

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

---

ALFA-AMILASE E MALTASE NOS SIMBIONTES  
*Leucoagaricus gongylophorus* SINGER (MÖLLER) (LEUCOCOPRINEAE:  
AGARICACEAE) E *Atta sexdens* LINNAEUS (ATTINI: FORMICIDAE)

**ALINE SILVA**

**Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior**  
(Orientador)

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Rio Claro  
Estado de São Paulo  
Brasil

Outubro de 2004

ALFA-AMILASE E MALTASE NOS SIMBIONTES  
*Leucoagaricus gongylophorus* SINGER (MÖLLER) (LEUCOCOPRINEAE:  
AGARICACEAE) E *Atta sexdens* LINNAEUS (ATTINI: FORMICIDAE)

**ALINE SILVA**

**Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior**  
(Orientador)

Este trabalho foi realizado com recursos da FAPESP  
(Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)  
Processo 00/00428-0 (Bolsa de Doutorado)

Rio Claro  
Estado de São Paulo  
Brasil

Outubro de 2004

547.758 Silva, Aline

S586a Alfa-amilase e maltase nos simbioses *Leucoagaricus gongylophorus* Singer (Möller) (Leucocoprineae: Agaricaceae) e *Atta sexdens* / Aline Silva. – Rio Claro : [s.n.], 2004  
77 f. : il., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Maurício Bacci Júnior

1. Enzimas. 2. Simbiose. 3. Purificação. 4. Formigas. 5. Fungos. I. Título

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

## **AGRADECIMENTOS**

*À minha família, por tanto carinho e força, em todos os momentos da minha vida...*

*Aos tantos amigos que fiz em Rio Claro. Foram eles os responsáveis por eu me sentir tão bem aqui, o que foi de muita importância para que eu pudesse realizar meu trabalho com tranquilidade.*

*Ao meu Orientador, Maurício Bacci Júnior, por tantas oportunidades, pela paciência que sempre teve comigo, e pelo exemplo que foi para mim durante todos estes anos que trabalhamos juntos.*

*À Unesp Rio Claro e aos seus funcionários e professores, sempre tão prontos a ajudar nos momentos necessários.*

*Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais e a todos que ali conviveram comigo. Está sendo difícil deixá-los...*

*A esta Cidade tão querida para mim, que me acolheu tão bem e que aprendi a gostar tanto...*

*A Deus, que sempre me dá forças, e que coloca em meu coração muita tranquilidade e felicidade para seguir o meu caminho...*

## ÍNDICE

RESUMO .....	03
JUSTIFICATIVA E OBJETIVO .....	04
CAPÍTULO I .....	06
Revisão Bibliográfica .....	07
A simbiose entre formigas forrageadoras e fungos .....	07
Aspectos gerais da interação .....	07
O fungo simbiote .....	08
Disseminação do fungo e preparação do substrato para seu cultivo .....	09
Outros microrganismos no ninho .....	10
Crescimento do fungo no ninho e nutrição das formigas.....	12
Primeira teoria com enfoque metabólico sobre a simbiose entre fungos e Attini .....	13
Determinação de enzimas sacaridásicas em operárias de Attini .....	14
Determinação de enzimas sacaridásicas no fungo simbiote .....	15
Integração metabólica na simbiose entre fungos e Attini .....	15
CAPÍTULO II .....	23
Produção de $\alpha$ -amilase e maltase pelo fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> na presença de diferentes fontes de carbono	
Resumo .....	24
Introdução .....	24
Material e Métodos.....	25
Resultados e Discussão .....	27
CAPÍTULO III .....	33
Purificação, caracterização e comparação de $\alpha$ -amilase e maltase de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> e <i>Atta sexdens</i>	
Resumo .....	34
Introdução .....	34
Material e Métodos .....	36
Resultados e Discussão .....	40
Purificação da maltase e $\alpha$ -amilase fúngicas .....	40
Purificação da maltase e $\alpha$ -amilase do intestino das operárias de <i>A. sexdens</i> .....	46
Caracterização das enzimas purificadas.....	52
CAPÍTULO IV .....	68
Discussão Final	
O significado do estudo das amilases na simbiose entre formigas cortadeiras e fungos .....	69
O amido e as amilases .....	69
Utilização de inibidores de amilase no controle de insetos e fungos .....	70
Como é o controle atual de formigas cortadeiras .....	71
Conclusões .....	72

## RESUMO

Neste trabalho foi proposto o estudo de  $\alpha$ -amilase e maltase do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* e do intestino de operárias da formiga cortadeira de folhas *Atta sexdens*, organismos que vivem numa simbiose obrigatória, na qual um dos fatores relevantes é o provável fornecimento de enzimas fúngicas aos insetos. Para tanto, as amilases do fungo foram induzidas em diferentes fontes de carbono, sendo estas mais secretadas em amido e/ou maltose e reprimidas parcial ( $\alpha$ -amilase) ou totalmente (maltase) por glicose. Após a purificação das enzimas, através de cromatografia líquida (troca iônica, interação hidrofóbica e exclusão molecular), a determinação das características físico-químicas (temperatura de atividade ótima e de inativação; pH de melhor atividade e estabilidade;  $K_m$ ; peso molecular; influência do cloreto e  $Q_{10}$ ) permitiu a comparação das mesmas e os resultados mostraram que maltases de ambas as origens são enzimas distintas, enquanto que a  $\alpha$ -amilase presente no intestino dos insetos têm as mesmas características da  $\alpha$ -amilase do fungo simbiote, indicando a sua provável origem fúngica.

## JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

O fungo *Leucoagaricus gongylophorus* Singer (Möller) (Leucocoprineae: Agaricaceae) e a formiga *Atta sexdens* Linnaeus (Attini: Formicidae) vivem numa simbiose obrigatória na qual são envolvidos diferentes aspectos, dentre os quais a cooperação bioquímica parece ser um dos pontos fundamentais. Alguns estudos realizados nas últimas décadas vêm indicando que a produção e ciclagem de enzimas digestivas entre ambos são fatores vitais para o equilíbrio e manutenção da simbiose. Isto sugere que interferir neste metabolismo enzimático pode ser um bom alvo para o controle destes organismos, que são considerados pragas quando ocorrem em ambientes agrícolas. Nestes ambientes, as formigas cortam matéria vegetal e a carrega para o ninho, utilizando-a no cultivo do fungo, que degrada os polissacarídeos foliares e os reverte em nutrientes solúveis e assimiláveis, tanto para si como para os insetos.

Pesquisas na área de controle biológico destas formigas e seu fungo simbiote vêm sendo realizadas, mas não há dados de qualquer linha de trabalho objetivando o controle destes organismos utilizando inseticidas e/ou fungicidas que interfiram na digestão/degradação ou utilização de nutrientes importantes na sua nutrição. E talvez esta seja uma boa vertente de pesquisa a ser explorada.

Porém, para estudos aplicados, são necessários conhecimentos básicos sobre as enzimas que estão envolvidas na digestão, e principalmente de polissacaridasas, que parecem ser enzimas chaves na integração digestiva entre insetos e fungo. Mas pouco se conhece até o momento sobre o tema: desde que iniciaram os estudos sobre enzimas digestivas nestes organismos (1969) apenas 23 artigos, incluindo as revisões, foram publicados no mundo inteiro. Isto é muito pouco levando-se em consideração que há 191 espécies de formigas que vivem em simbiose com fungos, as chamadas Attini (Weber, 1972), dentre as quais 14 delas são economicamente importantes, por se comportarem como pragas em áreas cultivadas (Forti e Boaretto, 1997).

As pectinases parecem ser as enzimas mais importantes para a manutenção do equilíbrio de um ninho. Resultados já indicam que estas são enzimas de origem fúngica e que são recicladas no ninho pelas formigas (Ronhede *et al.*, 2004; Siqueira, 2004). Amilases vêm em segundo lugar como importantes para ambos os organismos, pois são as principais enzimas que atuam na produção de glicose no formigueiro, e este é um nutriente importante na manutenção de operárias e do próprio fungo (Siqueira *et al.*, 1998 e Silva *et al.*, 2003). E em vista da importância das amilases para estes organismos é que neste trabalho se propôs o estudo destas enzimas.

O presente trabalho teve como objetivo principal a comparação de amilases presentes nos dois simbiotes, o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* e as formigas *Atta sexdens*. Para esta comparação, as enzimas foram isoladas e caracterizadas, a partir de meio de cultivo do fungo ou do fluido fecal de operárias retiradas de formigueiro de laboratório.

### Citações Bibliográficas

- Forti, L. C.; Boaretto, M. A. C. (1997) Formigas cortadeiras: biologia, ecologia, danos e controle. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo. 61p.
- Ronhede, S.; Boosma, J. J.; Rosendahl, S. (2004) Fungal enzymes transferred by leaf-cutting ants in their fungus gardens. *Mycol. Res.*, 108 (1): 101-106.
- Silva, A.; Bacci Jr., M.; Siqueira, C. G.; Bueno, O. C.; Pagnocca, F. C.; Hebling, M. J. A. (2003). Survival of *Atta sexdens* on different food sources. *J. Insect Physiol.*, 49:307-313.
- Siqueira, C. G. (2004) Identificação de pectinases predominantes em ninhos de formigas *Atta sexdens* L. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.
- 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 leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. *Appl Environ Microbiol*, 64 (12): 4820-4822.
- Weber, N. A. (1972) Gardening ants: the Attines. Philadelphia: The American Philosophical Society, p. 87-115.



# *Capítulo I*

## *REVISÃO BIBLIOGRÁFICA*

## A Simbiose entre Formigas Forrageadoras e Fungos

### *Aspectos gerais da interação*

As formigas forrageadoras fazem parte do grupo de formigas da Tribo Attini, representante da subfamília Myrmicinae, Família Formicidae (Hölldobler e Wilson, 1990). Este grupo é caracterizado por cultivar fungos no interior de seus ninhos, com os quais mantém uma simbiose obrigatória.

A Tribo Attini é composta por 13 gêneros de formigas, estando estas subdivididas em um grupo derivado monofilético, no qual estão inseridos os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (as chamadas formigas cortadeiras), além dos gêneros *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*, e também um grupo parafilético, que é formado pelas Attini primitivas ou basais, que deram origem ao grupo das derivadas (Mueller *et al.*, 2001).

As formigas mais primitivas são caracterizadas por possuírem ninhos pequenos, com algumas dezenas a centenas de operárias monomórficas, que cultivam seu fungo em matéria vegetal morta, carcaças de outros insetos, frutos e flores recém caídos. No grupo considerado mais evoluído estão as formigas cortadeiras, caracterizadas por cortar material vegetal fresco, no qual cultivam seu fungo simbiote. Algumas espécies desenvolvem grandes ninhos e possuem operárias com alto grau de polimorfismo (Cherrett *et al.*, 1989). Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são considerados economicamente importantes, por tornarem-se pragas em ambientes onde predominam monoculturas agrícolas (Cherrett, 1986; Hernández e Jaffé, 1995).

As Attini são encontradas apenas na Região Neotropical, distribuindo-se deste o Sul dos Estados Unidos até o Sul da América do Sul, não ocorrendo em algumas ilhas da América Central e no Chile (Mariconi, 1970). As espécies representantes dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são consideradas as maiores consumidoras da matéria vegetal nos ecossistemas Neotropicais, cortando até 75% das espécies que ocorrem nestas regiões (Cherrett, 1986), e dentre as cortadeiras que invadem ecossistemas agrícolas, *Atta sexdens* é a espécie que mais causa danos econômicos na América do Sul, principalmente no Brasil (Weber, 1966). Vale ressaltar que o fungo também deve ser considerado um grande consumidor da matéria vegetal no ambiente Neotropical, mesmo que indiretamente, uma vez que todo o material coletado pelas formigas é utilizado para o seu cultivo.

A associação simbiótica destas formigas aos fungos que elas cultivam no interior de seus ninhos é considerada uma das razões de seu sucesso ecológico na natureza (Vasconcelos e Fowler, 1990). Outros insetos não cultivadores de fungos e que utilizam também material vegetal para alimentação submetem-se diretamente aos mecanismos de defesa de plantas, o que limita o número de espécies vegetais que podem forragear, tornando-os mais específicos em suas coletas. E o que faz das Attini cortadoras de plantas possuir alto grau de polifagia e predominar sobre outros insetos é provavelmente a interação que faz com fungos. Considerados altamente polípagos, os fungos são menos específicos na degradação da matéria vegetal na natureza, e isto se reverte em vantagem para os insetos, uma vez que estes podem ser menos seletivos em seu forrageamento, e mesmo as formigas coletando plantas com

defesas químicas contra insetos fitófagos, o fungo pode ser capaz de crescer neste substrato, detoxificá-lo, degradá-lo, produzindo nutrientes palatáveis no ninho (Cherret, 1980; Funk, 1985; Cherrett *et al.*, 1989; Dowd, 1992).

A simbiose obrigatória entre formigas e fungo foi primeiro relatada por Belt, em 1874. Baseada em interações mútuas entre ambos os organismos, estudos objetivando determinar os aspectos evolutivos, comportamentais, nutricionais e bioquímicos que envolvem a interação vêm sendo realizados até o presente.

### ***O fungo simbiote***

Dentre as pesquisas realizadas referentes à esta simbiose, o conhecimento sobre os fungos cultivados pelas Attini até os dias atuais não tem a dimensão dos estudos realizados com os seus insetos simbiotes. William Morton Wheeler, em 1910, já previa este fato dizendo: “*O estudo das Attini está apenas começando, e o avanço neste fascinante tema será mais difícil para micologistas do que para entomologistas*” (citação retirada de Mueller, 2002, pág. 1).

Uma das razões dos poucos estudos realizados com fungos de Attini é a sua difícil identificação. O alemão Alfred Möller, em 1890, iniciou os estudos com estes fungos numa viagem que fez ao Sul do Brasil (informação descrita em Weber, 1982, pág. 350). Na ocasião, Möller descreveu um fungo que se desenvolveu em um ninho de *Acromyrmex disciger*, referindo-se a um basidiomiceto, que nomeou de *Rozites gongylophora*.

Os estudos realizados até o momento indicam ser basidiomicetos os cultivares de todos os gêneros de Attini (Weber, 1966), porém há dificuldades na definição do táxon destes fungos, devido ao fato de, na maioria dos casos, apenas desenvolvem hifas estéreis, seja no ninho ou em culturas isoladas de laboratório, dificultando a taxonomia tradicional deste grupo, que é baseada na morfologia do basidioma, estrutura de reprodução destes fungos e que é indispensável na identificação até nível de espécie. Apesar de já se ter observado a manifestação do estágio sexuado em alguns fungos de formigas, apenas em algumas espécies isto ocorreu. Mas apesar das dificuldades na taxonomia tradicional, estudos celulares e moleculares vêm sendo realizados: a descrição de estruturas microscópicas realizada por Angeli-Papa e Eymé (1979, 1985) a partir de linhagens isoladas dos gêneros *Atta*, *Acromyrmex* e *Trachymyrmex* e estudos moleculares/evolutivos realizados por Chapella *et al.* (1994), Hinkle *et al.* (1994) e Mueller *et al.* (1998) comprovam ser basidiomicetos os fungos simbiotes das Attini.

Se em nível de Filo os estudos taxonômicos não foram fáceis até o momento, a identidade em nível de espécie destes fungos está distante de ser definida. Estudos tentando verificar se há a ocorrência de uma mesma espécie de fungo sendo cultivada por diferentes espécies de Attini foram realizados por Stradling e Powell (1986). Estes autores fizeram testes de interação entre linhagens isoladas de *A. sexdens*, *Atta cephalotes*, *Acromyrmex octospinosus* e *Trachymyrmex urichi*, e em suas conclusões, sugeriram que as diferentes espécies estudadas cultivam a mesma espécie de fungo. Em estudos moleculares realizados por Chapella *et al.* (1994) observaram-se diferenças até em nível taxonômico de

Família entre os fungos cultivados por diferentes categorias de Attini. Mueller (2002) faz um relato de todas as ocorrências de basidiomas em ninhos de formigas forrageadoras e, a partir deste trabalho pode-se inferir que, ao menos para as espécies dos gêneros considerados mais evoluídos (*Atta* e *Acromyrmex*) há o cultivo da mesma espécie de fungo. Silva-Pinhati *et al.* (2004) confirmam esta hipótese, após avaliar DNA ribossomal e espaçadores gênicos de diferentes linhagens de fungos cultivados por *Atta* e *Acromyrmex*.

Quanto à nomenclatura destes fungos, mesmo para linhagens que tiveram manifestação do basidioma no ninho, sempre foi controversa entre diferentes autores. Möller (1893) foi o primeiro a fazer uma descrição detalhada do fungo cultivado. Ele descreveu basidiomas formados em ninhos de *Acromyrmex*, identificando-os como *Rozites gongylophora*. Weber (1957) induziu em laboratório a formação de basidiomas de fungos de Attini, que após avaliados por Heim, em 1957, foram nomeados de *Leucocoprinus gongylophorus*. Kriesel (1972) chamou de *Attamyces bromatificus* o fungo isolado a partir do ninho da espécie *Atta insularis*.

Singer (1986), após análise de todas as descrições de basidiomas fúngicos realizadas anteriormente, renomeou o fungo cultivado pelas formigas Attini como *Leucoagaricus gongylophorus*, que é a nomenclatura mais utilizada atualmente pelos pesquisadores da área.

Muchovej *et al.* (1991) descreveram a obtenção de um basidioma em ninho de *A. sexdens* e o identificaram como *Leucoagaricus weberi*. Estes autores também relatam neste trabalho o aparecimento do mesmo fungo em ninho de *A. cephalotes*. Porém, mais recentemente, Fisher *et al.* (1994) também obteve um basidioma em ninho de *A. cephalotes*, o qual o autor define como sendo *Leucoagaricus gongylophorus* Singer (Möller), confirmando a nomenclatura proposta por Singer, em 1986.

### ***Disseminação do fungo e preparação do substrato para seu cultivo***

A disseminação do fungo é feita por rainhas jovens, que saem de ninhos adultos todos os anos, no período do "vôo nupcial". Estas rainhas saem de seus ninhos, são fertilizadas pelos machos e, em seguida, vão ao solo para formar novos ninhos (Weber, 1972). Trazem um inóculo do fungo em sua cavidade bucal, que é expelido assim que elas preparam o substrato para o início de seu cultivo, que nesta fase é feito em ovos colocados pela rainha especialmente para este fim. Após eclodirem as primeiras operárias, estas iniciam então a coleta de material foliar no ambiente externo, e é neste substrato que o fungo então vai produzir biomassa para o crescimento do ninho. O substrato vegetal coletado para o cultivo do fungo é preparado cuidadosamente pelas operárias, e esta preparação consiste nas seguintes etapas:

- 1) Cortar em pequenos fragmentos todo o substrato carregado para o ninho;
- 2) Macerar o material foliar com as mandíbulas. Neste momento ocorre um processo de salivagem na folha que, segundo Stahel (1943), Weber, (1955), Weber (1966) e Martin e Martin (1970), seria necessária tanto para a incorporação de enzimas digestivas como para a descontaminação da superfície foliar;

3) Depositar sobre o substrato o fluido fecal, que contém enzimas que auxiliam na degradação dos polímeros foliares (Martin, 1970).

Esta preparação do substrato foi detalhadamente discutida por Quinlan e Cherrett (1977), que utilizaram como modelo um ninho de laboratório de *A. octospinosus* coletando diversas espécies vegetais. Os autores observaram que folhas não tratadas pelas operárias não foram capazes de suportar o crescimento fúngico no ninho na maioria dos testes realizados, além de permitir maior crescimento de microrganismos contaminantes. Para verificar se apenas a descontaminação seria a razão para o melhor crescimento do fungo simbiote, os autores realizaram testes nos quais as folhas tiveram sua superfície descontaminada com agentes antimicrobianos antes de serem incorporadas ao fungo. Observaram que, apesar de ter havido crescimento fúngico em alguns casos, este não foi tão significativo quando o material foliar foi tratado pelas próprias formigas. Após observações microscópicas, concluíram que, além da descontaminação, a remoção da cera presente na camada mais superficial da folha era também fator importante no estímulo ao crescimento fúngico. Este processo, denominado de maceração e que ajuda na destruição da barreira física da cutícula foliar, permitindo maior permeabilidade para o crescimento fúngico, é auxiliado por enzimas presentes no fluido fecal, já anteriormente descritas por Martin (1974) e Martin *et al.* (1975). Diniz (2003) também demonstrou que as espécies *Atta laevigata* e *Atta bisphaerica* também preparam o substrato foliar, retirando a camada mais externa da folha antes da inoculação do fungo simbiote.

A descontaminação da superfície foliar, realizada pelas operárias, é de extrema importância para a colonização do substrato pelo fungo, tornando-o competitivo perante outros microrganismos. Esta é uma das características da simbiose que vem sendo discutida desde 1943, por Stahel, que relatou a incrível capacidade de um fungo crescer, aparentemente sem contaminantes, num ecossistema microbiologicamente tão competitivo como o solo. A capacidade de inibir o desenvolvimento de esporos fúngicos por secreções da glândula metapleurar de espécies de formigas do Gênero *Myrmecia* Fabricius (Myrmeciini: Formicidae), em estudos realizados por Beattie *et al.* (1986) e Veal *et al.* (1992) indicavam o provável mecanismo de controle de contaminantes utilizados também pelas formigas cortadeiras. Mas apenas recentemente foram iniciados estudos sobre a glândula metapleurar de espécies de Attini. Ortius-Lechner *et al.* (2000) e Bot *et al.* (2001) determinaram os componentes secretados e a estrutura desta glândula em *A. octospinosus*, discutindo o potencial antimicrobiano das substâncias produzidas. Efeito inibitório de secreções da glândula mandibular de *A. sexdens* sobre conídios do fungo *Botrytis cinerea* e de secreções da glândula metapleurar de *A. octospinosus* sobre o crescimento de diferentes espécies de fungos e bactérias foram detectados por Massaro Júnior *et al.* (2001), Poulsen *et al.* (2002) e Bot *et al.* (2002).

### ***Outros microrganismos no ninho***

A inibição de outros microrganismos no ninho, como já relatado anteriormente, é de crucial importância para a colonização e predominância do fungo simbiote sobre o substrato. Porém, sabe-se

que há uma microbiota paralela ao fungo simbiote que perfaz 30% de toda a microbiota do formigueiro, sendo 20% composta de leveduras e 10% de outros microrganismos (Fisher *et al.*, 1996). A atuação destes no interior dos formigueiros vem sendo estudada por diversos autores e atualmente sabe-se que há papéis importantes desta microbiota. Quanto às leveduras, relatos de Weber (1957), Craven *et al.* (1970) e Angelis (1983) mostram a sua presença em ninhos de *A. cephalotes*, *A. octospinosus*, *A. sexdens* e *A. laevigata*. Carreiro *et al.* (1997) identificaram 24 espécies de leveduras em ninhos de *A. sexdens*. A presença relevante de leveduras em ninhos de Attini indica, segundo Fisher *et al.* (1996), que este grupo de microrganismos possa exercer importante papel, podendo ser inclusive, um terceiro organismo simbiote.

Bactérias também foram detectadas em ninhos de *A. octospinosus*, *A. laevigata* e *A. sexdens* por Sheld *et al.* (1971), Serzedello e Tauk (1973, 1975), Bacci Jr. *et al.* (1995) e Ribeiro (2000), que discutem sobre estas auxiliarem na degradação de sacarídeos no ninho, uma vez que demonstraram esta capacidade em ensaios de laboratório.

Ainda com relação às bactérias, uma descoberta recente vem influenciando as teorias sobre o equilíbrio desta simbiose entre fungo e formigas. Currie *et al.* (1999b, 2003b) identificou uma bactéria associada à cutícula de operárias de diversas espécies de Attini, tanto primitivas como derivadas. No relato, os autores apresentam actinomicetos da Família *Pseudonocardiaceae* como um terceiro simbiote na interação, indicando ser este um especializado microrganismo atuando contra o principal parasita dos ninhos, um fungo filamentosso do gênero *Escovopsis*. Em 2003a, Currie *et al.* apresentam os resultados experimentais que evidenciam a atuação destes actinomicetos no controle do fungo parasita.

O fungo *Escovopsis* é outro microrganismo encontrado em formigueiros de Attini. Considerado o principal microrganismo antagonista da simbiose, este fungo parece estar presente mesmo em ninhos saudáveis, onde apresenta um crescimento controlado. Mas em situações de desequilíbrio do formigueiro, este fungo se manifesta, crescendo em tal velocidade, que pode destruir um ninho em poucos dias (Currie *et al.*, 1999a). A manifestação deste fungo no interior dos ninhos foi observada desde os primeiros estudos realizados por Möller, no final do século XIX, porém em seus relatos o autor identificou o fungo como sendo “uma das formas de crescimento do fungo simbiote”. Mas os desenhos realizados por ele mostram que esta suposta forma distinta do simbiote era, na verdade, o parasita *Escovopsis* (retirado de Weber, 1972, pág. 112-115). Stahel, em 1943, detecta um fungo que cresce rapidamente em ninhos de Attini, e pelas características de crescimento descritas, este seria o provável *Escovopsis*, porém o autor também o trata como sendo uma das formas de crescimento do simbiote. Apenas em 1972, Kriesel descreve um fungo que se manifestou em ninho de *A. insularis* como sendo um outro microrganismo que se desenvolve no ninho, e o nomeou de *Phialocladus* sp. Em 1990 Muchovej e Della Lucia renomeiam o fungo, denominando-o de *Escovopsis weberi*. Até o momento, duas espécies já foram descritas: *Escovopsis weberi* (Muchovej e Della Lucia, 1990) e *Escovopsis aspergilloides* (Seifert *et al.*, 1995).

### ***Crescimento do fungo simbiote no ninho e nutrição das formigas***

Após preparar a superfície foliar, garantindo maceração prévia e descontaminação da matéria vegetal, as operárias inoculam o fungo simbiote com pequenos fragmentos de hifas (retirados de partes maduras do ninho), iniciando então o crescimento deste em um novo substrato (Weber, 1979). Neste substrato, ele desenvolve predominantemente o seu estágio vegetativo, formando uma estrutura esbranquiçada e esponjosa denominada “jardim de fungo”, que fica distribuída nas chamadas “câmaras” (cavidades que compõem o ninho). Neste estágio, o fungo produz hifas especiais denominadas gongilídeos (Belt, 1874), extremidades intumescidas das hifas, agrupadas em cachos (chamados estáfilos) e que armazenam carboidratos, provavelmente utilizados como fonte de energia dentro do ninho. Nesta fase, há a participação ativa das operárias, que permanentemente mantêm as condições ótimas para a manutenção saudável do simbiote. Estas realizam cortes estratégicos nas hifas para retirar regiões exauridas e estimular uma maior produção de gongilídeos nas extremidades de crescimento (Schildknecht *et al.*, 1973; Bass e Cherret, 1994 e 1996). Temperatura de 25°C e pH em torno de 5,0 são condições ótimas para o seu crescimento e produção de gongilídeos [condições verificadas para *A. sexdens* por Mudd e Bateman (1979) e Powell e Stradling (1986)].

A manutenção de um ninho saudável e livre da contaminação excessiva de outros organismos tem participação ativa das operárias. Antes dos relatos de Currie, em 1999, sobre os actinomicetos associados às formigas, o controle de contaminantes era atribuído somente às substâncias produzidas por glândulas mandibulares e metatorácicas dos insetos. Porém, atualmente, sabe-se que estas bactérias têm papel importante, ao menos no controle do *Escovopsis*, que é o principal contaminante do ninho (Currie *et al.*, 2003).

As formigas disseminam o fungo, o inoculam em substrato previamente preparado, cuidam dele durante seu desenvolvimento no ninho, estimulando seu crescimento e evitando contaminantes. Dados de Martin *et al.* (1969), utilizando fungo de *A. cephalotes* como modelo, mostram que, aproximadamente, 50% do peso seco fúngico está disponível na forma de nutrientes solúveis e potencialmente assimiláveis pelas formigas. São 27% de carboidratos, 13% de proteínas, 4,7% de aminoácidos livres e 0,2% de lipídios. Dentre os carboidratos solúveis, trealose e glicose são os mais abundantes. Dados de Silva *et al.* (2003) mostram que glicose é um eficiente nutriente para a sobrevivência de operárias adultas de *A. sexdens*, e sabe-se que trealose é o principal açúcar utilizado como reserva de energia para insetos (Chippendale, 1978).

Porém, apesar do fungo ser aparentemente uma excelente fonte de nutrientes, há controvérsias quanto ao seu real papel nutricional para os insetos. As primeiras afirmações feitas por Belt (primeiro investigador a se referir sobre a simbiose obrigatória entre os dois organismos), em 1874, determinavam que a principal função do fungo na simbiose era servir de alimento para as formigas. Esta teoria foi adotada por todos os pesquisadores da área, até que em 1979, Quinlan e Cherrett estabeleceram um paradigma na simbiose entre insetos e fungo, afirmando que o fungo é responsável apenas pela nutrição das larvas dos insetos e que para as operárias adultas este não forneceria mais que 5% de toda a fonte de energia necessária para sua sobrevivência. Em 1995, Bass e Cherrett confirmaram esta teoria,

apenas sugerindo que o fungo teria uma participação maior na nutrição das formigas, aumentando-a para 9%. Esta teoria estabelece que mais de 90% das necessidades nutricionais de operárias adultas, no que diz respeito aos carboidratos, são obtidas a partir da seiva de plantas que estas coletam. Apesar de improvável, é esta hipótese que vem sendo adotada por pesquisadores da área atualmente.

Porém, mesmo antes da teoria de Quinlan e Cherrett (1979) já havia sido relatado que há situações em que operárias cessam o forrageamento (em muito baixas temperaturas ou em períodos de fortes chuvas, por exemplo) e que se alimentam exclusivamente do fungo nesta fase (Hodgson, 1955). Esta observação, se for associada ao próprio hábito de coleta das *Attini* primitivas, que não carregam material vegetal fresco constantemente (Weber, 1972), ou mesmo de algumas espécies de cortadeiras, como *Atta mexicana* e *Acromyrmex versicolor*, que ocorrem em regiões desérticas e que nem sempre tem acesso a vegetais frescos para forragear (Mintzer, 1979; Wetterer, 2000), apresentam indícios da improbabilidade da teoria que prioriza a seiva de plantas como principal fonte de nutrientes e que minimiza a participação do fungo simbiote como fornecedor de alimento para as formigas operárias.

Resultados apresentados por Silva *et al.* (2003), utilizando *A. sexdens* como modelo, contradizem que plantas possam suportar a sobrevivência de operárias adultas e demonstram que o jardim de fungo, como está presente no ninho, pode suportar a sobrevivência destas. Contudo, os autores não afirmam que esta seja a única fonte nutricional, mas sugerem que este seja o principal alimento das operárias, mas que deve haver outras fontes onde os insetos possam obter os carboidratos necessários para suas atividades diárias. Uma das fontes, além do jardim de fungo, que provavelmente supre parcialmente os carboidratos necessários para as operárias de formigas cortadeiras é o líquido proctodeal que as larvas liberam no momento em que são alimentadas pelas formigas adultas (Schneider, 2003). Neste líquido, além de aminoácidos e ácido fosfórico, há carboidratos, principalmente glicose, numa concentração média de 12 mg/mL. Considerando que Silva *et al.* (2003) estabelecem que o jardim de fungo, que contém, em média, 30 mg de glicose/g de jardim de fungo, supra 50% das necessidades de carboidratos para as operárias, este fluido forneceria cerca de 20%. Então, jardim de fungo e líquido proctodeal supriria 70% das necessidades de glicose das operárias, sendo 30% originários de outras fontes, ainda desconhecidas.

Disseminação do fungo pela natureza, controle de microrganismos contaminantes, fornecimento de nutrientes dentro do ninho. Estes são importantes pontos da simbiose que revelam a co-dependência entre estes dois organismos. Mas além destes, há um outro aspecto a ser considerado, tão relevante quanto os anteriormente citados, que é o enredo enzimático que envolve os insetos e o seu fungo simbiote. Desde os primeiros estudos realizados nesta área, notam-se resultados que indicam dependência e colaboração metabólica entre estes organismos.

### ***Primeira teoria com enfoque metabólico/enzimático sobre a simbiose entre fungos e Attini***

Martin e Weber, em 1969, foram os primeiros a apresentar estudos metabólicos de *Attini* envolvendo enzimas. Em seus primeiros resultados, demonstraram a capacidade do fungo simbiote de



*Atta colombica tonsipes*, isolado em laboratório, utilizar a celulose para o seu crescimento. Com isto, os autores inferem sobre a produção de celulase pelo fungo e estabelecem a teoria de que a relação simbiótica entre *A. colombica* ou outras Attini e seu fungo simbiote está baseada na degradação deste polímero, que é o principal componente do material vegetal carregado para o ninho.

Em 1970, Martin e Martin publicam os primeiros estudos de detecção de atividades enzimáticas em operárias de formigas. Estes autores determinaram proteinases no intestino médio e no fluido fecal de operárias das espécies *A. colombica tonsipes*, *A. cephalotes*, *A. sexdens*, *A. octospinosus*, *Sericomyrmex urichi* e *Trachymyrmex septentrionalis*. Atividade proteinásica no canal retal foi, em média, cinco vezes maior que no intestino médio. Os autores discutiram que, se as enzimas são produzidas pela formiga, a sua secreção seria realizada no intestino médio e que o reto seria um local de depósito das proteinases. Esta foi a primeira citação que se refere às formigas como possíveis armazenadoras de enzimas.

Martin e Martin (1970) também determinaram que o fungo simbiote não foi capaz de se desenvolver em meio de cultivo contendo proteínas complexas. Observou-se que, após a adição de aminoácidos no meio de cultivo, houve aumento na produção de biomassa fúngica em até quatro vezes. A adição do fluido fecal das operárias ao meio também aumentou o crescimento do fungo. Os autores especularam sobre a incapacidade deste microrganismo em degradar proteínas complexas e sugeriram que aminoácidos e proteinases das formigas sejam expelidos no fluido fecal, auxiliando no crescimento do fungo no ninho. Baseado nestes resultados, Martin, em 1970, publica a primeira teoria sobre a base bioquímica da simbiose entre as Attini e seu fungo, definindo que a integração metabólica entre eles é baseada nos seguintes aspectos: as formigas defecam no material foliar antes de inocular o fungo, e com isto contribuem com a habilidade de degradar proteínas, tornando mais rápida a aquisição de nutrientes assimiláveis para este. Em recompensa, as formigas são beneficiadas pela habilidade do fungo em degradar a celulose, disponibilizando nutrientes para elas. Porém, em 1975, Boyd e Martin revêem esta hipótese, baseados em dados experimentais nos quais foi demonstrada a origem fúngica de proteinases presentes no fluido fecal de operárias de *A. colombica*. A partir de então definem que o benefício proporcionado pelas formigas consiste em transportar enzimas fúngicas no ninho, ingerindo-as em regiões da esponja fúngica já desenvolvida e disponibilizando-as em regiões de recém inoculação do fungo no substrato.

#### ***Determinação de enzimas sacarídicas em operárias de Attini***

A determinação de sacaridases em formigas Attini foi iniciada por Martin *et al.* (1973) e Martin (1974): Amilase e quitinase em espécies de *Cyphomyrmex*, *Apterostigma*, *Myrmicocrypta* e *Sericomyrmex* (Martin *et al.*, 1973), e em *A. colombica tonsipes*, além destas enzimas, foi também encontrada atividades de pectinase e xilanase. *A. colombica tonsipes* também foi avaliada quanto ao número de unidades das enzimas presentes em seu fluido fecal na degradação de pectina, amido, celulose e xilana (Martin *et al.*, 1975). Detectaram-se níveis de degradação semelhantes para amido, celulose e

xilana, mas para pectinase, o número de unidades de enzima foi, aproximadamente, 40 vezes maior do que para as outras polissacaridases testadas. Inicia-se então a discussão da importância da pectinase para a simbiose. O autor justifica tão elevado nível da enzima devido à necessidade de rápida degradação da superfície foliar (coberta por pectina) para o acesso do fungo aos nutrientes internos da folha.

Em glândulas labiais e no intestino de *A. octospinosus* Febvay e Kermarrec (1981, 1983) detectaram maltase, trealase e celobiosidase; e D'Ettorre *et al.* (2002) determinaram, em operárias de *Acromyrmex subterraneus* e *Acromyrmex crassispinus*, atividades de amilase, maltase e invertase. Em larvas destas formigas, além das enzimas citadas, foi detectada laminarinase. Em 2004, Ronhede *et al.* apresentam dados de detecção de pectinase e celulase em *Acromyrmex echinator*.

Mais recentemente, Erthal Jr. *et al.* (2004) avaliaram a distribuição de sacaridases, dentre outras enzimas digestivas, no aparato intestinal de operárias adultas de *A. subterraneus*. Glicosidases ( $\alpha$  e  $\beta$ ) foram detectadas em grande quantidade no reto das operárias. Dentre as polissacaridases que degradam o substrato vegetal, foram detectadas apenas amilase (na glândula labial e reto) e pectinase (no reto).

#### ***Determinação de enzimas polissacaridásicas no fungo simbiote***

Após o trabalho de Martin e Weber, em 1969, que sugere a produção de celulase pelo fungo simbiote de *A. colombica*, apenas em 1995 Bacci Jr. *et al.* publicam dados de determinação de enzimas no fungo simbiote. Neste trabalho, celulase foi detectada no fungo de *A. sexdens*, levando aos autores a confirmar a teoria de que a degradação de celulose seria importante na interação entre os dois organismos. Porém, em 1998, Siqueira *et al.* refutam esta hipótese, afirmando, com dados experimentais, a pouca habilidade do fungo simbiote em degradar a celulose. Abril e Bucher (2002), após avaliar fungos cultivados por *Acromyrmex lundii*, *Acromyrmex lobicornis*, *Acromyrmex heyeri* e *Atta vollenweideri*, afirmam ainda que estes não degradam celulose. Em *L. gongylophorus*, o fungo cultivado por *A. sexdens*, Siqueira *et al.* (1998) detectaram elevada quantidade de pectinase (em relação à celulase, foi duzentas vezes maior), média atividade de amilase e baixas atividades de xilanase e celulase. Atividade de celulase, apesar de baixa, também foi detectada nos fungos cultivados por *A. subterraneus* e *A. crassispinus* (D'Ettorre *et al.*, 2002). Todos estes resultados mais recentes derrubam a hipótese de que a celulase seja enzima chave na simbiose, pois isto realmente é pouco provável. Contudo, seria incorreto concordar com Abril e Bucher (2002), que afirmam que fungos simbiotes de Attini não metabolizam celulose, pois há evidências de que alguns fungos simbiotes possuem celulase, porém esta enzima tem baixa atividade nestes organismos.

#### ***Integração metabólica na simbiose entre fungos e Attini***

Mas se a celulase não é uma enzima importante na simbiose, qual a integração metabólica/digestiva que existe entre estes dois organismos? Dados recentes vêm mostrando que há um

enredo enzimático na simbiose, no qual participam diferentes enzimas, com diferentes atuações dentro do ninho.

A primeira observação a se fazer é sobre a elevada produção de pectinases por algumas linhagens de fungos de Attini (Siqueira *et al.*, 1998; Silva, 2000a; Silva, 2000b), e que há também alta atividade de pectinase no fluido fecal de operárias de cortadeiras (Martin *et al.*, 1975; Silva, 2000a; Siqueira, 2003). Mas seriam as pectinases do fluido fecal originárias do fungo simbiote? Ronhede *et al.* (2004) sugerem que sim. A partir de perfis semelhantes de pectinases fúngicas e do fluido fecal obtidos em focalização isoeletrica os autores sugerem que sejam a mesma enzima. Com estes dados eles discutem a teoria de Martin (1975), de que estas enzimas seriam ingeridas pelas operárias a partir do fungo já desenvolvido no ninho, concentradas em seu intestino e depositadas no substrato onde o fungo vai ser inoculado.

Quanto a outras polissacaridases importantes na degradação do material foliar carregado para o ninho, Silva (2000a) apresenta dados que mostram a importância destas na simbiose, bem como suas possíveis origens, utilizando a espécie *A. sexdens* e seu fungo simbiote *L. gongylophorus* como modelo. Amilases, xilanases e celulases foram determinadas em operárias de *A. sexdens* e no fungo simbiote, isolado em laboratório ou retirado diretamente do ninho, na forma de jardim de fungo. Quanto à origem destas enzimas verificou-se que o fungo provavelmente é o produtor de xilanases e celulases presentes nas operárias, e que estas seriam ingeridas enquanto as formigas se alimentam ou cuidam do fungo simbiote. Tal proposta foi justificada pela baixa sobrevivência das operárias quando estas foram isoladas do fungo e alimentadas apenas com os polissacarídeos vegetais xilana ou celulose, bem como pela ausência da enzima nas formigas nestas condições. Para amilases, verificou-se ainda que o fungo produz ao menos uma das amilases presentes no organismo das formigas. Porém, existem amilases nas operárias cuja origem não foi possível identificar, uma vez que elas poderiam ser produzidas pelas próprias formigas ou seriam originárias de outros microrganismos.

Todas as pesquisas realizadas até o momento mostram que há um complexo multi-enzimático envolvendo a simbiose, no qual algumas enzimas parecem estar prioritariamente relacionadas:

1) a pectinase parece ser uma importante enzima simbiote (Siqueira *et al.*, 1998), que é originária do fungo, ingerida pelas formigas, concentradas em seu intestino e excretada no fluido fecal durante o preparo do substrato para o cultivo do fungo (Ronhede *et al.*, 2004). Com isto, o fungo encontra o substrato pré-degradado e tem acesso direto à outros polissacarídeos que melhor induzem seu crescimento, amido ou xilana (1975; Siqueira *et al.*, 1998). Isto se mostra importante, uma vez que o fungo se torna competitivo na colonização do substrato perante outros microrganismos;

2) a amilase se apresenta como uma enzima secundária, porém importante, pois é a principal enzima atuando na produção de glicose no ninho. E a glicose se mostra como nutriente chave na simbiose, pois é eficiente na manutenção da sobrevivência das operárias (Silva *et al.*, 2003) e na formação de biomassa e gongilídeos pelo fungo simbiote (Siqueira *et al.*, 1998; Silva, 2000a);

3) xilanase é importante por ser a enzima que degrada a xilana, produzindo xilose. E este açúcar proporciona crescimento do fungo semelhante à glicose (Siqueira *et al.*, 1998);

4) Quanto à celulase, parece esta não ter papel relevante na degradação do substrato foliar levado para o ninho, porém vale ressaltar que a celulose se mostra como um importante polissacarídeo. Alguns dados demonstram ser este um bom indutor da produção de polissacaridases por *L. gongylophorus* (Silva *et al.*, em redação).

Os resultados mais recentes mostram que não há uma enzima polissacaridásica ou um polissacarídeo único que fundamente a dependência bioquímica entre as Attini e seu fungo simbiote. Há na verdade um conjunto de fatores metabólicos que se complementam e que contribuem para o equilíbrio destes organismos nos ecossistemas em que eles habitam.

### **Citações Bibliográficas**

- Abril, A. B.; Bucher, E. H. (2002) Evidence that the fungus cultured by leaf-cutting ants does not metabolize cellulose. *Ecology Letters*, 5: 325-328.
- Angeli-Papa, J.; Eymé, J. (1979) Le Champignon cultivé par la “fourmi-manioc”, *Acromyrmex octospinosus* Reich en Guadeloupe; résultats préliminaires sur le mycélium en culture pure et sur l’infrastructure des hyphes. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 289 (1): 21-24.
- Angeli-Papa, J.; Eymé, J. (1985) Le champignon cultivés par les fourmis attine. *Ann. Sci. Nat. Bot. Paris.*, 7: 103-129.
- Angelis, C.; Serzedello, A.; De Angelis, D. F. (1983) Yeasts found in gardens of *Atta sexdens rubropilosa* and *Atta laevigata*. *Naturalia*, 8: 149-151.
- Bacci Jr., M.; Ribeiro, S. B.; Casarotto, M. E. F.; Pagnocca, F. C. (1995) Biopolymer-degrading bacteria from nests of leaf cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28: 79-82.
- Bacci Jr., M.; Anversa, M. M.; Pagnocca, F. C. (1995) Cellulose degradation by *Leucocoprinus gongylophorus*, the fungus cultured by the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28: 79-82.
- Bass, M.; Cherrett, J. M. (1994) The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae) in fungus garden maintenance. *Ecol. Entomol.*, 19: 215-220.
- Bass, M.; Cherrett, J. M. (1995) Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Physiol. Entomol.*, 20:1-6.
- Bass, M.; Cherrett, J. M. (1996) Leaf-Cutting Ant (Formicidae, Attini) prune their fungus to increase and direct its productivity. *Func. Ecol.*, 10: 53-61.
- Beattie, A. J.; Turnbull, C. L.; Hough, T.; Knox, R. B. (1986) Antibiotic production: a possible function for the metapleural glands of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 79: 448-450.
- Belt, T. (1874) *The naturalist in Nicaragua*. London: Jonh Murray. (2ed, 1985, United States of America: The University of Chicago Press).
- Bot, A. N. M.; Obermayer, M. L.; Hölldobler, B.; Boomsma, J. J. (2001) Functional morphology of the metapleural gland in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Insects Soc.*, 48: 63-66.

- Bot, A. N. M.; Ortius-Lechner, D.; Finster, K.; Maile, R.; Boomsma, J. J. (2002) Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants. *Insects Soc.*, 49: 363-370.
- Boyd, N. D.; Martin, M. M. (1975) Faecal proteinases of the fungus-growing ant *Atta texana*: their fungal origin and ecological significance. *J. Insect Physiol.*, 21: 1815-1820.
- Carreiro, S. C.; Pagnocca, F. C.; Bueno, O. C.; Bacci Júnior, M.; Hebling, M. J. A.; Silva, O. A. (1997) Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71: 243-8.
- 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.
- 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.; Hammond, P. M.; Webber, J. F. (1989) *Insect-Fungus Interactions*. New York: Academic Press, p. 93-120.
- Cherrett, J. M. (1980) Possible reasons for the mutualism between leaf-cutting ants (Hymenoptera:Formicidae) and their fungus. *Biol. Ecol. Méditer.*, 7 (3): 113-122.
- Cherrett, J. M. (1986) The biology, pests status and control of leaf-cutting ants. *Agric. Zool. Rev.*, 1: 1-37.
- Chippendale, G. M. (1978) The function of carbohydrates in insect life processes. In: Rockstein, G. M. *Biochemistry of insects*. New York: Academic Press, p. 2-54.
- Craven, S. E.; Dix, M. W.; Michaels, G. E. (1970) Attine fungus gardens contain yeasts. *Science*, 169: 184-186.
- Currie, C. R.; Bot, A. N. M.; Boomsma, J. J. (2003a) Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus garden from specialized parasites. *Oikos*, 101: 91-102.
- 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. (2003b). *Corrigenda* reported in *Nature*, 423: 461.
- 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.
- D'Ettorre, P.; Mora, P.; Dibangou, V.; Rouland, C.; Errard, C. (2002) The role of the symbiotic fungus in the digestive metabolism of two species of fungus-growing ants. *J. Comp. Physiol. B*, 172: 169-176.
- Diniz, E.A. (2003) Preparação do substrato vegetal para o cultivo do fungo simbiote em duas espécies de formigas cortadeiras: *Atta laevigata* (Smith, 1858) e *Atta bisphaerica* (Forel, 1908) . Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Zoologia), Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.
- Dowd, P. F. (1992) Insect fungal symbionts: a promising source of detoxifying enzymes. *J. Ind. Microbiol.*, 9: 149-161.
- Erthal Jr., M.; Silva, C. P.; Samuels, R. I. (2004) Digestive enzymes of the leaf-cutting ants, *Acromyrmex*

- subterraeus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): distribution in the gut of adult workers and partial characterization. *J. Insect Physiol.*, 50 (10): 881-891.
- Febvay, G.; Kermarrec, A. (1981) Activités enzymatiques des glandes salivaires et de l'intestin moyen d'une fourmi attine (adultes et larves): *Acromyrmex octospinosus* Reich (Formicidae, Attini). *Arch. Biol. (Bruxelles)*, 92: 299-316.
- Febvay, G.; Kermarrec, A. (1983) Enzymes digestives de la fourmi attine *Acromyrmex octospinosus* Reich: caractérisation des amylases, maltase et tréhalase des glandes labiales et de l'intestin moyen. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 296: 453-456.
- Fisher, P. J.; Stradling, D. J.; Pegler, D. N. (1994) Leaf cutting ants, their fungus gardens and the formation of basidiomata of *Leucoagaricus gongylophorus*. *Mycologist*, 8 (3): 541-546.
- Fisher, P. J.; Stradling, D. J.; Sutton, B. C.; Petrini, L. E. (1996) Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. *Mycol. Res.*, 100 (5): 541-546.
- Fowler, H. G. (1994) Los jardines de hongos de las hormigas arrieras. *Ciencia*, 45: 163-170.
- Funk, A. (1985) Foliar fungi of western trees. In: Wilding, N.; Collins, N. M.; Hammond, P. M.; Webber, J. F. (1989) *Insect-Fungus Interactions*. New York: Academic Press, p. 93-120.
- Heim, R. A. (1957) A propos du *Rozites gongylophora*. *Rev. Mycol.*, 22: 293-299.
- Hernández, J. V.; Jaffé, K. (1995) Dano econômico causado por populações de formigas *Atta laevigata* (F. Smith) em plantações de *Pinus caribaea* Mor e elementos para o manejo da praga. *An. Soc. Entomol. Brasil*, 24: 287-298.
- Hinkle, G.; Wetterer, J. K.; Schultz, T. R.; Sogin, M. L. (1994) Phylogeny of the attine ant fungi based on analysis of small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Science*, 266: 1695-1697.
- Hodgson, E. S. (1955) An ecological study of the behavioral of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Ecology*, 36: 293-303.
- Hölldobler, B.; Wilson, E. O. (1990) *The ants*. Cambridge: Harvard University Press, p. 596-608.
- Kriesel, H. (1972) Pilze aus pilzgarten von *Atta insularis* in Kuba. In: Fowler, H. G. (1994) Los jardines de hongos de las hormigas arrieras. *Ciencia*, 45: 163-170.
- Mariconi, F. A. M. (1970) *As saúvas*. São Paulo: Agrônômica Ceres. 167 p.
- Martin, J.S.; Martin, M. (1970) The presence of protease activity in the tectal fluid attine ants. *J. Insect Physiol.*, 16: 227-232.
- Martin, M. M.; Gieselmann, M. J.; Martin, J. S. (1973) Rectal enzymes of attine ants:  $\alpha$ -amylase and chitinase. *J. Insect Physiol.*, 19: 1409-1416.
- Martin, M. M. (1970) The biochemical basis of the fungus-attine ant symbiosis. *Science*, 169: 16-20.
- Martin, M. M. (1974) Biochemical ecology of the attine ants. *Acc. Chem. Res.*, 7: 1-5.
- Martin, M. M.; Boyd, N. D.; Gieselmann, M. J.; Silver, R. G. (1975) Activity of faecal fluid of a leaf-cutting ant toward plant cell wall polysaccharides. *J. Insect Physiol.*, 21: 1887-1892.
- Martin, M. M.; Carman, R. M.; McConnel, J.G. (1969) Nutrients derived from the fungus cultured by the fungus-growing ant *Atta colombica tonsipes*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 62: 11-13.
- Martin, M. M.; Martin, J. S. (1970) The biochemical basis for the symbiosis between the ant, *Atta*

- colombica tonsipes*, and its food fungus. *J. Insect Physiol.*, 16: 109-119.
- Martin, M. M.; Weber, N. A. (1969) The cellulose-utilizing capability of the fungus cultured by the attini ant *Atta colombica tonsipes*. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 62: 1386-1387.
- Massaro Júnior, A. L.; Della Lucia, T. M. C.; Barbosa, L. C. A.; Maffia, L. A.; Morandi, M. A. B. (2001) Efeito de secreções da glândula mandibular de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea* Pers. Fr. *Neotropical Entomol.*, 30 (3): 403-406.
- Mintzer, A. (1979) Foraging activity of the Mexican leaf-cutting ant *Atta mexicana* (F. Smith), in a Sonoran Desert habitat (Hymenoptera: Formicidae). *Insectes Sociaux*, 26: 364-372.
- Möller, A. (1893) Die pilzgärten einiger südamerikanischer ameisen. In: Batra, L. R. (Ed.) (1979) Insect-fungus symbiosis, mutualism and commensalism. New York, John Willey & Sons, p. 77-116.
- Muchovej, J. J.; Della Lucia, T. M.; Muchovej, R. M. C. (1991) *Leucoagaricus weberi* sp. nov. from a live nest of leaf-cutting ants. *Mycol. Res.*, 95 (11): 1308-1311.
- Mudd, A.; Bateman, G.L. (1979) Rates of growth of the food fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) on different substrates gathered by the ants. *Bull. Ent. Res.*, 69: 141-148.
- Mueller, U. G. (2002) Ant versus fungus versus mutualism: ant-cultivar conflict and the deconstruction of the Attine ant-fungus symbiosis. *The Amer. Nat.*, 160: 67-98.
- Mueller, U. G.; Rehner, A.; Schultz, T. R. (1998) The evolution of agriculture 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 attine ant-fungus symbiosis. *Quarterly Review Biol.*, 76: 169-197.
- Ortius-Lechner, D.; Maile, R.; Morgan, E D.; Boomsma, J. J. (2000) Metapleural gland secretion of the leaf-cutter ant *Acromyrmex octospinosus*: New compounds and their functional significance. *J. Chem. Ecol.*, 26 (7): 1667-1683.
- Poulsen, M.; Bot, A. N. M.; Nielsen, M. G.; Boomsma, J. J. (2002) Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 52: 151-157.
- Powell, R. J.; Stradling, D. J. (1986) Factors influencing the growth of *Attamyces bromatificus*, a symbiont of Attini ants. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 87 (2): 205-213.
- Quinlan, R. J.; Cherrett, J. M. (1977) The role of substrate preparation in the symbiosis between the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. *Ecol. Entomol.*, 2: 161-170.
- Quinlan, R. J.; Cherrett, J. M. (1979) The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecol. Entomol.*, 4: 151-160.
- Ribeiro, S. B. (2000) Caracterização de espécies bacterianas encontradas em ninhos de *Atta sexdens* L. e isolamento de *Streptomyces* de formigas da Tribo Attini. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.

- Ronhede, S.; Boosma, J. J.; Rosendahl, S. (2004) Fungal enzymes transferred by leaf-cutting ants in their fungus gardens. *Mycol. Res.*, 108 (1): 101-106.
- Schildknecht, H.; Reed, P. B.; Reed, F. D.; Koob, K. (1973) Auxin activity the symbiosis of leaf-cutting ants and their fungus. *Insect Biochem.*, 3: 439-442.
- Schneider, M.O. (2003) Comportamento de cuidado da prole da saúva-limão *A. sexdens rubropilosa* Forel (1908) (Hymenoptera, Formicidae). Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Zoologia), Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.
- Seifert, K. A. (1995) *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. *Mycologia*, 87 (3): 407-413.
- Serzedelo, A.; Tauk, S. M. (1973) Celulase de bactérias isoladas de ninhos de *Atta laevigata* Smith. *Ciênc. Cult.*, 26 (10): 957-960.
- Serzedelo, A.; Tauk, S. M. (1975) Invertase e amilase de bactérias isoladas de ninhos de *Atta laevigata*, Smith. *Bol. Fac. Filos. Cien. Let.* 2: 11-28.
- Sheld, R. W.; Dix, M. W.; Michaels, G. E.; Craven, S. E. (1971) Bacterial distribution of attine ants and their gardens. *Bact. Prog.*, 71: 47-50.
- Silva, A. (2000) Participação do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* na produção de enzimas intestinais da formiga *Atta sexdens*. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.
- Silva, A. C. O. (2000) Isolamento do fungo simbiote da formiga *Mycetarotes paralellus* e avaliação de suas habilidades metabólicas. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.
- Silva, A.; Bacci Jr., M.; Siqueira, C. G.; Bueno, O. C.; Pagnocca, F. C.; Hebling, M. J. A. (2003). Survival of *Atta sexdens* on different food sources. *J. Insect Physiol.*, 49:307-313.
- Silva-Pinhati, A. C.; Bacci Jr., M.; Hinkle, M. L.; Sogin, M. L.; Pagnocca, F. C.; Martins, V. G.; Bueno, O. C.; Hebling, M. J. A. (2004). Low variation in ribossomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 37 (in press).
- Singer, R. (1986) The Agaricales in modern taxonomy. In: Fisher, P. J.; Stradling, D. J.; Pegler, D. N. (1994) Leaf cutting ants, their fungus gardens and the formation of basidiomata o *Leucoagaricus gongylophorus*. *Mycologist*, 8 (3): 541-546.
- Siqueira, C. G. (2003) Identificação de pectinases predominantes em ninhos de formigas *Atta sexdens* L. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.
- 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 leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. *Appl Environ Microbiol*, 64 (12): 4820-4822.
- Stahel, G. (1943) The fungus gardens of the leaf-cutting ants. *J. New York Bot. Garden*, 44: 245-253.



- Stradling, D. J.; Powell, R. J. (1986) The Cloning of more highly productive fungal strains: a factor in the speciation of fungus-growing ants. *Experientia*, 42: 962-964.
- Vasconcelos, H. L.; Fowler, H. G. Foraging and fungal substrate selection by leaf-cutting ants. In: Meer, R.K.V.; Jaffé, K.; Cedeno, A. (Ed.). *Applied myrmecology: a world perspective*. San Francisco: Westview Press, 1990. p. 410-9.
- Veal, D. A.; Trimble, J. E.; Beattie, A. J. (1992) Antimicrobial properties of secretions from the metapleural glands of *Myrmecia gulosa* (the Australian bull ant). *J. Appl. Bacteriol.*, 72: 188-194.
- Weber, N. A. (1955) Pure cultures of fungi produced by ants. *Science*, 121: 109.
- Weber, N. A. (1957) Fungus-growing ants and their fungi: *Cyphomyrmex costatus*. *Ecology*, 38 (3): 480-494.
- Weber, N. A. (1958) Evolution in fungus-growing ants. *Proc. Tenth. Intern. Congress Entomol.*, 2: 459-473.
- Weber, N. A. (1966) Fungus-growing ants. *Science*, 153: 587-604.
- Weber, N.A. (1972) Gardening ants: the Attines. Philadelphia: The American Philosophical Society, p. 87-115.
- Weber, N.A. (1979) Fungus culturing by ants. In: Batra, L. R. (Ed.). *Insect -fungus symbiosis, mutualism and commensalism*. New York: John Willey & Sons.
- Weber, N. A. (1982) Fungus ants. In: Hermann, H. R. (Ed.) *Social Insects*. New York: Academic Press, p. 255-363.
- Wetterer, J.K.; Himler, A.G.; Yospin, M.M. (2000) Foraging ecology of the desert leaf-cutting ant, *Acromyrmex versicolor*, in Arizona (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 37 (3B): 633-649.

## ***Capítulo II***

PRODUÇÃO DE  $\alpha$ -AMILASE E MALTASE PELO FUNGO *Leucoagaricus gongylophorus* NA PRESENÇA DE  
DIFERENTES FONTES DE CARBONO

## **Produção de $\alpha$ -Amilase e Maltase pelo fungo *Leucoagaricus gongylophorus* na Presença de Diferentes Fontes de Carbono**

### **Resumo**

O fungo *Leucoagaricus gongylophorus* vive em simbiose com formigas cortadeiras da espécie *Atta sexdens*, provendo-lhes enzimas para a degradação do material vegetal carregado para o ninho. Amido e enzimas amilolíticas são importantes para a nutrição dos simbiossitos sendo, provavelmente, os principais componentes na obtenção e ciclagem de glicose no ninho. A formação de biomassa, produção de proteínas totais e das enzimas  $\alpha$ -amilase e maltase por *L. gongylophorus* quando cultivado em amido, maltose e glicose, separados ou mesclados entre si foi investigada. O fungo foi capaz de utilizar todas as fontes de carbono para formação de biomassa. Não houve diferença em relação à variedade na produção de bandas protéicas, avaliadas em SDS-PAGE, nos meios contendo glicose, amido, maltose ou em amido e glicose. Alfa-amilase foi mais produzida em substratos contendo amido e/ou maltose. Na presença de glicose a enzima também foi produzida, porém em menores quantidades. Maltase foi detectada apenas em amido e/ou maltose, sendo que na presença de glicose não houve produção da enzima. Os resultados mostraram o melhor meio de cultivo para a produção das amilases por *L. gongylophorus*, possibilitando sua obtenção para estudos bioquímicos.

### **Introdução**

O fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, simbiossita das formigas cortadeiras *Atta sexdens*, produz enzimas que degradam polissacarídeos foliares, transformando-os em nutrientes assimiláveis, que são utilizados tanto para o seu crescimento, como para suportar a sobrevivência das formigas (Siqueira *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2003).

O estudo de polissacaridases em *L. gongylophorus* foi iniciado em 1969 por Martin e Weber, que estabeleceram a teoria de que a celulase seria a principal enzima fúngica atuante na simbiose, teoria esta que vinha sendo aceita por diversos pesquisadores que estudam a interação destes insetos e o fungo que cultiva no interior de seus ninhos. Porém, nos últimos anos, os estudos metabólicos realizados em fungos simbiossitos de formigas cortadeiras vêm mostrando que a celulase não é uma enzima prioritariamente produzida, e que há outras polissacaridases aparentemente mais importantes que a celulase (Siqueira *et al.*, 1998; Abril e Bucher, 2002).

Dentre as polissacaridases pesquisadas, pectinases, amilases e xilanases são produzidas em maior quantidade por *L. gongylophorus* do que a celulase, o que indica que estas enzimas tenham maior relevância na degradação do substrato foliar carregado para os formigueiros. Pesquisas já mostraram elevada capacidade do fungo em produzir e degradar a pectina (Siqueira *et al.*, 1998), o que é uma vantagem, pois garante que o fungo tenha acesso rápido aos nutrientes internos da folha e que estimulam o seu crescimento, garantindo o domínio do substrato perante outros microrganismos competidores (Martin, 1973; Martin *et al.*, 1975). Após a pectinase, a amilase é a polissacaridase mais produzida pelo

fungo simbiote, e tanto a amilase, como o substrato que ela degrada, o amido, parecem ter elevada importância no metabolismo e nutrição dos organismos simbiotes. Amido se comporta como o polissacarídeo vegetal que induz a produção de uma maior diversidade de proteínas por *L. gongylophorus* (Silva *et al.*, em redação) e provavelmente é nutriente chave na formação de biomassa fúngica (Siqueira *et al.*, 1998), indução da formação de gongilídeos (Silva *et al.*, 1998) e sobrevivência das formigas (Silva *et al.*, 2003), uma vez que seria a fonte de glicose mais utilizada dentre os polissacárides componentes do material vegetal carregado para o ninho. E a amilase, sendo a enzima responsável pela degradação do amido tem relevante papel no metabolismo, tanto do fungo como das formigas.

Perante tais observações, o estudo de enzimas atuantes na degradação do amido parece ser de relevante importância para o melhor conhecimento da simbiose, e este trabalho se propõe a investigar o efeito do amido, maltose e/ou glicose na indução de enzimas amilolíticas e biomassa em *L. gongylophorus*, simbiote das formigas cortadeiras *A. sexdens*.

## **Material e Métodos**

### *Cultivo de *L. gongylophorus* para Indução das Polissacaridases*

Linhagem isolada de *L. gongylophorus*, a partir de formigueiro de laboratório, em agosto de 1997 (Cód. B1-97) foi cultivada em meio estéril, contendo tampão citrato-fosfato 0,075 M pH 5,0, contendo 0,67 g.100 mL<sup>-1</sup> de Yeast Nitrogen Base (Difco cód. 100690) e 0,5 g.100 mL<sup>-1</sup> de cada fonte de carbono [glicose (J.T.Baker cód. 1916-01), amido (Sigma cód. S 9765) e maltose (Sigma cód. M 9171)], que foram utilizadas separadamente ou mescladas entre si, na proporção de 1:1. Após o crescimento estacionário do fungo por 10, 15, 20 ou 30 dias, a 25° C, cada erlenmeyer contendo 20 mL de meio de cultivo já com as enzimas secretadas foi filtrado em membrana 0,45 µm e dialisado, sendo esta a amostra utilizada nos experimentos.

### *Ensaio Enzimáticos*

Para a determinação das atividades de α-amilase e maltase foram utilizados os substratos amido (Sigma cód. S 9765), a 1,0 g.100 mL<sup>-1</sup>, e maltose (Sigma cód. M 9171), a 2,0 g.100 mL<sup>-1</sup> respectivamente. Amostra e substrato foram incubados, na proporção de 1:1 (v:v), a 30°C, em tampão citrato-fosfato 0,075 M pH 5,0. No tempo zero e a cada 15 minutos, alíquotas de 100 µL foram coletadas, seguindo para a determinação dos produtos de hidrólise.

Para α-amilase, o volume retirado da reação foi completado para 500 µL com água *MilliQ*, misturado a 500 µL de reagente de iodo [preparado com 0,25 g.100 mL<sup>-1</sup> de Iodo (Merck cód. 4761) e 0,16g.100 mL<sup>-1</sup> de Iodeto de Potássio (Mallinckrodt cód. 1127), seguindo para leitura em espectrofotômetro a 620 nm (Bernfeld, 1955). Para atividade de maltase a mistura reacional maltose/amostra foi fervida por 3 minutos (para parar a reação), sendo em seguida adicionada a 400 µL

de água *Milli Q* e a 500  $\mu\text{L}$  do reagente de glicose oxidase (Labtest cód. 34-E). Após banho-maria a 37° C por 15 minutos, seguiram para leitura em espectrofotômetro a 505 nm.

Os valores de densidade óptica obtidos foram utilizados para a determinação das atividades enzimáticas, utilizando-se curva padrão de amido (para atividade de  $\alpha$ -amilase) ou de glicose (para atividade maltase). Uma unidade (U) de atividade de  $\alpha$ -amilase foi definida como a atividade que causou a diminuição de 1 $\mu\text{g}$  na massa de amido solúvel colocada na reação, por mL de meio de cultivo, por minuto; e para maltase considerou-se como uma unidade (U) a produção de 1  $\mu\text{mol}$  de glicose, por mL de meio de cultivo, por minuto.

#### *Determinação de Proteínas Totais*

Foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  de cada amostra a 1000  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford (Bradford, 1976), seguindo a mistura para leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Para determinar a massa total de proteínas foi utilizada curva-padrão de ovoalbumina.

#### *Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE)*

Amostras contendo 10  $\mu\text{g}$  de proteínas totais foram concentradas em liofilizador e aplicadas ao gel de eletroforese. A preparação do gel de poliacrilamida na concentração final de 15% (v/v), as condições de preparação da amostra e de realização da corrida foram as mesmas estabelecidas por Laemmli (1970). Após a corrida, o gel foi submetido à coloração de prata (Heukeshoven and Dernick, 1985).

Todos os reagentes para realização da eletroforese foram originários da Amersham Biosciences, incluindo padrão de peso molecular (cod. 17-0446-01): fosforilase b (97 KiloDaltons-kDa); soroalbumina bovina (66 kDa); ovalbumina (45 kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,1 kDa).

#### *Estatística*

Foram realizados dois experimentos como o descrito no primeiro tópico de material e métodos. Em cada um deles, vinte e quatro réplicas de cada cultivo foram feitas, sendo retiradas seis destas a cada período de 10, 15, 20 ou 30 dias. Para cada avaliação foi utilizado então um “n” de 12 amostras, que foram submetidas à estatística, avaliando-se a capacidade de cada substrato em induzir a formação de biomassa e amilases por *L. gongylophorus*. Para a comparação, foi utilizado o teste paramétrico de *Tukey* (com intervalo de confiança de 95 %) (Zar, 1996) executado no programa *GraphPad Prism 4.0*<sup>®</sup>.

## **Resultados e Discussão**

No cultivo de *L. gongylophorus* nas fontes de carbono testadas (amido, maltose e glicose) objetivou-se avaliar três parâmetros: *a*) a formação de biomassa; *b*) o perfil das proteínas produzidas em SDS-PAGE e *c*) a produção de  $\alpha$ -amilase e maltase.

*L. gongylophorus* teve sua biomassa mensurada por até 30 dias de cultivo nas diferentes fontes de carbono (tabela 1). O fungo foi hábil em crescer em todos os substratos fornecidos. Apesar da glicose fornecida isoladamente ter proporcionado um maior crescimento do fungo após 30 dias, as análises estatísticas realizadas com os valores de biomassa obtidos no decorrer do experimento não indicaram diferenças entre as fontes de carbono na indução do crescimento fúngico.

**Tabela 1.** Biomassa (mg peso seco) produzida em até 30 dias de cultivo de *L. gongylophorus* em diferentes fontes de carbono [Média ( $\pm$  desvio padrão)]. A indução de biomassa fúngica foi estatisticamente idêntica dentre todos os substratos testados (teste de *Tukey*, 95% de confiança).

Fontes de Carbono ( <i>n</i> =12)	10 dias	15 dias	20 dias	30 dias
Glicose	0,0	12,0 (1,0)	16,6 (1,8)	22,0 (1,6)
Amido	0,0	10,2 (1,3)	12,0 (1,0)	15,0 (1,2)
Maltose	0,0	9,6 (0,9)	14,4 (1,3)	15,0 (1,2)
Amido e Maltose	0,0	9,4 (1,0)	13,4 (1,4)	16,0 (0,5)
Amido e Glicose	0,0	9,8 (0,8)	16,2 (1,4)	19,0 (2,0)
Maltose e Glicose	0,0	14,0 (0,7)	16,8 (1,5)	19,3 (0,6)

A diversidade de bandas protéicas após 30 dias de cultivo do fungo simbiote nos diferentes substratos foi detectada em gel de eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) (figura 1), que revelou não haver diferenças no perfil de proteínas expressas na presença das fontes de carbono testadas (glicose, amido ou maltose). A partir deste resultado, poderia-se concluir que qualquer meio de cultivo seria eficiente na indução das amilases, porém não foi este o resultado que as determinações das atividades enzimáticas revelaram (figura 2).

Alfa-amilase foi produzida por *L. gongylophorus* em todos os meios de cultivo, indicando ser esta uma enzima constitutiva. A produção da enzima pelo fungo durante os experimentos variou bastante, com picos de atividade bem distintos para cada uma das fontes de carbono testadas. Meios contendo amido ou maltose, ou a mistura dos dois, foram os que proporcionaram maior produção de  $\alpha$ -amilase (teste de *Tukey*) (figuras 2b, 2c e 2d). Nos meios elaborados com glicose a produção inicial de  $\alpha$ -amilase foi muito baixa, aumentando somente nos últimos dez dias de cultivo (figuras 2a, 2e e 2f). A presença deste açúcar, apesar de não inibir totalmente a enzima, reduziu a sua produção.

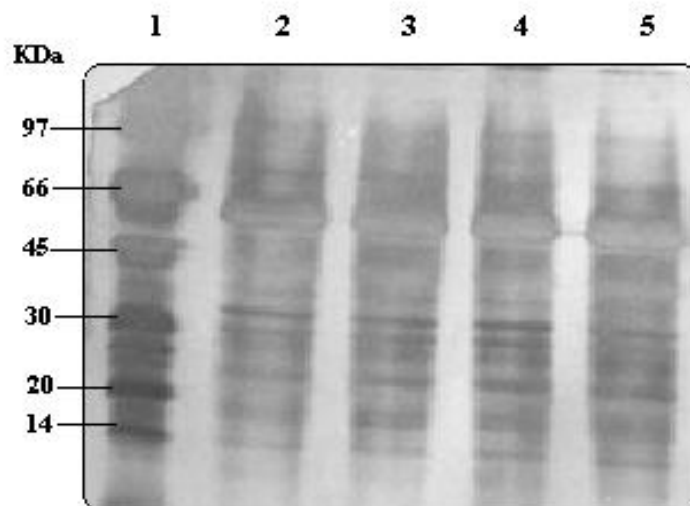
Quanto à maltase, observou-se a sua produção apenas em meio contendo amido e/ou maltose, sendo que em amido como única fonte de carbono, esta enzima foi mais produzida (figuras 2b, 2c e 2d).

Em todos os meios de cultivo contendo glicose a enzima não foi detectada (figuras 2a, 2e e 2f). De acordo com as análises estatísticas realizadas, o amido foi o maior indutor de atividade de maltase, seguido da maltose, isolada ou com amido. Isto indica ser a maltase fúngica uma enzima indutível, controlada pela presença do substrato a ser degradado.

A glicose foi detectada nos meios de cultivo no decorrer de todo o experimento. Nas figuras 2b a 2f o aumento na concentração deste açúcar é justificado pela hidrólise do amido ou da maltose durante o crescimento fúngico. A glicose interferiu na produção das duas enzimas, reprimindo totalmente a maltase e parcialmente a  $\alpha$ -amilase. Aparentemente, em concentrações acima de 4,5 mg/mL de glicose, a  $\alpha$ -amilase sofreu repressão catabólica.

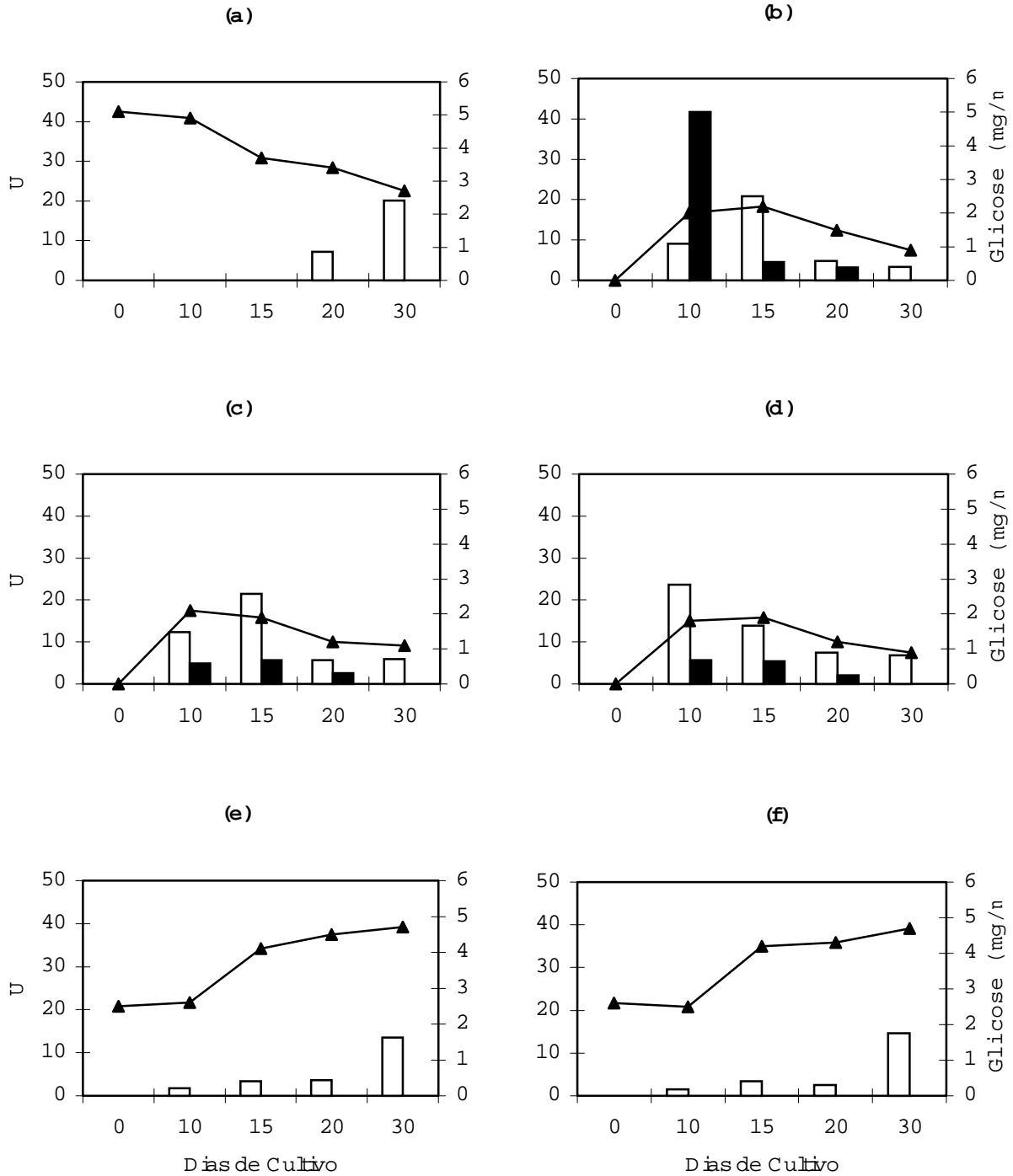
Extrapolando-se os resultados observados nesta situação de laboratório para o provável comportamento do fungo no interior dos ninhos, onde ele cresce numa mistura de nutrientes, dentre os quais a glicose é um deles, pode-se elaborar a seguinte questão: a glicose no ninho inibiria a produção destas enzimas? Dados ainda não publicados mostram que há degradação do amido no jardim de fungo, sendo esta mais elevada em regiões do ninho onde o fungo simbiote é recém inoculado (na esponja nova). Curiosamente esta é a região onde há menos glicose disponível no formigueiro. Quanto à  $\alpha$ -amilase fúngica não se espera que esta seja uma enzima reprimida, uma vez que há amido sendo constantemente incorporado através da matéria vegetal trazida pelas formigas, e este polímero induz a sua produção. Quanto à maltase fúngica, a glicose provavelmente pode reprimi-la no ninho, porém não se espera que isto impessa a degradação completa do amido neste ambiente, uma vez que há outros microrganismos presentes e que também devem auxiliar na degradação do substrato incorporado pelas formigas, além do que foi observado que a maltase presente no líquido fecal das operárias não é de origem fúngica (dados apresentados no próximo capítulo desta tese). Isto indica que esta enzima, ao ser depositada junto com o fluido fecal no material foliar, possa auxiliar na degradação completa do amido presente no substrato. Espera-se contudo que esta maltase presente nos insetos não seja inibida por glicose.

Comparando-se o perfil de produção das amilases de *L. gongylophorus* com o de outros fungos observam-se algumas semelhanças, porém não é válido fazer comparações para estabelecer padrões na produção de enzimas na presença de diferentes fontes de carbono, pois alguns autores determinam que não há um perfil único de indução de enzimas por fungos, até mesmo de um único gênero, afirmando que cada organismo pode ter seu próprio padrão de indução enzimática (Lachmund *et al.*, 1993; Haseltine *et al.*, 1996). Apesar disto, há relatos semelhantes ao ocorrido com *L. gongylophorus*. Em *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus nidulans* observou-se maior produção de  $\alpha$ -amilase em meios contendo amido ou maltose. Glicose, apesar de não inibir a enzima, reduziu a sua produção (Lachmund *et al.*, 1993; Nahas e Waldemarin, 2002). Em *Sulfolobus solfataricus* a adição de glicose reprimiu a produção de amilase (Haseltine *et al.*, 1996), e em espécies do gênero *Termitomyces*, fungo cultivado por cupins, detectou-se produção intensa de amilase e maltase na presença de amido (Mora e Rouland, 1995).



**Figura 1.** Perfil eletroforético (em SDS-PAGE) das amostras contendo proteínas secretadas por *L. gongylophorus* após 30 dias de cultivo em glicose (2) amido (3), maltose (4) e amido e glicose (5). Amostra 1 corresponde ao padrão de peso molecular, em kDa.





**Figura 2.** Unidades de  $\alpha$ -amilase ( $\square$ ) e maltase ( $\square$ ), e concentração de glicose ( $\square$ ) (mg/mL) nos meios de cultivo após manutenção de *L. gongylophorus* por até 30 dias. (n=12). **(a)** glicose, **(b)** amido, **(c)** maltose, **(d)** amido e maltose, **(e)** amido e glicose, **(f)** maltose e glicose.

### **Citações Bibliográficas**

- Abril, A. B.; Bucher, E. H. (2002) Evidence that the fungus cultured by leaf-cutting ants does not metabolize cellulose. *Ecology Letters*, 5:325-328.
- Bacci Jr., M.; Anversa, M. M.; Pagnocca, F. C. (1995) Cellulose degradation by *Leucocoprinus gongylophorus*, the fungus cultured by the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28: 79-82.
- Bateman, D. F.; Millar, R. L. (1967) Pectic enzymes in tissue degradation. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 14: 119-146.
- Bernfeld, P (1955) Amylases,  $\alpha$  e  $\beta$ . In: Methods in Enzymology, Vol I. Colowick, S. P. (Ed). New York: Academic Press. p. 149-158.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 86:142-146.
- Cherret, J.M. (1980) Possible reasons for the mutualism between leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) and their fungus. *Biol. Ecol. Méditer.*, 7(3):113-122.
- Cherret, J.M. (1986) The biology, pests status and control of leaf-cutting ants. *Agric. Zool. Rev.*, 1: 1-37.
- Haseltine, C.; Rolfsmeier, M.; Blum, P. (1996) The glucose effect and regulation of alpha-amylase synthesis in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.*, 178: 945-950.
- Hernández, J.V.; Jaffé, K. (1995) Dano econômico causado por populações de formigas *Atta laevigata* (F. Smith) em plantações de *Pinus caribaea* Mor e elementos para o manejo da praga. *An. Soc. Entomol. Brasil* 24: 287-298.
- Heukeshoven, J.; Dernick, R. (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6:103-112.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 227:680-685.
- Lachmund, A.; Urmann, U.; Minol, K.; Wirsal, S.; Ruttkowski, E. (1993) Regulation of alfa-amylase formation in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus nidulans* transformants. *Curr. Microbiol.*, 26: 47-51.
- Martin, M. M. (1973) Biochemical ecology of the attine ants. *Acc. Chem. Res.*, 7(1):1-5.
- Martin, M. M.; Weber, N.A. (1969). The cellulose-utilizing capability of the fungus cultured by the attini ant *Atta colombica tonsipes*. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 62: 1386-1387.
- Martin, M. M.; Boyd, N. D.; Gieselmann, M. J.; Silver, R. G. (1975) Activity of faecal fluid of a leaf-cutting ant toward plant cell wall polysaccharides. *J. Insect Physiol.*, 21: 1887-1892.
- Mora, P.; Rouland, C. (1995) Comparison of hydrolitic enzymes produced during growth on carbohydrate substrates by *Termitomyces* associates of *Pseudacanthotermes spiniger* and *Microtermes subhyalinus* (Isoptera: Termitidae). *Sociobiology*, 26 (1): 39-53.
- Nahas, E.; Waldemarin, M.M. (2002) Control of amylase production and growth characteristics of *Aspergillus ochraceus*. *Rev. Lat. Americ. Microb.*, 44 (1):5-10.

- Silva, A. (2000) Participação do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* na produção de enzimas intestinais da formiga *Atta sexdens*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro, São Paulo.
- Silva, A.; Bacci Jr., M.; Siqueira, C.G.; Bueno, O.C.; Pagnocca, F.C.; Hebling, M.J.A. (2003). Survival of *Atta sexdens* on different food sources. *J. Insect Physiol.* 49:307-313.
- Silva, A.; Bacci Jr., M.; Siqueira, C.G.; Bueno, O.C.; Pagnocca, F.C.; Hebling, M.J.A. (1998). Influência de nutrientes na produção de gongilídeos pelo fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, simbiote da formiga cortadeira *Atta sexdens* L. In Anais do Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental. Sociedade Brasileira de Microbiologia. Cuaibá, Mato Grosso, Brazil, pp. 137.
- 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 leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12):4820-4822.
- Weber, N.A. (1966) Fungus-growing ants. *Science* 153:587-604.
- Zar, J.H. (1996) Bioestatistical analysis, 3rd edn. New Jersey: Prentice-Hall.

## ***Capítulo III***

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DE  $\alpha$ -AMILASE E MALTASE PRESENTES NOS ORGANISMOS SIMBIONTES *Leucoagaricus gongylophorus* E *Atta sexdens*

## Purificação, Caracterização e Comparação de $\alpha$ -Amilase e Maltase Presentes nos Organismos Simbiontes *Leucoagaricus gongylophorus* e *Atta sexdens*

### Resumo

Alfa-amilase e maltase foram purificadas e caracterizadas a partir do intestino de operárias das formigas cortadeiras *Atta sexdens* e de seu fungo simbiote, *Leucoagaricus gongylophorus*. Na caracterização das enzimas purificadas foram obtidos os seguintes resultados: 1) Alfa-amilase do fungo simbiote: temperatura de atividade ótima, 35°C, temperatura de inativação, 50°C; pH de melhor atividade, 5; pH de estabilidade, 4 a 6; Km, 0,92 mg/mL; peso molecular, 29 kDa. 2) Alfa-amilase isolada do intestino posterior das formigas: temperatura de atividade ótima, 35°C, temperatura de inativação, 55°C; pH de melhor atividade, 5; pH de estabilidade, 4 a 6; Km, 0,84 mg/mL; peso molecular, 27 kDa. 3) Maltase do fungo simbiote: temperatura de atividade ótima, 55°C; temperatura de inativação, > 60°C; pH de melhor atividade, 5; pH de estabilidade, 4 a 6; Km, 0,94 mM; peso molecular, 74 kDa. 4) Maltase isolada do intestino posterior das formigas: temperatura de atividade ótima, 40°C; temperatura de inativação, 45°C; pH de melhor atividade, 6; pH de estabilidade, 6; Km, 2,4 mM; peso molecular, 63 kDa. Cloreto aumentou significativamente a atividade das  $\alpha$ -amilases de ambas as origens. Os resultados mostraram que maltases de ambas as origens são enzimas distintas, enquanto que a  $\alpha$ -amilase presente no intestino dos insetos têm as mesmas características da  $\alpha$ -amilase do fungo simbiote, indicando a sua origem fúngica. Provavelmente, esta enzima é ingerida pelas operárias e concentradas no seu intestino para ser novamente depositada no ninho antes da implantação de um novo inóculo do fungo no material foliar recém cortado, sendo esta ciclagem de enzimas microbianas no ninho um dos fatores que envolve a integração metabólica entre estes dois organismos.

### Introdução

*Leucoagaricus gongylophorus* é um fungo basidiomiceto que vive em uma simbiose obrigatória com as formigas cortadeiras *Atta sexdens*, uma das espécies pertencentes à Tribo Attini, que é caracterizada por agrupar espécies de formigas que cultivam fungos no interior de seus ninhos. *A. sexdens* é conhecida por seu hábito de cortar material vegetal fresco, que é utilizado para o cultivo de seu fungo simbiote (Mariconi, 1970; Hölldobler e Wilson, 1990), e por este hábito de forrageamento é uma espécie economicamente importante, principalmente no Brasil, onde invadem ambientes agrícolas e se tornam potenciais pragas (Weber, 1966; Cherrett, 1986; Hernández e Jaffé, 1995).

Dentre os aspectos que envolvem a simbiose há indícios de que a cooperação bioquímica/enzimática entre estes organismos é fator preponderante para a sobrevivência e equilíbrio nutricional de ambos. A primeira teoria estabelecida sobre a integração enzimática foi de que a relação simbiótica entre formigas e fungo estava baseada na degradação, pelo fungo, da celulose presente no material vegetal carregado para o ninho (Martin e Weber, 1969). Atualmente, a celulase já não é considerada enzima fundamental para a simbiose, havendo outras polissacaridasas que atuam

predominantemente na degradação do material vegetal, gerando nutrientes dentro do formigueiro.

Resultados recentes vêm mostrando que pectinases e amilases têm papel fundamental na degradação dos polissacarídeos vegetais e conseqüente formação de metabólitos solúveis dentro do ninho (Siqueira *et al.*, 1998; Silva, 2000; Ronhede *et al.*, 2004), o que se leva a crer que interferir na produção destas enzimas possa ser um bom alvo para o controle destes organismos em áreas agrícolas. Porém, para direcionar estudos aplicados são necessários estudos básicos que visem definir como estas enzimas atuam na degradação dos sacarídeos do substrato foliar.

Nesta degradação há a participação não só de enzimas fúngicas como também de enzimas excretadas pelas formigas durante o momento em que preparam o material vegetal para inocular o fungo. Esta preparação do substrato pelas operárias é uma das mais importantes etapas no estabelecimento e crescimento de um formigueiro, pois é nesta fase que há a retirada mecânica de microrganismos contaminantes e na qual se inicia a degradação do material foliar, possibilitando ao fungo, depois de inoculado, acesso rápido aos nutrientes internos da folha, a partir dos quais ele produz biomassa mais rapidamente (Weber, 1955; Bass e Cherret, 1994; Siqueira *et al.*, 1998). A preparação consiste nas operárias cortarem em pequenos pedaços os fragmentos vegetais e depositarem sobre este saliva e material fecal.

Wheeler, em 1937, fazia a seguinte observação: “*nutritivas gotas fecais das operárias parecem estimular o crescimento do micélio fúngico no material foliar*” (citação retirada de Weber, 1972); e Weber, em 1938 se referia ao líquido fecal como “*adubo sobre as partículas vegetais*”. Este autor observava que o depósito de líquido fecal promovia o crescimento fúngico, mas que não havia relatos sobre quais substâncias contidas neste fluido eram responsáveis por isto. Em 1941, Weber discute que, provavelmente, proteínas presentes no fluido fecal seriam as responsáveis pelo estímulo ao crescimento fúngico. Mas apenas em 1970 há o primeiro relato sobre substâncias do fluido fecal que teriam esta função: as enzimas. Martin e Martin (1970) detectaram proteinases no fluido fecal de operárias de diferentes espécies de *Attini*. A partir de então diferentes trabalhos de detecção de enzimas, principalmente sacaridases, em operárias destas formigas, foram realizados. Amilase, quitinase, pectinase e xilanase foram detectadas em *Atta colombica* e em espécies de *Cyphomyrmex*, *Apterostigma*, *Myrmicocrypta* e *Sericomyrmex* (Martin *et al.*, 1973; Martin, 1974). Em glândulas labiais e no intestino de *Acromyrmex octospinosus* Febvay e Kermarrec (1981, 1983) detectaram maltase, trealase e celobiosidase. No fluido fecal e/ou bucal de operárias de *A. sexdens* foram detectadas amilase, pectinase, xilanase e celulase (Silva, 2000). D’Ettorre *et al.* (2002) determinaram, em operárias de *Acromyrmex subterraneus* e *Acromyrmex crassispinus*, atividades de amilase, maltase e invertase. Em 2004, Ronhede *et al.* apresentaram dados de detecção de pectinase e celulase em *Acromyrmex echinator*.

Estas enzimas presentes no fluido fecal das formigas e que são depositadas no material foliar certamente fazem parte do “*adubo*” ao qual se referiam antigos autores, e são estas as responsáveis indiretas pelo crescimento do fungo, uma vez que degradam polímeros foliares, gerando nutrientes assimiláveis. Mas dentre as enzimas presentes no fluido fecal, quais seriam as mais importantes para a degradação do material foliar? As polissacaridases são as principais candidatas, uma vez que o material

vegetal é composto principalmente de polissacarídeos (Raven *et al.*, 1996). Martin e Weber (1969) estabeleceram que a celulase seria a principal enzima atuante na degradação, porém resultados mais recentes mostram que outras enzimas podem ter papel mais importante: pectinases e amilases presentes no fluido fecal e produzidas também pelo fungo são mais efetivas na digestão dos polissacarídeos foliares (Siqueira *et al.*, 1998; Silva, 2000). Pectinases do fluido fecal provavelmente auxiliam na degradação da pectina presente na superfície do material vegetal, possibilitando ao fungo a colonização rápida do substrato e o acesso imediato a nutrientes mais internos (Martin *et al.*, 1975), e amilases, atuando na degradação do amido, promovem a formação de glicose, que é a melhor fonte de carbono para a indução do crescimento fúngico (Siqueira *et al.*, 1998) e para a nutrição das formigas operárias de *A. sexdens*. (Silva *et al.*, 2003).

Dentro deste contexto, questiona-se se estas enzimas seriam produzidas pelas próprias operárias ou seriam originárias de seu fungo simbiote. Pesquisas sobre a origem de enzimas presentes no fluido fecal das formigas foram primeiro realizadas por Boyd e Martin, em 1975, que determinaram a origem fúngica de proteinases presentes no fluido fecal de operárias de *Atta texana*. A partir destes dados estes autores especularam sobre as polissacaridases do fluido fecal, sugerindo que também seriam enzimas oriundas do fungo. Porém, apenas em 2004, Ronhede *et al.* e Siqueira apresentam dados experimentais que indicam a origem fúngica de pectinases presentes nos insetos, que seriam ingeridas pelas operárias a partir do fungo já desenvolvido no ninho, concentradas em seu intestino e depositadas no novo substrato foliar trazido para o ninho e onde o fungo vai ser inoculado.

E quanto às amilases do fluido fecal? Qual seria sua origem? É para responder a esta questão que este trabalho foi delineado. O objetivo deste trabalho foi isolar e determinar algumas das características físico-químicas de enzimas que atuam na degradação do amido,  $\alpha$ -amilase e maltase, presentes no intestino de operárias de *A. sexdens* e em culturas de laboratório de seu fungo simbiote, *L. gongylophorus*. E com os resultados de caracterização, as enzimas foram comparadas, sendo possível determinar se há origem fúngica de amilases presentes no intestino das formigas.

## **Material e Métodos**

### ***1. Obtenção das amostras***

Amostra fúngica foi obtida a partir de cultivos, por 15 a 20 dias, a 25°C, de linhagem de *L. gongylophorus* em tampão citrato-fosfato 0,075 M pH 5,0, contendo 0,67 g.100mL<sup>-1</sup> de Yeast Nitrogen Base (Difco cód. 100690), 0,25 g.100mL<sup>-1</sup> de amido (Sigma cód. S 9765) e 0,25 g.100mL<sup>-1</sup> de maltose (Sigma cód. M 9171). O meio de cultivo contendo as enzimas secretadas foi filtrado em membrana 0,45  $\mu$ m, dialisado e liofilizado, sendo esta a amostra bruta utilizada para o início do processo de purificação.

Amostras do intestino das formigas foram obtidas a partir da coleta de material fecal de operárias mantidas em ninho de laboratório. Para isto, seu abdome foi comprimido com o auxílio de uma pinça e o fluido expelido foi coletado com pipeta automática e depositado em tubo de microensaio mantido em gelo.

## 2. Cromatografias

Para a purificação da maltase e  $\alpha$ -amilase foram utilizadas cromatografias de troca iônica, interação hidrofóbica e gel filtração. Todas as etapas cromatográficas foram realizadas em Aparelho  $\dot{A}KTA_{FPLC}$  (Amersham Biosciences).

### 2.1. Cromatografia de troca iônica (DEAE Sepharose)

Foi utilizada coluna cromatográfica modelo C 16/20 (Amersham Biosciences cód. 19-5101-01) com volume interno de 40 mL e empacotada no laboratório com 36 mL de resina DEAE Sepharose (Amersham Biosciences cód. 17-0709-10), previamente deaerada. A mesma foi mantida a 8° C e equilibrada com tampão fosfato 20 mM pH 8,0, num fluxo de 2 mL.minuto<sup>-1</sup>. A amostra bruta foi aplicada na coluna e a eluição das proteínas foi feita em passos, adicionando-se NaCl ao tampão de equilíbrio nas concentrações de 0,3; 0,5 e 1,0 M (para amostra fúngica) ou 0,1; 0,3 e 1,0 M (para amostra do fluido fecal das operárias).

Após a cromatografia em coluna de troca iônica, as frações protéicas contendo atividades de maltase ou  $\alpha$ -amilase foram acrescidas de sulfato de amônio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 1,3 M, e aplicadas em coluna de interação hidrofóbica.

### 2.2. Cromatografia de interação hidrofóbica (Butyl Sepharose)

#### 2.2.1. Amostra fúngica

Utilizou-se coluna pré-empacotada Butyl Sepharose (Amersham Biosciences cód. 17-5096-01), com volume interno de 20 mL. A mesma foi equilibrada, num fluxo de 2 mL.minuto<sup>-1</sup>, com sulfato de amônio 1,3 M dissolvido em tampão fosfato 20 mM pH 8,0. À esta coluna foram aplicadas frações reunidas de amostras protéicas provindas de troca iônica e contendo atividades de maltase ou  $\alpha$ -amilase. A eluição das proteínas foi realizada em passos com soluções de 1,3, 0,65 e 0,0 M de sulfato de amônio e as frações com atividade de maltase seguiram para cromatografia de gel filtração e com atividade de  $\alpha$ -amilase seguiram para troca iônica em resina Q Sepharose.

#### 2.2.2. Fluido fecal

Utilizou-se coluna pré-empacotada tipo *Hi-Trap* Butyl Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences cód. 17-5096-01), pré-empacotada, com volume interno de 1,0 mL. A mesma foi equilibrada, num fluxo de 1 mL.minuto<sup>-1</sup>, com sulfato de amônio 1,3 M dissolvido em tampão fosfato 20 mM pH 8,0. À esta coluna foram aplicadas frações reunidas de amostras protéicas provindas de troca iônica e contendo atividades de maltase ou  $\alpha$ -amilase. A eluição das proteínas foi realizada em passos com soluções de 1,3 e 0,0 M de sulfato de amônio. Frações contendo maltase foram reunidas e seguiram para gel filtração, e com  $\alpha$ -amilase para a troca iônica em resina Q Sepharose.

### 2.3. Cromatografia de troca iônica (Q Sepharose)

Foi utilizada coluna cromatográfica pré-empacotada tipo *Hi-trap*, volume interno de 1,0 mL, com a resina Q Sepharose (Amersham Biosciences cód. 17-6002-33). A mesma foi mantida a 8° C e



equilibrada com tampão fosfato 20 mM pH 8,0, num fluxo de 1 mL.minuto<sup>-1</sup>. Amostras do cultivo do fungo ou fluido fecal provinda da interação hidrofóbica e contendo atividade de  $\alpha$ -amilase foram aplicadas na coluna e a eluição das proteínas foi feita em passos, adicionando-se NaCl ao tampão de equilíbrio nas concentrações de 0,5 e 1,0 M. O cromatografado contendo atividade de  $\alpha$ -amilase seguiu para a cromatografia de exclusão molecular.

#### *2.4. Cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100)*

Para esta cromatografia foi utilizada coluna pré-empacotada Sephacryl S-100 (Amersham Biosciences cód. 17-1165-01) com dimensões de 1,6 cm de diâmetro, 60 cm de altura e volume interno total de 120 mL. A coluna foi mantida a 8° C e equilibrada com tampão fosfato 20 mM, a 1 mL.minuto<sup>-1</sup>.

As amostras providas da interação hidrofóbica (contendo atividade de maltase) ou da troca iônica Q Sepharose (contendo atividade de  $\alpha$ -amilase) foram dialisadas, concentradas em liofilizador, resuspensas em 2 mL do tampão de equilíbrio da gel filtração e aplicadas à coluna. Frações de 2 mL foram coletadas num fluxo isocrático de tampão (1,5 volume de coluna).

### **3. Parâmetros avaliados nas etapas cromatográficas**

#### *3.1. Atividades de $\alpha$ -Amilase e Maltase*

Para a determinação de  $\alpha$ -amilase, 100  $\mu$ L de cada amostra foram misturados a 100  $\mu$ L de solução de amido (10 mg.mL<sup>-1</sup>) diluído em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 5,0, contendo 2 mM de cloreto de cálcio, seguindo para a incubação, a 30°C. Nos tempos zero e após 60 minutos de incubação foram adicionados à reação 500  $\mu$ L de reagente de iodo [preparado com 0,25 g.100 mL<sup>-1</sup> de Iodo (Merck cód. 4761) e 0,16 g.100 mL<sup>-1</sup> de Iodeto de Potássio (Mallinckrodt cód. 1127)], seguindo para leitura em espectrofotômetro a 620 nm (Bernfeld, 1955). Os valores de densidade óptica obtidos foram utilizados para a determinação das atividades enzimáticas, utilizando-se curva padrão de amido. Uma unidade de atividade da enzima foi definida como a diminuição de 1  $\mu$ g na massa de amido solúvel colocada na reação, por minuto, por mL de meio de cultivo ou de amostra cromatografada.

Para maltase foram utilizados 100  $\mu$ L de amostra e 100  $\mu$ L de maltose (20 mg.mL<sup>-1</sup>/ 60 mM) dissolvida em tampão citrato-fosfato pH 5,0 contendo cloreto de cálcio 2 mM. A mistura substrato-amostra foi mantida a 30° C e, nos mesmos tempos descritos para atividade de  $\alpha$ -amilase, os tubos contendo a mistura reacional foram mantidos em fervura por 3 minutos (para parar a reação), sendo em seguida acrescidos de 300  $\mu$ L de água e 500  $\mu$ L do reagente de glicose oxidase (Labtest, cód. 34-E). Após banho-maria a 37°C por 15 minutos, as amostras seguiram para leitura em espectrofotômetro a 505 nm. Os valores de densidade óptica obtidos foram utilizados para a determinação da atividade de maltase, utilizando-se o fator obtido na curva padrão de glicose. Considerou-se 1 unidade de atividade de maltase a produção de 1  $\mu$ mol de glicose por minuto, por mL de meio de cultivo ou de amostra cromatografada.

### 3.2. Determinação de proteínas totais

Foram adicionados 100  $\mu$ L de cada amostra a 100  $\mu$ L do reagente de Bradford (Bradford, 1976), seguindo a mistura para leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Para determinar a massa total de proteínas foi utilizada curva-padrão de ovoalbumina.

### 3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A preparação do gel de poliacrilamida na concentração final de 15% (v/v), as condições de preparação da amostra e de realização da corrida foram as mesmas estabelecidas por Laemmli (1970). Após a corrida, o gel foi submetido à coloração de prata (Heukeshoven and Dernick, 1985).

Todos os reagentes para realização da eletroforese foram originários da Amersham Biosciences, incluindo padrão de peso molecular (cod. 17-0446-01): fosforilase b (97 KiloDaltons-kDa); soroalbumina bovina (66 kDa); ovalbumina (45 kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,1 kDa).

## 4. Caracterização das proteínas purificadas

Maltase e  $\alpha$ -amilase purificadas do fungo simbionte ou do intestino de operárias de *A. sexdens* foram caracterizadas quanto à influência da temperatura e do pH na sua atividade e estabilidade, influência do cloreto de cálcio sobre atividade de  $\alpha$ -amilase, determinação das constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_m$ , e determinação do peso molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida. A atuação sinérgica entre as maltases purificadas de ambos os organismos também foi determinada.

Todos os ensaios enzimáticos das etapas de caracterização foram realizados em triplicata e a determinação das atividades enzimáticas foi feita como descrito no item 3.1, seguindo-se as mesmas proporções, modificando-se apenas o volume final de reação para 100  $\mu$ L.

### 4.1. Influência da temperatura

Na determinação das atividades enzimáticas em diferentes temperaturas, maltases originárias do fungo ou da formiga foram mantidas de 0 a 40 minutos nas temperaturas de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60°C. Para  $\alpha$ -amilase foram utilizadas as temperaturas 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 e 55°C. Os resultados obtidos foram analisados em dois tipos de gráficos: um plotando-se os valores em  $V_m$  versus as temperaturas utilizadas (em graus *Celcius*), e um outro gráfico denominado *Plote de Arrhenius*, no qual plotam-se o inverso de  $V_m$  versus o inverso das temperaturas (em *Kelvin*). Neste último tipo de gráfico é possível linearizar a curva de temperatura, podendo-se observar se há mudança na energia de ativação da enzima durante o experimento, bem como o ponto preciso em que a enzima desnatura com a temperatura. Uma queda brusca na reta indica desnaturação, e uma mudança leve de inclinação na reta pode indicar mudança conformacional da enzima durante o experimento, mas não desnaturação.

Para verificar a estabilidade das enzimas nas diferentes temperaturas, as enzimas (sem substrato) foram incubadas por 1 hora nas temperaturas citadas acima, tendo em seguida suas atividades residuais determinadas a 30°C.

Alfa-amilases de ambas as origens também foram avaliadas quanto a inativação térmica. Para tanto, ambas as enzimas, separadamente, foram mantidas, a 40°C, por 5, 10, 15, 20 e 30 minutos, tendo em seguida suas atividades residuais determinadas, a 30°C. O Logaritmo destas atividades residuais versus o tempo de incubação a 40°C foram plotados graficamente, obtendo-se retas, que foram utilizadas na comparação das enzimas.

Com os ensaios de temperatura foi também possível determinar a energia de ativação ( $E_a$ ) e o  $Q_{10}$  [número de vezes em que a temperatura aumenta, a cada 10° C] (Copeland, 1996). Quanto maior o valor de  $Q_{10}$ , maior é a energia de ativação da enzima.

#### 4.2. Influência do pH

A influência do pH na *atividade* das enzimas foi determinada incubando-se a amostra, a 30° C, em tampão citrato-fosfato 75 mM nos pHs 4, 5, 6, 7 e 8. E para avaliar a influência do pH na *estabilidade* das enzimas, as mesmas foram mantidas por 1 hora, a 8° C, dentro de tampão citrato-fosfato com diferentes valores de pH (os mesmos citados anteriormente). Em seguida, suas atividades foram determinadas, a 30° C, nos valores de pH de melhor atividade para cada enzima: pH 5,0 para  $\alpha$ -amilase (de ambas as origens) e maltase fúngica; e pH 6,0 para maltase presente no fluido fecal.

#### 4.3. Influência do Cloreto

Atividade de  $\alpha$ -amilase foi determinada incubando-se a enzima em diferentes concentrações de  $CaCl_2$  (0, 2, 4, 6, 8 ou 10 mM). Os valores das diferenças de atividades com e sem  $CaCl_2$  foram plotados (em recíprocos) contra os recíprocos das concentrações de cloreto, calculando-se a constante de dissociação do cloreto como se este fosse  $K_m$ .

#### 4.4. Determinação do $K_m$ e $V_m$

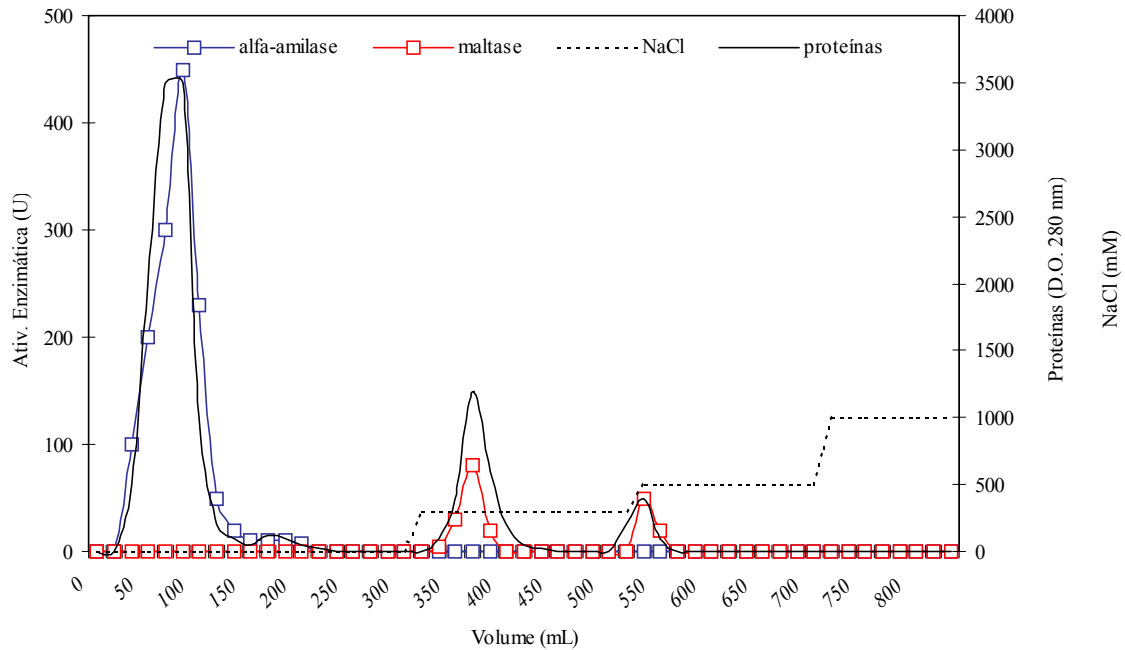
Para a determinação das constantes cinéticas de Michaelis-Menten,  $V_m$  (velocidade máxima da reação) e  $K_m$  (concentração de substrato na qual a velocidade de reação é metade da  $V_m$ ), as enzimas foram incubadas em diferentes concentrações de substrato. Para maltase foram utilizadas concentrações de 0,2 a 10 mM de maltose (Sigma, cód. M-9171) e para  $\alpha$ -amilase, de 1 a 10 mg/mL de amido solúvel (Sigma, cód. S-9765). Os valores das constantes foram obtidos a partir do plote linear de Lineweaver-Burk.

## **Resultados e Discussão**

### ***1. Purificação da maltase e $\alpha$ -amilase fúngicas***

Maltase e  $\alpha$ -amilase fúngicas foram purificadas utilizando-se cromatografias de troca iônica, interação hidrofóbica e exclusão molecular. A primeira cromatografia utilizada foi a de troca iônica, a

partir da qual foram selecionadas amostras contendo as atividades de  $\alpha$ -amilase e maltase. Na figura 1 é apresentado o cromatograma obtido após a passagem da amostra bruta contendo as enzimas fúngicas na coluna de troca iônica. Alfa-amilase não interagiu com a resina e foi detectada durante a passagem do tampão de equilíbrio, e a maltase foi eluída com a passagem de 0,3 e 0,5 M de Cloreto de Sódio (NaCl).

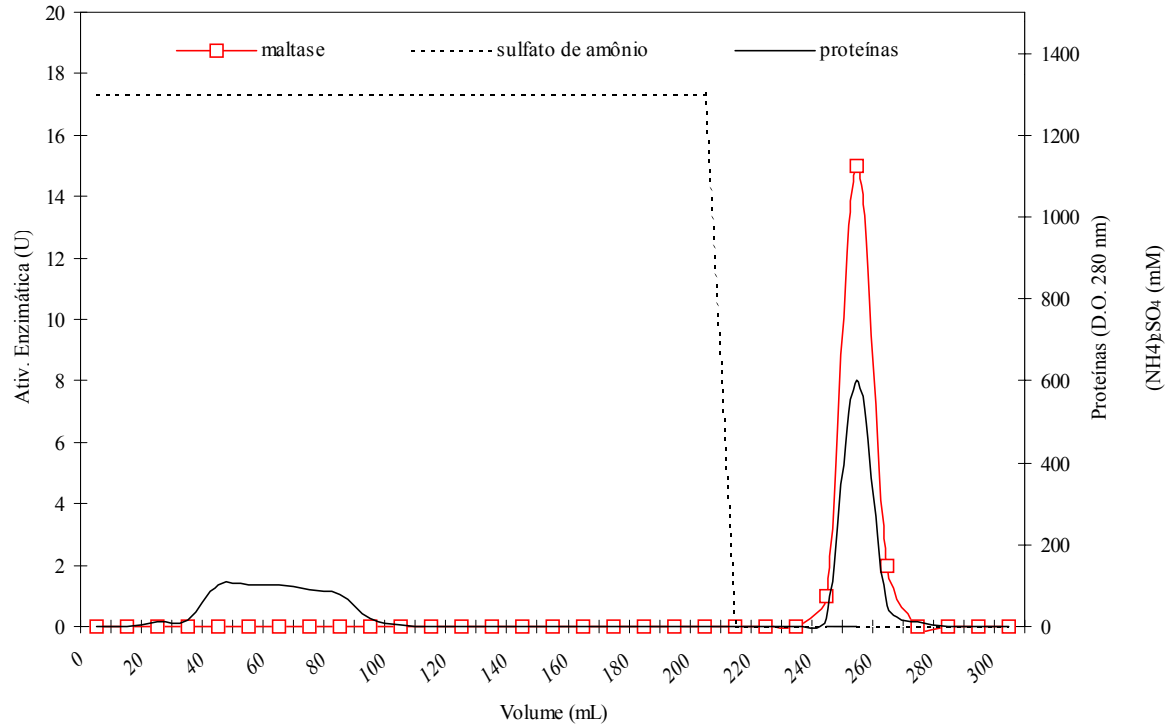


**Figura 1.** Cromatograma obtido a partir de cromatografia de troca iônica *DEAE Sepharose* após a passagem de amostra bruta do meio de cultivo do fungo simbiote isolado em laboratório. Alfa-amilase foi detectada durante a passagem do tampão de equilíbrio, e maltase durante a passagem de 0,3 e 0,5 M de NaCl.

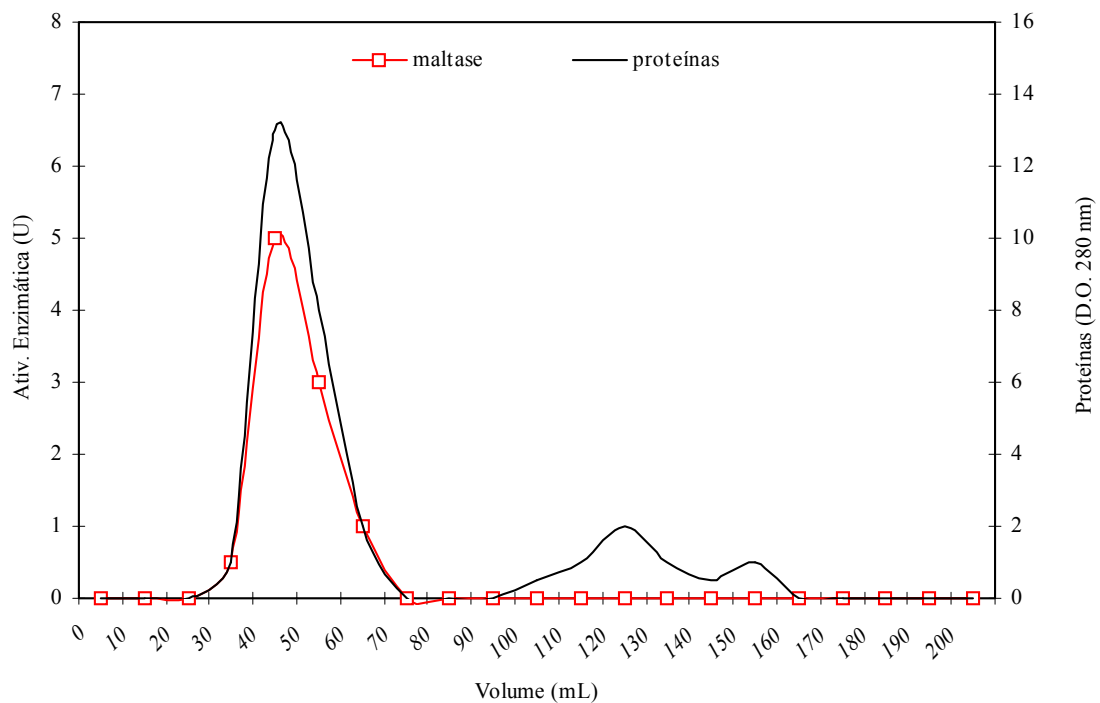
Para a purificação da maltase, amostras correspondentes ao pico eluído em NaCl 0,3 M seguiram para a coluna de interação hidrofóbica. O cromatograma obtido está apresentado na figura 2, com atividade de maltase detectada na amostra eluída após a passagem de 0,0 M de sulfato de amônio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ .

As amostras correspondentes ao pico contendo atividade de maltase teve suas frações reunidas, dialisadas, concentradas (por liofilização a  $-40^\circ\text{C}$ ), resuspensas em tampão fosfato 20 mM pH 8,0 e aplicadas em coluna de exclusão molecular. O perfil cromatográfico obtido está apresentado na figura 3. Atividade de maltase foi detectada no primeiro pico eluído.

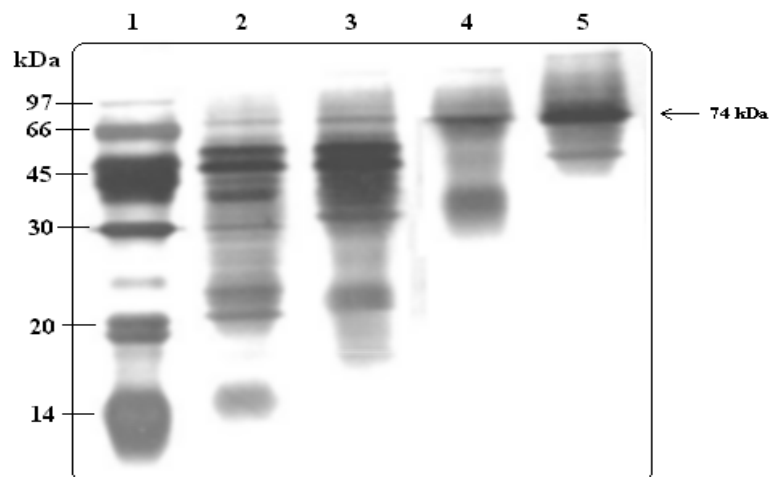
O perfil eletroforético das amostras contendo atividade de maltase em todos os passos cromatográficos é apresentado na figura 4. A proteína com banda única (apresentada na amostra 5, figura 4), correspondendo à maltase, apresentou peso molecular aproximado de 74 kDa. Na tabela 1 são mostrados os resultados da purificação obtidos em cada etapa cromatográfica. Foram recuperados 9 % da quantidade inicial da enzima ativa, que foi enriquecida cerca de 21 vezes em relação ao extrato bruto.



**Figura 2.** Cromatograma obtido em coluna de interação hidrofóbica *Butyl Sepharose* após passagem de amostra fúngica contendo maltase provinda de troca iônica. Atividade de maltase foi detectada após a passagem de 0,0 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .



**Figura 3.** Cromatograma obtido a partir de exclusão molecular em coluna *Sephacryl S-100*, após passagem do eluído em coluna de interação hidrofóbica, com maltase detectada no primeiro pico. A amostra aplicada à coluna foi originária de uma interação hidrofóbica, eluída em tampão fosfato 20 mM.



**Figura 4.** Perfil eletroforético (em SDS-PAGE) de amostras de meio de cultivo fúngico contendo atividade de maltase e cromatografadas em colunas de troca iônica (amostra 3), interação hidrofóbica (amostra 4) e em exclusão molecular (amostra 5). Amostra 1 corresponde ao padrão de peso molecular e amostra 2 ao extrato bruto inicial. A proteína com banda única (apresentada na amostra 5) apresentou peso molecular aproximado de 74 kDa. Em cada raia foram aplicados 10  $\mu$ g de proteínas totais (método de Bradford).

**Tabela 1.** Tabela de purificação da maltase produzida pelo fungo *Leucoagaricus gongylophorus*.

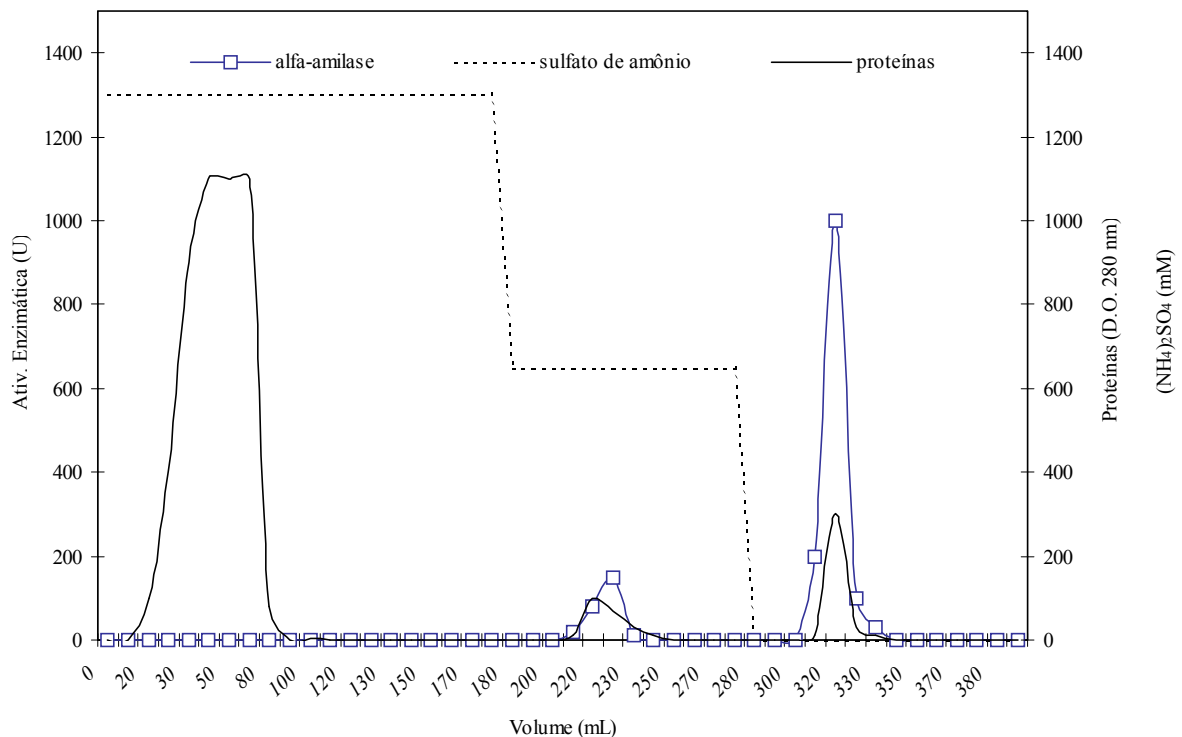
	<i>Atividade (U)</i>	<i>Volume da Amostra (mL)</i>	<i>Atividade Total (U.volume total<sup>-1</sup>)</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Proteínas Totais (mg)</i>	<i>Atividade Específica (U.mg proteína<sup>-1</sup>)</i>	<i>Fator de Purificação (enriquecimento)</i>
<b>Extrato Bruto</b>	0,095	50	4,8	100	280	0,017	1,0
<b>Troca Iônica</b>	0,064	30	1,9	40	42,3	0,047	2,8
<b>Interação Hidrofóbica</b>	0,033	50	1,7	35	22,1	0,075	4,4
<b>Exclusão Molecular</b>	0,029	15	0,5	9	1,25	0,352	21,0

Para a purificação da  $\alpha$ -amilase fúngica, a amostra provinda da troca iônica apresentada na figura 1, durante a passagem do tampão de equilíbrio, seguiu para a coluna de interação hidrofóbica, na qual se observou a atividade de  $\alpha$ -amilase durante a passagem de 0,65 e 0,0 M de sulfato de amônio na coluna (figura 5).

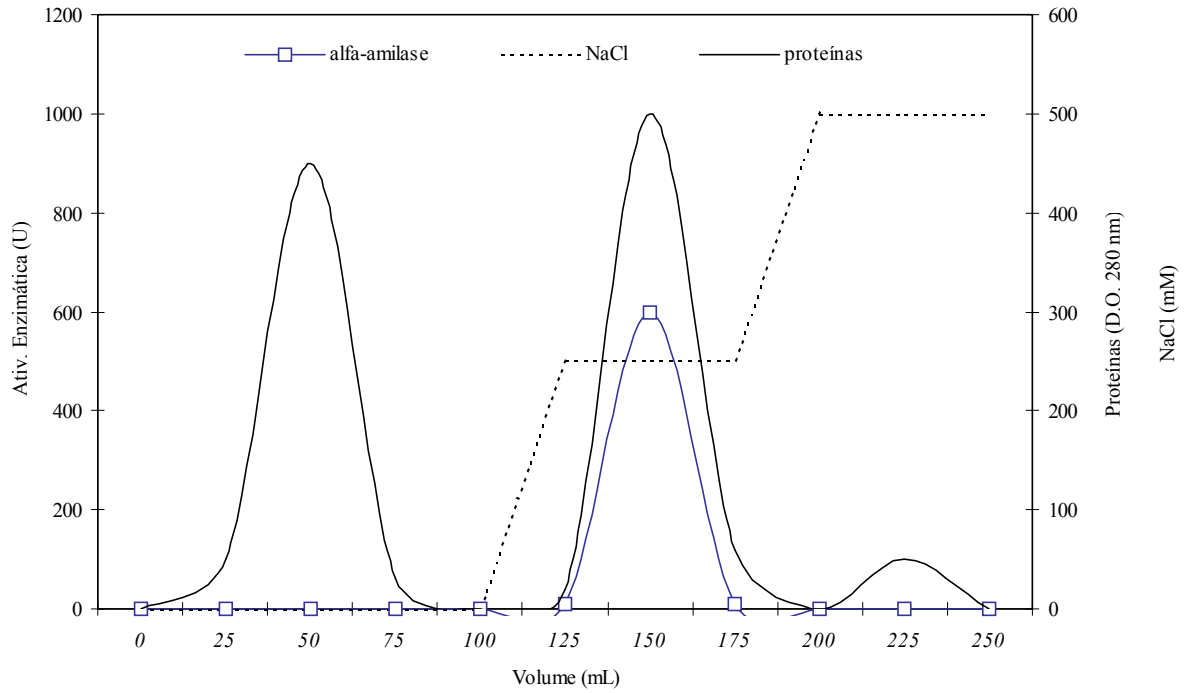
A partir da interação hidrofóbica, as frações contendo atividade de  $\alpha$ -amilase foram reunidas e seguiram para a coluna de troca iônica Q Sepharose. O perfil cromatográfico obtido (figura 6) mostra que a  $\alpha$ -amilase interagiu com a resina, sendo eluída após a passagem de NaCl 0,5 M.

Após a troca iônica Q Sepharose, a amostra contendo  $\alpha$ -amilase seguiu para cromatografia de exclusão molecular. Na figura 7 observa-se o perfil cromatográfico obtido a partir da passagem desta amostra na coluna.

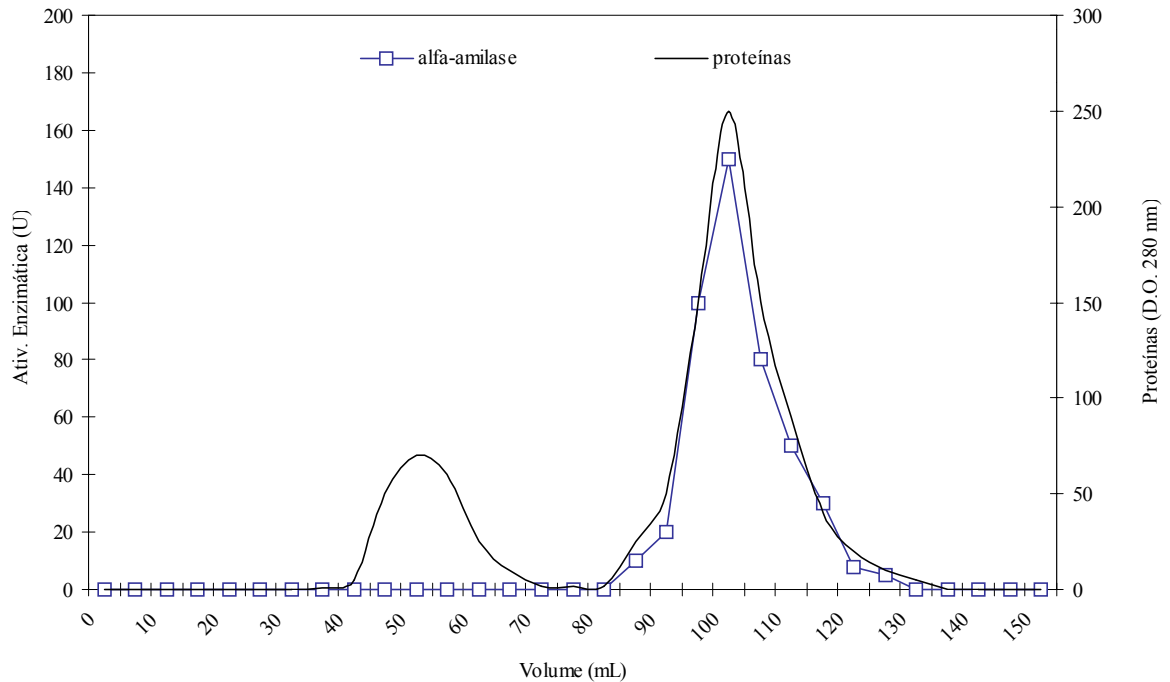
O perfil eletroforético de todas as etapas cromatográficas utilizadas na separação da  $\alpha$ -amilase fúngica está apresentado na figura 8. A amostra contendo atividade de  $\alpha$ -amilase aparece aparentemente pura no gel e apresentou peso molecular aproximado de 29 kDa. Na tabela 2 são mostrados os resultados obtidos em cada etapa de purificação, sendo que ao final foram obtidos 9,6 % da quantidade inicial da enzima, com enriquecimento aproximado de 13 vezes.



**Figura 5.** Cromatograma obtido em coluna de interação hidrofóbica *Butyl Sepharose* na purificação da  $\alpha$ -amilase fúngica. A enzima aparece nos picos eluídos nas concentrações molares de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,65 e 0,0 M.

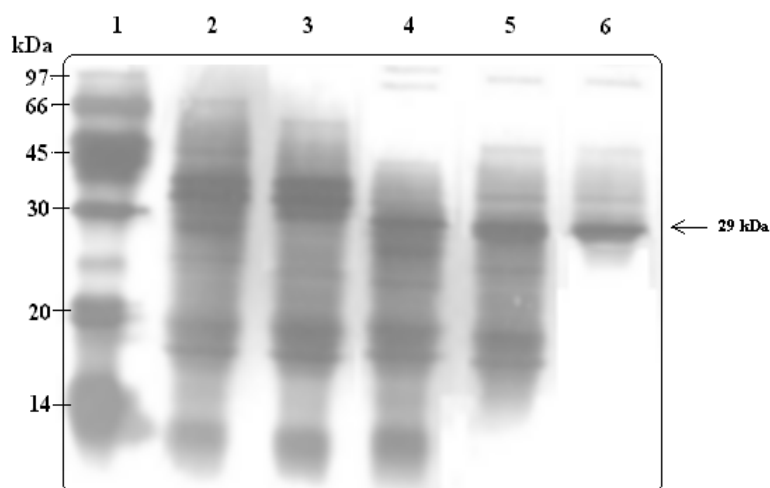


**Figura 6.** Cromatograma obtido em coluna de troca iônica Q Sepharose durante purificação de  $\alpha$ -amilase fúngica. A enzima foi eluída após passagem de NaCl 0,5 M.



**Figura 7.** Perfil cromatográfico obtido a partir de exclusão molecular em coluna *Sephacryl S-100*. Como amostra inicial foram aplicadas as frações contendo atividade de  $\alpha$ -amilase fúngica originárias da coluna de troca iônica Q Sepharose (figura 6). A enzima foi eluída no segundo pico da cromatografia.





**Figura 8.** Perfil eletroforético (em SDS-PAGE) das amostras obtidas em cada etapa de purificação da  $\alpha$ -amilase fúngica. Amostra 1 (padrão de peso molecular); amostra 2 (extrato bruto); amostras 3, 4, 5 e 6 (frações com atividade de  $\alpha$ -amilase obtidas após troca iônica DEAE Sepharose, interação hidrofóbica, troca iônica Q Sepharose e exclusão molecular, respectivamente). A proteína pura que aparece na amostra 6 representa o perfil das frações obtidas entre o volume de 85 a 95 mL do cromatograma apresentado na figura 7. Esta apresentou peso molecular aproximado de 29 kDa. Em cada raia foram aplicados 10  $\mu$ g de proteínas totais (método de Bradford).

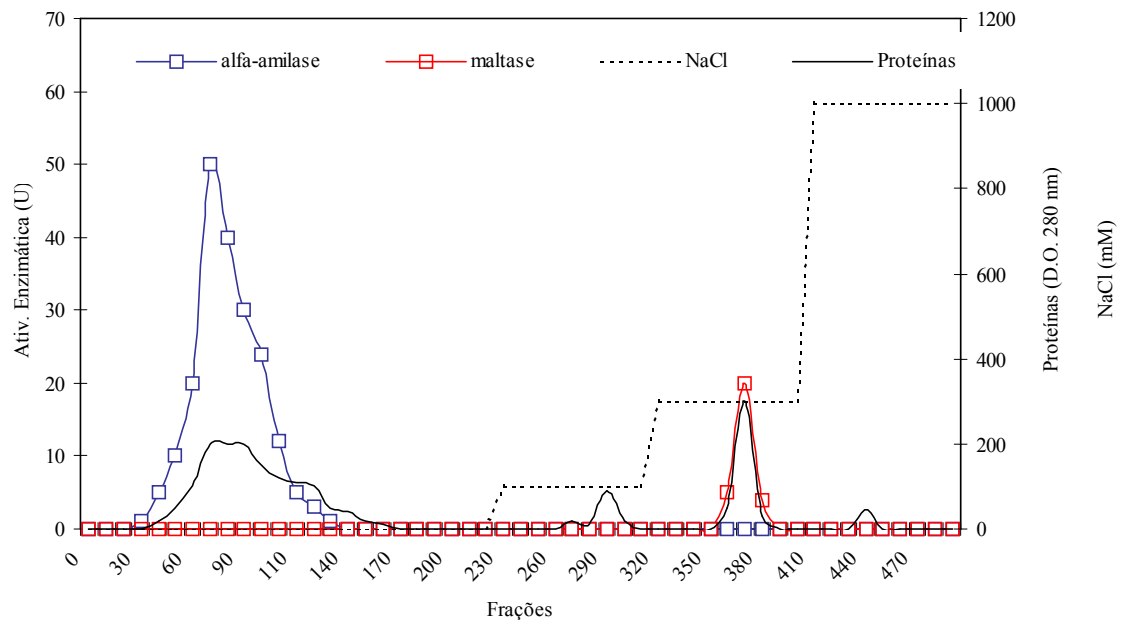
**Tabela 2.** Tabela de purificação da  $\alpha$ -amilase produzida pelo fungo *Leucoagaricus gongylophorus*.

	<i>Atividade (U)</i>	<i>Volume da Amostra (mL)</i>	<i>Atividade Total (U.volume total<sup>-1</sup>)</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Proteínas Totais (mg)</i>	<i>Atividade Específica (U.mg proteína<sup>-1</sup>)</i>	<i>Fator de Purificação (enriquecimento)</i>
<i>Extrato Bruto</i>	75,5	50	3.775	100	280	13,5	1,0
<i>Troca Iônica DEAE Sepharose</i>	65,0	50	3.250	86	180	18,1	1,3
<i>Interação Hidrofóbica</i>	25,0	50	1.250	33	22,1	56,8	4,2
<i>Troca Iônica Q Sepharose</i>	24,1	20	482	13	8,3	60,3	4,5
<i>Exclusão Molecular</i>	9,1	40	364	9,6	2,1	173	12,8

## 2. Purificação da maltase e $\alpha$ -amilase do intestino das operárias de *A. sexdens*

As sacaridasas maltase e  $\alpha$ -amilase presentes no fluido fecal das formigas foram purificadas utilizando-se cromatografias de troca iônica, interação hidrofóbica e exclusão molecular. A primeira cromatografia utilizada foi a de troca iônica, a partir da qual foram selecionadas amostras contendo as

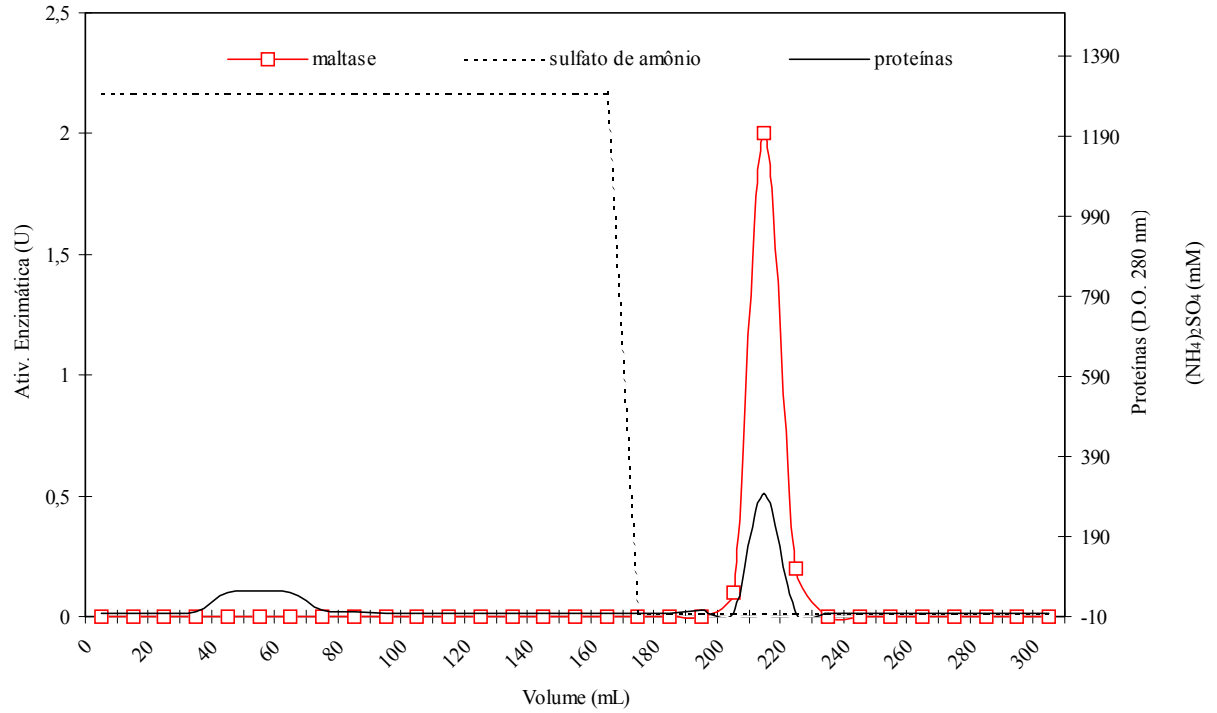
atividades de  $\alpha$ -amilase ou maltase. Na figura 1 é apresentado o cromatograma obtido nesta coluna. Como ocorreu com o fungo, a  $\alpha$ -amilase não interagiu com a resina e foi detectada durante a passagem do tampão de equilíbrio, e a maltase foi eluída com a passagem de 0,3 M de NaCl na coluna.



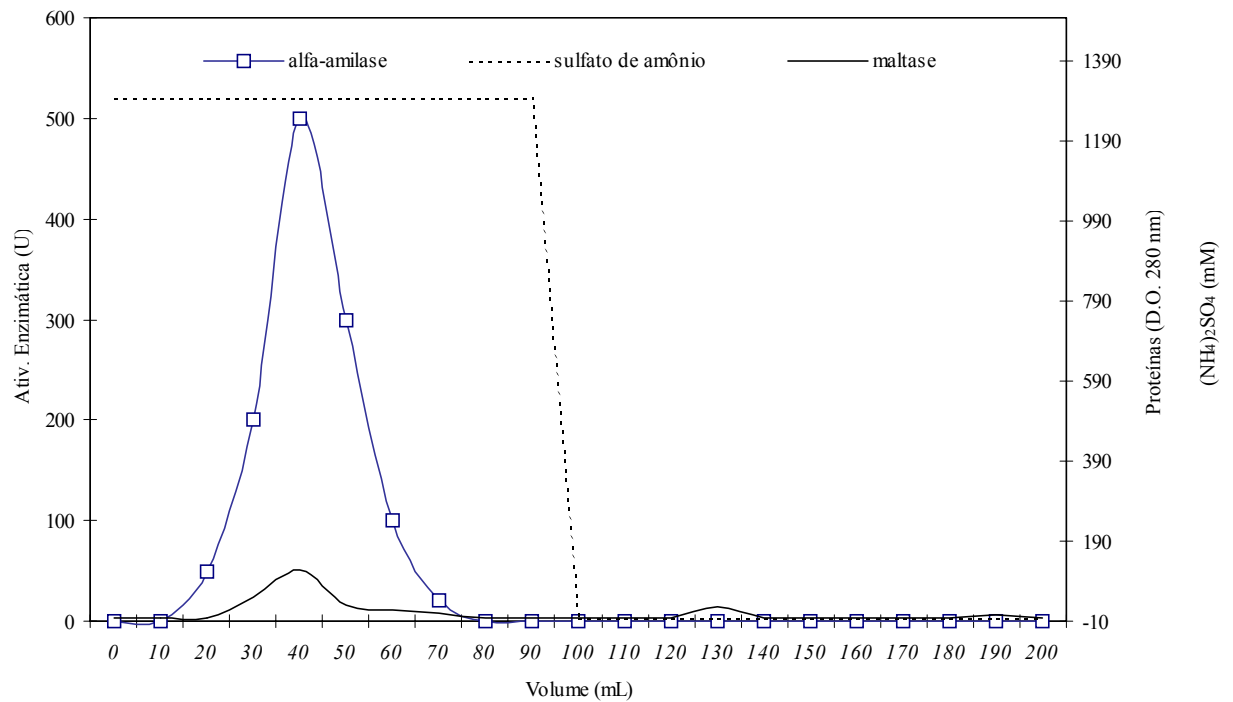
**Figura 9.** Cromatograma obtido a partir de cromatografia de troca iônica após a passagem do fluido fecal de operárias de *A. sexdens*. Alfa-amilase foi detectada durante a passagem do tampão de equilíbrio, e maltase durante a passagem de 0,3 M de NaCl.

A partir da cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose foram formadas 2 diferentes amostras, contendo atividades de maltase ou  $\alpha$ -amilase. Estas seguiram então, separadamente, para cromatografia de interação hidrofóbica. Maltase e  $\alpha$ -amilase tiveram comportamentos distintos nesta cromatografia. Maltase interagiu com a resina e foi eluída após a passagem de sulfato de amônio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  0,0 M (figura 10), enquanto a  $\alpha$ -amilase foi detectada durante a passagem do tampão de equilíbrio da resina  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  1,3 M (figura 11).

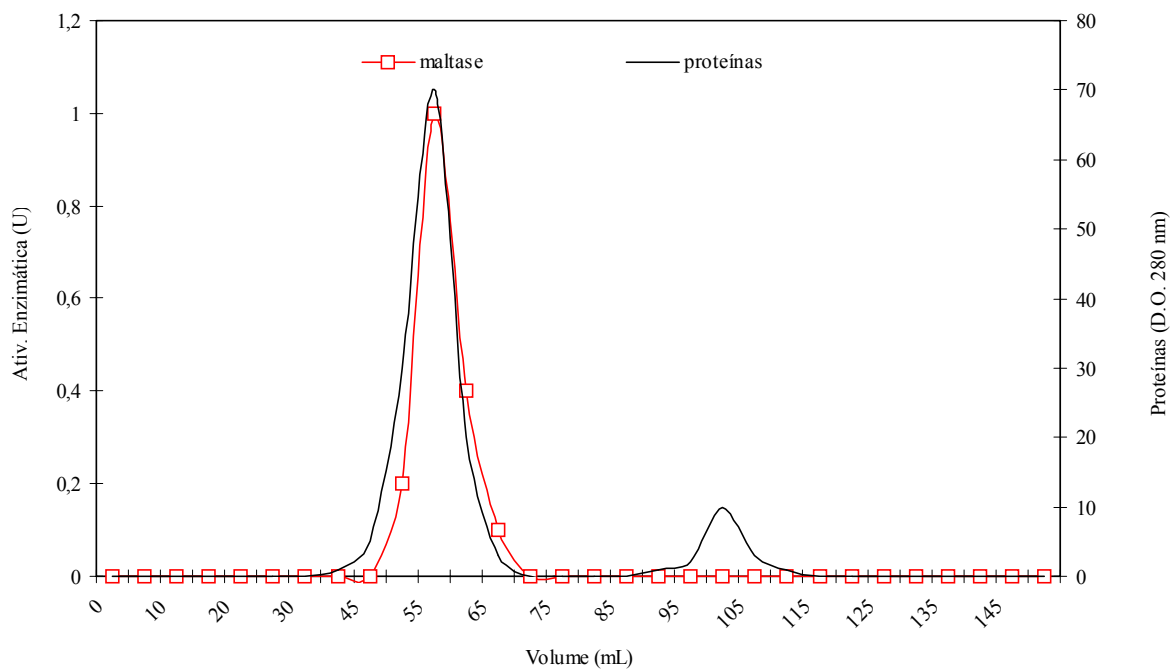
As amostras contendo atividades de maltase ou  $\alpha$ -amilase tiveram suas frações reunidas, dialisadas e concentradas, seguindo para passos cromatográficos subsequentes. Para amostra contendo maltase, foi utilizada coluna de exclusão molecular (figura 12). Apenas frações iniciais do pico contendo atividade de maltase apresentaram a proteína pura (figura 13 – amostra 5), com peso molecular aproximado de 63 kDa, determinado em SDS-PAGE. Na tabela 3 são mostrados os resultados da purificação obtidos em cada etapa cromatográfica. Ao final do processo, 0,9 mg de maltase purificada foi obtida, 12 % de sua quantidade inicial, e enriquecida 9 vezes.



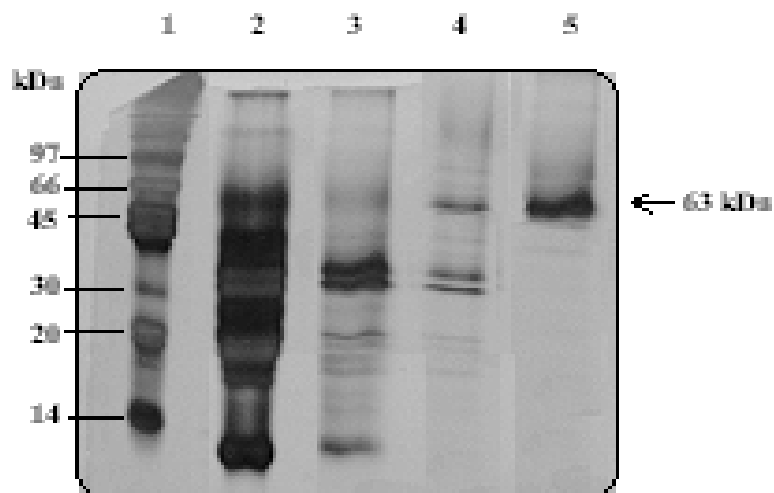
**Figura 10.** Cromatograma obtido em coluna de interação hidrofóbica *Butyl Sepharose* a partir da passagem de amostra do fluido fecal de *A. sexdens*. Atividade de maltase foi detectada após a passagem de 0,0 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na coluna.



**Figura 11.** Cromatograma obtido em coluna de interação hidrofóbica *Butyl Sepharose* a partir da passagem de amostra do fluido fecal de *A. sexdens*. Atividade de  $\alpha$ -amilase foi detectada durante a passagem do tampão de equilíbrio da resina,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,3 M.



**Figura 12.** Exclusão molecular em coluna *Sephacryl S-100* com amostra do fluido fecal de operárias de *A. sexdens* contendo atividade de maltase e provinda de cromatografia de interação hidrofóbica. Atividade de maltase foi eluída no primeiro pico.

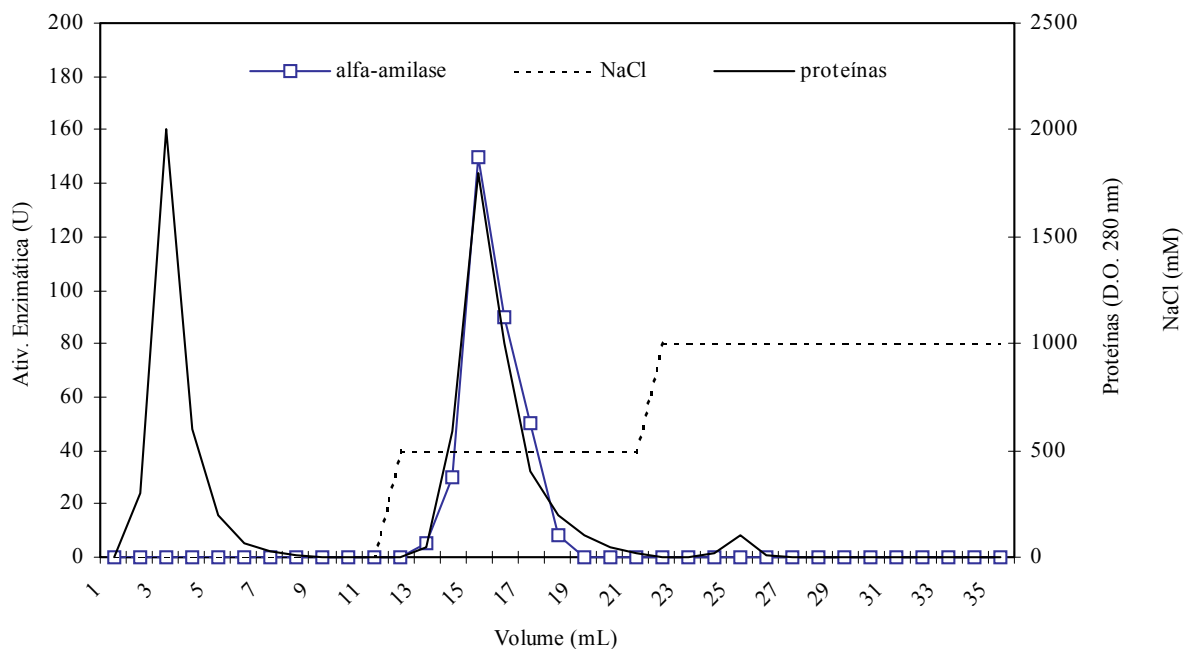


**Figura 13.** Perfil eletroforético (em SDS-PAGE) de amostra do fluido fecal de operárias de *A. sexdens* contendo atividade de maltase e cromatografadas em diferentes resinas. Amostras: 1 (padrão de peso molecular), 2 (amostra bruta), 3 (após troca iônica), 4 (após interação hidrofóbica), 5 (após exclusão molecular). A proteína com banda única (apresentada na amostra 5) apresentou peso molecular aproximado de 63 kDa e representa as frações obtidas entre os volumes de 45 a 55 mL do cromatograma apresentado na figura 12. Em cada raia foram aplicados 10  $\mu$ g de proteínas totais (método de Bradford).

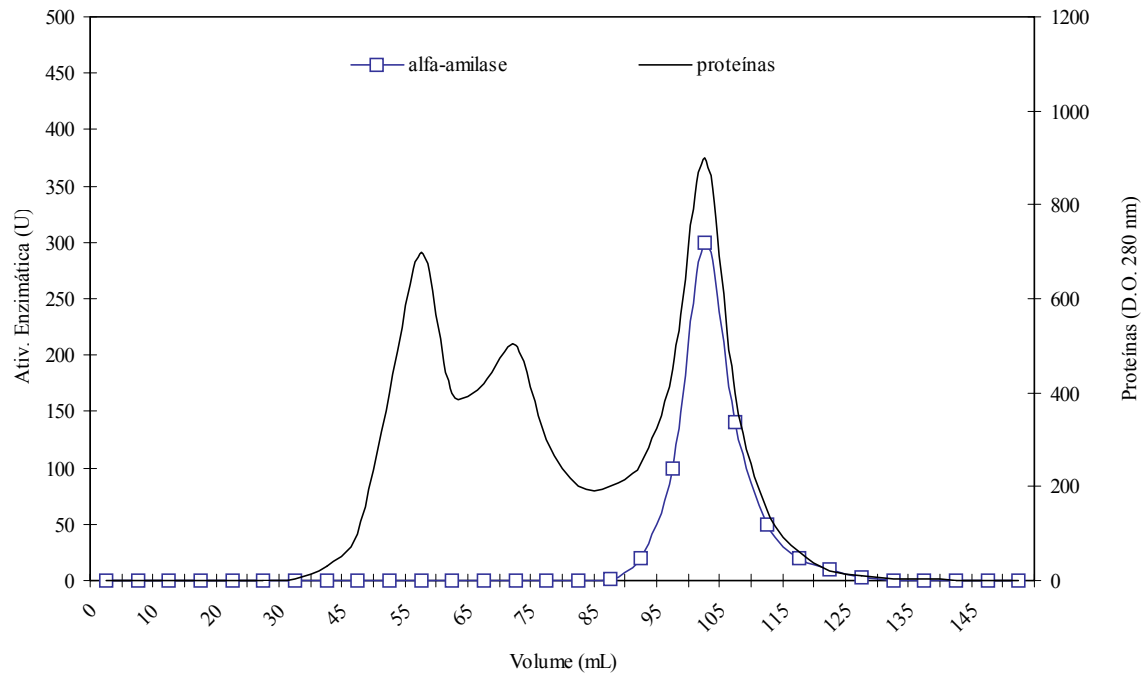
**Tabela 3.** Tabela de purificação da maltase presente no fluido fecal de operárias de *A. sexdens*.

	Atividade (U)	Volume da Amostra (mL)	Atividade Total (U.volume total <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	Proteínas Totais (mg)	Atividade Específica (U.mg proteína <sup>-1</sup> )	Fator de Purificação (enriquecimento)
<i>Extrato Bruto</i>	3,5	2	7,0	100	72,0	0,1	1,0
<i>Troca Iônica</i>	0,08	30	2,8	41	22,2	0,12	1,3
<i>Interação Hidrofóbica</i>	0,06	30	1,8	24	8,1	0,2	2,0
<i>Exclusão Molecular</i>	0,03	30	0,9	12	0,9	0,9	9,0

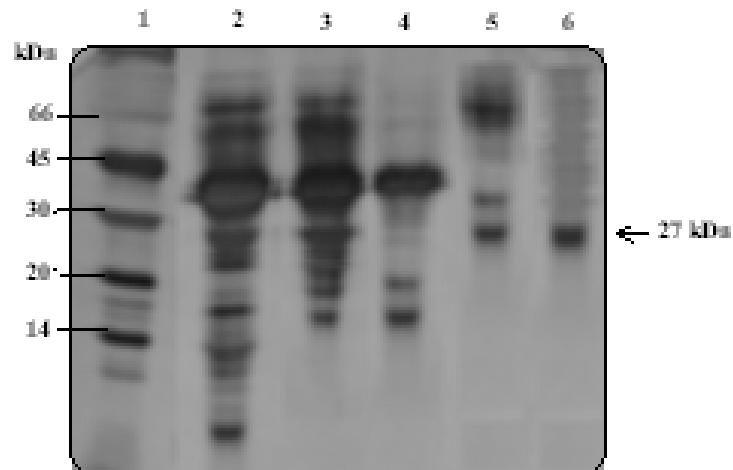
A amostra contendo atividade de  $\alpha$ -amilase que foi obtida da interação hidrofóbica (apresentada na figura 11) seguiu para a coluna de troca iônica Q Sepharose e depois para exclusão molecular. Na Q Sepharose a amostra interagiu com a resina e foi eluída após a passagem de NaCl 0,5 M (figura 14). Na cromatografia de gel filtração a proteína foi eluída em maior concentração aos 100 mL, após o início da cromatografia, porém apenas a região final do pico aparece purificada em gel de eletroforese (figura 15). O perfil eletroforético de todas as etapas cromatográficas está na figura 16 e os cálculos de purificação na tabela 4. Ao final do processo, 0,8 mg de proteína foi purificado, com enriquecimento de 14,4 vezes e recuperação de 16 % da quantidade inicial de  $\alpha$ -amilase presente no fluido fecal bruto.



**Figura 14.** Cromatograma obtido em coluna de troca iônica Q Sepharose após passagem de amostra de fluido fecal provinda de interação hidrofóbica. Alfa-amilase foi prioritariamente eluída após passagem de NaCl 0,5 M.



**Figura 15.** Exclusão molecular em coluna *Sephacryl S-100* com amostra do fluido fecal de operárias de *A. sexdens* contendo atividade de  $\alpha$ -amilase e provinda de cromatografia de troca iônica Q Sepharose. A enzima foi eluída dos 90 aos 130 mL.



**Figura 16.** Perfil eletroforético (em SDS-PAGE) de amostra do fluido fecal de operárias de *A. sexdens* contendo atividade de  $\alpha$ -amilase e cromatografadas em diferentes resinas. Amostras: 1 (padrão de peso molecular), 2 (amostra bruta), 3 (após troca iônica DEAE Sepharose), 4 (após interação hidrofóbica), 5 (após troca iônica Q Sepharose), 6 (após exclusão molecular). A proteína com banda única (apresentada na amostra 6) apresentou peso molecular aproximado de 27 kDa e representa o perfil protéico das amostras obtidas entre os volumes de 110 a 130 mL do cromatograma apresentado na figura 15.

**Tabela 4.** Tabela de purificação da  $\alpha$ -amilase presente no fluido fecal de operárias de *A. sexdens*.

	<i>Atividade (U)</i>	<i>Volume da Amostra (mL)</i>	<i>Atividade Total (U.volume total<sup>-1</sup>)</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Proteínas Totais (mg)</i>	<i>Atividade Específica (U.mg proteína<sup>-1</sup>)</i>	<i>Fator de Purificação (enriquecimento)</i>
<i>Extrato Bruto</i>	549	2	1.098	100	72	15,3	1,0
<i>Troca Iônica DEAE Sepharose</i>	28	35	980	89	31	31,6	2,1
<i>Interação Hidrofóbica</i>	73	10	730	67	14	51,4	3,4
<i>Troca Iônica Q Sepharose</i>	10,3	30	309	28	3,1	99,7	6,5
<i>Exclusão Molecular</i>	8,8	20	176	16	0,8	220,0	14,4

### **3. Caracterização das enzimas purificadas (de origem fúngica e presentes no intestino de operárias de *A. sexdens*)**

Maltase e  $\alpha$ -amilase purificadas do fungo simbiote ou de operárias de *A. sexdens* foram caracterizadas quanto à influência da temperatura e do pH na atividade e estabilidade, influência do cloreto de cálcio, determinação das constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_m$ , e determinação do peso molecular em SDS-PAGE. Os resultados obtidos são apresentados a seguir:

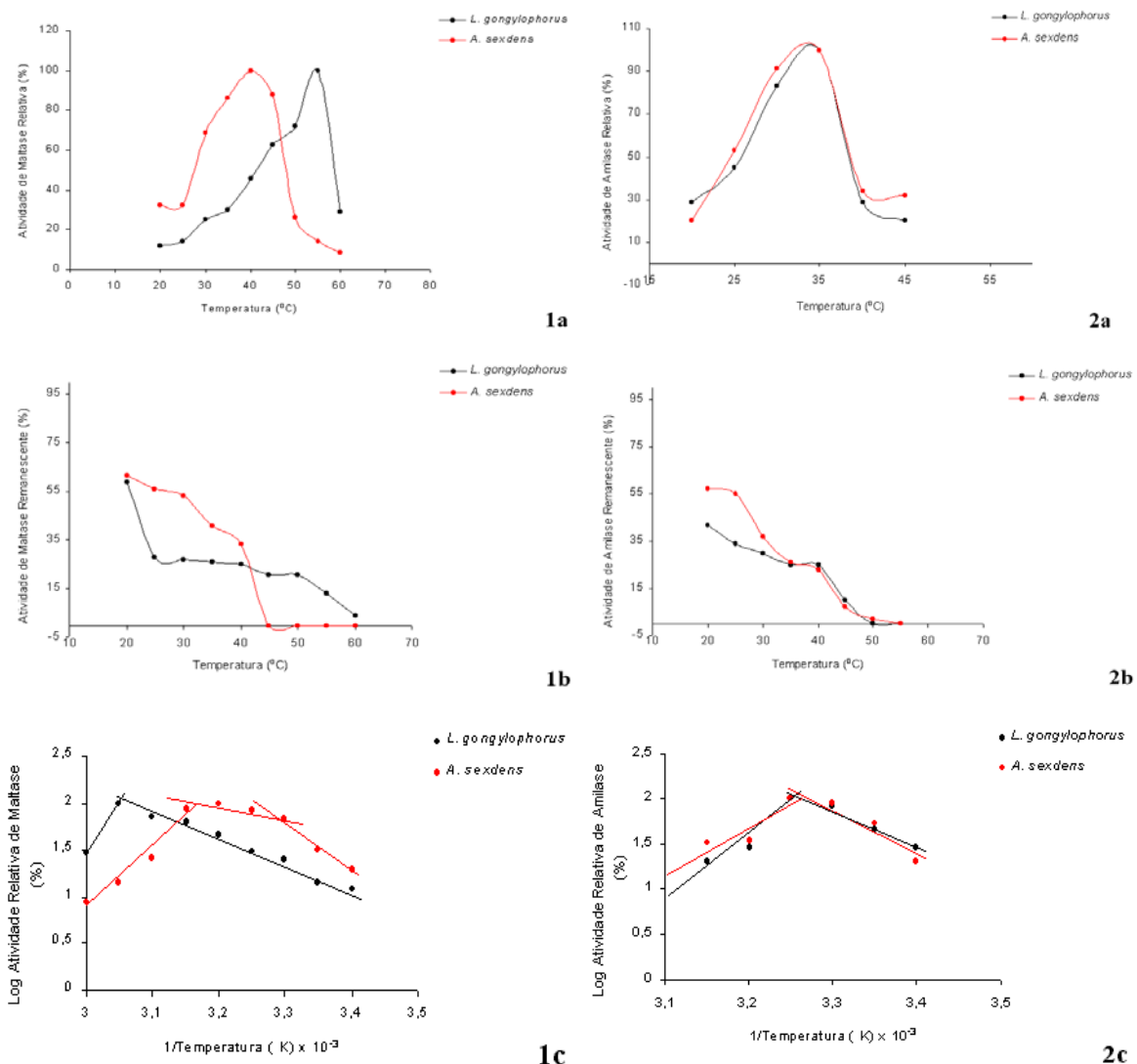
#### **3.1. Influência da temperatura**

Na determinação das atividades enzimáticas em diferentes temperaturas, maltases originárias do fungo ou da formiga foram incubadas nas temperaturas de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60° C, e  $\alpha$ -amilase foram ensaiadas nas temperaturas de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 e 55° C. Para maltase, as melhores temperaturas de atividade foram 55° C para a enzima originária do fungo e de 40° C para a maltase detectada no fluido fecal das operárias (figura 17 1a). Quanto à  $\alpha$ -amilase, a mesma temperatura ótima de atividade foi detectada para as enzimas de ambos os organismos, 35° C (figura 17 2a).

Para verificar a termoestabilidade das enzimas após incubação das mesmas por 1 hora em diferentes temperaturas antes de ensaiar suas atividades a 30° C, os dados mostraram que em todas as temperaturas houve perda de atividade enzimática, sendo que a total inativação das enzimas foi detectada a 45° C para maltase presente nas operárias (figura 17 1b), 50 e 55° C para  $\alpha$ -amilase presente no fungo e no fluido fecal das operárias, respectivamente (figura 17 2b). Nas temperaturas testadas não se observou inativação total da maltase fúngica, que permaneceu com 9 % de sua atividade inicial, mesmo mantida por 1 hora a 60° C (figura 17 1b).

A partir do plote de *Arrhenius*, determinaram-se alguns parâmetros das enzimas estudadas: para maltase fúngica os dados possibilitaram o desenho de uma reta linear sobre os pontos, e também observou-se uma queda brusca da atividade após 55° C, indicando desnaturação da enzima nesta temperatura (figura 17 1c), enquanto que para a maltase presente nas operárias de *A. sexdens* duas retas com diferentes inclinações puderam ser traçadas sobre os pontos, indicando a provável modificação conformacional da mesma enzima, com mudança de sua energia de ativação (figura 17 1c). Provável desnaturação desta enzima foi verificada aos 45° C.

O plote de *Arrhenius* para  $\alpha$ -amilase mostrou semelhança no comportamento da enzima, seja originária do fungo simbiote ou das operárias das formigas, sendo possível traçar uma única reta sobre os pontos (figura 17 2c). O gráfico mostra o mesmo comportamento de desnaturação de ambas as  $\alpha$ -amilases, que ocorreu a 308 K (35° C).



**Figura 17.** Efeito da temperatura sobre as enzimas maltase (1) e  $\alpha$ -amilase (2) secretadas pelo fungo *L. gongylophorus* ou presentes no fluido fecal das operárias de *A. sexdens*. A influência na atividade das enzimas está no item (a), e na estabilidade no item (b). O item (c) corresponde aos plotes de *Arrhenius* elaborados com os dados obtidos nas curvas do item (a).

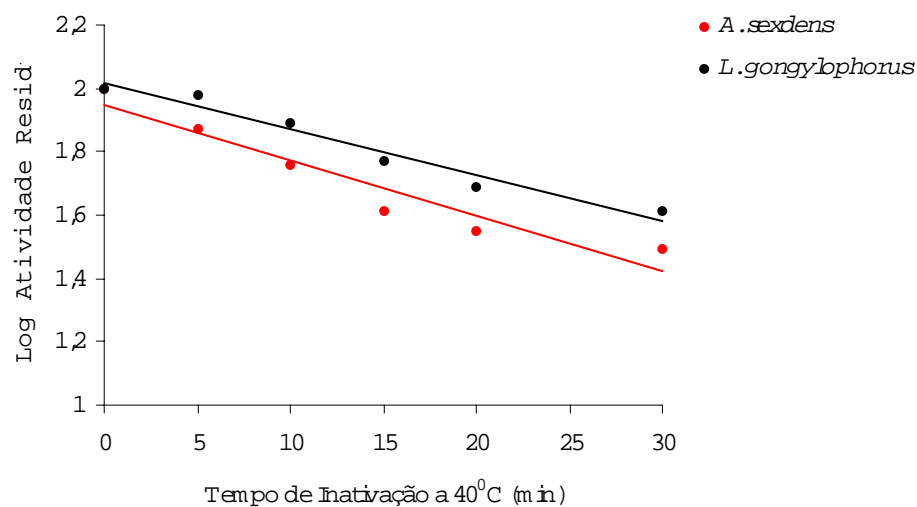


A determinação da constante “ $Q_{10}$ ” (qüoeficiente que indica o número de vezes que a atividade enzimática aumenta a cada  $10^{\circ}\text{C}$ ) e da energia de ativação ( $E_a$ ) das  $\alpha$ -amilases de ambas as origens estão apresentados na tabela 5. Valores de “ $Q_{10}$ ” indicam sobre a  $E_a$  das enzimas em geral, que por sua vez está diretamente relacionada à taxa de reações químicas durante a catálise. Portanto,  $E_a$  muito próximas sugerem que as enzimas possuem grupos químicos idênticos em seus sítios de atividade enzimática. Os resultados obtidos na avaliação destes parâmetros são indicadores que as  $\alpha$ -amilases de ambas as origens são idênticas e maltases são distintas.

**Tabela 5.** Valores de  $Q_{10}$  e  $E_a$  da maltase e  $\alpha$ -amilase secretadas pelo fungo *L. gongylophorus* e também detectadas no fluido fecal de operárias de *A. sexdens*.

	Maltase		$\alpha$ -Amilase	
	$Q_{10}$ (nº vezes)	$E_a$ (cal/mol)	$Q_{10}$ (nº vezes)	$E_a$ (cal/mol)
<i>L. gongylophorus</i>	2,2	13,0	3,4	21,2
<i>A. sexdens</i>	1,4	16,9	3,3	21,4

A avaliação da  $\alpha$ -amilase de ambas as origens quanto a inativação térmica é apresentada na figura 18. A enzima foi mantida, a  $40^{\circ}\text{C}$ , por 5, 10, 15, 20 e 30 minutos, tendo em seguida suas atividades residuais determinadas, a  $30^{\circ}\text{C}$ . Os plotes dos valores obtidos mostraram duas curvas lineares muito próximas, com uma diferença de inclinação de 12,5 %. Este resultado é mais um indício de que a  $\alpha$ -amilase presente no intestino posterior das operárias de *A. sexdens* é a mesma enzima secretada pelo seu simbionte, o fungo *L. gongylophorus*.



**Figura 18.** Inativação térmica das  $\alpha$ -amilases originárias do fungo simbionte, *L. gongylophorus*, ou do fluido fecal das operárias de *A. sexdens*. Os plotes mostram duas curvas próximas, com diferenças de inclinação de 12,5 %.

### 3.2. Influência do pH

Para avaliar a atividade das enzimas nos diferentes valores de pH, as mesmas foram ensaiadas em pH 4, 5, 6, 7 e 8. Na figura 18 observam-se os resultados obtidos:

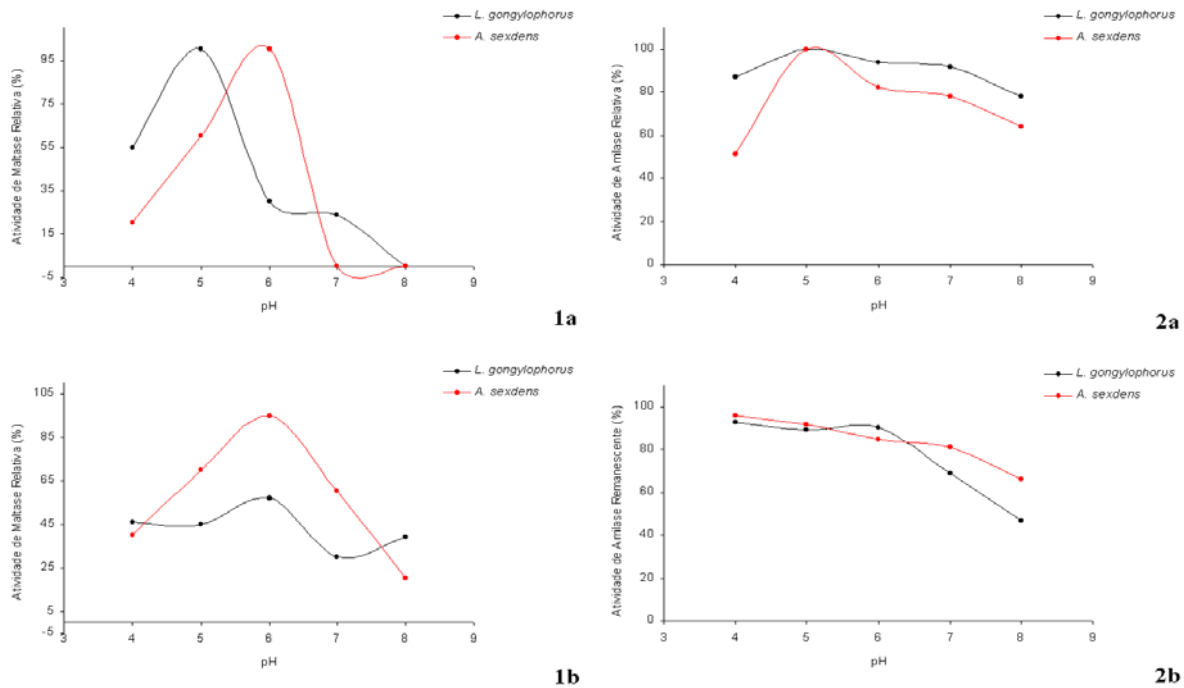
- Os melhores valores de pH para atividade de maltase fúngica ou do fluido fecal foram 5,0 e 6,0, respectivamente. Em ambos os casos houve declínio da atividade em pH menores ou maiores que os valores de pH ótimo determinados (figura 18 *1a*), sendo que as enzimas foram inativas em pH 7,0 (para maltase isolada do fluido fecal) e pH 8,0 (para maltase do fungo simbiote);

- Na avaliação da estabilidade das maltases das diferentes origens quando mantidas nos diferentes valores pH por 1 hora antes da realização dos ensaios foi obtido o seguinte resultado (figura 18 *1b*): em todos os valores foi observado declínio na atividade de maltase, sendo que maltase de *L. gongylophorus* foi mais sensível, declinando em até 70 % sua capacidade de degradação da maltose. Em pH 6,0 observou-se atividade residual máxima da maltase fúngica (55 %). A maltase presente no fluido fecal apresentou melhor estabilidade, principalmente em pH 6,0, no qual manteve 95 % de sua atividade máxima. Teve declínio nos demais valores de pH, chegando a perder 80 % de sua atividade inicial no pH 8,0.

- Alfa-amilases de ambas as origens apresentaram melhor atividade em pH 5,0, declinando nos demais valores testados (figura 18 *2a*). Esta enzima, quando originária do fungo, manteve até quase 70 % de sua atividade ótima nos demais valores. A enzima obtida do fluido fecal das formigas foi menos resistente, perdendo até 50 % de sua atividade inicial.

- A atividade residual da  $\alpha$ -amilase de ambas as origens quando mantidas por 1 hora nos diferentes valores de pH (figura 18 *2b*) foi de quase 100 % nos valores de 4,0 a 6,0. Em pH 7,0 houve declínio de, aproximadamente, 25 % da atividade e, em pH 8,0 a perda da atividade foi, em média, de 55 %, para  $\alpha$ -amilases de ambas as origens.

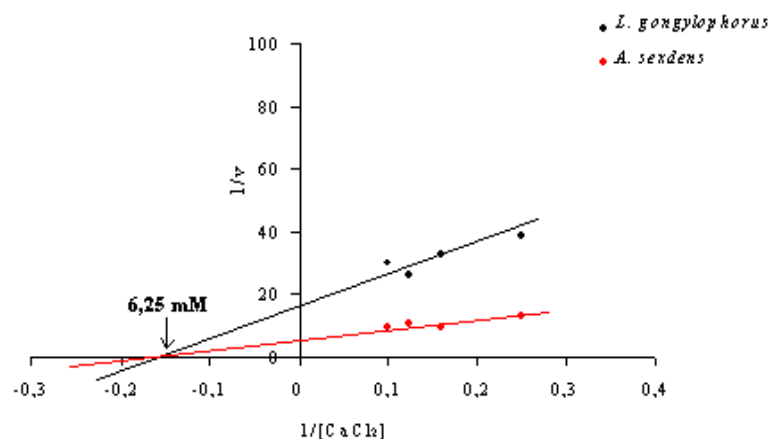
Numa avaliação geral da influência do pH, seja na atividade ou na estabilidade da enzima, observou-se que em valores de pH mais ácidos a enzima foi mais ativa e mais estável também. Dados ainda revelam que o pH no interior do ninho de *A. sexdens* está na faixa de 5,0 a 6,0 (Mudd e Bateman, 1979; Powell e Stradling, 1986). Isto leva à conclusão de que maltase ou  $\alpha$ -amilase de ambas as origens podem atuar eficientemente no ninho.



**Figura 19.** Influência do pH sobre as enzimas maltase (1) e  $\alpha$ -amilase (2) secretadas pelo fungo *L. gongylophorus* ou presentes no fluido fecal das operárias de *A. sexdens*. Influência na atividade das enzimas (a) e na estabilidade das mesmas (b).

### 3.3. Influência do cloreto

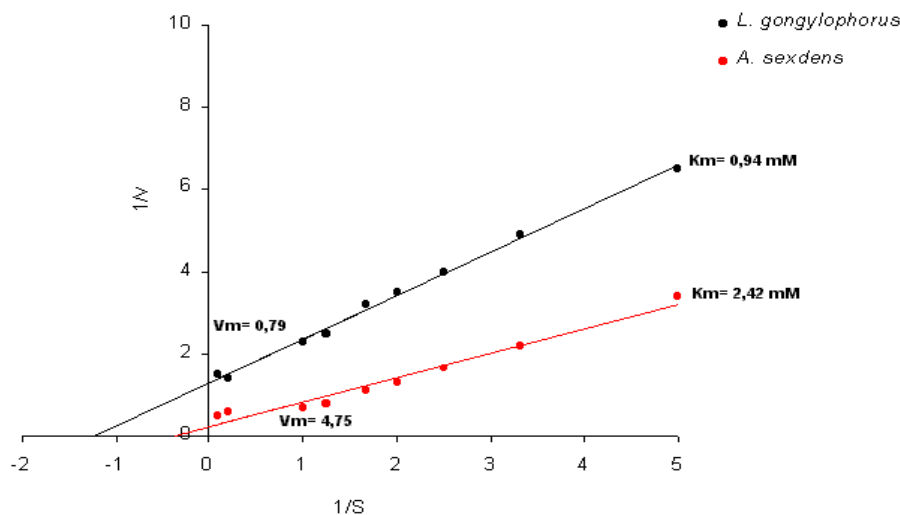
A influência do cloreto [determinada utilizando-se o cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ )] foi testada apenas para  $\alpha$ -amilase, uma vez que a maltase não sofre incremento em sua atividade com adição do cloreto. Na figura 19 observa-se o resultado obtido. O gráfico mostra a concentração de saturação/dissociação do cloreto ligado à enzima ( $\alpha$ -amilase fúngica ou presente no fluido fecal das operárias), que foi 6,25 mM, em ambos os casos.



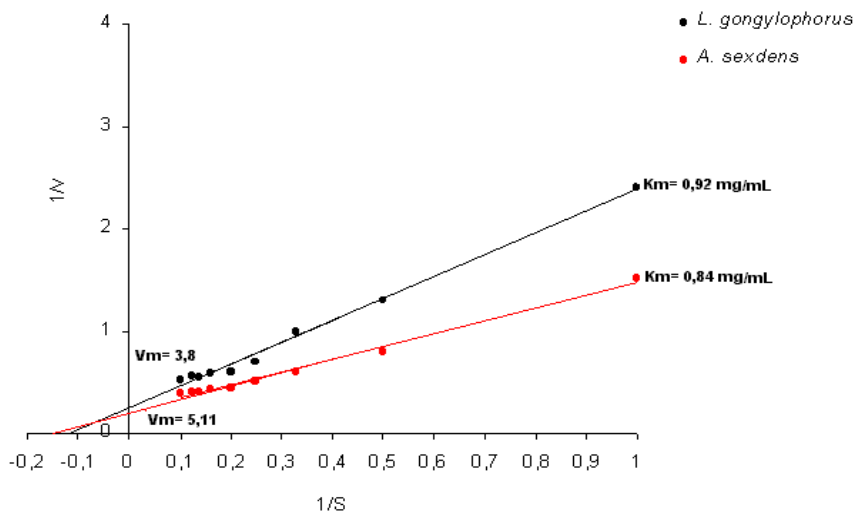
**Figura 20.** Influência do  $\text{CaCl}_2$  sobre atividade de  $\alpha$ -amilase secretada pelo fungo *L. gongylophorus* ou presente no fluido fecal das operárias de *A. sexdens*. O gráfico dos recíprocos representa a concentração molar de  $\text{CaCl}_2$  (eixo x) versus a atividade de  $\alpha$ -amilase (eixo y). A constante de dissociação do cloreto foi de 6,25 mM.

### 3.4. Determinação das constantes cinéticas $K_m$ e $V_m$

As constantes cinéticas de Michaelis-Menten  $K_m$  e  $V_m$  foram determinadas a partir do plote linear de Lineweaver-Burk (figuras 20 e 21). Os valores encontrados para maltase e  $\alpha$ -amilase estão relacionados na tabela 6:



**Figura 21.** Plote linear de Lineweaver-Burk para a determinação das constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_m$  das maltases purificadas do fungo *L. gongylophorus* e a partir de operárias de *A. sexdens*.



**Figura 22.** Plote linear de Lineweaver-Burk para a determinação das constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_m$  das  $\alpha$ -amilases purificadas do fungo *L. gongylophorus* e da formiga *A. sexdens*.

**Tabela 6.** Valores de Km e Vm das enzimas maltase e  $\alpha$ -amilase secretadas pelo fungo *L. gongylophorus* e também detectadas no fluido fecal de operárias de *A. sexdens*.

	<i>MALTASE</i>		<i><math>\alpha</math>-AMILASE</i>	
	<b>Km</b> (mM)	<b>Vm</b> ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ )	<b>Km</b> (mg/mL)	<b>Vm</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ )
<i>L. gongylophorus</i>	0,94	0,79	0,92	3,80
<i>A. sexdens</i>	2,42	4,75	0,84	5,11

### 3.5. Determinação do peso molecular por SDS-PAGE

Os valores de peso molecular, estimados em SDS-PAGE, das amilases de *L. gongylophorus* e detectadas em *A. sexdens* foram, respectivamente: 74 e 63 kDa para maltase, e 29 e 27 kDa para  $\alpha$ -amilase (figuras 4, 8, 13 e 16).

Na avaliação dos parâmetros de caracterização de maltases e  $\alpha$ -amilases de ambos os organismos verificaram-se coincidências e diferenças com resultados observados para as mesmas enzimas em outros microrganismos ou insetos, não havendo um padrão em valores de temperaturas ótimas, Km ou peso molecular. A única característica que parece se manter constante entre  $\alpha$ -amilases e maltases de diferentes origens é a faixa de pH na qual estas enzimas são mais ativas, que é em valores de pH de ácidos a neutros, o que foi verificado para as amilases investigadas neste trabalho. Alfa-amilases de qualquer origem também são altamente influenciadas pela presença de cloreto (Yamamoto, 1995), como foi verificado na figura 20.

Uma das características que vale ressaltar são alguns dos valores de Km obtidos das enzimas estudadas neste trabalho. Quanto às  $\alpha$ -amilases, os valores de Km obtidos de 0,92 e 0,84 podem ser considerados baixos, indicando alta eficiência da enzima para degradar o substrato. A maioria dos valores de Km de  $\alpha$ -amilases de diversas origens se agrupam entre 1 a 4 mg/mL quando utilizado amido solúvel como substrato (Terra e Ferreira, 1994; Yamamoto, 1995). Para maltases de diferentes origens, os valores de Km observados variam de 2 a 20 mM de maltose. O Km da enzima isolada do intestino das operárias de *A. sexdens* foi de 2,4 mM, estando dentro da faixa de valores observados para a maioria das maltases, mas o Km de 0,94 mM da maltase fúngica mostra alta eficiência desta enzima na degradação do substrato.

Os estudos de purificação e caracterização de amilases apresentados forneceram informações sobre condições ótimas de degradação do amido, possibilitando não só inferências a respeito do funcionamento destas enzimas nos dois organismos, mas também comparações e discussão da possível origem das amilases presentes no intestino de *A. sexdens*. Os parâmetros importantes para a comparação entre as enzimas fúngicas e as detectadas no fluido fecal das operárias estão dispostos na tabela 7.

**Tabela 7.** Comparação entre os parâmetros físico-químicos avaliados da maltase e  $\alpha$ -amilase secretadas pelo fungo *L. gongylophorus* ou isoladas do fluido fecal das operárias de *A. sexdens*.

Características Avaliadas	MALTASE		$\alpha$ -AMILASE	
	<i>L. gongylophorus</i>	<i>A. sexdens</i>	<i>L. gongylophorus</i>	<i>A. sexdens</i>
<i>Temperatura ótima (atividade)</i>	55°C	40°C	35°C	35°C
<i>Temperatura de inativação</i>	> 60°C	45°C	50°C	55°C
<i>Temperatura de desnaturação (plote de Arrhenius)</i>	55°C	45°C	35°C	35°C
<i>Inativação Térmica</i>	nd	nd	87,5% de similaridade entre as curvas	
<i>pH ótimo (atividade)</i>	5,0	6,0	5,0	5,0
<i>pH ótimo (estabilidade)</i>	4,0 a 6,0	6,0	4,0 a 6,0	4,0 a 6,0
<i>K<sub>m</sub></i>	0,94 mM	2,42 mM	0,92 mg/mL	0,84 mg/mL
<i>PM (SDS-PAGE)</i>	74 kDa	63 kDa	29 kDa	27 kDa
<i>Q<sub>10</sub></i>	2,2	1,4	3,4	3,3
<i>E<sub>a</sub></i>	13,0 cal/mol	16,9 cal/mol	21,2 cal/mol	21,4 cal/mol
<i>Influência do cloreto na atividade da enzima (constante de dissociação)</i>		nd	6,25 mM	

(K<sub>m</sub>) Constante de Michaelis-Menten

(PM) Peso Molecular

(Q<sub>10</sub>) Qüoeficiente de aumento da temperatura a cada 10°C

(E<sub>a</sub>) Energia de ativação

(nd) não determinado

Os dados mostraram que, no que diz respeito às maltases de ambas as origens, são estas enzimas distintas, enquanto que  $\alpha$ -amilases tiveram características físico-químicas semelhantes. Estes resultados sugerem que, dentre as enzimas avaliadas neste trabalho, apenas a  $\alpha$ -amilase presente no fluido fecal tem origem fúngica, enquanto que a maltase pode ser produzida pelos próprios insetos, ou ser originária de outros microrganismos. Mas o que define a identidade físico-química de uma enzima e o que garante que duas enzimas isoladas de diferentes organismos tenham a mesma origem? Segundo Copeland (1996), enzimas são proteínas funcionais, composta de centenas de aminoácidos, que estão organizados em uma complexa estrutura. Destes, apenas alguns participam de seu “sítio ativo”, região onde ocorrem as reações químicas que resultam na atividade enzimática. E este agrupamento de aminoácidos de cada proteína no seu sítio ativo é o que garante sua identidade físico-química. Portanto, proteínas produzidas por diferentes organismos têm variações quanto à composição de aminoácidos e respondem diferentemente às condições às quais são submetidas. Logo, proteínas que apresentam a mesma resposta a

vários e diferentes estímulos recebidos (por exemplo: temperatura, pH), provavelmente são idênticas, pois devem ter os mesmos aminoácidos “atuando no sítio ativo”.

### ***As enzimas em Attini e outros insetos***

As enzimas amilolíticas são amplamente distribuídas em insetos, podendo ser inclusive produzidas por estes (Khan e Ford, 1967; Terra e Ferreira, 1994; Scrivener *et al.*, 1998). Dentre as Attini, já foram detectadas amilases em espécies de *Atta*, *Acromyrmex*, *Cyphomyrmex*, *Apterostigma*, *Myrmicocrypta* e *Sericomyrmex* (Martin *et al.*, 1973; Febvay e Kermarrec, 1983; Silva, 2000; Erthal Jr. *Et al.*, 2204). Quanto à produção destas enzimas pelos próprios insetos, sabe-se que são prioritariamente produzidas em glândulas da parte mais anterior de seu trato digestivo, como glândulas salivares, mandibulares e infra-bucais (Ayre, 1967; Febvay e Kermarrec, 1983). Há também relatos de produção de amilases no intestino médio de insetos (Ayre, 1967). A digestão de substratos amilolíticos também parece ocorrer prioritariamente em partes iniciais do intestino de insetos (Khan e Ford, 1967; Terra e Ferreira, 1994).

Em formigas cortadeiras há evidências da digestão de amido por enzimas produzidas pelas próprias operárias (Febvay e Kermarrec, 1983; Silva, 2000; Silva *et al.*, 2003). Mas porque estes insetos também expõem estas enzimas para o ambiente externo? Este parece ser um hábito não somente das formigas cortadeiras, mas também de vários insetos que cultivam microrganismos. Mishra (1991) discute que a excreção de enzimas digestivas no material fecal pode ser uma adaptação que permitiu a evolução de espécies de insetos cultivadores de fungos. Estes insetos colocariam estas enzimas digestivas sobre o substrato, estimulando o crescimento fúngico, sendo este depois utilizado como alimento.

E qual o significado deste hábito na simbiose entre cortadeiras e seu fungo simbiote? Martin (1975) já discutia esta questão sugerindo que as enzimas expelidas pelas formigas seriam produzidas pelo fungo, ingeridas pelas operárias, e novamente depositadas no formigueiro, sobre o substrato recém introduzido no ninho. Com isto, o fungo já encontraria o substrato pré-degradado antes de ser inoculado, podendo crescer mais rapidamente e predominando sobre outros microrganismos competidores que estão presentes no ninho. Esta afirmação também é discutida por Ronhede *et al.*(2004), que demonstra experimentalmente a capacidade de operárias servirem como reservatórios de enzimas fúngicas, concentrando-as em seu intestino e depositando-as em regiões onde há necessidade do rápido crescimento microbiano. Esta observação remete à uma reconsideração da visão “*entomocêntrica*” da simbiose entre formigas forrageadoras e fungos, priorizada por vários autores, que estabelece teorias onde as formigas domesticaram um microrganismo para lhe servir como um “*estômago externo*” para digerir polissacárides do substrato carregado até o ninho. Numa outra visão, sugerida também por Mueller (2002), os fungos simbiotes das Attini seriam também muito atuantes no estabelecimento desta simbiose há milhares de anos atrás. Estes seriam muito beneficiados tendo as formigas como “*reservatórios*” de suas próprias enzimas.

### ***Fornecimento de enzimas microbianas a insetos***

A interação enzimática de insetos com microrganismos que vivem no ambiente externo, resultando em benefícios nutricionais é verificada em várias espécies. Relatos de Abrahamson e Norris (1969) e de Kukor e Martin (1986) suportam a conclusão de que micróbios cultivados por besouros que se alimentam de madeira são responsáveis por suprir enzimas indispensáveis à sua sobrevivência. Martin *et al.* (1981) demonstraram evidências de que a origem de enzimas em onze espécies de besouros é de microrganismos utilizados como alimento por estes. Dentre as interações relacionadas pelos autores entre insetos e fungos estão as espécies *Phenolia grossa* e *Laetiporus sulphureus*, *Tritoma pulchra* e *Tyromyces albellus*, *Triplax thoracica* e *Pleurotus ostreatus*, *Mycetophagus flexuosus* e *Clavicornia pyxidata*, *Bolitotherus cornutus* e *Ganoderma applanatum*.

Em vespas de madeira da espécie *Sirex cyaneus*, que também vivem em simbiose com um fungo basidiomiceto (Ordem Aphyllophorales), Kukor e Martin (1983) sugerem que as polissacaridasas celulase e xilanase presentes no organismo dos insetos eram originárias de seu fungo simbionte. Os autores purificaram e caracterizaram estas enzimas a partir dos dois organismos, identificando a sua origem. Mishra (1991) verificou que *Crematogaster dohrni* constrói seus ninhos com material foliar seco e cultiva sobre este um fungo do qual se alimenta e ingere enzimas.

Martin (1983) declara que muitos insetos compensam sua incapacidade de degradar substratos ingerindo enzimas fúngicas e de outros microrganismos. Dentre as Attini a ingestão de enzimas foi demonstrada em duas situações: ingestão de proteinases por *Atta texana* (Boyd e Martin, 1975) e de pectinases por *Acromyrmex echinator* e *Atta colombica* (Ronhede *et al.*, 2004).

No fornecimento de enzimas fúngicas a insetos há o clássico caso da interação entre cupins e fungos basidiomicetos. No mundo Neotropical, o principal inseto cultivador de fungos são as formigas da Tribo Attini. Porém, em outros continentes, há a ocorrência de outros insetos com este hábito. Abo-Khatwa (1978) relata sobre a simbiose entre cupins da subfamília Macrotermitinae e o fungo basidiomiceto *Termitomyces sp.*, que vivem confinados na região tropical dos continentes africano e asiático. Ele discute sobre a origem de enzimas que degradam celulose, carboximetilcelulose e celobiose e que estão presentes no intestino do cupim *Macrotermes subhyalinus*. Ele verificou que quando os cupins eram isolados de seu fungo simbionte as atividades enzimáticas sobre os polímeros celulose e carboximetilcelulose eram reduzidas, enquanto a atividade sobre celobiose permanecia inalterada. Após purificação das enzimas presentes no fungo simbionte e nos insetos, o autor verificou que celulase e carboximetilcelulase dos dois espécimens eram idênticas, enquanto a celobiase presente no cupim foi distinta da encontrada no fungo, levando-o à conclusão de que esta última enzima era produzida pelo próprio inseto. Resultados semelhantes foram obtidos por Martin e Martin (1978, 1979) em *Macrotermes natalensis*: celulasas detectadas no intestino destes insetos tinham origem fúngica, enquanto carboximetilcelulasas e celobiasas eram produzidas pelo próprio inseto.

Celulasas de origem fúngica em cupins também foram determinadas por Zoberi (1979). Este autor discute a relevância do fungo simbionte destes insetos para a degradação da celulose, já que este polímero é o principal precursor de fonte energética para eles. Rouland *et al.* (1986) purificaram



celulases, carboximetilcelulases e  $\beta$ -glicosidasas de *Macrotermes mülleri* e de seu simbionte, o fungo *Termitomyces sp.*, e determinaram que as duas primeiras enzimas eram produzidas apenas pelo fungo. Eles encontraram diferentes  $\beta$ -glicosidasas no intestino dos cupins: uma de origem fúngica e outra produzida pelo cupim. Rouland *et al.* (1988) determinaram, “*in vitro*”, o sinergismo entre enzimas celulolíticas derivadas do cupim *M. mülleri* e de seu fungo simbionte *Termitomyces sp.* Estes autores realizaram bioensaios em que celulases e  $\beta$ -glicosidasas derivadas de ambas as origens foram reunidas para depois serem adicionadas ao substrato. Diferentes misturas, com diferentes proporções destas enzimas, aumentaram a degradação da celulose em até 300%.

A participação do fungo simbionte no metabolismo digestivo de diferentes espécies de cupins (*Macrotermes bellicosus*, *Odontotermes pauperans*, *Ancistrotermes cavithorax*, *Microtermes toumodiensis* e *Pseudocanthotermes militaris*) também foi estudada por Rouland *et al.* (1991). Todas as espécies de cupins demonstraram intensa atividade enzimática sobre a celobiose. O fungo simbionte destas espécies não teve grande atuação na degradação dos oligossacarídeos, exceto o fungo simbionte de *P. militaris*, que demonstrou elevada atividade enzimática sobre a maltose. No que diz respeito à degradação de polissacarídeos, o fungo teve uma maior participação, sendo a xilana o polissacarídeo mais degradado.

Veivers *et al.* (1991) determinaram que ocorre a produção de carboximetilcelulases e  $\beta$ -glicosidasas tanto no fungo simbionte como nas espécies de cupins *Macrotermes subhyalinus* e *M. michaelseni*. Eles sugerem que apenas 9% da degradação de carboximetilcelulose ou celobiose podem ser realizados por enzimas de origem fúngica, que estão localizadas no intestino destas espécies de cupins. Mas, apesar do pequeno percentual de degradação, o sinergismo que ocorre entre as enzimas dos dois organismos pode melhorar a eficiência na degradação do substrato (Rouland *et al.*, 1988).

Slaytor (1992) discute resultados dos autores citados anteriormente e questiona quanto à real necessidade que cupins cultivadores de fungos têm com respeito à aquisição de celulases do seu simbionte. Este autor relata os resultados obtidos por Veivers *et al.* (1991) e especula que seja improvável que os cupins da espécie *M. subhyalinus* tenham a capacidade de acumular celulases em seu organismo, já que o seu fungo simbionte supre somente 9% das enzimas responsáveis pela degradação da celulose. Slaytor (1992) ignora qualquer possível sinergismo entre as celulases de ambas as origens e determina a hipótese de que, possivelmente, estes insetos sejam capazes de suprir a sua própria produção de celulases. Mais recentemente, Watanabe *et al.* (1998) determinaram, a partir do seqüenciamento de aminoácidos, que celulases relevantes na degradação da celulose e que são detectadas no cupim *Reticulitermes speratus* são secretadas por glândulas salivares dos próprios insetos.

Degradação de xilanase também foi estudada em cupins. Matoub e Rouland (1995) determinaram, após purificação e caracterização de xilanases encontradas na espécie *Macrotermes bellicosus* e em seu fungo simbionte *Termitomyces sp.*, que endoxilanases detectadas no intestino dos insetos eram de origem fúngica, enquanto que exoxilanases eram produzidas por ambos os simbiontes.

### ***A origem das amilases no intestino das operárias de A. sexdens***

Sendo uma das principais enzimas atuantes na degradação do material foliar carregado para o ninho, enzimas amilásicas em *A. sexdens* e em *L. gongylophorus* foram estudadas por Silva (2000), que apresentou indícios iniciais de que o fungo produzia ao menos uma das amilases presentes no organismo das formigas. Porém, verificou-se ainda que existiam amilases nas operárias cuja origem não era possível identificar.

Neste trabalho agora apresentado, os resultados demonstram evidências de que a  $\alpha$ -amilase presente no fluido fecal de operárias de *A. sexdens* é de origem fúngica, e que a maltase não é originária de *L. gongylophorus*. Porém, esta constatação remete à questão de como enzimas fúngicas permanecem intactas ou estáveis no intestino dos insetos após ingeridas e ainda com atividade biológica depois de expelidas no fluido fecal? Atualmente, as seguintes explicações podem ser fornecidas: Erthal Jr. *et al.* (2004) apresentaram em seu trabalho dados que mostram a diminuição do pH na região retal de operárias de *Acromyrmex subterraneus*. Estes autores discutem que esta diminuição do pH no reto seria uma estratégia para inativar proteases, que tem maior eficiência em pHs mais alcalinos. Com isto, as enzimas se manteriam estáveis enquanto armazenadas, e ativas após serem depositadas sobre o material foliar. Um outro dado relevante e que deve ser considerado para explicar sobre a estabilidade destas enzimas no reto das operárias é a detecção de glicerol, em elevada concentração, no fluido fecal de operárias de *Atta sexdens* (Petacci, 2001); e glicerol é um excelente conservante de proteínas, utilizado inclusive em laboratórios, para manter proteínas estáveis.

Quanto à  $\alpha$ -amilase, vale ressaltar que há a possibilidade da produção desta enzima pelos próprios insetos, mas que devem ser depositadas em outras regiões de seu intestino. Como o objetivo do trabalho foi avaliar amilases do fluido fecal que são expelidas para o ambiente externo para atuar na degradação do amido componente do substrato foliar carregado para o ninho, os dados mostraram que a  $\alpha$ -amilase atuante na degradação do amido seja prioritariamente de origem fúngica, que é ingerida pelas operárias e concentradas no seu intestino para ser novamente depositada no ninho antes da implantação de um novo inóculo do fungo no material foliar. Isto evidencia mais uma vez a teoria de que há ciclagem das enzimas microbianas no ninho e que isto é um dos fatores que envolve a integração metabólica entre estes dois organismos.

### **Citações Bibliográficas**

- Abo-Khatwa, N. (1978) Cellulase of fungus-growing termites: a new hypothesis on its origin. *Experientia*, 34 (5): 559-560.
- Abrahamson, L. P.; Norris, D. M. (1969) Symbiotic interrelationships between microbes and ambrosia beetles IV. Ambrosia fungi associated with *Xyloterinus politus*. *J. Inverteb. Pathol.*, 14: 381-385.
- Abril, A. B.; Bucher, E. H. (2002) Evidence that the fungus cultured by leaf-cutting ants does not metabolize cellulose. *Ecology Letters*, 5: 325-328.

- Ayre, G. L. (1967) The relationships between food and digestive enzymes in five species of ants (Hymenoptera: formicidae). *The Can. Entomol.*, 99: 408-411.
- Banks, W. M. (1963) Carbohydrate digestion in the cockroach. *Science*, 141: 1191-1192.
- Bass, M.; Cherrett, J. M. (1994) The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae) in fungus garden maintenance. *Ecol. Entomol.*, 19: 215-220.
- Bass, M.; Cherrett, J. M. (1995) Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Physiol. Entomol.*, 20:1-6.
- Bernfeld, P (1955) Amylases,  $\alpha$  e  $\beta$ . In: Methods in Enzymology, Vol I. Colowick, S. P. (Ed). New York: Academic Press. p. 149-158.
- Boyd, N. D.; Martin, M. M. (1975) Faecal proteinases of the fungus-growing ant *Atta texana*: their fungal origin and ecological significance. *J. Insect Physiol.*, 21: 1815-1820.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 86:142-146.
- Cherrett, J. M. (1986) The biology, pests status and control of leaf-cutting ants. *Agric. Zool. Rev.*, 1: 1-37.
- Copeland, R.A. (1996) Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. United States of America: Wiley-VCH Press. 306 p.
- D'Ettoire, P.; Mora, P.; Dibangou, V.; Rouland, C.; Errard, C. (2002) The role of the symbiotic fungus in the digestive metabolism of two species of fungus-growing ants. *J. Comp. Physiol. B*, 172: 169-176.
- Febvay, G.; Kermarrec, A. (1981) Activités enzymatiques des glandes salivaires et del'intestin moyen d'une fourmi attine (adultes et larves): *Acromyrmex octospinosus* Reich (Formicidae, Attini). *Arch. Biol. (Bruxelles)*, 92: 299-316.
- Febvay, G.; Kermarrec, A. (1983) Enzymes digestives de la fourmi attine *Acromyrmex octospinosus* Reich: caractérisation des amylases, maltase et tréhalase des glandes labials et de l'intestin moyen. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 296: 453-456.
- Hernández, J. V.; Jaffé, K. (1995) Dano econômico causado por populações de formigas *Atta laevigata* (F.Smith) em plantações de *Pinus caribaea* Mor e elementos para o manejo da praga. *An. Soc. Entomol. Brasil*, 24: 287-298.
- Heukeshoven, J.; Dernick, R. (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6:103-112.
- Hölldobler, B.; Wilson, E. O. (1990) *The ants*. Cambridge: Harvard University Press, p. 596-608.
- Khan, M. R.; Ford, J. B. (1967) The distribution and localization of digestive enzymes in the alimentary canal and salivary glands of the cotton stainer, *Dysdercus fasciatus*. *J. Ins. Physiol.*, 13: 1619-1628.
- Kukor, J.; Martin, M. M (1983) Acquisition of digestive enzymes by siridic woodwasps from their fungal symbiont. *Science*, 220: 1161-1163.
- Kukor, J. J.; Martin, M.M. (1986) The transformation of *Saperda calcarata* (Coleoptera: Cerambycidae) into a cellulose digester through the inclusion of fungal enzymes in its diet. *Oecologia*, 71: 138-141.

- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 227:680-685.
- Mariconi, F. A. M. (1970) As saúvas. São Paulo: Agronômica Ceres. 167 p.
- Martin, M. (1983) Cellulose digestion in insects. *Comp. Biochem. Physiol.*, 75A(3): 313-324.
- Martin, M. .M.; Gieselmann, M. J.; Martin, J. S. (1973) Rectal enzymes of attine ants:  $\alpha$ -amylase and chitinase. *J. Insect Physiol.*, 19: 1409-1416.
- Martin, M. M. (1974) Biochemical ecology of the attine ants. *Acc. Chem. Res.*, 7: 1-5.
- Martin, M. M.; Boyd, N. D.; Gieselmann, M. J.; Silver, R. G. (1975) Activity of faecal fluid of a leaf-cutting ant toward plant cell wall polysaccharides. *J. Insect Physiol.*, 21: 1887-1892.
- Martin, M. M.; Martin, J. S. (1970) The biochemical basis for the symbiosis between the ant, *Atta colombica tonsipes*, and its food fungus. *J. Insect Physiol.*, 16: 109-119.
- Martin, M. M.; Martin, J. S. (1978) Cellulose digestion in the midgut of the fungus-growing termite *Macrotermes natalensis*: The role of acquire digestive enzymes. *Science*, 199: 1453-1455.
- Martin, M. M.; Martin, J. S. (1979) The distribution and origins of the cellulolytic enzymes of the higher termite, *Macrotermes natalensis*. *Physiol. Zool.*, 52: 11-21.
- Martin, M. M.; Weber, N. A. (1969) The cellulose-utilizing capability of the fungus cultured by the attini ant *Atta colombica tonsipes*. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 62: 1386-1387.
- Martin, M. M.; Kukor, J. J.; Martin, J.S.; O'Toole, T. E.; Johnson, M. W. (1981) Digestive enzymes of fungus-feeding beetles. *Physiol. Zool.*, 54 (1): 137-145.
- Matoub, M.; Rouland, C. (1995) Purification and proprieties of the xylanases from the termite *Macrotermes bellicosus* and its symbiotic fungus *Termitomyces* sp. *Comp. Biochem. Physiol.*, 112B (4): 629-635.
- Mishra, S. C. (1991) Chemical composition and digestive enzymes of the nest of *Crematogaster dohrni*, Rogenhoferi Mayr (Hymenoptera: Formicidae) and their significance. *J. Anim. Morphol. Physiol.*, 38 (1-2): 19-28.
- Mora, P.; Rouland, C. (1994) Comparison of hydrolytic enzymes produced during growth on carbohydrate substrates by *Termitomyces* associates of *Pseudacanthotermes spiniger* and *Microtermes subhyalinus* (Isoptera: Termitidae). *Sociobiology*, 26:39-53.
- Mudd, A.; Bateman, G.L. (1979) Rates of growth of the food fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) on diferent substrates gathered by the ants. *Bull. Ent. Res.*, 69: 141-148.
- Mueller, U. G. (2002) Ant versus fungus versus mutualism: ant-cultivar conflict and the deconstruction of the Attine ant-fungus simbiosis. *The Amer. Nat.*, 160: 67-98.
- Powell, R. J.; Stradling, D. J. (1986) Factors influencing the growth of *Attamyces bromatificus*, a symbiont of Attini ants. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 87 (2): 205-213.
- Petacci, F. (2001) Produtos Naturais de um sauveiro e atividade inseticida de *Dimorphandra mollis*. Tese de Doutorado em Química, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos.
- Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. (1996) *Biologia Vegetal*, 5 ed. Rio de Janeiro, Guanabara

- Koogan. p. 13-42.
- Ronhede, S.; Boosma, J. J.; Rosendahl, S. (2004) Fungal enzymes transferred by leaf-cutting ants in their fungus gardens. *Mycol. Res.*, 108 (1): 101-106.
- Rouland, C.; Chararas, C.; Mora, P.; Renaux, J. (1986) Etude comparative entre la beta-glucosidase présente dans le digestif du termite *Macrotermes mülleri* e la beta- glucosidase du champignon symbiotique *Termitomyces sp.* *Acta Insects Soc.*, 3: 109-118.
- Rouland, C.; Civas, A.; Renoux, J.; Petek, F. (1988) Synergistic activities of the enzymes involved in the cellulose degradation, purified from the *Macrotermes mülleri* and from its symbiotic fungus *Termitomyces sp.* *Comp. Biochem. Physiol.*, 91B: 459-465.
- Rouland, C.; Lenoir, F.; Lepage, M. (1991) The role of the simbiotic fungus in the digestive metabolism of several species of fungus-growing termites. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99A (4): 657-663.
- Scrivener, A. M.; Watanabe, H.; Noda, H. (1998) Properties of digestive carbohydrate activities secreted by two cockroaches, *Panestia cribata* and *Periplaneta Americana*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119B(2): 273-282.
- Silva, A. (2000) Participação do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* na produção de enzimas intestinais da formiga *Atta sexdens*. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.
- Silva, A.; Bacci Jr., M.; Siqueira, C. G.; Bueno, O. C.; Pagnocca, F. C.; Hebling, M. J. A. (2003). Survival of *Atta sexdens* on different food sources. *J. Insect Physiol.*, 49:307-313.
- 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 leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. *Appl Environ Microbiol*, 64 (12): 4820-4822.
- Slaytor, M. (1992) Cellulose digestion in the termites and cockroaches: what role do symbionts play? *Comp. Biochem. Physiol.*, 103 B (4): 775-784.
- Terra, W. R.; Ferreira, C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109B (1): 1-62.
- Veivers, P.C.; Mühlemann, R.; Slaytor, M.; Leuthold, R. H.; Bignell, D. E. (1991) Digestion, diet and polyethism in two fungus-growing termites: *Macrotermes subhyalinus* Rambur and *M. michaelseni* SJØSTEDT. *J. Insect. Physiol.*, 37: 675-682.
- Watanabe, H.; Noda, H.; Tokuda, G. (1998) A cellulase gene of termite origin. *Nature*, 394:
- Weber, N. A. (1938) The biology of the fungus-growing ants. Part III. The sporophore of the fungus grown by *Atta cephalotes* and a review of reported sporophores. *Revista Entomol.*, 8: 265-272.
- Weber, N. A. (1941) The biology of the fungus-growing ants. Part VII. The Colorado Island, Canal Zone, species. *Revista Entomol*, 12: 93-130.
- Weber, N. A. (1955) Pure cultures of fungi produced by ants. *Science*, 121: 109.
- Weber, N. A. (1966) Fungus-growing ants. *Science*, 153: 587-604.
- Weber, N. A. (1972) Gardening ants: the Attines. Philadelphia: The American Philosophical Society, p. 87-115.

- Yamamoto, T. (Ed.) (1995) Enzyme chemistry and molecular biology of amylases and related enzymes. New York: CRC Press. 206 p.
- Zoberi, M. H. (1979) The ecology of some fungi in a termite hill. *Mycologia*, 71: 537-545.

## ***Capítulo IV***

DISCUSSÃO FINAL

## Discussão Final

### ***O significado do estudo de amilases na simbiose entre formigas cortadeiras e fungos***

As formigas cortadeiras carregam folhas, flores e demais partes tenras dos vegetais que cortam. Nos ninhos, ocorre a degradação dos componentes estruturais deste material vegetal, que é formado principalmente por polissacarídeos. A celulose é o polissacarídeo mais abundante (cerca de 70%), que forma filamentos entrelaçados entre si. Estes filamentos celulósicos são permeados e unidos por moléculas de hemicelulose (xilana) e pectina. Esta rede de polissacarídeos forma a parece celular vegetal. Mais internamente, a célula vegetal ainda possui um outro polissacarídeo, o amido, que é o principal material de reserva de vegetais superiores e compõe cerca de 10% de todos os polissacarídeos (Raven *et al.*, 1996).

Organismos que utilizam vegetais em sua dieta necessitam, de uma degradação prévia dos polissacarídeos presentes nestes vegetais. Esta degradação é realizada por algumas enzimas e possibilita a obtenção de nutrientes assimiláveis. Atualmente já se sabe que não há habilidade de enzimas fúngicas ou das operárias em degradar a celulose do material vegetal carregado até o ninho (Siqueira *et al.*, 1998; Silva, 2000; Abril e Bucher, 2002). Por sua vez, foi verificado que glicose é o principal açúcar para a manutenção de operárias e formação de biomassa pelo fungo simbiote (Siqueira *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2003), sendo portanto uma fonte de carbono importante para a manutenção dos ninhos. Após a celulose, o amido então seria a principal fonte na obtenção da glicose dentro do sistema simbiote, e por isto a importância em estudar enzimas responsáveis pela sua degradação. Ademais do conhecimento biológico que este estudo proporciona, também fornece informações importantes para futuros estudos aplicados ao controle de formigas cortadeiras através da interferência em seu metabolismo.

### ***O amido e as amilases***

O amido, resultado do processo de fotossíntese, é o polímero utilizado como material de reserva em vegetais superiores (Raven *et al.*, 1996). Segundo Doelle *et al.* (1992) é composto de dois polímeros, amilose e amilopectina, com proporções variáveis entre as espécies vegetais.

Amilose é um polímero linear formado por unidades de glicose, unidas por ligações  $\alpha$ -1,4; e amilopectina é um grande e ramificado polímero composto de unidades de glicose, também unidas por ligações  $\alpha$ -1,4, e ainda ligações  $\alpha$ -1,6. O polímero consiste de uma cadeia principal, formada por aproximadamente quarenta e cinco unidades de glicose. Desta cadeia, partem diversas cadeias contendo 15 unidades de glicose, em média (Doelle *et al.*, 1992).

São três as principais enzimas citadas como degradadoras de amido:

1) a  $\alpha$ -amilase ou 1,4- $\alpha$ -D-glucano glucanohidrolase (EC 3.2.1.1), que quebra ligações  $\alpha$ -1,4, aleatoriamente, convertendo rapidamente o amido a maltose, glicose, maltotrioses e  $\alpha$ -dextrinas. Esta



enzima não hidrolisa ligações  $\alpha$ -1,6, não degradando totalmente a amilopectina. Neste caso pode atuar uma outra enzima, a dextrina, que quebra as ligações  $\alpha$ -1,6. Ocorre comumente em todos os organismos, principalmente em fungos e bactérias (Doelle *et al.*, 1992);

2) maltase ou  $\alpha$ -D-glucosídeo glucohidrolase (EC 3.2.1.20), exo-hidrolase que quebra ligações glicosídicas tipo  $\alpha$ -1,4 ou  $\alpha$ -1,6 de sacarídeos curtos. É amplamente distribuída entre microrganismos;

3)  $\beta$ -amilase ou 1,4- $\alpha$ -D-glucano maltohidrolase (EC 3.2.1.2)), exohidrolase que hidrolisa a penúltima ligação  $\alpha$ -1,4 da extremidade não-redutora da cadeia do substrato. Esta enzima não é capaz de hidrolisar ligações  $\alpha$ -1,6 dos substratos ramificados. Ocorre em vários tipos de plantas.

### ***Utilização de inibidores de amilase no controle de insetos fitófagos e fungos fitopatogênicos***

Desde a primeira metade do século passado são realizados estudos objetivando a descoberta de inibidores de amilases (IA) (Sorensen *et al.*, 2004), que vêm sendo isolados principalmente de plantas leguminosas (Payan, 2004).

Há duas categorias de IA, os de origem protéica e os não protéicos (Franco *et al.*, 2002). Os inibidores não protéicos são: acarbose ou ácido ascórbico, iso-acarbose, acarviosine-glicose, ácidos isolados de *Hibiscus sabdariffa* (hibisco) e ciclodextrinas. Acarviosine-glicose, iso-acarbose e ciclodextrinas são mais eficientes para inibir amilase humana.

Os inibidores de origem protéica são isolados de microrganismos, plantas e animais e são divididos em seis diferentes classes, segundo Franco *et al.* (2002), Payan (2004) e Pereira *et al.* (2004), de acordo com sua estrutura e modo de inibição:

- 1) *Lectinas*: isoladas de diferentes espécies de feijão, é efetivo contra insetos;
- 2) “*knottin-like*”: isolado de sementes de *Amaranthus hypocondriacus* também conhecido como AAI (sigla em inglês), é específico para inibir amilases de insetos;
- 3) “*Cereal-type*”: presentes em diferentes cereais, é efetivo contra amilases de diferentes origens, mas tem forte afinidade para amilases de insetos;
- 4) “*Kunitz-like*”: presentes em cevada, trigo e arroz, é também conhecido como BASI (sigla em inglês);
- 5) “ *$\gamma$ -purothionin-like*”: isolado de *Sorghum bicolor* (sorgo), é específico somente para insetos;
- 6) “*Thaumatococcus-like*”: isolado principalmente de *Zea mays* (milho), é eficiente como IA de fungos.

Para fungos não há muitos estudos sobre IA (Figueira *et al.*, 2002), enquanto que para insetos muitos são os dados efetivos já obtidos na inibição destas enzimas (Franco *et al.*, 2002). Porém, apesar dos resultados promissores, pouca aplicação biotecnológica é investigada e nenhuma produção industrial destes inibidores efetivos contra insetos ou fungos foi feita (Sorensen *et al.*, 2004).

Comercialmente, o único inibidor de amilase produzido até o momento é o de nome comercial “*Fabonol*®” (marca registrada do Laboratório norte americano *SAMI*), isolado de sementes do feijão *Phaseolus vulgaris* e utilizado para inibir amilase humana em tratamentos contra diabetes e obesidade.

### ***Como é o atual controle das formigas cortadeiras?***

Atualmente, o efetivo controle de formigas cortadeiras é realizado através da aplicação de produtos químicos, na forma de iscas formicidas, pós secos e termonebulização. São inseticidas à base de grupos fosforados, sulfonas e piretróides, dentre outros (Zanetti *et al.*, 2002).

Boaretto e Forti (1997), em “Perspectivas no Controle de Formigas Cortadeiras”, discutem, além do controle químico, as linhas de controle biológico já realizadas. Segundo estes autores, o controle biológico pode ser promissor, mas experimentos de campo não respondem eficientemente no controle destes insetos. O manejo integrado (MIP) também é discutido, porém há a necessidade de estudos de biologia básica em ninhos de campo para que seja possível estabelecer estratégias de MIP com formigas cortadeiras.

Controle microbiológico de formigas cortadeiras realizado por diversos autores é relatado por Kermarrec *et al.* (1986). Neste trabalho os autores discutem sobre resultados da utilização de fungos entomopatogênicos, nematóides micófagos e parasitas de insetos no controle das formigas e de seu fungo simbionte. Apesar de bons resultados iniciais em alguns trabalhos, um efetivo controle utilizando microrganismos não foi observado. Os autores discutem que estratégias mecânicas e bioquímicas das Attini para controlar patologias no ninho levam ao insucesso no controle destes insetos.

Alguns resultados no controle de formigas cortadeiras utilizando fungos entomopatogênicos foram obtidos por Diehl-Fleigh *et al.* (1993), mas a não aplicabilidade destas pesquisas até o momento evidencia a dificuldade deste tipo de controle.

Talvez a utilização do principal microrganismo parasita dos ninhos de Attini, o fungo filamentosso *Escovopsis* sp. possa fornecer bons resultados no controle microbiológico destes insetos-praga, porém ainda não há estudos com sua utilização.

A utilização de espécies vegetais tóxicas e suas substâncias ativas também é uma linha de pesquisa direcionada ao controle destes insetos. A utilização do gergelim (*Sesamum indicum*) é o caso mais clássico observado (Hebling-Beraldo *et al.*, 1991), mas outras plantas e seus compostos vêm sendo testados em laboratório, porém ainda não há efetivamente qualquer substância vegetal tóxica eleita para o controle destes organismos simbiotes em formigueiros de campo.

Em resumo, as únicas substâncias com aplicabilidade no campo para o controle destas formigas são os produtos químicos já descritos anteriormente. Levando-se em consideração prováveis efeitos nocivos ao homem e ao meio ambiente que estes produtos podem causar, associado também ao elevado índice de resistências que insetos podem desenvolver a estes produtos (Lorini e Beckel, 2002), a necessidade da pesquisa de novos produtos para o controle das formigas cortadeiras em áreas agrícolas é

urgente. E é neste campo que o investimento em estudos de inibidores enzimáticos pode ter relevante importância.

### Conclusões:

As principais conclusões obtidas neste trabalho foram:

*1. Quanto à influência das fontes de carbono no crescimento fúngico ou na indução de suas proteínas totais e das enzimas estudadas:*

*1.1.* Amido, maltose ou glicose, fornecidos separadamente ou mesclados entre si, induziram semelhantemente a formação de biomassa por *L. gongylophorus* após 30 dias de cultivo;

*1.2.* Não houve diferença quanto à variedade de proteínas produzidas por *L. gongylophorus* (detectadas em SDS-PAGE) quando este foi mantido em amido, maltose ou glicose;

*1.3.* Alfa-amilase foi mais produzida em amido e maltose, separados ou mesclados entre si e menos produzida em meios contendo glicose como fonte de carbono;

*1.4.* Maltase foi produzida somente em meios contendo amido ou maltose, separados ou mesclados entre si e totalmente inibida por glicose.

*2. Quanto à caracterização físico-química da maltase e  $\alpha$ -amilase secretadas por *L. gongylophorus* ou originária do intestino posterior de *A. sexdens* e purificadas em resinas de cromatografia líquida (troca iônica, interação hidrofóbica e exclusão molecular):*

*2.1.* Resultados resumidos na tabela abaixo:

Características Avaliadas	MALTASE		$\alpha$ -AMILASE	
	<i>L. gongylophorus</i>	<i>A. sexdens</i>	<i>L. gongylophorus</i>	<i>A. sexdens</i>
Temperatura ótima (atividade)	55°C	40°C	35°C	35°C
Temperatura de inativação	> 60°C	45°C	50°C	55°C
Temperatura de desnaturação (plote de Arrhenius)	55°C	45°C	35°C	35°C
Inativação Térmica	nd	nd	87,5% de similaridade entre as curvas	
pH ótimo (atividade)	5,0	6,0	5,0	5,0
pH ótimo (estabilidade)	4,0 a 6,0	6,0	4,0 a 6,0	4,0 a 6,0
<i>K<sub>m</sub></i>	0,94 mM	2,42 mM	0,92 mg/mL	0,84 mg/mL
PM (SDS-PAGE)	74 kDa	63 kDa	29 kDa	27 kDa
<i>Q<sub>10</sub></i>	2,2	1,4	3,4	3,3
<i>E<sub>a</sub></i>	13,0 cal/mol	16,9 cal/mol	21,2 cal/mol	21,4 cal/mol
Influência do cloreto na atividade da enzima (constante de dissociação)	nd		6,25 mM	

(*K<sub>m</sub>*) Constante de Michaelis-Menten

(PM) Peso Molecular

(*Q<sub>10</sub>*) Quociente de aumento da temperatura a cada 10°C

(*E<sub>a</sub>*) Energia de ativação

(nd) não determinado

3. *Quanto à comparação (a partir das características físico-químicas) e possível origem da maltase e  $\alpha$ -amilase presentes no intestino posterior de *A. sexdens*:*

3.1. Maltase de ambas as origens são enzimas distintas e a  $\alpha$ -amilase presente no intestino posterior das operárias de *A. sexdens* é de provável origem fúngica;

#### 4. *Conclusões finais*

4.1. A  $\alpha$ -amilase fúngica provavelmente é uma enzima estável e que permanece ativa mesmo após atravessar o intestino das operárias adultas. E esta deve ser a enzima prioritária na degradação do amido. Porém, para a completa degradação do amido foliar com enzimas do fluido fecal, a maltase fúngica não deve participar, uma vez que, se esta for ingerida pelas operárias, não resiste ao trato intestinal destas. Então, para a completa degradação do amido, a partir de enzimas presentes no fluido fecal, a principal maltase atuante seria a maltase originária do intestino dos insetos, que pode ser produzida por estes ou originária de outros microrganismos;

4.2. A participação fúngica na degradação do amido presente no substrato foliar cortado e carregado para o ninho pelas operárias consiste no fornecimento de sua  $\alpha$ -amilase às formigas, para que estas a concentrem em seu intestino posterior e a recolque no ninho através do fluido fecal, durante o tratamento do substrato foliar. Assim, além da ciclagem destas enzimas, há a garantia da degradação do amido do substrato rapidamente, produzindo glicose (metabólito formado após a sua degradação), nutriente importante para a sobrevivência de ambos os simbiontes.

*Com os resultados apresentados neste trabalho, que envolveu a determinação das principais fontes de carbono indutoras de amilases e o estudo de caracterização destas enzimas purificadas a partir das operárias de *Atta sexdens* e de seu simbionte, o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, proporcionou-se não só a comparação entre amilases secretadas por estes organismos, mas as informações básicas essenciais para futuras pesquisas na utilização destas enzimas como alvo no controle das formigas cortadeiras em áreas agrícolas.*

#### **Citações bibliográficas**

- Abril, A. B.; Bucher, E. H. (2002) Evidence that the fungus cultured by leaf-cutting ants does not metabolize cellulose. *Ecology Letters*, 5: 325-328.
- Boaretto, M.A.C.; Forti, L.C. (1997) Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. Série Técnica-IPEF, v, 11, n. 30, p. 31-46.
- Diehl-Fleish, E.; Silva, M. E.; Specht, A.; Valim-Labres, M. E. (1993) Efficiency of *Bauveria bassiana* for *Acromyrmex* spp. control (Hymenoptera: Formicidae). *Ann. Soc. Entomol. Brasil*, 22 (2):281-285.
- Doelle, H. W.; Mitchell, D. A.; Rolz, C. E. (1992) Solid substrate cultivation. London: Elsevier Applied Science. p. 29-51.

- Figueira, E. L.Z.; Blanco-Labra, A.; Gerage, A. C.; Ono, E.Y. S.; Mendiola-Olaya, E.; Ueno, Y.; Hirooka, E. Y. (2002) New amylase inhibitor present in corn seeds active in vitro against amylase from *Fusarium verticillioides*. *Plant Disease*, 87 (3): 233-240.
- Franco, O. L.; Rigden, D.; Melo, F. R.; Grossi-de-Sá, M. F. (2002) Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases structure, function and potential for crop protection. *Eur. J. Biochem.*, 269: 397-412.
- Hebling-Beraldo, M. J. A.; Bueno, O. C.; Almeida, R. E.; Silva, O. A.; Pagnocca, F. C. (1991) Influência do tratamento com folhas de *Sesamum indicum* sobre o metabolismo respiratório de *Atta sexdens rubropilosa* Forel. *Ann. Soc. Entomol. Brasil*, 20 (1): 27-33.
- Kermarrec, A.; Febvay, G.; Decharme, M. (1986) Protection of leaf-cutting ants from biohazards: is there a future for microbiological control? In: Lofgren, C.S.; Meer, R. K. V. Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management. Westview Press, p. 339-356.
- Lorini, I.; Beckel, H. (2002) Mecanismos de resistência das pragas de grãos armazenados. Folheto Técnico, Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS.
- Manjunath, P.; Shenoy, B. C.; Raghavendra-Rao, M .R. (1983) Fungal glucoamylases. *J. Appl. Biochem.*, 5: 235-260.
- Payan, F. (2004) Structural basis for the inhibition of mammalian and insect  $\alpha$ -amylases by plant protein inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta*, 1696: 171-180.
- Pereira, P. J. B.; Lozanov, V.; Patthy, A.; Huber, R.; Bode, W.; Pongor, S.; Strobl, S. (2004) Specific inhibition of insect  $\alpha$ -amylases: yellow meal worm  $\alpha$ -amylase in complex with the *Amaranth*  $\alpha$ -amylase inhibitor at 2.0 Å resolution. *Structure*, 7: 1079-1088.
- Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. (1996) *Biologia vegetal*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 13-42.
- Silva, A. (2000) Participação do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* na produção de enzimas intestinais da formiga *Atta sexdens*. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.
- Silva, A.; Bacci Jr., M.; Siqueira, C.G.; Bueno, O.C.; Pagnocca, F.C.; Hebling, M.J.A. (2003). Survival of *Atta sexdens* on different food sources. *J. Insect Physiol.* 49:307-313.
- 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 leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. *Appl Environ Microbiol*, 64 (12): 4820-4822.
- Sorensen, J. F.; Kragh, K. M.; Sibbesen, O.; Delcour, J.; Goesart, H.; Svensson, B.; Tahir, T. A.; Brufau, J.; Perez-Vandrell, A. M.; Bellincampi, D.; D'Ovidio, R.; Camardella, L.; Giovane, A.; Bonnin, E.; Juge, N. (2004) Potential role of glycosidase inhibitors in industrial biotechnological applications. *Biochim. Biophys. Acta*, 1696: 275-287.
- Zanetti, R.; Carvalho, G. A.; Santos, A.; Silva, A. S.; Godoy, M. S. (2002) Manejo Integrado de Formigas Cortadeiras (Texto Acadêmico). Lavras-MG, Editora UFLA.