsina benzamidina nas concentrações 0; 0,25; 0,50 e 0,75 (% p/p de dieta artificial). Foi verificado que a adição de benzamidina alterou significativamente a digestibilidade do alimento protéico. Tal alteração está correlacionada com impactos negativos ocasionados na fase larval desse inseto, tais como aumento do ciclo larval, diminuição de ganho de peso e aumento da mortalidade. Foi verificado também, que tanto a atividade proteolítica quanto a atividade amidásica apresentaram maiores índices em lagartas de 5º instar. A presença do inibidor

alterou os perfis de atividades, sugerindo que os insetos, após a ingestão de altas doses de inibidores de proteases, podem apresentar respostas de defesa através da hiperprodução de proteases sensíveis à benzamidina e/ou síntese de proteases insensíveis ao inibidor. Portanto, estes dados sugerem que estudos aprofundados do conjunto de proteases presentes na lagarta são necessários, para que a utilização de inibidores de protease possa ser uma estratégia promissora no controle de *A. gemmatilis*.

A transferência de genes pode ser considerada como um passo crucial no desenvolvimento de plantas resistentes a insetos, juntamente com vários resultados positivos em plantas transgênicas resistentes a pragas via expressão de genes de inibidores de proteases (HILDER *et al.*, 1987; DUAN *et al.*, 1996; GATEHOUSE *et al.*, 1998).

A utilização de genes que codificam inibidores de enzimas digestivas para a obtenção de plantas resistentes contra o ataque de insetos é uma estratégia promissora. Entretanto, para que isto ocorra é necessário que selecione estes inibidores levando-se em consideração a fisiologia do inseto e a bioquímica de sua digestão (FRANCO *et al.*, 2002). Neste sentido, os inibidores de proteases apresentam grande potencial por reduzirem ou impedirem a atividade das enzimas digestivas dos insetos, causando-lhes desnutrição e redução do desenvolvimento, podendo chegar até à morte.

1.5. Microbiota bacteriana de insetos

Para melhor compreensão sobre a bioquímica e fisiologia de insetos, é necessário também que eles sejam estudados dentro de um contexto ecológico juntamente com os microrganismos, sendo estes importantes componentes do sistema (STEINHAUS, 1960). A microbiota intestinal representa todo aspecto da relação microbiana, tanto de patógenos como de mutualismo obrigatório. Os primeiros estudos realizados sobre simbiose inseto-bactéria consideraram apenas a relação entre inseto e microrganismo patogênico e a conseqüente produção de inseticidas microbianos. Recentes

pesquisas no campo da endossimbiose têm enfatizado a relação de como os microrganismos interagem com os insetos (DILLON & DILLON, 2004).

Os insetos apresentam uma grande variação em espécies, habitat, dieta e características estruturais de seus sistemas digestivos, fatores que afetarão a composição de suas microbiotas gastrintestinais (STEVENS & HUME, 1998). Microrganismos desempenham um importante papel no crescimento e desenvolvimento de muitas espécies de insetos. Simbiontes contribuem para reprodução, digestão, nutrição e produção de feromônio (CAMPBELL, 1990; DASCH *et al.*, 1984). Relações simbióticas entre insetos e suas bactérias intestinais têm sido estudados extensivamente em muitos sistemas, particularmente em termites e afídeos, os quais se alimentam da madeira e do floema, respectivamente (BREZNAK & BRUNE, 1994). Entretanto, pouco é conhecido sobre a microbiota em outros grupos de insetos, principalmente aqueles que se alimentam de folhagens.

A quantidade de microrganismos que habitam o intestino humano (10^{14}) excede o das células somáticas e germinativas do organismo (10^{13}) e essa microbiota realiza uma atividade metabólica equivalente ao fígado humano (BERG, 1996). Muitas espécies de insetos também são habitadas por uma grande comunidade de microrganismos. Embora haja uma enorme variação no número de microrganismos colonizadores de insetos, é provável que a maioria dessas espécies abrigue uma microbiota que excede o número de suas próprias células (DASCH *et al.*, 1984).

Existem poucos estudos sobre o papel funcional da microbiota digestiva dos insetos. Assim, a função da microbiota normal dos insetos, comparada à dos seus patógenos obrigatórios, é pouco explorada. O que explica em parte, uma das dificuldades no reconhecimento dos benefícios dessa relação (DILLON & DILLON, 2004).

Relações descritas entre insetos e sua microbiota associada têm sido um desafio porque muitos dos microrganismos associados não são prontamente cultiváveis. A utilização de métodos independentes de cultura, como 16S rRNA – DGGE (HUI, *et al.*, 2006; REESON *et al.*, 2003; SCHABEREITER-GURTNER *et al.*, 2003), RAPD (DE VRIES *et al.*, 2001), PCR-RFLP (LI *et al.*, 2005), T-RFLP (MINKLEY, *et al.*, 2006, EGERT, *et al.*,

2005) hibridização in situ (BERCHTOLD *et al.*, 1999; DOMINGO *et al.*, 1998) e outros, fornecem uma oportunidade de detectar e classificar microrganismos que não podem ser cultivados pelos métodos existentes.

Em *Apis mellifera*, os ovos, pupas e abelhas operárias ao emergirem como adultos são usualmente livres de bactérias (GILLIAM, 1997). Os adultos adquirem uma microbiota bacteriana intestinal pelo intercâmbio de alimento com outros indivíduos na colônia e através do consumo de pólen. Os microrganismos da microbiota de insetos - notadamente espécies de *Bacillus* - são importantes para a conversão do pólen estocado em alimento para as abelhas operárias, bem como para complementação e preservação do alimento, sintetizando aminoácidos, vitaminas, ácidos graxos, enzimas e substâncias antimicrobianas, além de protegerem a saúde da colônia pela produção de antibióticos (GILLIAM, 1997).

Devido aos hábitos alimentares de dípteros adultos na natureza, a ingestão de bactérias é inevitável. Dependendo das relações que esses insetos possam ter desenvolvido com seus microrganismos, as bactérias poderão ou não serem transmitidas às larvas, seja via contaminação dos ovos ou do seu substrato alimentar no ato da oviposição. Ainda que as larvas tenham herdado bactérias intestinais de suas progenitoras e que estas tenham se estabelecido em seu trato alimentar, a microbiota intestinal será continuamente renovada com a alimentação do inseto adulto na natureza (GILLIAM, 1997).

A microbiota que tem sido alvo de estudos é a do trato digestivo de *Lutzomyia longipalpis* (Díptero), do grupo dos flebotomíneos é associada à transmissão de *Leishmania* spp que são agentes etiológicos de diversas formas de leishmaniose (OLIVEIRA, *et al.*, 2000). Os flebotomíneos, tanto os machos como as fêmeas, alimentam-se de açúcares, provenientes de várias fontes, como folhas, frutos e secreções de afídeos, possibilitando a ingestão de microrganismos. As fêmeas de algumas espécies procuram proteínas adicionais, como o sangue de vertebrados ou fluidos do corpo de outros insetos (OLIVEIRA, *et al.*, 2001).

A importância prática do estudo da composição da microbiota bacteriana de *L. longipalpis*, assim como de outros insetos hematófagos,

reside no fato destes poderem ser importantes fontes de infecções tanto para animais quanto para humanos. A presença de bactérias potencialmente patogênicas em seus tratos digestivos representaria um risco de contaminação no momento da alimentação (OLIVEIRA, *et al.*, 2001).

Muitos dos microrganismos ainda não detectados devido a limitações técnicas podem ser membros de associações importantes no trato digestivo de cupins. Em cupins, a espécie em que a microbiota intestinal é a mais bem estudada é a *Reticulitermes flavipes*. Estudos desenvolvidos com essa espécie, empregando técnicas de biologia molecular para detecção de microrganismos, mostram que a comunidade microbiana de seu trato intestinal apresenta uma alta diversidade de nichos. Isto corresponde a uma grande diversidade de espécies de microrganismos ocupando o ecossistema intestinal de *R. flavipes*. Os principais grupos bacterianos já detectados, havendo considerável diversidade de microrganismos, são bactérias pertencentes aos grupos dos *Enterococcus* e *Lactococcus*, incluindo espécies de *Desulfovibrio*. Contudo, faltam ainda maiores informações quanto à identificação de espécies potencialmente importantes do ponto de vista nutricional e funcional para esses insetos (BRUNE *et al.*, 1995; THOLEN *et al.*, 1997; HONGOHO *et al.*, 2003).

1.6. Fatores que influenciam a colonização microbiana do trato intestinal de insetos

A diversidade da microbiota está relacionada em parte com estruturas especializadas presentes no intestino e com o efeito de pH, condições redox, enzimas digestivas presentes e tipo de alimento ingerido pelo inseto (DILLON & DILLON, 2004). Algumas considerações foram feitas a respeito da estrutura e compartimentalização do trato digestivo de insetos. Observou-se que insetos que apresentavam estruturas mais complexas tinham uma ampla variedade microbiana, quando comparados com insetos cuja estrutura intestinal era mais simples (TANADA & KAYA, 1993).

O pH e o potencial redox são importantes fatores selecionadores para algumas espécies bacterianas. A maioria das bactérias tem um pH ótimo para o crescimento na faixa de 6 – 7, porém existem numerosas exceções, incluindo

bactérias lácticas que podem crescer em pH ácido (SHANNON *et al.*, 2001). Microrganismos aeróbios estritos crescem somente em ambientes com potencial redox positivo e anaeróbios em potencial redox negativo. Múltiplas adaptações têm surgido no intestino dos insetos para capacitá-los a digerir eficientemente suas dietas e importantes variações no pH e potencial redox fazem parte dessa adaptação (DILLON & DILLON, 2004). Algumas bactérias ácido-tolerantes criam seu próprio ambiente com pH baixo, através da produção de ácidos, tais como ácido láctico produzido por *Enterococcus* no intestino de *Lymantria dispar* (BRODERICK *et al.*, 2004).

Compostos secundários de plantas têm propriedades antimicrobianas e juntamente com o pH do intestino alteram a composição da microbiota e particularmente favorecem espécies que são capazes de destoxificar esses compostos tóxicos. De fato, é através dos taninos derivados da dieta que ocorre a alteração da composição bacteriana intestinal em larvas de *Acentria ephemerella*, um herbívoro aquático (WALENCIAK *et al.*, 2002).

1.7. Importância da microbiota bacteriana de insetos

Uma das características mais comuns do sistema digestivo de uma ampla gama de espécies de animais vertebrados e invertebrados é a presença de microrganismos simbioses. Os microrganismos intestinais contribuem na digestão dos alimentos, na produção de vitaminas essenciais para o hospedeiro e na defesa contra a patogênese bacteriana, por meio de competição com organismos que compartilham nutrientes e sítios de anexação (DILLON & DILLON, 2004).

1.7.1. Função nutricional da microbiota

As contribuições nutricionais da microbiota intestinal podem ocorrer de várias formas, como a melhoria da habilidade de viver em condições de dietas subótimas, o aumento da eficiência da digestão, a aquisição de enzimas digestivas e o abastecimento de vitaminas. Contribuições nutricionais estão bem estabelecidas entre o endossimbionte *Buchnera sp.* e afídeos (ADAMS & DOUGLAS, 1997; DOUGLAS *et al.*, 2001). A bactéria simbiote *Buchnera sp.* fornece aos afídeos aminoácidos essenciais e nutrientes que são ausentes em

sua dieta. Vários trabalhos realizados com cupins reportaram que microrganismos associados ao trato digestivo de diversas espécies desses insetos são essenciais para sua sobrevivência, por serem fontes potenciais de enzimas que degradam celulose e lignina, fornecendo aos seus hospedeiros glicose e ácidos graxos que serão utilizados como fonte de energia (EUTICK *et al.*, 1978; SCHULTZ & BREZNAK, 1978; BRUNE & FRIEDRICH, 2000; TANADA *et al.*, 2006). As espiroquetas fornecem carbono, nitrogênio e a energia necessária para a nutrição de cupins via acetogenese e fixação de nitrogênio (OHKUMA *et al.*, 1999; BRAUMAN *et al.*, 2001; BREZNAK *et al.*, 2002). Além disso, os próprios microrganismos podem servir como fonte de alimento para seus hospedeiros (BREZNAK *et al.*, 1994; SLAYTOR *et al.*, 1997; MINKLEY *et al.*, 2006).

Além do mais, microrganismos possuem propriedades metabólicas que estão ausentes nos insetos e devido a isso eles agem como “microrganismos corretores”, capacitando insetos fitófagos a superar suas barreiras bioquímicas (DOUGLAS, 1998). Alguns microrganismos destoxificam aleloquímicos presentes nas plantas, tais como flavonóides, taninos e alcalóides (BHAT *et al.*, 1998). Degradação microbiana de compostos aromáticos da planta pode ocorrer no trato intestinal de cupins e pode contribuir com requerimento de carbono e energia para o hospedeiro (BRUNE *et al.*, 1995). Enzimas digestivas de alguns insetos podem ser derivadas da microbiota, porém existem poucos estudos que mostram contribuição da produção de hidrolases pelos microrganismos (DILLON & DILLON, 2004).

1.7.2. Resistência à colonização

A principal função benéfica da microbiota intestinal residente em humanos e animais domésticos é sua habilidade de resistir a colonização do intestino por espécies não residentes, incluindo patógenos e, conseqüentemente, prevenir infecções entéricas (BERG, 1996). Microrganismos residentes em alguns insetos têm sido suprimidos por agentes antimicrobianos e comparados com outros insetos que contêm uma microbiota intacta. Larvas de Lepidoptera *Homona magnanima* criadas assepticamente, mantiveram um crescimento 20 vezes maior de *Bacillus thuringiensis* do que larvas criadas em ambientes não assépticos, o que sugere que as bactérias

intestinais influenciam o crescimento de microrganismos patogênicos nas larvas (TAKATSUKA *et al.*, 2000). *Schistocerca gregaria* germ-free foram alimentados com dieta adicionada de *Serratia marcescens*, uma bactéria patogênica de insetos (DILLON *et al.*, 2005). Os resultados mostraram que a densidade de *S. marcescens* encontrada em insetos germ-free foi cinco vezes maior do que em insetos controle, sugerindo que a microbiota intestinal de *S. gregaria* fornece proteção contra o estabelecimento de patógenos no intestino do hospedeiro.

1.7.3. Interações Multitróficas

Alguns insetos seqüestram componentes da planta para serem usados diretamente como componentes de feromônios ou produzem modificações nos precursores da sua dieta (TILLMAN, *et al.*, 1999).

Existem evidências que compostos metabólicos produzidos por algumas bactérias intestinais de lepidópteras estão envolvidos na síntese de produtos importantes nas interações multitróficas. Insetos que se alimentam de plantas são conhecidos por desencadear várias respostas sistêmicas na planta. Uma dessas respostas é a emissão de compostos voláteis que atraem predadores contra seus herbívoros (ARIMURA *et al.*, 2000). N-acilaminoácidos são amplamente encontrados nas secreções orais de insetos, conhecidos por serem indutores da biossíntese de compostos voláteis em plantas. Alguns trabalhos consideram que bactérias presentes no trato digestivo de larvas de *Spodoptera littoralis* estão envolvidas na síntese de N-acilaminoácidos, sugerindo assim que essas bactérias poderiam ser incluídas em outro nível trófico nos estudos das interações entre insetos, suas plantas hospedeiras e predadores (SPITELLER, *et al.*, 2000).

1.7.4. Transferência Gênica Bacteriana dentro do Intestino

As comunidades microbianas se adaptam através de várias transferências de genes e pela transconjugação entre cepas bacterianas presentes nos intestinos dos insetos, sendo essa adaptação importante tanto para os microrganismos quanto para o inseto hospedeiro (WATANABE *et al.*, 1998). O bacilo *Yersinia pestis* é encontrado na flora intestinal de pulgas. Estudos realizados com *E. coli* contendo plasmídeo de resistência a antibiótico,

mostraram que a transferência do gene para *Y. pestis* ocorreu no intestino médio da pulga após 3 dias de coinfecção, e 95% das pulgas coinfectadas continham *Y. pestis* transconjugantes resistentes a antibiótico após 4 semanas (HINNEBUSCH *et al.*, 2002).

1.7.5. Bactérias Intestinais Transgênicas no Biocontrole

Bactérias intestinais transgênicas são uma alternativa na estratégia de controle de insetos-praga e doenças, porém um estudo mais detalhado sobre a colonização, persistência e mecanismos de transmissão dessas bactérias é necessário antes da implementação dessa estratégia. Bactérias simbiontes de *Rhagoletis completa* foram modificadas via transformação para expressar proteínas transgênicas no intestino de moscas (PELOQUIN *et al.*, 2002). Bactérias residentes no intestino de *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) foram isoladas e testadas quanto a capacidade inseticida contra esse inseto (ERTÜRK & DEMIRBAG, 2006).

Esta Tese segue as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) com os seguintes capítulos:

- 1 Contribuição da microbiota bacteriana para o processo digestivo e desenvolvimento de *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae).
- 2 Caracterização de bactérias proteolíticas associadas ao trato intestinal de *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae).

2.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. & DOUGLAS, A.E. How symbiotic bacteria influence plant utilisation by the polyphagous aphid, *Aphis fabae*. *Oecologia*, 110: 528-532, 1997.

ARIMURA, G.; OZAWA, R.; SHIMODA, T.; NISHIOKA, T.; BOLAND, W. & TAKABYASHI, J. Herbivory-induced volatiles elicit defense genes in lima bean leaves. *Nature.*, 406: 512-515, 2000.

ARRESE, E.L.; CANAVOSO, L.E.; JOUNI, Z.E.; PENNINGTON, J.E.; TSUCHIDA & K.; WELLS, M.A. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 7-17, 2001.

BAIRD, I.R.; MOSI, R.; OLSEN, M.; CAMERON, B.R.; FRICKER, S.P.; SKERLJ, R.T. '3 + 1' mixed-ligand oxorhenium(V) complexes and their inhibition of the cysteine proteases cathepsin B and cathepsin K. *Inorganica Chimica Acta*, 359: 2736–2750. 2006.

BAKER, J.E.; Properties of amylases from midguts of larvae of *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus granaries*. *Insect Biochemistry*, 13: 421-428, 1983.

BARETT, A. J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods in Enzymology*, 244: 1-15, 1994.

BATISTA, R. B.; OLIVEIRA, M. G. A.; PIRES, C. V.; PIOVESSAN, N. D.; REZENDE, S. T. & MOREIRA, M. A. Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas à aplicação de ácidos graxos poliinsaturados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37 (11): 1517-1524, 2002 (a).

BATISTA, R. B.; OLIVEIRA, M. G. A.; PIRES, C. V.; GOMES, M. R. A.; JOSE, I. C.; PIOVESSAN, N. D.; REZENDE, S. T. & MOREIRA, M. A. Efeito da

aplicação foliar de ácidos graxos na via das lipoxigenases de plantas de soja. Química Nova, 25 (6A): 914-920, 2002 (b).

BAUMANN, E. Isolation and partial characterization of a chymotrypsin-like endoprotease from cockroach intestinal system. Insect Biochemistry, 20: 761-768, 1990.

BERCHTOLD, M.; CHATZINOTAS, A.; SCHONHUBER, W.; BRUNE, A. & AMANN, R. Differential enumeration and *in situ* localization of microorganisms in the hindgut of the lower termite *Mastotermes darwiniensis* by hibridization with rRNA-targeted probes. Archives of Microbiology, 172: 407-416, 1999.

BERG, R. D. The indigenous gastrointestinal microflora. Trends Microbiology, 4: 430-435, 1996.

BHAT, T.K.; SINGH, B. & SHARMA, O.P. Microbial degradation of tannins – a current perspective. Biodegradation, 9: 343-357, 1998.

BRANDON, D. L.; HAQUE, S. & FRIEDMAN, M. Interaction of monoclonal antibodies with soybean trypsin inhibitors. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 35: 195-200, 1987.

BRAUMAN, A.; DORÉ, J.; EGGLETON, P.; BIGNELL, D.; BREZNAK, J.A. & KANE, M.D. Molecular phylogenetic profiling of prokaryotic communities in guts of termites with different feeding habits. FEMS Microbiology Ecology, 35: 27-36, 2001.

BRECCIA, J. D.; SINEREZ, F.; BAIGORI, M. D.; CASTRO, G. R. & HATTI-KAUL, R. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. Enzyme and Microbial Technology, 22: 42-49, 1998.

BRENNAN, Y.; CALLEN, W. N.; CHRISTOFFERSEN, L.; DUPREE, P.; GOUBET, F.; HEALEY, S.; HERNÁNDEZ, M.; KELLER, M.; LI, K.; PALACKAL,

N.; SITTENFELD, A.; TAMAYO, G.; WELLS, S.; HAZLEWOOD, G. P.; MATHUR, E. J.; SHORT, J. M.; ROBERTSON, D. E. & STEER, B. A. Unusual microbial xylanases from insect guts. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (6): 3609-3617, 2004.

BREZNAK, J. A. & BRUNE, A. Role of microorganism in the digestion of lignocellulose by termites. *Annual Review of Entomology*, 39: 453-487, 1994.

BREZNAK, J. A. Phylogenetic diversity and physiology of termite gut spirochetes. *Integrative and Comparative Biology*, 42 (3): 13-18, 2002.

BRITO, L. O.; LOPES, A. R.; PARRA, J. R. P.; TERRA, W. R. & SILVA-FILHO, M. C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 128 (B): 365-375, 2001.

BROADWAY, R. M. & DUFFEY, S. S. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology*, 32 (10): 827-833, 1986.

BROADWAY, R. M. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *Journal of Insect Physiology*, 41: 107-116, 1995.

BROADWAY, R. M. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 32: 39-53, 1996.

BRODERICK, N.A.; RAFFA, K.F.; GOODMAN, R.M. & HANDELSMAN, J. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (1): 293-300, 2004.

BROWN, D. P.; WILKINSON, H. S. & GATEHOUSE, J. A. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the

phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27: 625-638, 1997.

BRUNE, A.; MIAMBI, E. & BRESNAK, J. A. Roles of oxygen and the intestinal microflora in the metabolism of lignin-derived phenylpropanoids and other monoaromatic compounds by termites. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2688-2695, 1995.

BRUNE, A. & FRIEDRICH, M. Microecology of the termite gut : structure and function on a microscale. *Current Opinion in Microbiology*, 3: 263-269, 2000.

CAMPBELL, B. C. On the role of microbial symbiontes in herbivorous insects. In: BERNAYS, E. (Ed.) *Insect-plant interactions*. CRC Press, Boca Raton. v.1: 1-44, 1990.

CHACARAS, C.; EBERHARD, R.; COURTOIS, J. E. & PETEK, F. Purification of three cellulases from the xylophagous larvae of *Ergates faber* (Coleoptera: Cerambycidae). *Insect Biochemistry*, 13: 213-218, 1983.

DASCH, G. A.; WEISS, E. & CHANG, K. P. Endosymbionts of insects. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ed. NR Krieg, JG Holt, Baltimore Williams & Wilkins, p. 811-813, 1984.

DE LEO, F.; BONADÉ-BOTINO, M.; CECI, L. R.; GALLERANI, R. & JOANIN, L. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 593-602, 2001.

DE VRIES, E. J.; JACOBS, G. & BREEWER, J. A. J. Growth and transmission of gut bacteria in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77: 129-137, 2001.

DILLON, R. J. & DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. Annual Review of Entomology, 49: 71-92, 2004.

DILLON, R.J.; VENNARD, C.T.; BUCKLING, A. & CHARNLEY, A.K. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. Ecology Letters, 8: 1291-1298, 2005.

DOMINGO, J. W. S.; KAUFMAN, M. G.; KLUG, M. J. & TIEDJE, J. M. Characterization of the cricket hindgut microbiota with fluorescently labeled rRNA-targeted oligonucleotide probes. Applied and Environmental Microbiology, 64 : 752-755, 1998.

DOUGLAS, A. E. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. Annual Review of Entomology, 43: 17-37, 1998.

DOUGLAS, A.E.; MINTO, L.B. & WILKINSON, T.L. Quantifying nutrient production by the microbial symbionts in an aphid. The Journal Experimental Biology, 204: 349-358, 2001.

DUAN, X.; XIAOGANG, L.; QUINGZHONG, X.; ABO-EL-SAAD, M.; XU, D. & WU, R. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. Nature Biotechnology, 14: 494-498, 1996.

EGERT, M.; STINGL, U.; BRUUN, L.D.; POMMERENKE, B.; BRUNE, A. & FRIEDRICH, M.W. Structure and topology of microbial communities in the major gut compartments of *Melolontha melolontha* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). Applied and Environmental Microbiology, 71 (8):4556-4566, 2005.

ELISOR, L.O. Notes on the biology and control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner. Louisiana Agricultural Experimental Station Bulletin 350: 15-25, 1942.

ERTHAL M. J.; SILVA, C.P. & SAMUELS, R.I. Digestive enzymes of leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): distribution in the gut of adult workers and partial characterization. *Journal of Insect Physiology*, 50: 881-891, 2004.

ERTÜRK, O. & DEMIRBAG, Z. Studies on bacterial flora and biological control agent of *Cidia pomonella* L. (Lepidoptera : Tortricidae). *African Journal of Biotechnology*, 5 (22): 2081-2085, 2006.

EUTICK, M.L.; O'BRIEN, R.W. & SLAYTOR, M. Bacteria from the gut of Australian termites. *Applied and Environmental Microbiology*, 35 (5) : 823-828, 1978.

FARMER, E.E. & RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell*, 4: 129-134, 1992.

FERNANDO-WARNAKULASURIYA, G.; TSUCHIDA, K. & WELLS, M.A. Effect of dietary lipid content on lipid transport and storage during larval development of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry*, 18: 211-214, 1988.

FERREIRA, C. C. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; OLIVEIRA, J. A.; ALMEIDA, F. T. DE; PIRES, C. V.; PIOVESSAN, N. D. & MOREIRA, M. A. Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas a remoção dos primórdios florais. *Ciência e Agrotecnologia*, 28: 263-270, 2004.

FERREIRA, C. C. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; BRUMANO, M. H. N.; GUEDES, R. N. C.; ALMEIDA, F. T. DE; SILVA, C. H. O. & MOREIRA, M. A. Lack of seed lipoxigenases does not affect soybean defense against removal of reproductive tissue. *Bioscience Journal*, 21: 49-55, 2005.

FOISSAC, X.; EDWARDS, M.; DU, J. P.; GATEHOUSE, A. M. R. & GATEHOUSE, J. A. Putative protein digestion in a sapsucking homopteran plant pest (rice brown plant hopper, *Nilaparva lugens*: Delphacidae) –

identification of trypsin-like and cathepsin B-like proteases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 967-978, 2002.

FORD, B.J., STRAYER, J.R. & GODFREY, G.L. The literature of arthropods associated with soybean. IV. A bibliography of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera Noctuidae). *Natural History Survey* 92: 15p., 1975.

FORTUNATO, F. S.; OLIVEIRA, M. G. A.; BRUMANO, M. H. N.; ZANUNCIO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; ALMEIDA, F. T.; PILON, A. M.; SEDIYAMA, C. S. & MOREIRA, M. A. Effect of the *Anticarsia gemmatalis* injury on the lipooxygenases activity from soybean leaves. *Bioscience Journal*, 20 (2): 37-46, 2004.

FORTUNATO, F.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; BRUMANO, M.H.N.; SILVA, C.H.O.; GUEDES, R.N.C. & MOREIRA, M.A. Lipooxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*). *Journal of Pest Science*, 2007 (aceito para publicação).

FRANCO, O.L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F.R. & GROSSI-DE-SA, M.F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: structure, function and potential for crop protection. *European Journal of Biochemistry*, 269: 397-412, 2002.

GATEHOUSE, A.M.R. & GATEHOUSE, J.A. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. *Journal of Pest Science.*, 52: 165-175, 1998.

GILL, I.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; JORBA, X. & VULFSON, E. N. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme and Microbial Technology*, 18: 162-183, 1996.

GILLIAM, M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. FEMS Microbiology Letters, 155: 1-10, 1997.

GREENE, G.L., REID, J.C., BLOUNT, V.N. & RIDDLE, T.C. Mating and oviposition behavior of the velvetbean caterpillar in soybean. Environmental Entomology 2: 1113-1115, 1973.

GUYTON, F.E. An outbreak of the velvetbean caterpillar in Alabama with data on control. Journal of Economic Entomology 33(4): 635-639, 1940.

HILDER, V. A.; GATEHOUSE, A. M. R.; SHEERMAN, S. E.; BARKER, R. F. & BOULTER, D. A novel mechanisms of insect resistance engineered into tobacco. Nature., 330 : 160-163, 1987.

HINDS, W.E. & OSTERBERGER, B.A. The soybean caterpillar in Louisiana. Journal of Economic Entomology 24:1168-1173. 1931.

HINNEBUSCH, B. J.; ROSSO, M. L.; SCHWAN, T. G. & CARNIEL, E. High-frequency conjugative transfer of antibiotic resistance genes to *Yersinia pestis* in the flea midgut. Molecular Microbiology, 46: 349-354, 2002.

HOFFMAN, A. G. D. & DOWNER, R. G. H. End product specificity of triacylglycerol lipases from intestine, fat body, muscle and hemolymph of the American cockroach, *Periplaneta americana* L. Lipids., 14: 893-899, 1979.

HONGO, Y.; OHKUMA, M.; KUDO, T. Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera:Rhinotermitidae). FEMS Microbiology Ecology, 44 (2): 231-242, 2003.

HUI, X.; GUI-FANG, W.; SHIHAI, J.; JIANHUA, H.; XUE-XIA, M.; ZHIHUA, Z.; LI-PING, Z. & YONG-PING, H. Microbial communities in the larval midgut of laboratory and field populations of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). Canadian Journal of Microbiology, 52 (11): 1085-1092, 2006.

JANY, K. D.; BEKELAER, K.; PFLEIDERER, G.; ISHAY, J. Amino acid sequence of an insect chymotrypsin from the larvae of the hornet, *Vespa orientalis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 110: 1-7, 1983.

JOGSMA, M. A.; BAKKER, P. L.; PETERS, J.; BOSCH, D. & STICKEMA, W. J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of proteinase activity insensitive to inhibition. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92: 8041-8045, 1995.

KOIWA, H.; SHADE, R. E.; ZHU-SALZMAN, K.; SUBRAMANIAN, L.; MURDOCK, L. L.; BRESSAN, R. A. & HASEGAWA, P. M. A plant defensive cystatin (soyacystatin) targets cathepsin 1-like digestive cysteine proteinases (DvCALs) in the larval midgut of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). FEBS Letters, 471: 67-70, 2000.

KUNAKBAEVA, Z., CARRASCO, R., ROZAS, I. An approximation to the mechanism of inhibition of cysteine proteases: nucleophilic sulfur addition to Michael acceptors type compounds. Journal of Molecular Structure 626: 209–216, 2003.

LASKOWSKI, J. M. & KATO, I. Protein inhibitor of proteinases. Annual Review of Biochemistry, 49: 593-626, 1980.

LECADE, M.; DEDONDER, R. Les protéases de *Pieris brassicae*. I. Purification et propriétés. Bull. Soc. Chim. Biol., 48: 631-660, 1966.

LEE, M.J. & ANSTEE, J.H. Endoproteases from the midgut of larval *Spodoptera littoralis* includes a chymotrypsin-like enzyme with an extended binding site. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 25 (1): 49-61, 1995.

LEMOS, F. J. A. & TERRA, W. R. Soluble and membrane-bound forms of trypsin-like enzymes in *Musca domestica* larval midguts. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22: 613-619, 1992.

LEPPLA, N.C. Circadian rhythms of locomotion and reproductive behavior in adult velvetbean caterpillar. *Annals of the Entomological Society of America* 69(1):45-48, 1976.

LI, H.; MEDINA, F.; VINSON, S.H. & COATES, C.J. Isolation, characterization, and molecular identification of bacteria from the red imported fire ant (*Solenopsis invicta*) midgut. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89: 203-209, 2005.

LOPES, A. R. & TERRA, W. R. Purification, properties and substrate specificity of a digestive trypsin from *Periplaneta americana* (Dictyoptera) adults. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 407-415, 2003.

MALE, K.B. & STOREY, K.B. Enzyme activities and isozyme composition of triglyceride, diglyceride and monoglyceride lipases in *Periplaneta americana*, *Locusta migratoria* and *Polia adjuncta*. *Insect Biochemistry*, 11: 423-427, 1981.

MARES-GUIA, M. & SHAW, E. Studies on the active center of trypsin. The binding of amidines and guanidines as models of the substrate side chain. *The Journal Biological Chemistry*, 240: 1579-1585, 1965.

MARTIN, M. M. Cellulose digestion in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 75(A): 281-288, 1983.

MARTIN, M. M. The evolution of cellulose digestion in insects. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 333: 281-288, 1991.

MATSUMOTO, I.; EMORI, Y.; ABE, K. & ARAI, S. Characterization of a gene family encoding cysteine proteinases of *Sitophilus zeamais* (maize weevil) and

analysis of the protein distribution in various tissues including alimentary tract and germ cells. *Journal of Biochemical*, 121: 464-476, 1997.

MAZUMDAR-LEIGHTON, S.; BABU, C. R. & BENNETT, J. Identification of novel serine proteinase gene transcripts in the midguts of two tropical insect pests, *Scirpophaga incertulas* (Wk) and *Helicoverpa armigera* (Hb). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 57-68, 2000.

MAZUMDAR-LEIGHTON & BROADWAY, R. M. Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 645-657, 2001.

MINKLEY, N.; FUJITA, A.; BRUNE, A. & KIRCHNER, W.H. Nest specificity of the bacterial community in termite guts (*Hodotermes mossambicus*). *Insectes Sociaux*, 53: 339-344, 2006.

MOSCARDI, F., BARFIELD, C.S. & ALLEN, G.E. Effects of temperature on adult velvetbean caterpillar oviposition, egg hatch, and longevity. *Annals of the Entomological Society of America* 74(2): 167-171, 1981.

MUHARSINI, S.; DALRYMPLE, B.; VUOCOLO, T.; HAMILTON, S.; WILLANDSEN, P. & WIJFFELS, G. Biochemical and molecular characterization of serine proteases from larvae *Chrysomya bezziana*, the old screwworm fly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 1029-1040, 2001.

NICKLE, D.A. The peanut agroecosystem in central Florida; economic threshold for defoliating noctuids (Lepidoptera, Noctuidae), associated complex (Hymenoptera, Braconidae). 131p. Dissert. (PhD), Univ. Florida, Gainesville, USA, 1977.

OHKUMA, M.; IIDA, T. & KUDO, T. Phylogenetic relationships of symbiotic spirochetes in the gut of diverse termites. FEMS Microbiology Letters, 181: 123-129, 1999.

OLIVEIRA, G.; OLIVEIRA, M. G. A. ; PIRES, C. V. ; BATISTA, R. B. ; PIOVESSAN, N. D. ; GOMES, M. R. A. ; BARROS, E, G. & MOREIRA, M. A. Efeito do ácido jasmônico na atividade de lipoxigenases de plantas de soja. Ciência e Agrotecnologia, 26 (6) : 1143-1151, 2002.

OLIVEIRA, J. A.; OLIVEIRA, M. G. A. ; GUEDES, R. N. C. & SOARES, M. J. Morphology and preliminary enzyme characterization of the salivary glands from the predatory bug *Podisus nigrispinus*. Bulletin of Entomological Research, 96 : 1-8, 2006.

OLIVEIRA, M. G. A.; DE SIMONE, S. G.; XAVIER, L. P. & GUEDES, R. N. C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. Comparative Biochemistry and Physiology, 140 (B): 369-380, 2005.

OLIVEIRA, S. M. P.; MORAES, B. A.; GONÇALVES, C. A.; GIORDANO-DIAS, C. M.; ALMEIDA, J. M.; ASENSI, M. D.; MELLO, R. P. & BRAZIL, R. P. Prevalência da microbiota no trato digestivo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Díptera: Psychosidae) provenientes do campo. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 33 (3): 319-322, 2000.

OLIVEIRA, S. M. P.; MORAES, B. A.; GONÇALVES, C. A.; GIORDANO-DIAS, C. M.; VILELA, M. L.; R. P.; BRAZIL ; ALMEIDA, J. M.; ASENSI, M. D. & MELLO, R. P. Microbiota do trato digestivo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Díptera: Psychodidae) provenientes de colônia alimentadas com sangue e com sangue e sacarose. Caderno de Saúde Pública., 17 (1): 229-232, 2001.

PANIZZI, A.R., CORREA, B.S., GAZZONI, D.L., OLIVEIRA, E.B., NEWMAN, G.C. & TURNIPSEED, S.G. Insetos da soja no Brasil. Londrina, EMBRAPA CNPSoja, 20p (Boletim Técnico, nº 1), 1977.

PELOQUIN, J. J.; LAUZON, C. R.; POTTER, S. & MILLER, T. A. Transformed bacterial symbionts re-introduced to and detected in host gut. *Current Microbiology*, 45: 41-45, 2002.

PILON, A. M.; OLIVEIRA, M. G. A. & GUEDES, R. N. C. Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86: 23-29, 2006.

RAO, M. B.; TANKSALE, M.; MOHINI, S. & VASANTI, V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (3): 597-635, 1998.

REESON A. F.; JAKOVIC T.; KASPER M. L.; ROGERS S.; AUSTIN A. D. Application of 16rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespula germanica*. *Insect Molecular Biology*, 12 (1): 85-91, 2003.

REID, J.C. Larval development and consumption of soybean foliage by the velvetbean cartepillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera Noctuidae), in the laboratory 118p. dissert. (PhD), Univ. Florida, Gainesville, USA, 1975.

RYAN, C.A. Genes for improving defences against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 92: 245-449, 1990.

SAKAL, E.; APPLEBAUM, S. W. & BIRK, Y. Purification and characterization of *Locusta migratoria* chymotrypsin. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 32: 590-598, 1988.

SANTOS, C. D.; RIBEIRO, A. F. & TERRA W. R. Differential centrifugation, calcium precipitation and ultrasonic disruption of midgut cells of *Erinnyis ello*

caterpillars. Purification of cell microvilli and interferences concerning secretory mechanisms. Canadian Journal of Zoology, 64: 490-500, 1986.

SCHABEREITER-GURTNER, C.; LUBITZ, W. & ROLLEKE, S. Application of broadrange 16S rRNA PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of tick-infecting bacteria. Journal of Microbiological Methods, 52: 251-260, 2003.

SCHULTZ, J.E. & BREZNAK, J.A. Heterotrophic bacteria present in hindguts of wood-eating termites [*Reticulitermes flavipes* (Kollar)]. Applied and Environmental Microbiology, 35 (5): 930-936, 1978.

SEARLE-VAN LEEUWEN, M. J. F.; VAN DEL BROEK, L. A. M.; SCHOLS, H. A.; BELDMAN, G. & VORAGEN, A. G. J. Rhamnogalacturonan acetylsterase: a novel enzyme from *Aspergillus aculeatus*, specific for the deacetylation of hairy (ramified) regions of pectins. Applied and Microbiology Biotechnology, 38: 347-349, 1992.

SHANNON, A.L.; ATTWOOD, G.; HOPCROFT, D.H. & CHRISTELLER, J.T. Characterization of lactic acid bacteria in the larval midgut of the keratinophagous lepidopteran, *Hofmannophila pseudospretella*. Letters in Applied Microbiology, 32: 36-41, 2001.

SILVA, F. B.; OLIVEIRA, M. G. A.; BATISTA, R. B.; PIRES, C. V.; XAVIER, L. P.; PIOVESAN, N. D.; OLIVEIRA, J. A.; JOSÉ, I. C. & MOREIRA, M. A. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). Arquivos do Instituto Biológico, 69 (1): 67-74, 2002.

SILVA, F. B.; OLIVEIRA, M. G. A.; BRUMANO, M. H. N.; PIRES, C. V.; OLIVEIRA, J. A.; PILON, A. M.; PIOVESAN, N. D. & MOREIRA, M. A. Função bioquímica da via das lipoxigenases em plantas de soja submetidas ao ataque de mosca branca (*Bemisia argentifolli*). Ciência e Agrotecnologia, 28 (2): 409-416, 2004.

SILVA, M. D.; OLIVEIRA, M. G. A.; LANNA, A. C.; PIRES, C. V.; PIOVESSAN, N. D. JOSE, I. C.; BATISTA, R. B.; BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A. Caracterização da via das lipoxigenases em plantas de soja resistente e susceptíveis a *Diaphorte phaseolorum* F. sp. meridionalis, agente causal do cancro-da-haste. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 13 (3): 316-328, 2001.

SIPOS, T. & MERKEL, J. R. An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. Biochemistry, 9 (14): 2766-2775, 1970.

SIQUEIRA, C. G.; BACCI, M. J.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. & HEBLING, M. J. A. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. Applied and Environmental Microbiology, 64 (12) : 4820-4822, 1998.

SLAYTOR, M. Cellulose digestion in termites and cockroaches: what role do symbionts play? Comparative Biochemistry and Physiology, 103: 775-784, 1992.

SLAYTOR, M.; VEIVERS, P.C. & LO, N. Aerobic and anaerobic metabolism in the higher termite *Nasutitermes walkeri* (Hill). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 27 (4): 291-303, 1997.

SPITELLER, D.; DETTNER, K. & BOLAND, W. Gut bacteria may be involved in interactions between plants, herbivores and their predators: microbial biosynthesis of N-acylglutamine surfactants as elicitors of plant volatiles. The Journal Biological Chemistry, 381: 755-762, 2000.

STEINHAUS, E. A. The importance of environmental factors in the insect microbe ecosystem. Archives of Bacteriological Reviews.,24: 365-373, 1960.

STEVENS, C. E. & HUME, I. D. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. Physiological Reviews., 78: 393-427, 1998.

SVENSSON, B.; FUKUDA, K.; NIELSEN, P.K. & BONSAGER, B.C. Proteinaceous α -amylase inhibitors. *Biochemica et Biophysica Acta.*, 1696: 145-156, 2003.

TAKATSUKA, J.; KUNIMI, Y. Intestinal bacteria affect growth of *Bacillus thuringiensis* in larvae of the oriental tea tortrix, *Homona magnanima* Diakonoff (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 76: 222-26, 2000.

TANADA, Y. KAYA, H.K. Associations between insects and nonpathogenic microorganisms. In *Insect Pathology*, pp.12-51. New York: Academic. 666p. 1993.

TANADA, H.; AOYAGI, H.; SHINA, S.; DODO, Y.; YOSHIMURA, T.; NAKAMURA, R. & UCHIYAMA, H. Influence of the diet components on the symbiotic microorganisms community in hindgut of *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 71: 907-917, 2006.

TERRA, W.R. & FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109B (1): 1-62, 1994.

TERRA, W.; FERREIRA, C. & BAKER, J.E. Digestive enzymes. In: LEHANE, M.J. & BILLINGSLEY, P.F. (ed). *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall. The University Press, Cambridge. First edition, 206-235, 1996.

TERRA, W.R. & FERREIRA, C. A digestão dos insetos. In: Medeiros, M.A. *As pragas também morrem pela boca*. Pesquisa Fapesp, 54: 20-27, 2000.

TARRAGÓ, M.F.S., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, S. & BARBIN, D. Influência de fatores ecológicos na flutuação populacional das lagartas da soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner e *Rachiplusia nu* (Guen) em Santa Maria-RS. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 6(2):180-193, 1977.

THOLEN, A.; SCHINCK, B. & BRUNE, A. The gut microflora of *Reticulitermes flavipes*, its relation to oxygen, and evidence oxygen-dependent acetogenesis by the most abundant *Enterococcus* sp. FEMS Microbiology Ecology, 24 (2): 137-149, 1997.

TILLMAN, J. A.; SEYBOLD, S. J.; JURENKA, R. A. & BLOMQUIST, G. J. Insect pheromones – an overview of biosynthesis and endocrine regulation. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 29: 481-514, 1999.

TSUCHIDA, K. & WELLS, M.A. Digestion, absorption, transport and storage of fat during the last larval stadium of *Manduca sexta*. Changes in the role of lipophorin in the delivery of dietary lipid to the fat body. Insect Biochemistry, 18: 263-268, 1988.

TURUNEN, S.; CRAILSHEIM, K. Lipid and sugar absorption. In: Lehane, M.J., Billingsley, P.F. (Eds.), Biology of Insect Midgut. Chapman and Hall, London, p. 293-320, 1996.

VIEIRA, A. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; JOSE, I. C.; PIOVESSAN, N. D.; REZENDE, S. T.; MOREIRA, M. A. & BARROS, E. G. Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plants submitted to wounding. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 13: 5-12, 2001.

WAGNER, W.; MÖHRLER, F. & SCHNETTER, W. Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Mellontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32: 803-814, 2002.

WALENCIAK, O.; ZWISLER, W. & GROSS, E.M. Influence of *Myriophyllum spicatum*-derived tannins on gut microbiota of its herbivore *Acentria ephemerella*. Journal of Chemical Ecology, 28: 2045-2056, 2002.

WATANABE, K.; HARA, W. & SATO, M. Evidence for growth of strains of the plant epiphytic bacterium *Erwinia herbicola* and transconjugation among the

bacterial strains in guts of the silkworm *Bombyx mori*. Journal of Invertebrate Pathology, 72: 104-111, 1998.

WATERS, D.J. & BARFIELD, C.S. Larval development and consumption by *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) fed various legume species. Environmental Entomology 18(6): 1006-1010, 1989.

WATSON, J.R. Life history of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). Journal of Economic Entomology, 9: 521-528, 1916.

WEINTRAB, H. & TIETZ, A. Triglyceride digestion and absorption in the locust, *Locusta migratoria*. Biochemica et Biophysica Acta, 306: 31-41, 1973.

WEINTRAB, H. & TIETZ, A. Lipid absorption by isolated intestinal preparations. Insect Biochemistry, 8: 267-274, 1978.

WILLE, J.E. Entomologia Agricola del Peru. Estacion Experimental Agricola de la Molina. 468p., 1943.

WILSON, I.; VOGEL, J. & SOMERVILLE, S. Signalling pathways: A common theme in plants and animals? Current Opinion in Biology, 7 (3): 175-178, 1997.

XAVIER-FILHO, J. & CAMPOS, F. A. P. Proteinase inhibitors. In CHEECKE, P. R. (Ed) Toxicants of Plant Origin. Boca Raton, CCR Press. v. 3, 1-27, 1989.

XAVIER, L.P.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C.; SANTOS, A.V. & DE SIMONE, S.G. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). European Journal of Biochemistry, 102: 147-153, 2005.

ZIEGLER, R. Metabolic energy expenditure and its regulation. In: E.L. ARRESE *et al.* Insect Biochemistry and Molecular Biology. Springer: Berlin. p. 95-118, 1985.

ZIEGLER, R. Changes in lipid and carbohydrate metabolism during starvation in adult *Manduca sexta*. Journal Comparative Physiology, 161 (B): 125-131, 1991.

CAPÍTULO I

CONTRIBUIÇÃO DA MICROBIOTA BACTERIANA PARA O PROCESSO DIGESTIVO E DESENVOLVIMENTO DE *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA)

**CONTRIBUIÇÃO DA MICROBIOTA BACTERIANA PARA O PROCESSO
DIGESTIVO E DESENVOLVIMENTO DE *Anticarsia gemmatalis*
(LEPIDOPTERA)**

RESUMO- Muitos estudos têm sido realizados a respeito da caracterização da diversidade da microbiota intestinal de insetos. Entretanto, pouco se conhece sobre o papel funcional desses microrganismos, principalmente em Lepidópteras, um grupo que compreende insetos fitófagos, sendo muitos deles pragas agrícolas. Neste contexto, esse trabalho buscou compreender melhor se a presença da microbiota afeta as atividades das enzimas hidrolíticas do intestino de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidóptera: Noctidae), bem como os seus parâmetros biológicos de desenvolvimento. Tetraciclina, cloranfenicol e uma combinação desses dois antibióticos mais ampicilina foram incorporadas à dieta artificial em cinco doses específicas. Larvas foram alimentadas durante seu ciclo até o instar pupal. A inibição das atividades enzimáticas foi determinada utilizando-se extrato intestinal de larvas do 5º instar. A influência da microbiota sobre o perfil enzimático durante o período larval foi avaliada em todos os instars, na presença de quatorze diferentes substratos. O efeito dos antibióticos sobre a microbiota foi avaliado através de métodos microbiológicos de cultivo convencionais e microscopia. Os resultados mostraram que o tratamento com tetraciclina foi eficiente na inibição da atividade amidásica e lipásica, o que foi reforçado pela análise do perfil dessas enzimas durante o desenvolvimento do inseto. O tratamento com tetraciclina também apresentou um melhor efeito inibitório sobre bactérias cultiváveis totais e proteolíticas. Verificou-se que o ganho de peso larval foi mais rápido nas concentrações acima de $50 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ de tetraciclina. Como consequência observou-se uma pupação prematura e uma diferença significativa na viabilidade pupal entre larvas controle e larvas criadas com tetraciclina. A mortalidade foi maior entre os insetos alimentados com tetraciclina do que nos insetos controle. Deste modo, conclui-se que bactérias presentes no trato intestinal de *A. gemmatalis* possuem um papel importante na digestão de proteínas, lipídios e no desenvolvimento desse inseto.

PALAVRAS-CHAVE: contribuição da microbiota intestinal, digestão de insetos, serino-protease, lipase, desenvolvimento, *Anticarsia gemmatalis*

1. INTRODUÇÃO

O trato intestinal de insetos abriga uma ampla variedade de microrganismos devido a sua contínua exposição ao ambiente externo. Uma vez no intestino, os microrganismos podem crescer, ser lisados por enzimas ou excretados (WALKER *et al.*, 1999). Algumas espécies permanecem no intestino e exercem papéis importantes na nutrição, desenvolvimento, resistência a patógenos e reprodução do inseto hospedeiro.

Interações simbióticas nutricionais entre inseto-microrganismo têm sido amplamente pesquisadas nas últimas décadas em vários sistemas (SCHULTZ & BREZNAK, 1978; CRUDEN & MARKOVETZ, 1987; BREZNAK & BRUNE, 1994; DOUGLAS *et al.*, 2001; GENTA *et al.*, 2006). Sabe-se que a contribuição nutricional da microbiota intestinal pode ocorrer de várias formas como a maior habilidade de sobrevivência em condições de dietas subótimas, o aumento da eficiência da digestão, a aquisição de enzimas digestivas e o abastecimento de vitaminas (DILLON & DILLON, 2004). Por exemplo, os microrganismos associados ao trato digestivo das diversas espécies de cupins são essenciais para a sobrevivência desses insetos por serem fontes potenciais de enzimas que degradam celulose e lignina, fornecendo aos seus hospedeiros glicose e ácidos graxos que serão utilizados como fonte de energia. Espiroquetas fornecem carbono, nitrogênio e energia necessários para a nutrição de cupins via acetogênese e fixação de nitrogênio (BREZNAK, 2002). A eliminação de bactérias presentes em *Periplaneta americana* resultou na diminuição da capacidade reprodutiva e na incapacidade de biosíntese da metionina e cisteína (CRUDEN & MARKOVETZ, 1987).

Novas xilanases com seqüências primárias não usuais e novos domínios de funcionalidade desconhecida foram descobertas numa análise realizada com métodos independentes de cultivo em tratos intestinais de insetos das ordens Isoptera e Lepidoptera (BRENNAN *et al.*, 2004). A análise filogenética demonstrou uma diversidade considerável entre a seqüência dessas enzimas e outras xilanases conhecidas, sugerindo que são de origem microbiana.

Sabe-se também que a eliminação de simbiontes intracelulares (*Buchnera*) em afídeos afeta diretamente a nutrição e fisiologia do inseto, causando redução no seu desenvolvimento e falência reprodutiva

(WILKINSON, 1998; DOUGLAS *et al.*, 2001). Além do mais, os microrganismos possuem propriedades metabólicas que estão ausentes nos insetos e devido a isso eles agem como “microrganismos corretores”, capacitando insetos fitófagos a superar barreiras bioquímicas (DOUGLAS, 1998).

Vários estudos investigaram a diversidade microbiana, utilizando técnicas de cultivo tradicionais e métodos independentes de cultivo, presente no intestino de Lepidopteras, uma ordem que compreende mais de 150.000 espécies de insetos (SHANNON *et al.*, 2001; SITTENFELD *et al.*, 2001; BRODERICK *et al.*, 2004; ERTÜRK & DEMIRBAG, 2006). Entretanto, pouco se conhece sobre o papel funcional dos microrganismos associados à Lepidopteras. Alguns autores acreditam que devido à ausência de estruturas especializadas e ao trânsito alimentar rápido no trato intestinal de Lepidopteras, microrganismos contribuam pouco com a sua nutrição e digestão (APPEL, 1994; BIGNELL & EGGLETON, 1995). Enquanto outros sugerem que a microbiota fornece nutrientes e contribui com o metabolismo desses insetos (CAMPBELL, 1990; BRODERICK *et al.*, 2004). Essas divergências fazem com que estudos da funcionalidade da microbiota associada às Lepidopteras tenham um interesse particular.

Como estudo preliminar do papel das bactérias intestinais em Lepidopteras, foi utilizado como modelo *Anticarsia gemmatalis*, que é considerada praga da cultura da soja, sendo economicamente importante em função das grandes perdas que ocasiona a esta lavoura (GALLO *et al.*, 2002). Esse trabalho investigou a possibilidade da microbiota intestinal de *A. gemmatalis* aumentar a eficiência da digestão através do fornecimento de enzimas digestivas, tais como carboidrases, lipase, proteases e consequentemente melhorar o desenvolvimento desse hospedeiro. Embora, estudos de caracterização das proteases digestivas deste inseto tenham sido realizados (OLIVEIRA *et al.*, 2005; XAVIER, *et al.*, 2005; PILON, *et al.*, 2006), nenhum levou em consideração se essas enzimas são de origem bacteriana.

Espera-se, com o presente trabalho averiguar se as enzimas digestivas de *A. gemmatalis* são oriundas do próprio inseto ou se os microrganismos participam dessa produção, ao ponto de afetar a atividade dessas enzimas e os parâmetros biológicos desse inseto. Essa hipótese foi testada utilizando

larvas de *A. gemmatalis* criadas com dieta artificial controle (sem antibiótico) e adicionada de antibiótico. Foi avaliada a percentagem de inibição da atividade enzimática no trato intestinal desses insetos usando diversos substratos protéicos, polissacarídeos e lipídicos. Os parâmetros de desenvolvimento larval pós-embrionário e a influência na fisiologia do inseto também foram considerados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto de Biotecnologia - BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa.

2.1. Dieta artificial

A dieta artificial utilizada para a criação dos insetos foi desenvolvida por HOFFMAN-CAMPO *et al.* (1985), autoclavada e estocada a 4°C. Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma – Aldrich Química Brasil (São Paulo, SP, Brasil), exceto o ácido ascórbico e o nipagin, os quais foram obtidos da Synth-LabSynth (São Paulo, SP, Brasil). O feijão, o germe de trigo, a proteína de soja, o levedo de cerveja e a solução vitamínica foram obtidos no mercado local.

2.2. Teste *in vitro* dos antibióticos sobre a microbiota intestinal

Antibióticos foram testados para avaliar a sensibilidade da microbiota intestinal e determinar quais seriam os mais efetivos na eliminação dos microrganismos. Foi utilizada a técnica de disco de difusão em meio sólido, também chamada de antibiograma, onde 100 µL de extrato intestinal de *A. gemmatilis* no 5º instar foram inoculados em meio Luria-Bertaini (LB) e discos contendo antibióticos com concentrações conhecidas foram aplicados de acordo com as recomendações do fabricante (Oxoid Unipath Limited, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom), em câmara de fluxo laminar. Os antibióticos testados foram: espiramicina (100µg), espectomicina (10µg), norfloxacin (2µg), nitrofurantoína (50µg), furazolidona (15µg), sulfato de colistina (10µg), neomicina (10µg), cefalotina (30µg), cefotaxima (30µg), vancomicina (30µg), cefoxitina (30µg), penicilina G (10µg), estreptomicina (10µg), tetraciclina (30µg), ácido nalidíxico (30µg), cloranfenicol (30µg), imipenema (10µg), gentamicina (10µg), perfloxacin (5µg), oxacilina (1µg), ampicilina (10µg), eritromicina (15µg). As placas foram incubadas em duplicata por 24h a 30°C. Os halos de inibição formados ao redor dos discos de antibióticos foram medidos em milímetros, analisados quanto ao grau de sensibilidade ou resistência utilizando a tabela de interpretação do diâmetro de

halo de diferentes antibióticos (MADIGAN *et al.*, 2000) e representados por R (Resistente), I (Intermediário) e S (Sensível).

2.3. Tratamento dos insetos

O experimento foi realizado com três tratamentos diferentes, utilizando os antibióticos que foram mais eficazes no teste *in vitro*. Os antibióticos foram adicionados à dieta artificial durante seu preparo: tetraciclina solução estoque 10 mg/ mL (tratamento 1), cloranfenicol solução estoque 5 mg/ mL (tratamento 2) e uma mistura de tetraciclina, cloranfenicol e ampicilina solução estoque 5 mg/ mL (tratamento 3). Os tratamentos eram constituídos de seis concentrações finais diferentes de cada antibiótico (0, 30, 40, 50, 60 e 70 µg/ mL). Após a eclosão dos ovos, 100 lagartas foram coletadas para cada uma das concentrações de cada tratamento e criadas individualmente dentro de potes plásticos, em câmaras climatizadas a 25 °C, com umidade relativa de 60 ± 10% e fotoperíodo de 14 horas. Toda manipulação da dieta e lagartas foram realizadas em câmaras de fluxo laminar.

TABELA 1-
Volume dos antibióticos utilizados nos três tratamentos testados

Concentração final (µg/ mL) de antibiótico em 500 mL de dieta	Volume de antibiótico (mL)		
	Tetraciclina	Cloranfenicol	Ampicilina
0	0	0	0
30	1,5	3	3
40	2,0	4	4
50	2,5	5	5
60	3,0	6	6
70	3,5	7	7

2.4. Detecção de microrganismos

Cinco lagartas de cada tratamento foram selecionadas no 5º instar, colocadas a -20 °C para a diminuição de suas atividades vitais e, posteriormente, processadas em câmara de fluxo laminar, onde foram submetidas à desinfecção superficial em etanol 70 % (v/v) seguida por duas lavagens em água destilada estéril. As lagartas foram dissecadas e os tratos digestivos obtidos foram mergulhados em solução salina 0,85% estéril, onde foram homogenatos. Para a contagem das unidades formadoras de colônia

(UFCs), diluições seriadas foram realizadas, em 900 μ L de solução salina 0,85 % estéril e 100 μ L destas diluições foram plaqueadas no meio Luria-Bertaini (LB), composto por 10 g de triptona bacteriológica, 5 g de extrato de levedura, 10 g de cloreto de sódio e 15 g de ágar em 1000 mL de água destilada e no meio ágar caseinato de cálcio segundo Frazier e Rupp modificado (Merck) para detecção de bactérias proteolíticas. O meio caseinato de cálcio é indicador de proteólise, ou seja, bactérias que produzem proteases extracelulares formam um halo de clarificação ao redor de suas colônias, indicando que houve degradação do caseinato. As placas foram incubadas em triplicata a 30 °C, por 24 horas.

2.5. Análises microscópicas

As imagens de estereomicroscopia foram obtidas dos tratos intestinais de lagartas no 5º instar criadas com dieta sem a adição de antibiótico e com dieta adicionada de tetraciclina 70 μ g/ mL. Os intestinos foram dissecados em solução fisiológica 0,85% em estereomicroscópio e tiveram seus intestinos transferidos para solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 e deixados “overnight”. A seguir, os intestinos foram desidratados em uma série crescente de álcool (70%, 80%, 90%, 95%), sendo deixados por 10 minutos em cada solução. Para a realização da microscopia eletrônica de varredura, os intestinos foram transferidos para HMDS (hexamethyldisilazane) por 5 min, secados ao ar livre, recobertas com uma camada de 20 nm de ouro e analisados em microscópio de varredura JEOL. Para a microscopia de luz, após a desidratação em etanol 95% as amostras foram transferidas para embebição em resina metacrilato e deixados “overnight”. Foi feita a substituição de resina de embebição pela resina de inclusão. Os intestinos foram então transferidos para suportes para endurecimento por 24 h. Os blocos foram colocados em suportes e cortados em micrótomo. A espessura dos cortes foi de 5 μ m. Os cortes foram pescados em lâminas, deixados secar ao ar por cerca de 12 h. Após esse período as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina por 7 e 2 minutos, respectivamente.

2.6. Obtenção do extrato enzimático

Para análise do efeito dos antibióticos, intestinos de lagartas no 5º instar de todos os tratamentos foram extraídos após dissecação em presença de HCl 10^{-3} M a 4 °C. Para avaliação do perfil de atividade enzimática ao longo do desenvolvimento, tratos intestinais foram extraídos de larvas de 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 6º instar e pré-pupa em presença de HCl 10^{-3} M a 4°C. Os extratos enzimáticos foram obtidos através do rompimento celular resultante de nove ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37 °C, conforme metodologia utilizada por OLIVEIRA *et al.*, (2005). Após os ciclos, frações de 1 mL dos extratos foram centrifugadas em tubos plásticos de 2 mL com tampas a 10.000 g por 30 min a 4 °C. Os sobrenadantes contendo o material solúvel foram retirados e mantidos a -18°C para análises posteriores.

2.7. Ensaios enzimáticos e de proteína

A concentração de proteína foi determinada segundo a metodologia de BRADFORD (1976), usando soluções de albumina sérica bovina (BSA) de 0 a 0,2 mg/ mL como padrão.

A atividade proteolítica foi determinada usando azocaseína como substrato na concentração final de 2 % (p/v). O tempo de incubação foi de 30 min, o qual foi interrompido por adição de ácido tricloroacético 10 % (p/v). Após a interrupção, as amostras foram centrifugadas a 8.000 g por 5 min para remover a proteína precipitada e NaOH 1 M foi adicionado ao sobrenadante e a atividade, então, foi determinada a 440 nm de acordo com KUNITZ, (1947) modificado por OLIVEIRA *et al.* (1993). A atividade amidásica foi determinada como descrito por ERLANGER *et al.* (1961), utilizando *N*- α -benzoyl-L-Arg-*p*-nitroanilida (L-BApNA) como substrato na concentração final de 0,5 mM em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,2 a 25 °C) contendo 20 mM CaCl₂ e 1 % de dimetilformamida (DMF, v/v). A atividade de cisteíno protease foi determinada como citado para a atividade amidásica com adição de inibidor de tripsina-*like*, benzamidina na concentração de 1,0 mM. A atividade esterásica foi determinada utilizando *N*- α -*p*-tosyl-L-Arg metil ester (L-TAME; 0,10 mM) como substrato em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,2) (HUMMEL, 1959).

Os ensaios de atividade de carboidrases sobre os açúcares redutores, melibiose, lactose, manose e maltose (todos na concentração 40 mM) foram realizados por meio da medida de formação de glicose, pelo método da glicose oxidase (STENBERG *et al.*, 1970), utilizando um kit comercial (BIOCLIN). Ensaios para a atividade de carboidrases foram realizados com os açúcares não redutores rafinose (40 mM), xilana (1 %), carboximetilcelulose (CMC) (1 %) e pectina (1 %) com o uso do reagente dinitrossalicilato (DNS) (MILLER, 1956). A atividade de amilase foi determinada utilizando-se o kit enzimático (BIOCLIN) baseado na metodologia de CARAWAY (1959) modificada.

A atividade de lipase foi determinada com o kit enzimático (BIOCLIN), utilizando tributirato ditiopropanol como substrato, segundo a metodologia de CHERRY & CRANDALL (1932) modificada. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados numa série de três repetições.

2.8. Análise da performance do inseto

O experimento foi montado em delineamento de blocos ao acaso, sendo que cada concentração de antibiótico foi testado através de cinco repetições, cada uma constituindo-se de grupos de 10 lagartas individualizadas. Dietas com e sem antibióticos foram oferecidas aos insetos de acordo com cada tratamento estabelecido. O estágio pós-embrionário e os parâmetros fisiológicos de cada lagarta foram acompanhados até a fase adulta (PILON *et al.*, 2006). As lagartas foram mantidas em condições de temperatura a 25°C e a pesagem das lagartas foi feita diariamente em balança analítica.

2.9. Análises estatísticas

A relação entre efeito inibitório da atividade e concentração-resposta foi submetida à análise de regressão, por intermédio do procedimento PROC PROBIT (SAS Institute, 1989). As análises do perfil enzimático e da performance do inseto foram realizadas utilizando regressão do programa SIGMA PLOt (versão 10.0).

3. RESULTADOS

3.1. Antibiógrama

A eficiência dos antibióticos em reduzir o crescimento bacteriano do extrato intestinal de *A. gemmatalis* foi avaliada *in vitro* e os resultados estão apresentados na tabela 2. Dos 22 antibióticos testados, 10 foram capazes de inibir o crescimento bacteriano. Três mais efetivos foram selecionados, tetraciclina, cloranfenicol e ampicilina, devido à ação bactericida e a facilidade de compra. Depois foram administrados às larvas de *A. gemmatalis* através de três tratamentos diferentes: tetraciclina, cloranfenicol e uma combinação de antibióticos (tetraciclina + cloranfenicol + ampicilina) nas concentrações de 0, 30, 40, 50, 60, 70 µg/ mL. Os antibióticos foram adicionados à dieta artificial e seus efeitos no número de bactérias totais, proteolíticas e no desenvolvimento do inseto foram avaliados.

3.2. Efeitos dos antibióticos sobre a microbiota intestinal

O resultado do efeito dos antibióticos sobre a microbiota total aeróbica cultivável, determinado pela contagem do número de unidades formadoras de colônia por mg de intestino, está representado na figura 1A. Dos três tratamentos avaliados, o tratamento com tetraciclina foi o que obteve melhor desempenho na redução do número de bactérias viáveis, quando comparado aos tratamentos com cloranfenicol e a combinação de tetraciclina + cloranfenicol + ampicilina. A contagem de bactérias totais variou entre $0,704 \times 10^4$ a $0,536 \text{ UFC} \times \text{mg}^{-1}$ de intestino no tratamento com cloranfenicol, entre $1,144 \times 10^4$ a $0,376 \text{ UFC} \times \text{mg}^{-1}$ de intestino no tratamento com a combinação de antibióticos e entre $0,692 \times 10^4$ a $0,204 \text{ UFC} \times \text{mg}^{-1}$ de intestino no tratamento com tetraciclina. Nos três tratamentos nota-se um grande número de bactérias presentes no trato intestinal de *A. gemmatalis* quando exposta a dieta sem antibiótico. Porém essa população diminui com o aumento da concentração do antimicrobiano, principalmente nas concentrações superiores a 50 µg/ mL. No tratamento com tetraciclina as concentrações que apresentaram melhor efeito inibitório foram a partir de 30 µg/ mL, alcançando uma redução significativa, quando comparada ao tratamento sem antibiótico.

TABELA 2

Efeito dos antibióticos no crescimento de bactérias cultiváveis presentes no intestino de *Anticarsia gemmatilis*

Antibióticos	Concentração por disco (µg)	Inibição do crescimento bacteriano
Ácido nalidíxico	30	R
Ampicilina	10	S
Cefalotina	30	R
Cefotaxima	30	R
Cefoxitina	30	R
Cloranfenicol	30	S
Eritromicina	15	S
Espectomicina	10	R
Espiramicina	100	S
Estreptomicina	10	R
Furazolidona	15	I
Gentamicina	10	R
Imipemena	10	S
Neomicina	10	R
Nitrofurantoína	50	S
Norfloxacina	2	R
Oxacilina	1	R
Penicilina G	10	I
Perfloxacina	5	R
Sulfato de colistina	10	R
Tetraciclina	30	S
Vancomicina	30	S

R= resistente

S= sensível

I= intermediário

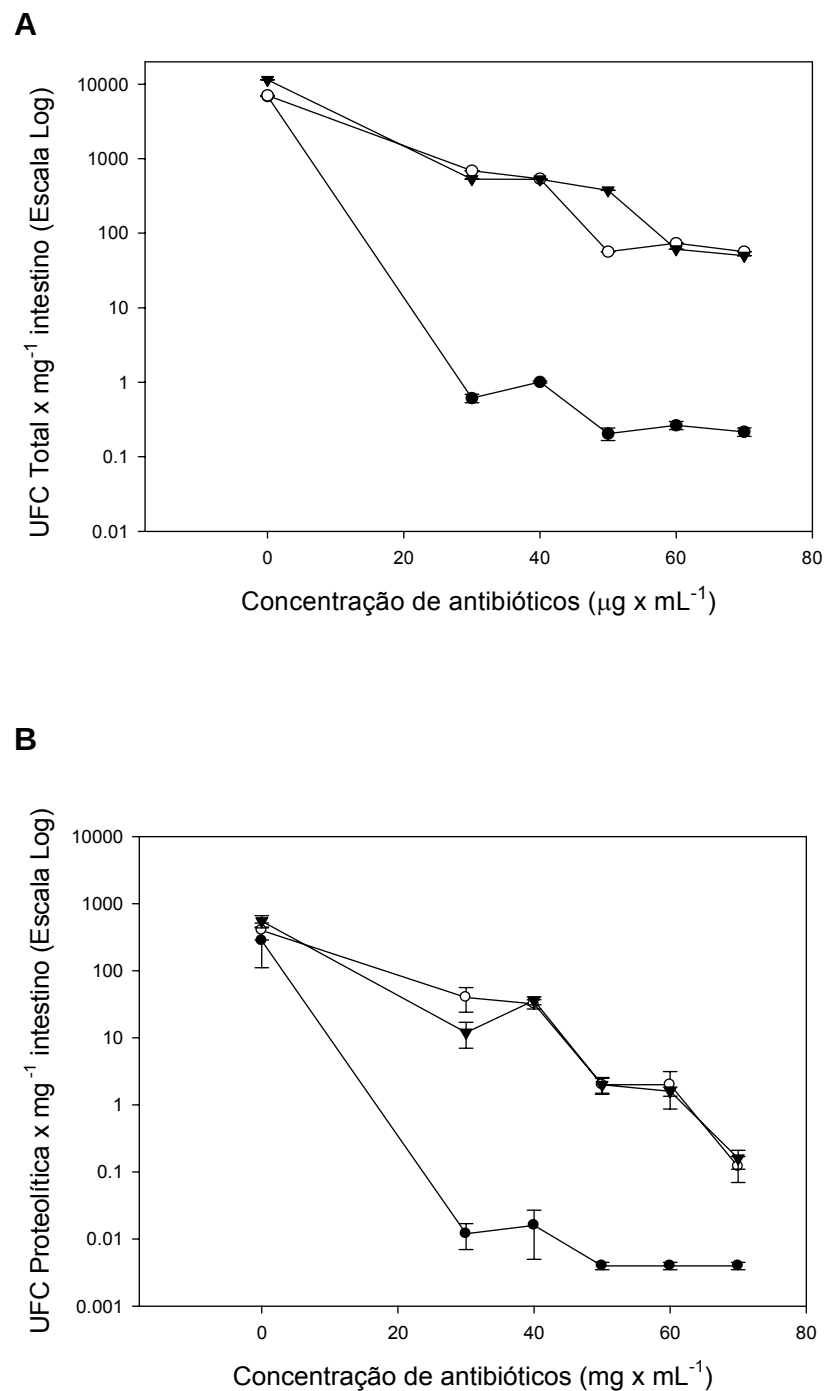


FIGURA 1- Número médio de bactérias totais (A) e proteolíticas (B) encontradas no trato intestinal de larvas de *Anticarsia gemmatilis* criadas com diferentes concentrações de tetraciclina (●), cloranfenicol (○) e tetraciclina, cloranfenicol e ampicilina (▼).

Também foi avaliada a eficiência dos antibióticos na diminuição do número de bactérias produtoras de proteases em meio indicador agar caseinato de cálcio. A figura 1B compara o número de bactérias proteolíticas encontradas nos três tratamentos. A contagem de bactérias proteolíticas variou entre 400 a 0,12 UFC x mg⁻¹ de intestino utilizando cloranfenicol, entre 520 a 0,16 UFC x mg⁻¹ de intestino utilizando a combinação de antibióticos e 280 a 0,004 UFC x mg⁻¹ de intestino utilizando tetraciclina. Deste modo verificou-se que todos os antibióticos administrados foram eficientes na inibição do crescimento de bactérias proteolíticas. Porém a tetraciclina obteve melhor resposta independente da concentração testada.

3.3. Avaliação da presença de bactérias no trato intestinal através de microscopia

A análise microscópica das amostras obtidas do intestino de *A. gemmatalis* mostrou a presença de um abundante número de bactérias, porém com tipos morfológicos limitados. O tipo bacteriano predominante foram cocos, os quais estavam arranjados isolados, aos pares e em cadeias curtas. Os bacilos também estavam presentes em menor número. Não foi visualizada a presença de espiroquetas, fungos e protozoários.

A microscopia eletrônica de varredura mostrou a presença de cocos aderidos ao epitélio intestinal assim como no lúmen do intestino (Figura 2). Nos dois tratamentos estudados percebe-se a presença de microbiota associada ao intestino da *A. gemmatalis*, com uma abundância maior verificada na parte posterior do intestino médio. Poucas bactérias foram observadas no intestino de lagartas criadas com dieta acrescentada de tetraciclina. O resultado obtido através da microscopia de luz reforça tanto a microscopia eletrônica de varredura como a contagem de UFC. Nota-se a presença de um número variável de bactérias no lúmen intestinal, sendo esse número reduzido em lagartas criadas com dieta com tetraciclina.

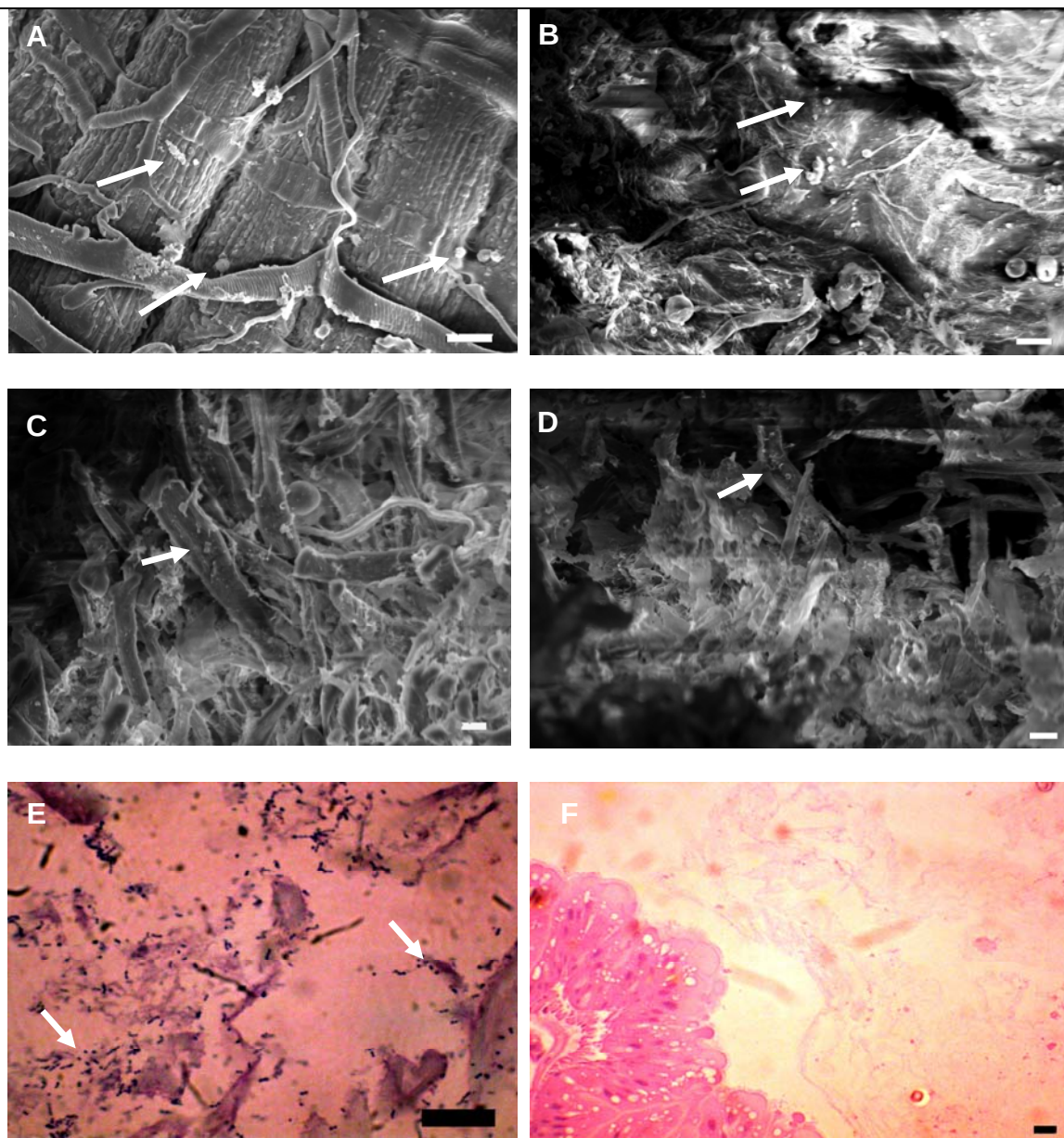


FIGURA 2. Micrografias eletrônicas de varredura e de luz do intestino de larvas de *Anticarsia gemmatalis*. (A) Epitélio do intestino de lagartas criadas em dieta artificial na ausência de antibiótico, barra = 30 µm; (B) lúmen intestinal de lagartas criadas em dieta artificial na ausência de antibiótico, barra = 20 µm; (C) e (D) lúmen intestinal de lagartas criadas em dieta artificial com 70 µg/ mL de tetraciclina, barra = 10 µm e 20 µm, respectivamente; (E) lúmen intestinal de lagartas criadas em dieta artificial na ausência de antibiótico (400x), (F) lúmen e parte do epitélio intestinal de lagartas criadas em dieta artificial com 70µg/ mL de tetraciclina (100x), barra = 20 µm. As setas mostram a presença de bactérias.

3.4. Efeito dos antibióticos nas atividades enzimáticas

O efeito dos antibióticos sobre as enzimas digestivas de *A. gemmatalis* foi avaliado nos três tratamentos realizados e expresso em porcentagem de inibição. Foram utilizados 14 diferentes substratos para averiguar a porcentagem de inibição das atividades de proteases, lipases e carboidrases provenientes de lagartas no 5º instar tratadas com diferentes concentrações dos antimicrobianos. No tratamento com cloranfenicol e com a combinação de antibióticos todos os substratos sofreram hidrólise, porém em todos os casos a análise de regressão mostrou que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as porcentagens de inibição nos diferentes níveis de concentração do antibiótico, indicando desse modo que esses tratamentos não afetaram as atividades das enzimas digestivas de *A. gemmatalis* (Tabela 3).

Na presença de tetraciclina, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as concentrações de antibiótico e a porcentagem de inibição da atividade sobre os substratos amido, melibiose, rafinose, carboximetilcelulose, pectina, L-TAME e L-BApNA com benzamidina (Tabela 4). Já a inibição das atividades sobre lactose, maltose, manose e xilana foi significativa ($P < 0,01$), porém esses resultados foram altamente variáveis, não havendo uma relação proporcional entre a inibição e o aumento da dose de tetraciclina (Tabela 4). A atividade proteolítica total apresentou uma inibição crescente com o aumento da concentração de tetraciclina, conforme ocorreu com as atividades amidásica e lipásica, porém os resultados das análises estatísticas não foram significativos ($\chi^2 = 44,09$; g.l. erro= 3; $P < 0,0001$).

Constatou-se uma inibição significativa para a atividade amidásica ($\chi^2 = 7,32$; g.l. erro= 3; $P = 0,06$) e atividade lipásica ($\chi^2 = 5,92$; g.l. erro= 3 ; $P = 0,11$) no tratamento com tetraciclina (Figura 3 e 4). Indicando uma relação dose dependente, uma vez que o aumento da concentração de tetraciclina aumenta o efeito inibitório da atividade. Os resultados de inibição da atividade enzimática em função da concentração-resposta foram utilizados para estimar as CL_{50} do antibiótico em questão através da análise de logística do Probit. A CL_{50} encontrada para as atividades proteásica, amidásica e lipásica foi de 56,18, 43,95 e 52,18 $\mu\text{g/ mL}$ respectivamente. Das concentrações de

tetraciclina avaliadas a que obteve maior efeito inibitório foi a concentração de 70 µg/ mL.

TABELA 3

Porcentagem de inibição das atividades enzimáticas detectadas no trato intestinal de larvas de *Anticarsia gemmatilis* de 5º instar criadas com dieta adicionadas de antibiótico

Substratos	Concentração de cloranfenicol (µg x mL ⁻¹)					
	0	30	40	50	60	70
Azocaseína	51,3	70,7	21,3	76,4	66,7	54,9
L-BApNA	65,9	48,6	9,1	73,6	25,3	7,3
L-TAME	56,5	64,0	46,4	49,6	53,0	7,52
L-BApNA +	50,7	87,5	48,6	74,6	91,6	44,1
Benzamidina						
Tributirato	96,7	33,8	54,2	90,4	21,0	29,6
ditiopropanol						
Amido	53,6	71,9	34,0	32,4	62,4	16,5
Lactose	70,9	68,4	21,6	81,7	63,7	56,8
Maltose	41,3	45,5	27,4	45,7	12,5	16,8
Manose	76,1	44,2	10,5	49,2	46,9	17,5
Melibiose	77,5	70,8	23,0	81,4	60,8	54,3
Pectina	53,8	35,0	48,3	59,3	49,4	38,0
Rafinose	40,6	33,4	18,4	45,1	26,0	20,8
Xilana	88,6	65,6	41,1	53,4	67,1	40,0
CMC	83,8	60,8	55,2	77,8	77,3	15,8
Substratos	Concentração de T+C+A (µg x mL ⁻¹)					
	0	30	40	50	60	70
Azocaseína	27,0	80,6	30,1	88,1	14,7	73,3
L-BApNA	23,0	75,5	82,2	77,5	10,2	48,5
L-TAME	47,5	92,5	88,0	82,0	29,5	78,9
L-BApNA +	37,5	77,4	85,8	89,5	32,3	65,2
Benzamidina						
Tributirato	47,7	90,7	80,5	98,4	64,2	76,3
ditiopropanol						
Amido	30,4	87,4	81,7	85,0	24,2	71,7
Lactose	51,4	85,5	87,2	96,8	55,6	82,3
Maltose	47,7	82,9	85,9	92,2	34,5	71,5
Manose	46,3	82,3	88,1	93,7	51,3	69,0
Melibiose	41,6	88,0	89,3	96,8	55,6	80,8
Pectina	26,1	77,5	78,3	86,5	28,6	65,9
Rafinose	36,1	73,5	79,2	80,6	18,0	59,8
Xilana	39,5	76,8	78,8	88,4	13,6	62,8
CMC	36,5	62,6	84,5	74,8	19,8	64,5

T= tetraciclina

C= cloranfenicol

A= ampicilina

CMC= carboximetilcelulose

TABELA 4

Porcentagem de inibição das atividades enzimáticas detectadas no trato intestinal de larvas de *Anticarsia gemmatalis* de 5º instar criadas com dieta artificial adicionada de tetraciclina

Substratos	Concentração de tetraciclina ($\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$)					
	0	30	40	50	60	70
Azocaseína	9,5	21,6	38,8	64,3	60,6	75,6
L-TAME	67,9	33,2	27,6	42,0	64,4	64,3
L-BApNA + Benzamidina	62,0	63,0	37,9	74,5	69,6	63,4
Amido	56,9	33,8	46,3	57,0	78,5	71,3
Lactose	42,9	17,9	51,0	59,6	70,2	80,9
Maltose	89,0	42,5	24,9	46,6	72,1	72,4
Manose	80,8	26,8	53,2	54,0	73,5	63,5
Melibiose	81,3	50,9	48,9	62,5	78,6	86,7
Pectina	75,5	27,8	70,9	42,0	88,5	77,5
Rafinose	62,1	41,4	30,2	42,4	73,1	78,8
Xilana	74,3	24,0	67,2	61,1	82,9	76,6
CMC	71,9	53,0	61,3	58,0	73,2	78,3

CMC= carboximetilcelulose

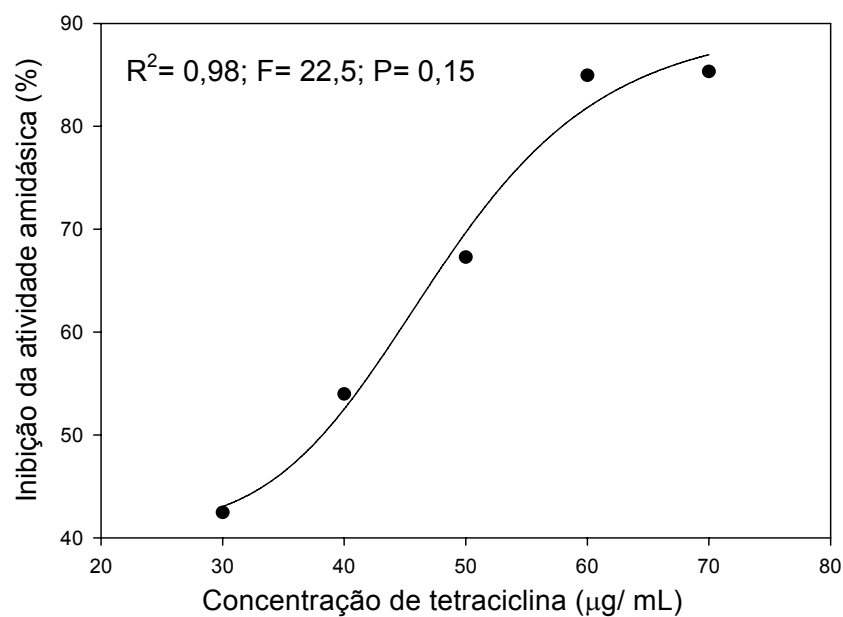


FIGURA 3- Inibição da atividade amidásica em função da concentração de tetraciclina. Cada ponto representa a média de três repetições contendo 5 larvas de 5º instar cada ($n = 3$; $\chi^2 = 7,32$; g.l. erro= 3; $P = 0,06$).

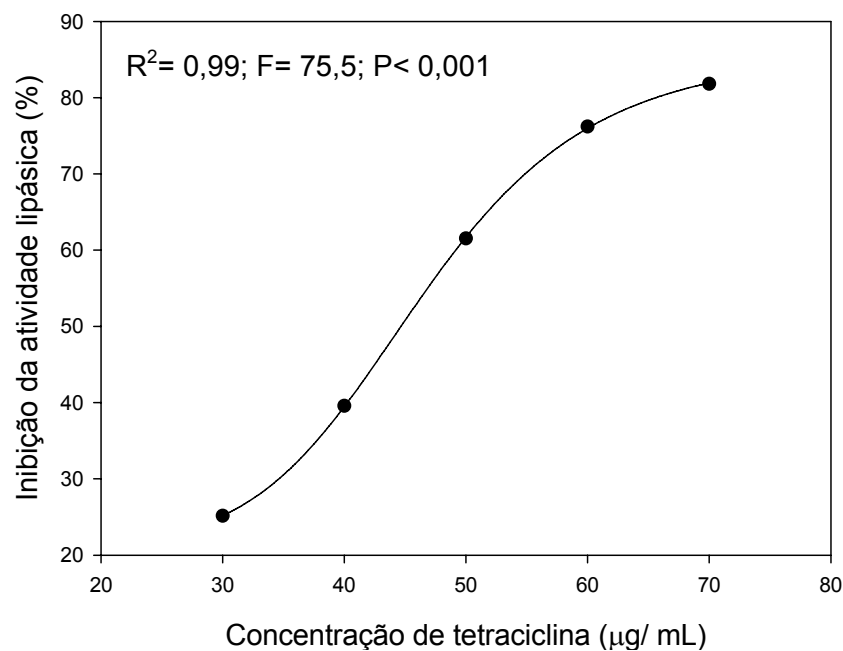


FIGURA 4- Inibição da atividade lipásica em função da concentração de tetraciclina. Cada símbolo representa a média de três repetições contendo 5 larvas de 5º instar cada ($n = 3$; $\chi^2 = 5,92$; g.l. erro= 3 ; $P = 0,11$).

Os perfis das atividades enzimáticas foram avaliadas durante todo o ciclo larval até a fase pré-pupa em lagartas criadas com dieta controle e dieta adicionada de tetraciclina 70 µg/ mL. Os instars foram representados como dias de desenvolvimento, sendo que os períodos entre os dias 0 e 2; 2 e 5; 5 e 9; 9 e 12; 12 e 15; 15 e 18; 18 e 21 correspondem respectivamente aos 1º; 2º; 3º; 4º; 5º; 6º instares e pré-pupa. O efeito da tetraciclina foi significativamente refletido na produção de enzimas que hidrolisam azocaseína, L-BApNA, e tributirato ditiopropanol (Figuras 5, 6, 7). As atividades foram afetadas principalmente nos últimos instares de desenvolvimento (4º, 5º e 6º instar). Verificou-se que os picos máximos das atividades ocorreram entre o 12º e 18º dia de desenvolvimento, para larvas criadas com dieta controle. Entretanto, para larvas alimentadas com tetraciclina não foi observado um pico máximo de atividade, ou seja, o perfil enzimático manteve-se constante ao longo do desenvolvimento do inseto.

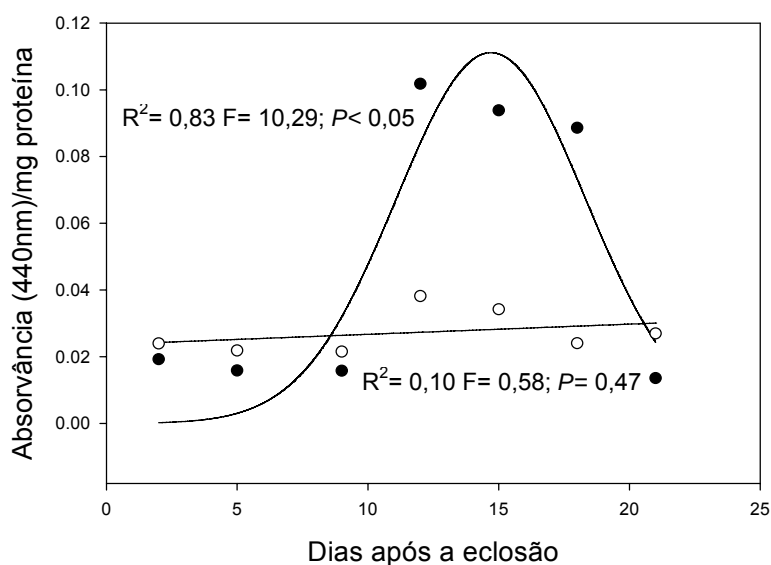


FIGURA 5- Perfil da atividade proteolítica do extrato intestinal de *Anticarsia gemmatilis* ao longo do desenvolvimento larval, utilizando azocaseína como substrato. Os insetos foram criados com dieta sem antibiótico (●) e dieta adicionada de tetraciclina 70 µg/ mL (○). Cada símbolo representa a média de três repetições contendo 5 lagartas de 5º instar cada (n= 3).

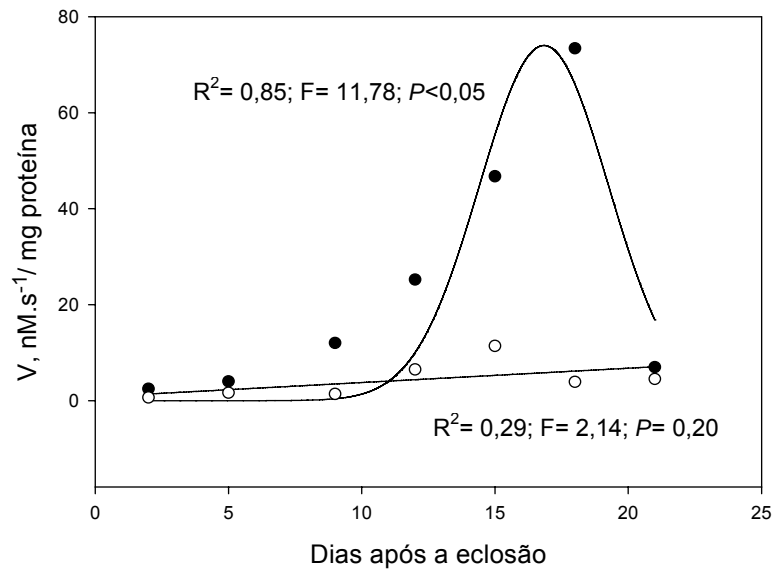


FIGURA 6- Perfil da atividade amidásica do extrato intestinal de *Anticarsia gemmatalis* ao longo do desenvolvimento larval, utilizando L-BApNA como substrato. Os insetos foram criados com dieta sem antibiótico (●) e dieta adicionada de tetraciclina 70 µg/ mL (○). Cada símbolo representa a média de três repetições contendo 5 lagartas de 5º instar cada (n= 3).

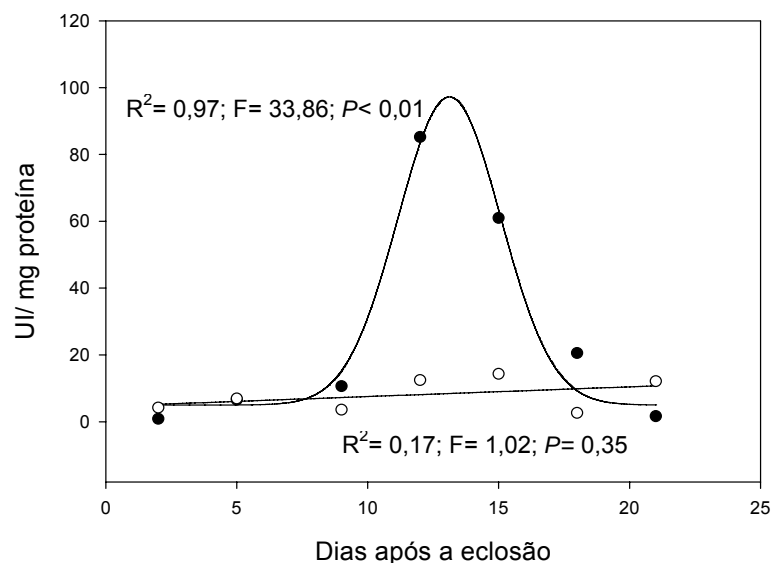


FIGURA 7- Perfil da atividade lipásica do extrato intestinal de *Anticarsia gemmatalis* ao longo do desenvolvimento larval, utilizando tributirato ditiopropanol como substrato. Os insetos foram criados com dieta sem antibiótico (●) e dieta adicionada de tetraciclina 70 µg/ mL (○). Cada símbolo representa a média de três repetições contendo 5 lagartas de 5º instar cada (n= 3).

3.5. Efeito dos antibióticos na performance do inseto

A redução da microbiota de *A. gemmatalis* não afetou significativamente os seguintes parâmetros fisiológicos analisados, duração da fase larval ($12,89 \pm 1,09$; $F= 2,21$; g.l.= 2; $P= 0,32$) (Figura 8), transformação em pupa ($39,5 \pm 5,8$; $F= 8,38$; g.l.= 2; $P= 0,10$) (Figura 9). Verificou-se que o ganho de peso larval foi mais rápido nas concentrações acima de $50 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ de tetraciclina (Tabela 5). Como consequência ocorreu uma pupação prematura de aproximadamente 70% das larvas criadas com tetraciclina no 15º dia (Tabela 5). A pupação prematura afetou a sua emergência, dessa forma observou-se diferença significativa na viabilidade pupal entre larvas controle e larvas criadas com antibiótico (Tabela 5). Observou-se um número maior de mortalidade entre os insetos alimentados com tetraciclina do que nos insetos controle (Tabela 5). Verificou-se uma diferença significativa na análise de variância entre o controle e as diferentes concentrações de tetraciclina avaliadas ($F= 50,32$; g.l.= 12; $P < 0,0001$). Realizou-se, em seguida, o teste de Scheffé para avaliação do contraste entre dois grupos, o controle (sem tetraciclina) e a média das diferentes concentrações de tetraciclina utilizadas. A mortalidade observada com a utilização de tetraciclina ($19 \pm 5,7$) foi significativamente maior que a observada no controle sem tetraciclina ($4 \pm 0,5$).

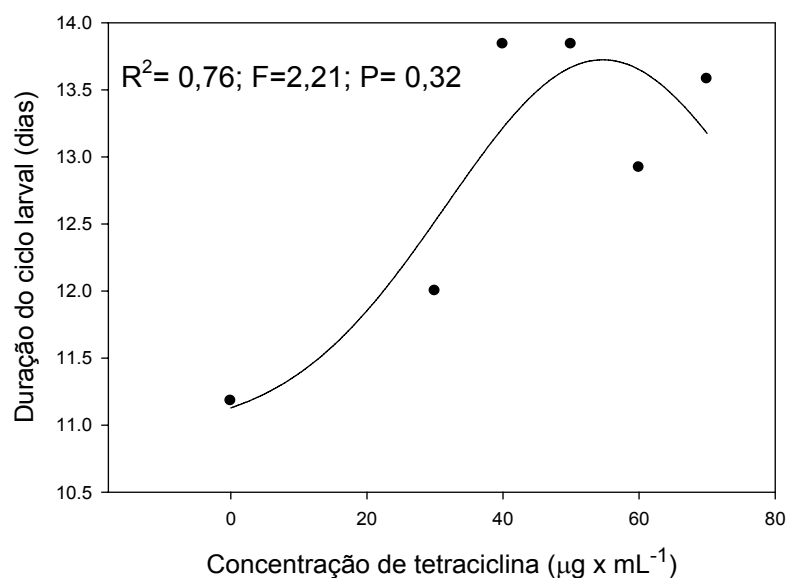


FIGURA 8- Variação no tempo de duração do ciclo larval em função da concentração de tetraciclina administrada as larvas de *Anticarsia gemmatalis* após a eclosão dos ovos.

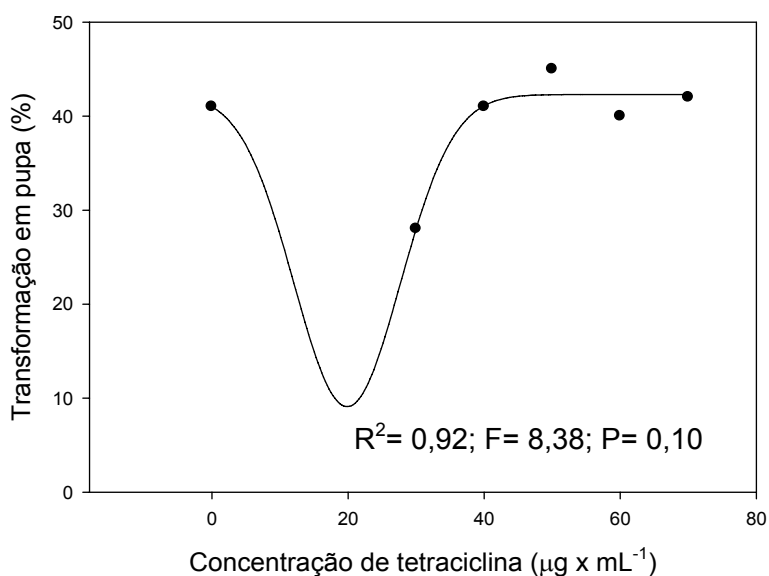


FIGURA 9- Variação na transformação em pupa em função da concentração de tetraciclina administrada as larvas de *Anticarsia gemmatalis* após a eclosão dos ovos.

TABELA 5

Parâmetros biológicos medidos ao longo dos dias do ciclo de vida de *Anticarsia gemmatalis* alimentada com dieta artificial adicionada de diferentes concentrações de tetraciclina.

Tetraciclina ($\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$)	Peso larval (g)			Número de pupas		Emergência (%)	Mortalidade			
	5 dias	10 dias	15 dias	7 dias	15 dias		5 dias	10 dias	15 dias	20 dias
0	0,013 ^{bc}	0,112 ^{bc}	0,119 ^{ab}	0	15	80 ^a	6	8	8	8
30	0,004 ^c	0,054 ^c	0,106 ^{ab}	0	13	40 ^b	19	22	23	28
40	0,007 ^{bc}	0,138 ^{ab}	0,140 ^a	0	18	62 ^{ab}	4	7	9	17
50	0,010 ^{bc}	0,193 ^a	0,064 ^b	0	30	66 ^{ab}	2	2	3	13
60	0,018 ^b	0,128 ^b	0,076 ^b	3	37	60 ^{ab}	7	8	11	25
70	0,032 ^a	0,149 ^{ab}	0,062 ^b	6	40	68 ^{ab}	4	5	6	16

n= número de larvas (50),

^{a,b,c}= indicam a diferença entre o peso das larvas e da viabilidade das pupas de *A. gemmatalis* criadas com diferentes concentrações de tetraciclina durante o ciclo larval, teste Tukey 5% ($P < 0,05$)

4. DISCUSSÃO

Enzimas que contribuem para a hidrólise de polissacarídeos são vistas como elementos-chave para a nutrição de insetos que se alimentam de material vegetal (ERTHAL *et al.*, 2004). Assim, muitos trabalhos são realizados sobre a composição da microbiota intestinal e seu papel na degradação de carboidratos. Porém, pouco se conhece sobre a contribuição dessas bactérias para o metabolismo digestivo de proteínas, lipídeos e no desenvolvimento e fisiologia do inseto. *A. gemmatalis* é um inseto polífago, considerada uma importante praga desfolhadora da cultura da soja (GALLO *et al.*, 2002). As folhas de soja são ricas em carboidratos, proteínas e lipídeos, além de conter microrganismos do ambiente. O nosso trabalho avaliou o papel potencial da microbiota intestinal quanto à produção de enzimas hidrolíticas no processo digestivo e no desenvolvimento de *A. gemmatalis*, utilizando administração oral de antibióticos para a supressão do crescimento de microrganismos. Vale ressaltar que esse trabalho é um dos poucos que investigou a função da microbiota em um inseto-praga.

O uso de antibióticos para a eliminação de microrganismos intestinais de insetos tem sido frequentemente utilizado devido à conveniência e o baixo custo desse método. Além disto, a esterilização via administração oral de antimicrobianos facilita estudos fisiológicos e das relações nutricionais entre a microbiota e seu hospedeiro. Entretanto, a composição da microbiota intestinal é extremamente variável e a eficácia dos antibióticos na eliminação das bactérias varia consideravelmente entre as espécies (JOHNSON *et al.*, 2004). Desta forma, torna-se necessário um estudo preliminar do efeito que determinados antimicrobianos irão exercer sobre o conjunto de microrganismos presentes no trato intestinal do hospedeiro e a dosagem correta a fim de minimizar efeitos deletérios. Nesse estudo foi realizada uma triagem afim de verificar qual o antimicrobiano atuaria melhor na eliminação da microbiota intestinal de *A. gemmatalis*. Nossos resultados demonstraram que, tetraciclina, cloranfenicol e ampicilina foram os antibióticos mais efetivos. Dentre os testados, todos reduziram significativamente o número de bactérias totais e proteolíticas, porém a tetraciclina obteve um melhor desempenho sendo capaz de inibir substancialmente bactérias proteolíticas cultiváveis sendo portanto, o

antibiótico de escolha. Vários trabalhos utilizaram tetraciclina para a eliminação da microbiota (KELLEN *et al.*, 1981; KAMBHAMPATI *et al.*, 1993; NOGGE & GERRESHEIM, 1992; GIRIN & BOULETREAUN, 1995; WILKINSON, 1998; HOERAUF *et al.*, 1999). A escolha da tetraciclina deve-se à sua atuação na síntese protéica, o que propicia esse antibiótico ter um amplo espectro de ação. Além disso, a tetraciclina é muito utilizada em experimentos nos quais se deseja eliminar microorganismos intracelulares, devido à sua capacidade de penetrar estruturas como bacteriócitos, onde se localizam simbioses intracelulares.

A presença de uma diversidade limitada de microrganismos no intestino de *A. gemmatilis*, observada pela microscopia, pode ser explicada pela estrutura do seu trato digestivo. A relação entre estrutura e colonização microbiana considera que insetos que possuem um trato digestivo linear e simples provavelmente possuem uma menor diversidade microbiana do que aqueles que possuem compartimentos mais complexos, como é o caso dos cupins (TANADA & KAYA, 1993). Foram observadas células bacterianas aderidas à membrana peritrófica e muitas no lúmen intestinal. Outros trabalhos de microscopia, com insetos que não possuem bacteriócitos, reportaram a presença de bactérias aderidas a cutículas do intestino posterior (HUNT & CHARNLEY, 1981), incorporadas dentro da matriz peritrófica (MEAD *et al.*, 1988) ocupando o lúmen intestinal e colonizando o epitélio do intestino posterior (MURPHY *et al.*, 1994).

Sabe-se que não existem estruturas especializadas, usualmente associadas a microrganismos, no intestino de larvas de Lepidopteras e em muitos desses herbívoros o fluxo alimentar é rápido dificultando a permanência de uma microbiota estável. Consequentemente, acredita-se que microrganismos intestinais têm pouca participação na nutrição e digestão desses insetos (DILLON & DILLON, 2004). Porém, no presente trabalho foi observado que, na ausência da microbiota, a atividade de serino protease e de lipase foram significativamente inibidas. A avaliação do perfil dessas atividades ao longo do desenvolvimento da lagarta da soja reforça a influência de bactérias sobre a síntese dessas enzimas. Embora alguns estudos a respeito das enzimas digestivas da lagarta da soja tenham sugerido que esse inseto sintetize suas próprias proteases (OLIVEIRA *et al.*, 2005; XAVIER *et al.*, 2005),

nenhum desses estudos considerou a possibilidade de que a atividade proteásica possa ser de origem bacteriana. O presente estudo é o primeiro que enfoca essa possibilidade. Esses resultados sugerem que bactérias presentes no trato intestinal da lagarta da soja influenciem a produção de proteases e lipases extracelulares contribuindo, dessa forma, com o processo digestivo desse inseto. Diferente resultado foi obtido por WALKER *et al.* (1999) que não verificaram uma redução significativa na atividade proteolítica do sistema digestivo de *Deroceras reticulatum*, quando comparados indivíduos alimentados com dieta artificial adicionada e livre de antibióticos. Uma das hipóteses sugeridas pelos autores, é que tenha ocorrido um aumento na síntese de proteases pelo próprio *D. reticulatum*, mascarando a diminuição de atividade proteásica causada pela ausência da microbiota. Outra hipótese seria o aumento da atividade proteolítica intracelular, ocasionado pela elevação da taxa de endocitose após a morte das células bacterianas.

Bactérias capazes de degradar celulose, pectina, xilana e amido foram isoladas do trato intestinal de *A. gemmatilis*, criadas com dieta artificial e folhas de soja, durante um estudo preliminar. Porém as atividades enzimáticas sobre esses substratos não foram afetadas significativamente quando larvas desse inseto foram criadas com dieta artificial controle e com dieta adicionada com antibióticos. Esses resultados sugerem várias possibilidades: a primeira é que embora bactérias que produzam enzimas que degradam carboidratos estejam presentes, elas têm pouca importância no processo digestivo de *A. gemmatilis*, já que a digestão de celulose em insetos é rara, porque o fator da dieta que limita o crescimento dos herbívoros é a qualidade protéica e não o tipo de carboidrato presente. Assim, a digestão de celulose é improvável por ser desvantajosa para o inseto, que pode encontrar requerimentos nutricionais mais fáceis de serem digeridos (MELLO & SILVA-FILHO, 2002). A segunda hipótese relaciona-se à composição da dieta artificial oferecida ao inseto, que é composta principalmente por proteínas e vitaminas, o que pode ter inibido a expressão de carboidrases e estimulado um mecanismo compensatório de proteases e lipases devido ao substrato ingerido. E uma outra resposta estaria relacionada a ação do antibiótico testado, ou seja, a tetraciclina pode não ser efetiva contra bactérias produtoras de carboidrases.

A eliminação da microbiota cultivável do trato intestinal de *A. gemmatalis* não afetou os parâmetros biológicos como duração da fase larval e transformação em pupa. Entretanto, foram observados um aumento rápido no peso larval, pupação prematura, inviabilidade pupal e uma mortalidade maior entre os insetos tratados com tetraciclina do que entre os insetos controle. A inibição da atividade proteolítica e amidásica pode ter contribuído para uma deficiência na absorção de aminoácidos essenciais, acarretando em um aumento da mortalidade. GENTA *et al.* (2006), trabalhando com larvas de *Tenebrio molitor*, mostraram que a ausência da microbiota resultou em perda de massa larval e pupação prematura. DOUGLAS *et al.* (2001) verificaram que a mortalidade de afídeos aposimbiontes foi elevada, sugerindo que a ausência de aminoácidos derivados de bactérias e a baixa taxa de assimilação destes aminoácidos contribuem para o pobre crescimento desses insetos. Resultados obtidos por ZUREK & KEDDIE (1996) mostram que, ao reduzirem a população bacteriana no intestino de *Periplaneta americana* através de dieta artificial adicionada de metronidazol, houve uma diminuição significativa na concentração de ácidos graxos voláteis, a redução no ganho de peso do inseto e o aumento do tempo de duração no ciclo de vida.

O conjunto desses dados mostram que, a atividade de serino protease, lipase e alguns parâmetros biológicos da lagarta da soja foram afetadas pela redução da microbiota. Isso sugere que bactérias intestinais fornecem enzimas importantes para a digestão de proteínas e de lipídeos, contribuindo com o processo digestivo e com o desenvolvimento de *A. gemmatalis*. Além do mais, a inibição da atividade proteolítica verificada nesse trabalho mostra a necessidade de isolamento, caracterização de bactérias proteolíticas e um estudo bioquímico-cinético mais detalhado sobre as proteases por elas produzidas, visando à complementação de pesquisas que buscam novas técnicas de controle dessa praga.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPEL, H.M. The chewing herbivore gut lumen: physicochemical conditions and their impact on plant nutrients, allelochemicals and insect pathogens. In: Plant Interactions, ed Bernays, Boca Raton, CRC Press, 5 ed, p.209-221, 1994.

BIGNELL, D.E. & EGGLETON, P. On the elevated intestinal pH of higher termites (Isoptera, Termitidae). *Insectes Sociaux*, 42: 57-69, 1995

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248, 1976.

BRENNAN, Y., CALLEN, W.N., CHRISTOFFERSEN, L., DUPREE, P., GOUBET, F., HEALEY, S., HERNÁNDEZ, M., KELLER, M., LI, K., PALACKAL, N., SITTENFELD, A., TAMAYO, G., WELLS, S., HAZLEWOOD, G.P., MARTHUR, E.J., SHORT, J.M., ROBERTSON, D.E. & STEER, B. Unusual microbial xylanases from insect guts. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3609-3617, 2004.

BREZNAK, J.A. & BRUNE, A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annual Review of Entomology*, 39: 453-487, 1994.

BREZNAK, J.A. Phylogenetic diversity and physiology of termite gut spirochetes. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 13-18, 2002.

BRODERICK, N.A.; RAFFA, K.F.; GOODMAN, R.M. & HANDELSMAN, J. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (1): 293-300, 2004.

CAMPBELL, B. C. On the role of microbial symbiontes in herbivorous insects. In: BERNAYS, E. (Ed.) *Insect-plant interactions*. CRC Press, Boca Raton. v.1: 1-44, 1990.

CARAWAY, W.T., 1959. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. *American Journal of Clinical Pathology*, 32: 97-99, 1959.

CHERRY, S. & CRANDALL, L.A. The specificity of pancreatic lipase: its appearance in the blood after pancreatic injury. *American Journal of Physiology*, 100: 266-270, 1932.

CRUDEN, D.L. & MARKOVETZ, A.J. Microbial ecology of the cockroach. *Annual Review of Microbiology*, 41: 617-643, 1987.

DILLON, R.J. & DILLON, V.M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology*, 49: 71-92, 2004.

DOUGLAS, A.E. Nutricional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology*, 43: 17-37, 1998.

DOUGLAS, A.E., MINTO, L.B. & WILKINSON, T.L. Quantifying nutrient production by the microbial symbionts in an aphid. *The Journal of Experimental Biology*, 204: 349-358, 2001.

ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N. & COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95: 271-278, 1961.

ERTHAL, M.J.; SILVA, C.P. & SAMUELS, R.I. Digestive enzymes of leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): distribution in the gut of adult workers and partial characterization. *Journal of Insect Physiology*, 50: 881-891, 2004.

ERTÜRK, O. & DEMIRBAG, Z. Studies on bacterial flora and biological control agent of *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *African Journal of Biotechnology*, 5 (22): 2081-2085, 2006.

GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R.P.L., BATISTA, G.C., BERTI FILHO, E., PARRA, J.R.P., ZUCCHI, R.A., ALVES, S.B., VENDRAMIN, J.D., MARCHINI, L.C., LOPES, J.R.S. & OMOTO, C., Manual de Entomologia Agrícola. Piracicaba: FEALQ, 920, 2002.

GENTA, F.A., DILLON, R.J., TERRA, W.R. & FERREIRA, C. Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 52 : 593-601, 2006.

GIRIN, C. & BOULETREAUN, M. Microorganism-associated variation in host infestation efficiency in a parasitoid wasp, *Trichogramma boutatachae* (Hymenoptera, Trichogramma). *Experientia*, 51: 398-401, 1995.

HOERAUF, A., NISSEN-PÄHLE, K., SCHMETZ, C., DÜRHSSEN, K.H., BLAXTER, M.L., BÜTTNER, D.W., GALLIN, M.Y., AL-QAOU, K.M., LUCIUS, R., FLEISCHER, B. Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *Journal of Clinical Investigation*, 103: 11-18, 1999.

HOFFMAN-CAMPO, C.B., OLIVEIRA, E.B. & MOSCARDI, F. Criação massal de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*). Londrina, EMBRAPA-CNPSO, 10, Documentos, 23p., 1985.

HUMMEL, B.C.W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, e trombin. *Canadian Journal of Microbiology*, 37: 1393-1399, 1959.

HUNT, J. & CHANLEY, A.K. Abundance and distribution of the gut flora of desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38: 378-385, 1981.

JOHNSON, S.A. ; NICOLSON, S.W. & JACKSON, S. The effect of different oral antibiotics on the gastrointestinal microflora of a wild rodent (*Aethomys namaquensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 138 (A): 475-483, 2004.

KAMBHAMPATI, S., RAI, K.S., BURGUN, S.J. Unidirectional cytoplasmic incompatibility in the mosquito *Aedes albopictus*. *Evolution*, 47: 673-377, 1993.

KELLEN, W.R. ; HOFFMAN, D.F. & KWOC, R.A. *Wolbachia* sp. (Rickettsiales : Rickettsiaceae) a symbiont of the almond moth *Ephestia cautella* : ultrastructure and influence on host fertility. *Journal of Invertebrate Pathology*, 37: 272-283, 1981.

KUNITZ, M., Crystalline soybean trypsin inhibitor II – General Properties. *Journal of Genetic and Physiology*, 30: 291-310, 1947.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M. & PARKER, J. (Eds.) Clinical and diagnostic microbiology and immunology. In: Brock Biology of Microorganisms, 9nd edn. Prentice-Hall, New Jersey, p. 854-890, 2000.

MEAD, L.J.; KHACHATOURIANS, G.G. & JONES, G.A. Microbial ecology of the gut in laboratory stocks of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes* (Fab)(Orthoptera, Acrididae). *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 1174-1181, 1988.

MELLO, M.O. & SILVA-FILHO, M. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defence mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14: 1-14, 2002

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428, 1956.

MURPHY, K.M.; TEAKLE, D. S. & MACRAE, I.C. Kinetics of colonization of adult Queensland fruit-flies (*Bactrocera tryoni*) by dinitrogen-fixing alimentary tract bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2508-2517, 1994.

NOGGE, G. & GERRESHEIM, A. Experiments of the elimination of symbionts from the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans* (Diptera: Glossinidae) by antibiotics and lysozyme. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40: 166-171, 1992.

OLIVEIRA, M.G.A.; ROGANA, E.; ROSA, J.C.; REINHOLD, B.B.; ANDRADE, M.H.; GREENE, L.J. & MARES-GUIA, M. Tirosyne 151 is part of substrate activation binding site. The Journal Biological Chemistry, 268: 26893-26903, 1993.

OLIVEIRA, M.G.A.; DE SIMONE, S.G.; XAVIER, L.P. & GUEDES, R.N.C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. Comparative Biochemistry and Physiology, 140 (B): 369-380, 2005.

PILON, A.M.; OLIVEIRA, M.G.A. & GUEDES, R.N.C. Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. Pesticide Biochemistry and Physiology, 86: 23-29, 2006.

SCHULTZ, J.E. & BREZNAK, J.A. Heterotrophic bacteria present in hindguts of wood-eating termites [*Reticulitermes flavipes* (Kollar)]. Applied and Environmental Microbiology, 35: 930-936, 1978.

SHANNON, A.L. ; ATTWOOD, G. ; HOPCROFT, D.H. & CHRISTELLER, J.T. Characterization of lactic acid bacteria in the larval midgut of the keratinophagous lepidopteran, *Hofmannophila pseudospretella*. Letters in Applied Microbiology, 32 : 36-41, 2001.

STENBERG, D.; JIJAYKUMAN, P. & REESE, E.T. β -glucosidase: microbiology of production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. Canadian Journal of Microbiology, 23: 139-147, 1970.

SITTENFELD, A., URIBE-LORÍO, L., MORA, M., NIELSEN, V., ARRIETA, G. & JANZEN, D.H. Does a polyphagous caterpillar have the same gut microbiota when feeding on different species of food plants? Revista de Biología Tropical, 50 (2): 1-13, 2002.

TANADA, Y. & KAYA, H.K. Associations between insects and nonpathogenic microorganisms. In *Insect Pathology*, pp.12-51. New York: Academic. 666p., 1993.

XAVIER, L.P. ; OLIVEIRA, M.G.A. ; GUEDES, R.N.C. ; SANTOS, A.V. & DE SIMONE, S.G. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *European Journal of Biochemistry*, 102: 147-153, 2005.

WALKER, A.J., GLEN, D.M. & SHEWRY, P.R. Bacteria associated with the digestive system of the slug *Deroceras reticulatum* are not required for protein digestion. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 1387-1394, 1999.

WILKINSON, T.L. The elimination of intracellular microorganisms from insects: an analysis of antibiotic-treatment in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Comparative Biochemistry and Physiology (A)*, 119: 871-881, 1998.

ZUREK, L. & KEDDIE, B.A. Contribution of the colon and colonic bacterial flora to metabolism and development of the American cockroach *Periplaneta americana* L. *Journal of Insect Physiology*, 42: 743-748, 1996.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PROTEOLÍTICAS ASSOCIADAS AO TRATO INTESTINAL DE *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA)

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PROTEOLÍTICAS
ASSOCIADAS AO TRATO INTESTINAL DE *Anticarsia gemmatalis*
(LEPIDOPTERA)**

RESUMO- A presença de bactérias intestinais têm sido reportada em várias espécies de insetos. Muitos desses microrganismos contribuem com o processo digestivo e nutricional do inseto, através do fornecimento de enzimas digestivas, aminoácidos e vitaminas essenciais. Sabe-se que no intestino de *Anticarsia gemmatalis* existe a presença de proteases e que provavelmente esta seja a principal enzima envolvida na sua digestão. Com o objetivo de conhecer se proteases também são oriundas da microbiota, espécies bacterianas cultiváveis presentes no intestino da lagarta da soja que são capazes de produzir proteases foram isoladas, identificadas e caracterizadas. Doze bactérias proteolíticas foram isoladas de lagartas de quinto instar em meio agar caseinato de cálcio em condições aeróbias e anaeróbias. A análise por PCR-RFLP reuniu os 12 isolados em cinco grupos. Um isolado de cada grupo foi selecionado para caracterizações posteriores. As seqüências do gene 16S rRNA e testes bioquímicos identificaram as bactérias como *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.* e duas espécies de *Enterococcus sp.*. As atividades proteolíticas foram determinadas para todas as cinco espécies. Quando se comparou a produção enzimática entre os isolados, verificou-se uma diferença significativa ($P < 0,01$) na atividade, sobre todos os substratos. Os isolados foram capazes de hidrolisar todos os substratos testados, exceto *Staphylococcus sp.*, que não degradou L-BApNA e L-TAME, substratos específicos de tripsina-like. O *Enterococcus sp.* mostrou maior atividade proteolítica, porém *Bacillus sp.* e *B. subtilis* apresentaram melhor atividade específica de serino e cisteíno protease. Esse trabalho fornece base para a caracterização bioquímico-cinética de proteases de origem microbiana, importantes para a complementação de estudos relacionados ao uso de inibidores de proteases como método alternativo de controle dessa praga.

PALAVRAS-CHAVE: bactérias proteolíticas, proteases, caracterização bioquímica, 16S rRNA, *Anticarsia gemmatalis*

1. INTRODUÇÃO

A ordem Lepidoptera é um grupo primariamente fitófago que engloba mais de 150.000 espécies de insetos. Ela inclui algumas das mais danosas pragas agrícolas e florestais do mundo, compreendendo espécies que superam as medidas de controle existentes, como inseticidas sintéticos, inseticidas microbianos e plantas hospedeiras geneticamente resistentes (SCOBLE, 1992).

Das enzimas envolvidas com o processo de digestão em Lepidopteras, o grupo mais importante é o das proteases, que são classificadas em quatro grupos, baseado no grupo funcional presente no sítio ativo: serino proteases, aspártil proteases, cisteíno proteases e metalo proteases (TERRA & FERREIRA, 1994). Inibidores potentes contra quase todas as classes de proteases têm sido descritos (POMPERMAYER *et al.*, 2001; TIFFIN *et al.*, 2001; FRANCO *et al.*, 2002). Alguns deles são naturalmente produzidos pelas plantas e estão intimamente relacionados ao mecanismo de defesa contra a herbivoria. Porém, os insetos utilizam diferentes modos para contornar os efeitos negativos dos inibidores (JONGSMA & BOLTER, 1997), através do uso de proteases que não são facilmente inibidas (PAULILLO *et al.*, 2000), da degradação proteolítica dos inibidores (GIRARD *et al.*, 1998) e da aquisição de proteases insensíveis aos inibidores (BRITO *et al.*, 2001).

A utilização de genes que codificam inibidores de proteases para a obtenção de plantas resistentes ao ataque de insetos é uma estratégia promissora (JONGSMA & BOLTER, 1997). Porém, para que isso ocorra é importante que a planta expresse uma combinação de inibidores que cubra o espectro total de proteases intestinais. Por esse motivo, é fundamental o conhecimento do conjunto de proteases digestivas presentes no intestino do inseto (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

A *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta da soja, é um inseto polífago que tem por principal hospedeiro a soja (*Glycine max*). Ela é considerada uma das pragas-chave da sojicultura, sendo economicamente importante em função das grandes perdas que ocasionam (GALLO *et al.*, 2002). Estudos têm demonstrado que serino

proteases são as principais proteases expressas no trato intestinal da lagarta da soja (OLIVEIRA *et al.*, 2005, XAVIER *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2005). Proteases solúveis e ligadas à membrana foram extraídas do intestino médio de *A. gemmatalis* purificadas e caracterizadas bioquímica e cineticamente (OLIVEIRA *et al.*, 2005, XAVIER *et al.*, 2005). Os resultados demonstraram que as enzimas parcialmente purificadas apresentam o mesmo padrão hidrolítico e parâmetros cinéticos observados para a tripsina bovina.

Sabe-se que relações simbióticas estabelecidas com microrganismos ajudam a definir o perfil metabólico do inseto, contribuindo, entre outras, para uma eficiente transformação de macromoléculas a nutrientes essenciais (BRENNAN *et al.*, 2004). No entanto, antes de avaliar o impacto da comunidade bacteriana na fisiologia do inseto, faz-se necessária uma caracterização da microbiota intestinal. Em *Lymantria díspar* (Lepidoptera) a diversidade bacteriana existente no intestino médio de larvas no 3º instar, usando técnicas independentes de cultivo, é composta por 23 filotipos (BRODERICK *et al.*, 2004). Muitos dos genes 16S rRNA amplificados consistiam de seqüências ainda não descritas na literatura. Mas, o mais surpreendente desse estudo foi que numerosas espécies de bactérias cultiváveis divergiam totalmente de espécies e gêneros conhecidos. Estudos utilizando larvas de *Automeris zugana* alimentada com diferentes dietas mostraram a presença de 22 espécies de bactérias cultiváveis dentro de 12 gêneros (SITTENFELD *et al.*, 2002). *Enterobacter*, presente em 81,8% das amostras, foi o gênero mais encontrado. *Bacillus thuringiensis* foi isolado de 30,3% das larvas dissecadas, mas estava presente somente em larvas alimentadas com determinadas plantas testadas.

Com o objetivo de conhecer as principais espécies bacterianas cultiváveis que são capazes de produzir proteases em *A. gemmatalis*, bactérias proteolíticas presentes no intestino da lagarta da soja foram isoladas, identificadas e caracterizadas.

2. MATERIAL E METÓDOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto de Biotecnologia - BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa.

2.1. Criação de *Anticarsia gemmatalis*

Aos insetos foram fornecidas dieta artificial (HOFFMAN-CAMPO, 1985) e folhas de soja “ad libitum”. A criação foi mantida sobre condições controladas de $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 14 horas.

2.2. Isolamento de bactérias proteolíticas

Lagartas de *A. gemmatalis* de quinto ínstar foram colocadas à -18°C por aproximadamente 3 min, para diminuição das atividades vitais e submetidas à desinfecção superficial com etanol 70% (v/v), seguida de lavagens em água destilada estéril. Para o isolamento de bactérias anaeróbias, cinco lagartas foram dissecadas em câmara de anaerobiose (COY Laboratory Products Inc., Grass Lake, MI, USA), sendo os intestinos transferidos para cadinho contendo 1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v) e resazurina (agente indicador de oxi-redução). Após a maceração, 100 μL de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) foram plaqueados em ágar caseinato de cálcio (MERCK), que é um meio indicador de proteólise. As bactérias que crescem e produzem proteases extracelulares degradam o caseinato presente no meio e formam halos clarificados ao redor da colônia, sendo assim, consideradas bactérias proteolíticas. As placas de Petri foram mantidas sob atmosfera de $\text{CO}_2:\text{H}_2$ (95:5%), a 30°C . Para o isolamento de bactérias aeróbias, o mesmo procedimento foi feito, porém em câmara de fluxo laminar. Todas as diluições foram plaqueadas em triplicata. Após 48 h, as colônias formadoras de halos que apresentaram características morfológicas diferentes foram selecionadas e estriadas em ágar Luria Bertaini (LB), composto por 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, 20 g de ágar, até a obtenção de colônias puras.

2.3. Extração de DNA genômico

As bactérias proteolíticas foram inoculadas em 3 mL de BHI líquido a 37°C por 16 h e 200 rpm de rotação. As culturas foram centrifugadas a 3000 g por 5 min. O sedimento foi ressuspensionado em 400 µL de tampão SET (75 mM NaCl, 25 mM EDTA e 20 mM Tris-HCl, pH 7,5). Em seguida, 10 µL de lisozima (50 mg/ mL) foram adicionados e a reação foi incubada à 37°C por 1h, com inversões espaçadas. Foram acrescentados 1/10 do volume de SDS 10 % e 10 µL de proteinase K (20 mg/ mL) e novamente, a mistura foi incubada a 60°C por 1 h. Após esse tempo foram adicionados 1/3 do volume de NaCl 5 M e seguido de desproteinização com 1 volume de fenol-clorofórmio (1:1) e clorofórmio. Os ácidos nucleicos foram precipitados com isopropanol, lavados com etanol 70%. Finalmente, o “pellet” seco foi ressuspensionado em 30 µL de tampão TE (100 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA, pH, 7,5).

2.4. Amplificação do gene 16S rRNA bacteriano e análise por RFLP

Para análise por PCR-RFLP, o DNA total foi amplificado com oligonucleotídeos específicos para o gene 16S rRNA, a saber: 5'-AGAGTTTGATCMTGG-3' (16SF) e 5'-TACCTTGTTACGACTT-3' (16SR). As reações de amplificação foram efetuadas em um volume total de 25 µL contendo: 2,5 mM de MgCl₂; tampão da Taq polimerase 1X; 200 µM de desoxirribonucleotídeo (dNTP); 0,4 µM de cada “primer”; uma unidade da enzima Taq polimerase e finalmente 50 ng/µL de DNA. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 2 min e finalizando com uma etapa de extensão final a 72° por 5 min. Uma alíquota de 5 µL foi analisada em gel de agarose 0,8%, sendo o restante incubado separadamente, com 5U das enzimas de restrição *Hae* III e *Rsa* I (PROMEGA). Após a incubação por 5h, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2 % em tampão TBE 1X, a voltagem constante de 100 V. Com base no perfil de restrição, diferentes isolados foram selecionados para identificação bioquímica, molecular e avaliação das atividades proteolíticas.

2.5. Sequenciamento do gene 16S rRNA e análises de dados

Para identificação molecular, os produtos de PCR foram purificados do gel de agarose usando-se o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc, Valencia CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os amplicons foram submetidos ao seqüenciamento em aparelho MegaBACE 500. As seqüências obtidas foram comparadas às disponíveis no banco de seqüências de DNA GenBank, usando o programa BLASTn. As análises filogenéticas foram realizadas com o programa Genes e o método do vizinho mais próximo foi usado para construir a árvore filogenética.

2.6. Testes bioquímicos

Os isolados foram caracterizados pela coloração de Gram e por meio de 20 testes bioquímicos. O procedimento de identificação das bactérias isoladas foi realizado de acordo com o “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” e “Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology” (SNEATH *et al.*, 1986; KONEMAN, 1992).

2.7. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

Placas contendo BHI foram inoculadas com 100 µL de cultura bacteriana e discos contendo antibióticos foram aplicados de acordo com as recomendações do fabricante (Oxoid Unipath Limited, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom). Os antibióticos testados foram estreptomicina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), penicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), eritromicina (15 µg), neomicina (10 µg), ampicilina (10 µg) e ácido nalidíxico (30 µg). O experimento foi realizado em duplicata e incubado a 30°C por 24h. Após o período de incubação, zonas de inibição ao redor dos discos foram medidas e a susceptibilidade ou resistência ao antibiótico foi inferida com base no descrito na literatura (MADIGAN *et al.*, 2000).

2.8. Ensaios Enzimáticos

As bactérias proteolíticas isoladas foram cultivadas em 50 mL de BHI a 37°C por 48 h e 200 rpm de rotação. Depois do tempo de incubação, as culturas foram centrifugadas a 10.000 *g* por 10 min à 4°C. O sobrenadante foi coletado e usado para os ensaios enzimáticos.

A atividade proteolítica foi determinada utilizando-se azocaseína como substrato numa concentração de 2 %. O tempo de incubação foi de 30 min, o qual foi interrompido por adição de ácido tricloroacético 10 % (p/v). Após a interrupção, as amostras foram centrifugadas para remover a proteína precipitada, NaOH 1M foi adicionado ao sobrenadante e a atividade, então, foi determinada a 440 nm de acordo com o método descrito por KUNITZ (1947), adaptado por OLIVEIRA *et al.* (1993). A atividade amidásica foi realizada pelo método descrito por ERLANGER *et al.* (1961), utilizando-se o substrato cromogênico N-benzoil-L-arginil p-nitroanilida (L-BapNA, substrato para enzimas tripsina-*like*) na concentração final de 0,5 mM, a 25°C em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl₂ e 1 % (v/v) de dimetilformamida (DMF). A atividade esterásica foi realizada pelo método descrito por HUMMEL *et al.* (1959), utilizando o substrato L-TAME na concentração final de 0,10 mM, a 25 °C em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl₂. As velocidades iniciais foram determinadas pela medida da absorvância a 247 nm em função do tempo (2,5 min), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 540 M⁻¹ x cm⁻¹ para o produto. A atividade de cisteíno protease foi determinada como citado para a atividade amidásica com adição de inibidor de tripsina-*like*, benzamidina na concentração de 1,0 mM. Todos os experimentos foram realizados em uma série de três repetições.

2.9. Determinação da concentração de proteína

A determinação da concentração da proteína foi obtida de acordo com o método descrito por BRADFORD (1976), utilizando como padrões soluções de 0 a 0,2 mg/ mL de albumina sérica bovina (BSA).

3. RESULTADOS

3.1. Contagem microbiológica e isolamento de bactérias proteolíticas

O número de unidades formadoras de colônias (UFC) totais e proteolíticas, obtido de intestinos de lagartas criadas em dieta artificial e folhas de soja, em condições aeróbias e anaeróbias, está apresentado na tabela 1. Verificou-se que, em lagartas criadas em dieta a contagem de UFC foi maior em ambas as atmosferas de incubação quando comparada a lagartas criadas com folhas. Notou-se também que o número de UFC encontrado em condições aeróbias foi de aproximadamente dez vezes maior do que em anaerobiose. As condições de incubação avaliadas afetaram significativamente a contagem ($P < 0,05$). Já a diferença entre o número de UFC encontrado em lagartas criadas com dieta e folhas em condições aeróbias não foi significativa. O número de bactérias proteolíticas encontrado foi significativamente ($P < 0,05$) maior em lagartas criadas com dieta artificial. Em condições anaeróbicas nenhuma bactéria capaz de produzir protease foi detectada. Um total de doze bactérias proteolíticas, morfolologicamente distintas foi isolado, sendo que sete foram obtidas do intestino de lagartas criadas com dieta artificial e cinco de lagartas criadas com folhas de soja.

TABELA 1

Número de bactérias totais e proteolíticas presentes no trato intestinal de *Anticarsia gemmatilis* criadas com dieta artificial e folhas de soja

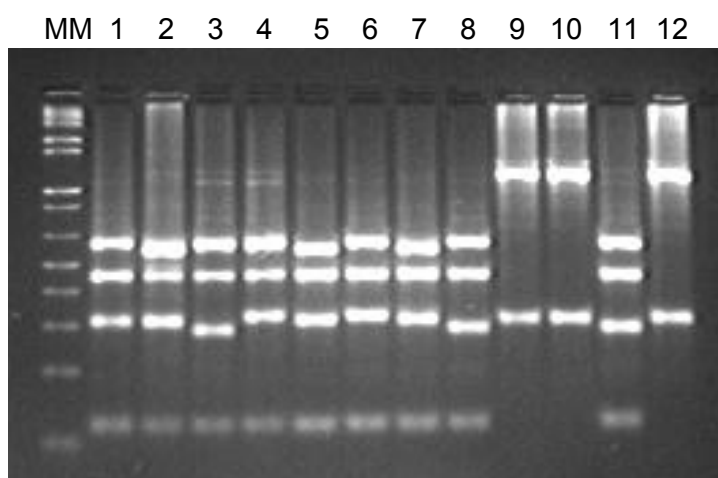
Dieta	Atmosfera de incubação	Bactérias Totais (UFC x mg ⁻¹ de intestino)		Bactérias proteolíticas (UFC x mg ⁻¹ de intestino)	
		$\bar{x}^a$	DP^b	$\bar{x}^a$	DP^b
Dieta artificial	aerobiose	4,520 x 10 ⁴ ± 0,393		17,333 x 10 ² ± 6,110	
Dieta artificial	anaerobiose	5,186 x 10 ³ ± 0,560		0	
Folhas de soja	aerobiose	3,677 x 10 ⁴ ± 0,433		5,533 x 10 ² ± 3,868	
Folhas de soja	anaerobiose	2,999 x 10 ³ ± 0,404		0	

$\bar{x}^a$ =média de três repetições; DP^b = desvio padrão

3.2. PCR - RFLP

A figura 1 mostra os resultados da análise por RFLP dos produtos amplificados. As amostras de DNA nas posições 1 a 7 e 8 a 12 correspondem aos DNAs amplificados de bactérias isoladas do intestino de lagartas criadas com dieta artificial e folhas de soja, respectivamente. O DNA total das doze bactérias isoladas foi clivada com *HaeIII* (Figura 1A). As amostras que apresentaram o mesmo perfil de restrição foram clivadas posteriormente com *RsaI* para a avaliação se elas pertenciam ao mesmo grupo de microrganismos (Figura 1B).

A



B

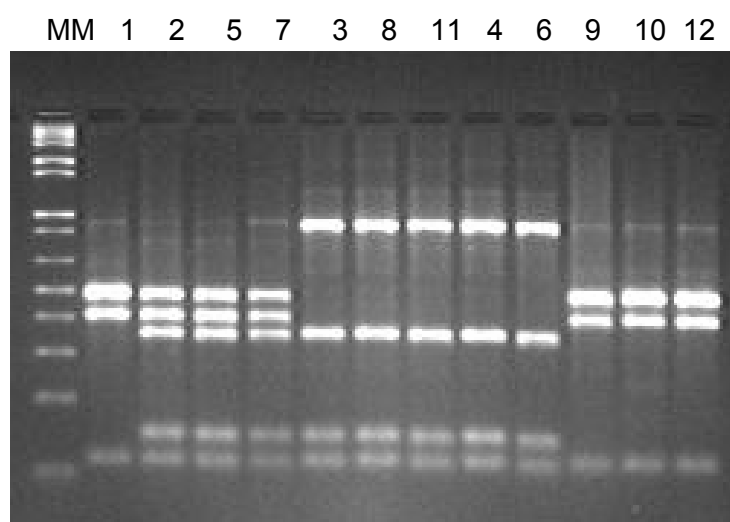


FIGURA 1- Análise por PCR-RFLP do perfil de restrição do gene que codifica 16S rRNA de bactérias isoladas do intestino de *Anticarsia gemmatilis* obtidas pela digestão com *HaeIII* (A) e *RsaI* (B) . MM é marcador molecular e os números 1-12 são os isolados proteolíticos.

Na figura 2, observa-se o dendrograma obtido do agrupamento dos doze isolados proteolíticos dado pelo método do vizinho mais próximo, com base nas distâncias obtidas pelo índice de diversidade multicategórico-binário. O dendrograma foi construído a partir das informações contidas na figura 1, usando 1 para presença e 0 para ausência de bandas em cada posição no gel. Foram consideradas duas categorias, cada qual correspondendo às duas enzimas de restrição utilizadas. Foram obtidos cinco grupos baseados nas diferenças apresentadas pelos padrões de restrição: grupo 1 (isolado 1), grupo 2 (isolados 2, 5 e 7), grupo 3 (isolados 3, 8 e 11), grupo 4 (isolados 4 e 6) e grupo 5 (isolados 9, 10 e 12). Com base nos resultados, um isolado de cada grupo foi selecionado para as caracterizações posteriores.

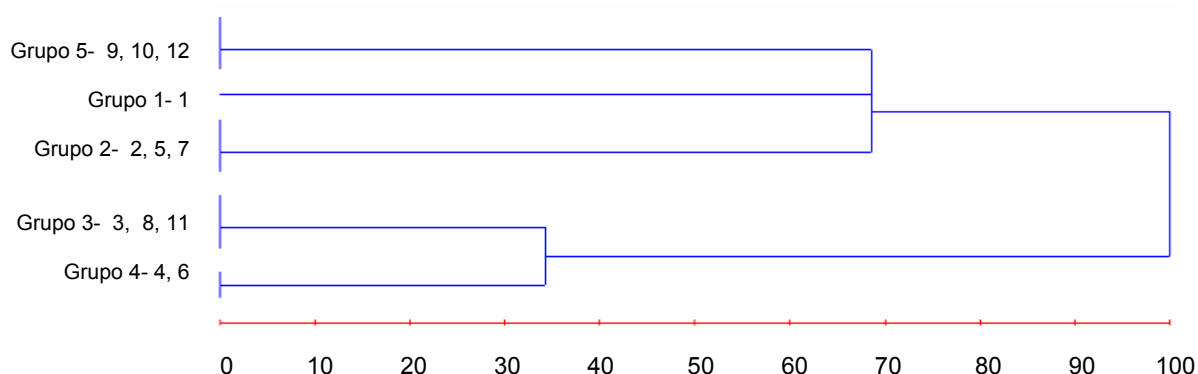


FIGURA 2- Dendrograma obtido pelo método do vizinho mais próximo com base nos perfis de restrição dos doze isolados proteolíticos, utilizando *Hae* III e *Rsa* I.

3.3. Caracterização fenotípica e identificação molecular dos isolados

A sequência do gene 16S rRNA foi obtida para um representante de cada grupo e usada para confirmar a identidade dos isolados. Os produtos de PCR foram seqüenciados com “primers” específicos, gerando uma sequência contínua de aproximadamente 1400 pares de bases. A análise molecular permitiu a identificação dos isolados ao nível de gênero (Tabela 2).

TABELA 2
Identificação dos isolados com base no gene 16S rRNA

	GRUPOS				
ANÁLISES	1	2	3	4	5
MOLECULARES					
Nº de bases sequenciadas	1419	329	1337	1408	1397
Espécies relacionadas	<i>B. subtilis</i> <i>Bacillus sp.</i>	<i>B. cereus</i> <i>Bacillus sp.</i>	<i>E. mundtii</i> <i>E. durans</i> <i>Enterococcus sp.</i>	<i>E. casseliflavus</i> <i>E. gallinarum</i> <i>Enterococcus sp.</i>	<i>Staphylococcus sp.</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>S. xylosus</i> <i>S. cohnii</i>
Similaridade (%)	97%	91%	99%	99%	99%
Nº de acesso no GenBank					
IDENTIFICAÇÃO	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>

Com base nas características morfológicas e bioquímicas descritas na tabela 3, o gênero de todos os isolados foi identificado. Os isolados 1 e 2 foram identificados como *Bacillus sp.*, pois tinham forma de bastonetes, eram aeróbios, produtores de catalase, móveis. Os isolados 3 e 4 foram identificados como estreptococos do grupo D (*Enterococcus*), apresentando forma de diplococos Gram positivos. As características que o diferenciaram dos *Streptococcus*, além do arranjo, foram sua capacidade de hidrolisar esculina na presença de 40 % de bile e o crescimento em NaCl 6,5 %. E finalmente, o isolado 5 apresentou características de estafilococos, devido a sua forma e arranjo serem de cocos agrupados irregularmente, catalase positiva, oxidase negativa e resistentes a bacitracina. Duas características importantes apresentada por esse isolado, classificaram-no dentro do grupo dos *Staphylococcus sp.*, coagulase negativa, resistente a novobiocina.

TABELA 3
Análise morfológica e bioquímica das bactérias proteolíticas isoladas

CARACTERÍSTICAS	ISOLADOS				
	1	2	3	4	5
MORFOLOGIA					
Forma	Bacilo	Bacilo	Cocos	Cocos	Cocos
Arranjo	Isolado	Isolado	Diplococo	Diplococo	Grumos
Coloração de Gram	+	+	+	+	+
TESTES					
BIOQUÍMICOS					
Motilidade	+	+	ND	ND	ND
Prova da Oxidase	-	-	-	-	-
Prova da Catalase	+	+	-	-	+
Prova da coagulase	-	-	-	+	-
Prova da Hemólise	β	β	α	α	α
Prova Camp Test	ND	ND	-	-	-
Tolerância a NaCl 6,5%	+	+	+	+	+
Hidrólise da Esculina	+	-	+	+	-
Hidrólise do Manitol	+	-	-	+	+
Crescimento em MacConkey	+	-	-	-	-
Resistência a Optoquina	ND	ND	R	R	R
Resistência a Bacitracina	ND	ND	R	R	R
Resistência a Novobiocina	ND	ND	ND	ND	R
Resistência a Vancomicina	ND	ND	S	S	S
Fermentação Sacarose	+	+	-	+	+
Fermentação Xilose	-	-	+	-	+
Fermentação Rafinose	+	+	-	+	-
Fermentação Manose	-	-	-	-	-
Fermentação Lactose	-	-	-	-	-
Fermentação Maltose	-	+	-	+	+
IDENTIFICAÇÃO	Bacillus sp.	Bacillus sp.	Enterococcus sp.	Enterococcus sp.	Staphylococcus sp.

ND – não determinado

S – sensível

R – resistente

3.4. Análise do perfil de resistência dos isolados aos antimicrobianos

Na análise de resistência aos antimicrobianos, a determinação do grau de sensibilidade ou de resistência da bactéria está relacionada com o diâmetro das zonas de inibição (mm) formadas em torno dos discos impregnados com antibióticos. Desse modo, os halos foram medidos e as bactérias classificadas como sensíveis (S), intermediárias (I) e resistentes (R). Os isolados mostraram grau de resistência variável como mostra a tabela 4. Todas bactérias foram resistentes ao ácido nalidíxico. Os antimicrobianos que apresentaram melhor eficácia foram tetraciclina, cloranfenicol e eritromicina.

3.5. Análise dos ensaios enzimáticos

Para averiguar que tipo de proteases as bactérias proteolíticas isoladas são capazes de sintetizar, ensaios enzimáticos para detecção de proteases totais, serino protease e cisteíno protease foram realizados. A atividade proteolítica foi detectada com o substrato azocazeína, enquanto a atividade de cisteíno protease foi detectada utilizando o substrato L-BApNA na presença de inibidor de tripsina-*like*, a benzamidina. Para a análise da atividade de tripsina-*like* foram utilizados o substrato amidolítico L-BApNA e o substrato esterolítico L-TAME. Os isolados foram avaliados com base na sua capacidade de produzir protease não específica, serino protease e cisteíno protease. Os valores das atividades proteolíticas produzidas pelos isolados foram determinados como atividades específicas e estão apresentados na tabela 5. Quando se comparou a produção enzimática entre os isolados, verificou-se uma diferença significativa na atividade ($P < 0,01$), sobre todos os substratos testados. Observou-se também, que os isolados foram capazes de hidrolisar todos os substratos testados, exceto o *Staphylococcus sp.*, que não degradou L-BApNA e L-TAME, substratos específicos de tripsina-*like*. O grupo que mostrou maior atividade proteolítica foi o grupo dos *Enterococcus sp.*, já o grupo dos *Bacillus cereus* apresentaram melhor atividade específica de serino e cisteíno protease.

TABELA 4

Efeito dos antimicrobianos sobre as bactérias proteolíticas isoladas do intestino de *Anticarsia gemmatalis*

ISOLADOS	ANTIBIÓTICOS								
	Est	C	Pen	Tet	Gen	E	N	Amp	Nal
<i>Bacillus subtilis</i>	R	I	R	S	R	I	I	R	R
<i>Bacillus sp.</i>	S	I	R	I	R	I	I	R	R
<i>Enterococcus sp.</i>	R	S	I	S	R	I	R	S	R
<i>Enterococcus sp.</i>	I	I	I	S	R	I	R	S	R
<i>Staphylococcus sp.</i>	S	S	R	I	S	S	S	R	R

Est – estreptomicina, C – cloranfenicol, Pen – penicilina, Tet – tetraciclina, Gen – gentamicina, E – eritromicina, N – neomicina, Amp – ampicilina, Nal – ácido nalidíxico

TABELA 5

Atividade de proteases detectada nos sobrenadantes das culturas das bactérias isoladas do intestino de *Anticarsia gemmatalis*

ISOLADOS	SUBSTRATOS			
	Azocaseína(Abs ₄₄₀ /mg proteína)	L-BApNA (nM/s/mg)	L-BApNA com benzamidina (nM/s/mg)	L-TAME (nM/s/mg)
<i>Bacillus subtilis</i>	0.225 ± 0.05 ^{ab}	0,263 ± 0,06 ^c	1,197 ± 0,63 ^c	46,98 ± 6,5 ^b
<i>Bacillus sp.</i>	0,132 ± 0,01 ^{bc}	2,416 ± 0,63 ^a	4,149 ± 0,39 ^a	68,75 ± 9,0 ^a
<i>Enterococcus sp.</i>	0.318 ± 0.14 ^a	0,178 ± 0,03 ^{cd}	3,412 ± 1,76 ^{ab}	0,49 ± 0,04 ^{cd}
<i>Enterococcus sp.</i>	0.046 ± 0.006 ^c	0,902 ± 0,2 ^b	2,164 ± 0,09 ^{bc}	8,75 ± 0,05 ^c
<i>Staphylococcus sp.</i>	0.0632 ± 0.001 ^c	0 ^d	1,378 ± 0,21 ^c	0 ^d

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as atividades para cada substrato foram comparadas usando teste de Duncan, com nível de significância de 0,01. Cada atividade refere-se à média de três repetições (n=3).

4. DISCUSSÃO

Esse estudo comprova, pela primeira vez, a existência de comunidade bacteriana no intestino da lagarta da soja. Por métodos dependentes de cultivo foi detectada uma influência significativa da atmosfera de incubação na enumeração de microrganismos, obtendo-se os maiores valores de UFC sob condições de aerobiose. Os baixos níveis de O₂ no intestino permitem a sobrevivência de bactérias anaeróbias facultativas. A compartimentalização do trato intestinal de *A. gemmatilis* é relativamente simples, então sugere-se que seus microambientes não sejam totalmente anóxicos devido ao maior fluxo de O₂, o que propiciaria o desenvolvimento de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas. Gradientes de O₂ e H₂ obtidos com o uso de microsensores no trato intestinal de cupins revelaram que, devido à estrutura complexa todos os compartimentos centrais, exceto o intestino médio e as regiões menos dilatadas do intestino posterior, são anóxicos, favorecendo o desenvolvimento de anaeróbios (BERCHTOLD *et al.*, 1999; BRUNE & FRIEDRICH, 2000). É possível que o meio utilizado para a contagem microbiológica tenha sido nutricionalmente incapaz de promover o crescimento de bactérias intestinais anaeróbias, o que justifica as baixas contagens obtidas. É estimado que 99% dos microrganismos presentes no trato intestinal de insetos não sejam cultiváveis (DILLON & DILLON, 2004). Porém, foi registrada a contagem na ordem de 1×10^9 a 3×10^9 UFC por intestino de *Acheta domesticus* (SANTO DOMINGO *et al.*, 1998).

O tipo de dieta fornecida não teve influência significativa na enumeração de bactérias totais, semelhante resultado foi encontrado por SANTO DOMINGO *et al.* (1998). Entretanto, o número de bactérias proteolíticas encontrado em larvas criadas com dieta artificial foi superior ao encontrado em larvas criadas com folhas de soja. Isso pode ser explicado pelo maior teor protéico encontrado na dieta, o que favorece o aumento na população de microrganismos capazes de degradar proteínas.

Embora a escolha dos isolados tenha inicialmente sido baseada em diferenças morfológicas, o PCR-RFLP mostrou a existência de apenas cinco bactérias proteolíticas diferentes. Por sequenciamento do gene 16S rRNA identificaram-se três gêneros distintos, *Bacillus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus*. Um dos *Bacillus* foi classificado ao nível de espécie, *Bacillus subtilis* e o outro ao

nível de gênero, *Bacillus* sp., provavelmente devido o sequenciamento de apenas 329 pb de gene 16S rRNA. Os isolados dos grupos 3 e 4 foram identificados como sendo *Enterococcus* sp., porém pertencentes a espécies distintas. O PCR-RFLP mostrou um padrão de restrição diferente, quando os *Enterococcus* desses dois grupos foram clivados com *HaeIII* sendo confirmada pela análise de similaridade, obtida pelo índice de diversidade multicategórico-binária. Além disso, não houve semelhança entre as espécies dos dois grupos, quando as seqüências do gene 16S rRNA foram comparadas as depositadas no Genbank. Isso tudo reforça a possibilidade deles pertencerem a espécies diferentes. O grupo 5 apresentou alta similaridade (99%) com três espécies do grupo dos estafilococos coagulase negativo, resistente a novobiocina, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus cohnii*. Estudos sobre relações filogenéticas foram realizados com 38 espécies do gênero *Staphylococcus* baseado na análise da seqüência do gene 16S rRNA (KLOOS & WOLFSHOHL, 1982; TAKAHASHI, *et al.*, 1999). Seus resultados demonstram que há uma forte homologia entre essas três espécies e que elas estão intimamente relacionadas, o que dificulta a identificação ao nível de espécie.

A presença de *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Enterococcus* já foi relatada no trato intestinal de outros insetos, como abelhas (GILLIAM, 1997), formigas (LI *et al.*, 2005) e flebotomíneos (OLIVEIRA *et al.*, 2001). Nenhuma bactéria Gram-negativa proteolítica foi encontrada em *A. gemmatilis*. Resultado diferente foi reportado por ERTÜRK & DEMIRBAG (2006), quando investigaram a microbiota presente no trato digestivo de *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). Através de testes morfológicos e bioquímicos foram identificadas oito bactérias, a maioria Gram-negativa, três Gram-positivos, sendo uma identificada como *Bacillus laterosporus*. Em outra lepidóptera, *Pecnophora gossypiella*, também foi observada a presença de muitas bactérias Gram-negativas e *Enterococcus* sp. (KUZINA *et al.*, 2002). Porém, microrganismos identificados como numericamente dominantes não são necessariamente aqueles que têm relevância biológica (DILLON & DILLON, 2004). Deve-se considerar sempre o meio de cultura utilizado no isolamento além de fatores ambientais como pH e disponibilidade de nutrientes no intestino do inseto.

A resistência aos antimicrobianos variou entre os grupos isolados, mas não dentro do mesmo gênero. Os *Bacillus* apresentaram resistência aos β -lactâmicos e gentamicina. De acordo com o Manual de Bergey's, *B. cereus* geralmente tem alta resistência a ampicilina, colistina e polimixina, poucas cepas mostraram-se resistentes a bacitracina, kanamicina e tetraciclina. *Bacillus subtilis* são resistentes principalmente a estreptomicina. Os *Enterococcus sp.* apresentaram resistência aos aminoglicosídeos, gentamicina e neomicina. Segundo LECLERCQ *et al.* (1992) o alto grau de resistência aos aminoglicosídeos é decorrente da produção de enzimas modificadoras desses antimicrobianos, tais como 6'-acetil transferase e 2'-fosfotransferase. Essas enzimas geralmente são expressas por genes localizados em plasmídeos. A resistência aos β -lactâmicos, apresentada pelo *Staphylococcus coagulase* negativo isolado, é tradicionalmente associada à produção de β -lactamases.

O presente estudo verificou que todas as bactérias proteolíticas isoladas do trato intestinal de *A. gemmatilis* foram capazes de hidrolisar azocaseína, substrato para proteases não específicas e L-BAPNA na presença benzamidina, substrato específico para cisteíno-proteases. Os substratos para a verificação da produção de tripsina-like, pelas bactérias isoladas, foram L-BAPNA e L-TAME. Todos isolados proteolíticos apresentaram atividade de tripsina-like, exceto o *Staphylococcus sp.*, que mostrou apenas produção de cisteíno protease. O *Bacillus sp.* foi o que melhor hidrolisou a maioria dos substratos protéicos. Relata-se que a maioria das serino proteases comerciais são produzidas por organismos que pertencem ao gênero *Bacillus* (MANACHINI *et al.*, 1988; RAO *et al.*, 1998; OLAJUYIGBE & AJELE, 2005). Os resultados obtidos sugerem que além das proteases produzidas pelo próprio inseto há também a produção por parte da microbiota local.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERCHTOLD, M.; CHATZINOTAS, A.; SCHÖNHUBER, W.; BRUNE, A.; AMANN, R.; HAHN, D. & KÖNIG, H. Differential enumeration and in situ localization of microorganisms in the hindgut of the lower termite *Mastotermes darwiniensis* by hybridization with rRNA-targeted probes. Archives of Microbiology, 172: 407-416, 1999.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248, 1976.

BRENNAN, Y.; CALLEN, W. N.; CHRISTOFFERSEN, L.; DUPREE, P.; GOUBET, F.; HEALEY, S.; HERNÁNDEZ, M.; KELLER, M.; LI, K.; PALACKAL, N.; SITTENFELD, A.; TAMAYO, G.; WELLS, S.; HAZLEWOOD, G. P.; MATHUR, E. J.; SHORT, J. M.; ROBERTSON, D. E. & STEER, B. A. Unusual microbial xylanases from insect guts. Applied and Environmental Microbiology, 70 (6): 3609-3617, 2004.

BRITO, L.O.; LOPES, A. R.; PARRA, J. R. P.; TERRA, W. R. & SILVA-FILHO, M. C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by synthesis of new proteinases. Comparative Biochemistry and Physiology., 128: 365-375, 2001.

BRODERICK, N.A.; RAFFA, K.F.; GOODMAN, R.M. & HANDELSMAN, J. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. Applied and Environmental Microbiology, 70 (1): 293-300, 2004.

BRUNE, A. & FRIEDRICH, M. Microecology of the termite gut : struture and function on a microscale. Current Opinion in Microbiology, 3 : 263-269, 2000.

DILLON, R. J. & DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. Annual Review of Entomology, 49: 71-92, 2004.

ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N. & COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics, 95: 271-278, 1961.

ERTÜRK, O. & DEMIRBAG, Z. Studies on bacterial flora and biological control agent of *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). African Journal of Biotechnology, 5 (22): 2081-2085, 2006.

FRANCO, O.L.; RIGDN, D.J.; MELO, D.J. & GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylase. European Journal of Biochemistry, 269: 397-412, 2002.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S. & OMOTO, C. Manual de Entomologia Agrícola. Piracicaba: FEALQ, 920p., 2002.

GILLIAM, M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. FEMS Microbiology Letters, 155: 1-10, 1997.

GIRARD, C.; METAYER, M.L.; BONADE-BOTINO, M.; PHAM-DELEGUE & M.H.; JOUANIN, L. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 28: 229-237, 1998.

HOFFMAN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, E.B. & MOSCARDI, F. Criação massal de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*). Londrina, EMBRAPA-CNPSO, 10, Documentos, 23p, 1985.

HUMMEL, B. C. W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, e trombin. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37 (12): 1393-1399, 1959.

JOGSMA, M.A. & BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, 43 (10): 885-895, 1997.

KLOOS, W.E. & WOLFSHOHL, J.F. Identification of *Staphylococcus* species with the API STAPH-IDENT system. *Journal Clinical Microbiology*, 16 (3): 509-516, 1982.

KONEMAN, E.W. (ed.). Cocos Gram positivos: parte I: Estafilococos y microorganismos relacionados. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5ed. Medica Panamericana, Buenos Aires, pp. 527-616, 1999.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor II – General Properties. *Journal Genetic and Physiology*, 30: 291-310, 1947.

KUZINA, L.V.; MILLER, E.D.; GE, B. & MILLER, T.A. Transformation of *Enterobacter gergoviae* isolated from pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) gut with *Bacillus thuringiensis* toxin. *Current Microbiology*, 44: 1-4, 2002.

LECLERCQ, R.; DUTKA-MALEN, S.; BRISSON-NOËL, A.; MOLINAS, C.; DERLOT, E.; ARTHUR, M.; DUVAL, J. & COURVALIN, P. Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. *Clinical Infectious Diseases*, 15: 495-501, 1992.

LI, H.; MEDINA, F.; VINSON, S.B. & COATES, C.J. Isolation, characterization, and molecular identification of bacteria from the red imported fire ant (*Solenopsis invicta*) midgut. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89: 203-209, 2005.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. (Eds). *Clinical and diagnostic microbiology and immunology*. In: *Brock Biology of Microorganisms*, 9nd edn. Prentice-Hall, New Jersey, pp. 854 – 890, 2000.

MANACHINI, P.L.; FORTINA, M.G. & PARINI, C. Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermoruber* – a new species of *Bacillus*. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 28: 409-413, 1988.

OLAJUYIGBE, F.M. & AJELE, J.O. Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species. African Journal of Biotechnology, 4 (8): 776-779, 2005.

OLIVEIRA, M. G. A.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHOLD, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, L. J. & MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. The Journal Biological Chemistry, 268 (36): 26893-26903, 1993.

OLIVEIRA, S. M. P.; MORAES, B. A.; GONÇALVES, C. A.; GIORDANO-DIAS, C. M.; VILELA, M. L.; R. P.; BRAZIL ; ALMEIDA, J. M.; ASENSI, M. D. & MELLO, R. P. Microbiota do trato digestivo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Díptera: Psychodidae) provenientes de colônia alimentadas com sangue e com sangue e sacarose. Caderno de Saúde Pública, 17 (1): 229-232, 2001.

OLIVEIRA, M. G. A.; DE SIMONE, S. G.; XAVIER, L. P. & GUEDES, R. N. C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. Comparative Biochemistry and Physiology, 140 (B): 369-380, 2005.

PAULILLO, L.C.M.S.; LOPES, A.R.; CRISTOFOLLETTI, P.T.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R. & SILVA-FILHO, M. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. Journal of Economic Entomology, 93 (3): 892-896, 2000.

PEREIRA, M.E.; DÖRR, F.A.; PEIXOTO, N.C.; LIMA-GARCIA, J.F.; DÖRR, F. & BRITO, G.G. Perspectives of digestive pest control with proteinase inhibitors that mainly affect the trypsin-like activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 38: 1633-1641, 2005.

POMPERMAYER, P.; TERRA, W.R.; PARRA, J.R.P.; FALCO, M.C. & SILVA-FILHO, M.C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 99: 79-85, 2001.

RAO, M. B.; TANKSALE, M.; MOHINI, S.; VASANTI, V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (3): 597-635, 1998.

SANTO DOMINGO, J.W.; KAUFMAN, M.G.; KLUG, M.J.; HOLBEN, W.E.; HARRIS, D. & TIEDJE, J.M. Influence of diet on the structure and function of the bacterial hindgut community of crickets. *Molecular Ecology*, 7: 761-767, 1998.

SCOBLE, M. J. *The Lepidoptera: form, function and diversity*. Oxford University Press, New York, N.Y. 1992.

SITTENFELD, A., URIBE-LORÍO, L., MORA, M., NIELSEN, V., ARRIETA, G. & JANZEN, D.H. Does a polyphagous caterpillar have the same gut microbiota when feeding on different species of food plants? *Revista de Biología Tropical*, 50 (2): 1-13, 2002.

SNEATH, P.H.A.; NAIR, S.N.; SHARP, M.E.; HALT, G.J. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol.2. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1986.

TAKAHASHI, T.; SATOH, I. & KIKUCHI, N. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 725-728, 1999.

TERRA, W.R. & FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109B (1): 1-62, 1994.

TIFFIN, P. E GAUT, B. S. Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor wip 1 in zea and related genera. *Molecular Biology Evolution.*, 18: 2092-2101, 2001.

XAVIER, L.P.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C.; SANTOS, A.V. & DE SIMONE, S.G. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *European Journal of Biochemistry*, 102: 147-153, 2005.

3. CONCLUSÕES

Com base nos objetivos e nos resultados obtidos, conclui-se que a redução substancial do número de UFC total e proteolítica foi alcançada com tetraciclina através do tratamento das larvas recém eclodidas.

As carboidrases não foram afetadas pela redução da microbiota, sugerindo então, que a digestão desse inseto seja primariamente protéica, ou que a tetraciclina não tenha sido eficiente na inibição do crescimento de bactérias produtoras dessas enzimas. Já as lipases e proteases foram inibidas com o aumento da concentração de tetraciclina e conseqüente aumento na redução do número de bactériass. O efeito da redução da microbiota utilizando-se tetraciclina foi também significativamente refletido na atividade de enzimas que hidrolisam azocaseína, L-BApNA, e tributirato ditiopropanol ao longo da fase larval. As atividades foram afetadas principalmente nos últimos instares de desenvolvimento (4º, 5º e 6º instar). Esses resultados sugerem que proteases e lipases, enzimas importantes para o processo digestivo de *A. gemmatalis* são oriundas tanto do inseto como da microbiota residente em seu trato intestinal.

Os resultados das análises da performance de *A. gemmatalis* indicaram que a redução da microbiota interferiu em alguns parâmetros biológicos do inseto, sugerindo dessa forma, que bactérias intestinais também influenciam o desenvolvimento do inseto.

Bactérias cultiváveis foram isoladas do trato intestinal da lagarta da soja e sua capacidade proteolítica foi testada. Os isolados degradaram todos os substratos protéicos com eficiência, confirmando a hipótese de que as proteases presentes no intestino da lagarta não são exclusivamente secretadas pelas células do próprio inseto, sendo as bactérias responsáveis por parte dessa produção.

4. PERSPECTIVAS

Esse trabalho é o primeiro relacionado a contribuição da microbiota intestinal na produção de enzimas hidrolíticas, principalmente proteases envolvidas no processo digestivo de Lepidoptera. Como os resultados demonstraram a influência da microbiota na atividade de proteases tornam-se necessários estudos de digestibilidade do inseto e estudos bioquímico-cinéticos que detalhem as proteases oriundas das bactérias, visando à complementação de pesquisas que buscam técnicas alternativas de controle de Lepidópteras.

Investigações futuras também, poderão ser realizadas para uma melhor caracterização da comunidade microbiana presente em *A. gemmatalis*. Métodos moleculares qualitativos e quantitativos, que são mais sensíveis e seletivos do que os métodos tradicionais poderão ser empregados. Assim, informações a respeito da diversidade e distribuição das bactérias no trato intestinal, incluindo as não cultiváveis, poderão ser obtidas e o seu envolvimento na associação planta-inseto-microrganismo esclarecido.

5. AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

“O cientista não estuda a natureza somente por ela ser útil; estuda-a porque ela lhe apraz, e ela lhe apraz por ser bela. Se a natureza não fosse bela, não mereceria ser conhecida, e se não merecesse ser conhecida, não valeria a pena viver”

Henri Poincaré