

ENZIMAS DIGESTIVAS PRESENTES NO INTESTINO DA FORMIGA
CORTADEIRA *Acromyrmex subterraneus* Forel, 1893 (Hymenoptera:
Formicidae) E NO SEU FUNGO MUTUALÍSTICO

MILTON ERTHAL JUNIOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCI RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES -RJ

JANEIRO - 2004

ENZIMAS DIGESTIVAS PRESENTES NO INTESTINO DA FORMIGA
CORTADEIRA *Acromyrmex subterraneus* Forel, 1893 (Hymenoptera:
Formicidae) E NO SEU FUNGO MUTUALÍSTICO

MILTON ERTHAL JUNIOR

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense, como parte
das exigências para obtenção do título de
Doutor em Produção Vegetal

Orientador: Prof. Richard Ian Samuels

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JANEIRO – 2004

ENZIMAS DIGESTIVAS PRESENTES NO INTESTINO DA FORMIGA
CORTADEIRA *Acromyrmex subterraneus* Forel, 1893 (Hymenoptera:
Formicidae) E NO SEU FUNGO MUTUALÍSTICO

MILTON ERTHAL JUNIOR

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense, como parte
das exigências para obtenção do título de
Doutor em Produção Vegetal

Aprovada em 27 de janeiro de 2004

Comissão Examinadora:

Prof. Hatisaburo Masuda (Dr. em Bioquímica) – UFRJ

Prof. Carlos Peres Silva (Dr. em Bioquímica) – UENF

Prof. Francisco José Alves Lemos (Dr. em Bioquímica) – UENF

Prof. Richard Ian Samuels (Ph.D. em Entomologia) – UENF

Orientador

Dedico

A Ana Paula pelo apoio e incentivo.

Ofereço

A Matheus e Mariana.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Darci Ribeiro, idealizador da UENF, que me proporcionou a oportunidade de realização do curso;

Ao CNPq e à UENF, pela bolsa de estudo concedida;

Ao professor Richard Ian Samuels, pela amizade, incentivo e colaboração na minha formação acadêmica.

Ao professor Carlos Peres Silva, pelo convívio, amizade, ensinamentos e suporte para a realização deste trabalho.

A Denise D. Oliveira Moreira, Cristine R. Benevides, Paulo César Pedra Jr., Arli de Fátima N. da Silva, Valeska B. Costa e Juliana G. Manhães, pela valiosa ajuda de vocês, amizade e paciência...valeu!

Aos amigos do LPP Adão, Alexandre, Andréia, Ângelo, Carol, Cíntia, Cláudio, Déborah, Dimi, Elaine, Eleodoro, Euzilene, Inorbert, Gava, Gilson, Jathinder, Juan, Jussara, Karin, Marcele, Verônica, Vicente, Patrícia, Rozimar, Mauri e Vinicius, valeu pelo companheirismo.

Aos professores Ana Maria M. Viana-Bailez e Omar Bailez, pelas sugestões e troca de idéias sempre muito úteis durante minha permanência no LPP.

Aos colegas do LQFPP Thais, Fábio, Cristóvão, Jucélia, Cíntia, Beto, Juliana, Adriana, Jorge, Logulo e Pink, obrigado pela amizade e pela ajuda durante a condução deste trabalho.

Ao Sr. Antônio, técnico da UFV, agradeço pela força durante a coleta das colônias de formigas em Viçosa, MG.

A Rogério Dahier e ao professor Messias G. Pereira, do LMGV, por muitas vezes facilitarem o andamento do trabalho.

Ao professor Francisco José Alves Lemos, pelas palavras de incentivo e apoio para a realização deste trabalho, e seus alunos Deisiele e Jaime, pela ajuda.

Aos amigos do LFBM: Eduardo, Flávia, Ana Paula, André, Solange, Thais, Wendel e à professora Valdirene, pela cordial convivência e facilitação do uso de equipamentos fundamentais neste trabalho.

Ao professor Renato DaMatta, à Rosivane e Luciane do LBCT, agradeço pela simpatia e acesso a equipamentos importantes durante a realização da tese.

Ao LBR, onde alguns equipamentos foram usados, agradeço pela ajuda.

À minha mãe Sônia, Sra. Valma, vó Geralda e tia Nice, pela atenção com seus netos Matheus e Mariana e pela excelente companhia de vocês aqui em Campos. Beijos.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| Lista de Tabelas | viii |
| Lista de Figuras | x |
| Resumo | XIV |
| Abstract | XVI |
| 1. Introdução | 1 |
| 2. Objetivos | 5 |
| 3. Revisão de Literatura | 7 |
| 3.1. Digestão em insetos | 7 |
| 3.2. Digestão na ordem Hymenoptera | 8 |
| 3.2.1. Digestão em Aculeata | 10 |
| 3.3. Digestão em formigas | 13 |
| 3.3.1. Hábito alimentar | 14 |
| 3.3.2. Evolução de Attini | 22 |
| 3.3.3. Fisiologia da digestão nas formigas | 25 |
| 3.3.4. Digestão nas formigas cortadeiras | 26 |
| 3.4. Associação das formigas cortadeiras com outros microorganismos | 27 |
| 4. Material e Métodos..... | 29 |

| | |
|--|----|
| 4.1. Manutenção das colônias | 31 |
| 4.2. Adultos | 31 |
| 4.2.1. pH do conteúdo luminal do intestino | 32 |
| 4.2.2. Fluxo de dieta ao longo do trato digestivo | 32 |
| 4.2.3. pH ótimo para atividade de carboidrases do reto | 35 |
| 4.2.4. Obtenção dos intestinos | 35 |
| 4.2.5. Avaliação da atividade enzimática | 35 |
| 4.2.6. Atividade enzimática na glândula labial | 40 |
| 4.2.7. Cromatografias | 41 |
| 4.2.8. Caracterização eletroforética | 42 |
| 4.3. Larvas | 45 |
| 4.3.1. pH do conteúdo luminal do intestino no médio | 45 |
| 4.3.2. Fluxo de dieta ao longo do intestino | 45 |
| 4.3.3. Obtenção do intestino médio e glândula labial | 46 |
| 4.3.4. Avaliação da atividade enzimática | 46 |
| 4.3.5. Cromatografias | 46 |
| 4.3.6. Caracterização eletroforética..... | 48 |
| 4.4. Fungo simbiote | 49 |
| 4.4.1. Coleta do jardim e hifas do fungo simbiote | 49 |
| 4.4.2. Atividade enzimática no jardim e hifas do fungo | 51 |
| 4.4.3. Caracterização eletroforética | 51 |
| 4.4.4. Cultivo do fungo simbiote <i>in vitro</i> | 51 |
| 4.4.5. Atividade enzimática nos filtrados de meio de cultura | 53 |
| 4.4.6. Cromatografias | 54 |
| 5. Resultados | 56 |
| 5.1. Adultos | 56 |
| 5.1.1. pH do conteúdo luminal do intestino | 56 |
| 5.1.2. Fluxo da dieta pelo intestino | 56 |
| 5.1.3. pH ótimo de atividade de três carboidrases do reto | 58 |
| 5.1.4. Distribuição espacial de enzimas | 58 |
| 5.1.5. Atividade enzimática associada às glândulas labiais | 62 |
| 5.1.6. Cromatografia | 62 |
| 5.1.7. Eletroforese | 70 |
| 5.2. Larvas | 73 |

| | |
|---|-----|
| 5.2.1. – Faixas de pH e tráfego de alimento no intestino médio | 73 |
| 5.2.2. Distribuição espacial das enzimas | 73 |
| 5.2.3. Atividade enzimática associada às glândulas labiais..... | 75 |
| 5.2.4. Cromatografia | 75 |
| 5.2.5. Eletroforese | 77 |
| 5.3. Fungo | 74 |
| 5.3.1. Atividade de enzimas no jardim e hifas do fungo simbiote | 83 |
| 5.3.2. Eletroforese | 83 |
| 5.3.3. Atividade de enzimas no meio de cultura líquido | 85 |
| 5.3.4. Cromatografia do meio de cultura líquido | 85 |
| 6. Discussão | 89 |
| 6.1. Adultos | 89 |
| 6.2. Larvas | 98 |
| 6.3. Fungo | 103 |
| 7. Resumo e Conclusões | 107 |
| 8. Referências Bibliográficas | 110 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|--|-------|
| Tabela 1 | Indicadores de pH usados para estimar as faixas de pH do papo, intestino médio, íleo e reto de operárias de <i>Acromyrmex subterraneus</i> . | pg 33 |
| Tabela 2 | Tabela 2. Substratos usados para detecção de atividade proteolítica nos compartimentos do intestino de <i>Acromyrmex subterraneus</i> , e no fungo simbiote. | pg 38 |
| Tabela 3 | Carboidratos testados contra o trato digestivo de larvas e adultos de <i>Acromyrmex subterraneus</i> . Estão listados também os tampões, pH e as concentrações (mM ou %) em que os substratos foram dissolvidos, além das respectivas enzimas envolvidas na degradação dos substratos. | pg 39 |
| Tabela 4 | Meio de minerais (basal salts medium, St Leger <i>et al.</i> , 1986) adicionados aos meios de cultura líquidos para o desenvolvimento dos fungos mutualísticos cultivados por <i>Acromyrmex subterraneus</i> . | pg 55 |
| Tabela 5 | Atividade enzimática no tecido epitelial e conteúdo luminal do intestino médio de operárias de <i>Acromyrmex subterraneus</i> . | pg 60 |

| | | |
|-----------|---|-------|
| Tabela 6 | Atividade enzimática no tecido epitelial e conteúdo luminal do reto de operárias de <i>Acromyrmex subterraneus</i> . | pg 61 |
| Tabela 7 | Atividade enzimática nas glândulas labiais de larvas e adultos de <i>Acromyrmex subterraneus</i> . | pg 63 |
| Tabela 8 | Atividade enzimática no tecido epitelial e conteúdo luminal do intestino médio de larvas de <i>Acromyrmex subterraneus</i> . | pg 74 |
| Tabela 9 | Atividade de enzimas digestivas presentes nas hifas e jardim do fungo simbiote cultivado por <i>Acromyrmex subterraneus</i> . Os valores absolutos foram expressos em mmols de substrato liberado por minuto/ml (mU/ml). | pg 84 |
| Tabela 10 | Atividade de carboidrases no filtrado de meio de cultura líquido usado para o desenvolvimento do fungo simbiote (<i>Leucocoprinus</i> sp.), cultivado por <i>Acromyrmex subterraneus</i> . Os valores absolutos foram expressos em mmols de substrato liberados /minuto/ml (mU/ml) | pg 87 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Desenho esquemático do canal alimentar de formigas cortadeiras obtido em Caetano (1984). O fluxo da dieta foi avaliado no papo, intestino médio, íleo e reto. pg 34
- Figura 2 Desenho esquemático do canal alimentar das larvas de *Acromyrmex subterraneus*. pg 47
- Figura 3 Aspecto da esponja do jardim de fungo cultivado por formigas cortadeiras (A). Na figura B observa-se um tufo de hifas do fungo simbiote e dentro do retângulo amarelo um cacho de gongilídeos; Uma foto ampliada dos gongilídeos na figura C. pg 50
- Figura 4 Placa de Petri contendo três colônias de fungo simbiote cultivado por *Acromyrmex subterraneus*, 30 dias após a inoculação das hifas. pg 54

- Figura 5 Representação esquemática de um trecho do intestino de *Acromyrmex subterraneus* localizado no abdômen. As faixas de pH, tempo de preenchimento (TP) e tempo de residência (TR) do conteúdo luminal do papo, intestino médio, íleo e reto estão indicados pelas setas. Sob as linhas horizontais estão listadas algumas enzimas que teoricamente poderiam ser ativas nas faixas de pH descritas para cada compartimento (valores de pH ótimo foram obtidos de Terra e Ferreira, 1994). * No último grupo de formigas (n = 5), dissecado 11 dias após o início do experimento, haviam formigas cujo conteúdo luminal do intestino médio apresentava coloração azul clara em relação à coloração intensa dos dias anteriores. ¹ Enzimas não detectadas ou investigadas nos compartimentos intestinais indicados. pg 57
- Figura 6 Influência do pH sobre atividade das enzimas α -glucosidase, β -glucosidase e α -galactosidase presentes no conteúdo luminal do reto de operárias de *Acromyrmex subterraneus*. Os símbolos na curva de atividade indicam os tampões utilizados: ácido cítrico (■), citrato-fosfato (◆), fosfato (●) e glicina (▲). pg 59
- Figura 7 Atividade de α -glucosidase nas frações cromatográficas provenientes das colunas: fenil-agarose (esquerda) e S-200 (direita), nas quais foram aplicadas amostras de macerado de intestino médio de *Acromyrmex subterraneus*. pg 64
- Figura 8 Atividade de α -glucosidase nas frações cromatográficas provenientes das colunas: fenil-agarose (esquerda) e S-200 (direita), nas quais foram aplicadas amostras de macerado do reto de *Acromyrmex subterraneus*. pg 65
- Figura 9 Atividades de α -galactosidase, β -glucosidase e α -manosidase nas frações cromatográficas provenientes das colunas: fenil-agarose (esquerda) e S-200 (direita), nas quais foram aplicadas amostras de macerado do reto de *Acromyrmex subterraneus*. pg 67
- Figura 10 Atividade contra MU- β -quitotriosídeo nas frações cromatográficas provenientes da coluna fenil-agarose, na qual aplicou-se amostras de macerado do reto (R) e glândula labial (Gl) de operárias de *Acromyrmex subterraneus*. pg 68
- Figura 11 Atividade de proteinases nas frações cromatográficas provenientes da coluna S-200, na qual aplicou-se amostras de macerado do reto de *Acromyrmex subterraneus*. pg 69

- Figura 12 SDS-PAGE 8% usado para detecção da atividade de α -glucosidase (setas brancas) do intestino médio e reto de *Acromyrmex subterraneus* (A). Atividades contra NP α Glu nas tiras de um gel 10% onde se aplicou amostras de 25 intestinos médios (B) e 18 retos (C). O gel foi cortado em 35 tiras de 1,6 mm cada. pg 71
- Figura 13 SDS-PAGES para detecção de β -glucosidases, α -galactosidases, α -amilases, quitinases e proteinases no trato digestivo de operárias de *Acromyrmex subterraneus*. As setas indicam a presença de bandas de atividade. Abreviações: IM, intestino médio; Ab, abdômen macerado em N₂; Tr, tórax macerado em N₂. pg 72
- Figura 14 Atividade de α -glucosidase e β -glucosidase nas frações cromatográficas provenientes da coluna fenil-agarose, na qual aplicou-se amostras de macerado de intestino médio de larva de *Acromyrmex subterraneus*. Os substratos ensaiados foram: NP α Glu, NP β Glu e celobiose. pg 76
- Figura 15 Atividades contra NP α Gal, melibiose, rafinose e NP α Man, expressas em mU/ml, nas frações cromatográficas provenientes da coluna fenil-agarose, na qual aplicou-se amostras de macerado de intestino médio de larva de *Acromyrmex subterraneus*. pg 78
- Figura 16 Atividade para MU- β -quitotriosídeo, expressa em mU/ml, nas frações cromatográficas provenientes da coluna fenil-agarose, na qual aplicou-se amostras de macerado do intestino médio (IM) e glândula labial (GL) de larvas de *Acromyrmex subterraneus*. pg 79
- Figura 17 Atividades contra amido, glicogênio e laminarina, expressas em mU/ml, nas frações cromatográficas provenientes da coluna fenil-agarose, na qual aplicou-se amostras de macerado de intestino médio de larva de *Acromyrmex subterraneus*. pg 80
- Figura 18 SDS-PAGES para detecção de α -glucosidase, β -glucosidases, α -galactosidases, α -amilases, quitinases e proteinases no trato digestivo das larvas de *Acromyrmex subterraneus*. As setas indicam a presença de bandas de atividade. Abreviações: IM, intestino médio; ecto, conteúdo luminal do espaço ectoperitrófico; endo, conteúdo luminal do espaço endoperitrófico; GL, glândula labial. pg 82
- Figura 19 SDS-PAGES para detecção de β -glucosidases, α -amilase e proteinases no jardim (Jar) e hifas (Hif) do fungo simbionte cultivado por *Acromyrmex subterraneus*. As setas indicam a presença de bandas de atividade. pg 86

Figura 20 Atividades de β -glicosidase e quitinase/lisozima nas frações cromatográficas provenientes da coluna fenil-agarose, na qual aplicou-se filtrado de meio de cultura líquido usado para o desenvolvimento do fungo simbiote cultivado por *Acromyrmex subterraneus*. pg 88

RESUMO

ERTHAL JUNIOR, MILTON; D.S; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darci Ribeiro; Janeiro de 2003; Enzimas digestivas presentes no intestino da formiga cortadeira *Acromyrmex subterraneus* Forel, 1893 (Hymenoptera: Formicidae) e no seu fungo simbiote; Prof. Orientador: Richard Ian Samuels; Professores conselheiros: Carlos Peres Silva e Ana Maria Matoso Viana-Bailez.

Este trabalho aborda aspectos da fisiologia da digestão da formiga cortadeira *Acromyrmex subterraneus* Forel, 1893, popularmente conhecida como quenquém-caiapó, que é uma importante praga agrícola do Brasil. A atividade das enzimas digestivas foi avaliada nas glândulas labiais, conteúdo luminal e tecido epitelial do intestino médio e reto das operárias, e nas glândulas labiais e intestino médio das larvas. As faixas de pH e o fluxo do corante azul de Evan's no papo, intestino médio, íleo e reto das operárias, e intestino médio das larvas, respectivamente, também foram avaliados. Substratos que apresentaram degradação significativa quando incubados com amostras dos intestinos foram testados contra amostras do jardim de fungo e hifas do fungo simbiote para se detectar indícios da procedência fúngica de enzimas. As enzimas das formigas e do fungo simbiote que apresentaram atividades majoritárias foram parcialmente caracterizadas. Os dados obtidos permitem concluir que algumas enzimas são

produzidas pelos insetos (tecido epitelial e glândula labial), enquanto que algumas carboidrases, principalmente as relacionadas com a degradação de polímeros de plantas, parecem ser provenientes do fungo simbiote. As operárias apresentam altas atividades de α -glucosidase e quitinase no intestino médio, enquanto que, no reto, além destas enzimas, outras atividades foram expressivas, indicando que este órgão funciona como reservatório de enzimas. Altas atividades de α -glucosidase e quitinase na glândula labial indicam que os insetos produzem estas enzimas. A defecação sobre o material vegetal e sobre o próprio corpo sugere que o líquido fecal pode ter papel importante na degradação de compostos presentes nas plantas ou no controle microbiano do ninho. O pH ácido do reto também pode estar envolvido na inibição das proteinases ali presentes, já que o tempo de permanência da dieta e, conseqüentemente, de outras enzimas neste compartimento, pode durar até 10 dias. As larvas apresentaram grande diversidade de enzimas relacionadas na degradação de fungo, polímero de plantas, oligômeros e dissacarídeos, além de intensa atividade proteolítica. Igual os adultos e com atividades mais expressivas, a glândula labial das larvas secreta quitinase, amilase e aminopeptidase, o que sustenta o hábito alimentar micófago nesta fase. A compartimentação de oligo e dissacaridases no espaço ectoperitrófico e polissacaridases no espaço endoperitrófico não acontece apontando para um modelo de digestão não muito organizada, semelhante aos ancestrais holometábolos. No entanto, variações nas faixas de pH (ácido na porção anterior do intestino médio e neutro a alcalino na porção posterior) indicam diferenças de ambiente que podem estar favorecendo a atividades de algumas enzimas em locais específicos do intestino médio. O fato das larvas de formigas cortadeiras não defecarem até a fase de pré-pupa, pode ter dispensado um fluxo intenso de solutos e enzimas entre os espaços ecto-endoperitrófico para auxiliar a digestão. De fato, o corante azul de Evan's apresenta lenta movimentação através do intestino médio. A detecção de atividade e caracterização parcial das enzimas majoritárias do jardim e hifas fúngicas apresenta forte indício de que as enzimas: pectinase, laminarinase, quitinase, amilase, α -galactosidase e β -glucosidase podem estar sendo produzidas pelo fungo simbiote. O crescimento do fungo no meio líquido contendo parede celular de plantas possibilitou constatar a capacidade deste fungo na secreção de algumas destas enzimas, principalmente as direcionadas a polímeros de plantas.

ABSTRACT

ERTHAL JUNIOR, MILTON; D.S; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darci Ribeiro; January 2003; Digestive enzymes present in the gut of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus*, Forel, 1893 (Hymenoptera: Formicidae) and in the symbiotic fungi. Advisor: Richard Ian Samuels; Committee members: Carlos Peres Silva and Ana Maria Matoso Viana-Bailez.

This work explored aspects of the digestive physiology of *Acromyrmex subterraneus* Forel, 1893 a leaf-cutting ant, and important agricultural pest of Neotropical region. The determination of enzymatic activity and partial characterization of major enzymes activities present in labial glands, luminal contents and epithelial tissues of the midgut and rectum of workers, and labial glands and midgut of larvae. The pH ranges and flux of Evan's blue through the alimentary channel, starting in the crop, midgut, ileum and rectum, and midgut of larvae, respectively, were evaluated. Substrates that showed high level of degradation when incubated with gut samples, were tested against fungus garden and hyphae of the symbiotic fungi in order to indicate enzyme origin. The results show that insects are able to produce certain digestive enzymes, associated with epithelial tissues and labial glands, necessary in their digestion, nevertheless, some carbohydrases, mainly related with plant polymers degradation, are probably

provided by the symbiotic fungi. The workers show high activities of an α -glucosidase and quitinase in the midgut, as well as in the rectum, beside this enzymes, many others activities were detected, indicating that this organ has enzyme storage function. High activities for α -glucosidases and quitinase in midgut epithelium tissue and in the labial gland, respectively, indicate enzymes origin. Defecation on fresh plant material seems to be related to plant polymer degradation and microbial control inside the nest. The acid pH of the rectum pH, may also prevent proteolytic activity in this compartment, protecting other enzymes from deterioration during the 10 days that material is maintained in this compartment. The larvae present a high diversity of active enzymes related with degradations of fungi, plant polymers, oligomers and disaccharides, beside intense proteolytic activities. As for the workers, larvae have a high activity for quitinase, amylase and traces of aminopeptidase in labial glands, what sustain the mycophagous feeding behaviour of these ant larvae. The compartmentation of oligo and disaccharidases in ecto-endoperitrophic space did not occur, which suggest basic digestion model, similar to holometabolous ancestors. The variations in pH ranges (acid in midgut anterior region and neutral to alkaline in posterior region) indicate that different environments can be favorable to enzymes activity. The fact that larvae of leaf-cutting ants do not defecate before the pre-pupal stage. This could cause an intense flux of solutes and enzymes between a ecto-endoperitrophic spaces to maximize the digestion. In fact, Evan's blue show a very slow flux rate through the midgut (after five days remaining in the anterior region). The detection of activity and parcial characterization of enzymes from the fungus garden and hypha, demonstrated that: pectinase, laminarinase, chitinase, amylase, α -galactosidase and β -glucosidase, can be produced by the mutualistic fungi. The development of the fungi in a liquid medium containing plant cell wall, should the capacity of these fungi to produce these enzymes for plant polymers degradation.

1. INTRODUÇÃO

As formigas apresentam destacado sucesso ecológico, pois são amplamente distribuídas no mundo, capazes de ocupar nichos bastante diferenciados e por serem dominantes em relação à biomassa animal (Hölldobler e Wilson, 1994). A história evolutiva das formigas demonstra, ainda, que elas apresentam longevidade filética mais acentuada do que outros grupos de animais (baixa taxa de extinção), indicando sua adaptabilidade a mudanças do clima do planeta (Wilson, 1987). Para justificar este mérito, os principais fatores considerados por Hölldobler e Wilson (1990) são: o surgimento da glândula metatorácica, a exploração de um nicho rico em recursos (predação na superfície do solo) e pelo comportamento eusocial, caracterizado pela sobreposição de gerações, divisão de trabalho entre castas reprodutivas e estéreis e o cuidado com a prole. O comportamento eusocial favoreceu o surgimento do forrageamento em grupo, que, em geral, é mais eficiente para a obtenção de alimento e defesa (Ydenberg e Schmid-Hempel, 1994).

Na região Neotropical, a subfamília Myrmicinae é a mais diversa, considerando-se a abundância e a riqueza de espécies, sendo que mais de 1000 foram descritas (Caetano *et al.*, 2002). As espécies de Myrmicinae de maior sucesso ecológico são as pertencentes à tribo Attini, que apresentam,

aproximadamente, 200 espécies descritas e que cultivam, em seus ninhos, fungos simbioses da ordem Agarales, família Lepiotacea, que é usado como alimento e fonte de enzimas digestivas que auxiliam o processo digestivo das formigas (Mueller *et al.*, 2001). Muitos estudos têm demonstrado que esta coevolução gerou uma interdependência entre formigas Attini e seus fungos, de modo que ambos não sobrevivem isoladamente (Martin, 1992).

Em outras associações mutualísticas estáveis entre insetos e fungos, como observado para os cupins Macrotermitinae e vespa da madeira (Siricidae), ocorrem adaptações nestes organismos que facilitam a perpetuação desta associação e promovem relações de interdependência (Martin e Martin, 1978; Kukor e Martin, 1983). Os fungos envolvidos nestas simbioses recebem um ambiente adequado para o seu desenvolvimento, com recurso disponível, umidade e ausência de competidores, além de deixarem sua propagação a cargo dos insetos (Martin, 1992). Por outro lado, os insetos se beneficiam pela aquisição de alimento (micofagia) e enzimas digestivas, que ficam ativas no intestino dos insetos, contribuindo, principalmente, na degradação de polímeros de plantas (Benjamin *et al.*, 2000). Os esporos e hifas de fungos são ricos em carboidratos, proteínas e lipídeos e, por isso, constituem uma dieta equilibrada para os insetos, podendo suprir larvas (que exigem alimento rico em proteína) e adultos (exigentes para carboidratos) (Kendrick, 1992).

A maioria dos attines utiliza material vegetal e animal em decomposição como substrato para o desenvolvimento do fungo simbiote, exceto as formigas cortadeiras, pertencentes aos gêneros *Acromyrmex* e *Atta*, que usam folhas frescas para o cultivo do fungo (Weber, 1972). As formigas cortadeiras apresentam alta complexidade social, colônias populosas, sendo algumas espécies altamente polimórficas, o que permite forrageamento eficiente de grandes volumes de material vegetal. Estes insetos consomem entre 13 a 17 % da vegetação da floresta amazônica e por isso são considerados herbívoros dominantes da Região Neotropical (Hölldobler e Wilson, 1990). Em razão da herbivoria acentuada e das grandes perdas provocadas nos sistemas agropecuário e florestal, estes insetos são considerados as principais pragas agrícolas da América do Sul (Cherrett, 1986; Fowler *et al.*, 1989). A espécie *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, popularmente conhecida como quenquém-caiapó, encontra-se amplamente distribuída no Brasil, ocorrendo

também no Peru, Bolívia, Paraguai e Argentina (Della Lucia, 1993). A quenquém-caiapó apresenta os maiores e mais populosos formigueiros do seu gênero. Além disso, o fato de cortar folhas de dicotiledôneas, muitas delas cultivadas pelo homem (hortaliças, videira, pessegueiro, laranjeira, etc) torna esta formiga uma praga agrícola de grande importância no Brasil (Gonçalves, 1961, 1964).

Grande parte da biomassa vegetal coletada não é de fato consumida diretamente pelas formigas, sendo usada como substrato para o desenvolvimento do fungo mutualístico, o qual, em troca oferece nutrientes para as colônias. O fungo é o alimento exclusivo das larvas e adultos alados (machos e fêmeas virgens) e complementa a dieta das operárias e rainhas (Hölldobler e Wilson, 1990). Além de oferecer alimento às formigas, o fungo é a fonte exclusiva de algumas enzimas digestivas (Boyd e Martin, 1975a). Boyd e Martin (1975b) demonstraram que três proteinases presentes no fluido fecal de adultos de *Atta texana* eram obtidas do fungo simbiote, e este resultado levou estes autores a sugerirem que estes insetos teriam perdido a habilidade de produzir suas próprias hidrolases. Febvay e Kermarrec (1986) mostraram a presença de lipase, maltase, trealase e peptidases no intestino-médio de larvas e adultos de *Acromyrmex octospinosus*, além de atividade quitinolítica nas suas glândulas labiais. No entanto, a origem destas enzimas não foi avaliada.

O fungo cultivado por estas formigas cortadeiras não é o único microorganismo presente nos ninhos (Carreiro *et al.*, 1997; Currie *et al.*, 1999; Santos, 2003) e, portanto, as enzimas digestivas encontradas no trato digestivo de larvas e adultos podem ser secretadas por bactérias e leveduras presentes no ninho. Outra possível fonte de enzimas pode ser os microorganismos simbiotes presentes em regiões especializadas do canal alimentar (Caetano, 1984; Boursaux-Eude e Gross, 2000; Borm *et al.*, 2002). Além dos microorganismos, é possível que, durante a manipulação da vegetação, as formigas obtenham algumas enzimas presentes nos tecidos das plantas. Desta forma, somente uma caracterização detalhada das enzimas envolvidas na fisiologia da digestão das formigas cortadeiras e seus fungos mutualísticos poderá nos levar a uma melhor compreensão desta interação.

Portanto, somente um estudo detalhado pode esclarecer a origem e o papel das enzimas digestivas produzidas pelos fungos, as quais são ingeridas pelas formigas, podendo estar envolvidas na digestão do alimento, ou associadas

à degradação da vegetação através da deposição de líquido fecal, que pode facilitar a colonização do fungo simbiote. Estudos mais detalhados também são necessários para caracterização das enzimas digestivas produzidas pelas próprias formigas (larvas e adultos). O conhecimento das interações fisiológicas entre insetos e fungos é um aspecto importante para entender melhor os mecanismos do mutualismo e sua evolução.

Um aspecto interessante ao se estudar digestão em insetos é o desenvolvimento de métodos de controle que atuem interferindo nas funções do intestino (Terra e Ferreira, 1994). Um melhor conhecimento das interações entre as formigas cortadeiras e seus fungos poderia conduzir a novos métodos de controle que atinjam processos específicos da fisiologia e bioquímica destes insetos e seus fungos mutualísticos.

Atualmente, o controle das formigas cortadeiras é possível somente pelo uso de produtos químicos. O método recomendado é a utilização de iscas granuladas contendo sulfluramida com polpa de citros. A isca granulada deve ser atrativa às formigas, de modo que sejam transportadas para o interior dos ninhos. Esse produto é um tóxico pertencente a uma classes de inseticidas de ação lenta, portanto três vezes menos tóxico para mamíferos que o dodecacloro, um inseticida amplamente utilizado na década de 1980 (Della Lucia, 1993). Apesar da baixa toxicidade para mamíferos, as iscas de sulfluramida podem atingir outros insetos e invertebrados benéficos, causando alterações indesejáveis no ecossistema. Portanto, uma forma de controle específica, atingindo somente a interação inseto-fungo, seria menos prejudicial ao meio ambiente.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar alguns aspectos relacionados à fisiologia da digestão de operárias e larvas de *Acromyrmex subterraneus*, tais como: o fluxo da dieta, pH e atividade de enzimas digestivas em alguns compartimentos do canal alimentar. O fungo simbionte cultivado por *A. subterraneus* também foi investigado em relação à atividade enzimática.

Pontos específicos:

- a) Determinação do pH, tempo de preenchimento e tempo de residência da dieta no intestino médio das larvas; e papo, intestino médio, íleo e reto dos adultos.
- b) Avaliação da atividade de enzimas digestivas presentes na glândula labial, tecido epitelial e conteúdo luminal do intestino médio e reto das operárias. Nas larvas, a atividade enzimática foi investigada na glândula labial, tecido epitelial e conteúdo luminal do intestino médio. A matriz peritrófica presente no conteúdo luminal do intestino médio das larvas divide os espaços ectoperitrófico e endoperitrófico, sendo que a atividade hidrolítica foi avaliada em ambos separadamente.

- c) Investigação das enzimas presentes nas hifas e jardim do fungo simbiote (*in vivo*), assim como a atividade de enzimas secretadas pelo fungo quando cultivado em meio de cultura adequado para o seu desenvolvimento (*in vitro*).

- d) Caracterização parcial das enzimas digestivas das operárias, larvas e fungo simbiote que apresentam atividades majoritárias, através de duas colunas de cromatografia (interação hidrofóbica e filtração em gel), uso de SDS-PAGES e pH ótimo de atividade.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 – Digestão em insetos

Os insetos apresentam hábito alimentar muito diversificado, podendo ser divididos em 5 categorias segundo o nível trófico do alimento que consomem: herbívoros (alimentam-se de plantas), carnívoros (consomem animais vivos), sapróvoros ou detritívoros (comem matéria orgânica animal ou vegetal em decomposição), fungívoros (consomem fungos) e onívoros (comem mais de um tipo de alimento citado anteriormente).

Em geral, a digestão do alimento nos insetos pode ocorrer ao longo de todo o aparelho digestivo, mas é no intestino médio que a maior parte das hidrolases estão presentes e onde o alimento é assimilado (Chapman, 1988). O processo digestivo ocorre em três fases: digestão inicial (polímeros maiores); digestão intermediária (oligômeros); e digestão final (dímeros e pequenos oligômeros) (Terra, 1991).

Muitas espécies de insetos apresentam no intestino médio a matriz peritrófica (MP), que tem papel importante na proteção das células epiteliais, digestão e compartimentação do conteúdo luminal (Tellam, 1996). A MP é uma película fina, não celular, que envolve o alimento dentro do ventrículo e é formada

por quitina, proteínas e carboidratos. A presença da MP separa o conteúdo luminal em dois compartimentos: espaço endoperitrófico (conteúdo luminal envolto pela MP) e ectoperitrófico (conteúdo luminal presente entre a MP e o epitélio) (Terra, 1988). Ao chegar ao intestino médio, o alimento permanece no espaço endoperitrófico, onde ocorre a digestão de polímeros complexos em partículas menores, que atravessam a MP e chegam ao espaço ectoperitrófico, onde ocorre a digestão intermediária e final, sendo que esta última também pode ocorrer nas microvilosidades das células epiteliais (Terra, 1991). No entanto, algumas espécies de insetos não apresentam este tipo de organização durante o processo digestivo. Em holometábolos primitivos (besouros) e alguns avançados (himenópteros) a digestão pré-oral e no papo, realizada por enzimas secretadas pelo sistema glandular e provenientes do intestino médio, tem papel digestivo importante. Nestas espécies, é comum observar-se a matriz peritrófica no estado gelatinoso no intestino médio e não há divisão entre digestão inicial, intermediária e final entre os espaços endo-ectoperitróficos (Terra, 1998).

O epitélio do intestino médio dos insetos é composto por células especializadas, que são responsáveis pela extrusão e absorção de água e íons, entre outras funções (Terra e Ferreira, 1994). A circulação da água aliada ao potencial osmótico gerado pela liberação de íons provoca o fluxo de solutos entre os espaços endo e ectoperitrófico, conduzindo o alimento aos locais de digestão e absorção e é responsável pela compartimentação de enzimas digestivas (Terra, 1988).

3.2 - Digestão na ordem Hymenoptera

Esta ordem apresenta cerca de 108.000 espécies descritas, e estima-se que possam existir mais de 150.000 espécies. Os principais representantes desta ordem são as abelhas, formigas, vespas, come-aranhas (Pompilidae) e mamangavas (Buzzi & Miyazaki, 1998). Os insetos desta ordem exibem grande diversidade de hábitos e comportamentos, como a organização da eusocialidade observada em vespas, abelhas e formigas. Esta ordem é dividida em duas subordens: Symphyta, que são considerados os mais próximos dos ancestrais himenópteros, sendo a maioria dos seus representantes herbívoros; e Apocrita, que se divide em dois grupos: a) Parasítica, que são geralmente predadores ou

parasitóides de outros insetos; b) Aculeata, agrupa a maioria das espécies de Hymenoptera, são geralmente predadores ou parasitóides, no entanto, a fitofagia ressurgiu várias vezes (Daly *et al.*, 1998). A subordem Apocrita inclui as abelhas, vespas e formigas, que apresentam grande diversidade de hábito alimentar.

O sistema digestivo dos himenópteros ainda é pobremente conhecido, já que os escassos trabalhos existentes são sobre adultos pertencentes às famílias mais derivadas (ex. formigas, vespas, abelhas), enquanto que os insetos da subordem Symphyta ainda são pobremente estudados, o que impede fazer uma análise evolutiva sobre a fisiologia da digestão para esta ordem (Terra, 1998). Algumas modificações fisiológicas, como a ausência dos cercos gástricos na porção anterior do intestino médio, a perda do papo nas larvas, e tendência à aquisição de enzimas digestivas de origem fúngica para auxiliar na digestão apontam para um modelo de digestão típica de insetos mais derivados (Terra, 1990). Apesar da não-translocação de enzimas digestivas do ventrículo para o papo ser uma característica de alguns himenópteros (Terra, 1991), dados da nossa equipe (Denise D.O. Moreira, comunicação pessoal) indicam que esta característica ocorre para a formiga cortadeira *A. subterraneus*, que é um fato comum entre holometábolos primitivos como Coleoptera. Portanto, uma análise grosseira da fisiologia da digestão de Hymenoptera aponta para uma mistura de características entre holometábolos avançados e primitivos.

As larvas de Aculeata apresentam um intestino médio fechado posteriormente, que se encontra desligado do intestino posterior até a época da pupação. Esta característica é, possivelmente, uma herança dos ancestrais endoparasitas, cujas larvas armazenavam o bolo fecal para evitar a soltura de compostos tóxicos no interior do hospedeiro (Terra, 1991; Terra, 1988).

O comportamento social observado em várias espécies possibilita associações íntimas entre larvas e adultos que resultam na troca de alimentos digeridos e enzimas digestivas (Wilson, 1971; Hölldobler e Wilson, 1990). Portanto, o estudo do comportamento alimentar e do processo digestivo destes insetos deve considerar os aspectos individuais de cada casta e a interação entre elas (ex.: larvas x operárias, rainhas x operárias, e entre diferentes castas de operárias) para que a dinâmica de nutrientes na colônia seja compreendida.

3.2.1 - Digestão em Aculeata

Parasitóides: o estudo do processo digestivo de algumas espécies de parasitóides que apresentam importância no controle biológico de pragas tem sido encorajado, principalmente, para elaboração de dietas com propriedades químicas e físicas mais eficientes destinadas à criação destes insetos em laboratório (Jargees *et al.*, 1998; Baker e Fabrick, 2000). O conhecimento atual sobre digestão de himenópteros parasitóides inclui apenas alguns aspectos morfológicos do trato digestivo de *Trichogramma australium* (Jargees *et al.*, 1998) e a constatação de atividade e caracterização parcial de proteinases presentes no intestino médio de *Habrobracon hebetor* (Baker e Fabrick, 2000).

Abelhas: a superfamília Apoidea, onde as abelhas estão inseridas, é dividida em 10 subfamílias, onde a maioria das espécies é fitófaga, explorando geralmente as flores. No entanto, variações no hábito alimentar podem ser observados na família Megachilidae, cujas operárias coletam folhas de plantas como alimento, e para algumas espécies das subfamílias Nomadinae e Xylocopinae, que são parasitas de outras abelhas (Borror *et al.*, 1992).

As abelhas podem apresentar hábitos solitários até eusocial, sendo que as espécies que exibem comportamento social complexo apresentam, geralmente, alta frequência de contato entre indivíduos, que resulta na troca de alimento por trofalaxia, o que pode refletir em adaptações bioquímicas que visem ao bem-estar da colônia. (Wilson, 1971). Os adultos das abelhas *Apis mellifera* forrageiam por néctar e pólen, que constituem a base da dieta da colônia (Ramalho *et al.*, 1991). As larvas de rainhas são alimentadas com uma secreção glandular liberada pelos adultos denominada geléia real, enquanto que as larvas de operárias e zangões são nutridos com uma mistura de geléia real, mel e pólen. O néctar é rico em sacarose, e durante sua permanência no papo dos adultos, este alimento é degradado por uma sacarase (alfa-glicosidase) produzida pela glândula hipofaringeana (Terra, 1991). Esta glândula também produz quitinase e fosfatase ácida (Costa e Cruz-Lamdim, 2002). O conteúdo do papo é frequentemente regurgitado pelas operárias para que o alimento forrageado seja mais bem distribuído na colônia (Wilson, 1971). Os grãos de pólen também ficam

armazenados no papo, sendo seletivamente transferidos para o intestino médio, onde ficam retidos no espaço endoperitrófico, incham devido à baixa pressão existente neste compartimento e expõem o protoplasma. O alimento presente no papo pode ser regurgitado ou transferido para o ventrículo, onde o alimento sofre ação de outras hidrolases e é absorvido para atender às necessidades energéticas do indivíduo. A atividade de lipases foi verificada no ventrículo de *A. mellifera carnica*. Os lipídeos são provenientes do grão de pólen, e demonstrou-se que quanto mais velha é a operária, maior sua habilidade para degradar estes compostos (Loild e Crailsheim, 2001).

A absorção de leucina e glicose ocorre na porção anterior do ventrículo dos adultos de *A. mellifera*. Estes dados sugerem que as enzimas e nutrientes atravessam a matriz peritrófica e são carregados para os sítios de absorção pelo fluxo de fluidos. Este fluxo de solutos ocorre devido à presença física da matriz peritrófica, e de células especializadas, responsáveis pela extrusão e absorção de água e íons (Terra e Ferreira, 1994). As rainhas de muitas abelhas se alimentam de ovos colocados por operárias e de células contendo mel.

Vespas: o hábito alimentar dos insetos da família Vespidae consiste em madeira em decomposição, conteúdo celular de plantas, pólen, néctar e artrópodos. De um modo geral, as vespas alimentam suas larvas com insetos e outros artrópodos, enquanto que os adultos usam o néctar das flores como principal alimento (Ramalho *et al.*, 1991). As larvas são alimentadas diretamente pelos adultos, e retribuem secretando gotas de fluidos salivares ricas em nutrientes que são coletadas pelas operárias (Wilson, 1971). As operárias de *Vespula* spp. são atraídas para as secreções salivares das larvas que contêm, em média, 9% de trealose e glicose e uma pequena porção de aminoácidos e proteínas (Wilson, 1971). A glândula salivar destes insetos é bem desenvolvida e seu conteúdo rico em carboidratos. Funcionalmente, esta glândula assemelha-se a um “papo social”, que estoca alimento para a colônia, liberando-o de acordo com a necessidade dos indivíduos. Um outro ponto interessante é a capacidade exclusiva que as larvas de *Vespula occidentalis* apresentam na degradação de proteínas, pois estes indivíduos são os únicos da colônia a possuírem uma quimotripsina e duas carboxipeptidases (Wilson, 1971). Os adultos também

apresentam restrita capacidade para degradar carboidratos, sugerindo que, nas colônias destas vespas, ocorre uma divisão bioquímica do trabalho entre adultos e larvas. Alguns autores sugerem, ainda, que as regurgitações das larvas também têm papel importante na manutenção da umidade e temperatura no interior dos ninhos (Wilson, 1971).

A anatomia do trato digestivo dos adultos da vespa *Protopolybia exigua* exibe uma constituição normalmente encontrada na maioria dos himenópteros: cavidade bucal, faringe, esôfago, papo, proventrículo, ventrículo, intestino fino, ânus e ligação reto-ânus (Caetano e Machado, 1982). Estes autores não observaram variações morfométricas acentuadas das partes do trato digestivo entre as castas de *P. exigua*, no entanto, ocorre variação significativa na atividade hidrolítica entre diferentes castas (Machado e Tauk, 1975). Nestas vespas, a atividade contra os carboidratos amido, maltose, sacarose e trealose, e contra a caseína (substrato protéico) foi maior para as rainhas e variável entre as operárias, sendo que a atividade de invertases aumentou nas castas menores. A atividade para amido foi maior no intestino posterior, sugerindo interação com outros indivíduos da colônia, visto que este compartimento não é especializado na absorção de nutrientes.

A troca de alimentos entre adultos e entre larvas e adultos parece ser uma característica comum entre as vespas sociais avançadas e primitivas. No entanto, pouco se sabe sobre o comportamento alimentar em vespas solitárias ou com comportamento pré-social, tornando difícil as considerações evolutivas sobre aspectos digestivos destes insetos.

A fisiologia da digestão da vespa da madeira *Sirex* se assemelha à das formigas cortadeiras, pois ambas utilizam um fungo simbiote usado como alimento (Martin, 1992). As larvas da vespa-da-madeira (Siricidae - subordem Symphyta) alimentam-se de madeira em decomposição e obtêm celulase e xilanase presentes nas hifas do fungo simbiote que se desenvolve neste substrato. A retenção destas enzimas no intestino pode ser o resultado da circulação ecto-endoperitrófica (Kukor e Martin, 1983).

3.3 - Digestão em formigas

As formigas são derivadas das vespas e a classificação atual da família Formicidae considera válida a existência de 11 subfamílias, divididas em dois grandes grupos: os poneróides e os formicóides (Wilson, 1971; Hölldobler e Wilson, 1990, Fowler *et al.*, 1991). Diferenças na morfologia do abdômen separam estes dois grupos de formigas e refletem também seus hábitos alimentares. As formigas poneróides apresentam um ventrículo estreito, com pouca capacidade de armazenamento de alimento e musculatura associada ao ferrão bem desenvolvida, enquanto que os formicóides (grupo considerado mais avançado) apresentam aparelho digestivo não-tubular, adaptando-se para o armazenamento de alimento líquido e com tendência à perda do ferrão.

3.3.1 - Hábito alimentar

As formigas alimentam-se de recursos muito diversificados, que podem ser de origem fúngica, vegetal ou animal, incluindo o honeydew (Caroll e Janzen, 1973) e, em função do seu hábito alimentar, podem ser separadas como herbívoras, carnívoras, detritívoras ou onívoras (Fowler, 1991). A utilização de alimento de mais de um nível trófico é comum entre as formigas, de modo que a onivoria pode ser considerada o hábito mais comum (Hölldobler e Wilson, 1990). Apesar das diferenças observadas entre o aparelho digestivo das poneróides (geralmente predadora) e a dos formicóides (geralmente associadas com afídeos), o que indica tendências em relação ao seu hábito alimentar, ambos os grupos (primitivas e avançadas) apresentam adaptações para utilizarem recursos variáveis. Um exemplo é a existências de predação em Formicinae e a presença de espécies de Myrmicinae na associação com homópteros (Hölldobler e Wilson, 1990).

Predação

Os registros fósseis indicam que o hábito alimentar primitivo das formigas era a predação de outros artrópodos, sendo outras espécies de formigas os hospedeiros mais utilizados (Wilson, 1971, Daly *et al.*, 1998). Segundo Hölldobler e Wilson (1990), um dos fatores que contribuíram para o sucesso destes insetos

foi o fato das formigas serem os primeiros organismos eusociais com hábito predador a nidificar e forragear na superfície do solo. O hábito predador se manteve até o presente, pois a grande maioria das espécies atual de formigas utiliza insetos para obter proteína (Sudd, 1982). As espécies de formigas com o hábito predatório são muito abundantes e a maioria delas complementam sua dieta através do saprofitismo e secreções de Homoptera, sendo poucas as espécies estritamente predadoras (Carroll e Janzen, 1973). Hölldobler e Wilson (1990) registraram cerca de 80 espécies de formigas predadoras especialistas, o que é pouco representativo em relação ao número atual de espécies descritas (9.500 espécies). Segundo Sudd (1982) o contato íntimo das formigas primitivas com o solo e raízes de plantas pode ter gerado novas oportunidades que favoreceram a diferenciação do hábito alimentar.

Saprofagia

As formigas saprófagas são oportunistas e podem se alimentar de resíduos de animais (ex.: fezes de pássaros, insetos mortos, carcaças de animais mortos) e material vegetal em decomposição (ex.: pedaços de frutos) (Carroll e Janzen, 1973). Embora muitas formigas apresentem hábitos alimentares bastante diversificados, dificultando sua classificação em relação ao papel ecológico das mesmas, algumas são estritamente saprófitas (ex.: *Tetramorium*, *Monomorium*, *Solenopsis*, *Pheidole*, *Myrmica*, *Leptothorax*, *Iridomyrmex*, *Lasius*, espécies primitivas da tribo Attini, etc).

As estratégias de forrageamento utilizadas por formigas saprófagas, em geral, maximizam o número de procuras e minimizam o custo por procura, e desenvolveram mecanismos para uma rápida atração de companheiras para a fonte de alimento. Estas espécies apresentam geralmente muitas operárias pequenas por colônia, sistema de comunicação química bem desenvolvido e são muito agressivas. Nas espécies polimórficas (ex.: *Camponotus*, *Solenopsis* e *Pheidole*), as formigas pequenas forrageiam, enquanto que as maiores defendem o recurso alimentar.

Coletoras de sementes

Os óleos que recobrem algumas sementes (eliossoma) são utilizados como recurso por muitas espécies de formigas. A dureza da semente e sua composição química são fatores determinantes na sua seleção. Além de apresentarem alto valor energético, as sementes, ao contrário de animais, podem ser estocadas e diminuir a necessidade de forrageamento (Carroll e Janzen, 1973). Entre as estratégias adotadas para diminuir o risco de intoxicação, um armamento bioquímico é liberado. A presença da casta dos soldados é uma característica comum e de grande importância para estas formigas, pois estes indivíduos carregam sementes grandes e trituram as duras (Hölldobler e Wilson, 1990).

Associação com plantas

As formigas que se alimentam de plantas podem ser divididas em três categorias. A primeira compreende as formigas que apresentam associações mutualísticas com plantas, onde obtêm abrigo e alimento, e em troca oferecem para os hospedeiros defesa contra herbívoros e plantas competidoras (Janzen, 1966; Janzen, 1968). O segundo grupo são as formigas que se alimentam de honeydew, solução açucarada liberada por homópteros, sendo, assim, uma associação indireta. O terceiro grupo são as Attini (Myrmecinae), que utilizam materiais vegetais para obter seiva e para o cultivo do fungo simbionte por elas cultivado em seus ninhos (Weber, 1972).

Muitas espécies de formigas utilizam a glicose, frutose e, menos freqüentemente, aminoácidos produzidos por plantas, que suprem suas necessidades energéticas, possibilitando uma busca mais eficiente por presas ricas em proteínas e lipídeos (Davidson, 1997). Esta característica é um fator importante para explicar a abundância destas formigas (excedendo inclusive a abundâncias de suas presas) na copa das árvores das regiões tropicais, onde elas representam até 70% da biomassa de artrópodos que habitam o dossel.

As formigas Attini, que coletam exclusivamente plantas frescas, são as espécies dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, enquanto que algumas espécies de *Trachimyrmex* e *Sericomyrmex* podem, ocasionalmente, utilizar este tipo de recurso (Anjos *et al.*, 1998). As formigas cortadeiras são consideradas herbívoras dominantes na região Neotropical, pois consomem mais vegetação que qualquer

outro grupo taxonômico, utilizando-se de grande diversidade de plantas (Cherrett, 1986). Estes insetos são altamente polípagos, podendo utilizar mais de 60% das espécies de plantas em ecossistemas de cerrado e floresta amazônica (Cherrett *et al.*, 1989; Schoereder e Colinho, 1991). Na América Central, *Atta cephalotes* e *Atta colombica*, que são duas espécies de saúvas endêmicas, apresentam preferência por 22% e 31% das plantas que elas exploram (Rockwood, 1976). Esta polifagia acentuada pode ser explicada pela simbiose entre as formigas e o fungo, já que as formigas retiram as barreiras físicas das plantas e depositam enzimas nos fragmentos de folhas que facilitam a penetração do fungo. Por outro lado, o fungo metaboliza o material vegetal, inclusive compostos tóxicos, e devolve em forma de alimento para as formigas.

Apesar de serem polípagas, as formigas cortadeiras selecionam as plantas que cortam e os fatores que afetam esta seletividade podem ser físicos ou químicos. Entre os fatores químicos, destacam-se a qualidade e a quantidade de nutrientes nas folhas, o teor de água e a presença de compostos secundários das plantas que tenham efeito sobre as formigas, fungo simbiote ou ambos. A quantidade de tricomas, dureza do material vegetal e presença de látex são características físicas igualmente importantes na seletividade do substrato (Cherrett, 1989).

As formigas *Atta cephalotes*, *Acromyrmex octospinosus* e *A. coronatus* preferem coletar folhas novas das plantas que são macias e ricas em nutrientes (Barrer e Cherrett, 1972; Littledyke e Cherrett, 1978; Weterrer, 1995). No entanto, as espécies de plantas cujas folhas novas apresentem alta concentração de tanino, que pode agir de modo deletério sobre o fungo simbiote e podem, assim, ser evitadas pelas formigas, que optam por coletar folhas maduras (Nichols-Orians e Schultz, 1990). Apesar das folhas novas de carvalho (*Quercus fusiformis*) serem mais ricas em nutrientes e água, e apresentarem menor teor de tanino do que as folhas maduras, a formiga *Atta texana* prefere cortar folhas maduras, indicando que a dureza do substrato e a presença de taninos não são, para esta espécie, fatores muito limitante na seleção de recurso (Waller, 1982). Comportamento inverso ocorre em *Atta cephalotes*, que prefere coletar folhas novas ricas em tanino a folhas duras, indicando que a dureza da folha para esta espécie de formiga é mais importante que a presença de tanino (Nichols-Orians e Schultz, 1989, 1990). Plantas da família Euphorbiaceae são pouco atrativas para

formigas cortadeiras devido ao látex produzido por elas, no entanto, as euforbiáceas com pouco látex são atacadas (Stradling, 1978).

As formigas cortadeiras evitam a coleta de plantas que apresentam em sua constituição alguns compostos polares e apolares. Hubbel e colaboradores (1984) que compostos polares como fenóis, flavonóides e glicosídeos, e compostos apolares como terpenóides, esteróis e ceras apresentam grande repelência para a formiga *A. cephalotes*. O grau de toxicidade ou algum outro atributo que limite a utilização de um recurso por *Acromyrmex octospinosus* pode influenciar o tipo de resposta desta formiga quando em contato com o alimento. Knapp e colaboradores (1990) demonstraram que este contato pode variar de uma simples inspeção seguida de repulsão até o seu corte e carregamento por um determinado período seguido de rejeição. As ceras presentes nas folhas de um grande número de espécies de plantas do cerrado, além de constituírem uma barreira física para a penetração do fungo simbiote, apresentam compostos químicos secundários que provocam repelência a operárias de *Atta sexdens rubropilosa* (Sugayama e Salatino, 1995).

Os óleos presentes nas folhas de *Eucalyptus nova-anglica*, *E. maculata*, *E. citriodora*, *E. grandis*, *E. deanei* e *E. acmenioides* provocam uma resistência moderada do corte praticado pelas saúvas *Atta sexdens* e *A. laevigata*, que são as principais causas de queda de produtividade dos plantios de eucaliptos na América do Sul (Cherrett, 1986; Anjos e Santana, 1994). Para a formiga cortadeira *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, existe baixa aceitabilidade para *Eucalyptus acmenioides* e *E. citriodora* (Della Lucia et al., 1995).

Uma estratégia interessante é adotada por *Atta laevigata*, que coleta o material vegetal e o deposita nas entradas e canais dos ninhos até que elas murchem, para, posteriormente, incorporá-las ao fungo simbiote. Sugeriu-se que este comportamento proporciona minimização dos efeitos de químicos secundários de plantas, que se degradam durante a murcha do fragmento de folha (Vasconcelos e Cherrett, 1996).

A distância do ninho onde as formigas cortadeiras coletam material vegetal pode ser influenciada pelo conteúdo de água presente neste recurso alimentar. Bowers e Porter (1981) demonstraram que operárias de *Atta colombica* podem aumentar a distância do local de coleta de acordo com o teor de água presente nas folhas. Howard (1990) destacou que, além do teor de água, *A.*

colombica seleciona plantas de acordo com a presença de compostos secundários. Folgarait *et al.* (1996) também encontraram indícios de que o teor de água e baixa presença de saponinas na seleção das espécies de plantas por *Atta cephalotes*, mas não observaram correlações entre a dureza e idade da folha com a seleção. Howard (1987) não encontrou relação entre seleção de plantas e conteúdo de água nas folhas para *A. cephalotes* e concluiu que os químicos secundários de plantas constituem o principal fator de seleção para esta espécie. Este mesmo autor, em um outro trabalho publicado em 1998, demonstrou que o teor de nutrientes também pode ser importante na seleção das plantas, enquanto que as características físicas (presença de tricomas e dureza) não apresentaram relação significativa com a seleção. Nihols-Orians (1992) demonstrou que operárias de *A. cephalotes* preferem folhas de plantas que são amplamente atingidas pela luz solar, o que pode estar relacionado com maior quantidade de nutriente nas folhas.

A associação obrigatória entre as formigas cortadeiras e seus fungos mutualísticos exige que as formigas reconheçam plantas que podem ser tóxicas para o fungo, o que acarretaria prejuízo para toda a colônia. Hubbell e colaboradores (1983) demonstraram que o terpenóide cariofileno epóxido, presente nas folhas de *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinoidea), apresenta acentuada atividade antifúngica contra o fungo cultivado por *Atta cephalotes*, o que explicaria o fato desta planta ser raramente atacada por esta formiga. Folhas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) apresentam compostos químicos que agem impedindo o crescimento do fungo simbiote neste substrato e também exerce um efeito fisiológico em operárias de *A. sexdens rubropilosa* (Hebling *et al.*, 1996).

A seleção de espécies de plantas palatáveis pelas colônias adultas de formigas cortadeiras parece ser um comportamento igualmente importante para a sobrevivência de colônias jovens. A abundância de colônias de *Atta* é maior em áreas degradadas (Vasconcellos e Cherrett, 1995), que apresentam alta densidade de plantas pioneiras, que, por sua vez, são mais palatáveis para estas formigas em relação às plantas presentes nas florestas (Farji-Brener, 2001).

Como se pode perceber no texto acima, as características que levam à seleção do substrato pelas formigas cortadeiras são muito diferenciadas e muitas vezes contraditórias para uma mesma espécie. Este quadro indica que muito

deve ser feito para entendermos, de forma mais clara, a seleção de espécies de plantas pelas formigas cortadeiras.

Fungivoria

Um grande número de espécies de fungos se associa com insetos e outros artrópodos (Benjamin *et al.*, 2000). Estas associações podem ser antagônicas, facultativas (sem relação de dependência) e simbióticas, que podem apresentar benefícios para uma das partes, ou vantajosa para ambas, o que caracteriza neste último caso o mutualismo. A maioria das associações entre fungos e insetos são facultativas, onde os insetos utilizam fungos para complementar sua dieta e os fungos podem usar os insetos para sua dispersão. A micofagia complementa a dieta dos insetos que se alimentam de dejetos de animais, frutas e partes de plantas em decomposição, e espécies aquáticas (Mueller *et al.*, 2001).

Em algumas associações mutualísticas estáveis entre insetos e fungos, como observado para os cupins Macrotermitinae, vespa da madeira (Siricidae) e formigas Attini, que cultivam fungo em seus ninhos, ocorrem adaptações em ambas as partes, que facilitam a perpetuação desta associação e promovem relações de interdependência (Martin, 1992). Segundo Martin, os fungos envolvidos nestas simbioses recebem um ambiente adequado para o seu desenvolvimento, com recurso disponível, umidade e ausência de competidores, além de deixar sua propagação a encargo dos insetos. Por outro lado, os insetos se beneficiam pela aquisição de alimento (micofagia) e enzimas digestivas, que ficam ativas no intestino dos insetos contribuindo, principalmente, na degradação de polímeros de plantas (Benjamin *et al.*, 2000). Os esporos e hifas de fungos são ricos em carboidratos, proteínas e lipídeos e, por isso, constituem uma dieta equilibrada para insetos, podendo suprir larvas (que exigem alimento rico em proteína) e adultos (exigentes para carboidratos) (Kendrick, 1992). Estas associações foram descritas nas ordens Isopoda, Homoptera, Coleoptera, Diptera e Hymenoptera (Vespidae e Formicidae) (Kendrick, 1992).

Muitas formigas utilizam fungos como a base de sua dieta, como ocorre em *Camponotus gigas*, uma espécie asiática que usa fragmentos de fungos como alimento majoritário em sua dieta. Mas as associações mutualísticas estáveis entre formigas e fungos estão registradas para as espécies da tribo Attini (216

spp.), *Lasius fuliginosus*, e as espécies do gênero *Megalomyrmex* (8 spp.) que são parasitas sociais das Attini. (Hölldobler e Wilson, 1990; Mueller *et al.*, 2001).

O fungo cultivado por *Lasius fuliginosus* é importante para a arquitetura do ninho, servindo como parede, o que possibilita a construção de ninhos grandes, e, além disso, produzem compostos químicos que contribuem com a sanidade da colônia (Hölldobler e Wilson, 1990). As formigas do gênero *Megalomyrmex* dependem do fungo cultivado nos ninhos das Attini, mas algumas espécies parecem não ter a habilidade para manter o cultivo do fungo após a morte das formigas hospedeiras (Mueller *et al.*, 2001).

A associação entre as formigas da tribo Attini e seus fungos mutualísticos é possivelmente o fator mais importante para o sucesso destes organismos, que estão entre os insetos mais abundantes (número de indivíduos) da Região Neotropical (Cherrett *et al.*, 1989). Atualmente, são conhecidas, aproximadamente, 200 espécies de Attini, distribuídas em 12 gêneros e separadas em três grupos: primitivos (*Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Mycetarotes*, *Mycetosoritis*, *Mycocepurus* e *Myrmicocrypta*); transacionais (*Mycetophylax*, *Sericomyrmex* e *Trachymirmex*); e avançados (*Acromyrmex* e *Atta*) (Wilson, 1971; Schultz e Meier, 1995; Wetterer *et al.*, 1998; Leal e Oliveira, 2000).

O sucesso ecológico dos fungos por elas cultivados também é evidente, como observado para o fungo simbiote das formigas cortadeiras, que juntos consomem 17% da produção de folhas no trópico Americano. Os fungos parasitas de plantas causam, nestas áreas, danos de $11,6\% \pm 3,1$ (média \pm erro padrão), indicando que os fungos cultivados são uma das espécies dominantes na exploração de material vegetal fresco (Cherrett, 1989).

Embora a tribo Attini seja monofilética, os fungos por elas cultivados são polifiléticos. Estes fungos são Basidiomicetos da ordem Agarales, família Lepiotaceae, tribo Leucocoprini, e seus parentes próximos são de vida livre e exploram a camada litorânea do solo para se desenvolver (Chapela *et al.*, 1994). As formigas do gênero *Apterostigma* são as únicas que cultivam fungos que não pertencem à família Lepiotaceae. Análises de DNA destes fungos demonstraram que houve, no mínimo, três domesticações independentes, sendo que as formigas são capazes de mudar de isolado, como é o caso de *Mycocepurus*, que cultiva uma grande diversidade deles (Mueller *et al.*, 1998).

Os fungos cultivados pelas Attini são geralmente mais pobres em nutrientes do que os fungos de vida livre que são filogeneticamente próximos das espécies cultivadas. Uma hipótese para explicar esta seletividade é a presença de compostos químicos secundários que apresentam papel de defesa contra micofagia de insetos (Mueller *et al.*, 2001).

3.3.2 - Evolução de Attini

Os registros fósseis mais antigos de formigas datam de 90-94 milhões de anos atrás (m.a.a.), sendo que a estimativa para o seu surgimento na terra é de 110-130 m.a.a. (Grimald, 1997). Entre as formigas Attini, os registros fósseis mais antigos pertencem aos gêneros *Trachymirmex* e *Cyphomyrmex*, que datam do Oligoceno-Mioceno, com idade aproximada de 20-30 m.a.a. Segundo Mueller *et al.* (2001), o fato de estas formigas serem monofiléticas, e considerando que *Trachymirmex* é um gênero intermediário, estima-se que a origem dos Attini ocorreu há, aproximadamente, 45-65 m.a.a. O isolamento da Gondwanalandia Ocidental ocorreu no final do Cretáceo, há aproximadamente 65 milhões de anos, o que explica o fato destas formigas serem restritas ao continente Americano (Schultz e Meier, 1995).

Nos gêneros primitivos, as colônias de Attini são de pequenas a médias, sendo que as mais numerosas podem conter algumas centenas de operárias que são monomórficas. Os substratos para o cultivo do fungo simbiote são fezes de insetos e matéria orgânica vegetal. Os gêneros intermediários também apresentam colônias de tamanho pequeno a médio, mas as operárias são polimórficas, e o substrato para o cultivo do fungo pode incluir frutos, pétalas e folhas novas de plantas (Cherrett *et al.*, 1989). Por fim, os gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, considerados avançados, que formam colônias grandes, com muitos indivíduos apresentando polimorfismo e polietismo (sistema de divisão de tarefas em castas) mais complexo do que nos outros gêneros, e usam material vegetal fresco para o cultivo do fungo simbiote (Weber, 1972).

A região Neotropical é provavelmente o centro de dispersão dos Attini, pois é onde se encontram 95% das espécies de Attini, enquanto que a região Nearctica apresenta apenas 5% das espécies (Mayhé-Nunes, 2001). As Attini

provavelmente surgiram nas regiões tropicais úmidas, pois quase todas as espécies basais selecionam bosques chuvosos para estabelecer suas colônias. A origem Amazônica é a mais aceita, sendo que no Terciário ocorreu grande diversificação das espécies (Mayhé-Nunes, 2001).

Mueller e colaboradores (2001) mencionam que, até o momento, sete hipóteses foram sugeridas para explicar o início da relação mutualística entre as Attini e os fungos da tribo Leucocopriini.

a) Sementes armazenadas: esta hipótese considera que o fungo inicialmente crescia sobre estoques de sementes armazenadas nos ninhos. Esta hipótese não parece ser sustentada por dois motivos evidentes: primeiro, os fungos leucocoprininos são adaptados para se desenvolver na camada litorânea do solo, sendo pouco competitivos com fungos que colonizam sementes; segundo, pelo fato de que as formigas coletoras de sementes são filogeneticamente distantes das Attini.

b) Raízes em decomposição: esta hipótese também é considerada remota, já que este substrato não é adequado para o desenvolvimento dos leucocoprininos, e por ocorrer no interior do solo, ambiente não explorado por estes fungos de vida livre.

c) Micorrizas: também é uma hipótese refutável, já que os fungos micorrízicos são da subdivisão Zygomycotina, e, portanto, filogeneticamente distantes de Deuteromycotina.

d) Fungos adventícios nas paredes dos ninhos: as formigas selecionam ambientes úmidos para construir seus ninhos, e mantêm a umidade no interior do ninho em níveis maiores do que o ambiente externo. Este ambiente é ideal para o crescimento de fungos, que são controlados por secreções da glândula metatorácica e pelos comportamentos de assepsia exibidos pelas operárias. Pelo fato das Attini construir ninhos profundos, abaixo da camada litorânea que é o ambiente natural de Lepiotacea, deixa esta hipótese enfraquecida.

e) Fezes de formigas: esta hipótese baseia-se no fato de algumas Attini, como *Apterostigma*, que incorporam fezes de insetos no jardim de fungo.

Ressalta-se que a única formiga que cultiva um fungo fora da família Lepiotaceae é *Apterostigma*, que cultiva um Tricholomataceae, o que deixa esta hipótese pouco provável.

f) Carcaças de insetos e pilha de refugos: formigas do gênero *Blepharidatta* são consideradas ancestrais dos Attini. Estas formigas forrageiam por insetos, e acumulam no fundo dos seus ninhos pilhas de carcaças de insetos de onde se desenvolve um fungo. Diniz e colaboradores (1998) sugeriram, então, esta hipótese para o início da relação com os fungos, já que muitos Attini primitivos usam carcaças de insetos para o crescimento dos seus fungos (Wilson, 1971). Mueller *et al.* (2001) consideram esta hipótese pouco provável, já que os leucocoprininos não se desenvolvem adequadamente neste substrato, e, além disso, argumentam que a profundidade do ninho não é o ambiente preferido por Lepiotadea. É preciso que o fungo nos ninhos de *Blepharidatta* seja identificado para esclarecer sua relação com os fungos das Attini.

g) Pelete infrabucal: a câmara infrabucal das formigas serve como um filtro biológico que retém partículas sólidas, de até 1 micrômetro de diâmetro, que são periodicamente regurgitadas. Para muitas formigas têm sido observado esporos de fungos nestes peletes, sugerindo que elas tenham papel importante na dispersão de muitos fungos na natureza. Desta forma, os esporos de Lepiotacea poderiam chegar até o interior dos ninhos com freqüência.

Pode-se concluir que as hipóteses f e g são as que apresentam maior sustentabilidade para explicar o início da interação entre as Attini e seus fungos.

3.3.3 - Fisiologia da digestão nas formigas

As formigas ingerem alimentos na forma líquida, sendo que as larvas de muitas espécies de poneróides se alimentam de dieta líquida e/ou sólida. As partículas sólidas do alimento ficam retidas na câmara infrabucal (Eisner e Happ, 1962). Esta cavidade é uma estrutura de grande importância social, pois funciona como filtro biológico prevenindo a ocorrência de epizootias (Fowler *et al.*, 1991).

Para as formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*, a câmara infrabucal, além de contribuir com a limpeza, é o local onde se inicia a degradação de alguns polímeros como quitina e amido (Febvay e Kermarrec, 1986).

Assim como as abelhas, as formigas apresentam taxas de trofalaxia muito variáveis, que são determinadas pelo hábito alimentar e posição filogenética (Wilson, 1971). A trofalaxia é ausente ou praticada de modo restrito nos poneríneos mais primitivos (predadores), e bem desenvolvida nas espécies avançadas, adaptadas para coleta de secreções de afídeos e de partes especializadas de plantas. Em geral, a taxa de trofalaxia aumenta com o volume de líquido da dieta natural. O papo das formigas que coletam honeydew são capazes de uma ampla distensão que permite transportar maiores volumes de dieta. As larvas de Ponerinae, Myrmecinae (onde as formigas cortadeiras estão inseridas) e Formicinae secretam, periodicamente, pequenas quantidades de um líquido claro que é coletado pelos adultos. Acredita-se que este líquido seja originado na glândula labial das larvas, mas esta hipótese ainda não foi confirmada. Além de servir como alimento, as secreções das glândulas labiais das formigas podem ser usadas para digestão pré-oral do alimento, para comunicação com as operárias através de trofalaxia, construção de casulo e ninhos de seda (Mathias da Silva, 2002). Além de secreção bucal, as formigas também produzem um líquido na região anal, que se acredita que seja originado pelos tubos de Malpighi.

A possibilidade das larvas servirem como uma casta digestiva tem sido investigada para as formigas da subfamília Myrmicinae (Hölldobler e Wilson, 1990). Em larvas de *Messor capitatus*, foi detectada a presença de lipases e proteases na secreção da glândula salivar, enquanto que nas glândulas labial e cefálica dos adultos foram observadas carboidrases, as quais não foram detectadas nas larvas (Delage, 1968). Este mesmo autor demonstrou a existência de um intercâmbio de hidrolases entre larvas e adultos de *M. capitatus*, o que pode aumentar a eficiência da digestão do alimento da colônia. Sistemas semelhantes a estes também foram observados em *Myrmica rubra* e *Monomorium pharaonis* (Hölldobler e Wilson, 1990).

3.3.4 - Digestão nas formigas cortadeiras

A fisiologia e a bioquímica digestiva das formigas cortadeiras interagem estreitamente com as dos fungos simbiotes. Ao contrário das outras espécies de Attini, que utilizam fezes de insetos, insetos mortos, frutos e partes de plantas em decomposição para o cultivo do fungo mutualístico, as formigas cortadeiras utilizam folhas frescas (Weber, 1972). Leal e Oliveira (2000) demonstraram que o tipo de alimento forrageado pelos Attini é influenciado pela sazonalidade e, para *Trachymyrmex*, o uso de folhas frescas de plantas ocorre nas épocas de escassez de alimento, sugerindo que os Attini avançados tenham surgido através deste tipo de pressão seletiva. Entre os gêneros avançados, *Atta* e *Acromyrmex*, com 15 e 24 espécies respectivamente, que, juntos, representam cerca de 25% das espécies de Attini, formam colônias grandes, com muitos indivíduos, as quais apresentam um sistema de divisão de tarefas em castas mais complexo do que nos outros gêneros (Wilson, 1980; Cherrett, 1989).

Na associação com o fungo mutualístico, as formigas cortadeiras coletam o substrato vegetal, retiram suas barreiras físicas (ceras principalmente) (Cherrett *et al.*, 1989) e adicionam uma gota de líquido fecal que contém enzimas digestivas (proteínases, pectinase, celulase e amilase) que iniciam a digestão do tecido foliar no local onde uma porção de hifas será inoculada (Martin *et al.*, 1975a). Boyd e Martin (1975b) concluíram que três hidrolases encontradas no fluido fecal são derivadas do fungo e sugeriram não ser necessário para as formigas produzirem suas próprias enzimas digestivas, uma vez que elas as obtêm dos próprios fungos. Febvay e Kermarrec (1986) mostraram a presença de lipase, maltase, trealose e peptidases no intestino-médio de larvas e adultos de *Acromyrmex octospinosus*, além de atividade quitinolítica nas suas glândulas labiais (Febvay *et al.*, 1983). No entanto, a origem destas enzimas não foi avaliada. A glândula labial das formigas tem importante papel na produção de algumas enzimas. Para *Formica polyctena*, esta glândula é responsável pela secreção de trealases (Paulsen, 1971). Em *A. sexdens* foi observada a presença de amilase, xilanase e celulase no fluido bucal, mas a origem destas enzimas não está, obrigatoriamente, associada às glândulas acessórias do intestino anterior

Os fungos mutualísticos cultivados por *Atta* e *Acromyrmex* são capazes de concentrar tecidos vegetais quimicamente defendidos para insetos e

nutricionalmente pobres, em uma dieta rica para os adultos e, principalmente, para as larvas (Stradling, 1991). Os gongilídeos, além de enzimas digestivas, contêm nutrientes como: carboidratos (27%), proteínas (13%), aminoácidos livres e lipídeos (0,2%) (Martin *et al.*, 1969) que constituem a dieta para as larvas da colônia (Wilson, 1971).

Nas colônias das formigas cortadeiras, as formas imaturas apresentam movimentação limitada e dependem das operárias para a aquisição do alimento (Weber, 1972). Este contato íntimo pode ter favorecido a troca de enzimas digestivas entre estas castas por trofalaxia. Além disso, o papo das formigas mínimas, que interagem com maior frequência com as larvas, são proporcionalmente maiores em relação às outras castas, sugerindo uma adaptação para a troca de líquidos com as larvas (Caetano, 1984).

A morfologia do intestino dos adultos de diferentes castas de *Atta* foi descrita por Caetano (1984). Segundo este autor, as partes do trato digestivo destas formigas é similar às de outros himenópteros, ocorrendo variações de tamanho entre as castas, e é formado pela cavidade bucal, faringe, esôfago, papo, proventrículo, ventrículo, intestino posterior, reto e ânus. Os adultos se alimentam de seiva de plantas, um material que contém sais minerais, aminoácidos livres, proteínas, mono e dissacarídeos, além de celulose, xilana, cutina, etc. Assim, a detecção de enzimas que atuam sob estes substratos é esperada nos adultos. No entanto, nenhum outro aspecto da digestão, como distribuição espacial das enzimas, sítios de absorção, etc foram avaliados.

As larvas de *A. subterraneus* apresentam a MP, mas esta é inexistente nos adultos das formigas cortadeiras, apesar de ser comum em operárias de outras espécies (Caetano, 1984; Milton Erthal Jr., observação pessoal). Em *Ectatoma edentatum*, uma ponerinae predadora, a matriz peritrófica é formada por um grupo de células dispostas na base da válvula cárdia (Zara & Caetano, 1998). No entanto, ao longo do ventrículo, a matriz é composta por várias lamelas, assemelhando-se a matrizes do tipo I, que são formadas ao longo de todo o intestino médio. Estes autores sugerem que este tipo de matriz seja intermediária entre os tipos I e II.

Em *Acromyrmex octospinosus* foi detectada a presença de carboidrases, proteinases e lipases no intestino médio das larvas e adultos, sendo que a origem destas enzimas é desconhecida (Febvay e Kermarrec, 1986). Em *A. sexdens* foi

observada a presença de amilase, xilanase e celulase no fluido bucal, e xilanase, pectinase e amilase no fluido fecal (Silva, 2000).

O pH do intestino é uma propriedade importante que pode afetar a estabilidade das enzimas digestivas ao longo do trato digestivo dos insetos (Terra e Ferreira, 1994). Em geral, o pH no ventrículo varia entre 6 e 7,5, sendo que nos himenópteros ocorre acidificação do pH na região posterior (Terra e Ferreira, 1994). Ensaio *in vivo* com o uso de microeletrodos em adultos de *A. texana* demonstraram que o pH no papo, intestino médio e reto foi de 7,2, 6,5 e 5,8, respectivamente (Boyd e Martin, 1975). No entanto, o uso desta técnica impede a determinação de variações dos valores do pH ao longo dos compartimentos que pode revelar o fluxo de solutos.

3.4 - Associação das formigas cortadeiras com outros microorganismos

Nos ninhos das formigas cortadeiras, além do fungo mutualístico, muitos outros microorganismos foram detectados. Em ninhos de *A. sexdens* foram obtidos 93 isolados de leveduras a partir de amostras das paredes das câmaras (painéis), do corpo das operárias, lixo da colônia, folhas e do jardim de fungo (regiões "novas" e "velhas"), sendo que as mais abundantes são pertencentes ao gênero *Candida* (Carreiro *et al.*, 1997). Estes mesmos autores observaram maior diversidade de leveduras na porção "nova" do jardim de fungo, e que isto pode ser devido à presença de operárias com folhas vindas do campo.

Bactérias também foram encontradas nos ninhos das formigas cortadeiras e sua população pode ser controlada pela acidificação do substrato feita com secreções glandulares das formigas (Kermarrec *et al.*, 1990). Tauk e Serdello (1975) observaram bactérias presentes no jardim de fungo de *Atta laevigata* e sugeriram a participação destas na degradação de substratos presentes no jardim do fungo simbiote e sua possível participação na dieta das formigas. Esta hipótese também foi sustentada por Kermarrec *et al.* (1990), que sugeriram uma possível simbiose entre bactérias e leveduras com as formigas cortadeiras. Em ninhos de *A. sexdens* foram isoladas bactérias com capacidade para degradar a celulose (Bacci Jr. *et al.*, 1995a).

A simbiose com microorganismos também pode ocorrer no trato digestivo das formigas. Nos insetos em geral, é comum a presença de uma microbiota no aparelho digestivo, que, além de muitas funções, pode auxiliar no processo digestivo (Dillon, 2000). Douglas (1998) observou a produção de nutrientes por bactérias do gênero *Buchnera* no intestino de operárias de *Camponotus* spp., e que a origem das mesmas seriam os afídeos com os quais elas se associam. Entre as formigas cortadeiras, a ocorrência de simbiontes associados com o aparelho digestivo dos adultos já foi relatada (Caetano, 1984), no entanto, nada se sabe sobre suas origens e funções.

Além de enzimas, os microorganismos associados ao ninho podem ser responsáveis pela produção de antibióticos que inibem o crescimento de fungos competidores. No corpo das operárias de *Atta* e *Acromyrmex* foram isoladas bactérias do gênero *Streptomyces*, as quais previnem o desenvolvimento dos fungos *Escovopsis* spp., que são competidores e/ou parasitas dos fungos simbiontes das Attini (Currie *et al.*, 1999 a,b).

O estudo do sistema enzimático das formigas pode refletir os hábitos alimentares das formigas (Ayre, 1967). No caso específico das formigas cortadeiras, onde além da produção pelo inseto, as enzimas do intestino podem ter origens variadas (fungos simbiote, bactérias, plantas e outros microorganismos), somente uma caracterização mais detalhada das enzimas poderá revelar a origem das mesmas, e esclarecer melhor aspectos da interação: larvas - adultos - plantas - microorganismos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Manutenção das colônias

O fungo simbiote e as formigas usadas neste trabalho foram coletados em cinco colônias adultas de *A. subterraneus*, procedentes de Viçosa, MG, as quais foram mantidas no laboratório sob condições adequadas para se desenvolverem (Moreira *et al.*, 1987) e supridas diariamente com folhas de *Acalipha* sp., *Ligustrum* sp., pétalas de rosas e Neston® quinzenalmente.

4.2 - Adultos

Por ser *Acromyrmex subterraneus* uma espécie altamente polimórfica, e devido ao fato de haver correlação entre tamanho dos indivíduos e atividade enzimática (Benevides *et al.*, 2003) foram selecionados apenas os soldados para se minimizar o erro experimental. As operárias foram escolhidas de acordo com o tamanho de suas cápsulas cefálicas, medindo-se o maior comprimento lateral da cabeça em vista frontal, sendo este $\geq 2,0$ mm (Wilson, 1980).

4.2.1 – pH do conteúdo luminal do intestino

Operárias de *A. subterraneus* foram alimentadas com soluções indicadoras de pH diluídas em solução de mel 10% para estimular o consumo (Tabela 1). Os insetos foram removidos dos ninhos e mantidos em placas de Petri (5 formigas/plasca) em jejum por duas horas. Em seguida, as formigas foram alimentadas com solução indicadora embebida em bolas de algodão. Grupos de três a cinco insetos foram dissecados em intervalos de tempo conhecido após a alimentação para a observação das cores presentes no papo, intestino médio, íleo e reto (Figura 1).

4.2.2 – Fluxo de dieta ao longo do trato digestivo

O fluxo de líquido pelo trato digestivo de *A. subterraneus* foi investigado através da alimentação dos insetos com o corante Azul de Evans (0,5 %) dissolvido em solução de mel 10 % para estimular o consumo. Dois parâmetros fisiológicos foram avaliados: a) tempo de preenchimento, que é o tempo entre a ingestão do alimento e o preenchimento de cada compartimento do intestino com corante; b) tempo de residência, que é o tempo que o corante permanece em cada compartimento. Operárias foram removidas das colônias e mantidas em placas de Petri (5 formigas/placa) por 4 horas com acesso apenas a água destilada embebida em bolas de algodão. Após este período, as operárias foram alimentadas com a solução de corante e mel, a qual foi oferecida às formigas em três gotas de 50 µl cada colocadas no fundo da placa. Assim que a solução foi localizada, as formigas permaneciam entre 3 e 4 minutos se alimentando (Denise D.O. Moreira, dados não publicados) e em seguida eram transferidas para placas de Petri contendo duas bolas de algodão, uma embebida com água destilada e outra com solução de mel 10 %, as quais eram trocadas diariamente ao longo do experimento, que teve duração de 10 dias. Para estimar a taxa de movimento do corante ao longo do canal alimentar, grupos de 3 a 5 insetos foram dissecados em intervalos de tempo conhecidos e a presença do corante observada no papo, intestino médio, íleo e reto.

Tabela 1. Indicadores de pH usados para estimar as faixas de pH do papo, intestino médio, íleo e reto de operárias de *Acromyrmex subterraneus*

| Indicadores * | Faixa de pH | Faixa de cor |
|-----------------------|-------------|--------------------|
| 2,4-dinitrofenol | 2,4 - 4,0 | Incolor – amarelo |
| azul de bromofenol | 3,0 – 4,6 | Amarelo – azul |
| vermelho congo | 3,0 – 5,0 | azul – vermelho |
| vermelho de metila | 4,4 – 6,2 | vermelho – amarelo |
| Litmus | 4,5 – 8,3 | vermelho – azul |
| violeta de bromcresol | 5,2 – 6,8 | amarelo – violeta |
| azul de bromotimol | 6,0 – 7,6 | amarelo – azul |
| vermelho fenol | 6,4 – 8,2 | amarelo – vermelho |
| Fenolftaleína | 8,2 – 10,0 | incolor - violeta |

* Os indicadores foram previamente diluídos como sugerido no catálogo da Merk

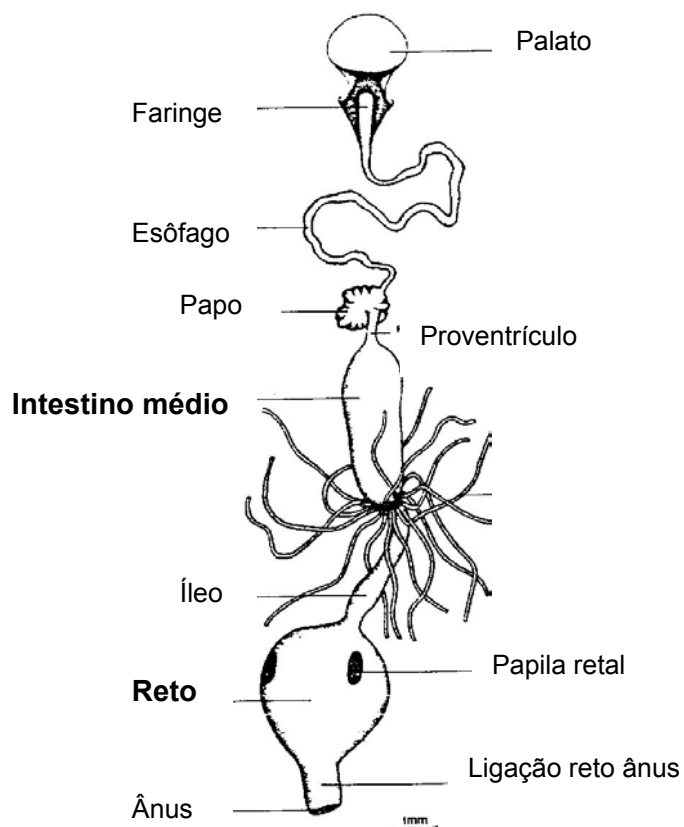


Figura 1. Desenho esquemático do canal alimentar de formigas cortadeiras obtido em Caetano (1984). O fluxo da dieta foi avaliado no papo, intestino médio, íleo e reto.

4.2.3 - pH ótimo para atividade de carboidrases do reto

Para confirmar se as carboidrases presentes no reto estão ativas na faixa de pH deste compartimento, estes órgãos foram dissecados, acumulados em água destilada (20 retos/ml) e em seguida homogeneizados e centrifugados para os ensaios enzimáticos, como descrito no item 4.2.5 abaixo. As amostras foram ensaiadas contra três substratos: NP α Glu, NP β Glu e NP α Gal, que foram dissolvidos em 14 tampões, cujas faixas de pH variaram entre 3 e 10. Os tampões usados foram: ácido cítrico 100 mM (pH 3,0), citrato-fosfato 100 mM (pH 4,0, 4,25, 4,5, 4,75, 5,0, 5,25, 5,5, 5,75, 6,0, 7,0), tampão-fosfato 100 mM (pH 8,0) e glicina 100 mM (pH 9,0 e 10,0).

4.2.4 - Obtenção dos intestinos

As operárias foram dissecadas em solução de NaCl 215mM (SS) para obtenção do tecido epitelial e conteúdo luminal do intestino médio e do reto (Figura 1). Os compartimentos intestinais foram transferidos para tubos eppendorf de 1,5 ml contendo 500 μ l de SS. O tecido epitelial foi lavado três vezes em SS para remoção das enzimas presentes na hemolinfa e do conteúdo luminal antes de ser armazenado. Os epitélios foram homogeneizados com Potter descartável (Sigma-RU) e submetidos à centrifugação (20 000g / 20 minutos, 4°C) para a coleta do sobrenadante (fração solúvel). O pelete (fração particulada) foi resuspendido e homogeneizado em 500 μ l de SS. Os lotes de amostras continham 10 ou 20 compartimentos intestinais de operárias por 500 μ l de SS. Durante a coleta e processamento das amostras, os eppendorfs foram mantidos no gelo e em seguida armazenados em freezer a -15°C até a realização dos ensaios para detectar atividades de carboidrases e proteinases.

4.2.5 - Avaliação da atividade enzimática

Considerando-se o hábito alimentar e os relatos da literatura sobre a presença de enzimas digestivas em glândulas e canal alimentar das formigas cortadeiras (Boyd e Martin, 1975; Febvay e Kermarrec, 1986, Silva, 2000), 27 substratos foram selecionados e testados contra amostras de compartimentos intestinais de *Acromyrmex subterraneus*.

Ensaio preliminares foram necessários para se estimar a diluição das amostras e tempo total de reação para que as atividades enzimáticas fossem quantificadas adequadamente. Todos os resultados foram expressos em mili unidades/minuto/animal, ou mU/animal. Em cada compartimento estudado, os ensaios foram repetidos no mínimo 4 vezes e a proteína dos lotes foi estimada pelo método de Bradford (1976), usando-se ovoalbumina para construção da curva padrão.

Deteccção de atividade proteolítica

Seis substratos foram usados para a deteção de atividade proteolítica (Tabela 2). A atividade contra azoalbumina (2% em tampão PO_4), que pode ser atacada por proteinases diversas, foi feita em eppendorfs contendo 100 μl de substrato e 50 μl de amostra, que, após rápida agitação, foram incubados a 25°C por um período que variou entre 2 e 48 horas, de acordo com a intensidade da atividade da amostra. As reações foram paralisadas com adição de 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10% em água destilada e quinze minutos depois os tubos foram centrifugados (4 300g por 5 min) para a coleta de 1 ml do sobrenadante, que foi adicionado a 0,5 ml de hidróxido de sódio 2,0 M. A leitura da coloração da solução final foi feita a 440 nm (Sarath *et al.*, 1996). Para cada amostra, foram ensaiados quatro tubos, cujas reações foram paralisadas em quatro tempos diferentes. A relação entre absorbância e tempo de reação foi estimada por regressão linear que foi usada para quantificar a atividade das amostras, expressas em mU/animal. Cada unidade de atividade foi considerada como variação de 0,001 unidades de absorbância / hora. Como controle, foi usado um tubo contendo azoalbumina e amostra onde se adicionou TCA antes da amostra.

A atividade das amostras contra os substratos contendo paranitroanalina (pNA) foi estimada em placas de Elisa, aplicando-se, em cada poço, 60 μl de tampão Tris-HCl pH 8,0, 40 μl de amostra e 10 μl de substrato (1 mM). Logo após a adição do substrato, a absorbância foi avaliada em um leitor de Elisa contendo filtro de 405 nm, onde a absorbância de pNA é máxima (Erlanger *et al.*, 1961). A absorbância dos poços foi avaliada em intervalos de tempo conhecidos e as atividades (A) foram calculadas com auxílio da fórmula descrita por Sarath *et al.* (1989):

$A = \mu \text{ mol de } p\text{-NA} / \text{minuto};$

$A = \Delta \text{ absorb\~{a}ncia} / \Delta \text{ tempo} \times 1 / 8\,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times 10^{-6} \mu\text{M M}^{-1} \times 0,001 \text{ L}.$

$A = \Delta \text{ absorb\~{a}ncia} / \Delta \text{ tempo} \times 3,408 \mu \text{ mols/minuto/animal}$

Detecção de Carboidrases

Vinte e um substratos foram usados para a detecção de carboidrases (Tabela 2). A maioria dos ensaios para detectar carboidrases foi realizada em banho maria, a 30°C, utilizando-se quatro tubos de ensaio, cada um contendo 25 µl de substrato e 25 µl de amostra, os quais tiveram suas reações paralisadas em quatro intervalos de tempo diferente para verificar aumento de absorbância, que está relacionada à atividade enzimática. O cálculo da atividade hidrolítica foi feito através do fator b da equação da reta, obtido por regressão linear e com um fator (1/b) obtido através de curvas padrões. Os tempos de incubação oscilaram entre 80 minutos e 24 horas, de acordo com a atividade da enzima e diluição da amostra.

Atividades contra os dissacarídeos derivados ligados a paranitrofenol (NP α Gal, NP α Glu, NP β Glu e NP α Man) foram quantificadas pela liberação de *p*-nitrophenolato no meio após a adição de 200 µl de tampão carbonato 0,25 M bicarbonato 0,25 M + SDS (1%), usado para paralisar a reação. Duzentos µl da solução final foram transferidos em placas Elisa e a absorbância avaliada em leitor de Elisa a 405 nm, onde a absorbância de *p*-nitrophenolato é máxima (Terra *et al.*, 1979). Curvas de calibração foram feitas com 0,2 mM de *p*-nitrophenol.

Os ensaios contra os substratos celobiose, lactose, maltose, melibiose e sacarose tiveram as reações paralisadas com 5 minutos de fervura, seguido da adição de 500 µl de tris-glicose oxidase (TGO) nos tubos de reação e incubados por uma hora a 37°C. O TGO quantifica a glicose liberada no meio e quando oxidado possui absorbância máxima a 420 nm (Dahlqvist, 1968). Duzentos µl da solução final foram transferidos para placas Elisa e a absorbância avaliada a 405 nm. Uma curva padrão com uma solução de glicose 0,02% foi feita para o cálculo do coeficiente b da equação da reta.

As atividades contra os substratos amido, glicogênio, pectina, celulose microcristalina, carboximetilcelulose, xilana, β_{1-3} glucano, laminarina e rafinose foram avaliadas após a adição de 200µl do ácido dinitrossalicílico (DNS), fervura

Tabela 2. Substratos usados para detecção de atividade proteolítica nos compartimentos do intestino de *Acromyrmex subterraneus* e no fungo simbiote

| Substrato | Concentração do substrato | Solvente usado | Atividade diagnóstica | Classificação da proteinase |
|-------------------------------------|---------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Azoalbumina bovina | 2 % | Tp PO ₄ | inespecífica | - |
| N-Suc-Ala ₂ -Pro-Phe-pNA | 1 mM | DMSO | quimotripsina | Serínica |
| N-Bz-Phe-Val-Arg-pNA, | 1 mM | DMSO | Tripsina | Serínica |
| N-Bz-Phe-Ala-pNA | 1 mM | DMSO | Tripsina | Serínica |
| N-Bz-Arg-pNA | 1 mM | DMSO | Tripsina | Serínica |
| L-Leu-pNA | 1 mM | DMSO | Aminopectidase | Aminopectidase |

Tp PO₄ – Tampão fosfato 100 mM pH 7,8.

Tabela 3. Carboidratos testados contra o trato digestivo de larvas e adultos de *Acromyrmex subterraneus*. Estão listados também os tampões, pH e as concentrações (mM ou %) em que os substratos foram dissolvidos, além das respectivas enzimas envolvidas na degradação dos substratos

| Substratos | Abreviações | Concentração do substrato | Tampão em que foi diluído | pH do tampão | Enzimas que atuam na degradação |
|---|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------|---------------------------------|
| Oligossacarídeos | | | | | |
| <i>p</i> -nitrofenil α -D-glicopiranosídeo | NP α Glu | 10 mM | Citrato fosfato 100mM | 5,5 | α -glucosidase |
| Sacarose | - | 20 mM | Acetato de sódio 100 mM | 5,5 | α -glucosidase |
| Maltose | - | 20 mM | Citrato fosfato 100 mM | 5,0 | α -glucosidase |
| <i>p</i> -nitrofenil β -D-glicopiranosídeo | NP β Glu | 10 mM | Citrato fosfato 100 mM | 5,0 | β -glucosidase |
| Celobiose | - | 20 mM | Acetato de sódio 100 mM | 5,5 | β -glucosidase |
| <i>p</i> -nitrofenil α -D-galactopiranosídeo | NP α Gal | 10 mM | Citrato fosfato 100 mM | 5,5 | α -galactosidase |
| Melibiose | - | 50 mM | Citrato fosfato 100 mM | 5,0 | α -galactosidase |
| Rafinose | - | 50 mM | Citrato fosfato 100 mM | 5,5 | α -galactosidase |
| <i>p</i> -nitrofenil α -D-mannopiranosídeo | NP α Man | 10 mM | Citrato fosfato 100 mM | 5,5 | α -manosidase |
| Lactose | - | 50 mM | Citrato fosfato 100 mM | 5,5 | lactase/ β -glucosidase |
| Polissacarídeos | | | | | |
| Amido | - | 1 % | Acetato de sódio 100 mM | 5,5 | amilase |
| Glicogênio | - | 1 % | Acetato de sódio 100 mM | 5,5 | amilase |
| 4-metilumbeliferil- β -D-N,N',N''-triacetilquitotriosídeo | MU- β -quitotriosídeo | 0,9 μ M | Acetato de sódio 100 mM | 5,5 | quininase/lisozima |
| Quitina azure | - | 1 mM | Acetato de sódio 100 mM | 5,5 | quitinase |
| Pectina | - | 1 % | Citrato fosfato 100 mM | 5,5 | pectinase |
| Xilana | - | 1 % | Citrato fosfato 100 mM | 5,5 | xilanase |
| Celulose microcristalina | - | 1 % | Citrato fosfato 100 mM | 5,5 | celulase |
| Celulose azure | - | 1 % | Citrato fosfato 100 mM | 6,0 | celulase |
| Carboximetilcelulose | CMC | 1 % | Citrato fosfato 100 mM | 5,5 | celulase |
| Laminarina | - | 0,13 % | Citrato fosfato 100 mM | 6,0 | laminarinase |
| β ₁₋₃ Glucano | - | 0,25 % | Citrato fosfato 100 mM | 6,0 | β -glucanase |

- Os traços referen-se aos substratos não abreviados. 6,3 mM do substrato MU- β -chitotriose foi previamente diluído em DMSO. Nos tampões onde se dissolveu: rafinose, amido, glicogênio, pectina, xilana, laminarina e β ₁₋₃glucano adicionou-se 2 mM de CaCl₂.

dos tubos por cinco minutos e adição de 200 μ l de água destilada. O DNS quantifica os grupos redutores no meio e tem maior absorvância máxima a 550 nm (Noelting e Bernfeld, 1948). A absorvância foi avaliada em um Leitor de Elisa com filtro de 540 nm, e uma curva padrão, feita com solução de glicose 0,2% foi preparada para a obtenção do coeficiente b da equação da reta. O reagente DNS foi preparado com 1 g de ácido 3,5 dinitrossalicílico, o qual foi dissolvido em 20 ml de NaOH 2N e 50 ml de H₂O bidestilada sob agitação e protegido da luz. Em seguida, 30 g de tartarato de sódio e potássio foram adicionados ao reagente e água destilada para elevar o volume para 100 ml.

Os substratos celulose azure e quitina azure foram ensaiados sob agitação (150 rpm), a 25°C, sendo que os tubos continham 50 μ l de substrato, 50 μ l de amostra e 900 μ l do mesmo tampão usado para solubilizar os substratos (vide tabela 3). O conteúdo dos tubos foi centrifugado (4 300 g por 5 minutos) no início e fim de cada experimento para a coleta do sobrenadante, que foi lido em espectrofotômetro a 595 nm, onde a absorvância do corante é máxima. A atividade enzimática foi estimada pela diferença entre as absorvâncias final e inicial, e expressas em mU/animal.

A atividade contra o substrato MU- β -quitotriosídeo foi avaliada em espectrofluorofotômetro (Shimadzu, RF-5301 PC) a 37°C, por 100 segundos, com o uso de 5 μ l deste substrato dissolvido em 2 ml tampão acetato de sódio e 30 μ l de amostra. As atividades foram calculadas pela luz que foi excitada a 320 nm e emitida a 460 nm. Uma curva de calibração foi construída com uma solução de 4-Methylumbelliferona.

Todos os experimentos foram repetidos pelo menos quatro vezes, para que os valores (médias \pm desvios padrões) das atividades enzimáticas dos substrato testados fossem obtidos. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a catálise de clivagem de 1 μ mol de substrato liberado / min ou miliunidades (mU).

O conteúdo de proteína nas amostras foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976), usando-se ovoalbumina como padrão.

4.2.6 - Atividade enzimática na glândula labial

As glândulas labiais das operárias de *A. subterraneus* foram obtidas, homogeneizadas e centrifugadas como descrito anteriormente, para a coleta do

sobrenadante. A fração solúvel foi ensaiada contra substratos que são sabidamente degradados em outra espécie de formigas cortadeiras (*A. octospinosus*) (Febvay e Kermarrec, 1983, 1986; Febvay *et al.*, 1984), e contra substratos que eram degradados pelo conteúdo luminal do trato digestivo, mas não pelo extrato do tecido epitelial. Considerando-se estas duas características, as glândulas labiais foram ensaiadas contra os seguintes substratos: NP α Gal, rafinose, melibiose, NP β Glu, NP α Man, trealose, amido, glicogênio, MU- β -quitotriosídeo e L-Leu-pNA. A proteína total das amostras foi avaliada pelo método de Bradford (1976). Os lotes de amostra continham 10 a 20 glândulas em 400 μ l de SS.

4.2.7 - Cromatografias

Interação hidrofóbica

Uma coluna cromatográfica de interação hidrofóbica foi utilizada para caracterizar analiticamente as enzimas das operárias. A coluna, com 0,5 cm de diâmetro, foi empacotada a 10 cm de altura com a resina fenil – agarose e acoplada ao Econo System (BioRad, Richmond, EUA) para o bombeamento dos tampões. Lotes de amostras contendo 100 intestinos médios, 100 retos e 40 glândulas labiais de adultos foram aplicados na coluna previamente equilibrada com tampão citrato-fosfato 100 mM, pH 5,5 contendo 1 M de sulfato de amônio.

Os volumes dos lotes foram estimados para que sulfato de amônio 2 M fosse adicionado em igual volume às amostras antes de sua aplicação na coluna. Em fluxo constante de 1ml/minuto, eluíram-se inicialmente 15 ml do mesmo tampão usado para equilibrar a coluna e, em seguida, um segundo tampão (citrato-fosfato sem sulfato de amônio) passou a ser eluído em gradiente linear crescente até 50 ml, quando a concentração de sulfato de amônio chegou a 0 M, seguindo-se de mais 10 ml de eluição isocrática. Cada uma das 60 frações coletadas continha 1 ml de (eluto) tampão e foram imediatamente transferidas para o gelo. As corridas foram feitas à temperatura ambiente.

As frações de intestino médio dos adultos foram ensaiadas contra NP α Glu, maltose e sacarose, e as do reto contra NP α Glu, maltose e sacarose, MU- β -quitotriosídeo, NP α Gal, NP α Man, NP β Glu e celobiose.

Filtração em gel

A massa molecular das enzimas com atividades majoritárias presentes no intestino dos adultos foi estimada com uma coluna de gel filtração. Amostras contendo 40 intestinos médios e 30 retos foram obtidas e processadas como descrito anteriormente e diluídas com 1,2 ml de tampão citrato-fosfato 100 mM, pH 5,5, contendo 150 mM de NaCl. Estes mesmo tampão foi usado para equilibrar a coluna Sephacryl S-200 (75 cm x 2.8 cm i.d.) e bombeado durante as corridas por um sistema de FPLC (Pharmacia). As corridas foram feitas à temperatura ambiente, em um fluxo de 0,5 ml/min, onde, após o descarte dos primeiros 20 ml, coletaram-se 160 ml, distribuídos em 80 tubos (2 ml/tubo). A massa molecular foi estimada usando-se uma curva de calibração que foi obtida pela passagem na coluna de proteínas com peso molecular conhecido. As proteínas usadas (lisozima, 14 Kda; tripsina, 24 Kda; albumina de ovo, 45 Kda e albumina bovina 66 Kda) foram eluídas sob as mesmas condições das corridas das amostras, e suas presenças detectadas através de leitura das frações em espectrofotômetro a 280 nm.

As frações das corridas contendo amostra de intestino médio foram ensaiadas contra NP α Glu, maltose e sacarose, enquanto que para o reto, além destes substratos, ensaiou-se contra NP α Gal, NP β Glu, NP α Man, azoalbumina, N-Bz-Phe-Val-Arg-pNA.

4.2.8 - Caracterização eletroforética

SDS-PAGES, com géis contendo 8% de acrilamida foram utilizados para detecção de enzimas com atividades majoritárias presentes no intestino médio, reto e glândula labial dos adultos. As enzimas estudadas foram: α -glicosidase, β -glicosidase, α -galactosidase, amilase, quitinase e proteinases.

Amostras do intestino médio, reto e glândula labial, incluindo-se o tecido epitelial, foram homogeneizadas e centrifugadas, como descrito anteriormente, para a coleta do sobrenadante. As amostras continham entre 30 e 50 compartimentos intestinais por 100 μ l de água destilada. Trinta μ l de amostra foram diluídos em 10 μ l de tampão de amostra que era composto por: 2,1 ml de água destilada + 0,5 ml de Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 + 0,4 ml de glicerol + 0,8 ml de

SDS 10% (p/v) + 0,2 ml de azul de bromofenol 1% (p/v) (2-mercaptoetanol não foi adicionado) e aplicadas no gel sem ferver. Os géis usados na corrida tinham 10 cm x 7 cm x 1,0 mm (ou 1,5 mm) do sistema Bio Rad Mini Protean III. Em cada raia aplicaram-se 25 μ l de solução composta por amostra (19 μ l) + tampão de amostra (6 μ l) e as corridas foram realizadas a 150 V, a 4 °C, durante 1 h e 20 minutos, tempo aproximado para que o tampão de amostra saísse do gel. Após as corridas, os géis foram submetidos a duas lavagens de 15 min cada com Triton X-100 2,5%, para que o excesso de SDS fosse removido e, em seguida, encubado com tampão apropriado ou revelador para que as bandas de atividade fossem reveladas.

Para detectar atividade de α -glicosidase, os géis foram incubados em tampão citrato fosfato 0,1 M, pH 5,5, contendo 2 mM de 4-metilumbeliferil α -D-glicopiranosídeo e mantido a 30 °C por 20 a 30 min. As bandas fluorescentes foram visualizadas em luz UV e o gel registrado em um foto-documentador em sistema Eagle Eye II (STRATAGENE, EUA). A detecção de atividade de β -glicosidase e α -galactosidase foi feita de modo similar ao descrito acima, no entanto, usaram-se os reveladores 4-metilumbeliferil β -D-glicopiranosídeo e 4-metilumbeliferil α -D-galactopiranosídeo, respectivamente. Para detectar atividade de amilase, o gel foi incubado em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5, contendo 2 mM de CaCl_2 e 2% de amido por 1 hora a 30 °C. Em seguida, o gel foi lavado com água destilada e transferido para solução corante contendo 1,3 % (p/v) de I_2 e 3% (p/v) de KI. Após a coloração, bandas claras foram visualizadas em fundo escuro, o que indica a atividade amilolítica, e a documentação feita em scanner Genius Color Page-Vivid Pro II. A atividade de quitinase foi visualizada em SDS-PAGE contendo 0,2 ml de glicol quitina (1%), cujo volume foi descontado da água destilada. Depois da lavagem com Triton, o gel foi incubado por 24 horas a 37 °C com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, contendo 1% de Triton X-100. Ao término da incubação, o gel foi lavado em solução reveladora, calcofluor 0,01 % em 0,5 M de tampão Tris-HCl, pH 8,0, recém-preparada. Após cinco minutos, retirou-se a solução reveladora e o gel foi incubado por uma hora em água destilada à temperatura ambiente. Para a revelação do resultado, o gel foi exposto à luz UV, onde se observaram bandas escuras em fundo cinza.

A atividade proteolítica foi detectada adicionando-se 1,1 ml de solução de gelatina (0,9%), descontando-se este volume de água durante a preparação do

gel. Após a lavagem com Triton, o gel foi incubado em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, por 5,5 horas a 30 °C. Em seguida, o gel foi encubado em solução corante de Coomassie blue R-250 (0,1%) diluído em metanol (40%) e ácido acético (10%) e água destilada por 24 horas. A atividade proteolítica foi visualizada após lavagem do gel com solução de metanol (40%), ácido acético (10%) e água destilada por alguns minutos, o que revelou bandas claras em fundo azul.

Para confirmar a presença de uma banda de atividade para α -glicosidase, um novo gel contendo 10% de acrilamida foi preparado e, após a corrida e lavagem com Triton, o gel foi cortado em 35 tiras, de 1,6 mm cada, as quais foram individualizadas em eppendorfs contendo 500 μ l de tampão citrato fosfato 0,1 M, pH 5,5, homogeneizados com Potter e mantidos no gelo por 24 horas para permitir a difusão da enzima presente nas tiras. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1 250 g por 20 segundos para a coleta de 25 μ l do sobrenadante de cada tubo, os quais foram ensaiados contra o substrato NP α Glu por 20 minutos. A presença de atividade para NP α Glu foi estimada como escrito previamente e expressa em mU/ml.

4.3 - Larvas

Larvas de *A. subterraneus* foram selecionadas considerando-se dois critérios: a) tamanho dos indivíduos, sendo o comprimento do corpo $\geq 3,5$ mm, pois de modo similar às operárias, as larvas são polimórficas; b) indivíduos visivelmente alimentados, que foram identificados pela coloração marrom escura do intestino médio em contraste com a coloração branca do corpo do inseto, já que larvas não alimentadas apresentam atividade enzimática residual (Milton Erthal Jr., observação pessoal).

4.3.1 – pH do conteúdo luminal do intestino médio

Para se conhecer as faixas de pH do intestino médio das larvas, 135 delas foram alimentadas diretamente na boca, com auxílio de capilares de vidro, com as mesmas soluções indicadoras usadas no experimento dos adultos (Tabela 1). Para cada solução indicadora, 15 larvas foram alimentadas e dissecadas em grupos de 3 nos intervalos de tempo de 1, 2, 6, 12 e 24 horas após a ingestão dos indicadores para o registro visual da coloração do intestino médio.

4.3.2 - Fluxo de dieta ao longo do intestino

Buscou-se, neste experimento, avaliar os tempos de preenchimento e residência do alimento no intestino médio das larvas. As larvas foram removidas das colônias e mantidas em placas de Petri por duas horas em jejum e, em seguida, alimentadas fartamente (períodos que variaram entre 3 e 10 minutos) com solução de mel 10% e corante azul de Evan's 0,5% diretamente na boca, com auxílio de um capilar de vidro. Placas de isopor com pequenas fendas foram usadas para que as larvas fossem posicionadas com o ventre virado para cima para facilitar sua alimentação. As larvas foram alimentadas a cada 8 horas com solução de mel 10 % durante 5 dias, que foi o período de duração do experimento. Os insetos foram dissecados em intervalos de tempo conhecidos e a presença do corante registrada visualmente no intestino médio das larvas.

4.3.3 - Obtenção do intestino médio e glândula labial

Os insetos foram dissecados em SS para a coleta do intestino médio e glândula labial. Do intestino médio obtiveram-se amostras do tecido epitelial e conteúdo luminal. A presença da matriz peritrófica no intestino médio das larvas divide o conteúdo luminal em dois compartimentos: espaços ectoperitrófico e endoperitrófico (Figura 2). Estes compartimentos foram coletados separadamente, sendo que a matriz peritrófica foi incluída nas amostras do espaço endoperitrófico. As amostras do tecido epitelial foram homogeneizadas como descrito para as operárias, e os epitélios processados para obtenção da fração solúvel e particulada. Cada lote de amostras continha compartimentos intestinais de 5 ou 10 insetos/500 µl de SS. As glândulas labiais foram igualmente processadas para obtenção da fração solúvel, sendo que os lotes continham entre 5 e 10 glândulas por 500 µl de SS.

4.3.4 – Avaliação da atividade enzimática

Os compartimentos do intestino médio foram ensaiados com os mesmos substratos usados nos ensaios dos adultos (Tabelas 2 e 3), e os resultados avaliados de modo similar. As glândulas labiais das larvas foram ensaiadas contra os mesmos substratos testados nas glândulas dos adultos.

4.3.5 - Cromatografias

Lotes de amostra contendo 15 intestinos médios de larvas foram homogeneizados e centrifugados como descrito anteriormente e aplicados na coluna de interação-hidrofóbica seguindo-se o mesmo protocolo descrito para os intestinos dos adultos. Os lotes de glândula labial continham glândulas de 20 larvas.

Para os intestinos médios das larvas, as frações foram ensaiadas contra NP α Glu, maltose e sacarose, MU- β -quitotriosídeo, NP α Gal, NP α Man, NP β Glu e celobiose, amido, glicogênio, laminarina, azoalbumina. As frações das corridas com amostras das glândulas labiais foram ensaiadas contra MU- β -quitotriosídeo.

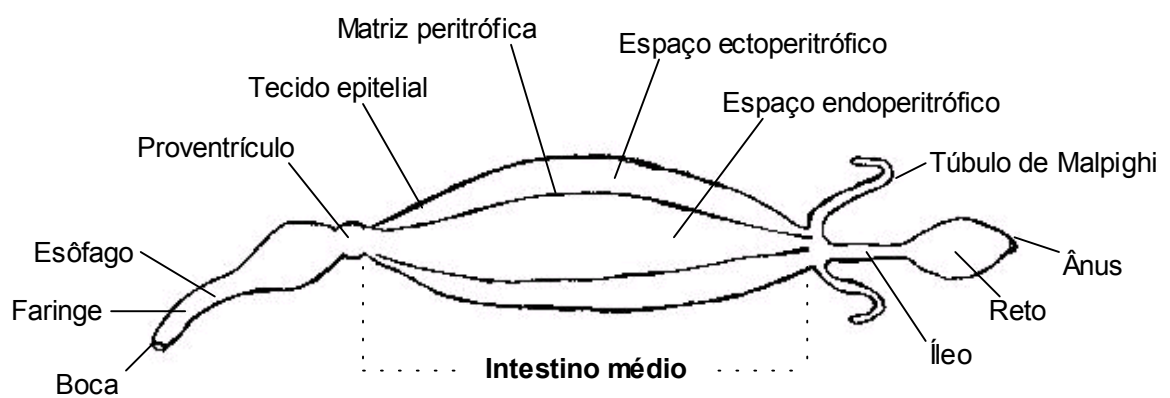


Figura 2. Desenho esquemático do canal alimentar das larvas de *Acromyrmex subterraneus*.

4.3.6 - Caracterização eletroforética

As amostras de intestino médio das larvas continham entre 5 e 10 intestinos por 100 μ l de água destilada, enquanto que as amostras de glândulas labiais continham 15 glândulas por 100 μ l de água destilada. Os géis foram revelados para detectar atividade de α -glicosidase, β -glicosidase, α -galactosidase, α -amilase, quitinase e proteinase.

4.4 – Fungo simbiote

4.4.1 - Coleta do jardim e hifas do fungo

A atividade de enzimas foi testada na parte superior do jardim de fungo cultivado por *A. subterraneus*. Esta região é considerada a parte “nova” da esponja, que é o local onde o material vegetal fresco é incorporado e há destacado desenvolvimento de hifas e produção de gongilídeos (Bass e Cherrett, 1996). A esponja fúngica cultivada por operárias de *Atta* spp. abriga grande diversidade de microorganismos (Carreiro *et al.*, 1997; Santos, 2003), e possivelmente o jardim cultivado por espécies de *Acromyrmex* apresenta padrão similar.

A atividade de enzimas da esponja fúngica foi avaliada através da coleta de duas partes (Figura 3):

a) pedaços de 0,3g de esponja que foram triturados em um cadinho após a adição de N₂ líquido e em seguida transferidos para tubos eppendorf contendo 1 ml de SS, os quais foram mantidos no gelo e agitados em vortex por 10 vezes a cada 30 segundos, intercalando-se repouso no gelo por 30 segundos;

b) coleta de hifas e gongilídeos do fungo simbiote (*Leucocoprinus* sp.) que foram removidos, com o auxílio de um par de pinças finas, de pedaços de aproximadamente, 10 gramas da parte superior da esponja, os quais foram destacados das colônias e levados ao microscópio estereoscópico com aumento de 10 vezes. As estruturas do fungo foram removidas e transferidas para tubos eppendorf contendo 500µl de solução salina, até que as amostras preenchessem 1/10 do volume total do tubo, aproximadamente, o que corresponde a 150 µl.

As amostras (a e b) foram centrifugadas de modo similar ao tecido epitelial do intestino das formigas para a coleta da fração solúvel. o pelete das amostras de hifas e gongilídeos foi resuspendido e homogeneizado em 500 µl de SS.

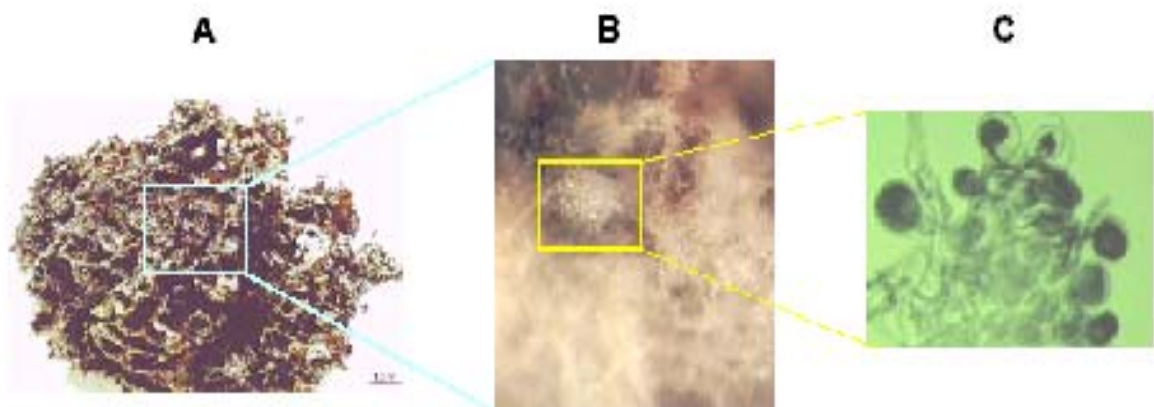


Figura 3. Aspecto da esponja do jardim de fungo cultivado por formigas cortadeiras (A). Na figura B observa-se um tufo de hifas do fungo simbiote e dentro do retângulo amarelo um cacho de gongilídeos; Uma foto ampliada dos gongilídeos na figura C.

4.4.2 – Atividade enzimática no jardim e hifas do fungo

As amostras de hifa e jardim de fungo foram ensaiadas contra substratos atacados com maior intensidade por enzimas presentes no intestino das larvas e adultos de *A. subterraneus*, e contra substratos atacados por enzimas secretadas pelo fungos simbiote cultivado por *Atta sexdens* (Bacci Jr. *et al.*, 1995b; Siqueira *et al.*, 1998; Abril e Bucher, 2002). Os substratos ensaiados foram: amido, glicogênio, MU- β -quitotriosídeo, pectina, laminarina, β_{1-3} glucano, celulose azure, celulose microcristalina, CMC, NP α Glu, maltose, sacarose, NP β Glu, celobiose, NP α Gal, rafinose, NP α Man e os substratos protéicos descritos na Tabela 1.

4.4.3 - Caracterização eletroforética

Amostras de hifa e jardim de fungo foram obtidas de modo similar ao descrito para os ensaios enzimáticos, sendo as hifas coletadas em maior quantidade, para detectar em gel a atividade de β -glicosidase, α -galactosidase, α -amilase e proteinases.

4.4.4 - Cultivo do fungo simbiote *in vitro*

O fungo simbiote (*Leucocoprinus* sp.), cultivado por *A. subterraneus*, foi isolado dos ninhos e inoculado em meios de cultura para verificar a capacidade de produção de enzimas digestivas direcionadas para a degradação de polímeros de plantas. O isolamento do fungo foi feito a partir de pedaços de, aproximadamente 10 g de esponja que foram removidos dos ninhos, transferidos para placas de Petri (9 cm de diâmetro) estéreis e manipulados sob microscópio estereoscópico em uma câmara de fluxo laminar. Com auxílio de um par de pinças finas, as hifas foram cuidadosamente removidas da esponja e inoculadas em meios sólidos de extrato de Malte (Acumedia-USA) com Agar (Oxoid-UK) e sem antibiótico, que, em ensaios preliminares, se mostrou mais adequado para o desenvolvimento deste fungo (Manhães *et al.*, 2003). O meio de extrato de malte era composto por malte (3 %), peptona (0,5 %) e agar (1,5 %), sendo que estes componentes foram dissolvidos em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0 e vertidos em placas de Petri (25 ml/placa) após a autoclavagem (20 min, 115 bar). As placas foram periodicamente vistoriadas para a remoção de microorganismos

contaminantes. Todo material usado durante o isolamento foi previamente esterilizado com luz UV durante 15 min para minimizar a contaminação por outros microorganismos.

Trinta dias de desenvolvimento foram suficientes para que as colônias de fungo simbiote atingissem diâmetro $\geq 1,5$ cm (Figura 4). As colônias foram raspadas dos meios sólidos com auxílio de uma alça de platina previamente esterilizada e transferidas para meio líquido, onde a atividade de enzimas foi avaliada. Após autoclavagem, o meio líquido, que era constituído por parede celular de planta (1 %), meio de minerais (0,1 %) (Tabela 1) e tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0, foi vertido em erlermeyers de 50 ml (20 ml de meio/frasco), os quais foram inoculados com três colônias de fungo cada. Cinco erlermeyers inoculados com colônias de fungo, além de outros três que serviram como controle (meio sem fungo) foram mantidos sob agitação (130 rpm, 25°C) durante seis dias, que é um período suficiente para liberação de enzimas no meio, como demonstrado em ensaios preliminares (Manhães et al, 2003). Após este período, os meios foram transferidos para o gelo, filtrados em papel de filtro, centrifugados (20 000 g/20 min, 4°C) e armazenados a -15°C. Todo o processo de repicagem foi realizado sob as condições de assepsia previamente descritas.

A parede celular usada no meio líquido foi obtida de folhas de *Acalypha* sp., que é uma planta bem aceita por *A. subterraneus*. Cem gramas de folhas picotadas foram maceradas em um cadinho, com auxílio de um bastão, após a adição de N₂ líquido, e transferidas para um Becker mantido no gelo, onde se adicionou tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0 em volume 2,5 vezes maior que o de folhas trituradas. A solução foi mantida em repouso por cinco minutos no gelo e, em seguida, batida no liquidificador em alta velocidade durante três minutos e filtrada em tecido organza, para a coleta do material insolúvel, o qual foi novamente resuspendido no tampão fosfato e processado. Este processo foi repetido três vezes, sendo que, na última, utilizou-se água destilada como solvente. A massa de resíduos de folhas retida na organza foi em seguida solubilizada com metanol e clorofórmio 1:1 (v/v), agitada por 3 minutos com bastão de vidro e filtrada para a coleta do material insolúvel. O volume de solvente usado foi de duas vezes o volume da massa do resíduo de folha. Este processo foi repetido três vezes, sendo que, na última, usou-se acetona como solvente. O material insolúvel resultante das lavagens foi armazenado em um

Becker, coberto com papel laminado com furos, e deixado na bancada por quatro dias para permitir a volatilização dos solventes. Em seguida, o material seco foi transferido para um recipiente fechado contendo sílica gel para que a secagem fosse total, sem resíduo tóxico no meio, e mantido na geladeira para minimizar o crescimento de microorganismos.

4.4.5 – Atividade enzimática nos filtrados de meio de cultura

O meio de cultura líquido foi congelado após o sexto dia de crescimento e ensaiado posteriormente contra os substratos: pectina, glicogênio, laminarina, NP α Gal e NP β Glu, pois estes substratos foram altamente degradados nos ensaios do jardim e hifas fungicas.

4.4.6 - Cromatografias

Cinco ml dos meios de cultura líquidos usados para o desenvolvimento do fungo simbiote também foram aplicados à coluna de interação-hidrofóbica, seguindo-se o mesmo protocolo descrito para os insetos. As frações foram ensaiadas contra NP α Glu, sacarose, NP β Glu e MU- β -quitotriosídeo.

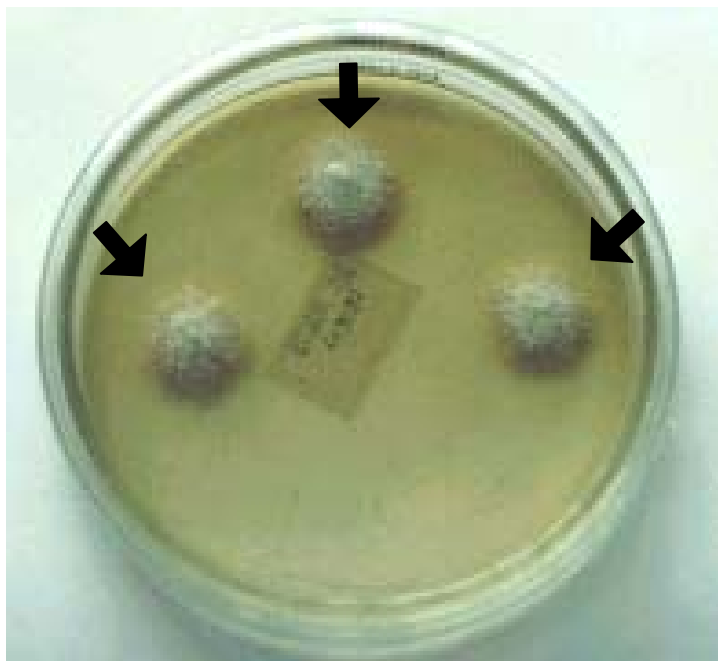


Figura 4. Placa de Petri contendo três colônias de fungo simbiote (setas pretas) cultivado por *Acromyrmex subterraneus*, 30 dias após a inoculação das hifas.

Tabela 4. Meio de minerais (basal salts medium, St Leger *et al.*, 1986) adicionados aos meios de cultura líquidos para o desenvolvimento dos fungos mutualísticos cultivados por *Acromyrmex subterraneus*

| Elementos químicos | Concentração (%) |
|---|------------------|
| KH_2PO_4 | 0,1 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,05 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,2 |
| ZnSO_4 | 0,02 |
| $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 0,02 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ | 0,02 |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ | 0,02 |

5. RESULTADOS

5.1 - Adultos

5.1.1 - pH do conteúdo luminal do intestino

O uso das soluções indicadoras de pH demonstraram uma acidificação gradual dos compartimentos do canal alimentar examinadas, iniciando-se no intestino médio, íleo e reto (Figura 5). O papo apresentou ampla faixa de pH alcalino (8,2 – 6,0), o intestino médio apresenta faixa de pH em torno da neutralidade (6,4 – 7,6), enquanto que os conteúdos luminais do íleo e do reto apresentam condição ácida (5,0 – 3,0).

5.1.2 – Fluxo da dieta pelo intestino

As operárias supridas com a dieta contendo azul de Evans apresentam rápido tempo de preenchimento e longo tempo de residência do alimento no canal alimentar. Trinta segundos são necessários para o preenchimento do papo, intestino médio e íleo das formigas, enquanto que a passagem para o reto se inicia 15 minutos após a ingestão, sendo necessários mais 30 minutos para que este compartimento seja inteiramente preenchido (Figura 5). A dieta permaneceu no papo por 12 horas, e 10 dias no íleo e reto. O experimento se estendeu por 11

| | <u>Papo</u> | <u>Intestino Médio</u> | <u>Íleo</u> | <u>Reto</u> |
|------------------|-------------|------------------------|-------------|-------------|
| pH | 8,2 – 6,0 | 7,6 – 6,4 | 5,0 – 4,5 | 5,0 – 3,0 |
| TP (min.) | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 15 – 45 |
| TR (dias) | 0,5 | * | 10 | 10 |

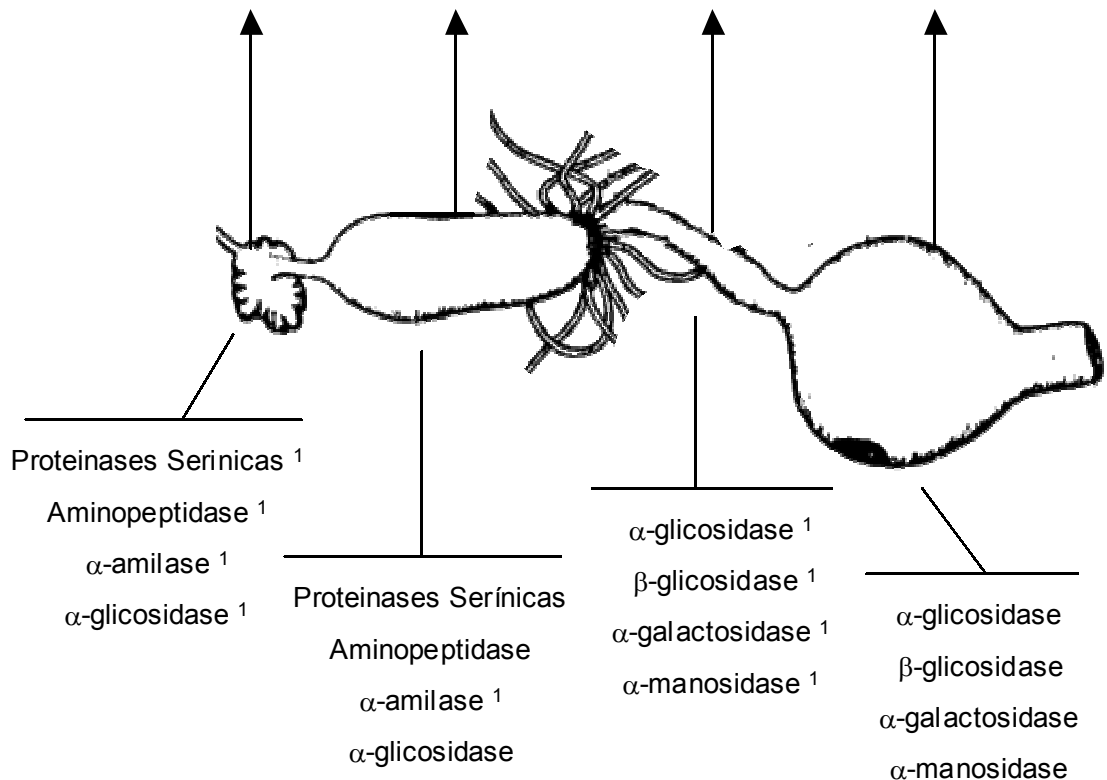


Figura 5. Representação esquemática de um trecho do intestino de *Acromyrmex subterraneus* localizado no abdômen. As faixas de pH, tempo de preenchimento (TP) e tempo de residência (TR) do conteúdo luminal do papo, intestino médio, íleo e reto estão indicados pelas setas. Sob as linhas horizontais estão listadas algumas enzimas que teoricamente poderiam ser ativas nas faixas de pH descritas para cada compartimento (valores de pH ótimo foram obtidos de Terra e Ferreira, 1994). * No último grupo de formigas (n = 5), dissecado 11 dias após o início do experimento, havia formigas cujo conteúdo luminal do intestino médio apresentava coloração azul clara em relação à coloração intensa dos dias anteriores.¹ Enzimas não detectadas ou investigadas nos compartimentos intestinais indicados.

dias e as últimas formigas dissecadas ainda apresentavam vestígios do corante no intestino médio.

5.1.3 - pH ótimo de atividade de três carboidrases do reto

A influência do pH do meio de reação sobre a atividade de α -glicosidase, β -glicosidase e α -galactosidase presentes no reto das operárias foi investigada. A α -glicosidase mostrou-se ativa em ampla faixa de pH (4,5 a 10), sendo mais ativa entre 5,0 e 7,0 e com pH ótimo de 5,25 (Fig. 12). Este resultado sugere que o papo, Intestino médio, íleo e reto apresentam condições favoráveis, mas não ótimas, para a atividade de α -glicosidase. A atividade de α -galactosidase é mais intensa em uma faixa de pH entre 4,0 e 7,0, com eficiência máxima entre 5,25 e 5,75 (Fig. 12). A enzima β -glucosidase apresenta pico de atividade em pH 5,5, sendo ela pouco ativa em $\text{pH} \leq 4,0$ e $\geq 8,0$.

5.1.4 - Distribuição espacial de enzimas

Dezessete substratos demonstraram níveis detectáveis de atividade enzimática, que variaram entre uma faixa de 0,1 e 27,0 mU/animal (atividade absoluta) e 24 e 16000 mU/mg de proteína (atividade específica) nos diferentes compartimentos estudados. Atividades contra lactose, celulose microcristalina, celulose azure, CMC, β_{1-3} -glucano, laminarina e xilana não foram detectadas no intestino dos adultos, enquanto que pectina apresentou traços de atividade no reto. Níveis significativos de atividade contra NP α Glu foram detectados em quase todos os compartimentos estudados, exceto na fração particulada do reto (Tabelas 5 e 6). Atividades contra maltose e sacarose também foram detectadas com mesmo padrão de distribuição espacial observado contra NP α Glu, no entanto, com menores níveis de atividades. No conteúdo luminal do intestino médio detectaram-se atividades significativas de α -glucosidase, quitinase ou lisozima e proteinases (Tabela 5). O conteúdo luminal do reto apresentou atividade contra 16 substratos, sendo 5 deles protéicos, excluindo-se aminopeptidase e, entre as carboidrases, as atividades mais expressivas foram contra rafinose, amido e MU- β -quitotriosídeo (Tabela 6).

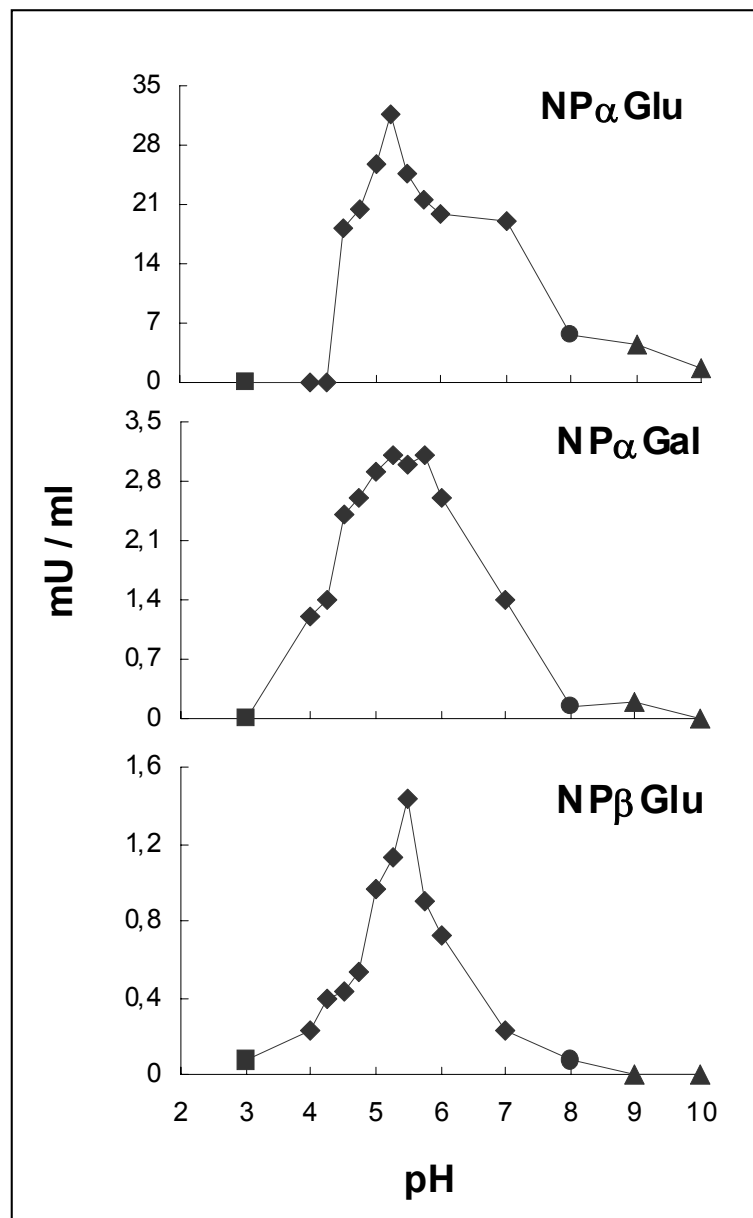


Figura 6. Influência do pH sobre atividade das enzimas α -glucosidase, β -glucosidase e α -galactosidase presentes no conteúdo luminal do reto de operárias de *Acromyrmex subterraneus*. Os símbolos na curva de atividade indicam os tampões utilizados: ácido cítrico (■), citrato-fosfato (◆), fosfato (●) e glicina (▲).

Tabela 5. Atividade enzimática no tecido epitelial e conteúdo luminal do intestino médio de operárias de *Acromyrmex subterraneus*

| Substratos | Intestino Médio | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | Epitélio | | Conteúdo Luminal |
| | Fração Solúvel | Fração Particulada | |
| MU- β -quitotriosídeo | - | - | 13 \pm 4,4 (650 \pm 220) |
| NP α Glu | 23 \pm 7 (9200 \pm 2700) | 24 \pm 4 (16000 \pm 2600) | 27 \pm 10 (9900 \pm 3700) |
| Maltose | 2,4 \pm 0,4 (950 \pm 160) | 2,6 \pm 0,5 (1500 \pm 270) | 2,3 \pm 0,5 (1000 \pm 200) |
| Sacarose | 8,1 \pm 1,4 (2400 \pm 440) | 2,8 \pm 0,4 (1900 \pm 290) | 2,7 \pm 0,7 (1300 \pm 330) |
| Celobiose | - | 0,5 \pm 0,2 (280 \pm 90) | - |
| Azoalbumina | - | - | 1,8 \pm 0,5 (830 \pm 240) |
| N-Suc-Ala ₂ -Pro-Phe-pNA | 0,2 \pm 0,04 (75 \pm 19) | - | 0,2 \pm 0,05 (63 \pm 23) |
| N-Bz-Phe-Val-Arg-pNA | - | - | 0,1 \pm 0,01 (24 \pm 3,3) |
| N-Phe-Ala-pNA | 0,1 \pm 0,01 (27 \pm 4,6) | - | 0,2 \pm 0,04 (92 \pm 19) |
| N-Bz-Arg-pNA | - | - | 0,1 \pm 0,01 (28 \pm 5) |
| N-Leu-pNA | - | - | 0,2 \pm 0,1 (83 \pm 42) |

As médias \pm desvios padrões das atividades absolutas e específicas (valores entre parênteses) foram expressas em mmols de substrato liberado por minuto/animal ou mU/animal, e mU/animal/mg de proteína ou mU/mg de proteína, respectivamente. A unidade de atividade contra azoalbumina foi considerada como variações de 0,001 unidades de absorvância por hora. Os traços (-) indicam atividades \leq 0,03 mU/animal.

Tabela 6. Atividade enzimática no tecido epitelial e conteúdo luminal do reto de operárias de *Acromyrmex subterraneus*. Informações adicionais vide rodapé da tabela 5 na pág. 58

| Substratos | Reto | | |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | Epitélio | | Conteúdo Luminal |
| | Fração Solúvel | Fração Particulada | |
| Amido | - | - | 4,4 ± 1,1 (1300 ± 330) |
| UM-β-quitotriosídeo | - | - | 7,5 ± 1,8 (470 ± 110) |
| NP α Glu | 10 ± 4 (13000 ± 5600) | - | 26 ± 4 (4600 ± 740) |
| Maltose | - | - | 2,4 ± 0,5 (370 ± 72) |
| Sacarose | 0,6 ± 0,1 (530 ± 46) | - | 11 ± 3 (1400 ± 350) |
| NP α Gal | - | - | 2,9 ± 0,6 (420 ± 80) |
| Melibiose | - | - | 0,3 ± 0,1 (38 ± 8) |
| Rafinose | - | - | 7,7 ± 0,2 (1300 ± 35) |
| NP β Glu | - | - | 2,5 ± 0,5 (380 ± 68) |
| Celobiose | - | - | 1,4 ± 0,3 (260 ± 55) |
| NP α Man | - | - | 2,6 ± 1,3 (400 ± 190) |
| Azoalbumina | 1 ± 0 (1100 ± 0) | - | 8 ± 3 (1200 ± 460) |
| N-Suc-Ala ₂ -Pro-Phe-pNA | - | - | 0,3 ± 0,04 (42 ± 5,4) |
| N-Bz-Phe-Val-Arg- pNA | - | - | 0,5 ± 0,05 (62 ± 6,4) |
| N-Bz-Phe-Ala-pNA | 0,1 ± 0,01 (120 ± 18) | 0,2 ± 0,04 (100 ± 23) | 0,3 ± 0,05 (34 ± 7) |
| N-Bz-Arg-pNA | 0,2 ± 0,05 (210 ± 78) | 0,1 ± 0,06 (72 ± 33) | 0,2 ± 0,08 (26 ± 12) |

Altos níveis de degradação do substrato MU- β -quitotriosídeo, que podem significar atividade de quitinase ou lisozima, foram detectados nas glândulas labiais e conteúdo luminal do reto e intestino médio. No entanto, esta atividade foi ausente nas frações dos respectivos tecidos epiteliais. Baixos níveis de atividade proteolítica foram observados no conteúdo do reto e intestino médio, sendo que atividade de proteinases do tipo tripsina e quimotripsina também estão associadas com o tecido epitelial destes compartimentos. Atividade para aminopeptidase foi apenas detectada nas glândulas labiais e conteúdo luminal do intestino médio, estando ausente no respectivo tecido epitelial e no reto.

5.1.5 - Atividade enzimática associada às glândulas labiais

Dos 10 substratos testados contra extratos da glândula labial, apenas 4 foram degradados, com atividade expressiva para MU- β -quitotriosídeo, atividades intermediárias contra amido e glicogênio, e apenas traços de atividade para aminopeptidase (Tabela 7).

5.1.6 – Cromatografia

Amostras de extrato de intestino médio eluídas na coluna fenil-agarose apresentaram atividade contra NP α Glu, maltose e sacarose entre as frações 3 e 20, com atividade máxima nas frações 5, 6 e 7 (Fig. 7). Este perfil de eluição demonstra a natureza hidrofílica desta enzima. Em torno da fração 34, pode-se observar um pequeno pico de atividade, o que sugere a presença de duas α -glicosidases. Quando amostras do intestino médio foram aplicadas na coluna de filtração em gel (S-200), a atividade de α -glicosidase foi detectada entre as frações 18 e 25, com atividade máxima nas frações 20, 21 e 22 (Fig. 7), sugerindo que esta enzima tem massa molecular de, aproximadamente, 56 500.

Observando-se a Figura 8, nota-se que o perfil de eluição de α -glicosidase presente no reto de *A. subterraneus* apresenta caráter hidrofílico e massa molecular similar à α -glicosidase presente no intestino médio, o que sugere tratar-se de mesma enzima. Não se observou no reto atividade em torno da fração 34.

Tabela 7. Atividade enzimática nas glândulas labiais de larvas e adultos de *Acromyrmex subterraneus*. Vide rodapé da tabela 5 na pág. 59 para informações adicionais

| Substratos | Atividades | |
|-----------------------------|---|--|
| | Adultos | Larvas |
| MU- β -quitotriosídeo | 1100 \pm 300 (700000 \pm 200000) | 2400 \pm 300 (120000 \pm 15000) |
| Amido | 3,0 \pm 0,9 (19000 \pm 5600) | 9,4 \pm 0,9 (2800 \pm 260) |
| Glicogênio | 1,5 \pm 0,6 (9200 \pm 4000) | 7,1 \pm 0,6 (2100 \pm 180) |
| N-Leu-pNA | 0,01 \pm 0,006 (5,3 \pm 2,4) | 0,003 \pm 0 (3,3 \pm 0) |

Fenil-agarose

S-200

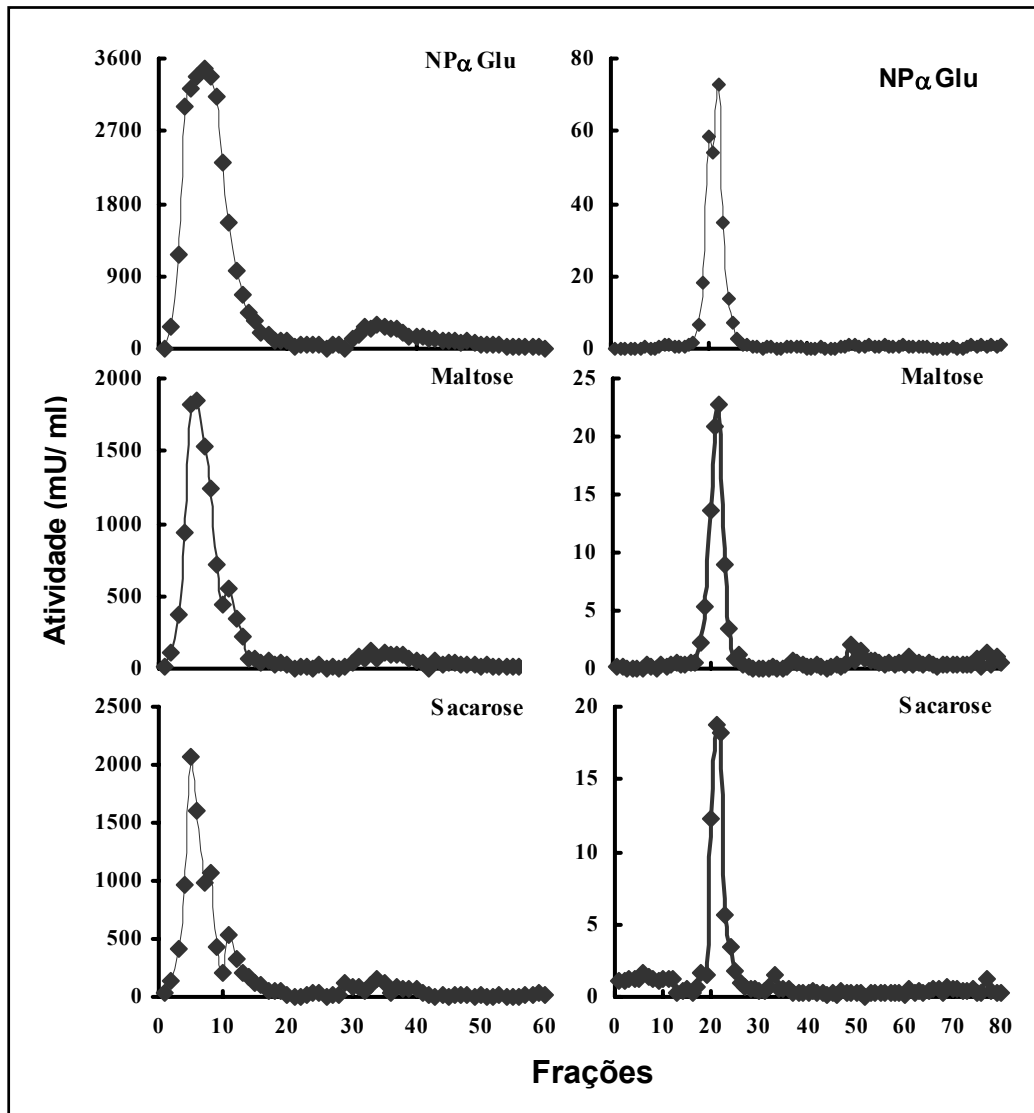


Figura 7. Atividade de α -glucosidase nas frações cromatográficas provenientes das colunas: fenil-agarose (esquerda) e S-200 (direita), nas quais foram aplicadas amostras de macerado de intestino médio de *Acromyrmex subterraneus*.

Fenil-agarose

S-200

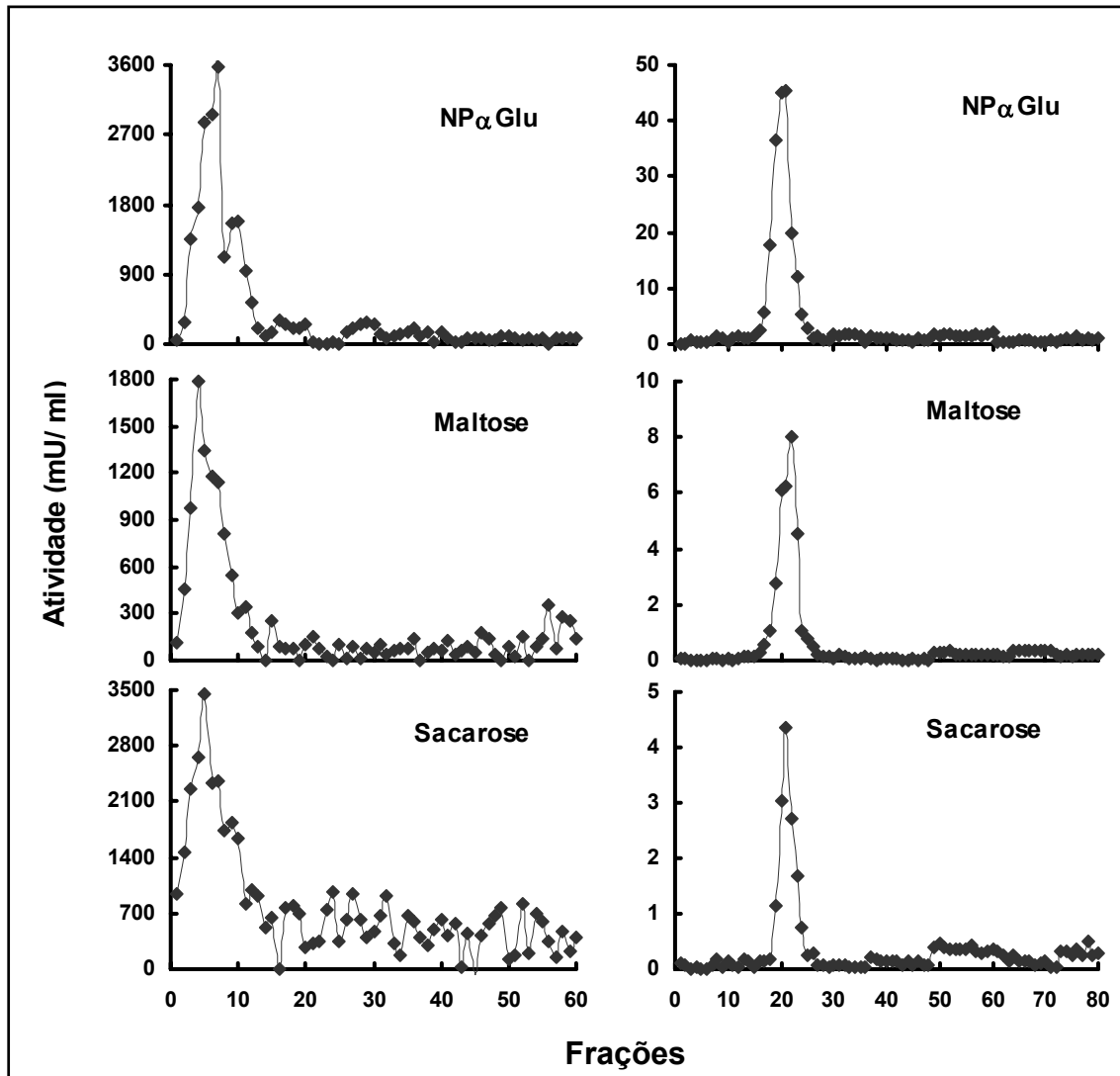


Figura 8. Atividade de α -glucosidase nas frações cromatográficas provenientes das colunas: fenil-agarose (esquerda) e S-200 (direita), nas quais foram aplicadas amostras de macerado do reto de *Acromyrmex subterraneus*.

A atividade de β -glicosidase nas frações cromatográficas eluídas na coluna de interação hidrofóbica resultaram em três picos de atividade: o primeiro, eluído no início da corrida (fração 5), um segundo pico no meio da corrida (fração 36) e o último nas frações finais da corrida (pico na fração 59), que apresentaram atividades mais expressivas (Fig. 9). Dois picos de atividade foram detectados nas frações eluídas na coluna de filtração em gel (S-200), sugerindo que estas enzimas apresentam massa molecular de 63 400 (frações 15 - 16) e 46 700 (frações 31 - 32) (Fig. 9).

As amostras do reto eluídas nas duas colunas apresentaram um único pico de atividade de α -galactosidase (Fig. 9). Na coluna de interação hidrofóbica, o pico de atividade ocorreu no início da corrida (fração 4), indicando a natureza hidrofílica desta enzima. Na coluna de filtração em gel, o pico de atividade ocorreu nas frações 16 a 18, sugerindo uma enzima com massa molecular de 61 300.

As frações eluídas na coluna de interação hidrofóbica, onde se aplicou amostra do reto de *A. subterraneus*, apresentaram dois picos de atividade contra o substrato NP α Man (específico para detecção de α -Manosidase): um inicial em torno da fração 5, que pode ser enzima em excesso, e o segundo no meio da corrida, em torno da fração 36 (Fig. 9). Nas frações obtidas na coluna de filtração em gel observou-se um único pico de atividade (fração 15), indicando que esta enzima apresenta massa molecular de, aproximadamente, 63 400, sendo, portanto, similar a uma β -glicosidase (Fig. 9).

Dois picos de atividade contra o substrato MU- β -quitotriosídeo foram detectados nas frações eluídas na coluna de interação hidrofóbica, onde se aplicou amostra do reto, o primeiro, em torno da fração 5 e o último, em torno da fração 52, que apresenta caráter hidrofóbico (Fig. 10). Este resultado nos permite afirmar a presença de, pelo menos, uma quitinase ou lisozima neste compartimento. Para as amostras de glândula labial das operárias, nota-se um único pico de atividade, com atividade máxima na fração 54. A atividade de quitinase/lisozima nas frações finais de amostras do reto e da glândula labial de operárias sugere que esta enzima pode ser proveniente da glândula labial (Fig. 10).

A atividade de proteinases também foi investigada nas frações provenientes da coluna S-200 onde se aplicou amostra do reto. Na Figura 11, observa-se um pico de atividade para azoalbumina entre as frações 46 e 56, com

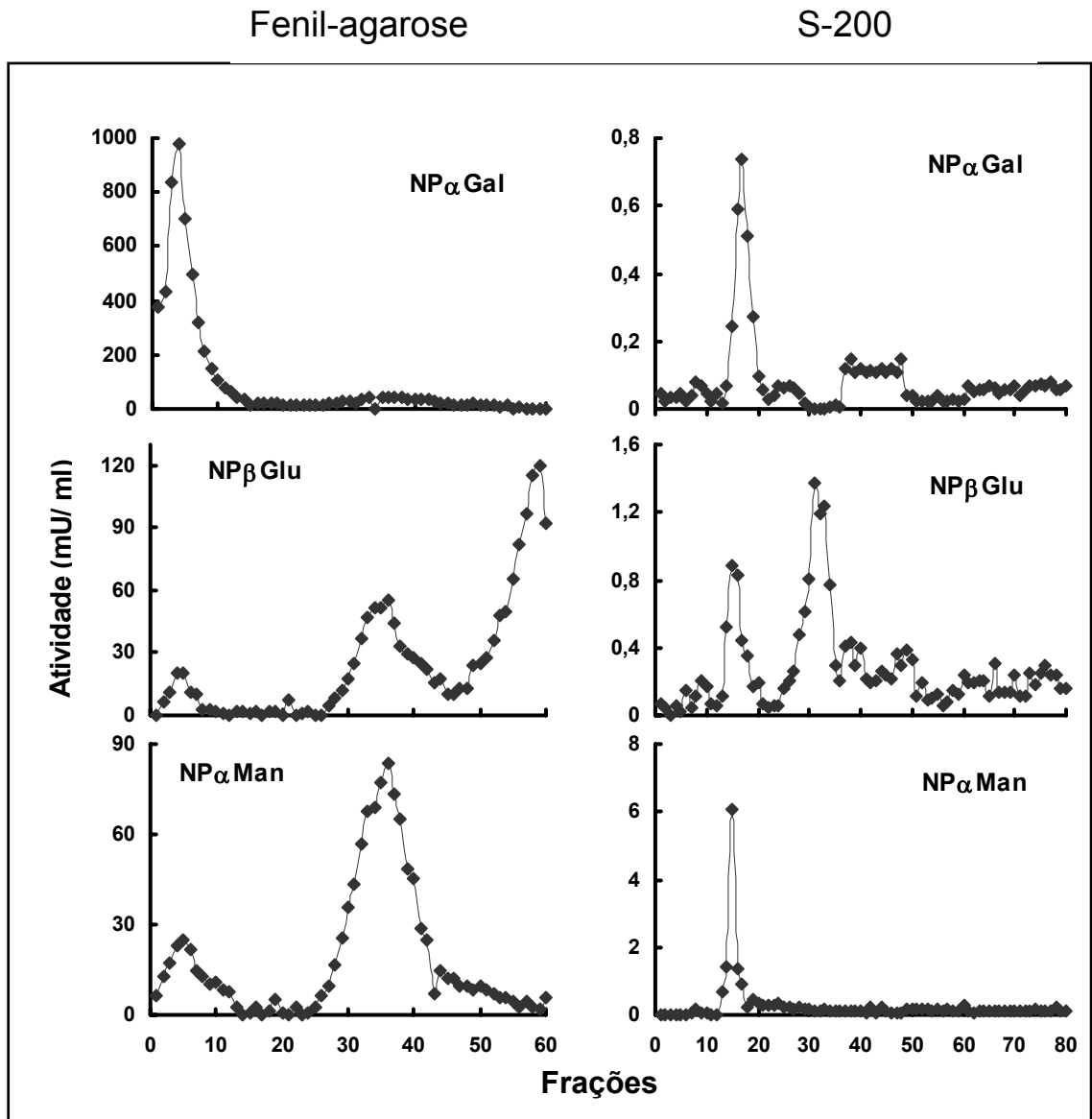


Figura 9. Atividades de α -galactosidase, β -glucosidase e α -manosidase nas frações cromatográficas provenientes das colunas: fenil-agarose (esquerda) e S-200 (direita), nas quais foram aplicadas amostras de macerado do reto de *Acromyrmex subterraneus*.

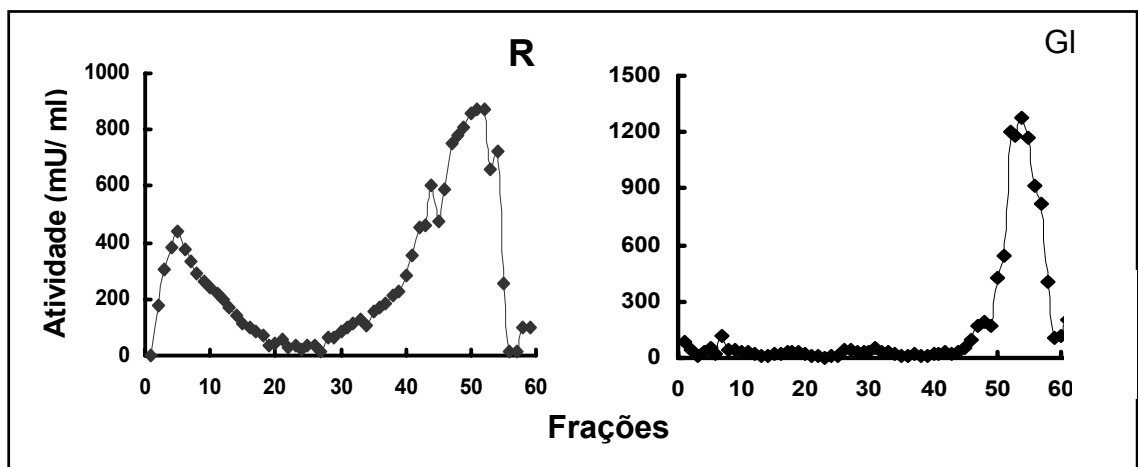


Figura 10. Atividade contra MU- β -quitotriosídeo nas frações cromatográficas provenientes da coluna fenil-agarose, na qual se aplicaram amostras de macerado do reto (R) e glândula labial (GI) de operárias de *Acromyrmex subterraneus*.

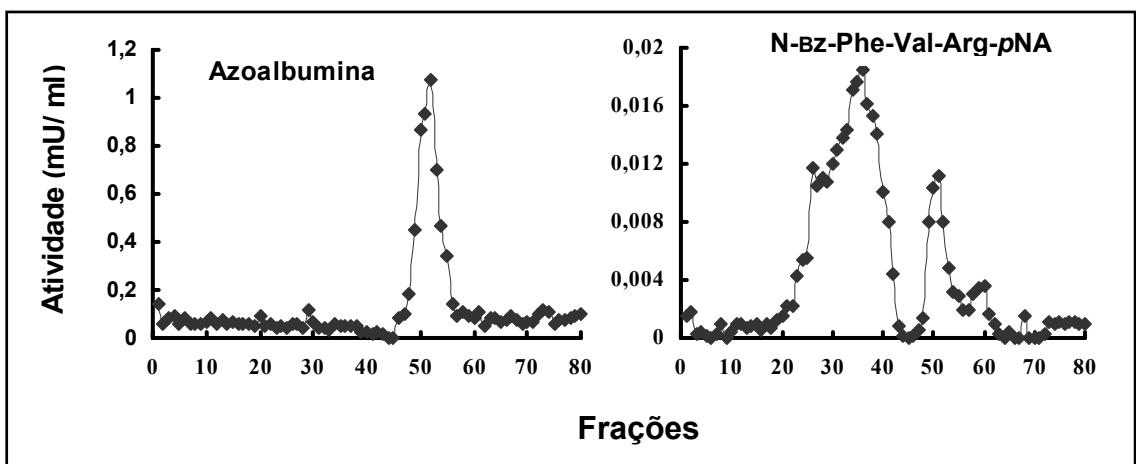


Figura 11. Atividade de proteinases nas frações cromatográficas provenientes da coluna S-200, na qual se aplicaram amostras de macerado do reto de *Acromyrmex subterraneus*.

atividade máxima no tubo 52, indicando a ocorrência de uma proteinase com massa molecular de 24 900. O ensaio das frações com substrato específico para detectar atividade de tripsina (N-Bz-Phe-Val-Arg-pNA) indicou a presença de dois picos de atividade, sendo o primeiro de uma enzima com massa molecular de 42 600, e um segundo, que coincide com o pico observado para azoalbumina, com massa molecular de 24 900.

5.1.7 Eletroforese

A caracterização eletroforética das enzimas com atividades majoritárias no intestino dos adultos foi útil para constatar a presença de isoenzimas (β -glucosidases, α -galactosidases, α -amilases, quitinases e proteinases) presentes, principalmente, no reto dos adultos. Uma exceção foi a enzima α -glucosidase, que, no gel (8%) mostrado na figura 12, apresenta uma única banda de atividade, que são coincidentes nas raias onde se aplicaram amostras de intestino médio e reto. Um segundo gel (10%), que foi cortado em tiras as quais foram ensaiadas contra NP α Glu, apresentou resultado similar ao primeiro gel, indicando a presença de um pico de atividade entre as tiras 12 e 16 nas raias contendo amostra de intestino médio e reto (Fig. 12).

Nos géis onde se aplicou amostra do reto, duas bandas de atividade de β -glucosidases e α -galactosidases podem ser visualizadas, respectivamente (Fig. 13). A atividade de α -amilases foi detectada nas amostras do intestino médio e reto, sendo que, em ambos, pode-se observar duas bandas de atividade (Fig. 13). Uma banda de atividade de quitinase pode ser observada nas raias contendo amostras de macerado de tórax e abdômen de adultos, no entanto, as bandas não são coincidentes, indicando que a quitinase do abdômen apresenta massa molecular maior que a do tórax, cuja origem provável seja a glândula labial (Fig. 13). O gel de gelatina indica que os adultos apresentam três proteinases presentes nas amostras de intestino médio e reto (Fig. 13).

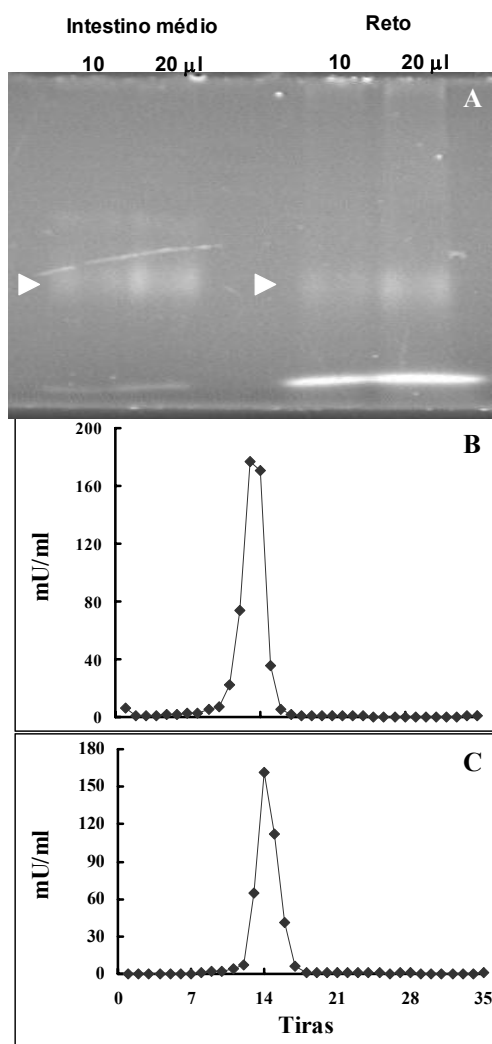


Figura 12. SDS-PAGE 8% usado para detecção da atividade de α -glucosidase (setas brancas) do intestino médio e reto de *Acromyrmex subterraneus* (A). Atividades contra NP α Glu nas tiras de um gel 10% onde se aplicaram amostras de 25 intestinos médios (B) e 18 retos (C). O gel foi cortado em 35 tiras de 1,6 mm cada.

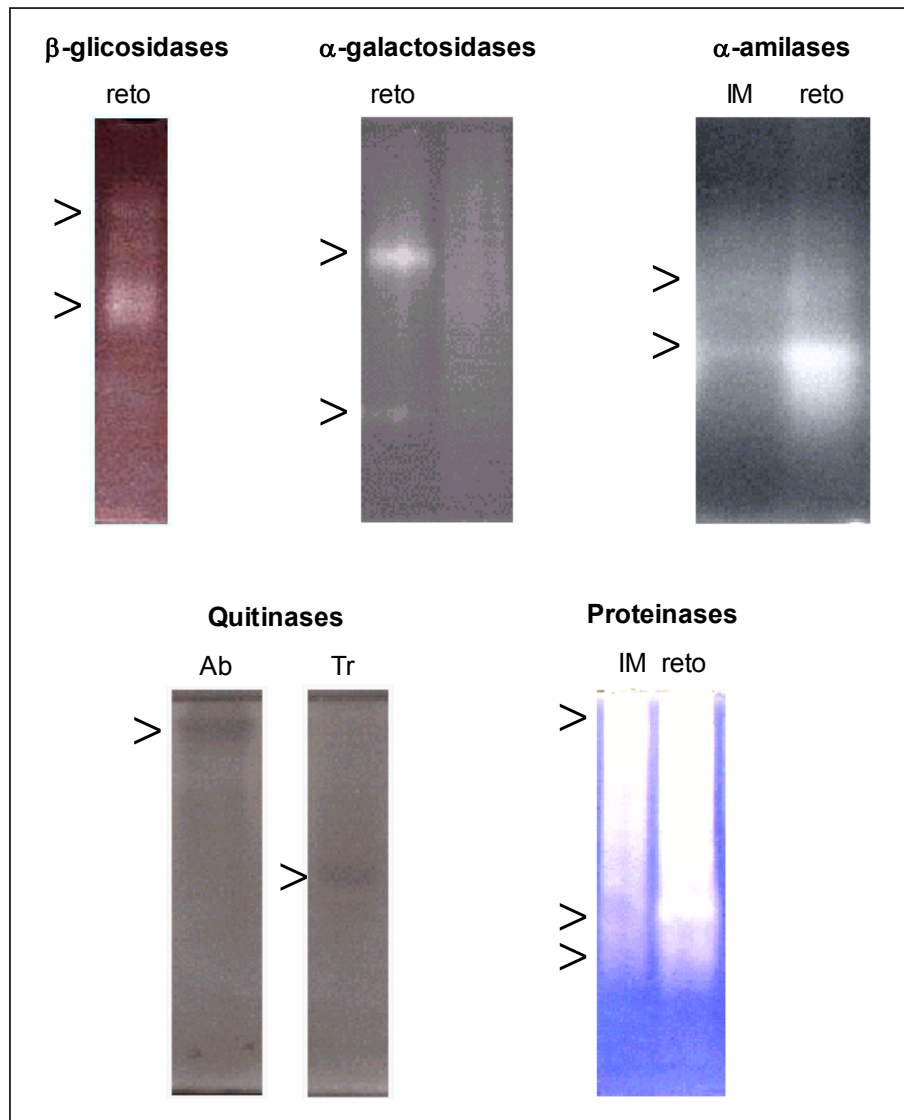


Figura 13. SDS-PAGES para detecção de β -glicosidases, α -galactosidases, α -amilases, quitinases e proteinases no trato digestivo de operárias de *Acromyrmex subterraneus*. As setas indicam a presença de bandas de atividade. Abreviações: IM, intestino médio; Ab, abdômen macerado em N₂; Tr, tórax macerado em N₂.

5.2 - Larvas

5.2.1 – Faixas de pH e tráfego de alimento no intestino médio

Os indicadores de pH azul de bromofenol, azul de bromotimol e violeta de bromocresol indicaram que a porção anterior do intestino médio das larvas de *A. subterraneus* (aproximadamente $\frac{1}{4}$ do comprimento total) apresenta faixa de pH ácida, entre 3,0 e 6,8, enquanto que a porção posterior apresenta pH em torno da neutralidade, entre 5,2 e 7,6.

Nas larvas alimentadas com solução de mel e azul de Evans, observou-se que o corante ingerido pela boca é prontamente transferido para o intestino médio através do esofago. No intestino médio, o alimento se desloca lentamente, permanecendo na sua porção anterior. Cinco dias após a ingestão do corante, observou-se este preenchendo, no máximo, até 1/10 do comprimento total deste compartimento.

5.2.2 - Distribuição espacial das enzimas

Com exceção dos substratos quitina azure, celulose azure, celulose microcristalina, carboximetilcelulose, N-Phe-Ala-pNA e Bz-Arg-pNA, todos os demais foram degradados por amostras do intestino médio das larvas, com atividades absolutas e específicas variando entre 0,1 e 167 (mU / animal), e 1820 e 1,1 (mU / mg de proteína), respectivamente. As amostras do tecido epitelial apresentaram atividades contra 10 substratos testados. Na fração solúvel, detectou-se maior diversidade de enzimas, sendo α -amilase, α -glucosidase, β -glucosidase, α -manosidase, quimotripsina e aminopeptidase as mais ativas. Estas enzimas (exceto α -amilase) também foram detectadas na fração particulada do epitélio, onde suas atividades (absoluta e específica) são geralmente superiores em relação à fração solúvel (Tabela 9).

As maiores atividades foram detectadas no conteúdo luminal do intestino médio das larvas, com exceção para aminopeptidase, que foi mais ativa na fração particulada do tecido epitelial. No conteúdo luminal, a atividade de carboidrases foi maior no espaço endoperitrófico do que no espaço ectoperitrófico, enquanto que a atividade proteolítica foi similar em ambos (Tabela 9). Os substratos amido,

Tabela 8. Atividade enzimática no tecido epitelial e conteúdo luminal do intestino médio de larvas de *Acromyrmex subterraneus*. Informações adicionais vide rodapé da tabela 5 na pg. 60

| Substratos | Epitélio | | Conteúdo luminal | |
|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | Fração solúvel | Fração particulada | Espaço ectoperitrófico | Espaço Endoperitrófico |
| Amido | 2,8 ± 0,5 (60 ± 12) | - | 93 ± 7 (1970 ± 149) | 167 ± 12 (1800 ± 125) |
| Glicogênio | - | - | 87 ± 19 (1630 ± 355) | 162 ± 11 (1820 ± 125) |
| MU-β-quitotriosídeo | - | - | 18 ± 1,6 (915 ± 78) | 81 ± 14 (1250 ± 217) |
| Pectina | - | - | 7,3 ± 0,9 (155 ± 21) | 3,2 ± 0,2 (36 ± 2) |
| Xilana | - | - | - | 3,8 ± 2,5 (46 ± 31) |
| Laminarina | - | - | 7,8 ± 1,9 (156 ± 38) | 11 ± 2 (123 ± 20) |
| β ₁₋₃ glucano | - | - | - | 7,8 ± 1,9 (89 ± 22) |
| NPαGlu | 5,5 ± 0,6 (134 ± 15) | 5,6 ± 1,0 (164 ± 31) | 48 ± 3 (910 ± 47) | 123 ± 35 (1390 ± 505) |
| Maltose | 2,0 ± 1,3 (36 ± 23) | - | 5,6 ± 0,7 (110 ± 15) | 19 ± 4 (195 ± 41) |
| Sacarose | 1,0 ± 0,4 (20 ± 8) | - | 6,8 ± 0,9 (139 ± 18) | 26 ± 3 (310 ± 39) |
| NPαGal | - | - | 16 ± 2 (346 ± 49) | 41 ± 6 (456 ± 67) |
| Melibiose | - | - | - | 0,9 ± 0,2 (11 ± 3) |
| Rafinose | - | - | - | 3,9 ± 3,1 (40 ± 32) |
| NPβGlu | 1,5 ± 0,3 (34 ± 8) | 2,5 ± 0,6 (74 ± 18) | 51 ± 11 (982 ± 216) | 69 ± 6 (747 ± 61) |
| Celobiose | 0,6 ± 0,1 (10 ± 3) | - | 4,2 ± 0,7 (90 ± 15) | 12 ± 2 (140 ± 22) |
| NPαMan | 1,4 ± 0,4 (32 ± 9) | 3,4 ± 0,7 (99 ± 20) | 45 ± 7 (860 ± 127) | 53 ± 14 (640 ± 173) |
| Lactose | - | - | 1,9 ± 0,3 (36 ± 6) | 3,2 ± 0,4 (36 ± 4) |
| Azoalbumina | 1,2 ± 0,4 (23 ± 9) | 1,4 ± 0,5 (50 ± 20) | 28 ± 4 (622 ± 91) | 58 ± 11 (674 ± 131) |
| N-Suc-Ala ₂ -Pro-Phe-pNA | 0,2 ± 0 (3,8 ± 0) | 0,1 ± 0 (2,8 ± 0) | 0,7 ± 0,1 (13 ± 2) | 0,8 ± 0,2 (8,6 ± 2) |
| N-Bz-Phe-Val-Arg-pNA | - | - | - | 0,1 ± 0,06 (1,5 ± 0,6) |
| N-Leu-pNA | 0,1 ± 0,01 (1,1 ± 0,1) | 1,7 ± 0,2 (48 ± 5) | 0,5 ± 0,1 (8,6 ± 1,9) | 0,7 ± 0,1 (7,4 ± 1) |

glicogênio, MU- β -quitotriosídeo, NP α Glu, NP β Glu, NP α Gal, NP α Man e azoalbumina foram os mais degradados.

5.2.3 - Atividade enzimática associada às glândulas labiais

Similarmente aos adultos, a glândula labial das larvas apresenta atividade majoritária contra MU- β -quitotriosídeo, atividades intermediárias contra amido e glicogênio e traços de atividade de uma aminopeptidase (Tabela 7). As atividades absolutas contra MU- β -quitotriosídeo, amido e glicogênio são superiores nas glândulas das larvas em relação aos adultos, no entanto, os valores de atividade específica apresentam padrão inverso, indicando que, nas glândulas das operárias, estas atividades são mais enriquecidas.

5.2.4 – Cromatografia

A atividade contra NP α Glu foi detectada nas 50 frações iniciais da coluna fenil-agarose onde se aplicaram amostras do intestino médio das larvas (Fig. 14). A atividade máxima foi detectada na fração 25 e este perfil sugere que esta enzima apresenta polaridade mediana, diferente, portanto, da α -glicosidase hidrofílica das operárias.

O ensaio das frações contra NP β Glu revelou perfil de atividade semelhante ao observado no reto das operárias, com a presença de 3 picos de atividade (Fig. 14). Como o primeiro pico (fração 5) pode representar excesso de enzima que não se ligou à coluna, pode-se afirmar que pelo menos duas β -glucosidases ocorrem no intestino médio das larvas: uma de polaridade mediana e outra de caráter hidrofóbico com picos de atividade nas frações 31 e 57, respectivamente. No ensaio das frações contra celobiose, substrato natural específico para detecção de β -glicosidases da classe 2 (Terra e Ferreira, 1994), observaram-se dois picos de atividade, um inicial (fração 6) e outro de uma (ou mais) β -glucosidase(s) de polaridade mediana (Fig. 14).

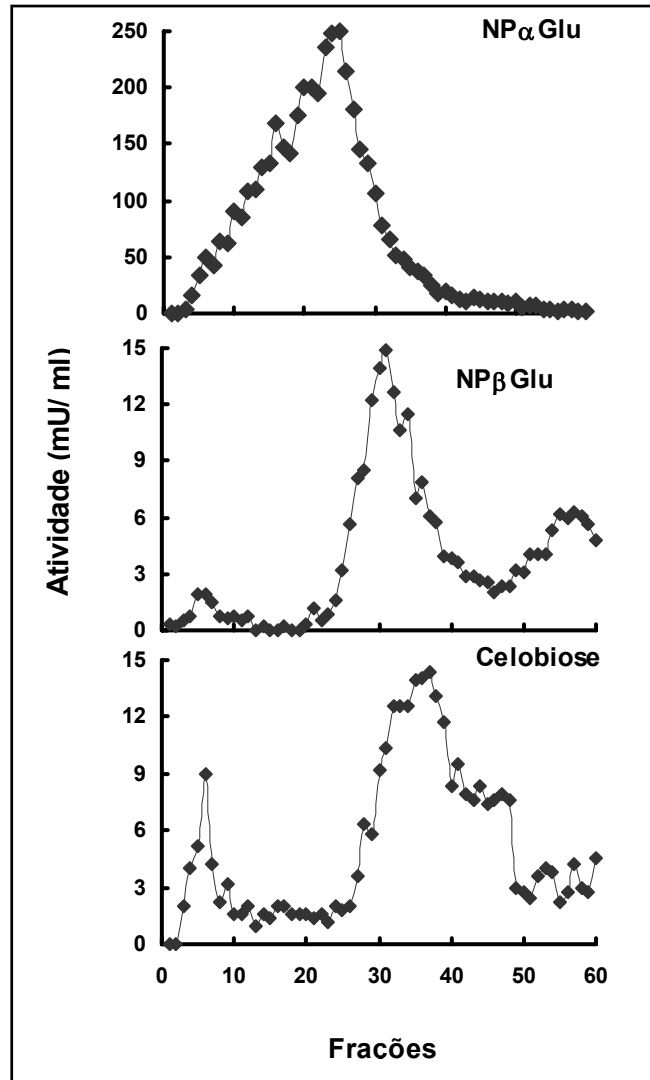


Figura 14. Atividade de α -glucosidase e β -glucosidase nas frações cromatográficas provenientes da coluna fenil-agarose, na qual se aplicaram amostras de macerado de intestino médio de larva de *Acromyrmex subterraneus*. Os substratos ensaiados foram: NP α Glu, NP β Glu e celobiose.

Os ensaios das frações contra NP α Gal, melibiose e rafinose apresentaram pico de atividade na fração seis (Fig. 15), indicando que a degradação destes substratos pode estar sendo catalisada por uma única enzima de caráter hidrofílica, sendo ela, portanto, semelhante à α -galactosidase detectada no reto das operárias. O ensaio contra NP α Man revelou a presença de um pico de atividade na fração 31, sugerindo que a α -manosidase presente nas larvas seja de polaridade mediana (Fig. 15).

A atividade de quitinase/lisozima no intestino médio das larvas apresentou pico de atividade na fração 6, indicando ser esta enzima de caráter hidrofílico (Fig. 16). Quando o ensaio foi realizado com macerado da glândula labial, detectou-se atividade de uma quitinase/lisozima de caráter hidrofóbico, onde o pico de atividade máxima ocorreu na fração 51 (Fig. 16). Estes resultados sugerem alguns aspectos importantes destas enzimas: a) primeiramente, pode-se afirmar que duas quitinases/lisozimas estão presentes no canal alimentar das larvas: uma secretada pela glândula labial e outra de origem incerta, possivelmente proveniente do jardim de fungo (ver resultados pg. ??); b) o perfil cromatográfico da quitinase/lisozima da glândula labial das larvas e adultos é semelhante, tratando-se, possivelmente, de uma mesma enzima (Figs. 10 e 16); c) a quitinase/lisozima produzida pela glândula labial das larvas não permanece ativa no conteúdo luminal do intestino médio (Fig. 16).

Os ensaios contra amido e glicogênio revelaram a presença de uma α -amilase hidrofóbica, com pico de atividade entre as frações 53 e 56 (Fig. 17), o que sugere que uma única enzima pode estar atuando na degradação destes dois substratos. O ensaio contra laminarina indicou a presença de uma laminarinase hidrofóbica, com atividade máxima na fração 59.

5.2.5 - Eletroforese

Na figura 17, pode-se observar o perfil eletroforético de algumas carboidrases e proteinases presentes no trato digestivo das larvas de *A. subterraneus*. Similarmente aos adultos, as larvas apresentam apenas uma α -glucosidase, detectada no espaço ecto e endoperitrófico do intestino médio, no entanto, a α -glucosidase das larvas apresenta menor migração eletroforética em relação à α -glucosidase das operárias.

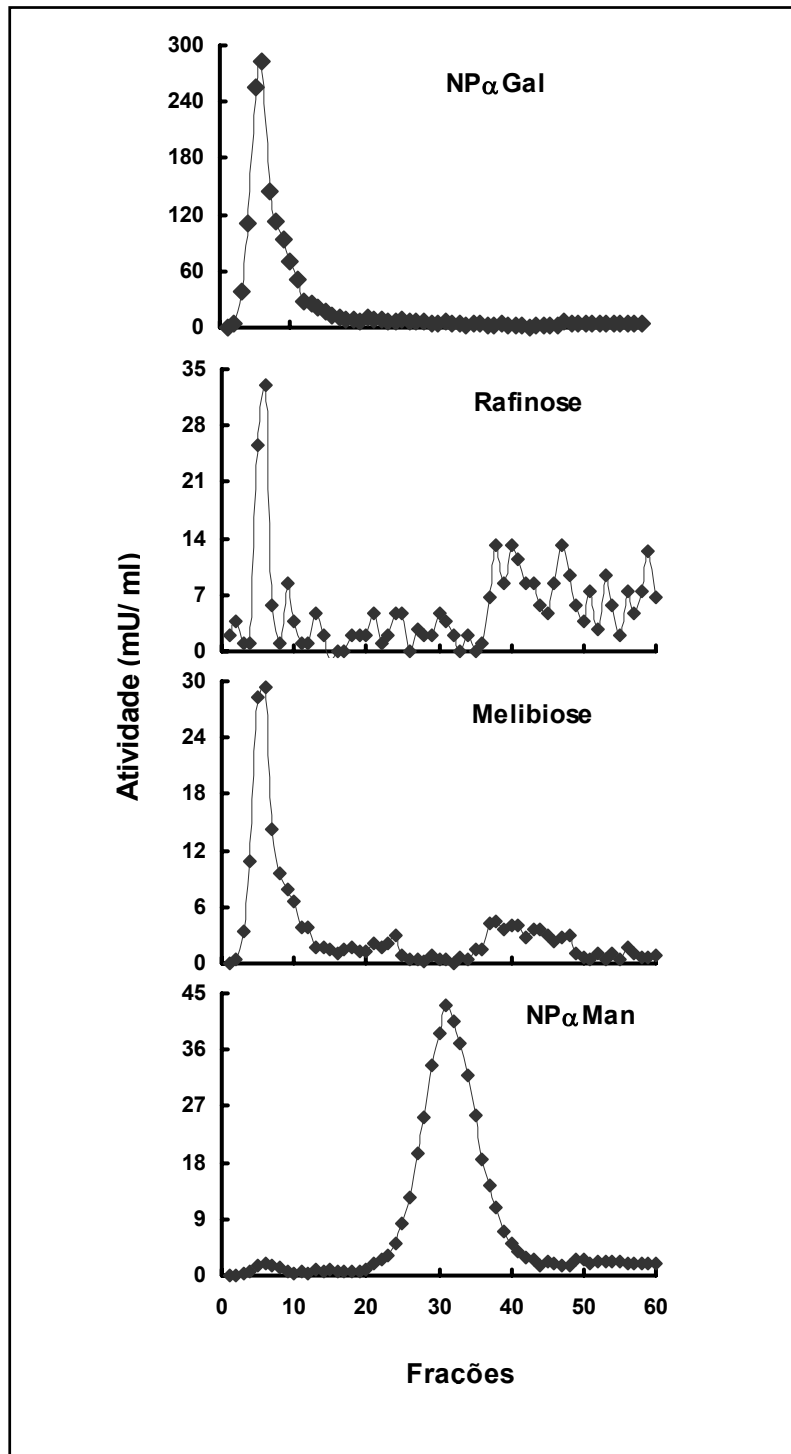


Figura 15. Atividades contra NP α Gal, melibiose, rafinose e NP α Man, expressas em mU/ml, nas frações cromatográficas provenientes da coluna fenil-agarose, na qual se aplicaram amostras de macerado de intestino médio de larva de *Acromyrmex subterraneus*.

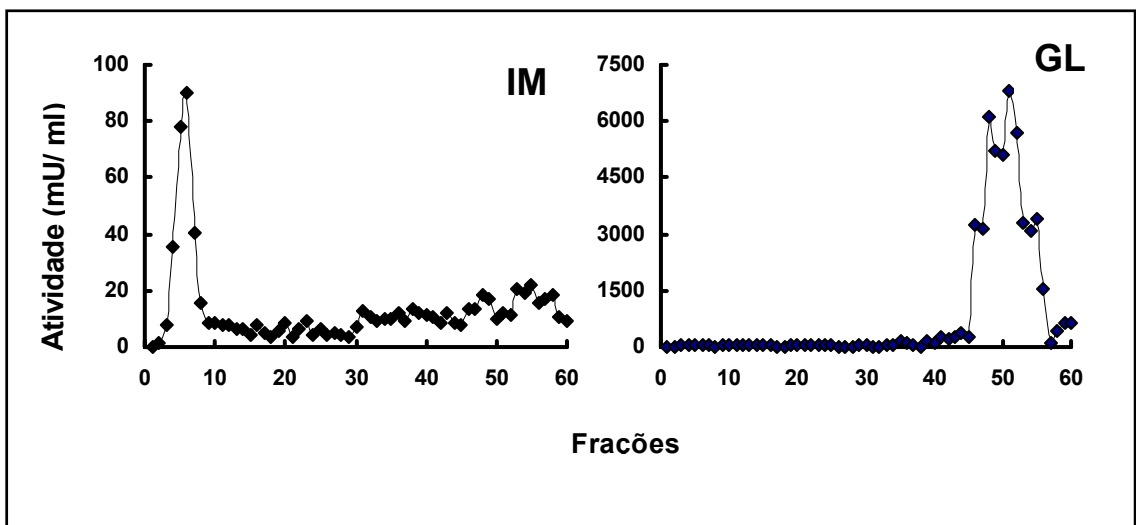


Figura 16. Atividade para MU- β -quitotriosídeo, expressa em mU/ml, nas frações cromatográficas provenientes da coluna fenil-agarose, na qual se aplicaram amostras de macerado do intestino médio (IM) e glândula labial (GL) de larvas de *Acromyrmex subterraneus*.

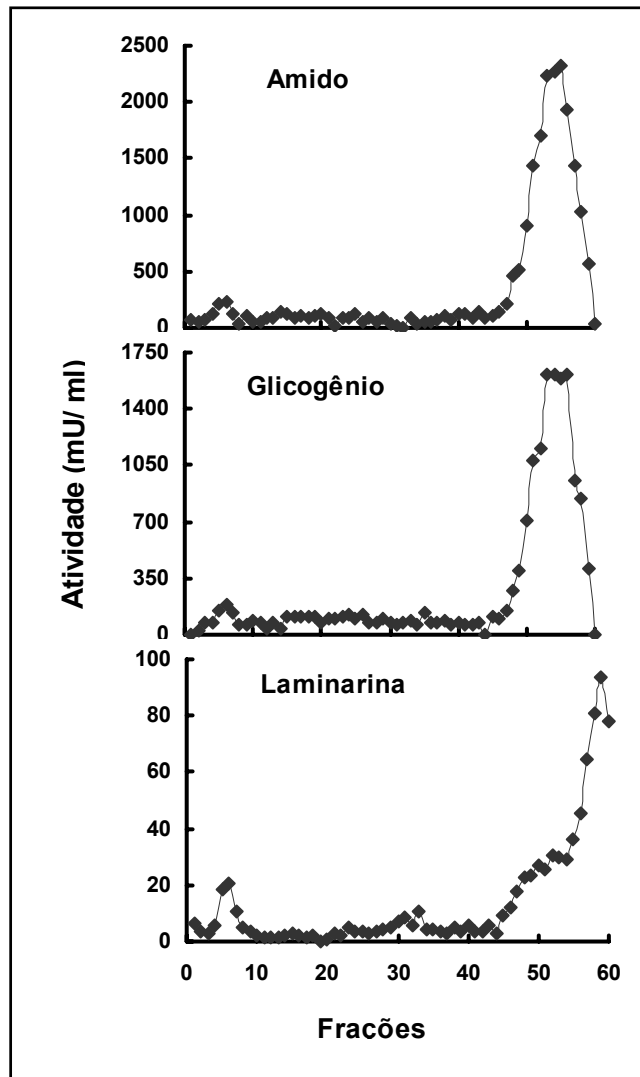


Figura 17. Atividades contra amido, glicogênio e laminarina, expressas em mU/ml, nas frações cromatográficas provenientes da coluna fenil-agarose, na qual se aplicaram amostras de macerado de intestino médio de larva de *Acromyrmex subterraneus*.

As larvas apresentam alta diversidade de β -glucosidases no intestino médio, onde quatro bandas de atividade podem ser visualizadas (Fig. 17). As duas bandas superiores ou de menor migração eletroforética são coincidentes com as bandas visualizadas no SDS-PAGE do reto dos adultos (Fig. 13).

No SDS-PAGE usado para detecção de α -galactosidase, três bandas de atividade podem ser visualizadas. Duas bandas, as de menor e maior migração também foram observadas no gel das operárias (Fig. 13), no entanto, as larvas apresentam uma enzima a mais em relação aos adultos, que apresenta migração intermediária no gel.

Duas bandas de atividade de α -amilase foram detectadas no intestino médio das larvas (Fig. 17). A comparação dos SDS-PAGES usados para detecção de α -amilases das larvas e dos adultos sugere que ambos tenham as mesmas enzimas, já que a migração eletroforética destas proteínas foi similar (Fig. 13).

Na raia onde se aplicou extrato das glândulas labiais observa-se uma banda de atividade de uma quitinase no meio do gel (Fig. 17). Uma segunda quitinase pode ser observada em bandas posicionadas na parte superior do gel onde se aplicaram amostras de macerado de intestino médio e corpo inteiro das larvas, o que reforça a hipótese da existência de duas quitinases no trato digestivo das larvas.

O gel de gelatina indica que as larvas apresentam grande diversidade de proteinases, com quatro bandas de atividade presentes no espaço ecto e endoperitrófico. Algumas bandas apresentam migração eletroforética similar aos adultos, sugerindo que algumas proteinases podem ser comuns e importantes para ambos.

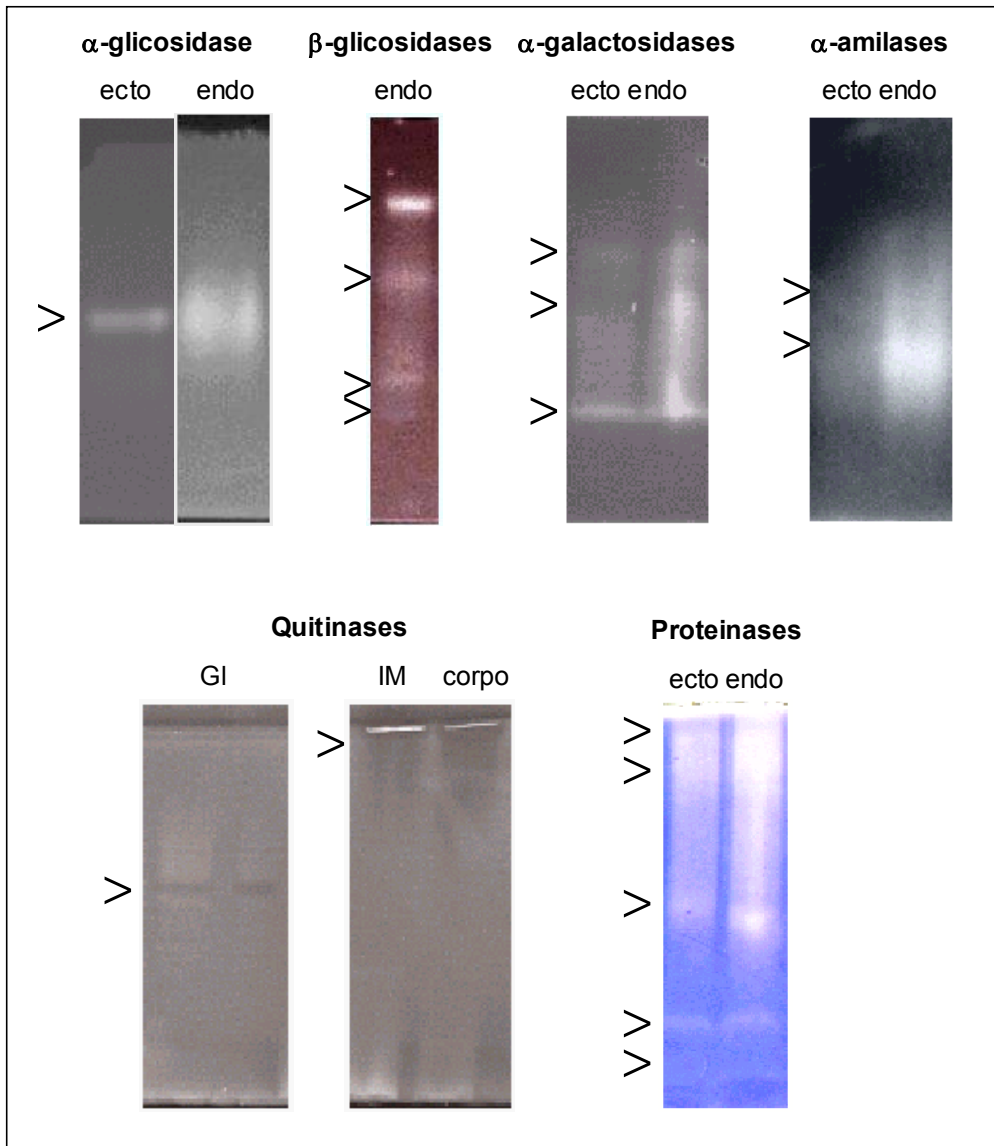


Figura 18. SDS-PAGES para detecção de α -glucosidase, β -glucosidases, α -galactosidases, α -amilases, quitinasas e proteinases no trato digestivo das larvas de *Acromyrmex subterraneus*. As setas indicam a presença de bandas de atividade. Abreviações: IM, intestino médio; ecto, conteúdo luminal do espaço ectoperitrófico; endo, conteúdo luminal do espaço endoperitrófico; GL, glândula labial.

5.3 - Fungo

5.3.1 - Atividade de enzimas no jardim e hifas do fungo simbiote

O jardim de fungo apresenta níveis de atividade que variam entre 0,8 e 93 e 53 e 4660 de atividades absoluta e específica, respectivamente (Tabela 9). As atividades mais acentuadas foram a proteolítica, detectada pelo substrato azoalbumina, e contra carboidratos de cadeias longas, como laminarina, pectina e β_{1-3} glucano. Os ensaios para detecção de proteinases específicas demonstraram que apenas NBz-Suc-Ala₂-Pro-Phe-pNA (quimotripsina) e NBz-Phe-Val-Arg-pNA (tripsina) apresentaram atividade. A atividade contra glicogênio foi acentuada e contra amido foi relativamente baixa. Este padrão é contrário ao observado para os insetos, cujos níveis de atividade contra amido e glicogênio sempre foram similares, sendo a atividade contra amido sempre superior. A atividade de α -glicosidase e β -glicosidase foram maiores para substratos naturais (maltose, sacarose e celobiose) do que os substratos sintéticos (NP α Glu e NP β Glu), o que também é contrário ao padrão observado para os insetos.

Nas frações solúveis e particuladas das hifas do fungo simbiote, a atividade contra azoalbumina também foi a mais expressiva, e observou-se também atividade tripsinica e quimotripsica (Tabela 9). Entre os carboidratos atacados, pode-se destacar MU- β -quitotriosídeo, laminarina, pectina e celobiose.

As atividades absolutas e específicas observadas nas hifas foram inferiores às do jardim, provavelmente, devido a diferenças de volumes de amostras coletadas. Para os ensaios realizados com o jardim, coletaram-se 0,3 g deste substrato, enquanto que as hifas foram coletadas em quantidade inferior.

5.3.2 - Eletroforese

O SDS-PAGE usado para detectar atividade de β -glicosidases apresentou duas bandas de atividade nas raias onde se aplicaram amostras do jardim e hifas do fungo simbiote (Fig. 19). Estas bandas são coincidentes com duas bandas de maior migração eletroforética observadas no SDS-PAGE das larvas (Fig. 18).

Tabela 9. Atividade de enzimas digestivas presentes nas hifas e jardim do fungo simbiote cultivado por *Acromyrmex subterraneus*. Os valores absolutos foram expressos em mmols de substrato liberado por minuto/ml (mU/ml). Informações adicionais vide rodapé da tabela 5 na pg. 60

| Substratos | Hifas | | Jardim |
|--|---------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | Fração Solúvel | Fração particulada | |
| Amido | - | - | 5,2 ± 1,1 (347 ± 73) |
| Glicogênio | - | - | 33 ± 0 (1750 ± 0) |
| UM-β-quitotriosídeo | 5,9 ± 0,6 (5845 ± 605) | - | 4,9 ± 0,6 (491 ± 58) |
| Pectina | 4,2 ± 0,8 (507 ± 104) | 1,0 ± 0,2 (71 ± 14) | 38 ± 16 (1970 ± 839) |
| Laminarina | 3,7 ± 1,0 (430 ± 121) | - | 50 ± 8 (2630 ± 437) |
| β ₁₋₃ glucano | - | - | 29 ± 5 (1530 ± 252) |
| NPαGlu | 0,5 ± 0,1 (56 ± 11) | 0,3 ± 0,06 (33 ± 10) | 9,0 ± 1,6 (471 ± 84) |
| Maltose | - | - | 19 ± 2 (1020 ± 103) |
| Sacarose | - | 3,3 ± 1,0 (330 ± 99) | 20 ± 2 (1030 ± 123) |
| CMC | 0,2 ± 0,1 (50 ± 12) | - | 0,8 ± 0,2 (53 ± 13) |
| NPαGal | 3,1 ± 0,5 (365 ± 54) | 0,5 ± 0,03 (50 ± 0) | 23 ± 3,0 (1170 ± 153) |
| Rafinose | - | - | 1,6 ± 0,5 (103 ± 35) |
| NPβGlu | 1,3 ± 0,4 (159 ± 43) | 1,0 ± 0,2 (103 ± 5) | 10 ± 1,4 (538 ± 72) |
| Celobiose | 3,7 ± 0,7 (455 ± 79) | 4,4 ± 0,8 (436 ± 76) | 24 ± 1 (1240 ± 67) |
| NPαMan | - | 0,3 ± 0,06 (30 ± 10) | 3,4 ± 0,9 (170 ± 45) |
| Azoalbumina | 18 ± 3 (1990 ± 353) | 19 ± 2 (1860 ± 152) | 93 ± 9 (4660 ± 427) |
| N-Bz-Suc-Ala ₂ -Pro-Phe-pNA | 0,2 ± 0,04 (29 ± 6) | 0,1 ± 0,05 (13 ± 5) | 4,2 ± 0,4 (262 ± 26) |
| N-Bz-Phe-Val-Arg-pNA | 0,3 ± 0,04 (44 ± 7) | 0,2 ± 0,07 (20 ± 6) | 2 ± 0,4 (130 ± 27) |

Uma banda de atividade de α -amilase está presente no SDS-PAGE onde se aplicou amostra de jardim de fungo (Fig. 19). O SDS-PAGE contendo gelatina (específico para detecção de atividade proteolítica) revelou a presença de duas bandas de atividade que apresentam baixa migração eletroforética nas raias onde se aplicaram amostras de hifas e jardim de fungo simbiote (Fig. 19). Estas bandas, assim como as bandas visualizadas nos géis onde se aplicaram amostras do reto das operárias e intestino médio das larvas são coincidentes entre si, sugerindo que estas proteinases (de baixa migração no gel) sejam secretadas pelo fungo (Figs. 13 e 18).

5.3.3 -Atividade de enzimas no meio de cultura líquido

A Tabela 10 mostra a atividade de carboidrases encontrada no filtrado de meio de cultura de parede celular de plantas usado para o desenvolvimento do fungo cultivado por *A. subterraneus*. Não se detectou atividade contra os substratos NP α Glu, sacarose e celobiose. Pectina foi o polímero mais degradado, enquanto que os ensaios com laminarina, glicogênio e NP α Gal apresentaram atividades intermediárias.

5.3.4 - Cromatografia do meio de cultura líquido

A atividade de β -glucosidase e uma quitinase nas frações cromatográficas provenientes da coluna fenil-agarose onde se aplicou filtrado de meio de cultura usado para o desenvolvimento do fungo mutualístico, indicou a presença de dois picos de atividade para cada substrato (Fig. 19). O primeiro pico pode ser o resultado de excesso de proteína que não se ligou à coluna, o que permite afirmar a presença de uma quitinase e uma β -glicosidase, ambas de caráter hidrofóbico. O pico de atividade para quitinase não coincide com os picos das glândulas labiais dos insetos, sugerindo que o fungo e as formigas tenham diferentes enzimas. O perfil da β -glicosidase do fungo é semelhante a esta mesma enzima de caráter hidrofóbico detectada no ensaio com amostra do reto das operárias e intestino médio das larvas. Nos ensaios feitos com os substratos NP α Glu e sacarose não se observou pico de atividade.

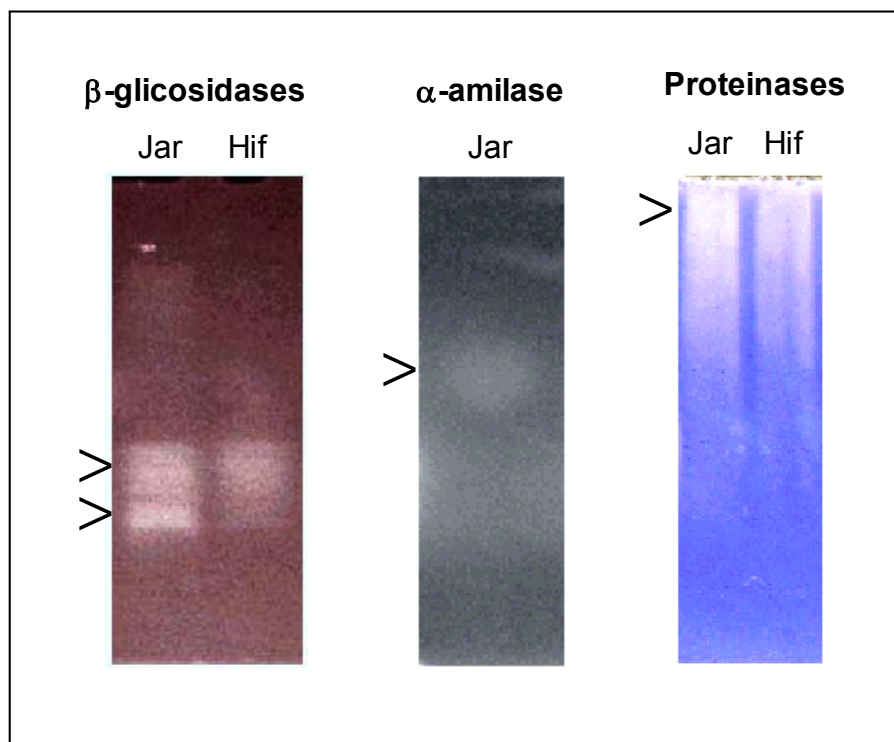


Figura 19. SDS-PAGES para detecção de β -glucosidases, α -amilase e proteinases no jardim (Jar) e hifas (Hif) do fungo simbiote cultivado por *Acromyrmex subterraneus*. As setas indicam a presença de bandas de atividade.

Tabela 10. Atividade de carboidrases no filtrado de meio de cultura líquido usado para o desenvolvimento do fungo simbiote (*Leucocoprinus* sp.), cultivado por *Acromyrmex subterraneus*. Os valores absolutos foram expressos em mmols de substrato liberados /minuto/ml (mU/ml)

| Substratos | | | | | |
|-------------------|----------------|---------------|---------------|-----------------|----------------|
| | Pectina | Laminarina | Glicogênio | NP α Gal | NP β Glu |
| Atividade | 17,6 \pm 2,9 | 7,3 \pm 1,6 | 7,6 \pm 3,8 | 8,1 \pm 0,1 | 1,6 \pm 0,2 |

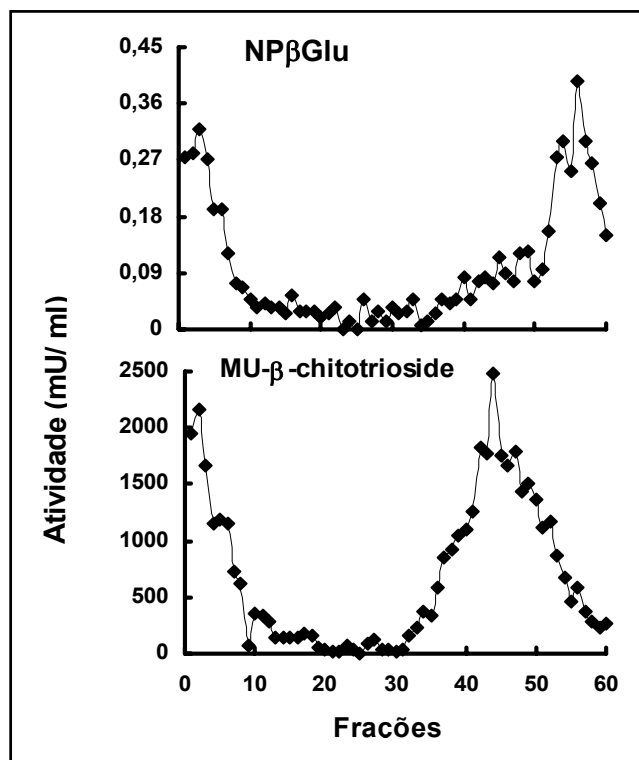


Figura 20. Atividades de β -glicosidase e quitinase/lisozima nas frações cromatográficas provenientes da coluna fenil-agarose, na qual se aplicou filtrado de meio de cultura líquido usado para o desenvolvimento do fungo simbiote cultivado por *Acromyrmex subterraneus*.

6. DISCUSSÃO

6.1 - Adultos

As enzimas digestivas detectadas no trato digestivo dos adultos de *A. subterraneus* refletem seu hábito alimentar e fisiologia da digestão deste componente do “superorganismo”. A bioquímica da digestão não é apenas uma indicação da fonte de nutrientes, mas é também uma parte da relação simbiótica com o fungo e interação entre indivíduos de diferentes castas da colônia. Segundo Ayre (1967), o estudo da bioquímica digestiva das formigas é útil para melhor compreensão do tipo de alimento ingerido pelos adultos, pois em muitas situações o recurso transportado por operárias nas trilhas de forrageamento não reflete as necessidades dos indivíduos, mas sim a da colônia como um todo (larvas, rainhas e formas aladas). No caso específico das formigas Attini, o fungo simbiote entra como fator extra das necessidades da colônia, de modo que a bioquímica e fisiologia da digestão dos insetos e do fungo podem ajudar para melhor entendimento da partição de recursos coletados, sua digestão e distribuição entre as partes do superorganismo.

O conhecimento atual sobre alimentação de formigas cortadeiras indica que os adultos obtêm recursos procedentes de quatro fontes distintas: seiva de

plantas, fungo simbiote (Littledyke and Cherrett, 1976; Quinlan and Cherrett, 1979), jardim de fungo (Silva et al., 2003), e líquidos liberados pelas larvas (trofalaxia anal), sendo este último um aspecto importante ainda não explorado na nutrição dos adultos (Schneider, 2000). O trabalho de Silva *et al.* (2003) sugere que o jardim de fungo seja a fonte de nutrientes mais importante para *Atta sexdens*, já que a sobrevivência das formigas mantidas com este substrato foi significativamente superior à dos demais tratamentos. As formigas supridas com solução de glicose em concentração similar à encontrada no jardim de fungo apresentaram tempo de sobrevivência semelhante às que se alimentaram exclusivamente de jardim de fungo, sugerindo que a glicose necessária para a sobrevivência das operárias é proveniente do jardim. Surpreendentemente, a sobrevivência de formigas mantidas com folhas frescas ou fungo simbiote que se desenvolveu em meio de cultura não foi diferente de insetos mantidos em jejum, enfraquecendo desta forma a hipótese de que mais de 90% das necessidades energéticas dos adultos são obtidas de seiva de plantas liberada durante a manipulação da vegetação (Littledyke e Cherrett, 1976).

Neste estudo, além do conteúdo luminal, a atividade de enzimas foi testada no tecido epitelial do intestino médio e reto, e na glândula labial das formigas, podendo, assim, nos ajudar a entender a origem de algumas destas enzimas, já que, o fungo simbiote pode estar oferecendo algumas delas aos insetos. As enzimas detectadas no intestino dos insetos, além de estarem envolvidas no processo digestivo, podem estar atuando na detoxificação de metabólitos de plantas, contribuindo na degradação de polímeros de plantas através da defecação sobre o material vegetal e, possivelmente, sobre a supressão de microorganismos no interior do ninho.

A glândula labial dos insetos está frequentemente associada à produção de saliva e enzimas, que são responsáveis pela lubrificação do aparelho bucal e digestão inicial do alimento (Chapman, 1998). A grande diversidade de recurso alimentar explorado pelas formigas reflete também especializações da glândula labial que pode produzir lípases, carboidrases e/ou proteases de acordo com o tipo da dieta (Fowler *et al.*, 1991). Como as formigas cortadeiras podem ser consideradas herbívoras e micófagas, a diversidade de sua dieta requer produção de muitas enzimas para que o alimento seja degradado. Extratos da glândula labial de *A. subterraneus* apresenta alto nível de atividade contra quitinase (tabela

7). No gel contendo glicol quitina, pode-se observar bandas posicionadas na porção mediana do gel, que são coincidentes nas raias onde se aplicou glândula labial de larvas e macerado de tórax dos adultos, sugerindo semelhança entre a quitinase das larvas e a de adultos. Resultados similares foram obtidos em *Acromyrmex octospinosus*, onde altos níveis de atividade de quitinase e amilase foram detectados na glândula labial dos adultos (Febvay e Kermarrec, 1983, Febvey *et al.*, 1984). Este tipo de enzima é importante na degradação inicial de fungo que apresenta quitina na sua parede celular. Altos níveis de quitinase foram detectados no conteúdo luminal do intestino médio e reto dos adultos, e os ensaios cromatográficos (Fig. 8) mostram que uma quitinase apolar apresenta pico de atividade coincidente com o pico da quitinase da glândula labial, indicando que esta glândula é capaz de produzir esta enzima. A falta de atividade de quitinase nas frações epiteliais reforça a hipótese de que esta quitinase não está sendo produzida no intestino médio das operárias.

A atividade de amilase pode estar relacionada à digestão de amido presente principalmente no cloroplasto das células dos vegetais (Taiz e Zeiger, 1990), ou na degradação do glicogênio, que é o açúcar de reserva dos fungos (Alexopaulos *et al.*, 1996; Herzer, 1998). A atividade de aminopeptidase, embora baixa, pode ser de extrema importância para compensar a ausência desta enzima junto à fração epitelial do intestino médio das operárias e indica que adultos requerem aminoácidos livres na sua dieta, além de explicar a origem desta enzima. Embora a atividade contra trealose seja descrita em extratos da glândula labial de formigas (Fowler *et al.*, 1991), não se detectou esta enzima nos homogeneizados das glândulas labiais de larvas e adultos de *A. subterraneus*. A atividade de trealase foi verificada em *Formica polyctena*, que é uma Formicinae de hábito predador (Palsen, 1971). A trealose é o açúcar de reserva encontrado na hemolinfa dos insetos (Chapman, 1998), o que justifica sua necessidade nas espécies com hábito predador, como é o caso de *F. polyctena*.

A atividade de α -glicosidase foi a mais expressiva e foi encontrada em quase todos os compartimentos avaliados dos adultos (Tabela 5 e 6) e pode ser considerada como sendo produzida pelo próprio inseto. Baixos níveis de atividade contra NP α Glu foram detectados nos extratos do fungo cultivado por *A. subterraneus*, o que pode ser considerado como mais uma evidência da habilidade do inseto para produzir e secretar esta enzima. A alta atividade desta

enzima indica que estes sítios são importantes na digestão de dissacarídeos e outros oligossacarídeos, resultando na assimilação de glicose pelo inseto. A massa molecular relativa da α -glicosidase presente no intestino médio e reto dos adultos (56 500) é de uma enzima pequena se comparada com as α -glicosidases de outros insetos (Terra e Ferreira, 1994). De fato, maltose e sacarose podem ser obtidas em seiva de planta, embora os resultados obtidos por Silva *et al.* (2003) indiquem que operárias de *Atta sexdens* apresentam baixa sobrevivência quando supridas somente com folhas em placas de Petri.

A fisiologia da digestão de *Acromyrmex octospinosus* foi estudada por Febvay e Kermarrec, (1986) usando ApiZym, um Kit de testes que apenas detectou atividades significantes para α -glicosidase, aminopeptidase, esterase, e lipase no conteúdo luminal do intestino médio das operárias. A atividade de aminopeptidase foi alta no tecido epitelial e conteúdo luminal do intestino das larvas, mas nos adultos sua atividade ficou limitada no conteúdo luminal do intestino médio dos adultos de *A. subterraneus*, podendo ser proveniente da glândula labial. Uma pequena atividade de aminopeptidase foi detectada nas glândulas labiais dos insetos, indicando sua origem. Aminopeptidase é uma enzima associada à degradação final de proteínas, que podem estar sendo degradadas no conteúdo luminal do intestino médio dos adultos ou no papo. Através do conhecimento do tempo de residência do alimento no papo, que foi de 12 horas, pode-se concluir que uma parte da digestão das operárias pode ocorrer neste compartimento.

A faixa de pH do papo variou entre alcalina (8,6) e ligeiramente ácida (6,0), indicando que este compartimento não apresenta sistema de tamponamento eficiente, mas esta faixa de pH apresenta um ambiente adequado para ação de enzimas proteolíticas. O tecido epitelial do papo é quitinoso e, provavelmente, não ocorre extrusão e absorção de íons neste compartimento. Desta forma, é possível que o pH luminal possa ser influenciado por fluidos do sistema glandular, intestino médio (Denise D.O. Moreira, comunicação pessoal) e do alimento. As proteinases serínicas e aminopeptidase de insetos apresentam pH ótimo de atividade na faixa alcalina (Terra e Ferreira, 1984). É possível que o papo seja um importante sítio na degradação inicial do alimento, com importante participação do aparato glandular. Para *A. octospinosus*, as glândulas labiais apresentam atividades semelhantes ao observado em *A. subterraneus*, com atividade contra amido, quitina, aminopeptidase e, também, a participação das glândulas hipofaríngeas e

maxilar na produção de outras enzimas (Febvay e Kermarrec, 1982, 1986). A atividade de amilase também não foi detectada no intestino médio. No entanto, esta enzima é produzida nas glândulas labiais, indicando que a digestão de amido é importante no papo ou anteriormente a este, como na câmara infrabucal. Esta câmara é importante na digestão inicial do alimento (Febvay *et al.*, 1984) e para filtrar o alimento, que é direcionado para o papo (Hölldobler e Wilson, 1990). Estudos do tempo de residência do alimento na câmara infrabucal, seu pH, e da presença de atividade enzimática podem ajudar a esclarecer estes pontos. A regurgitação de saliva pode ser igualmente importante para digestão preoral que pode estar ocorrendo no ventre das larvas. Ao medir-se a atividade quitinolítica presente nas glândulas labiais de operárias de três classes de tamanho, Febvay *et al.* (1984) constataram relação positiva entre tamanho da formiga e atividade de quitinase. No entanto, considerando-se a relação atividade/peso, observou-se que as menores formigas apresentavam atividade proporcionalmente maior. Em colônias de *Atta sexdens* e *Acromyrmex subterraneus*, as menores formigas são entre outras funções, responsáveis pela nutrição das larvas e a rainha, o que reforça a hipótese de que a atividade de enzimas na glândula labial de larvas e adultos é importante na degradação de fungo (Wilson, 1980; Andrade *et al.*, 2001).

A presença de atividade proteolítica no intestino dos adultos, inclusive uma aminopeptidase produzida pela glândula labial, sugere que as operárias apresentem necessidade de degradar proteínas. A massa molecular relativa de uma proteinase serínica (24,9 Kda), que foi estimada pela coluna S-200, apresenta tamanho similar a outras proteinases serínicas de formigas e vespas (Jany *et al.*, 1978; Whitworth *et al.*, 1998). O tráfego lento do alimento através do canal alimentar de *A. subterraneus* reforça esta hipótese, já que se a dieta das formigas cortadeiras fosse composta principalmente por seiva de planta, esperar-se-ia consumo freqüente deste recurso, que é pobre em nutrientes (Taiz e Zeiger, 1990). Outros insetos que exploram seiva de planta, como percevejos e afídeos (ordem Auchenorrhincha e Stenorrhincha) sugam grande quantidade de seiva e alta taxa de passagem de líquidos para compensar a escassez de nutrientes deste recurso (Terra, 1988). Uma característica do processo digestivo de insetos que se alimentam de dieta rica em proteínas é a passagem lenta do alimento através do canal alimentar (Terra, 1991). Este fato sustenta a hipótese de maior

participação do fungo simbiote na dieta das operárias de formigas cortadeiras. A sobrevivência de operárias de *A. subterraneus* foi maior em grupos de formigas que receberam solução de mel 10% ou jardim de fungo como fonte de alimento, enquanto que operárias supridas com folhas sobreviveram pouco (Benevides, 2004). A baixa sobrevivência de operárias de *A. sexdens* quando supridas com fungo simbiote que se desenvolveu em meio de cultura sólido pode estar relacionado à falta de reconhecimento químico entre formiga e fungo (Viana-Bailez *et al.*, 2001) ou carência de nutrientes nas hifas, pois gongilídeos não são observados em meios de cultura usados para o desenvolvimento do fungo e, além disso, a interação mutualística com as formigas pode facilitar o desenvolvimento do fungo ou estimular uma concentração de nutrientes em compartimentos especializados como os gongilídeos.

A ausência de atividade contra alguns substratos é um importante aspecto que permite inferir sobre a fisiologia da digestão de *A. subterraneus*. No intestino médio dos adultos não se observou atividade de pectinase, xilanase e celulase, indicando que os adultos não são adaptados para degradar componentes da parede celular das plantas. Traços de atividade contra pectina foram observados no conteúdo luminal do reto. Este também foi o caso de 11 espécies de besouros que utilizam um fungo simbiote como alimento, que, assim como as formigas cortadeiras, não apresentavam atividades contra polímeros de plantas como: celulase, hemicelulase e pectina. (Martin *et al.*, 1981).

As enzimas presentes no fluido fecal das formigas cortadeiras foram extensivamente estudadas por Martin e colaboradores durante a década de 70 (Martin, 1970; Martin *et al.* 1973; Boyd and Martin, 1975a; Boyd and Martin, 1975b; Martin *et al.* 1975) e, entre as conclusões obtidas, destaca-se a de que o fungo fornece às operárias enzimas proteolíticas. Esta importante descoberta implica não apenas a importância do inseto na recolocação desta enzima sobre o substrato usado para o fungo se desenvolver, mas também sugere que os insetos tenham perdido habilidade em secretar suas próprias proteínases, que poderiam degradar enzimas e outras proteínas do próprio fungo. Esta possibilidade não se confirmou neste trabalho. No entanto, Boyd e Martin (1975c) sugerem que a quitinase, pectinase, xilanase e celulase provenientes do fluido fecal de *A. colombica tonsipes* são também derivadas do fungo. Neste estudo não se observou atividade de xilanase e celulase no conteúdo luminal do reto de *A.*

subterraneus, enquanto que pectinase apresentou traços de atividade, indicando que os produtos de degradação destes polímeros não são importantes nutricionalmente para estes insetos. Para *A. sexdens*, a sobrevivência dos adultos foi muito afetada quando estas foram nutridas com carboidratos resultantes da degradação destes polímeros de parede celular de plantas (Silva *et al.*, 2003).

O fato de que o reto apresenta atividade de muitas enzimas em comparação com o intestino médio, indica que as formigas cortadeiras armazenam e concentram estas enzimas neste compartimento. O pH ácido deste compartimento pode prevenir a ação das proteinases no seu conteúdo luminal, já que o tempo de residência de alimento neste compartimento pode durar 10 dias (Tabela 6). Comparando-se as atividades de endoproteinases no conteúdo luminal do intestino médio e reto percebe-se pouca diferença de atividade para tripsina e quimotripsina, contudo, quando se quantificou a atividade proteolítica com azoalbumina, esta foi quatro vezes maior no reto do que no intestino médio, e aminopeptidase estava ausente. Este resultado corrobora observações feitas para outros Attini, onde o reto se comporta como órgão de estoque de enzimas proteolíticas. No entanto, em outras espécies de formigas (fora de Attini), que não apresentam este tipo de simbiose, a atividade proteolítica é maior no intestino médio do que no reto (Martin, 1970).

Assim como em *A. colombica*, e outros Attini (Martin, 1970; Martin *et al.*, 1975), o fluido fecal de *A. subterraneus* apresenta alta atividade de α -glicosidase em relação à β -glicosidase e α -galactosidase. As massas moleculares relativas das duas β -glicosidasas presentes no reto (Mr 46 700 e Mr 63 400) são intermediárias em relação às massas de outras β -glicosidasas de insetos (Terra e Ferreira, 1994). A enzima α -manosidase apresentou massa molecular relativa inferior às outras já descritas para outros insetos (Mr 63 400) (Terra e Ferreira, 1994). A relação entre o pH do meio de reação e a atividade de α -glicosidase, β -glicosidase e α -galactosidase mostra que estas enzimas têm atividade máxima em uma faixa de pH que varia entre 5,25 e 5,75, que é a faixa de pH ótimo para o funcionamento destas enzimas estudadas em outros insetos (Terra e Ferreira, 1994). O conteúdo luminal do reto, cujo pH está entre 3,0 e 5,0, não apresenta condições ótimas para o funcionamento destas enzimas. No entanto, não significa que elas estejam inativas neste pH. Como a α -glicosidase só apresenta atividade

em pH acima de 4,5, é possível que ela seja a enzima mais afetada por esta condição.

A deposição de fluido fecal na superfície das folhas pode colaborar na degradação de tecidos de plantas, ajudando no processo de colonização da folha pelo fungo simbiote. Ao contrário de *A. colombica* (Martin *et al.*, 1975), *A. sexdens* (Siquira, 2002) e *A. laevigata* (Milton Erthal Jr., observação pessoal), que tem alta atividade de pectinase no fluido fecal, *A. subterraneus* apresenta apenas traços desta enzima, que é fundamental na maceração química do substrato vegetal facilitando a ramificação do fungo. Este fluido também pode estar envolvido no controle microbiano no interior do ninho (Férrandez-Marín *et al.*, 2003). A secreção de quitinases e proteinases é um importante fator de patogenicidade de fungos micófitos. A acidificação do jardim para controle microbiano, que, segundo Bot *et al.* (2002), é exercida pela glândula metapleurá, poderia também ter a colaboração de gotas de líquido fecal sobre a vegetação e superfície do jardim. Rainhas e operárias de colônias jovens de *A. octospinosus* passam suas pernas dianteiras sobre a abertura da glândula metapleurá e defecam na boca e pernas e executam "grooming" constante antes de tocar no jardim de fungo ao chegarem do campo (Férrandez-Marín *et al.*, 2003). Este relato fortalece a hipótese de que o líquido fecal apresenta atividade microbiana e pode ter um importante papel na defesa da colônia.

A prolongada presença do corante no intestino médio pode ter três significados: a) longa permanência do bolo alimentar no intestino médio, indicando degradação lenta da dieta, ou; b) o corante pode estar aderido na superfície das células epiteliais ou sendo absorvido; c) compartimentação do corante. Caetano (1984) não observou matriz peritrófica no intestino médio de operárias de formigas cortadeiras, no entanto, é possível que esta matriz esteja presente na forma gelatinosa, que é comum para holometábolos primitivos, cujo sistema digestivo se assemelha ao de alguns Hymenoptera. O rápido preenchimento do trato digestivo pelo corante pode ser uma estratégia da formiga para ingerir quantidades elevadas de recursos que podem ser distribuído entre as companheiras da colônia por trofalaxia. O longo tempo de residência do alimento no trato digestivo indica que *A. subterraneus* não se alimenta em intervalos curtos de tempo, pois se assim o fizesse, esperar-se-iam menores tempos de residência. O comportamento destes insetos e as condições experimentais a que eles foram

submetidos podem estar relacionados com o longo período de permanência do corante no trato intestinal. É possível que a quantidade de alimento ingerido seja maior que o necessário para satisfazer as necessidades de um indivíduo, sendo que o excesso de recurso pode ser distribuído para outras companheiras por trofalaxia. Como neste experimento as formigas foram mantidas em placas de Petri, com outras operárias igualmente nutridas, é improvável que a troca de alimento por trofalaxia tenha ocorrido. Futuros estudos para melhor entender estes pontos devem considerar a permanência dos insetos nas colônias. Para a abelha *Scaptotrigona postica*, que se alimenta de pólen, observou-se que o tempo de retenção da dieta no papo é 2 vezes maior do que o observado em *A. subterraneus*, mas o tempo de preenchimento do canal alimentar é semelhante ao de *A. subterraneus* (Zerbo *et al.*, 2001). O longo tempo de permanência do corante no intestino das operárias não sugere que elas usem dieta pobre, como é o caso de seiva de plantas, do contrário necessitaria de alta taxa de passagem, similar a pulgões e percevejos, e ortópteros, para compensar os baixos níveis de nutriente presente na seiva de planta (Silva e Terra, 1994; Chapman, 1998) e, por outro lado, reforça a hipótese de maior participação do fungo na sua alimentação.

6.2 - Larvas

O conteúdo luminal do intestino médio das larvas apresentou atividade para 21 substratos, sendo que a maior diversidade e valores de atividades detectáveis (absolutos e específicos) foi observada no conteúdo luminal do espaço endoperitrófico. Neste compartimento ocorrem enzimas relacionadas à degradação de polissacarídeos e dissacarídeos. Os ensaios de pH sugerem a existência de um mecanismo de compartimentação, já que a porção anterior do intestino (1/3 do comprimento total) é neutra a ácida (3,0 a 6,8), enquanto que o restante apresenta pH ligeiramente ácido a alcalino (5,2 a 7,6). Após a retirada do epitélio das larvas, notava-se que a coloração do espaço endoperitrófico era homogênea, sugerindo que a região ectoperitrófica da parte inicial do intestino das larvas apresenta ambiente adequado para carboidrases (Terra e Ferreira, 1994). Esta característica do pH pode estar relacionada à supressão de proteólise em um ambiente onde outras enzimas, carboidrases e lípases sejam importantes.

Embora com atividades inferiores, o conteúdo do espaço ectoperitrófico também apresenta atividade de dissacaridases e polissacaridases, o que sugere ausência de um sistema de compartimentação de enzimas, propiciando degradação de polissacarídeos no espaço endoperitrófico e a presença de dissacaridases e oligossacaridases majoritariamente no espaço ectoperitrófico. Esta característica é semelhante ao processo digestivo de holometábolos primitivos, como coleópteros (Terra, 1988). Os besouros primitivos usam recursos estáveis, o que garante vida longa aos mesmos, enquanto que os holometábolos mais avançados se adaptaram na exploração de recursos efêmeros, fazendo-se necessária uma digestão mais rápida (Terra, 1988). No caso específico das formigas cortadeiras, o fungo e as folhas de plantas que são cortadas durante todo o ano na região Neotropical (Anjos *et al.*, 1998) representam recursos estáveis, indicando que a fisiologia da digestão desta formiga pode ser uma adaptação ao seu hábito alimentar. O fato das larvas não defecarem pode explicar esta característica, pois a permanência de alimento por períodos prolongados poderia dispensar um sistema com intensa extrusão e absorção de água e íons tornando o processo digestivo mais eficiente energeticamente. De fato, larvas supridas com corante azul de Evan's apresentaram baixa mobilidade do corante ao longo do intestino médio, indicando um elevado tempo de residência do alimento e baixa movimentação do mesmo ao longo do intestino médio.

A atividade proteolítica é similar entre os espaços endo-ectoperitrófico, o que reforça a ausência de compartimentação. No entanto, os ensaios de determinação de pH mostram que a região posterior do intestino médio apresenta condições mais favoráveis à atividade proteolítica, enquanto que a região anterior apresenta condições mais adequadas para o funcionamento de carboidrases. A inibição de atividade proteolítica na porção anterior do intestino médio poderia garantir a atividade das carboidrases nesta região, enquanto que a proteína contida no alimento (fungo simbiote) (Martin *et al.*, 1969), inclusive as suas enzimas, que no conteúdo luminal do intestino médio das larvas são teoricamente desnecessárias, poderiam ser degradadas na porção posterior. Por serem as larvas micófagas, a presença de algumas enzimas, como pectinase e laminarinase, apesar de ativas, podem ser desnecessárias no intestino médio e estas enzimas podem estar sendo usadas como fonte de aminoácidos para as larvas, o que justificaria a alta atividade de pectinase no espaço ectoperitrófico em

relação ao espaço endoperitrófico. Os ensaios cromogênicos indicam alta atividade proteolítica no intestino médio das larvas (Tabela 9) e o gel contendo gelatina mostra que uma grande diversidade de proteinases (cinco bandas visíveis) está presente neste compartimento (Fig. 17). Uma proteinase com baixa migração eletroforética e outra posicionada na região mediana do gel são coincidentes entre as larvas e adultos. Estes dados mostram que a digestão de proteínas no intestino de larvas e adultos é alta, envolvendo isoenzimas (serínicas e aminopeptidases) na degradação de proteínas. A atividade de proteinases serínicas em *Solenopsis invicta*, que é uma espécie de formiga filogeneticamente próxima aos Attini, foi significativa em várias fases da vida das formigas, sendo mais expressiva nas larvas do 4^o instar.

Os ensaios dos extratos da fração epitelial foram importantes para mostrar que algumas enzimas, como α -glicosidase, β -glicosidase, α -manosidase e proteases (tripsínica e aminopeptidase) podem estar sendo produzidas e liberadas por este tecido. Por outro lado, a ausência de algumas atividades relacionadas ao tecido epitelial e que são majoritárias no conteúdo luminal, como α -amilase, quitinase, pectinase, laminarinase, β_{1-3} glucanase, α -galactosidase e uma tripsina (N-BZ-Phe-Val-Arg-pNA), indica que estas enzimas são produzidas em outro local. A intensa atividade de aminopeptidase presente na fração particulada do tecido epitelial indica que as microvilosidades podem ser um local importante na degradação final de proteínas, que é uma característica comum entre insetos exigentes em aminoácidos (Terra e Ferreira, 1994), o que provavelmente é o caso das larvas de *A. subterraneus*.

As secreções liberadas pelas glândulas labiais das larvas de formigas podem servir de alimento aos adultos, serem regurgitadas para pré-digestão do alimento a ser consumido pelas operárias, usadas para comunicação com as operárias através de trofalaxia, e construção de casulos e ninhos de seda (Mathias da Silva, 2002). O fato das larvas serem micófagas e apresentarem padrão enzimológico da glândula labial similar aos adultos permite especular sobre a nutrição dos adultos, indicando que a secreção desta glândula está relacionada à degradação do fungo. Os ensaios cromatográficos para detectar atividade quitinolítica na glândula labial das larvas apresentaram perfis similares aos da glândula das operárias (Fig. 8 e Fig 15). Este resultado, associado à presença de bandas coincidentes nas raias do gel contendo glicol quitina, onde se aplicaram amostras

de glândula labial de larvas e macerado de tórax de operárias, sugerem que a quitinase das glândulas labiais das larvas e das operárias seja a mesma. Interessantemente, o pico de atividade quitinolítica do intestino médio das larvas não coincide com o pico da glândula labial, indicando que a quitinase produzida na glândula não está ativa no intestino médio. É possível que a digestão da quitina seja extra oral, ocorrendo nos segmentos torácicos do ventre das larvas, como em outras espécies de formigas (Hölldobler e Wilson, 1990). No entanto, a presença de quitinase de caráter hidrofílico neste compartimento (Fig. 15) permite supor a presença de outra(s) quitinase(s) no trato digestivo das larvas, de origem incerta, que, apesar de pouco ativa, foi detectada nas amostras de intestino médio (Tabela 9). Uma redução da atividade quitinolítica pode ser interessante no intestino médio para prevenir a degradação da matriz peritrófica que contém quitina em sua composição (Chapman, 1998).

As enzimas com atividades majoritárias também foram detectadas no trabalho de D'Etorre *et al.* (2002) com *A. subterraneus* e *A. crassispinus*. No entanto, as atividades foram feitas em homogeneizados de larvas inteiras, deixando incerto o conhecimento do local do canal alimentar onde sua atividade é enriquecida, além de detectar atividade de enzimas que não estão relacionadas ao processo digestivo. No intestino médio de *A. octospinosus*, observou-se alta atividade de α e β glicosidases, α -galactosidase, quitinase e proteinases (principalmente aminopeptidase) e atividades módicas de lipases, além de alta atividade quitinolítica na glândula labial (Febvay e Kermarrec, 1986), sendo, assim, semelhante às atividades detectadas em *A. subterraneus*.

Similarmente aos adultos, as larvas de *A. subterraneus* apresentam uma α -glicosidase e algumas evidências indicam diferença entre as enzimas das larvas e dos adultos. O SDS-PAGE usado para detecção de α -glicosidase (Fig. 17) revelou a presença de uma banda de atividade nas raias onde se aplicou amostra do intestino médio de larva, que é de uma enzima de menor migração eletroforética se comparada com a das operárias (Fig. 11), e, além disso, através da coluna de interação-hidrofóbica pode-se observar que a α -glicosidase das larvas apresenta polaridade mediana, em contraste com a dos adultos, que é hidrofílica. Altas atividades de α -glicosidase são comuns em muitas espécies de insetos e nas larvas de *A. subterraneus*. Esta enzima pode estar atuando na digestão intermediária e final de amido ou glicogênio.

Os insetos apresentam muitos tipos de α -amilases, que são enzimas que atuam na degradação de amido e glicogênio e suas diferenças podem ser detectadas através do tipo de resíduo gerado (Terra e Ferreira, 1994). A amilase detectada no intestino médio das larvas apresenta caráter hidrofóbico, o que é semelhante às amilases de *Callosobruchos maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* (Silva *et al.*, 2000). Um pico menor pode ser observado no início da corrida (Fig. 16), indicando que as larvas possuem outra α -amilase, de caráter hidrofílico, ativa no intestino médio ou poderia ser excesso de proteína que não conseguiu aderir à coluna. Como os ensaios em gel indicam duas bandas de atividade amilolíticas nas raias onde se aplicou conteúdo do espaço ecto e endoperitrófico (Fig. 17), pode-se deduzir sobre a presença de duas α -amilases. A alta atividade de α -amilases e α -glicosidase indica que amido (ou glicogênio) é importante na dieta destes insetos. No entanto, eles não precisam de muitas isoformas para degradar este alimento, já que esta é uma característica incomum entre insetos que degradam amido ou seiva de plantas tendo várias isoformas destas enzimas para driblar as defesas químicas das plantas (Silva, 1994, Silva *et al.*, 1999).

O conteúdo luminal e tecido epitelial do intestino médio das larvas apresentam alta atividade para degradar o substrato NP β Glu. Os ensaios cromatográficos indicam a presença de três picos de atividade (Fig. 13) quando o ensaio foi feito com o substrato NP β Glu e 3 picos no ensaio com celobiose (frações 5, 36 e 47) (Fig. 13). Como o primeiro pico pode ser o resultado de excesso de proteína que não se ligou à coluna, pode-se concluir que pelo menos quatro isoformas estão presentes neste compartimento. O gel de atividade para detectar β -glicosidases pode-se visualizar 4 bandas, o que confirma a diversidade destas enzimas (Fig. 17). Quando se ensaiou contra celobiose, notam-se, apenas, dois picos, o que sugere que a enzima de polaridade mediana seja uma β -glicosidase da classe 2, que ataca preferencialmente substratos naturais (Terra e Ferreira, 1994). A ausência de pico de atividade nas frações finais no ensaio contra celobiose indica ser esta β -glicosidase de caráter hidrofóbico (fração 56 do ensaio contra NP β Glu) é uma enzima da classe 3, que são específicas para degradação de glicosídeos tóxicos de plantas que são substâncias apolares (Terra e Ferreira, 1994). Como houve ausência de atividade de celulases, pode-se esperar que estas enzimas estejam associadas à degradação de glicosídeos

tóxicos, podendo ser estas enzimas fatores importantes para explicar a polifagia observada nestes insetos (Cherrett, 1989).

A ausência de atividade contra NP α Gal, rafinose e melibiose nas amostras de extratos de tecido epitelial e glândula labial de larvas e adultos sugere que a α -galactosidase presente no conteúdo luminal das larvas e adultos tenha outra origem. Em relação à hidrofobicidade, a α -galactosidase de larvas e adultos são semelhantes (Fig. 7 e Fig. 14). A revelação de atividade em SDS-PAGE indicou duas bandas nas amostras do reto (Fig. 11), que são coincidentes em relação às observadas nas raias onde se aplicou conteúdo do espaço ecto e endoperitrófico, que inclui ainda uma terceira banda que apresentou migração eletroforética intermediária (Fig. 17).

6.3 - Fungo

Os ensaios de detecção de atividades enzimáticas realizados no jardim e hifas do fungo simbiote revelam o potencial que este material tem para explicar a presença de certas enzimas, como α -amilase, pectinase, laminarinase, α -galactosidase, β -glicosidase, quitinase e proteinase, no intestino de *A. subterraneus*. O jardim é constituído por fungos, material vegetal em diferentes níveis de decomposição e apresenta secreções de formigas, provavelmente provenientes do reto. A atividade enzimática detectada nas hifas indica que o fungo simbiote pode ser a fonte destas enzimas para os insetos. A capacidade do fungo simbiote cultivado por *A. subterraneus* em secretar enzimas (α -galactosidase, laminarinase, quitinase, β -glicosidases, pectinase e amilase) quando inoculado em meio líquido contendo parede celular de plantas reforça seu potencial como fornecedor de enzimas para as formigas. Estudos anteriores sempre usaram meios ricos em carboidratos e nitrogênio que não representam a situação natural do tecido por ele degradado, podendo causar repressão de atividade de certas enzimas (Cooper e Wood, 1977; Patterson *et al.*, 1993). Ao estudar as enzimas produzidas pelo fungo cultivado por *A. octospinosus*, Febvay e Kermarrec (1986) detectaram atividades significativas de α -galactosidase, β -glicosidase, aminopeptidase e esterase. Neste estudo, não se detectou

aminopeptidase no fungo e no jardim, mas estes dados reforçam sua participação na origem das carboidrases.

Siqueira *et al.* (1998) observaram que o fungo cultivado por *Atta sexdens* apresenta taxa de desenvolvimento mais acelerado quando o meio é rico em xilana, amido, pectina e celulose. Estes resultados revelam algumas contradições, como o fato de as plantas cortadas por esta espécie de formiga cortadeira serem dicotiledôneas, que são pobre em xilana (Taiz e Zeier, 1990). O outro fato interessante é o desenvolvimento intermediário observado nos fungos que se desenvolveram em meio de celulose, já que grande parte do resíduo presente nas câmaras de lixo das formigas cortadeiras é composto por celulose, indicando que o fungo mutualístico não é apto para degradar este polímero (Abril e Bucher, 2002). Para explicar os resultados obtidos, é possível que o tempo de desenvolvimento tenha sido longo, permitindo ao fungo explorar outras reservas presentes no meio. No entanto, a presença de atividade celulósica foi descrita anteriormente por Bacci Jr. *et al.* (1985b) e sendo a celulose um polímero presente na parede celular das plantas, é possível que o fungo produza celulase, mas esta pode estar sendo secretada em pequenas quantidades e em pontos específicos, permitindo o acesso das hifas ao citoplasma das células vegetais.

As raias do gel onde se aplicaram amostras de hifas e jardim de fungo que foram incubadas para revelação de atividade de β -glicosidase indicaram a presença de duas bandas nestes compartimentos que são semelhantes a duas bandas presentes no gel das larvas, indicando suas origens. O ensaio das frações contra o substrato NP β Glu apresenta dois picos de atividade de enzimas polar e apolar, respectivamente. Como o primeiro pico pode representar excesso de proteína na coluna, os dados sugerem que o fungo produza uma (ou umas) β -glicosidase(s) do tipo três, que são apolares e relacionadas à degradação dos glicosídeos.

A presença das bandas escuras na parte superior do gel contendo amostras de macerado do corpo inteiro e intestino médio das larvas, e macerado de abdômen e tórax de operárias indica a presença de outra quitinase de origem desconhecida. A presença de atividade quitinolítica nas amostras de jardim e hifas do fungo simbiote (Tabela 11), além da atividade em meio de cultura (Fig. 19) sugere que esta fonte seja explorada futuramente.

O gel contendo gelatina indica a presença de duas proteinases de baixa migração eletroforética presentes nas amostras do jardim e hifas do fungo simbiote (Fig. 18). A presença do arrastão nas raias do fungo permite supor a presença da proteinase de menor massa molecular, mas a banda não ficou evidente. Estas bandas são coincidentes com bandas visualizadas nas raias onde se aplicaram amostras do conteúdo luminal das larvas e reto dos adultos, indicando sua origem (Fig. 11 e Fig. 17).

Estes dados evidenciam a importância do fungo para explicar algumas atividades majoritárias presentes no intestino dos insetos, sem atividade epitelial ou glandular. A esponja fúngica cultivada por operárias de *Atta* spp. abriga grande diversidade de microorganismos (Bass & Cherrett, 1997; Carneiro, 1997; Santos, 2003) e, apesar de nada se saber sobre a ocorrência de microorganismos no jardim de fungo cultivado por espécies de *Acromyrmex*, é muito provável que eles existam e sua importância no processo digestivo da vegetação ou dos insetos deve ser compreendida para que as bases bioquímicas do super-organismo seja compreendida.

Comparando-se as atividades enzimáticas nas hifas fúngicas e jardim de fungo, nota-se que algumas enzimas como amilase e β_{1-3} glucano estão presentes apenas no jardim, o que alerta sobre a participação de microorganismos presentes no jardim na degradação do material vegetal, fúngico ou no canal alimentar dos insetos.

7. RESUMO E CONCLUSÕES

- Este trabalho demonstrou diferenças importantes entre as enzimas digestivas presentes nas larvas, adultos e fungo simbiote, estando estas relacionadas à fisiologia da digestão de cada componente deste “super-organismo”. Os adultos são especializados na degradação de carboidratos de cadeias curtas, enquanto que as larvas apresentam capacidade em digerir polímeros de tamanhos diversos. O fungo simbiote é especialista na degradação de polímeros da parede celular de plantas, mas também apresenta capacidade de degradar substratos pequenos. A atividade de proteinases parece ser importante tanto para os insetos como para o fungo simbiote.

- A digestão de polímeros maiores nos adultos parece ocorrer na porção anterior do canal alimentar, compreendido entre a boca e o papo. Ensaio de atividade enzimática realizados em extratos da glândula labial demonstraram que esta glândula tem importante papel na degradação de material fúngico, reforçando as evidências de que a participação do fungo na dieta dos adultos pode estar sub estimada. O papo apresenta pH alcalino a ligeiramente ácido, o que oferece condições adequadas para atividade de proteinases. Uma acidificação do pH intestinal do intestino médio até o reto pode ser observada,

indicando que a atividade proteolítica ocorre somente na porção anterior do intestino. No reto, onde o alimento pode permanecer por vários dias, a acidez pode evitar a proteólise de enzimas presentes neste compartimento. Ensaio de pH ótimo indicam que as carbohidrases majoritárias do reto são ativas no conteúdo luminal deste compartimento, indicando que podem ser importantes depois da defecação sobre a folha ou jardim de fungo. O reto funciona como armazenador de enzimas digestivas que podem ser importantes para facilitar o desenvolvimento do fungo simbiote ou estar atuando na defesa contra outros microorganismos presentes no ninho. A enzima α -glucosidase apresentou atividade majoritária no intestino médio e reto dos adultos, indicando grande importância no processo digestivo destes insetos. Ensaio em gel e cromatográficos permitem afirmar a existência de uma única α -glucosidase nos adultos, que possivelmente é produzida pelo próprio inseto, contrariando a hipótese de Martin (1975b) de que todas as enzimas presentes no trato intestinal dos adultos sejam oriunda do fungo simbiote. Os resultados obtidos corroboram os dados obtidos por Silva *et al.* (2003), sugerindo maior participação do fungo na dieta dos adultos.

- Ambos, larvas e adultos, apresentam características de modelo de digestão encontrado em holometábolos primitivos, como besouros. Nas larvas não há diferença na presença de enzimas de digestão inicial e final entre os espaços endoperitrófico e ectoperitrófico, respectivamente. Para as larvas, a compartimentação de enzimas durante a digestão pode significar um custo energético desnecessário, já que o intestino médio dos insetos da subordem Apocrita se encontra fechado na porção posterior. Os ensaios com o corante azul de Evans demonstraram que o tempo de residência do alimento no intestino das larvas seja longo (maior que cinco dias), indicando que a compartimentação para facilitar a digestão inicial e final seja desnecessária. Alta atividade de amilase e quitinase na glândula labial das larvas, que são fungívoras, suportam a hipótese de que esta glândula seja especialista na degradação do fungo simbiote. O ensaio de pH demonstrou diferentes faixas no intestino médio das larvas, indicando que diferentes ambientes ocorrem neste compartimento.

- O fungo simbiote cultivado em meio de cultura líquido contendo parede celular de plantas como única fonte de carboidratos apresentou alta atividade de α -galactosidase, laminarinase, pectinase e β -glucosidase, indicando que ele é capaz de degradar polímeros de plantas. Os ensaios em gel permitem inferir que muitas carboidrases e proteinases detectadas no intestino dos insetos são de origem fúngica, no entanto, os insetos apresentam capacidade de produzir outras isoenzimas e enzimas que não são observadas no fungo simbiote.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abril, A.R., Bucher, E.H. (2002) Evidence that fungus cultured by leaf-cutting ants does not metabolize cellulose. *Ecology Letters* 5: 325-328.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. (1996) *Introductory mycology*. 4 ed., John Wiley & Sons INC.
- Andrade, A.P.P., Forti, L.C. (2002) Importância da atividade forrageira e da preparação do substrato no aperfeiçoamento do controle. Anais do XV Encontro de Mirmecologia. Londrina, Paraná, 73-76pp.
- Anjos, N., Santana, D.L. (1994) Alterações deletérias no comportamento de *Atta laevigata* (F. Smith) e *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae), causadas por folhas de *Eucalyptus* spp. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil* 23: 25-30.
- Anjos, N., Della Lucia, T.M.C., Mayé-Nunes, A.J. (1998) *Guia prático sobre formigas cortadeiras em reflorestamentos*. Editora Graff Cor, Ponte Nova, Minas Gerais, 97p.
- Ayre, G.L. (1967) The relationship between food and digestive enzymes in the five species of ants (Hymenoptera, Formicidae). *Canadian Entomology* 99: 408-411.

- Bacci Jr., M., Ribeiro, S.B., Casarotto, M.E.F., Pagnocca, F.C. (1995a) Biopolymer-degrading bacteria from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 28: 79-82.
- Bacci Jr., M., Anversa, M.M., Pagnocca, F.C. (1995b) Cellulose degradation by *Leucocoprinus gongylophorus*, the fungus cultured by the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Antonie van Leeuwenhoek* 67: 383-386.
- Baker, J.E., Fabrick, J.A. (2000) Host hemolymph proteins and protein digestion in larval *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 937-946.
- Barrer, P.M., Cherrett, J.M. (1972) Some factors affecting the site and pattern of leaf-cutting activity in the ant *Atta cephalotes* L. *Journal of Entomology* 47: 15-27.
- Bass, M., Cherrett, J.M. (1996) Fungus garden structure in the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Formicidae, Attini). *Symbiosis* 21: 9-24.
- Benevides, C.R., Erthal Jr., M., Silva, C.P., Samuels, R.I. (2003) Digestive enzymes of the four adult castes of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2003, Caxambu. Livro de Resumos.
- Benjamin, R.K., Blackwell, M., Chapela, I.H., Humber, R.A., Jones, K.G., Klepzig, K.A., Lichtwardt, R.W., Malloch, D., Noda, H., Roeper, R.A., Spatafora, J.W., Weir, A. (2000) The search for diversity of insect and other arthropod-associated fungi. <http://lsb380.plbio.lsu.edu/Chapter%2015>.
- Borm, S.V., Billen, J., Boomsma, J.J. (2002) The diversity of microorganisms associated with *Acromyrmex* leafcutter ants. *BMC Evolutionary Biology* 2: 9-19.
- Borror, D.J., Triplehorn, C.A., Johnson, N.F. (1992). *An introduction to the study of Insects*. 6 ed., Saunders College Publishing, 875p.
- Bot, A.N.M., Ortius-Lechner, D., Finster, K., Maile, R., Boomsman, J.J. (2002) Variavel sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the methapleural gland of leaf-cutting ants. *Insect Socioux* 49: 363-370.
- Boursaux-Eude, C., Gross, R. (2000) New insights into symbiotic associations between ants and bacteria. *Research Microbiology* 151: 513-519.

- Bowers, M.A., Porter, S.D. (1981) Effect of foraging distance on water content of substrates harvested by *Atta columbica*. *Ecology* 62: 273-275.
- Boyd, N.D., Martin, M.M. (1975a) Faecal proteinases of the fungus-growing ant, *Atta texana*: properties, significance and possible origin. *Insect Biochemistry* 5: 619-635.
- Boyd, N.D., Martin, M.M. (1975b) Faecal proteinases of the fungus-growing ant *Atta texana*: their fungal origin and ecological significance. *Journal of Insect Physiology* 21: 1815-182.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Buzzi, Z.J., Miyazaki, R.D. (1998) Entomologia didática. 2ed., Universidade Federal do Paraná, 272 p.
- Caetano, F.H., Machado, V.L.L. (1982) Morfologia e histologia do trato digestivo de *Protopolybia exigua exigua* (Hym.-Vespidae) e suas estruturas excretoras anexas. *Papéis Avulsos de Zoologia* 34: 288-296.
- Caetano, F.H. (1984) Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília Myrmicinae (Hymenoptera: Formicidae). *Papéis Avulsos de Zoologia* 35: 257-305.
- Caetano, F.H., Jaffé, K., Zara, F.J. (2002) *Formigas: biologia e anatomia*. Araras, São Paulo, Editora Topázio, 131p.
- Carreiro, S.C., Pagnocca, F.C., Bueno, O.C., Bacci Jr., M., Hebling, M.L.A. (1997) Yeast associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. *Journal of Genetics and Molecular Microbiology* 71: 243-248.
- Carroll, C.R., Janzen, D.H. (1973) Ecology of foraging by ants. *Annual Review Ecology and Systematics* 4: 231-257.
- Chapela, I.H., Rehner, S.A., Schultz, T.R., Mueller, U.G. (1994) Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science* 266: 1691-1694.

- Chapman, R.F. (1988) Structure of digestive system. *In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, NY, pp. 213-240.
- Cherrett JM (1980) Possible reasons for the mutualism between leaf cutting ants and their fungus. *Biologie-Ecologie mediterraneenne*. 7, 113-122
- Cherrett, J.M. (1986) History of leaf-cutting ant problem. *In: Lofgren, C.S., Vander Meer, R.K. (eds.) Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management*. Boulder: Westview Press, p.10-17.
- Cherrett, J.M., Powell, R.J., Stradling, D.J. (1989) The mutualism between leaf-cutting ants and their fungus. *In: Wilding, N., Collins, N.M., Hammoud, P.M., Webber, J.F. (eds.) Insect-fungus interactions*. Londres: Academic Press, p. 93-120.
- Costa, R.A.C., Cruz-Landim, C. (2002) Enzymatic activity of hypopharyngeal gland extracts from workers of *Apis mellifera*. *Sociobiology* 40: 403-411.
- Cooper, R.M., Wood, R.K.S. (1977) Regulation of synthesis of cell wall degrading enzymes of plant pathogens. *Plant Cell* 122: 163-211.
- Currie, C.R., Mueller, U.G., Malloch, D. (1999a) The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 7998-8002.
- Currie, C.R., Scott, J.A., Summerbell, R.C., Malloch, D. (1999b) Fungus growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* 398: 701-704.
- Dahlqvist, A. (1968) Assay of intestinal disaccharidases. *Analytical Biochemistry* 22: 99-107.
- Daly, H.V., Doyen, J.T., Purcell III, A.H. (1998) *Introduction to insect biology and diversity*. 2ed., Oxford University Press, 680p.
- Davidson, D.W. (1997) The role of resource imbalances in the evolutionary ecology of tropical arboreal ants. *Biological Journal of the London Society* 61: 153-181.
- Delage, B. (1968) Recherches sur les fourmis moissonneuses du Bassin Aquitain: éthologie, physiologie de l'alimentation. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie* 10: 197-3265

- D'Ettorre, P., Mora, P., Dibangou, V., Rouland, C. (2002) The role of the symbiotic fungus in the digestive metabolism of two species of fungus-growing ants. *Journal of Compared Physiology B* 172: 169-176.
- Douglas, A.E. (1997) Parallels and contrasts between symbiotic bacteria and bacterial-derived organelles: evidence from *Buchnera*, the bacterial symbiont of aphids. *FEMS Microbiology Ecology* 24: 1-9.
- Della Lucia, T.M.C. (1993) *As Formigas Cortadeiras*. Viçosa, Minas Gerais, Folha de Viçosa, p.262.
- Della Lucia, T.M.C., Oliveira, M.A., Araújo, M.S., Vilela, E.F. (1995) Avaliação da não preferência da formiga cortadeira *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel ao corte de *Eucalyptus*. *Revista Árvore* 19: 92-99.
- Dillon RJ (2000) Re-assessment of the role of the insect gut microbiota. Abstracts of XXI International Congress of Entomology, Foz do Iguassu, Brazil, august 20-26. Book 1, LI-LV.
- Diniz, J.L.M., Brandão, C.R.F., Yamamoto, C.I. (1998) Biology of *Blepharidatta* ants, the sister group of the Attini: a possible origin of fungus-ant symbiosis. *Naturwissenschaften* 85: 270-274.
- Douglas AE (1998) Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology* 43: 17-37.
- Eisner, T., Happ, G.M. (1962) The infrabuccal pocket of a formicine ant: a social filtration device. *Psyche* 69: 107-116.
- Farji-Brener, A.G. (2001) Why are leaf-cutting ants more common in early secondary forests than in old-growth tropical forests? An evaluation of the palatable forage hypothesis. *Oikos* 92: 169-177.
- Febvay, G., Kermarrec, A. (1983) Enzymes digestives de la fourmi attine *Acromyrmex octospinosus* (Reich): caractérisation de amylase, maltase et trehalase des glandes labiales. *C.R. Acad.Sci. Paris* 296: 453-456.
- Febvay, G., Decharme, M., Kermarrec, A. (1984) Digestion of chitin by the labial glands of *Acromyrmex octospinosus* Reich (Hymenoptera: Formicidae). *Canadian Journal of Zoology* 62: 229-234.

- Febvay, G., Kermarrec, A. (1986) Digestive physiology of leaf-cutting ants. In: Lofgren, C.S., Vander Meer, R.K. (eds.) *Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management*. Boulder, Colorado, London: Westview Press, pp274-288.
- Fernández-Marín, H., Zimmerman, J.K., Wcislo, W.T. (2003) Nest-founding in *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera, Formicidae, Attini): demography and putative prophylactic behaviors. *Insect Sociaux* 50: 304-308.
- Fougarait, P.J., Dyer, L.A., Marquis, R.J., Braker, H.E. (1996) Leaf-cutting ant preferences for five native tropical plantation tree species growing under different light conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80: 521-530.
- Fowler, A.G., Pagani, M.I., Silva, O.A., Forti, L.C., Silva, V.P., Vasconcelos, H.L. (1989) A pest is a pest is a pest? The dilemma of Neotropical leaf-cutting ants: keystone taxa of natural ecosystems. *Environmental Management* 13: 671-675.
- Gonçalves, C.R. (1961) O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hymen. Formicidae). *Estudia Entomologica* 4: 113-180.
- Gonçalves, C.R. (1964) As formigas cortadeiras. *Boletim do Campo* 181: 7-23.
- Grimaldi, D., Agosti, D., Carpenter, J.M. (1997) New and rediscovered primitive ants (Hymenoptera: Formicidae) in cretaceous amber from New Jersey, and their phylogenetic relationship. *American Museum Novitates* 3208: 1-43.
- Hebling, M.J.A., Maroti, P.S., Bueno, O.C., Silva, O.A., Pagnoca, F.C. (1996) Toxic effects of leaves of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) to laboratory nests of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Bulletin of Entomological Research* 86: 253-256.
- Herzer, E. (1998) Fungos. <http://members.tripod.com/~eveh/fungos.html>
- Hölldobler, B., Wilson, E.O. (1990) *The ants*. 1. ed. Cambridge: Harvard University Press, 733p.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O. (1994) *Journey of the ants: A story of scientific exploration*. 2 ed. Massachusetts: Harvard University Press, 224p.

- Howard, J.J. (1987) Leaf-cutting ant diet selection: the role of nutrients, water, and secondary chemistry. *Ecology* 68: 503-515.
- Howard, J.J. (1988) Leaf-cutting ant diet selection: relative influence of leaf chemistry and physical features. *Ecology* 69: 250-260.
- Howard, J.J. (1990) Infidelity of leafcutting ants to host plants: resource heterogeneity or defense induction. *Oecologia* 82: 394-401.
- Hubbell, S.P., Wiemer, D.F., Adejare, A. (1983) An antifungal terpenoid defends a neotropical tree (*Hymenaea*) against attack by fungus-growing ants (*Atta*). *Oecologia* 60: 321-327.
- Hubbell, S.P., Howard, J.J., Wiemer, D.F. (1984) Chemical leaf repellency to an Attine ant: seasonal distribution among potential host plant species. *Ecology* 65: 1067-1076.
- Janzen, D.H. (1966) Coevolution of mutualism between ants and acacias in central America. *Evolution* 20: 249-275.
- Janzen, D.H. (1968) Allelopathy by myrmecophytes: The ant *Azteca* as an allelopathic agent in *Cecropia*. *Ecology* 50(1): 147-153.
- Jany, K.D., Haug, H., Ishay, J. (1978) Trypsin-like endopeptidases from the midgut of the larvae from the hornets of *Vespa orientalis* and *Vespa crabro*. *Insect Biochemistry* 8:221-230.
- Jargees, E., Merritt, D.J., Gordh, G. (1998) Anatomy of the mouthparts and digestive tracts during feeding in larvae of the parasitoid wasp *Trichogramma australicum* Girault (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Int. Journal of Insect Morphology and Embryology* 27: 103-110.
- Knapp, J.J., Howse, P.E., Kermarrec, A. (1990) Factors controlling foraging pattern in leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich). In: Vander Meer, K.K., Jaffé, K., Cadenõ, A. (eds.): *Applied Myrmecology: A world perspective*. Westview Press.
- Kendrick, B. (1992) Mutualistic symbioses between fungi and animals. In: Kendrick, B. (ed.): *The fifth kindom*. 2ed. Massachusetts, Focus Text, 254-262pp.
- Kermarrec, A., Decharm, M., Febvay, G. (1990) Leaf-cutting ant symbiotic fungi: A synthesis of recent research. In: Vander Meer, R.K., K. Jaffé, A. Cedeño (eds.): *Applied myrmecology: a world perspective*. Westview Press, Bolder. pp. 231-246.

- Kukor, J.J., Martin, M.M. (1983) Aquisition of digestive enzymes by siricid woodwasp from their fungal symbiont. *Science* 220: 1161-1163.
- Leal, I.R., Oliveira, P.S. (2000) Foraging ecology of attine ants in a Neotropical savanas: seasonal use of fungal substrate in the cerrado vegetation of Brazil. *Insectes Socioux* 47: 376-382.
- Littledyke, M., Cherrett, J.M. (1976) Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae) *Bulletin of Entomology Research* 68: 263-271.
- Littledyke, M., Cherrett, J.M. (1978) Defence mechanisms in young and old leaves agaisnt cutting by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae). *Bulletin of Entomological Research* 68: 263-271.
- Loild, A., Crailsheim, K. (2001) Free fatty acids digested from pollen and triolein in the honeybee *Apis mellifera carnica* midgut. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 171: 313-319.
- Machado, V.L.L., Tauk, S.M. (1975) Estudo bioquímico e microbiológico do tubo digestivo de *Protopolybia exigua* var. *exigua* (Saussure, 1854) (Hym.-Vespidae). *Revista Brasileira de Biologia* 35: 83-86.
- Manhães, J.G., Erthal Jr., M., Silva, C.P., Samuels, R.I. (2003) Enzymatic activities of the fungal symbiont of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae) when cultured on different substrates. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2003, Caxambu. Livro de Resumos.
- Martin, M.M., Carman, R.M., Macconnel, J.D. (1969) Nutrients derived from the fungus cultured by the fungus-growing *Atta colombica tonsipes*. *Annals of Entomological Society of American* 63: 11-13.
- Martin, M.M. (1970) The biochemical basis of the fungus-Attini ant symbiosis. *Sciense* 169: 16-20.
- Martin, M.M., Gieselmann, M.J, Martin, J.S. (1973) Rectal enzymes of Attini ants. Amilase and chitinase. *Journal of Insect Physiology* 19: 1409-1416.

- Martin, M.M., Boyd, N.D., Gieselmann, M.J., Silver, R.G. (1975) Activity of fecal fluid of a leaf cutting ant towards plant cell wall polysaccharides. *Journal of Insect Physiology* 21: 1877-1892.
- Martin, M.M. e Martin, J.S. (1978) Cellulose digestion in the midgut of the fungus-growing termite *Macrotermes natalensis*: the role of acquired digestive enzymes. *Science* 199: 1453-1455.
- Martin, M.M. (1992) The evolution of insect-fungus associations-from contact to stable symbiosis. *American Zoology* 32, 593-605.
- Mathias da Silva, E.C. (2002) Glândulas salivares larvais das abelhas. In: Cruz-Landim, C., Abdalla, F.C. (eds.): *Glândulas exócrinas das abelhas*. Editora FUNPEC, Ribeirão Preto, São Paulo, pp. 21-49.
- Mayhé-Nunes, A.J. (2001) Evolução da tribo Attini (Hym., Formicidae). Anais do XV Encontro de Mirmecologia. 22-25 de outubro, Londrina, PR. pp. 166-168.
- Mueller, U.G., Rehner, S.A., Schultz, T.R. (1998) The evolution of agriculture in ants. *Science* 281: 2034-2038.
- Mueller, U.G., Schultz, T.R., Currie, C.R., Adams, R.M.M., Malloch, D. (2001) The origin of the Attini ant-fungus mutualism. *Quarterly Review of Biology*, 76: 169-197.
- Nichols-Orians, C.M., Schultz, J.C. (1989) Leaf toughness affects leaf harvesting by the leaf cutter ant, *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae). *Biotropica* 21: 80-83.
- Nichols-Orians, C.M., Schultz, J.C. (1990) Interactions among leaf toughness, chemistry, and harvesting by attine ants. *Ecological Entomology* 15: 311-320.
- Nichols-Orians, C. (1992) The acceptability of young and mature leaves to leaf-cutter ants varies with light environment. *Biotropica* 24: 211-214.
- Noelting, G., Bernfeld, P. (1948) Sur les enzymes amylolytiques. III. La β -amylase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d' α -amylase. *Helv. Chemistry Acta* 31: 286-290.
- Patterson, I.C., Charley, A.K., Cooper, R.M., Clarkson, R.M. (1993) Regulation of production of a trypsin-like protease by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters* 109: 323-328.
- Paulsen, R. (1971) Characterization of trehalase from labial glands of ants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 142: 170-176.

- Quinlan, R.J., Cherrett, J.M. (1979) The role of the fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Ecological Entomology* 4: 151-160.
- Ramalho, M., Imperatriz-Fonseca, V.L., Kleinert-Giovannini, A. (1991) Ecologia nutricional de abelhas sociais. In: Panizzi, A.R., Parra, J.R.P. (eds.). *Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas*. Editora Manole, pp. 225-252.
- Ridley P, Howse PE, Jackson CW (1996) Control of the behaviour of leaf-cutting ants by their "simbiotic" fungus. *Experientia* 52, 631-635.
- Rockwood, L.L. (1976) Plant selection and foraging patterns in two species of leaf-cutting ants (*Atta*). *Ecology* 57: 48-61.
- Santos, A.V. (2003) Bactérias associadas à formiga saúva *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) e seus efeitos sobre fungos entomopatogênicos: uma nova ênfase para estratégias de controle biológico". Tese (doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 116p.
- Sarath, G., La Motte, R.S., Wagner, F.W. (1996). Protease assay methods. In: Beynon, R.J., Bond, J.S. (eds.): *Proteolytic enzymes*. Oxford University Press, pp. 25-55.
- Schneider M (2000). XXI International Congress of Entomology, Foz do Iguassu, Brasil, agosto de 2000. comunicação oral.
- Schoereder, J.H., Coutinho, L.M. (1991) Atividade forrageira e sobreposição de nichos tróficos em formigas do gênero *Atta* (Hymenoptera, Formicidae) em cerrado. *Revista Brasileira de Entomologia* 35: 229-236.
- Schultz, T.R., Meier, R. (1995) A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. *Systematics Entomology* 20: 337-370.
- Silva, A. (2000) Participação do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* na produção de enzimas intestinais da formiga *Atta sexdens*. UNESP, Rio Claro, SP. Tese de mestrado, 103pp.

- Silva, A., Bacci Jr., M., Siqueira, C.G., Bueno, O.C., Pagnocca, F.C., Hebling, M.J.A. (2003) Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *Journal of Insect Physiology* 49: 307-313.
- Silva, C.P., Terra, W.R. (1994) Digestive and absorptive sites along the midgut of the cotton seed sucker bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 24: 493-505.
- Silva, C.P., Terra, W.R., Xavier-Filho, J., Grossi de Sá, M.F., Lopes, A.R., Pontes, E.G. (1999) Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 355-366.
- Siqueira, C.G., Bacci Jr., M., Pagnocca, F.C., Bueno, O.C., Hebling, M.J.A. (1998) Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. *Applied Environmental Microbiology* 64: 4820-4822.
- Siqueira, C.G. (2002) Identificação das pectinases predominantes em ninhos de formigas *Atta sexdens* (L.). Tese de doutorado, UNESP, Rio Claro, São Paulo.
- St Leger, R.J., Cooper, R.M., Chernley, A.K. (1986) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *Journal of General Microbiology* 132: 1509-1517.
- Stradling, D.J. (1978) The influence of size on foraging in the ant, *Atta cephalotes*, and the effect of some plant defense mechanisms. *Journal of Animal Ecology* 47: 173-188.
- Stradling, D.J. (1991) An Introduction to the fungus-growing ants, Attini: in *Ant-Plant Interactions*. (eds. Huxley, CR and Cutler, DF) Oxford Uni Press, Oxford 601pp.
- Sudd, J.H. (1982) Ants: foraging, nesting, brood behavior, and polyethism. In: Hermann, H.R. (ed.). *Social insects*. Vol. IV. Academic Press, 107-155p.
- Sugayama, R.L., Salatino, A. (1995) Influence of leaf epicuticular waxes from cerrado species on substrate selection by *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 74: 63-69.
- Taiz, L., Zeiger, E. (1990). *Plant physiology*. The Benjamin Cummings Publishing Company.

- Tauk, S.M., Serdello, A. (1975) Isolation of bacteria in gardens of *Atta laevigata*. *Anais da Academia brasileira de Ciências* 47: 295-300.
- Tellam, R.L. (1996) The peritrophic matrix. In: Lehane MJ, Billingsley PF. *Biology of the insect midgut*. Chapman & Hall, pp. 86-114.
- Terra, W.R., Ferreira, C., Bianchi, A.G. (1979) Distribution of digestive enzymes among the endo-and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *Journal of Insect Physiology* 25:487-494.
- Terra, W.R. (1988) Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian Journal of Medical Biology and Research* 21: 675-734.
- Terra, W.R. (1990) Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review Entomology* 35: 181-200.
- Terra WR (1991) Digestão do alimento e suas implicações na biologia dos insetos. In: Panizzi, A.R., Parra, J.R.P. *Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas*. Editora Manole pp. 67-99.
- Terra, W.R. e Ferreira, C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109B: 1-61.
- Vasconcelos, H.L., Cherrett, J.M. (1995) Changes in leaf-cutting ant populations (Formicidae: Attini) after the clearing of mature forest in Brazilian Amazonia. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 30: 107-113.
- Vasconcelos, H.L., Cherrett, J.M. (1996) The effect of wilting on the selection of leaves by the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 78: 215-220.
- Viana-Bailez, A.M.M., Frézard, A., Malosse, C., Della Lucia, T.M.C., Errard, C., Lenoir, A. (2001) Colonial recognition of fungus in the fungus-growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Chemoecology* 11: 29-36.
- Waller, D.A. (1982) Leaf-cutting ants and live oak: the role of leaf toughness in seasonal and intraspecific host choice. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 32: 146-150.

- Weber, N.A. (1972) Gardening ants: the attines. *Memoirs of American Philosophical Society* 92: 1-146.
- Wetterer, J.K. (1995) Forager size and ecology of *Acromyrmex coronatus* and other leaf-cutting ants in Costa Rica. *Oecologia* 104: 409-415.
- Wetterer, J.K., Schultz, T.R., Meier, R. (1998) Phylogeny of fungus-growing ants (Tribe Attini) based on mtDNA sequence and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9: 42-47.
- Whitworth, S.T., Blum, M.S., Travis, J. (1998) Proteolytic enzymes from larvae of fire ant, *Solenopsis invicta*: Isolation and characterization of four serine endopeptidases. *Journal of Biological Chemistry* 273: 14430-14434.
- Wilson, E.O. (1971) *The insect societies*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, ?p.
- Wilson, E.O. (1980) Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). I. The overall pattern in *A. sexdens*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 7: 143-156.
- Wilson, E.O. (1987) Causes of ecological success: the case of the ants. *Journal of Animal Ecology* 56:1-9.
- Ydenberg, R., Schmid-Hempel, P. (1994) Modelling social insect foraging. *Tree* 9: 49-50.
- Zara, F.J., Caetano, F.H. (1998) Formação da membrana peritrófica em larvas de *Ectatoma edentatum* (Roger, 1863) (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Brasileira de Biologia* 58: 33-37.
- Zerbo, A.C., Silva de Moraes, R.L.M., Brochetto-Braga, M.R. (2001) Protein requirements in larvae and adults of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae): midgut proteolytic activity and pollen digestion. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 129: 139-147.