



Ação antifúngica da secreção cutânea de Anfíbios–Anura da espécie *Physalaemus marmoratus* em fungos isolados de solos do Cerrado

Josué Mario Silva Assis¹ (PG) Igor G. de Oliveira² (PQ), Saulo J. L. de Siqueira² (PQ).

¹Acadêmico do curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Goiás Campus Palmeiras de Goiás. e-mail: Josuemario.silva@gmail.com

²Pesquisador, coordenador do projeto de pesquisa, docente da Universidade Estadual de Goiás Campus Palmeiras de Goiás.

Resumo

Esta pesquisa se fundamenta pelo fato de termos no Brasil a maior diversidade de anfíbios do mundo, uma oportunidade impar de desenvolver novas pesquisas, sabe-se que entre diversas funções o tecido tegumentar destes animais secreta substâncias protetoras, o espécime neste pesquisado *Physalaemus marmoratus* tem ampla distribuição geográfica possibilitando assim a chance de testarmos estas estruturas. É fato que observamos um complexo ecossistema de microrganismos presentes no solo, uma gama de bactérias, protozoários e fungos exercendo diferentes papéis funcionais, dentre eles temos fungos decompositores responsáveis pela reciclagem de nutrientes no solo, os anfíbios de forma geral estão em contato direto com estes que muitas vezes recebem o status de pragas agrícolas. Levantando assim a necessidade de pesquisarmos tais substâncias na expectativa de encontrarmos alguma substância de interesse científico. Ao observarmos a linha do tempo da ciência e tecnologia visualizamos que diversos medicamentos insumos sem contar a utilização em transgênicos são resultados de tais pesquisas. Foram realizadas armadilhas e buscas ativas por poças no município de Palmeiras de Goiás, porém não conseguimos capturar a espécie alvo de anuro, porém este trabalho isolou 4 morfotipos de fungos de solo do cerrado classificados dentre os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium* e *Mucor*.

Palavras-chave: Pesquisa. Substâncias. Utilização. Científica.

Introdução

O Brasil tem a maior diversidade de anfíbios do mundo com 1080 espécies descritas sendo que destas 1039 são Anuros (SBH, 2017). Ao ranquearmos os biomas o Cerrado fica em terceiro lugar com 209 espécies de anuros, assumindo a liderança quando o assunto é o endemismo de suas espécies, apresentando 51,7% de espécies endêmicas ao domínio (VALDUJO et al., 2012).

Atualmente, os anfíbios vêm ganhando destaque mundial, pois como animais de transição entre dois ambientes, apresentam inúmeras características adaptativas,

REALIZAÇÃO





dentre as quais se destaca o seu tegumento. A pele dos anfíbios exerce diversas funções, tais como: proteção contra abrasão, respiração cutânea, osmorregulação, termorregulação e secreção de substâncias protetoras (NASCIMENTO et al., 2003).

Physalaemus marmoratus pode ser encontrado nos estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, e também no Paraguai. Reproduz em lagoas rasas temporárias de habitats abertos. Não se adapta bem à perturbação antrópica (ANPHIBIAWEB, 2017).

Uma grande variedade e quantidade de microrganismos compõem o solo dentre eles temos os fungos responsáveis por manter o equilíbrio nutricional do solo, tendo por função a decomposição de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes (PELCZAR et al., 1997; FREITAS, et al., 2009). Tais fungos podem adquirir o status de praga agrícola, causando prejuízos aos agricultores (GHINI e NAKAMURA, 2001).

Assim, os anfíbios por serem animais terrestres e de pele úmida tendem a entrar em contato com tais fungos de solo. Por este motivo, este estudo busca observar a possível atividade antifúngica presente nas secreções cutânea da espécie *P. marmoratus* contra os fungos do solo do Bioma Cerrado.

Material e Métodos

Serão coletadas amostras de solo de Cerrado da região de Palmeiras de Goiás nos períodos úmido e seco. As amostras de solo serão coletadas a uma profundidade de 0 a 20 cm e acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em geladeira até o processamento (MONTEIRO, 2012).

Para o isolamento dos fungos, 5g de solo serão homogeneizados em 45 mL de solução salina esterilizada e incubados a 28° C por uma hora. Após esse período, a solução será diluída em série e 0,1mL da diluição 1:1000 será aplicada em placas contendo meio TLE-ágar modificado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g L⁻¹, KH_2PO_4 2,0 g L⁻¹, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4 g L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g L⁻¹, Uréia 0,3 g L⁻¹, Peptona 2 g L⁻¹ e solução



elementos traços (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) 0,1%) e ágar 15 g L^{-1} ou meio ágar batata, ambos contendo ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (MONTEIRO, 2012; DELABONA, 2011). As placas ficarão incubadas a 28°C por 7 dias ou até a esporulação dos fungos.

Diferenciação morfológica das linhagens

As linhagens serão diferenciadas a partir de seus aspectos morfológicos, como aspecto da hifa, cor, esporulação, etc. As placas serão fotografadas e os fungos com morfologia diferentes serão considerados de morfotipos diferentes.

Coleta de *P. marmoratus* e de sua secreção cutânea

Utilizaremos de forma combinada três métodos de coleta, sendo eles: levantamento em sitio de reprodução, captura por terceiros e encontros acidentais (SCOTT e WOODWARD, 1994). Os esforços de busca se concentraram nas áreas adjacentes e nos corpos de água presentes na área do Campus da UEG de Palmeiras de Goiás e em áreas da Serra da Jiboia.

Os animais serão capturados em lócus e conduzidos ao laboratório onde serão fotografados, medidos e pesados, e também será extraída a secreção por estimulação mecânica com Swab's (CARVALHO, 2008) sendo, imediatamente, esta secreção esfregada em placa de cultura contendo os morfotipos de fungos isolados. Os exemplares de anuros do estudo serão posteriormente liberados em seu local de coleta.

As placas contendo os fungos e as secreções serão seladas em papel filme e incubadas a temperatura ambiente (27°C $\pm$ 2°C) por sete dias (JESUS et al., 2015). Serão confeccionadas triplicatas de cada ensaio. Também serão utilizados controles negativos contendo somente o meio de cultura e positivos com uma substancia comprovadamente antifúngica. A análise da ação antifúngica das secreções cutâneas ocorrerá pela observação de alterações morfológicas da colônia de fungos em contato com a secreção e formação de alo de inibição (OLIVEIRA, 2014).

Para avaliação do crescimento micelial das colônias fúngicas serão realizadas medições do crescimento radial da colônia em dois eixos ortogonais, descartando-se o disco repicado da colônia pura, sendo posteriormente calculada uma média. A porcentagem de inibição do crescimento (PIC) foi obtida por meio da fórmula: PIC =



$[(\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento})/\text{diâmetro da testemunha}] \times 100$, para cada extrato em relação à testemunha (VENTUROSOS et al., 2011). A taxa de crescimento dos fitopatógenos será mensurada conforme Benício et al., 2003, onde os dados serão plotados para obtenção de uma equação de regressão linear simples ($y = a + bx$), sendo (x) os dias de incubação, (y) o diâmetro final da colônia, (a) o diâmetro inicial da colônia e (b) a taxa de crescimento micelial, determinada pelo coeficiente de regressão.

Resultados e Discussão

O projeto iniciou-se com orientação as práticas laboratoriais, inerentes aos meios de cultura necessários para este trabalho, em um primeiro momento conhecemos as vidrarias, equipamentos e as normas de segurança do laboratório, posteriormente, a disposição dos meios de culturas a ser utilizados. Em um último encontro foi orientado a forma correta de embrulhar as placas de Petri com papel e autoclavá-las como os meios de cultivos/semeadura de microrganismos através meios de repiques utilizando o cultivo sucessivo e ou, cultura contínua.

Iniciamos então a fase de Coleta de solo de Cerrado, foi realizada uma excursão a serra da jiboia na qual não estive presente e foram coletados e isolados em sacos plásticos amostras de solos e levada ao laboratório de pesquisa da UEG. A partir daí fizemos o cultivo e isolamento dos fungos, orientados pelo professor Dr. Saulo Siqueira.

Começamos então Diferenciação morfológica das linhagens e a Manutenção da micoteca para testes. Os fungos isolados do solo do cerrado e identificados quanto a seu morfotipo foram *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium* e *Mucor*.

Após todos estes processos foi iniciada a fase de coleta dos espécimes, para isso foi instalado armadilha do tipo *pitfalls trap* na área da UEG Campus Palmeiras de Goiás, estas foram monitorados pelos acadêmicos inseridos no projeto.

No mesmo período foram realizadas duas busca ativas com toda a equipe do projeto em áreas alagadas no entorno da cidade de Palmeiras de Goiás, outras excursões de busca ativa foram realizadas por todos os participantes da pesquisa. Diversos espécimes de diferentes táxons foram localizados nestas coletas, porém a espécie de interesse *P. marmoratus* não foi capturado em nem um esforço.



Considerações Finais

Fazer ciência é um desafio, nem sempre atingimos os resultados esperados. Mesmo com todo esforço amostral não foi coletada a espécie de interesse impossibilitando assim os testes finais. Considerando assim inconclusivo a ação antifúngica da secreção cutânea do *Physalaemus marmoratus*. Porém a formação científica de aprendizado de métodos de laboratório e campo foram bem aproveitados em minha trajetória acadêmica.

Agradecimentos

Agradeço a UEG Campus Palmeiras de Goiás na pessoa do professor coordenador do Projeto: Prof. M.Sc. Igor Gomes de Oliveira e ao professor Dr.Saulo Siqueira pela oportunidade de participar deste projeto de grande relevância científica e a transmissão do ensino-aprendizagem. Agradeço a Pró-Reitoria de Pesquisa (PrP) pela oportunidade da Iniciação científica.

Referências

NPHIBIAWEB, Disponível em: http://www.amphibiaweb.org/cgi/amphib_query?where-genus=Physalaemus&where-species=marmoratus. Acessado em 25/03/2017.

BENICIO, V.; ARAÚJO, E.; SOUTO, F.M.; BENICIO, M.J.; FELISMINO, D.C. **Identificação e características culturais de espécies do gênero *Aspergillus* isoladas de sementes de feijão no Estado da Paraíba**. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.28, n.2, p.180-183, 2003.

BULET, P.; STÖCKLIN, R. & MENIN, L. **Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates**. Immunol. 198, 169-184, 2004.

CARVALHO, I. F. **Atividade antinociceptiva, em dores agudas, de um novo fator opióide da secreção cutânea de *Rhinella schneideri***. 2008. 110f. Dissertação (PósGraduação)- Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

REALIZAÇÃO

PRG
Pró-Reitoria de
Graduação

PRP
Pró-Reitoria de
Pesquisa e
Pós-Graduação

PRE
Pró-Reitoria de
Extensão, Cultura e
Assuntos Estudantis



Universidade
Estadual de Goiás



DELABONA, P.S. **Bioprospecção de fungos produtores de celulases da região amazônica para a produção de etanol celulósico**. Dissertação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

FREITAS, V.L.O., et al. **Isolamento de fungos solubilizadores de fosfato e celulolíticos de uma pilha de rejeito - em processo de restauração - e no cerrado, no município de papagaio, MG**. Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil, São Lourenço – MG, set. 2009.

FROST, D.R. (2017). «Physalaemus». **Amphibian Species of the World**: an Online Reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Acessado em 03 de março de 2017.

GAMBALE, P.G., WOITOVICZ-CARDOSO, M., VIEIRA, R.R., BATISTA, V.G., RAMOS, J. & BASTOS, R.P. **Composição e riqueza de anfíbios anuros em remanescentes de Cerrado do Brasil Central**. Iheringia, Série Zoologia, Porto Alegre, 104(1): 50-58, 2014.

GANZ, T. e LEHRER, R. I. **Antimicrobial peptides of vertebrates**. Curr. Opin. Immunol.10, 41-44, 1998.

GHINI, R. e NAKAMURA, D. **Seleção de antagonistas e nutrientes que induzem supressividade de solos a Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli em microcosmos e in vivo**. Summa Phytopathologica, v.27, n.3, p.318-322, 2001.

JESUS, J.M.I., ROSA, E.V., SILVA, P., PESSOA, F.O.A.; SILVA, F.G. **VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA in vitro DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE QUINA FRENTE AO FUNGO Fusarium oxysporum**. Anais IV Congresso Estadual de Iniciação Científica do IF Goiano. Setembro, 2015

MONTEIRO, M.C.P. **Identificação de fungos dos gêneros Aspergillus e Penicillium em solos preservados do cerrado**. Dissertação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

NASCIMENTO, A. C. C.; FONTES, W.; SEBBEN, A. e CASTRO, M. S. **Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. Protein and Peptide Letters**. 10:227–238, 2003.



OLIVEIRA, C. L. **Análise in vitro da atividade de secreções cutâneas de anfíbios do Cerrado brasileiro à proliferação do fungo Batrachochytrium dendrobatidis** (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. UNB, Brasília, 2014.

PELCZAR JR; CHAN; KRIENG. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2 ed. V. 2. p. 306309, cap. 28, microbiologia do solo e do ar. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 1997.

SBH – SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. 2017. **Lista de espécies de anfíbios do Brasil**. Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/>, acesso em 03/02/2017.

SCOTT JR., N. e WOODWARD, B.D. Surveys at breeding sites, p.118-125. In: HEYER, W.R.; M.A. DONNELLY; R.W. MCDIARMID; L.C. HAYEK & M.S. FOSTER (Eds). **Measuring and Monitoring Biological Diversity** – Standard Methods for Amphibians. Washington, Smithsonian Institution Press, 364p, 1994.

VALDUJO, P.H., SILVANO, D.L., COLLI, G. & MARTINS, M. **Anuran species composition and distribution patterns in Brazilian Cerrado, a neotropical hotspot**. S. A. J. H. 7(2):63-78, 2012.

VENTUROSOS, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L. **Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos**. Summa Phytopathologica, v.37, n.1, p.18-23, 2011.