

## Determinação da atividade enzimática e do número de bactérias associadas ao intestino médio da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, criada em diferentes dietas

Eduardo Gomes de Mendonça<sup>1</sup>  
Maria Goreti de Almeida Oliveira<sup>1</sup>  
Liliane Evangelista Visôto<sup>1</sup>  
Raul Narciso Carvalho Guedes<sup>1</sup>  
Fabrício Rainha Ribeiro<sup>1</sup>  
Joel Antônio de Oliveira<sup>2</sup>

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi compreender melhor a influência de diferentes dietas na produção de enzimas digestivas e no número de bactérias associadas ao intestino da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae). Ensaio qualitativos detectaram atividade de protease, amilase e lipase nos intestinos de lagartas criadas com dieta artificial e folhas de soja. Posteriormente, quantificaram-se as atividades enzimáticas para verificar se as dietas alteram o padrão enzimático do inseto durante o período larval até a fase de pré-pupa. Os dados obtidos mostraram que as dietas influenciaram o padrão enzimático durante o estágio larval. Diferenças significativas foram observadas nas atividades enzimáticas, principalmente nos primeiros instares de desenvolvimento. No estágio pré-pupal, todas as atividades enzimáticas foram significativamente menores quando comparadas ao estágio larval e não diferiram significativamente quanto às dietas administradas. A produção de amilase foi alterada pela dieta apenas nos três primeiros instares, nos quais se verificou uma diferença significativa entre as atividades, apresentando produção superior de amilase em lagartas criadas com dieta artificial. A atividade de protease apresentou o mesmo padrão entre lagartas alimentadas com dieta artificial ou com folhas de soja, com picos de atividade nos 4° e 5° instares de desenvolvimento. A atividade lipásica foi mais expressiva em lagartas alimentadas com folhas de soja do que nos alimentos com dieta artificial, apresentando uma diferença de atividade significativa em toda fase de desenvolvimento, exceto no 6° instar e no estágio pré-pupal. Não houve diferença significativa entre o número de unidades formadoras de colônias (UFC) totais e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) produtoras de protease e lipase oriundas do intestino médio de lagartas alimentadas com folhas de soja e dieta artificial. Houve uma diferença significativa apenas no número de UFC produtoras de amilase.

**Palavras chave:** Perfil enzimático, dieta artificial, soja, bactérias intestinais, protease, lipase, amilase.

### ABSTRACT

#### Determination of enzymatic activity and the bacterial number associated with the midgut of the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, reared on different diets

The aim of this work was to better understand the influence of different diets on the production of digestive enzymes and on the number of gut bacteria associated with the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Qualitative tests detected activity of protease, amylase and lipase in the midgut of caterpillars

Recebido para publicação em julho de 2007 e aprovado em dezembro de 2008

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG.

<sup>2</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG.

reared with artificial diet and leaves of soybean. Subsequently, enzymatic activities were quantified to verify whether the diets change the insect enzymatic pattern from the larval period to the pre-pupae stage. Data showed that diets influenced the pattern of enzyme activity during the larval stage. Significant differences were found for enzymatic activities mainly in the first instars of development. In the pre-pupal stage, all enzymatic activities were significantly lower when compared to the larval stage and did not differ significantly among supplied diets. The production of amylase was affected by diet only in the first three instars, in which there was a significant difference between the activities, showing greater production in caterpillars reared on artificial diet. The protease activity showed the same pattern for both caterpillars fed on artificial diet and soybean leaves, with activity peaks on the 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> instars of development. The lipase activity was more expressive in caterpillars fed with soybean leaves than on artificial diet, showing a significant difference in activity in every phase of development, except for the 6<sup>th</sup> instar and pre-pupal stage. There was no significant difference between the total number of colony-forming units (CFU) and the number of protease and lipase-producing colony-forming units (CFU) from the midgut of caterpillars treated with soybean leaves and artificial diet. There was significant difference only for the number of amylase-producing CFU.

**Key words:** Enzymatic pattern, artificial diet, soybean, gut bacteria, protease, lipase, amylase

## INTRODUÇÃO

A lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), é considerada a principal praga desfolhadora de soja (*Glycine max* L.) no Brasil (Hoffmann-Campo *et al.*, 2000). Mesmo em baixas densidades populacionais, esse inseto causa danos à lavoura de soja, que vão desde o desfolhamento até a destruição completa da planta. Esse desfolhamento compromete o enchimento das vagens, com conseqüente redução na produção dos grãos.

O uso de cultivares resistentes à lagarta-da-soja é considerado um promissor método de controle, que pode ser integrado a outros métodos no manejo da praga (Fuji *et al.*, 2005). A utilização de genes de inibidores de enzimas digestivas, para a obtenção de cultivares resistentes ao ataque de insetos, é uma excelente estratégia para esse controle. Entretanto, fazem-se necessários não só estudos elucidativos sobre a fisiologia e bioquímica da digestão em *A. gemmatilis* como, também, da caracterização das principais enzimas, produzidas no trato intestinal desse inseto (Oliveira *et al.*, 2005).

Um dos aspectos importantes no estudo bioquímico e fisiológico de pragas é a dieta utilizada na criação dos insetos. Sabe-se que o tipo de alimento oferecido na fase larval pode influenciar alguns parâmetros biológicos do inseto, bem como alterar o perfil das enzimas digestivas necessárias para a conversão do alimento ingerido e a microbiota comensal presente em seu trato intestinal (Corrêa, 2006). Nos ensaios laboratoriais, as lagartas de *A. gemmatilis* são alimentadas com dieta artificial, isto porque, embora seja possível mantê-las durante o ano todo com folhas de soja, é exigida excessiva mão-de-obra para manipulação biológica da espécie vegetal utilizada na alimentação dos insetos (Garcia *et al.*, 2006). Então,

uma alternativa é a utilização dessas dietas, que além de proporcionarem a manutenção contínua dos insetos em laboratório, permitem diminuir a mão de obra nas criações (Garcia *et al.*, 2006).

Assim, o objetivo desse trabalho foi determinar o efeito da dieta alimentar no perfil enzimático de três enzimas importantes (protease, amilase e lipase) para a digestão em *A. gemmatilis*. Foi avaliada, também, a influência das dietas sobre o número de bactérias (UCF) totais e capazes de produzir tais enzimas, associadas ao trato intestinal de lagarta-da-soja.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Enzimologia e Bioquímica de Proteínas e Peptídeos e no Laboratório de Criação de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

### *Criação do inseto*

Os ovos de *A. gemmatilis* usados nesse experimento foram obtidos da criação regular do Laboratório de Criação de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Folhas de papel que continham as posturas foram retiradas das gaiolas de criação, cortadas em tiras de 2,5 cm de largura x 10 cm de comprimento e colocadas em copos plásticos (500 mL), com um orifício circular na tampa de, aproximadamente 2 cm, fechado com filó. Esses copos foram transferidos para câmara climatizada a 25°C, com umidade relativa de 60 ± 10% e o fotoperíodo de 14 horas, em que aguardou-se a eclosão das lagartas. As lagartas eclodidas foram individualizadas em copos plásticos (50 mL) e mantidas em câmara climatizada a 25°C, com umidade relativa de 60 ± 10% e o fotoperíodo de 14 horas. Um lote de

30 lagartas foi alimentado com dieta artificial *ad libitum* (Hoffman-Campo *et al.*, 1985). Outro lote, também com 30 lagartas, foi alimentado *ad libitum* com folhas de soja, plantada em casa de vegetação, variedade CAC1, com o pecíolo coberto com um chumaço de algodão embebido em água, para evitar o ressecamento das folhas. As lagartas foram alimentadas até a fase de pupa.

### Preparo da dieta artificial

A dieta artificial foi composta de feijão cariquinho (*Phaseolus vulgaris* L.), lêvedo de cerveja, gérmen de trigo, proteína de soja, caseína, ágar e água nas proporções listadas na tabela 1. Esses ingredientes foram pesados e misturados, com o auxílio de um liquidificador industrial. A mistura foi autoclavada, por 15 minutos, à pressão de 1,5 kgf/cm<sup>2</sup> e em seguida foi transferida novamente para o liquidificador, para a adição do ácido ascórbico (6 g), ácido sórbico (3 g), nipagin (metilparabeno) (5 g), formol 40% (6 mL) e 10 mL de solução vitamínica, composta por niacinamida (1 mg), pantoenato de cálcio (1 mg), tiamina (0,25 mg), riboflavina (0,50 mg), piridoxina (0,25 mg), ácido fólico (0,25 mg), biotina (0,02 mg), inositol (20 mg). A essa nova mistura foi adicionada água (1 L), até formar uma pasta homogênea, que foi então transferida, ainda quente, para um ou dois recipientes plásticos com tampa. A pasta assim obtida foi resfriada em câmara germicida com luz ultravioleta e depois conservada em refrigerador a  $\pm 4$  °C.

**Tabela 1.** Composição da dieta artificial (Pilon, 2004) para criação de *Anticarsia gemmatalis*

Ingrediente	Concentração (g/100 g de mistura)
Feijão cariquinho (cozido)	4,80
Lêvedo de cerveja	2,4
Gérmen de trigo	3,8
Proteína de soja	3,8
Caseína	1,9
Ágar-ágar	1,34
Ácido ascórbico	0,23
Ácido sórbico	0,11
Solução vitamínica	0,38
Nipagin	0,19
Formol 40%	0,23

### Teste qualitativo para detecção de protease, amilase e lipase

#### Obtenção do extrato enzimático

A produção de amilase, lipase e protease por lagartas de 5° ínstar, criadas com folhas de soja ou em dieta artificial, foi inicialmente verificada mediante o emprego de géis com substrato adequado. Para isso, 150 mg de intestino médio de lagartas de 5° ínstar criadas com dieta arti-

ficial ou folhas de soja foram extraídos na presença de solução salina 0,85% para a obtenção do extrato enzimático. Utilizaram-se apenas lagartas de 5° ínstar, porque é nesse estágio de desenvolvimento que o inseto se alimenta mais, e conseqüentemente, a atividade de suas enzimas digestivas é maior (Pilon *et al.*, 2006).

#### Meios de cultura

A composição do meio para detecção de amilase foi de 3 g de extrato de carne, 5 g de peptona, 20 mL de solução de amido 10%, 15 g de ágar e 1 L de água destilada. O meio foi autoclavado a 121 °C, por 15 minutos. A placa foi revelada com solução de lugol (Seeley & Van Demark, 1981). O meio indicador da presença de lipase foi constituído de ágar nutriente, adicionado de 0,2% de azeite de oliva e 1 mL de triton para 250 mL de meio. O meio foi autoclavado a 121 °C, por 15 minutos. A revelação foi feita com solução de fenolftaleína 2% em NaOH 0,1 N. O meio para proteases foi preparado do seguinte modo: 4,41 g de citrato de trisódio foram dissolvidos em 1 L de água para o preparo da solução de citrato de trisódio 0,015 M. Em seguida, 23,5 g de ágar para contagem (PCA) Merck foram adicionados a 500 mL da solução de citrato. Dez gramas de caseinato de sódio foram acrescentados nos outros 500 mL da solução de citrato, utilizando um misturador magnético até sua total dissolução. A mistura das duas soluções foi autoclavada a 121 °C, por 15 minutos. Uma solução contendo 218,99 g de cloridrato de cálcio hexahidratado em 1 L de água destilada foi preparada, autoclavada e 20 mL foram adicionados ao meio liquefeito, antes que ele fosse vertido nas placas de Petri (Frank *et al.*, 1992).

Em câmara de fluxo laminar, 25 mL de cada meio foram vertidos em placas de Petri e, após geleificação, foram feitos orifícios no centro das placas, nos quais foram colocados 100  $\mu$ L do extrato enzimático de lagartas de 5° ínstar. A incubação das placas foi a 30 °C, por 24 horas. As atividades de amilases, lipases e proteases foram observadas por meio da formação de halos de clarificação ao redor dos orifícios das placas, indicando a degradação de amido, óleo e caseína, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### Análise quantitativa das atividades de amilase, lipase e protease

#### Obtenção dos extratos enzimáticos

Para a obtenção dos extratos enzimáticos, lagartas criadas com dieta artificial e com folhas de soja, de 1°, 2°, 3°, 4°, 5°, 6° ínstar e pré-pupa, foram dissecadas e seus intestinos médios foram extraídos em presença de 1 mL de HCl 10<sup>-3</sup> M a 4°C. Utilizaram aproximadamente 150 mg de intestino médio das lagartas de todos os instares. Os extratos enzimáticos foram obtidos mediante rompimento celular,

resultante de nove ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. Após os ciclos, os extratos foram centrifugados em microtubos Eppendorf® de 2 mL, a 12.000 rpm por 8 min. em temperatura ambiente. O sobrenadante, contendo o material solúvel, foi retirado e mantido a -18°C para as análises posteriores (Oliveira *et al.*, 2005).

#### **Atividade de amilase**

A atividade da amilase foi determinada utilizando-se o “kit” enzimático Bioclin®, com base na metodologia de Caraway (1959) modificada, que consiste na incubação de 10  $\mu$ L do extrato enzimático em presença de solução de amido a 0,4 g/L e monofosfato/fosfato dissódico, pH 7,0, seguindo-se a leitura da absorbância a 660 nm. A atividade da amilase foi expressa em Unidades de Amilase/dL (U/dL), sendo uma unidade de enzima definida como a quantidade de enzima que hidrolisa totalmente 10 mg de amido, em 30 minutos, a 37 °C. O experimento foi realizado em uma série de três repetições.

#### **Atividade de lipase**

A atividade da lipase também foi determinada com “kit” enzimático Bioclin®, segundo a metodologia de Cherry & Crandall (1932) modificada. Um volume de 10  $\mu$ L de extrato enzimático foi incubado em tampão Tris (hidroximetilamino metano) 100 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,5, ácido ditionitrobenzóico (DTNB), inibidor fenilmetil sulfonil fluoreto, a 37 °C, por 30 minutos. Posteriormente, acrescentou-se tributirato ditiopropanol. Após a mistura e incubação, por 30 minutos, a 37 °C, adicionou-se acetona para paralisar a reação. Após a paralisação, a mistura de reação foi centrifugada a 3.500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante levado ao espectrofotômetro para leitura da absorbância a 410 nm. A atividade foi expressa em Unidades Internacionais (UI). O experimento foi realizado em uma série de três repetições.

#### **Atividade de protease**

A atividade proteásica foi determinada pelo método de Beynon & Bond (2001), que consiste na verificação da hidrólise do substrato azocaseína, a 440 nm, pelas proteases presentes no extrato. Amostras de 150  $\mu$ L de azocaseína a 2% foram incubadas a 37 °C com 125  $\mu$ L do extrato enzimático de lagartas de *A. gemmatalis* em tampão tris-HCl, pH 8,0, por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, 600  $\mu$ L de TCA a 10% (ácido tricloroacético) foram adicionados e a mistura deixada em repouso, por 15 minutos, em banho de gelo. Depois disso, fez-se uma centrifugação, por cinco minutos, a 14.000 rpm. Do sobrenadante, transferiram-se 600  $\mu$ L para um tubo contendo 700  $\mu$ L de NaOH 0,1 M e fez-se a leitura da absorbância a 440 nm. O experimento foi realizado em uma série de três repetições.

#### **Estimativa do número de bactérias totais e produtoras de amilase, lipase e protease**

Avaliou-se a influência das diferentes dietas no desenvolvimento de bactérias totais e produtoras das enzimas amilase, lipase e protease, associadas ao trato intestinal de *A. gemmatalis*. Para isso, 10 lagartas de 5º ínstar, 5 criadas com dieta artificial e 5 criadas com folhas de soja, foram colocadas a -20 °C, por 3 minutos, para diminuir suas atividades vitais e facilitar o manuseio. Posteriormente, as lagartas foram levadas para câmara de fluxo laminar e submetidas à desinfecção superficial com álcool 70%, seguida por duas passagens em água destilada estéril. Ainda em câmara de fluxo laminar, as lagartas foram dissecadas e os intestinos médios obtidos, mergulhados em 1 mL de solução salina 0,85% estéril, onde foram macerados (Oliveira *et al.*, 2000). Após a maceração, 100  $\mu$ L das diluições seriadas (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>) foram inoculados em meio Luria-Bertaini (LB), composto por tripton (10 g), extrato de levedura (5 g), NaCl (5 g), ágar (20 g) e água destilada (1000 mL), para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) totais. Para a contagem de bactérias produtoras de protease, amilase e lipase, o mesmo volume das diluições foi semeado nos meios indicadores de degradação de proteína, de amido e azeite, mencionados anteriormente. As placas foram incubadas em BOD a 30 °C, por 24 a 48 horas, até a observação do crescimento de UFC.

#### **Análises estatísticas**

O teste t foi realizado para comparar as médias, obtidas nas análises quantitativas das atividades enzimáticas e na enumeração de UFC dos extratos intestinais de lagartas alimentadas com dieta artificial e com folhas de soja, por intermédio do procedimento PROC UNI (SAS Institute, 1989).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **Ensaio qualitativo para detecção de amilase, lipase e protease**

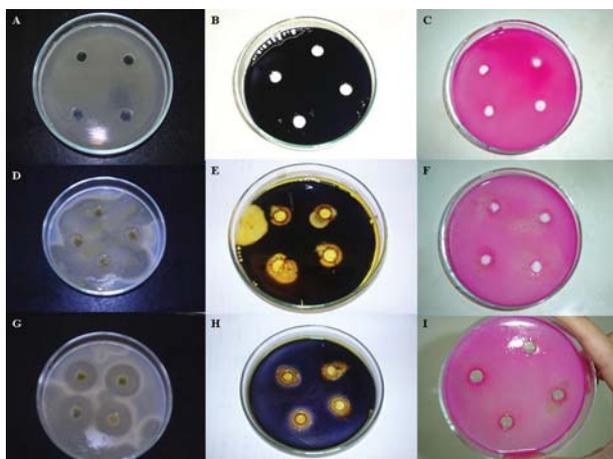
A análise qualitativa da produção de amilase, lipase e protease mostrou que lagartas de 5º ínstar alimentadas com dieta artificial e com folhas de soja produzem tais enzimas. Na figura 1, observou-se a degradação em placa de amido (E e H), de azeite (F e I) e de caseinato de cálcio (D e G), em presença do extrato intestinal; o mesmo não foi verificado no controle (A, B e C). Estes resultados foram importantes, pois justificaram a realização das análises quantitativas das atividades dessas enzimas.

O conhecimento sobre as principais enzimas produzidas no intestino de insetos é um pré-requisito para o entendimento do papel que elas desempenham no processo digestivo e, conseqüentemente, no desenvolvimento dos

insetos. Para isso, técnicas rápidas e sensíveis para detecção enzimática podem ser utilizadas como ferramentas preliminares, antes do uso de métodos mais complexos de quantificação da atividade enzimática (Lantz & Ciborowski, 1994).

Existem vários métodos de avaliação de atividade enzimática, como análises colorimétricas, uso de substrato fluorogênico, técnicas zimográficas, entre outros, (Vermelho *et al.*, 1996). A difusão radial de um extrato enzimático num gel contendo o substrato adequado permite a determinação da presença de uma enzima específica, desde que a distinção entre substrato e produto da hidrólise seja possível. Como método qualitativo, a vantagem do uso da incorporação de diferentes substratos em ágar nutriente consiste na sua simplicidade e baixo custo.

Os halos de clarificação, observados nas placas contendo amido, azeite e caseinato de cálcio, foram formados por hidrólise enzimática. Isso sugere que as enzimas advieram da própria lagarta e, possivelmente, das bactérias encontradas no intestino de *A. gemmatalis*. Esses resultados foram confirmados pelos ensaios quantitativos, em que as atividades enzimáticas foram detectadas em todo estágio de desenvolvimento larval.



**Figura 1.** Teste qualitativo de detecção de enzimas no intestino médio de lagartas de *Anticarsia gemmatalis*. Controles negativos (A, B e C), não apresentam halo de clarificação. As zonas claras ao redor dos orifícios mostram atividade de protease (D e G), amilase (E e H) e lipase (F e I) nos extratos intestinais de lagartas criadas com folhas de soja e com dieta artificial, respectivamente.

### *Análises quantitativas de amilase, lipase e protease*

As atividades de amilase, lipase e protease foram detectadas em todo ciclo larval e no estágio pré-pupal nos extratos intestinais de *A. gemmatalis* alimentadas em dieta artificial e com folhas de soja (Figura 2). As dietas influenciaram o padrão enzimático durante o estágio larval de forma que as diferenças significativas de atividade foram

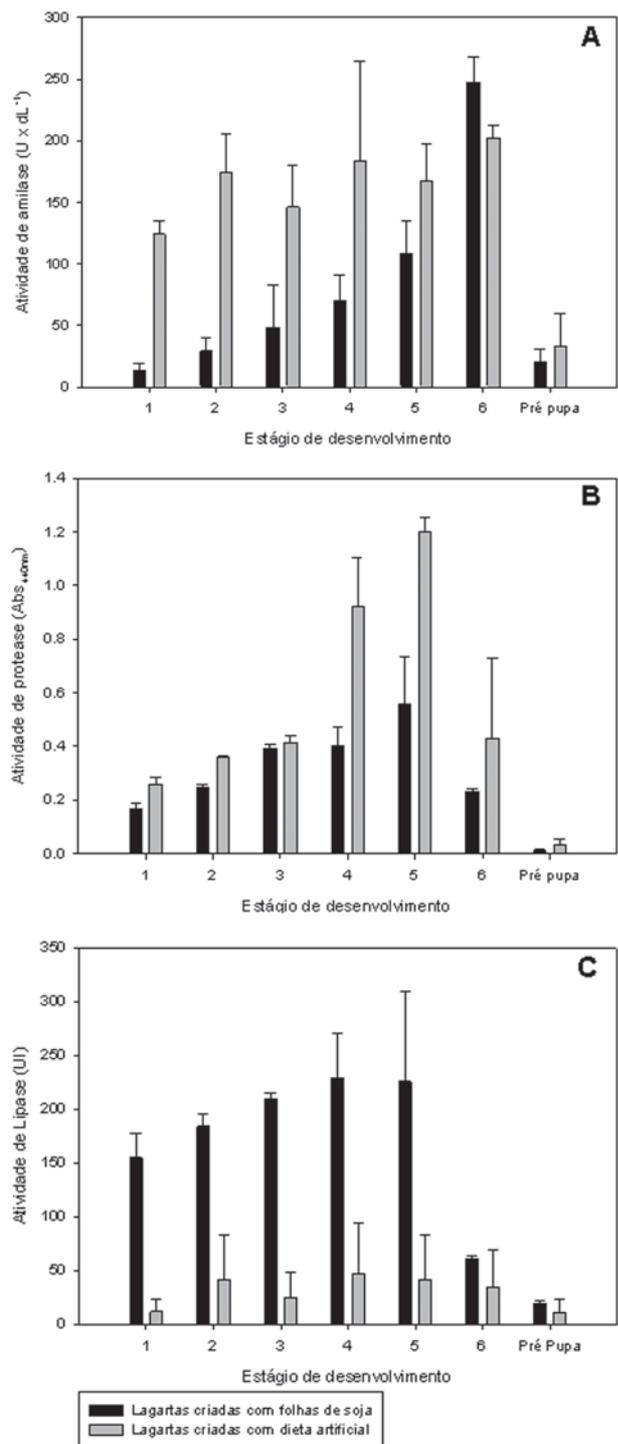
observadas principalmente nos primeiros ínstares de desenvolvimento. No estágio de pré-pupa, todas as atividades enzimáticas avaliadas foram significativamente menores (Teste t,  $P < 0,05$ ), quando comparadas ao estágio larval, e não diferiram significativamente (Teste t,  $P > 0,05$ ) quanto às dietas administradas. Isso pode ser explicado, pois no estágio pré-pupal o inseto diminui sua produção enzimática a um nível mínimo, já que cessa sua alimentação. Seus estoques energéticos, advindos do consumo alimentar durante período larval, são armazenados na forma de lipídios e usados para completar a metamorfose, sendo que a mariposa adulta ainda utiliza esses estoques na demanda de energia para reprodução e vôo (Ziegler, 1991).

A produção de amilase foi alterada pela dieta apenas nos três primeiros ínstares, em que se verificou uma diferença significativa entre as atividades (Teste t,  $P < 0,05$ ), apresentando produção superior em lagartas criadas com dieta artificial (Figura 2A). Observou-se também que, em lagartas criadas com folhas de soja, a amilase foi produzida de forma crescente, tendo um pico de atividade no 6º ínstar.

A atividade de protease apresentou o mesmo padrão para lagartas alimentadas com dieta artificial e folhas de soja, tendo picos de atividade nos 4º e 5º ínstares de desenvolvimento (Figura 2B). Oliveira *et al.* (2005) e Xavier *et al.* (2005) também verificaram que a atividade máxima de protease, presente na fração solúvel e insolúvel ligada à membrana, no intestino médio da lagarta-da-soja alimentada com dieta artificial ocorreu entre o 4º e 5º ínstares de desenvolvimento. Apesar desse padrão semelhante, verificou-se que em dieta artificial, a atividade proteolítica foi significativamente maior (Teste t,  $P < 0,05$ ) nos 1º, 2º, 4º e 5º ínstares do que em lagartas alimentadas com folhas de soja. A influência das dietas nas atividades enzimáticas de amilase e protease pode ser devido ao fato de a dieta artificial ser basicamente protéica, conter amido e não possuir fatores que possam diminuir a atividade dessas enzimas. A presença, nas folhas de soja, de inibidores enzimáticos e outros fatores antinutricionais, como lecitinas e ácido jasmônico, os quais atuam na defesa da planta contra herbivoria (Ryan & Jagendorf, 1995), podem explicar esse padrão.

A atividade lipásica foi mais expressiva em lagartas alimentadas com folhas de soja do que nas alimentadas com dieta artificial, apresentando uma diferença de atividade significativa (Teste t,  $P < 0,05$ ) em toda fase de desenvolvimento, exceto no 6º ínstar e no estágio pré-pupal (Figura 2C). Diferente resultado foi relatado por Esquivel & Felbeck (2006), que trabalhando com *Halictis rufescens* Swainson, 1822 alimentados com a dieta natural e a balanceada, observaram que a atividade lipásica do trato intestinal não foi alterada significativamente pelo tipo de ali-

mento ingerido. A atividade lipásica apresentou um pico entre os 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> ínstaes e uma redução no 6<sup>o</sup> ínstar tanto para lagartas criadas com folhas de soja como para aquelas criadas com dieta artificial. Esse padrão de atividade, observado também com a protease, pode estar relacionado com a diminuição do metabolismo digestivo da lagarta quando inicia seu ciclo pupal.



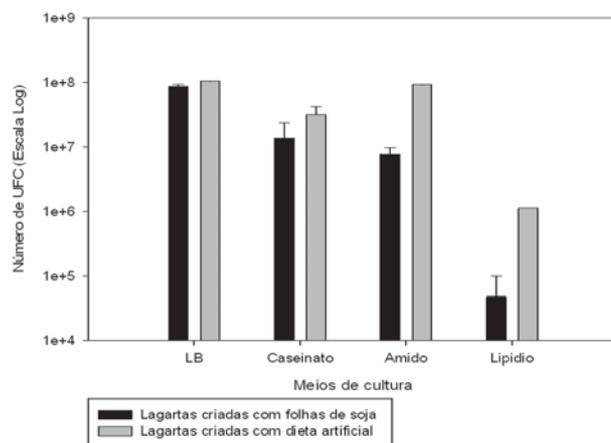
**Figura 2.** Atividade enzimática de amilase (A), de protease (B) e de lipase (C) durante o desenvolvimento de lagartas de *Anticarsia gemmatilis* criadas com folhas de soja e com dieta artificial. As linhas verticais nas barras indicam o desvio padrão das médias.

Chapman (1985) relatou que a produção de enzimas está relacionada com o consumo e com os hábitos alimentares, e também com a quantidade e tipo de alimento que passa através do trato digestivo do animal. Os dados obtidos nesse trabalho corroboram essa explicação, pois a lagarta-da-soja, provavelmente necessita consumir mais dieta do que folhas de soja e, conseqüentemente, aumentar a produção enzimática em seu trato digestivo para suprir sua necessidade metabólica e fisiológica. Assim, pode-se inferir que a dieta artificial possua um menor teor nutricional quando comparada com a de folhas de soja, uma vez que um aumento na atividade enzimática no trato intestinal é provavelmente devido à necessidade de um maior consumo e utilização do alimento em questão.

### Contagem bacteriana

Não houve diferença significativa (Test t,  $P > 0,05$ ) entre o número de UFC encontrado nos meios LB e caseinato provenientes dos tratos intestinais de lagartas tratadas com folhas de soja e com dieta artificial (Figura 3). No ágar nutriente, acrescentado com 0,2% de amido e ágar nutriente com 0,2% de azeite, verificou-se diferença significativa (Test t,  $P < 0,05$ ) no número de UFC quando comparadas às lagartas alimentadas nas diferentes dietas.

Levando em consideração a composição e a textura da dieta artificial e a das folhas de soja, acreditava-se que a proliferação bacteriana seria maior na dieta artificial que é rica em carbono, nitrogênio e outros compostos necessários para o crescimento de bactérias. Já as folhas de soja contêm aleloquímicos, como fenóis, terpenóides e taninos, os quais são tóxicos para a maioria dos microrganismos (Govenor *et al.*, 1997). Além disso, a textura das folhas é uma característica interessante que pode servir como



**Figura 3.** Estimação do número médio de bactérias aeróbias totais e produtoras de protease, amilase e lipase isoladas do intestino de *Anticarsia gemmatilis* tratadas com folhas de soja e com dieta artificial em diferentes meios de cultura. Os números foram expressos por unidades formadoras de colônia (UFC). As linhas verticais indicam o desvio padrão das médias.

um fator antibacteriano, já que apresenta certa rigidez, comparada a textura da dieta artificial.

Conforme argumenta Broderick *et al.* (2004), o estabelecimento e a manutenção de colônias bacterianas no intestino de larvas são importantes para o inseto. Vários exemplos podem ser dados sobre os efeitos benéficos de microrganismos colonizando o intestino de insetos, como a defesa contra outros microrganismos patogênicos (Dillon *et al.*, 2005), detoxificação de aleloquímicos de plantas (Arimura *et al.*, 2000), contribuição nutricional (Douglas *et al.*, 2001; Visôto, 2007) entre outros.

## CONCLUSÕES

A dieta alimentar altera o padrão enzimático de protease, amilase e lipase, principalmente nos primeiros instares de desenvolvimento da lagarta-da-soja e exerce influência, mesmo que em poucas populações, no número de bactérias associadas ao seu trato intestinal.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Arimura G, Ozawa R, Shimoda T, Nishioka T, Boland W & Takabayashi J (2000) Herbivore-induced volatiles elicit defense genes in lima bean leaves. *Nature*, 406:512-515.
- Beynon RJ & Bond JS (2001) *Proteolytic enzymes: a practical approach*, 2nd ed. Oxford, IRL Press at Oxford University Press. 340p.
- Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM & Handelsman J (2004) Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:293-300.
- Caraway WT (1959) A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. *American Journal of Clinical Pathology*, 32:97-99.
- Chapman RF (1985) Structure of the digestive systems. In: Kerkut GA & Gilbert LI. *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*, v 4. Oxford, Pergamon Press. p.165-211.
- Cherry IS & Crandall LA (1932) The specificity of pancreatic lipase: its appearance in the blood after pancreatic injury. *American Journal of Physiology*, 100:266-270.
- Corrêa FASF (2006) Criação em laboratório de *Condyllorrhiza vestigialis* (Guenné, 1854) (Lepidoptera: Crambidae) com diferentes dietas artificiais. Dissertação de mestrado. Curitiba, Universidade Federal do Paraná. 82 p.
- Dillon RJ, Vennard CT, Buckling A & Charnley AK (2005) Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecology Letters*, 8:1291-1298.
- Douglas AE, Minto LB & Wilkinson TL (2001) Quantifying nutrient production by the microbial symbionts in an aphid. *The Journal Experimental Biology*, 204:349-358.
- Esquivel ZG & Felbeck H (2006) Activity of digestive enzymes along the gut of juvenile red abalone, *Haliotis rufescens*, fed natural and balanced diets. *Aquaculture*, 261:615-625.
- Frank JF, Christen GL & Bullerman LB (1992) Tests for groups of microorganisms. 16 ed. In: Marshall RT. *Standard methods for the examination of dairy products*. New York, APHA. p. 271-286.
- Fugi CGQ, Lourenção AL & Parra, JRP (2005) Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. *Scientia Agricola*, 62:31-35.
- Garcia MS, Busato GR, Giolo FP, Manzoni C, Bernardi O, Zart M & Nunes AM (2006) Tabela de vida de fertilidade de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais. *Revista Brasileira de Agrociência*, 12:51-55.
- Govenor HL, Schultz JC & Appel HM (1997) Impact of dietary allelochemicals on gypsy moth (*Lymantria dispar*) caterpillars: importance of midgut alkalinity. *Journal of Insect Physiology*, 43:1169-1175.
- Hoffman-Campo CB, Oliveira EB & Moscardi F (1985) Criação massal de lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*). Londrina, EMBRAPA-CNPSo, 10, Documentos, 23p.
- Lantz MS & Ciborowski P (1994) Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. *Methods in Enzymology*, 235:563-594.
- Oliveira MGA, De Simone SG, Xavier LP & Guedes RNC (2005) Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140(B):369-380.
- Oliveira SMP, Moraes BA, Gonçalves CA, Giordano-Dias CM, Almeida JM, Asensi MD, Mello RP & Brazil RP (2000) Prevalência da microbiota no trato digestivo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychosidae) provenientes do campo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33:319-322.
- Pilon AM, Oliveira MGA & Guedes RNC (2006) Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86:23-29.
- Ryan CA & Jandendorf A (1995) Self defense by plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA (PNAS)*, 92:40-75.
- Seeley WW & Van Demark PJ (1981) *Microbes in action: a laboratory manual of microbiology*. San Francisco, WH Freeman. 385p.
- Vermelho AB, Meirelles MNL, Lopes A, Petinate SDG, Chaia AA & Branquinho MH (1996) Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91:755-760.
- Visôto LE (2007) Contribuição da microbiota bacteriana para o processo digestivo e desenvolvimento da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*) e caracterização de bactérias proteolíticas associadas ao seu trato intestinal. Tese de doutorado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 110 p.
- Xavier LP, Oliveira MGA, Guedes RNC, Santos AV & De Simone SG (2005) Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *European Journal of Biochemistry*, 102:147-153.
- Ziegler R (1991) Changes in lipid and carbohydrate metabolism during starvation in adult *Manduca sexta*. *Journal of Comparative and Physiology B*, 161:125-131.