



Ensaio da ação antifúngica da secreção cutânea de Anfíbios–Anura da espécie *Physalaemus nattereri* em fungos isolados de solos do Cerrado.

Juliana A. dos Santos (IC)^{1*}, Igor G. de Oliveira² (PQ), Saulo J. L. de Siqueira² (PQ).

¹Acadêmica do curso de Ciência Biológicas, Universidade Estadual de Goiás (UEG), Campus Palmeiras de Goiás, e-mail: jjuhsantos2@gmail.com

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

Resumo: *Physalaemus nattereri* é uma espécie de ocorrência ampla no centro e sudeste do Brasil, de hábito fossorial e sazonal típico, bem adaptado a um clima continental semiárido. É uma espécie considerada estável. O solo é constituído por uma considerável variedade e quantidade de microorganismos, inclusive fungos, que desempenham papel importante no equilíbrio nutricional do solo. Foram coletadas amostras de solo de Cerrado da região de Palmeiras de Goiás nos períodos úmido e seco. Os fungos foram isolados utilizando 5g de solo homogeneizados em 45 mL de solução salina esterilizada e incubados a 28° C por uma hora. Após esse período, 0,1mL da diluição 1:1000 foi aplicada em placas contendo meio TLE-ágar modificado. Os animais coletados foram conduzidos ao laboratório para que sua secreção fosse extraída, com auxílio do *swab*, e imediatamente esfregadas nas placas contendo morfotipos de fungos isolados. Posteriormente, os animais foram devolvidos ao local em que foram coletados.

Palavras-chave: Solo. Fungos isolados. Coleta. Anfíbios. Secreção antifúngica.

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).

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 nattereri é uma espécie de ocorrência ampla no centro e sudeste do Brasil, nas planícies orientais de Santa Cruz, na Bolívia, no leste do



Paraguai e na região do alto-Paraguai. Sua escala altitudinal é de 0-1.500m. É um anfíbio de hábito fossorial e sazonal típico, bem adaptado a um clima continental semiárido presente em savana e da pastagem no bioma do Cerrado, e ocorre no chão perto dos corpos d'água permanentes e provisórios, tais como lagoas e pântanos, onde se reproduz. Não se adapta bem à perturbação antrópica. A população dessa espécie é considerada estável (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 buscou observar a possível atividade antifúngica presente nas secreções cutânea da espécie *P. nattereri* contra os fungos do solo do Bioma Cerrado.

Material e Métodos

Primeiramente foram realizados treinamentos laboratoriais para produção de meio de cultura, isolamento e cultura de fungos do solo em placas de petri e manutenção de culturas empregando o método de repique.

Foram coletadas amostras de solo de Cerrado da região de Palmeiras de Goiás nos períodos úmido e seco. As amostras de solo foram 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 foi diluída em série e 0,1mL da diluição 1:1000 foi 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 100µg/mL (MONTEIRO, 2012; DELABONA, 2011). As placas ficaram incubadas a 28°C por 7 dias ou até a esporulação dos fungos.

Utilizamos 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 do município.

As placas contendo os fungos e as secreções foram seladas em papel filme e incubadas a temperatura ambiente (27°C+/- 2°C) por sete dias (JESUS et al., 2015).

Resultados e Discussão

A partir das amostras coletadas de solo do cerrado foram isolados e identificados quatro morfotipos de fungos: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium* e *Mucor*. Estes foram repicados em placas de petri e submetidos a culturas em placas por 7 dias para observar o crescimento do fungo, notou-se que os mesmos cresceram sem contaminação demonstrando ser morfotipos isolados e estarem prontos para serem testado com a secreção do anuro.

Esperava-se encontrar atividade antifúngica da secreção cutânea de *P. nattereri* nos fungos isolados do solo do cerrado, a partir da análise dos níveis de inibição da ação da secreção em diferentes morfotipos identificar os mais susceptíveis a tal atividade antifúngica.

Assim que se iniciou o período chuvoso construímos uma armadilha de queda (*pitfall trap*), composta por quatro cavas no chão, com profundidade suficiente para colocar baldes de 20L em cada um deles, estando dispostos em linha reta, a aproximadamente 10m de distância. Feito isto, utilizamos estacas como suporte para construir uma cerca guia com 50cm de altura de um balde até o outro, para que os anfíbios fossem guiados até um dos baldes.

Como não obtivemos sucesso com a armadilha, tentamos outro método, o de busca ativa. Então, saímos para procurar em locais úmidos e alagados, próximos ao campus, à noite, pois este é o horário em que os anfíbios estão ativos. Com isso,



conseguimos encontrar algumas espécies de anuros, mas não a do gênero de interesse.

Considerações Finais

Apesar de realizar buscas ativas em locais próximos ao campus e construir armadilha de queda não obtivemos o resultado de análise da atividade antifúngica. Portanto, com a iniciação científica, pudemos vivenciar resultados na prospecção e cultivo de fungos do solo do cerrado e aprender as técnicas de repique, isolamento de fungos e identificação de fungos. Além disso, pudemos aprender a produzir e usar métodos de captura de anfíbios que foram eficazes para anuros de outras espécies.

Agradecimentos

Agradecemos, principalmente, aos técnicos de laboratório pelo apoio e disponibilidade, para estar nos orientando com relação aos procedimentos laboratoriais, e também, aos colegas de iniciação científica, afinal, trabalhamos juntos neste projeto. E, a Pró-Reitoria de Pesquisa (PrP) pela oportunidade de participar do programa de Iniciação Científica Voluntário (PIVIC) da UEG.

Referências

ANPHIBIAWEB, Disponível em:

http://www.amphibiaweb.org/cgi/amphib_query?where-genus=Eupemphix&where-species=nattereri. Acesso 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.

DELABONA, P.S. Bioprospecção de fungos produtores de celulasas 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.

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.