

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E INDUÇÃO DE FITOALEXINAS POR EXTRATOS
DE GLÂNDULAS DE ANFÍBIOS**

LIVIA DEICE RAASCH FERNANDES

**Sinop, Mato Grosso
Março, 2017**

LIVIA DEICE RAASCH FERNANDES

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E INDUÇÃO DE FITOALEXINAS POR EXTRATOS
DE GLÂNDULAS DE ANFÍBIOS**

Orientadora: Prof^ª. Dra. Solange Maria Bonaldo

Co-orientador: Prof. Dr. Domingos de Jesus Rodrigues

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Sinop, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Área de concentração: Biodiversidade

**Sinop, Mato Grosso
Março, 2017**

Ficha Catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

R111a Raasch Fernandes, Livia Deice.
Atividade antifúngica e indução de fitoalexinas por extratos de glândulas de anfíbios / Livia Deice Raasch Fernandes. -- 2017
xi, 53 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Solange Maria Bonaldo.

Co-orientador: Domingos de Jesus Rodrigues.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Sinop, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Doença. 2. Inibição. 3. Síntese. 4. Biomoléculas. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

Sinopse:

Estudou-se indução de fitoalexinas e proteínas-PR e, atividade antifúngica por extratos de secreções de anfíbios.

Aspectos como produção de fitoalexinas em cotilédones de soja, hipocótilos de feijão e mesocótilos de sorgo, atividade enzimática em cotilédones de soja, crescimento micelial, esporulação e germinação de conídios de patógenos foram avaliados.

Palavras-chave: Doença; Inibição; Síntese; Biomoléculas.

Agradecimentos

A Deus que esteve sempre comigo me protegendo e me guiando em todos os momentos e, me dando forças para nunca desistir.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, *Campus Sinop/MT* e Universidade Federal de Mato Grosso pela oportunidade de realização do mestrado, em especial à coordenação e funcionários do programa.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) pelo apoio financeiro ao projeto: FAPEMAT/Processo N° 219465/2015.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A minha orientadora, Professora Dra. Solange Maria Bonaldo pelo apoio, dedicação, competência, parceria, amizade e, acima de tudo pelo exemplo de profissional e dedicação que representa.

Ao meu esposo André Fernandes pelo amor, carinho, amizade, companheirismo e, por sempre me apoiar e amparar em momentos que fraquejei pelo cansaço. Agradeço principalmente, pela compreensão e por nunca ter me julgado ou questionado pelos dias ausentes.

Aos meus pais, Samuel Raasch e Miraídes Tesch Raasch que sempre me ensinaram e, acima de tudo, me mostraram que sempre devemos buscar nossos sonhos.

Ao meu irmão, Tarles Yan Raasch, pelo carinho e amizade que sempre compartilhamos.

Ao meus sogros Luiz e Neusa Fernandes pelo apoio e domicílio durante o período do mestrado e, além disso, pelo carinho e cuidado que sempre demonstraram desde que nos conhecemos.

Às minhas amigas, companheiras e parceiras de laboratório, Ana Gabriela Araújo Verçosa e Daiane Lopes de Oliveira, pelo carinho, amizade, atenção, ajuda, aprendizado e muitas risadas que compartilhamos durante este período e, tenho certeza que levaremos por toda vida. Nossas conversas, brincadeiras e parceria fizeram meus dias mais felizes.

A amiga Gislaine Oliveira pela amizade, carinho, ensinamentos e apoio durante este período.

Aos colegas e amigos que compartilharam informações, companhia e me incentivaram neste período, em especial à Silmara Bonani, Lisa Miron, Camila Rocco, Wisney Fontenelle e Airton Lima enfim, todos que, de alguma forma contribuíram para este projeto.

A assistente técnica do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia, Denise Emília Godois Meding, pelo apoio e assistência.

A todos os funcionários da universidade, em especial aos guardas e funcionárias dos serviços gerais que sempre dividiam o café quando a lanchonete estava fechada.

A todos meus familiares e amigos que me incentivaram e me apoiaram nesta caminhada.

Ao meu avô, Alfredo Tesch, pelo carinho, amor e ensinamentos que sempre me dedicou.

A todos os meus professores que ensinaram e compartilharam sua sabedoria, durante toda minha vida acadêmica, contribuindo assim, para realização deste sonho.

Ao Professor Dr. Domingos de Jesus Rodrigues pelo apoio, orientação e fornecimento do material a ser avaliado no estudo.

Ao Professor Dr. Gerardo Magela Vieira-Junior pelo processamento dos extratos que proporcionaram a realização da pesquisa.

Ao Professor Dr. Rafael Ferreira Alfenas pelos ensinamentos e fornecimento de material para a pesquisa.

A Professora Dra. Stela Regina Ferrarini pelo apoio, orientação e processamento dos extratos para realização do experimento.

Ao colega Bryan Wender Debiasi pelo processamento dos extratos, pela troca de conhecimento obtida durante este período e pelas informações que foram cruciais para o experimento.

Aos colegas e amigos do mestrado, pela parceria e trocas de experiências, em especial à Tagliane Puhl Heemann e Juliana Riffel pela amizade, apoio e conversas em momentos difíceis.

A todos os professores do programa de pós-graduação que compartilharam e dividiram conosco suas experiências e saberes.

“Em seu coração o homem planeja o seu caminho, mas o Senhor determina os seus passos”
Provérbios 16:9

RESUMO

A classe Amphibia possui secreções cutâneas constituídas de uma variedade de substâncias com função de proteção contra microrganismos e de predadores maiores. Estas substâncias são basicamente sintetizadas pelo metabolismo do próprio animal e tem atraído a atenção de pesquisadores pelo potencial ainda desconhecido. Portanto, os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito dos extratos brutos metanólicos obtidos a partir de secreções cutâneas de dois gêneros da família Bufonidae, PRG (espécie 1) e PRM (espécie 2) na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja, hipocótilos de feijão e mesocótilos de sorgo, atividade enzimática em cotilédones de soja e a ação sobre isolados de *Fusarium solani*, *Fusarium udum*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum truncatum*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani* e *Calonectria pseudometrosideri*. Utilizou-se concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL dos extratos de secreções da espécie 1 (PRG) e espécie 2 (PRM). Para os ensaios de fitoalexinas, aplicou-se como controle negativo (água estéril) e controle positivo (*Saccharomyces cerevisiae* 20%) e, para atividade antifúngica como controle negativo (água estéril) e controle positivo (fungicidas pyraclostrobina+metconazol e azoxistrobina+ciproconazol). Os ensaios de produção de fitoalexinas foram realizados em triplicata e os dados foram expressos em absorbância (Abs) por grama de tecido fresco (gtf). Na atividade enzimática foram utilizados cotilédones após ensaios de produção de fitoalexinas. Nos ensaios de atividade antifúngica avaliou-se crescimento micelial (CM), produção de microescleródios, esporulação (PIE), germinação de conídios (PIG) e formação de apressórios (PIA). Com base nos resultados dos extratos na síntese de fitoalexinas constatou-se que o extrato das secreções da espécie PRG proporcionou efeito supressor sobre produção de gliceolina na cultivar de soja TMG 132 RR e não apresentou ação sobre as cultivares TMG 4182 convencional e Monsoy 8372 IPRO. Para o extrato de secreções de PRM, as cultivares de soja, TMG 132 RR e Monsoy 8372 IPRO, apresentaram indução nas concentrações 0,1 e 0,2 mg/mL e 0,2 mg/mL, respectivamente. Em hipocótilos de feijão, o extrato de secreções da espécie PRG não potencializou produção de faseolina. Para a espécie PRM, houve síntese de faseolina na concentração 0,3 mg/mL em dois bioensaios realizados. Os extratos não apresentaram atividade fitoalexínica em mesocótilos de sorgo. Nos ensaios de atividade enzimática, observou-se induções do de secreções de PRG na atividade das enzimas peroxidases, polifenoloxidasas e teor de proteínas totais na cultivar de soja TMG 132 RR. No extrato da espécie de PRM houve ação indutora na atividade de peroxidases e polifenoloxidasas nas cultivares de soja Monsoy 8372 IPRO e TMG 132 RR, respectivamente. A atividade de β -1,3-glucanases nas cultivares de soja TMG 132 RR e Monsoy 8372 IPRO é reduzida conforme aumento na concentração dos extratos de secreções das espécies PRG e PRM, respectivamente. Quanto aos ensaios em fitopatógenos, o extrato de secreções da espécie PRG apresentou redução no CM e IVCM de *F. udum*, *F. solani*, *A. flavus* e *M. phaseolina* em algumas concentrações. As concentrações 0,1 e 0,2 mg/mL deste extrato induziram o CM e IVCM de *C. pseudometrosideri*. No extrato de secreções de PRM, a concentração 0,5 mg/mL, em *C. truncatum* apresentou menor IVCM. Em relação ao PIC e a esporulação, o extrato de secreções de PRG, obteve inibições em *A. flavus*, nas concentrações 0,1 e 0,5 mg/mL. A produção de microescleródios de *R. solani* foi reduzida nas concentrações 0,2 e 0,3 mg/mL do extrato de secreções da espécie PRM. Em relação à PIA, no extrato de secreções cutâneas de PRG, houve inibições de 85 a 99%, enquanto em PRM, 63 a 100%. Os resultados obtidos neste estudo apresentam efeitos promissores com aplicação de secreções cutâneas de espécies de anfíbios, demonstrando atividade elicitora e fungitóxica. Estudos complementares que possam distinguir os compostos que possuem estas ações devem ser realizados.

PALAVRAS-CHAVE: Secreções cutâneas; Atividade antimicrobiana; Metabólitos de defesa; Biomoléculas.

ABSTRACT

The class Amphibia have skin secretions consist of a variety of substances with protective function against microorganisms and larger predators. These substances are basically summarized by metabolism of the animal itself and has attracted the attention of researchers by the potential still unknown. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of crude extracts metanólicos obtained from skin secretions of two genera of the family Bufonidae, PRG (species 1) and PRM (species 2) in the induction of phytoalexins in soybean cotyledons and hypocotyl of beans and sorghum mesocotyls, enzyme activity in soybean cotyledons and, the action on isolates of *Fusarium solani*, *Fusarium udum*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum truncatum*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani* e *Calonectria pseudometrosideri*. We used concentrations of 0.1; 0.2; 0.3; 0.4 and 0.5 mg/mL of extracts of secretions of the species 1 (PRG) and species 2 (PRM). For the testing of phytoalexins, it was applied as a negative control (sterile water) and a positive control (*Saccharomyces cerevisiae* 20%) and, for antifungal activity as a negative control (sterile water) and a positive control (fungicides pyraclostrobina+metconazole and azoxystrobin + cyproconazole). The tests for the production of phytoalexins were performed in triplicate and the data were expressed as absorbance (Abs) per gram of fresh tissue (gtf). In the enzymatic activity were used cotyledons after testing of production of phytoalexins. In the trials of antifungal activity was evaluated in mycelial growth (MG), production of microescleródios, sporulation (PIS), conidial germination (SGA) and appressorium formation (PIA). Based on the results of the extracts in the synthesis of phytoalexins showed that the extract of the secretions of the species PRG provided suppressive effect on production of gliceolina in soybean cultivar TMG 132 RR and showed no action on the cultivars TMG 4182 conventional and Monsoy 8372 IPRO. For the extract of secretions of PRM, the soybean cultivars, TMG 132 RR and Monsoy 8372 IPRO, showed induction at concentrations of 0.1 and 0.2 mg/mL and 0.2 mg/mL, respectively. In hypocotyl of beans, the extract of secretions of the species PRG is not increased production of faseolina. For the species PRM, there was a synthesis of faseolina the concentration 0.3 mg/mL in two bioassays performed. The extracts showed no activity in fitoalexínica sorghum mesocotyls. In the trials of enzymatic activity, we observed the Inductions of secretions of PRG in the activity of enzymes peroxidases and polyphenoloxidasas and content of total protein in soybean cultivar TMG 132 RR. The extract from the species of PRM there was action induces the activity of peroxidases and polyphenoloxidasas in soybean cultivars Monsoy 8372 IPRO and TMG 132 RR, respectively. The activity of β -1.3-glucanases in soybean cultivars TMG 132 RR and Monsoy 8372 IPRO is reduced as the increase in the concentration of the extracts of secretions of the species PRG and PRM, respectively. As for the trials in plant pathogens, the extract of secretions of the species PRG showed a reduction in the MG and IVCM of *F. udum*, *F. solani*, *A. flavus* and *M. phaseolina* in certain concentrations. The concentrations 0.1 and 0.2 mg/mL of extract induced the MG and IVCM of *C. pseudometrosideri*. In the extract of secretions of PRM, the concentration 0.5 mg/mL, in *C. truncatum* presented minor IVCM. In relation to PIG and sporulation, the extract of secretions of PRG, inhibitions in *A. flavus*, at concentrations 0.1 and 0.5 mg/mL. The production of microescleródios of *R. solani* was reduced at concentrations of 0.2 and 0.3 mg/mL of extract of secretions of the species PRM. In relation to the sink, the extract of skin secretions of PRG, there inhibitions from 85 to 99%, while in PRM, 63 to 100%. The results obtained in this study show promising effects with application of skin secretions of amphibian species, demonstrating phytoalexins activity and fungitoxic. Complementary studies that can distinguish the compounds that have these actions should be performed.

KEY WORDS: Cutaneous secretions; Antimicrobial activity; Defense metabolites; Biomolecules.

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS	16
Secreções cutâneas de anfíbios anuros na indução de mecanismos de defesa em planta	20
Introdução	20
Material e Métodos	21
<i>Obtenção dos extratos metanólicos</i>	21
<i>Bioensaio de fitoalexinas em soja</i>	22
<i>Bioensaio de fitoalexinas em feijão</i>	22
<i>Bioensaio de fitoalexinas em sorgo</i>	22
<i>Determinação da atividade de peroxidases</i>	22
<i>Determinação da atividade de polifenoloxidasas</i>	22
<i>Determinação da atividade de β-1,3-glucanases</i>	23
<i>Determinação do teor de proteínas totais</i>	23
<i>Análises estatísticas</i>	23
Resultados	23
<i>Produção de gliceolinas em cotilédones de soja</i>	23
<i>Atividade específica de peroxidases de guaiacol (POX)</i>	24
<i>Atividade específica de polifenoloxidasas (PFO)</i>	26
<i>Atividade específica de β-1,3-glucanases</i>	28
<i>Teor de proteínas totais</i>	29
<i>Produção de faseolinas em hipocótilos de feijão e deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo</i>	31
Discussão.....	33
<i>Produção de gliceolinas em cotilédones de soja</i>	33
<i>Indução de atividade enzimática em cotilédones de soja</i>	33
<i>Produção de faseolinas em hipocótilos de feijão e deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo</i>	34
Agradecimentos.....	35
Literatura citada	35
Atividade <i>in vitro</i> de extratos metanólicos de secreções cutâneas de anfíbios sobre fitopatógenos	39
Introdução	39
Resultados e discussão	41

Conclusões	56
Material e métodos.....	56
<i>Obtenção dos extratos e isolados</i>	56
<i>Ensaio de atividade antimicrobiana</i>	56
<i>Análises estatísticas</i>	58
Agradecimentos.....	58
Referências.....	59
CONCLUSÃO GERAL	63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Produção de gliceolinas dos três bioensaios em cotilédones de soja submetidos à diferentes concentrações de PRG e PRM (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL), água estéril (0) e *Saccharomyces cerevisiae* (SC).....24
- Figura 2.** Atividade específica de peroxidases (POX) nas cultivares TMG 132 RR, Monsoy 8372 IPRO e TMG 4182 convencional submetidas à diferentes concentrações de PRG e PRM (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL), água estéril (0) e *Saccharomyces cerevisiae* (SC)26
- Figura 3.** Atividade específica de polifenoloxidasas (PFO) nas cultivares TMG 132 RR, Monsoy 8372 IPRO e TMG 4182 convencional submetidas à diferentes concentrações de PRG e PRM (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL), água estéril (0) e *Saccharomyces cerevisiae* (SC)...27
- Figura 4.** Atividade específica de β -1,3-glucanases nas cultivares TMG 132 RR, Monsoy 8372 IPRO e TMG 4182 convencional submetidas à diferentes concentrações de PRG e PRM (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL), água estéril (0) e *Saccharomyces cerevisiae* (SC).....29
- Figura 5.** Teor de proteínas totais nas cultivares TMG 132 RR, Monsoy 8372 IPRO e TMG 4182 convencional submetidas à diferentes concentrações de PRG e PRM (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL), água estéril (0) e *Saccharomyces cerevisiae* (SC).....30
- Figura 6.** Produção de faseolinas em hipocótilos de feijão e deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo submetidos à diferentes concentrações de PRG e PRM (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL), água estéril (0) e *Saccharomyces cerevisiae* (SC).....32
- Figura 7.** Crescimento micelial das colônias dos patógenos *Fusarium udum*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum truncatum*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Calonectria pseudometrosideri* submetidos ao extrato de PRG (espécie 1)43
- Figura 8.** Crescimento micelial das colônias dos patógenos *Fusarium udum*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum truncatum*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Calonectria pseudometrosideri* submetidos ao extrato de PRM (espécie 2).....47

INTRODUÇÃO GERAL

A agricultura no Brasil é, historicamente, uma das principais bases da economia do país, desde a colonização até os dias atuais. A estimativa do ano de 2017 para safra nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas, segundo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017) é de, aproximadamente, 221,4 milhões de toneladas, 20,3% em relação à safra 2016, com área à ser colhida de 59,9 milhões de hectares, apresentando acréscimo de 4,9%, frente à área colhida em 2016.

O setor agrícola no país vem apresentando produtividade crescente, safras recordes e contribuições estruturais para balança comercial (GASQUES et al., 2014). O aumento da produtividade contribuiu para competitividade e eficiência do agronegócio brasileiro e foram alcançados graças à uma verdadeira revolução tecnológica (BARROS; SILVA, 2004), mostrando que se produz mais com menos recursos (GARCIA; VIEIRA JÚNIOR, 2014).

Porém, Carvalho; Barcelos (2012) afirmam que estas novas tecnologias de cultivo e aumento da área cultivada com plantas de interesse alimentar e industrial, aliados ao incremento populacional, necessidade crescente de alimento e métodos de controle de doenças, podem acarretar em problemas fitopatológicos.

O uso de defensivos agrícolas também tem sido ferramenta importante na manutenção da produção agrícola, bem como no controle de doenças em plantas (VENTUROSOSO et al., 2010). A utilização destas medidas de controle, baseadas apenas em aplicações de fungicidas, podem propiciar seleção de isolados do patógeno insensíveis ao princípio ativo, ocasionando possíveis excessos de aplicações e acúmulos, ainda, maiores de substâncias tóxicas no meio ambiente (PERINA, 2014), forçando o homem a uma busca contínua por novos agentes químicos (CARVALHO, 2012).

Além disso, o aumento da preocupação da população no consumo de alimentos saudáveis e a preservação do ambiente, tem tornado o uso de agentes químicos uma prática questionável (NASCIMENTO et al., 2016). Esta utilização desenfreada de defensivos agrícolas começa a ser repensada e as buscas por novas tecnologias voltadas à proteção das plantas contra agentes bióticos e abióticos tem ganhado novo impulso (CARVALHO, 2006).

A resistência induzida envolve ativação de mecanismos de resistência latentes nas plantas em resposta ao tratamento prévio com agentes bióticos ou abióticos (MÜLLER, 2015). A indução de resistência pode ser realizada por diversas substâncias elicitoras de defesa vegetal, incluindo extratos de plantas medicinais e óleos essenciais com propriedades antimicrobianas e/ou indutoras de resistência (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005), bem como

extratos obtidos de basidiocarpos (DI PIERO et al., 2005), de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* (PICCININ et al., 2005) e fungos sapróbios (BOTREL, 2013).

Estes extratos de plantas ou de basidiocarpos podem ser utilizados no controle direto de fitopatógenos ou na ativação de mecanismos de defesa das plantas (ARRUDA et al., 2012), pela indução de fitoalexinas, indicando presença de compostos com características elicitoras (STANGARLIN et al., 2011a).

Plantas expostas ao agente indutor de resistência apresentam aumento na atividade de rotas metabólicas quando envolvidas na percepção da presença de patógenos em potencial, permitindo sinalização bioquímica à pontos distantes do sítio onde o sinal foi originado e, por consequência, aumento nas atividades de enzimas envolvidas na síntese de compostos antimicrobianos, tais como PR-Proteínas (MACAGNAN et al., 2008).

A produção de fitoalexinas é considerada um dos principais mecanismos de defesa das plantas, estando diretamente associada à prevenção da infecção por muitos patógenos (RIZZARDI et al., 2003). São metabólitos secundários, antimicrobianos, produzidos pela planta em resposta à estresses físicos, químicos ou biológicos (STANGARLIN et al., 2011b). O modo de ação sobre fungos inclui granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas, refletindo na inibição da germinação e na alongação do tubo germinativo e redução ou inibição do crescimento micelial (BRAGA, 2008).

As fitoalexinas possuem grande diversidade, sendo que mais de 300 tipos foram caracterizados como pisatina em ervilha, gliceolina em soja, faseolina em feijão e gossipol em algodão (TAIZ; ZEIGER, 1998), entre diferentes classes de compostos químicos, como cumarinas, diterpenos, flavonoides e dioxiantocianidinas (CAVALCANTI et al., 2005). A ativação de mecanismos de defesa, como acúmulo de fitoalexinas em soja e sorgo, indicando presença de compostos com características elicitoras nos extratos vegetais de diversas espécies, foram observadas por Bonaldo et al. (2004); Franzener et al. (2007) e Matiello et al. (2016).

Além da quantificação de fitoalexinas, a identificação da ativação de rotas de defesa vegetal é importante para desenvolvimento de estratégias de defesa vegetal (GUIMARÃES et al., 2015). Na resistência induzida existe aumento da atividade de determinadas rotas metabólicas específicas, dessa forma, o estado de indução de plantas expostas à agentes indutores pode ser confirmado por meio da análise da atividade de algumas enzimas-chave envolvidas na resistência de plantas contra patógenos (MACAGNAN et al., 2008).

Entre essas enzimas, estão quitinases, β -1,3-glucanases, fenilalanina amônia-liase (FAL) (MAZARO et al. 2015) e peroxidases (PASCHOLATI et al., 2008), que podem atuar

diretamente sobre o patógeno, ou indiretamente, pela indução de resistência no hospedeiro (STANGARLIN et al., 2011b). As alterações nas atividades dessas enzimas-chave permitem acompanhar o estado de indução de resistência em plantas expostas a patógenos (MACAGNAN et al., 2008).

Extratos brutos aquosos ou óleos essenciais têm mostrado potencial no controle de fitopatógenos por sua ação fungitóxica direta, inibindo crescimento micelial e germinação de esporos (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008) de diferentes fitopatógenos. Este controle alternativo vem se destacando devido à diversidade de substâncias bioativas, provenientes de metabólitos secundários de inúmeras plantas (SILVA et al., 2010).

A indução de resistência em plantas e o controle alternativo de fitopatógenos com utilização de substâncias oriundas de extratos de plantas, óleos essenciais e extratos obtidos a partir de cogumelos e fungos sapróbios, tem demonstrado resultados promissores.

A natureza exibe enorme variedade química, sendo capaz de criar estruturas complexas e, muitas vezes, de difícil reprodução em laboratório (PIMENTEL et al., 2015). Segundo autores, na área farmacêutica, nos últimos dois séculos, tem-se usado compostos químicos de ocorrência natural tanto como princípios ativos em si quanto como base para desenvolvimento de novas moléculas.

Atualmente, no setor de defensivos agrícolas, indústrias altamente competitivas investem em pesquisas, desenvolvimento e inovação para atender exigências do ponto de vista ambiental, de segurança e qualidade dos alimentos e da contínua necessidade de oferecer soluções para que o produtor possa continuar apresentando ganhos sucessivos de produtividade e competitividade (BNDS, 2014). Segundo Phillips (2012), mesmo para grandes companhias, que dispõem de portfólio de produtos bastante ampliado, ficou difícil encontrar algo mais original.

Como pode-se observar, diversas alternativas podem ter efeito fungitóxico sobre patógenos e, pesquisas que possam desenvolver produtos com ingredientes ativos que apresentem eficácia no controle de pragas e doenças são necessárias. Desse modo, se faz necessário, o estudo da utilização de extratos obtidos de secreções animais que possa nos dar alternativas inovadoras para diversos desafios do setor agrícola.

Dentre esses animais, a classe Amphibia possui muitas glândulas de veneno na pele que são utilizadas em sua defesa contra possíveis predadores. Entre eles, destacam-se membros, pertencentes à família Bufonidae que apresentam glândulas responsáveis pela síntese de inúmeros compostos químicos, os quais conferem proteção contra infecções por bactérias e fungos.

Estas glândulas produzem secreções, compostas por proteínas, amins biogênicas (dehidrobufotenina, N-metil-serotonina, serotonina e bufotenina) e esteroides principalmente do tipo bufodienolídeo (bufalina, helebregenina, marinobufagina, resibufogenina e telocinobufagina) (FONTANA, 2012).

Cunha Filho et al. (2005), identificaram e isolaram dois desses esteroides, marinobufagina e telocinobufagina, encontrados na secreção da parotoide da espécie *Rhinella rubescens* Lutz (citada com *Bufo rubescens*), demonstrando sua função antimicrobiana. Entretanto, estes compostos possuem potencial ainda desconhecido, que necessitam de estudos e pesquisas para análise de seus efeitos sobre fitopatógenos, podendo ser utilizado pelas indústrias químicas, como alternativa aos agroquímicos existentes ou na geração de novas moléculas fungicidas.

Dessa forma, o trabalho teve como objetivos avaliar o efeito dos extratos brutos metanólicos obtidos a partir de secreções cutâneas de anfíbios anuros, PRG (espécie 1) e PRM (espécie 2) na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja, hipocótilos de feijão e mesocótilos de sorgo, atividade enzimática em cotilédones de soja e, a ação sobre isolados de *Fusarium udum* E.J. Butler, Mem., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & W.D. Moore, *Aspergillus flavus* Link, *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. e *Calonectria pseudometrosideri* R.F. Alfenas, L. Lombard, Crous & A.C. Alfenas.

REFERÊNCIAS

- ARRUDA, R. S.; MESQUINI, R. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; NASCIMENTO, J. F. Efeito de extratos de cogumelos na indução de fitoalexinas e no controle de oídio da soja em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 2, p. 164-172, 2012.
- BARROS, G. S. C.; SILVA, S. F. **O saldo comercial do agronegócio e o crescimento da economia brasileira**. Disponível em: http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/saldo_cresc. Acesso em: 10 out. 2016.
- BNDS. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. **Avaliação do Potencial de diversificação da indústria química Brasileira**. Relatório 3 – Defensivos Agrícolas. 2014. Disponível em: http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/productos/download/aep_fep/chamada_publica_FEPprospec0311_Defensivos.pdf. Acesso em: 16 nov. 2016.
- BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSMANN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 128-134, 2004.
- BOTREL, D. A. **Fungos sapróbios como agentes de biocontrole da mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *Garcae*) no cafeeiro**. 2013. 61f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2013.
- BRAGA, M. R. Fitoalexinas. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, p.305-346, 2008.
- CARVALHO, N. L. Resistência genética induzida em plantas cultivadas. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 7, n. 7, p. 1379-1390, 2012.
- CARVALHO, N. L.; BARCELLOS, A. L. Adoção do manejo integrado de pragas baseado na percepção e educação ambiental. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 5, n. 5, p. 749-766, 2012.
- CARVALHO, P. R. Avaliação do uso de ácido salicílico em sementes de calêndula (*Calendula officinalis* L.) sob diferentes estresses. 2006. 41f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, 2006.
- CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STARGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005, 263p.
- CUNHA FILHO, G. A.; SCHWARTZ, C. A.; RESCK, I. S.; MURTA, M. M.; LEMOS, S.; CASTRO, M. S.; KYAW, C.; PIRES JÚNIOR, O. R.; LEITE, J. R. S.; BLOCH, C.; SCHWARTZ, E. F. Antimicrobial activity of bufadienolides marinobufagin and

telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of toad *Bufo rubescens*. **Toxicon**, v. 45, n. 6, p. 777-782, 2005.

DI PIERO, R. M.; GARCIA JÚNIOR, D.; TONUCCI, N. M. Indutores bióticos. In: CAVALCANTI L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba SP. FEALQ, 2005, 358p.

FONTANA, P. L. M. **Estudo morfológico comparativo do sistema de defesa química cutânea em duas espécies de sapos amazônicos (*Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus*)**. 2012. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto Butantan, São Paulo, SP, 2012.

FRANZENER, G.; FRANZENER, A. S. M.; STANGARLIN, J. R.; CZEPAK, M. P.; SCHWANESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 29-38, 2007.

GARCIA, J. R.; VIEIRA JÚNIOR, J. E. R. Política agrícola brasileira: Produtividade, inclusão e sustentabilidade. **Revista de Política Agrícola**, v. 23, n. 1, p. 91-104, 2014.

GASQUES, J.; BASTOS, E.; VALDES, C.; BACCHI, M. Produtividade da agricultura: Resultados para o Brasil. **Revista de Política Agrícola**, v. 23, n. 3, p. 87-98, 2014.

GOMES, G. G. **Biodiversidade como fonte de desenvolvimento para a indústria farmacêutica: Uma análise crítica ao atual marco regulatório de acesso e repartição de benefícios**. 2011. 100f. Monografia (Curso de Altos Estudos de Política e Estratégia). Escola Superior de Guerra. Rio de Janeiro, RJ, 2011.

GUIMARÃES, S. S.; MAZARO, S. M.; FREDDO, Á. R.; WAGNER JÚNIOR, A. Potencial de preparados de cavalinha (*Equisetum* sp.) na síntese de metabólitos de defesa em cotilédones de soja (*Glycine max* L.) e o efeito sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani* Kuhn, *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.17, n.1, p.143-149, 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola 2017**. Disponível em: <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias.html?view=noticia&id=1&idnoticia=3373&busca=1&t=janeiro-ibge-preve-safra-20-3-maior-2017>. Acesso em: 24 fev. 2017.

MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R. S.; BARACAT-PEREIRA, M. C. LANNAFILHO, R.; BATISTA, G. S.; POMELLA, A. W. V. Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacauete expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 1, p. 34-37, 2008.

MATIELLO, J.; RAASCH-FERNANDES, L. D.; BERBER, G. C. M.; TRENTO, R. M.; BONALDO, S. M. Síntese de fitoalexinas em soja e sorgo por extratos e tinturas pertencentes a três espécies florestais. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 9, n. 3, p. 617-633, 2016.

MAZARO, S. M.; BORSATTIL, F. C.; DALACOSTA, N. L.; LEWANDOWSKI, A.; DANNER, M. A.; BUSSO, C.; WAGNER JUNIOR, A. Qualidade pós-colheita de acerolas

tratadas com ácido salicílico. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 4, p. 512-517, 2015.

MÜLLER, I. **Indução de resistência e tratamento de sementes de soja com fosfitos de potássio**. 2015. 118f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, PR, 2015.

NASCIMENTO, C. A. C.; DOURADO, D. P.; MARX, F.; SILVA, R. C.; SOUSA, M. K.; MURASHI, C. T. Diferentes concentrações da essência do café no controle micelial de *Sclerotium rolfsii*. **Revista Integralização Universitária**, v. 11, n. 14, p.123-127, 2016.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. Brasil. 1 ed. 2008, 627p.

PERINA, F. J. **Óleos essenciais e frações majoritárias ativas no controle da mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata*) em tangerina ponkan**. 2014. 112f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2014.

PHILLIPS, M. Novas moléculas para a agricultura. Pesquisa e desenvolvimento. **Agroanalysis**. 2012. Disponível em: <http://bibliotecadigital.fgv.br/ojs/index.php/agroanalysis/article/viewFile/24464/23239>. Acesso em: 16 nov. 2016.

PICCININ, E.; DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 5-9, 2005.

PIMENTEL, V.; VIEIRA, V.; MITIDIERI, T.; FRANÇA, F.; PIERONI, J. P. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES**, v. 43, n. 1, p. 42-89, 2015.

RIZZARDI, M. A.; FLECK, N. G.; AGOSTINETTO, D.; BALBINOT JÚNIOR, A. A. Ação de herbicidas sobre mecanismos de defesa das plantas aos patógenos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 957-965, 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 125-138, 2005.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Ed.). **Interação planta patógeno – fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, p. 227-248, 2008.

SILVA, M. B.; MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; VENZON, M.; FONSECA, M. C. M. Uso de princípios bioativos de plantas no controle de fitopatógenos e pragas. **Informe Agropecuário**, v. 31, n. 255, p. 70-77, 2010.

STANGARLIN, J. R.; J. R.; KUHN, O. J.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Org.). **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. 1 ed. Badajoz: Formatex Research Center, v. 2, p. 1033-1042, 2011a.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011b.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 2ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1998, 792p.

VENTUROSOSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; PONTIM, B. C. A.; CONUS, L. A. Influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 499-505, 2010.

Secreções Cutâneas de Anfíbios Anuros na Indução de Mecanismos de Defesa em Plantas

O uso de elicitores na indução de resistência em plantas pode gerar alterações metabólicas como produção de fitoalexinas e mudanças na atividade enzimática, conduzindo o hospedeiro à respostas de defesa contra fitopatógenos. Diversos são os elicitores com potencial de ativar estas respostas de defesa química de natureza complexa em algumas plantas. As secreções cutâneas produzidas por anfíbios anuros possuem amplo espectro de atividade antibacteriana e antifúngica e podem ser fonte de compostos químicos ainda não explorados na síntese de metabólitos de defesa. Dessa forma, avaliou-se o potencial de extratos metanólicos de secreções cutâneas de duas espécies de anfíbios da ordem Anura encontrados no bioma amazônico, PRG (espécie 1) e PRM (espécie 2) na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja, hipocótilos de feijão e mesocótilos de sorgo e, atividade enzimática de β -1,3-glucanase, peroxidases (POX), polifenoloxidasas (PFO) e teor de proteínas totais em cotilédones de soja. Os resultados demonstram que o extrato PRG proporcionou efeito supressor sobre produção de glicéolinas e, aumento na atividade das enzimas peroxidases, polifenoloxidasas e no teor de proteínas totais na cultivar TMG 132 RR. Para o extrato PRM, as cultivares TMG 132 RR e Monsoy 8372 IPRO apresentaram indução nas concentrações 0,1 e 0,2 mg/mL e 0,2 mg/mL, respectivamente. Na atividade enzimática, o extrato PRM induziu atividade específica de peroxidases e polifenoloxidasas nas cultivares Monsoy 8372 IPRO e TMG 132 RR, respectivamente. A atividade de β -1,3-glucanases nas cultivares TMG 132 RR e Monsoy 8372 IPRO é reduzida conforme aumento da concentração dos extratos PRG e PRM, respectivamente. Verificou-se que em hipocótilos de feijão, o extrato PRG não potencializou a produção de faseolinas. Para o extrato PRM houve síntese de faseolinas na concentração 0,3 mg/mL em dois bioensaios realizados. Os extratos não apresentaram indução na síntese de deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo. Os extratos de secreções cutâneas das duas espécies de anfíbios anuros tem ação na produção de metabólitos de defesa em plantas.

Palavras-chave: Metabólitos secundários, síntese, elicitores, controle alternativo.

O uso de agrotóxicos tem sido ferramenta importante na manutenção da produção agrícola, bem como no controle de doenças em plantas (Venturoso et al. 2010). A utilização destas medidas de controle, baseadas apenas em aplicações de fungicidas, podem propiciar seleção de isolados de patógenos insensíveis ao princípio ativo, ocasionando possíveis excessos de aplicações e acúmulos, ainda, maiores de substâncias tóxicas no meio ambiente (Perina 2014).

Alternativas de produção de alimentos saudáveis sem resíduos de agroquímicos, com menor impacto possível ao ambiente, de maneira econômica e socialmente sustentável tem sido uma busca de vários agricultores (Toledo et al. 2015). Assim, a indução de mecanismos de defesa latentes na própria planta tem sido considerado como forma de controle alternativo de doenças em substituição ao uso de pesticidas (Stangarlin et al. 2010).

Esta indução de resistência é desencadeada em resposta à moléculas eliciadoras (ou elicitoras) que podem ser de natureza biótica (como microrganismos viáveis ou inativados ou de origem natural, como os extratos de plantas medicinais) (Stangarlin et al. 2008) ou abiótica de origem sintética, como ácido aminobutírico, ácido salicílico, ácido jasmônico e acibenzolar-S-metil (Sobrinho et al. 2005).

Essa resposta de indução, pode incluir, por exemplo, acúmulo de fitoalexinas (compostos tóxicos aos fungos e bactérias) (Carvalho 2012) e, proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas), responsáveis pelas maiores mudanças quantitativas nos teores de proteína solúvel durante as respostas de defesa (Stintzi et al. 1993), protegendo a planta contra infecções subsequentes com patógenos.

As fitoalexinas apresentam natureza química variada, são antibióticos com baixa especificidade e seu modo de ação inclui diversos efeitos citológicos que culminam na inibição do crescimento ou morte do patógeno (Pascholati et al. 2008), através da desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas, podendo ocorrer próximos ao local da tentativa de penetração (Peiter-Benincá et al. 2008).

As PR-proteínas são induzíveis no hospedeiro em resposta à infecção por um patógeno ou por estímulos abióticos, e podem estar correlacionadas com a resistência não específica do hospedeiro ao patógeno (Linthorst 1991). Entre essas enzimas, estão quitinases, β -1,3-glucanases, fenilalanina amônia-liase (FAL) (Mazaro et al. 2015) e peroxidases (Pascholati et al. 2008), que podem atuar diretamente

sobre o patógeno (inibição do crescimento ou da germinação de esporos do patógeno), ou indiretamente, pela indução de resistência no hospedeiro (Stangarlin et al. 2011).

A indução de resistência em plantas com utilização de indutores de resistência oriundos de extratos de plantas, óleos essenciais e extratos obtidos de basidiocarpos, tem demonstrado resultados promissores. Entre estes estudos se destacam os de Guimarães et al. (2015) que avaliaram potencial de preparados de cavalinha (*Equisetum* sp.) na síntese de metabólitos de defesa em cotilédones de soja (*Glycine max*) e Telaxka et al. (2014) que observaram efeito de preparados homeopáticos de óleo essencial de *Eucalyptus globulus* na indução de faseolina em hipocótilos estiolados de feijão.

Matiello e Bonaldo (2013) obtiveram resultados com potencial elicitador, utilizando-se de extratos brutos aquosos e tinturas das espécies medicinais *Ruta graveolens*, *Origanum majorana* e *Baccharis trimera* em cotilédones de soja e mesocótilos de sorgo. Matiello et al. (2016) também avaliaram extratos brutos aquosos e tinturas das espécies das espécies florestais *Hymenolobium petraeum*, *Qualea albiflora* e *Corymbia citriodora* com resultados na síntese de gliceolina em cotilédones de soja e deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo.

Arruda et al. (2012) observaram potencial dos extratos aquosos dos basidiocarpos de *Agaricus blazei*, *Lentinula edodes* e *Pycnoporus sanguineus* na indução de fitoalexinas em soja. O potencial indutor de fitoalexinas também foi analisado com produtos à base de levedura *Saccharomyces boulardii* em mesocótilos de sorgo e cotilédones de soja (Stangarlin et al. 2010).

Mazaro et al. (2012) observaram que os indutores quitosana e Acibenzolar-S-Metil são capazes de atuar na resistência sistêmica adquirida em morangueiro, ativando as PRs-proteínas β -1,3-glucanase e quitinase. Paula et al. (2015), avaliando extrato e frações obtidas das folhas de *Bauhinia unguolata*, observaram alterações na produção das enzimas α -amilase, peroxidase, catalase e polifenol oxidase em, ao menos, uma das concentrações testadas em plântulas de alface (*Lactuca sativa*). Curvêlo et al. (2013) constataram que o silício (Si) tem efeito na atividade das enzimas peroxidases (POX), polifenoloxidases (PFO), quitinases (QUI), β -1,3-glucanases (GLU) e fenilalanina amônia-liases (FAL), aumentando a resistência em plantas de algodoeiro à mancha de ramulária (*Ramularia areola*).

Como pode ser observado, diversas substâncias podem apresentar ação elicitora e a variada natureza química dos elicitores demonstram que não há uma característica estrutural única que determine esta atividade (Pascholati et al. 2008), podendo atuar de maneira sinérgica, pela atuação de dois ou mais elicitores (Dixon e Lamb 1990). Dessa forma, várias substâncias precisam ser analisadas e seu potencial elicitador testado.

Uma destas substâncias, com potencial ainda desconhecido é a secreção cutânea produzida pelos anfíbios, especialmente nos sapos pertencentes à família Bufonidae que apresentam glândulas responsáveis pela síntese de grande diversidade de compostos químicos. Essas substâncias conferem proteção contra infecções por bactérias e fungos, bem como contra predadores. Dessa forma, buscou-se avaliar o potencial de extratos metanólicos de secreções cutâneas de duas espécies de anfíbios anuros encontradas no bioma amazônico, PRG (espécie 1) e PRM (espécie 2) na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja, hipocótilos de feijão e mesocótilos de sorgo e, atividade enzimática de β -1,3-glucanases, peroxidases (POX), polifenoloxidases (PFO) e teor de proteínas totais em cotilédones de soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos extratos metanólicos. As secreções cutâneas de duas espécies de anuros, PRG (espécie 1) e PRM (espécie 2), foram coletadas pela equipe de biólogos da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Campus Sinop (MT/ Brasil) sob coordenação do Prof. Dr. Domingos de Jesus Rodrigues (Licença de coleta do IBAMA nº 30034-1), secas em sílica gel dessecante, extraído três vezes em metanol e evaporado em evaporador rotatório para obtenção do extrato metanólico. Os extratos brutos obtidos foram pesados, diluídos em água estéril na concentração de 0,8 mg/mL e, submetidos à filtração em membrana Millipore® (0,22 μ m) para então serem diluídas nas concentrações desejadas. Para os tratamentos foram utilizadas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL do extrato metanólico (PRG e PRM), água estéril (controle negativo) e *Saccharomyces cerevisiae* (20%) proveniente do fermento comercial da Fleischmann® (controle positivo). Os ensaios foram realizados em triplicata contendo sete tratamentos/ensaio e cinco repetições/tratamento.

Bioensaio de fitoalexinas em soja. Sementes de soja (*Glycine max*) foram selecionadas de acordo com utilização dos produtores da região Central do Brasil. Após seleção das principais cultivares de soja, optou-se por materiais genéticos distintos, Monsoy 8372 IPRO (transgênica RR2), TMG 132 RR (transgênica RR1) e TMG 4182 (convencional) para verificar existência de variabilidade na resposta de indução de gliceolina quanto ao genótipo da cultivar. Sementes das três cultivares foram semeadas em areia esterilizada e germinadas em temperatura ambiente. Após período de sete dias, os cotilédones foram destacados das plântulas, lavados em água destilada, secos, pesados e cortados em seção aproximada de 1 mm de espessura e 6 mm de diâmetro a partir da superfície inferior. Os cotilédones foram pesados e alocados em placa de Petri com papel filtro umedecido com água estéril, com cinco cotilédones para cada repetição. Sobre cada cotilédone foi aplicado uma alíquota de 75 μL de cada tratamento. As placas de Petri foram mantidas a 25°C no escuro por 20 h. Passado o tempo estabelecido os cotilédones foram transferidos para tubos de ensaio contendo 15 mL de água estéril e deixados em agitação por 1 h para extração da gliceolina e a absorbância foi determinada a 285 nm (Ziegler e Pontzen 1982). Os dados foram expressos em absorbância por grama de tecido fresco (Abs.gtf^{-1}). Após esta etapa, os cotilédones foram enrolados em papel alumínio e congelados a -20°C para avaliação de atividade enzimática.

Bioensaio de fitoalexinas em feijão. A determinação da indução de fitoalexinas em feijão (*Phaseolus vulgaris*) foi realizada conforme metodologia proposta por Dixon et al. (1983), com algumas modificações. Sementes de feijão (ANFc 9) foram desinfestadas em água sanitária 1% durante cinco minutos, lavadas em água estéril, semeadas em areia esterilizada e mantidas no escuro em estufa. Após seis dias, foram cortados aproximadamente 5 cm dos segmentos de hipocótilos estiolados das plântulas, lavados em água estéril e secos em papel absorvente. Quatro segmentos de hipocótilo foram utilizados para cada repetição, sendo transferidos para placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água estéril, aplicando-se alíquota de 1 mL de cada tratamento/repetição. As placas de Petri foram mantidas à 25°C no escuro por 48 horas quando, os hipocótilos foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de etanol e mantidos a 4°C por 48 horas. Após este período, foram agitados por uma hora para a extração da faseolina com absorbância de 280 nm. Os dados foram expressos em absorbância por grama de tecido fresco (Abs.gtf^{-1}).

Bioensaio de fitoalexinas em sorgo. Sementes de sorgo (*Sorghum bicolor*), híbrido A9735R (Nidera), tratadas com dicarboximida (Captan 200FS), foram desinfestadas em água sanitária 1% durante 15 minutos, lavadas em água estéril e embebidas em água sob temperatura ambiente durante 24 horas. Após este processo as sementes foram enroladas em folhas de papel de germinação umedecidos e incubadas no escuro a 28°C por aproximadamente 6 dias. As plântulas geradas ficaram expostas a luz por 4 horas para paralisar a elongação dos mesocótilos. Os mesocótilos foram excisados e colocados em tubo de ensaio (três mesocótilos/repetição), contendo 1 mL de cada tratamento/repetição e, mantidos em câmara úmida a 25°C sob luz fluorescente por um período de 60 horas (Wulff 1997). Após este período, foram retirados dos tubos, a porção superior seca, pesada e cortada em pequenos segmentos. Estes segmentos foram colocados em tubos para micro centrífuga contendo 1,4 mL de metanol 80% acidificado (0,1% HCl; v/v) e mantidos a 4°C por 96 horas. A absorbância para determinação de deoxiantocianidinas foi realizada à 480 nm. Os dados foram expressos em absorbância por grama de tecido fresco (Abs.gtf^{-1}).

Determinação da atividade de peroxidases. Os cotilédones foram maceradas em cadinho de porcelana com auxílio de nitrogênio líquido, adicionando-se 4 mL de tampão fosfato. O material centrifugado à 14500 (SPEED) por 30 min, de 4 a 6°C. O sobrenadante das amostras foi retirado e armazenado em congelador. A atividade da peroxidases foi determinada diretamente pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol, misturando 20 μL do extrato enzimático à 2,9 mL de substrato preparado com 80 μL de guaiacol e 122,4 μL de peróxido em 40 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) (Lusso e Pascholati 1999). A atividade das peroxidases foi determinada a 30°C e realizada em espectrofotômetro a 470 nm, durante 2 min em intervalos de 10 s. Os resultados de atividade específica foram expressos em unidade de absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. O teor de peroxidase foi determinado conforme Bradford (1976).

Determinação da atividade de polifenoloxidasas. A atividade de polifenoloxidasas foi determinada conforme Duangmal e Apenten (1999) com modificações, consistindo em quantificar a oxidação do catecol convertido em quinona. O extrato enzimático foi obtido com adição de 12 mL de tampão polifenol e 0,0264 g de catecol, mantendo em banho-maria a 30°C por 30 min. O substrato foi composto

por catecol, na concentração de 20 mM, dissolvido em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8). A solução foi obtida com homogeneização de 980 μ L do substrato e 20 μ L do extrato enzimático. A reação foi conduzida à temperatura de 30°C, acompanhada de leituras em espectrofotômetro a 420 nm, de forma direta por um período de 2 min. A determinação de proteínas foi feita segundo Bradford (1976) e expressos em absorvância min^{-1} mg de proteína⁻¹.

Determinação da atividade de β -1,3-glucanases. A atividade de β -1,3-glucanases foi realizada pela quantificação de açúcares redutores liberados a partir da hidrólise do substrato laminarina pelo método descrito por Vogelsang e Barz (1999). Utilizou-se 30 μ L do extrato enzimático juntamente com 120 μ L de tampão fosfato de extração com adição de 150 μ L de laminarina (2 mg/mL) em tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0). Como controle, utilizou-se a mesma reação, adicionando-se laminarina, imediatamente antes da determinação de açúcares (sem incubação). A reação foi conduzida a 40°C por 1 hora em banho-maria. Para isso, foi retirada uma alíquota de 30 μ L dos tubos incubados e adicionado 1,5 mL de solução de hidrazida do ácido p-hidroxibenzoico (PAHBAH) 0,5% em NaOH 0,5 M. A mistura foi mantida a 100°C por 5 min e resfriada em banho de gelo. A leitura das absorvâncias foi realizada a 410 nm em espectrofotômetro, descontando-se os valores de absorvância do branco. Para determinação de quantidade de açúcares, empregou-se curva-padrão de concentrações de glicose. Os valores foram expressos em equivalente mg de glicose h^{-1} mg proteína⁻¹.

Determinação do teor de proteínas totais. Nas análises de proteínas totais empregou-se o método proposto por Bradford (1976). O extrato enzimático foi adicionado em tubos de ensaio juntamente com o reagente Bradford, com 50 μ L da amostra e 2,5 mL do reagente de Bradford, sob agitação em Vortex. Como referência utilizou-se 50 μ L de água destilada e 2,5 mL de reagente Bradford. Após cinco minutos foi feita leitura em espectrofotômetro com absorvância à 595 nm. Os valores de absorvância foram plotados em curva padrão de concentrações de albumina de soro bovino (ASB) de 0 a 4,0 mg/mL e a concentração de proteínas expressa em mg proteína mL^{-1} de peso fresco.

Análises estatísticas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e os dados analisados com auxílio do programa SISVAR 4.3 (SISVAR; <http://www.dex.ufla.br/~danielff/programas/sisvar.html>). Para ensaios de fitoalexinas, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), aplicando-se teste F e, as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Na avaliação de atividade enzimática os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), aplicando-se teste F, e, quando significativos ($p < 0,05$), realizou-se análise de regressão, ajustando equações de regressão (R^2). O tratamento de *S. cerevisiae* foi utilizado como padra de comparação para atividade específica de cada cultivar.

RESULTADOS

Produção de gliceolinas em cotilédones de soja. Para as cultivares Monsoy 8372 IPRO e TMG 4182 convencional, nos três bioensaios, não houve produção de gliceolinas nas concentrações dos extratos metanólicos de secreções cutâneas de PRG em relação ao controle negativo (Fig. 1A e 1C). Nas duas cultivares o tratamento *S. cerevisiae* estimulou produção de gliceolinas. Para cultivar TMG 132 RR (Fig. 1B), nos bioensaios 1 e 3 houve indução de suscetibilidade nos cotilédones nas concentrações 0,1; 0,2; 0,5 e 0,1; 0,2; 0,3 mg/mL, respectivamente.

O extrato metanólico de secreções cutâneas da espécie 2 (PRM), no terceiro bioensaio obteve diferença significativa ($p < 0,05$) na síntese de gliceolinas na concentração 0,2 mg/mL, na cultivar Monsoy 8372 IPRO (Fig. 1D) e, nas concentrações 0,1 e 0,2 mg/mL na cultivar TMG 132 RR (Fig. 1E), comparado ao controle negativo. Na cultivar TMG 4182 convencional não houve efeito do extrato sobre produção de gliceolinas (Fig. 1F). Para todas cultivares, o tratamento à base de *S. cerevisiae* proporcionou aumento significativo na síntese de gliceolinas.

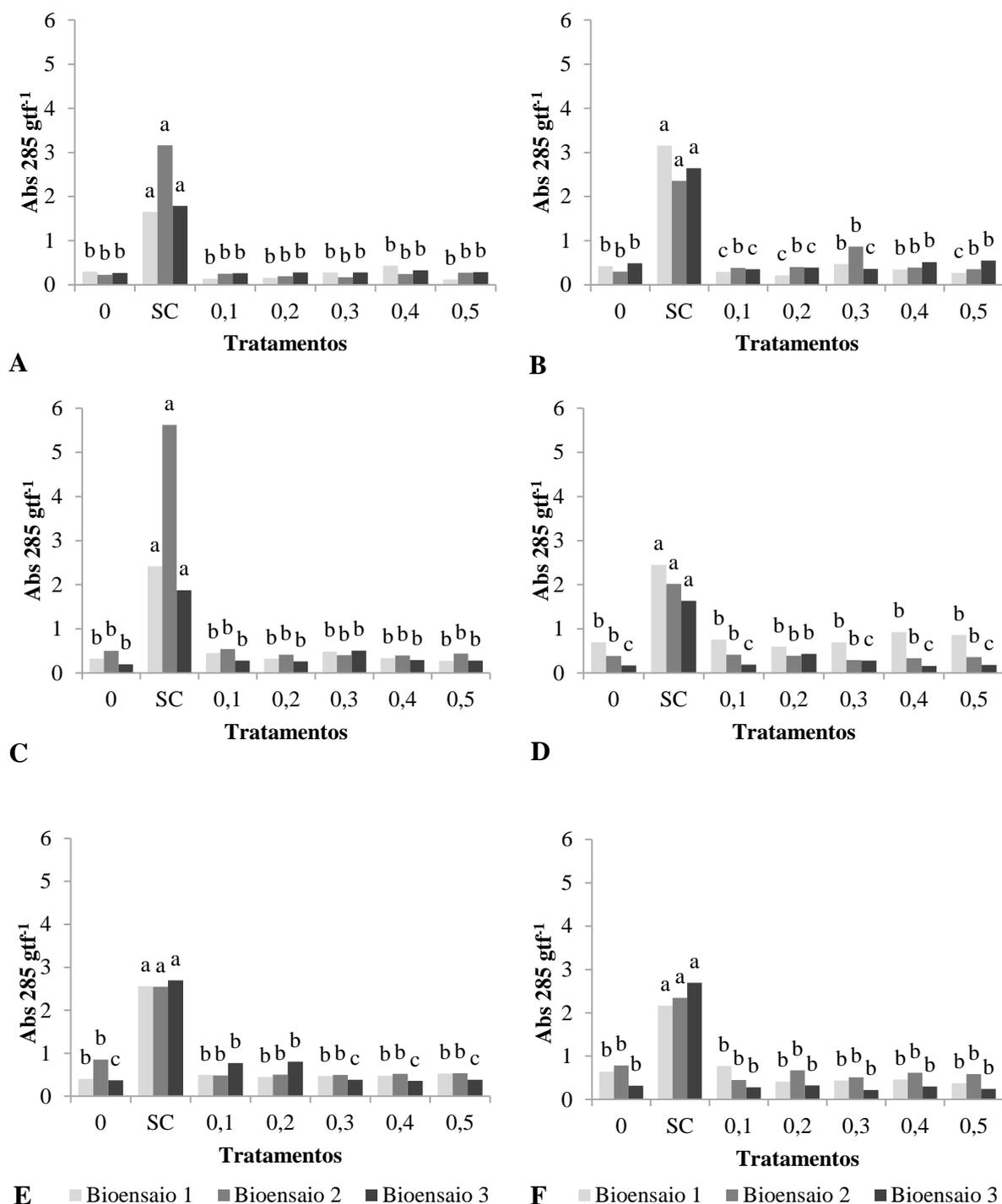


Fig. 1. Produção de gliceolinas dos três bioensaios em cotilédones de soja submetidos à diferentes concentrações de PRG e PRM (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL), água estéril (0) e *Saccharomyces cerevisiae* (SC). Cultivares submetidas ao extrato secreções cutâneas de PRG (espécie 1): **A**, Monsoy 8372 IPRO. **B**, TMG 132 RR. **C**, TMG 4182 convencional. Cultivares submetidas ao extrato secreções cutâneas de PRM (espécie 2): **D**, Monsoy 8372 IPRO. **E**, TMG 132 RR. **F**, TMG 4182 convencional. Mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados em $(x + 1)^{0,5}$.

Atividade específica de peroxidases de guaiacol (POX). O extrato metanólico de secreções cutâneas de PRG apresentou diferença ($p < 0,05$) na atividade de peroxidases de guaiacol nos cotilédones da cultivar TMG 132 RR (Fig. 2B). Nota-se que houve maior atividade enzimática

na concentração 0,5 mg/mL do extrato. As demais concentrações demonstraram reduções na síntese desta proteína em relação à água estéril (controle negativo). Não houve ação significativa na ativação de peroxidases nas cultivares TMG 4182 convencional e Monsoy 8372 IPRO não havendo ajuste satisfatório dos dados (Fig. 2A e 2C). No tratamento à base de *S. cerevisiae* houve maior atividade de peroxidases de guaiacol na cultivar TMG 4182 convencional.

Quanto ao extrato metanólico de secreções cutâneas da espécie 1 (PRM), a cultivar Monsoy 8372 IPRO apresentou resposta de indução significativa na atividade enzimática de peroxidases de guaiacol (Fig. 2D), exibindo tendência linear crescente em relação as concentrações. Os teores de atividade de POX foram maiores nas concentrações 0,2 e 0,5 mg/mL do extrato diferenciando-se dos demais tratamentos. As demais cultivares não apresentaram diferença significativa nos tratamentos testados, não havendo ajuste dos dados (Fig. 2E e 2F). *S. cerevisiae* apresentou maior atividade de POX em relação aos demais tratamentos nos cotilédones da cultivar TMG 132 RR.

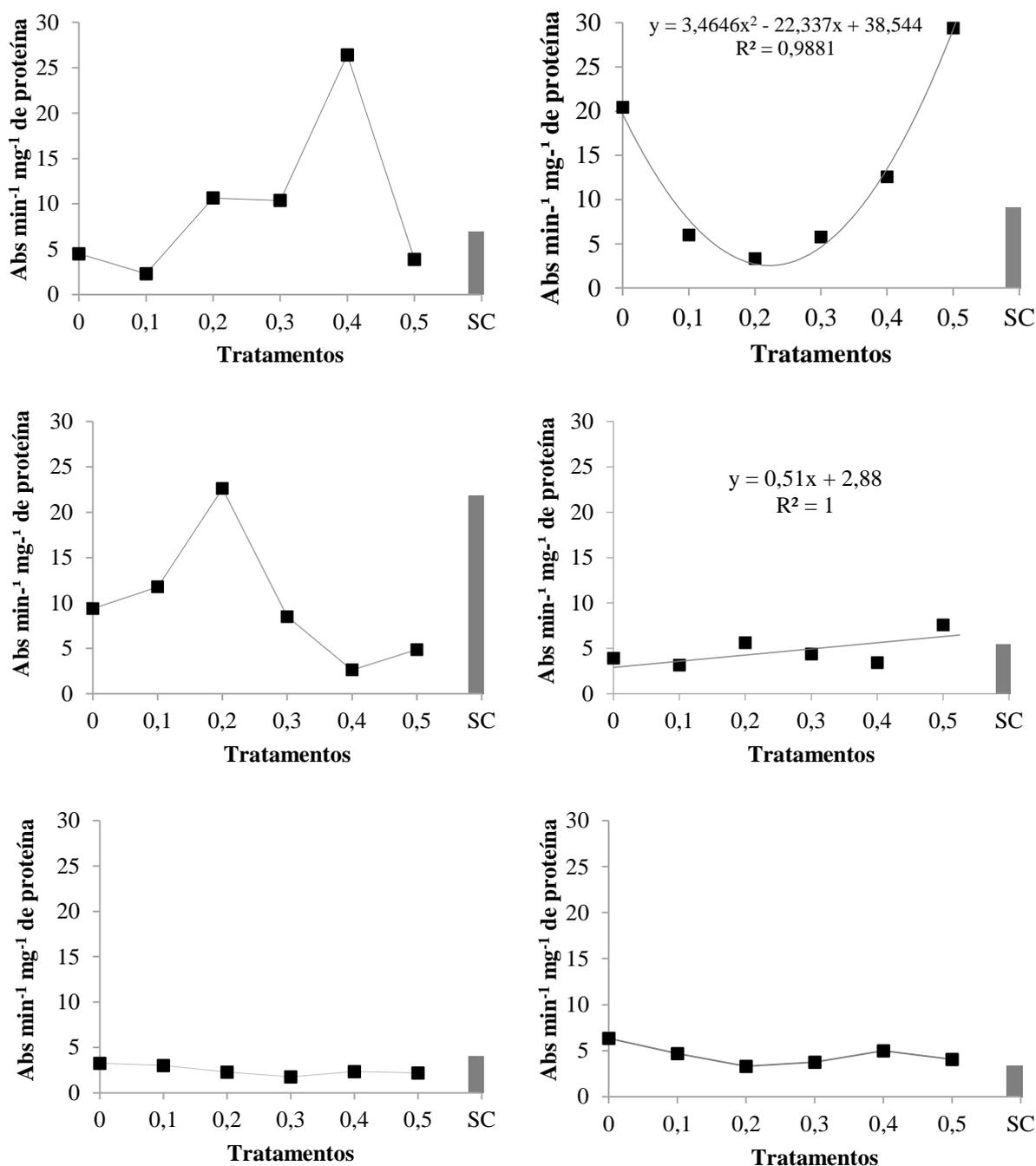


Fig 2. Atividade específica de peroxidases (POX) nas cultivares TMG 132 RR, Monsoy 8372 IPRO e TMG 4182 convencional submetidas à diferentes concentrações de PRG e PRM (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL), água estéril (0) e *Saccharomyces cerevisiae* (SC). Cultivares submetidas ao extrato secreções cutâneas de PRG (espécie 1): **A**, Monsoy 8372 IPRO. **B**, TMG 132 RR. **C**, TMG 4182 convencional. Cultivares submetidas ao extrato secreções cutâneas de PRM (espécie 2): **D**, Monsoy 8372 IPRO. **E**, TMG 132 RR. **F**, TMG 4182 convencional.

Atividade específica de polifenoloxidasas (PFO). Em polifenoloxidasas o extrato metanólico de secreções cutâneas de PRG ativou sua produção na concentração 0,5 mg/mL nos cotilédones da cultivar TMG 132 RR, diferenciando-se dos demais tratamentos (Fig. 3B). As concentrações analisadas do extrato nas cultivares Monsoy 8372 IPRO e TMG 4182 convencional não foram significantes em relação à testemunha negativa (Fig. 3A e 3C). Os cotilédones das cultivares Monsoy 8372 IPRO e TMG 132 RR expostos ao extrato metanólico de secreções cutâneas de PRM (Fig. 3D e 3E) demonstraram atividade enzimática de

polifenoloxidasas significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). Na cultivar TMG 132 RR houve maior produção de atividade de polifenoloxidasas na concentração 0,1 mg/mL. Para cultivar TMG 4182 convencional não houve significância entre os tratamentos não sendo realizado o ajuste dos dados (Fig. 3F).

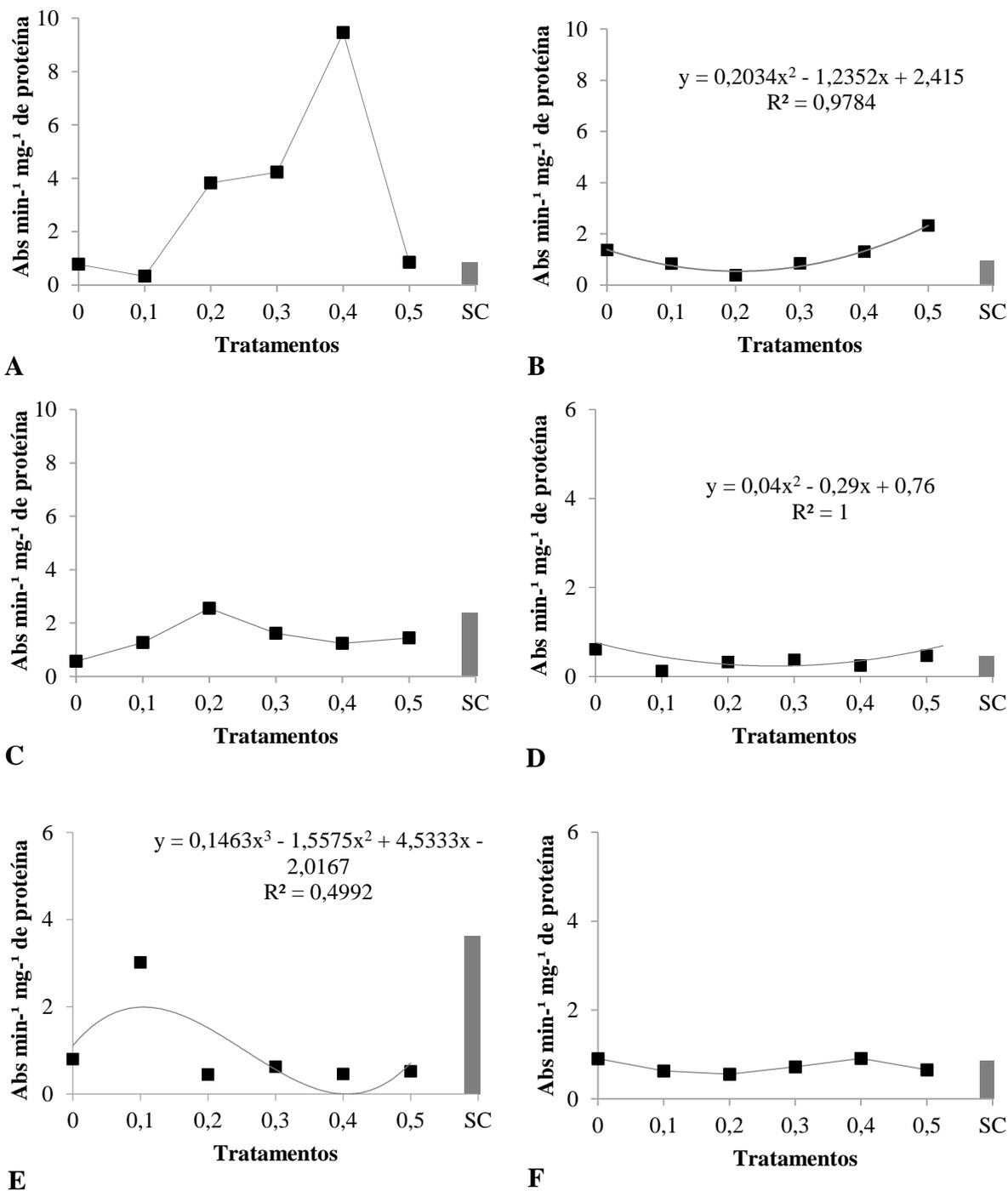


Fig 3. Atividade específica de polifenoloxidasas (PFO) nas cultivares TMG 132 RR, Monsoy 8372 IPRO e TMG 4182 convencional submetidas à diferentes concentrações de PRG e PRM (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL), água estéril (0) e *Saccharomyces cerevisiae* (SC). Cultivares submetidas ao extrato secreções cutâneas de PRG (espécie 1): **A**, Monsoy 8372 IPRO. **B**, TMG 132 RR. **C**, TMG 4182 convencional. Cultivares submetidas ao extrato secreções cutâneas de PRM (espécie 2): **D**, Monsoy 8372 IPRO. **E**, TMG 132 RR. **F**, TMG 4182 convencional.

Atividade específica de β -1,3-glucoanases. Com relação à atividade de β -1,3-glucoanases sob o efeito do extrato PRG, pode-se concluir que houve significância na cultivar TMG 132 RR (Fig. 4B). Porém, as concentrações do extrato não tiveram efeito positivo sobre ação de β -1,3-glucoanases com diminuição na atividade desta enzima quando expostas ao extrato em relação à testemunha negativa. As demais cultivares não demonstraram significância entre os tratamentos e controle negativo (Fig. 4A e 4C). As análises do extrato metanólico de secreções cutâneas de PRM evidenciam que houve significância nos tratamentos testados na cultivar Monsoy 8372 IPRO (Fig. 4A). No entanto, as concentrações de PRM apresentaram efeito redutor na síntese de β -1,3-glucoanases quando comparado ao controle negativo não havendo efeito benéfico com aplicação do extrato metanólico de secreções cutâneas de anfíbios anuros nos cotilédones. Os tratamentos nas cultivares TMG 132 RR e TMG 4182 convencional não apresentaram diferença significativa, não sendo necessário o ajuste dos dados (Fig. 4B e 4C).

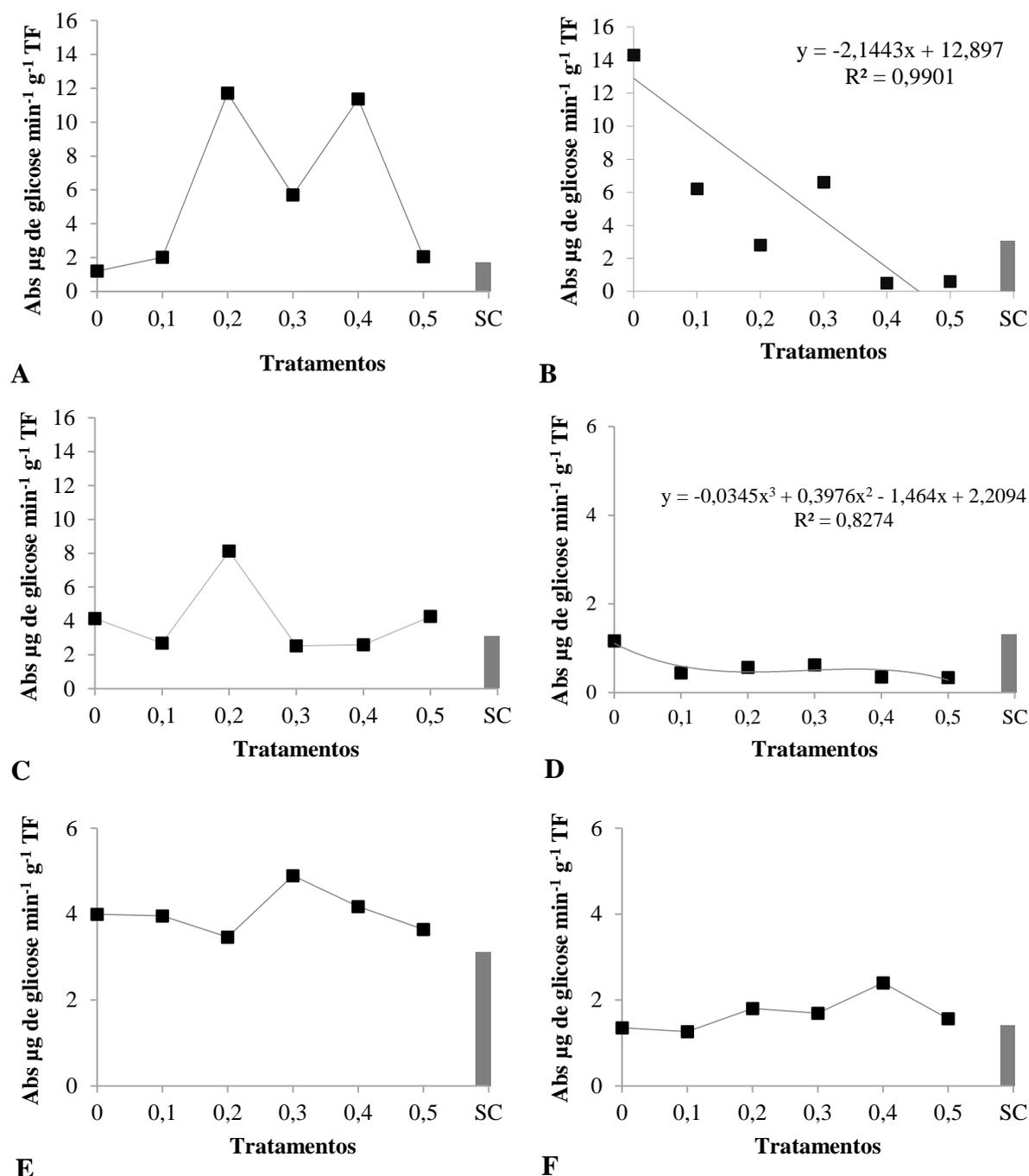


Fig 4. Atividade específica de β -1,3-glicanases nas cultivares TMG 132 RR, Monsoy 8372 IPRO e TMG 4182 convencional submetidas à diferentes concentrações de PRG e PRM (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL), água estéril (0) e *Saccharomyces cerevisiae* (SC). Cultivares submetidas ao extrato secreções cutâneas de PRG (espécie 1): **A**, Monsoy 8372 IPRO. **B**, TMG 132 RR. **C**, TMG 4182 convencional. Cultivares submetidas ao extrato secreções cutâneas de PRM (espécie 2): **D**, Monsoy 8372 IPRO. **E**, TMG 132 RR. **F**, TMG 4182 convencional.

Teor de proteínas totais. Para teor de proteínas totais o extrato metanólico de secreções cutâneas de PRG foi significativo nas cultivares de soja Monsoy 8372 IPRO e TMG 132 RR (Fig. 5A e 5B). Não foram verificadas diferenças no teor de proteínas totais na cultivar de soja TMG 4182 convencional (Fig. 5C). Observa-se que, em ambas as cultivares Monsoy 8372 IPRO e TMG 132 RR, concentrações menores alcançaram maiores teores de proteínas totais, 0,2 e 0,1 mg/mL, respectivamente. Em relação à cultivar de soja TMG 132 RR destaca-se que o teor de proteínas totais, a partir da

concentração 0,2 mg/mL, foi reduzido conforme aumento da concentração do extrato. Na avaliação da concentração de proteínas totais com aplicação do extrato metanólico de secreções cutâneas produzidas pela espécie 2 (PRM) não houve acréscimo nos tratamentos em nenhuma das cultivares analisadas (Fig. 5D, 5E e 5F).

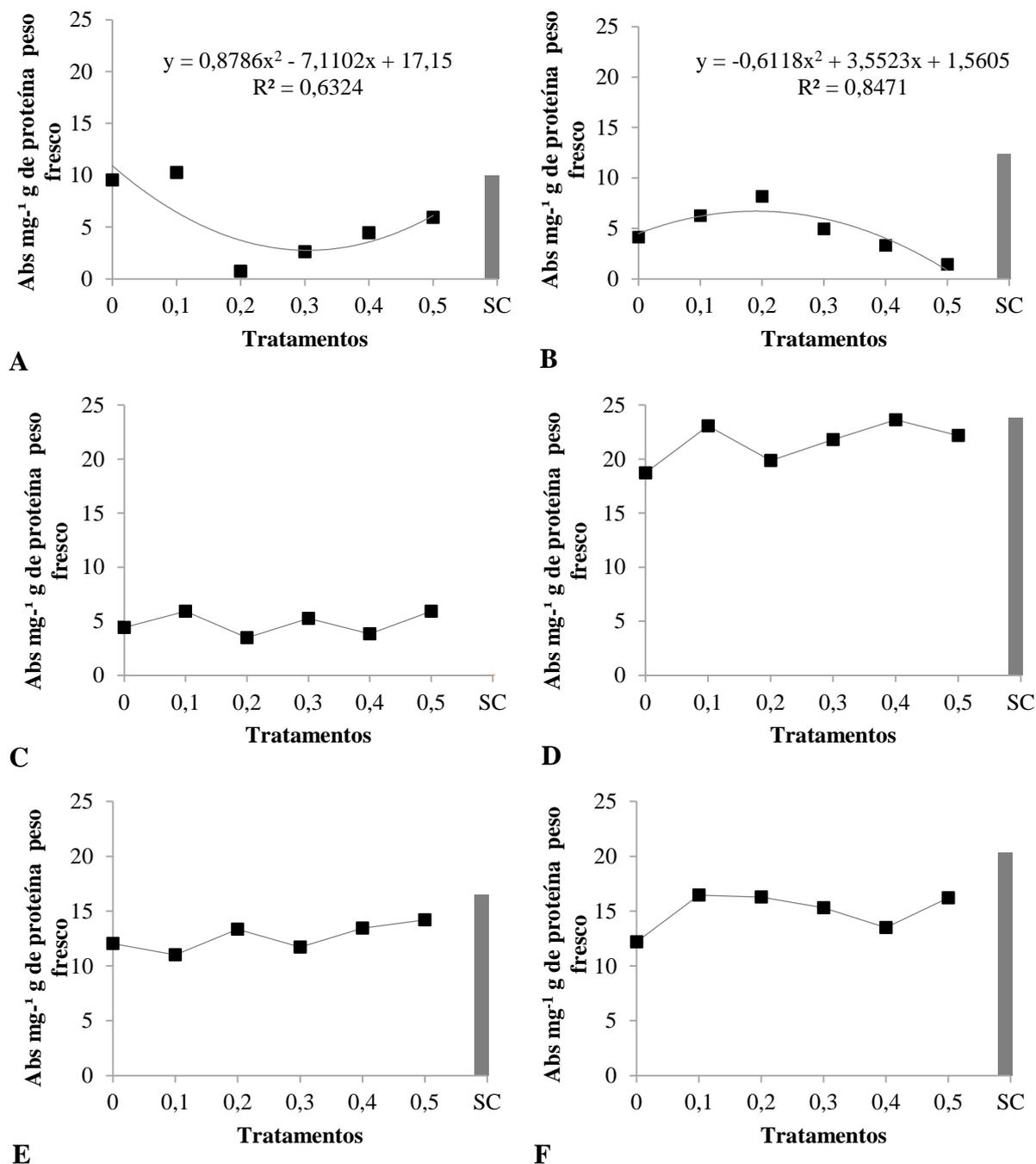


Fig 5. Teor de proteínas totais nas cultivares TMG 132 RR, Monsoy 8372 IPRO e TMG 4182 convencional submetidas à diferentes concentrações de PRG e PRM (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL), água estéril (0) e *Saccharomyces cerevisiae* (SC). Cultivares submetidas ao extrato secreções cutâneas de PRG (espécie 1): **A**, Monsoy 8372 IPRO. **B**, TMG 132 RR. **C**, TMG 4182 convencional. Cultivares submetidas ao extrato secreções cutâneas de PRM (espécie 2): **D**, Monsoy 8372 IPRO. **E**, TMG 132 RR. **F**, TMG 4182 convencional.

Produção de faseolinas em hipocótilos de feijão e deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo. Na indução de faseolinas em hipocótilos de feijão não houve resultados com efeito significativo ($p < 0,05$) nas concentrações do extrato metanólico de secreções cutâneas da espécie PRG (Fig. 6A) em relação à testemunha negativa. O tratamento positivo obteve ação significativa na indução de fitoalexinas nos bioensaios 1 e 3 com produção média de 1,75 e 1,53 Abs 280 gpf^{-1} . O extrato metanólico de secreções cutâneas de PRM (espécie 2), no bioensaio 2 (Fig. 6B) proporcionou aumento significativo na síntese de faseolinas em todas as concentrações em comparação aos hipocótilos submetidos à água estéril (controle negativo). A concentração 0,3 mg/mL obteve maior capacidade de indução em relação às demais, com valores médios de indução de 1,40 Abs 280 gpf^{-1} , seguidas das concentrações 0,4; 0,1; 0,2 e 0,5 mg/mL, com produção de 1,25; 1,23; 1,22 e 1,18 Abs 280 gpf^{-1} , que não alcançaram diferença entre si.

Pode-se verificar também, que a concentração 0,3 mg/mL do extrato metanólico de secreções cutâneas de PRM, obteve resultados promissores no terceiro bioensaio com hipocótilos de feijão, com indução de 1,42 Abs 280 gpf^{-1} , apresentando diferença estatística em relação à testemunha negativa, com indução média de 1,15 Abs 280 gpf^{-1} . O tratamento à base de *S. cerevisiae* obteve maiores atividades na síntese de faseolinas nos três bioensaios testados com valores médios de indução de 2,11; 2,40 e 2,44 Abs 280 gpf^{-1} , diferenciando-se estatisticamente dos demais.

Os tratamentos à base de extratos de secreções cutâneas de PRG (espécie 1) e PRM (espécie 2) não apresentam efeito na indução da síntese de deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo não diferindo da testemunha negativa testada (Fig. 6C e 6D).

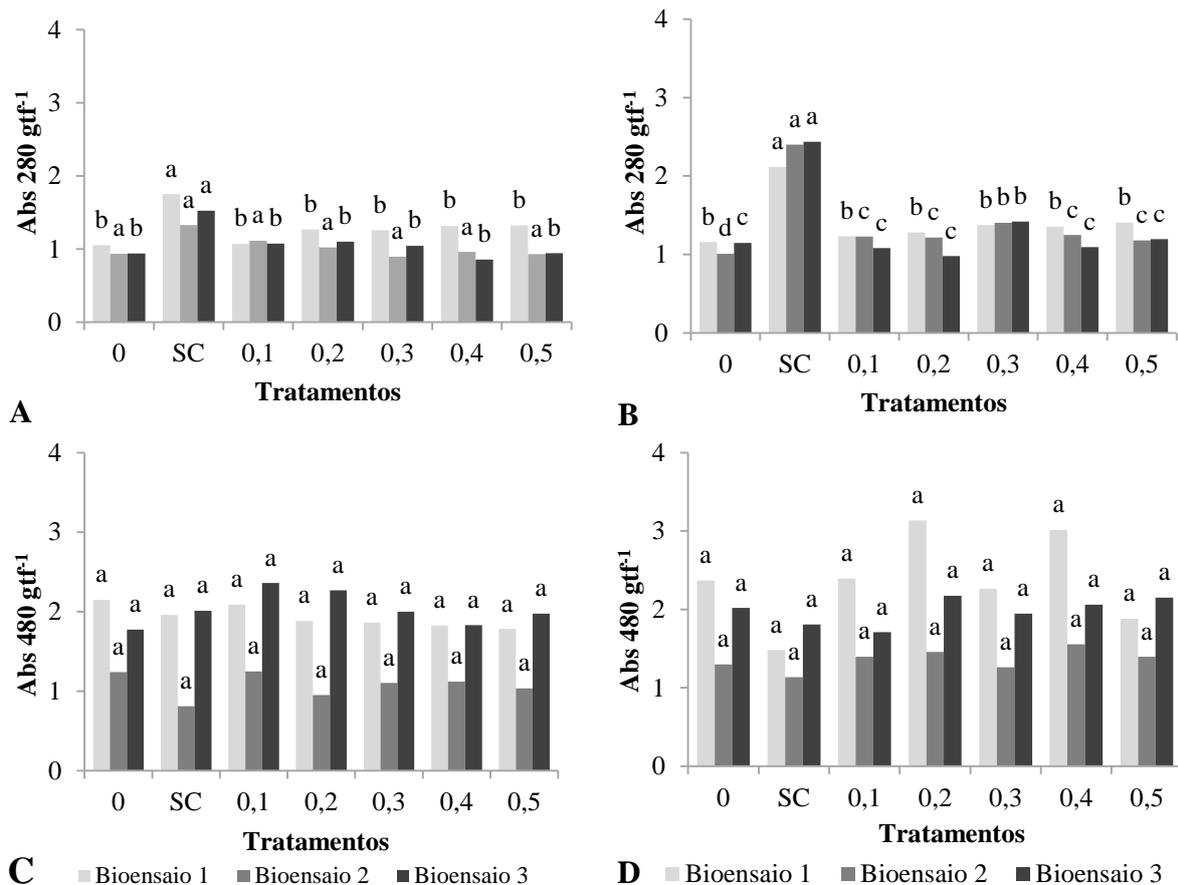


Fig. 6. Produção de faseolinas em hipocótilos de feijão e deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo submetidos à diferentes concentrações de PRG e PRM (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL), água estéril (0) e *Saccharomyces cerevisiae* (SC). **A**, Hipocótilos de feijão submetidos ao extrato PRG. **B**, Hipocótilos de feijão submetidos ao extrato PRM. **C**, Mesocótilos de sorgo submetidos ao extrato PRG. **D**, Mesocótilos de sorgo submetidos ao extrato PRM. Mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados em $(x + 1)^{0,5}$.

DISCUSSÃO

Produção de gliceolinas em cotilédones de soja. A supressão de fitoalexinas demonstrada na produção desses metabólitos de defesa na cultivar de soja TMG 132 RR, proporcionada pelo extrato de secreções cutâneas da espécie 1 (PRG), provavelmente, deve-se ao fato do gene da planta reconhecer este extrato como indutor de suscetibilidade. Esta resposta diferenciada pode estar relacionada à modificações no genoma da cultivar, que possui inserção de transgenes tolerantes à herbicidas a base de glifosato, *Round up Ready*[®] (RR). Esta modificação no material genético pode ter influenciado a habilidade da cultivar em reconhecer a substância como elicitora. Isto ocorre porque os mecanismos de defesa das plantas são mediados pelos genes *R* (Elvira et al. 2008).

De acordo com Flor (1971), com base em estudos genéticos, elaborou a teoria gene-a-gene onde, o alelo de avirulência (*Avr*) codifica uma molécula elicitora que é reconhecido por um receptor específico (codificado pelo alelo *R*) na planta hospedeira (Flor 1971). Segundo o autor, o reconhecimento da molécula elicitora inicia uma rota de transdução de sinais que ativam genes envolvidos na resposta de hipersensibilidade. Se o patógeno não possuir o gene de avirulência, este não será reconhecido pelo hospedeiro, resultando em interação compatível (suscetibilidade). Esta teoria é interpretada pelo modelo receptor-ligante que, bioquimicamente, prediz que as proteínas do gene *R* de plantas reconhecem diretamente as proteínas *Avr* do patógeno (Van der Biezen e Jones 1998), acionando o sistema de defesa das plantas. Pode-se inferir que a capacidade das plantas em reconhecer e responder a um patógeno ou, no caso em questão, o extrato de PRG, é o que diferencia suscetibilidade e resistência de uma interação.

Indução de atividade enzimática em cotilédones de soja. A redução nos níveis de síntese de peroxidases de guaiacol (POX) em algumas concentrações do extrato PRG evidenciaram indução de suscetibilidade nos cotilédones das cultivares de soja. Supressão na atividade de peroxidases em cotilédones de soja, empregando extratos de compostos provenientes da diversidade biológica, também foi relatada por Peiter-Beninca et al. (2008) que observaram inibição na atividade enzimática utilizando extratos diclorometânico e etanólico de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. Stangarlin et al. (2011) afirmam que mudanças na atividade das peroxidases têm sido frequentemente correlacionadas a resposta de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas. Esta resposta diferenciada quanto a defesa vegetal, está relacionada as peroxidases serem consideradas componentes de resposta inicial da defesa de plantas contra o ataque de patógenos (Tuzun 2001). Além disso, estas enzimas estão integradas a vários processos fisiológicos na planta, tais como a lignificação, catabolismo de auxinas, suberização, formação e reticulação de componentes da parede celular e senescência (Nascimento e Barrigossi 2014), demonstrando a importância desta enzima no estado de indução de defesa vegetal.

A resposta positiva na atividade polifenoloxidasas (PFO) com extrato metanólico de secreções cutâneas PRG em cotilédones da cultivar de soja TMG 132 RR, evidencia a importância dos resultados apresentados, uma vez que, estas enzimas estão envolvidas nas reações de imunidade, biossíntese de componentes da planta, extravasamento de radicais livres de tecidos fotossintetizantes (Heimdal et al. 1994), controle dos níveis de oxigênio no cloroplasto e síntese de compostos fenólicos (Vaughn e Duke, 1984). Esta mesma cultivar de soja (TMG 132 RR), obteve no extrato PRM maior produção de polifenoloxidasas na concentração 0,1 mg/mL. Quanto a atividade de polifenoloxidasas na cultivar de soja TMG 4182 Convencional, os resultados observados demonstram diminuição na ação desta enzima nas concentrações testadas do extrato, em relação à testemunha negativa.

Os resultados demonstrados pela cultivar de soja TMG 132 RR para o extrato PRM, revelaram maior atividade de polifenoloxidasas na menor concentração (0,1 mg/mL). Possível explicação para este resultado é ocorrência do efeito hormese, que refere-se a um fenômeno de dose-resposta distinguido por estimulação a baixa dosagem e inibição em alta dosagem (Brennecke et al. 2015). Em hormese, a relação dose-resposta é geralmente caracterizada por dose-resposta bifásica, plotada em gráficos como curvas dose-resposta em formato de “U” invertido ou “J” (Almeida et al. 2002). Basicamente, segundo o mesmo autor, no efeito hormético, a atividade biológica desenvolvida numa faixa de concentração plasmática é abolida quando a dose é reduzida abaixo do limite inferior da curva dose-resposta, mas torna a se manifestar em concentrações muito mais reduzidas. Assim, pressupõe-se que a exposição dos cotilédones desta cultivar de soja à menor concentração do extrato PRM induziu a síntese de polifenoloxidasas, enquanto altas doses não obtiveram mesmo efeito.

A redução na atividade específica de β -1,3-glucanases observada nas concentrações do extrato PRG, sugere efeito negativo no estado de indução dos cotilédones, diminuindo a sinalização de respostas de defesas mais eficientes nas plantas tratadas. Isto ocorre porque, β -1,3-glucanases são enzimas que hidrolisam β -1,3-glucana, principais polímeros componentes da parede celular de fungos tendo, portanto, ação tóxica direta sobre esses patógenos (Resende et al. 2007), desempenhando papel importante na defesa da planta. A supressão na atividade desta enzima com uso de elicitores, também foi observada por Lima Melo et al. (2016), ao aplicarem indutores de resistência abióticos, fosfito de cálcio, fosfito de cobre, Agro-Mos[®], silicato de cálcio, Biopirol[®] e Bion[®] em frutos de abacaxizeiro, descrevendo menor atividade de β -1,3-glucanase em relação à testemunha (água esterilizada), assim como demonstrado neste estudo.

As respostas de aumento no teor de proteínas totais em menores concentrações do extrato PRG nos cotilédones das cultivares de soja TMG 132 RR e Monsoy 8372 IPRO, demonstradas neste estudo confirmam que os compostos químicos presentes no extrato podem originar dose-resposta bifásica. A cultivar TMG 132 RR apresentou este mesmo efeito, quanto ao extrato PRM, em relação à atividade específica de polifenoloxidasas demonstrando efeito hormético, onde, uma característica biológica é estimulada por subdoses ou baixas doses de um composto, porém inibida por altas doses do mesmo (Calabrese e Baldwin, 2000).

Os dois extratos avaliados (PRG e PRM) demonstraram desempenhos distintos quanto a síntese de gliceolinas nas cultivares de soja testadas (TMG 132 RR e Monsoy 8372 IPRO), assim como, na atividade enzimática e teores de proteínas. Esta ocorrência pode estar relacionada ao material genético das cultivares testadas. A cultivar de soja TMG 4182 convencional não exibiu produção de gliceolinas e não apresentou significância quanto a atividade enzimática em cotilédones submetidos aos extratos PRG e PRM. Estes resultados demonstram que a cultivar de soja TMG 4182 convencional (não-transgênica), que possui apenas melhoramento genético, não reconhece os extratos como elicitores.

As outras cultivares de soja apresentaram respostas diferentes quanto a indução de metabólitos de defesa sob influência dos extratos. Possivelmente, a modificação nos genótipos destas cultivares, podem favorecer o reconhecimento dos extratos PRG e PRM como indutor. TMG 132 RR pertence ao primeiro grupo de cultivares transgênicas (RR1), com tecnologia que confere à soja resistência ao glifosato e, Monsoy 8372 IPRO, pertencente ao grupo de cultivares transgênicas de segunda geração (RR2) com tecnologia que, além de conferir à soja tolerância ao glifosato, possui transgenes de resistência às principais lagartas da cultura da soja

Por outro lado, os extratos analisados originam-se de secreções cutâneas de duas espécies distintas com variação nos compostos químicos de defesa, podendo ter efeito indutor ou supressor de gliceolinas e outros metabólitos de defesa. Toledo e Jared 1995; Clarke 1997 citam que, determinados anuros, compartilham as mesmas adaptações defensivas de glândulas granulosas (também conhecidas como glândulas de veneno) e, secretam substâncias similares, geralmente pertencentes à quatro categorias de compostos: aminas biogênicas, alcaloides, esteroides e proteínas.

Porém, esses compostos químicos de defesa possuem enorme complexidade envolvida quanto à origem evolutiva e ecológica (Berenbaum 1995), possuindo variação na quantidade, na estrutura e nas moléculas secretadas de acordo com a espécie e com a região corporal (Duellman e Trueb 1994; Clarke 1997; Pough et al. 2003; Jared et al. 2009). No veneno secretado pelas espécies PRG e PRM, podemos encontrar quantidades relevantes de esteroides, principalmente do tipo bufodienolídeo, entre eles: bufalina, helebregenina, marinobufagina, resibufogenina e telocinobufagina (Fontana 2012).

Produção de faseolinas em hipocótilos de feijão e deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo. Não há relatos de atividade indutora de defesas em plantas de feijão por secreções cutâneas de anfíbios, espera-se que esses resultados cooperem para desencadear estudos sobre o tema. As induções descritas, em sua maioria, estão relacionadas à preparados à base de plantas. Induções estas, como descrita por Barcelos (2015) que avaliando a atividade elicitora dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis*, observou síntese de faseolinas em hipocótilos de feijão. O mesmo efeito indutor sobre produção desses metabólitos de defesa foi observado por Oliveira et al. (2011) que analisaram preparados homeopáticos de *Corymbia citriodora* na indução de faseolinas em hipocótilos estiolados de feijoeiro.

Em mesocótilos de sorgo, apesar dos resultados com secreções cutâneas dos anfíbios anuros estudados não alcançarem efeitos promissores, a ação indutora de fitoalexinas em sorgo com utilização de compostos de origem natural, como extratos de plantas e basidiocarpos, tem sido relatadas por alguns autores. Meinerz et al. (2014) e Peiter-Beninca et al. (2008) obtiveram resultados significativos, ao testarem decocto de *Adiantum capillus-veneris* e extratos de basidiocarpos de *P. sanguineus*, respectivamente, na indução de resposta fitoalexínica em mesocótilos estiolados de sorgo. Utilizando-se extratos etanólicos de própolis, Baldin et al. (2013) também alcançaram efeitos positivos na indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo.

Os mecanismos de ação de indução de fitoalexinas por secreções cutâneas de anfíbios ainda são desconhecidos. Possivelmente, os extratos analisados não possuam ação indutora de fitoalexinas em sorgo pela falta de ativação dos genes requeridos para síntese de deoxiantocianidinas. Uma hipótese que também deve ser considerada, está relacionada à composição do extrato. Tratando-se de extrato bruto de secreções cutâneas, a associação de compostos químicos, podem exercer ação interferente sobre sua atividade quando comparados ao uso de sua forma isolada. Estes efeitos são semelhantes aos demonstrados em estudos fitoterápicos, com substâncias que podem ter seu potencial reduzido na presença de outros, podendo suprimir a ação de compostos indutores de metabólitos de defesa. Além disso, pressupõe a existência de diversos receptores com os quais as moléculas dos elicitores devem interagir para induzir fitoalexina, os quais devem ser específicos, uma vez que em muitos casos, podem discriminar entre moléculas ativas e inativas estruturalmente similares (Pascholati et al., 2008).

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa à primeira autora, a FAPEMAT pelo apoio financeiro ao projeto: Processo Nº 219465/2015.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (Fapemat) pela concessão de bolsa de iniciação científica ao autor Bryan Wender Debiasi, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelas concessões de bolsas Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) às autoras Ana Gabriela Araújo Verçosa e Daiane Lopes de Oliveira.

LITERATURA CITADA

- Almeida, R. B., Sotoriva, A., Salvador, A. C. A., Folchini, C. M., Bordignon, J. C. e Valdez, R. H. 2002. Uso racional de medicamentos numa proposta integrada de educação em saúde. <http://www.cff.org.br/>.
- Arruda, R. S., Mesquini, R. M., Schwan-Estrada, K. R. F. e Nascimento, J. F. 2012. Efeito de extratos de cogumelos na indução de fitoalexinas e no controle de oídio da soja em casa de vegetação. *Bioscience Journal*. 28:164-172.
- Baldin, D., Scariot, E., Telaxka, F. J., Jaski, J. M. e Franzener, G. 2013. Extrato etanólico de própolis na indução de fitoalexinas em sorgo e na atividade antifúngica sobre *Botrytis cinerea* e *Phaeoisariopsis griseola*. In: VIII Congresso Brasileiro de Agroecologia.
- Barcelos, R. A. 2015. Óleos essenciais na indução de resistência e no manejo do oídio da soja. 79 páginas. Dissertação Mestrado em Agronomia. Guarapuava, PR.
- Berenbaum, M. R. 1995. The chemistry of defense: theory and practice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92:2-8.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Brennecke, K., Sossai, V. L. M., Ferraz, F. M. e Carmelindo, B. A. 2015. Efeito de doses de herbicida inibidor do fotossistema II em plântulas de *Brachiaria decumbens* spp. *Revista Agrogeoambiental*. 7:19-26.

- Calabrese, E. J. e Baldwin, L. A. 2000. The marginalization of hormesis. *Human & experimental toxicology*. 19:32-40.
- Carvalho, N. L. 2012. Resistência genética induzida em plantas cultivadas. *Reget/UFMS*. 7:1379-1390.
- Clarke, B. T. 1997. The natural history of amphibian skin secretions: Their normal functioning and potential medical applications. *Biological Reviews*. 72:365-379.
- Curvêlo, C. R. S., Rodrigues, F. Á., Silva, L. C., Nascimento, K. J. T. e Berger, P. G. 2013. Mecanismos bioquímicos da defesa do algodoeiro à mancha de ramulária mediados pelo silício. *Bragantia*. 72:41-51.
- Dixon, R. A., Dey, P. M., Lawton, M. A. e Lamb, C. J. 1983. Phytoalexin induction in french bean: intercellular transmission of elicitation in cell suspension cultures and hypocotyl sections of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology*. 71:251-256.
- Dixon, R. A. e Lamb, C. J. 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 41:339-367.
- Duangmal, K. e Apenten, R. K. O. 1999. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. *Romano*). *Food Chemistry*. 64:351-359.
- Duellman, W. R. e Trueb, L. 1994. *Biology of amphibians*. 2 ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- Elvira, M. I., Galdeano, M. M., Gilardi, P., Garcý'A-Luque, I. e Serra, M. T. 2008. Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L3 plants. *Journal of Experimental Botany*. 59:1253-1265.
- Fontana, P. L. M. 2012. Estudo morfológico comparativo do sistema de defesa química cutânea em duas espécies de sapos amazônicos (*Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus*). 103 páginas. Dissertação Mestrado em Ciências, São Paulo, SP.
- Flor, H. H. 1971. Current status of gene for gene concept. *Annual Review of Phytopathology*. 9:275-296.
- Guimarães, S. S., Mazaro, S. M., Freddo, Á. R. e Wagner Júnior, A. 2015. Potencial de preparados de cavalinha (*Equisetum* sp.) na síntese de metabólitos de defesa em cotilédones de soja (*Glycine max* L.) e o efeito sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani* Kuhn, *in vitro*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 17:143-149.
- Heimdal, H., Larsen, M. L. e Poll, L. 1994. Characterization of polyphenol oxidase from photosynthetic and vascular lettuce tissues (*Lactuca sativa*). *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 42:1428-1433.
- Jared, C., Antoniazzi, M. M., Jordão, A. E. C., Silva, J. R. M. C., Greven, H. e Rodrigues M.T. 2009. Paratoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): Their structure and functioning in passive defence. *Toxicon*. 54:197-207.
- Lima Melo, L. G., Silva, E. K. C., Campos Neto, J. R. M., Lins, S. R. O., Rodrigues, A. A. C. e Oliveira, S. M. A. 2016. Indutores de resistência abióticos no controle da fusariose do abacaxi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 51:1703-1709.
- Linthorst, H. J. M. e Van Loon, L. C. 1991. Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 10:123-150.
- Lusso, M. F. G. e Pascholati, S. F. 1999. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. *Summa Phytopathologica*. 25:244-249.
- Matiello, J. e Bonaldo, S. M. 2013. Atividade elicitora de fitoalexinas em soja e sorgo por extratos e tinturas de espécies medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 15:541-550.
- Matiello, J., Raasch-Fernandes, L. D., Berber, G. C. M., Trento, R. M. e Bonaldo, S. M. 2016. Síntese de fitoalexinas em soja e sorgo por extratos e tinturas pertencentes a três espécies florestais. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*. 9:617-633.
- Mazaro, S. M., Gouvea, A., Wagner Junior, A. e Citadin, I. 2012. Enzimas Associadas à Indução de Resistência em Morangueiro pelo Uso de Quitosana e Acibenzolar-S-Metil. *Revista Ciências Exatas e Naturais*. 14:91-99.
- Mazaro, S. M., Borsattil, F. C., Dalacosta, N. L., Lewandowski, A., Danner, M. A., Busso, C. e Wagner Junior, A. 2015. Qualidade pós-colheita de acerolas tratadas com ácido salicílico. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. 10:512-517.

- Meinerz, C. C., Muller, S. F., Franzener, G., Schwan-Estrada, K. R. F., Portz, R. L., Kuhn, O. J. e Stangarlin, J. R. 2014. Elicidores proteicos e glicídicos de *Adiantum capillus-veneris* L. para fitoalexinas em sorgo *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 16:794-803.
- Nascimento, J. B. e Barrigossi, J. A. F. 2014. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. Agrarian Academy. 1:234-250.
- Oliveira, J. S. B., Maia, A. J., Schwan-Estrada, K. R. F., Carneiro, S. M. T. P. G. e Bonato, C. M. 2011. Indução de fitoalexinas em hipocótilos de feijoeiro por preparados homeopáticos de *Eucalyptus citriodora*. Cadernos de Agroecologia. 6:1-5.
- Pascholati, S. F., Leite, B., Stangarlin, J. R. e CIA, P. 2008. Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. 1 ed. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.
- Paula, C. S., Canteli, V. C. D., Silva, C. B., Miguel, O. G. e Miguel, M. D. 2015. Estudo do potencial fitotóxico de extratos de *Bauhinia unguolata* L. sobre a divisão celular e atividade enzimática em plântulas de alface. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 17:577-584.
- Peiter-Benincá, C., Franzener, G., Assi, L., Iurkiv, L., Eckstein, B., Costa, V. C., Nogueira, M. A., Stangarlin, J. R. e Schwan-Estrada, K. R. F. 2008. Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. Arq. Inst. Biol. 75:285-292.
- Perina, F. J. 2014. Óleos essenciais e frações majoritárias ativas no controle da mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata*) em tangerina ponkan. 112 páginas. Tese Doutorado em Agronomia, Lavras, MG.
- Pough, F. H., Andrews, R. M., Cadle, J. E., Crump, M. L., Savitsky, A. H. e Wells, K. D., 2003. Herpetology. 3ed. Person Prentice Hall, Saddle River.
- Resende, M. L. V., Costa, J. C. B., Cavalcanti, F. R., Ribeiro Júnior, P. M. e Camilo, F. R. 2007. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. Fitopatologia Brasileira. 32:213-221.
- Sobrinho, C. A., Ferreira, P. T. O. e Cavalcanti, L. S. 2005. Indutores abióticos. In: Cavalcanti, L. S., Di Piero, R. M., CIA, P., Pascholati, S. F., Resende, M. L. V. e Romeiro, R. S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. 1 ed. 51-80.
- Stangarlin, J. R., Schulz, D. G., Franzener, G., Assi, L., Schwan-Estrada, K. R. F. e Kuhn, O. J. 2010. Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces boulardii*. Arq. Inst. Biol. 77:91-98.
- Stangarlin, J. R., Kuhn, O. J., Toledo, M. V., Portz, R. L., Schwan-Estrada, K. R. F. e Pascholati, S. F. 2011. A defesa vegetal contra fitopatógenos. Scientia Agraria Paranaensis. 10:18-46.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglus, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M. e Fritig, B. 1993. Plant pathogenesis related proteins and their role in defense against pathogens. Biochimie. 75:687-706.
- Telaxka, F. J., Jaski, J. M., Baldin, D., Scariot, E., Grosselli, M. A., Moura, G. S., Franzener, G. 2014. Atividade antibacteriana e indução de fitoalexinas em feijão por preparados homeopáticos do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*. In: I Congresso Paranaense de Agroecologia.
- Toledo, R. C. e Jared, C. 1995. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. Comparative Biochemistry and Physiology. 111:1-29.
- Toledo, M. V., Stangarlin, J. R. e Bonato, C. M. 2015. Controle da pinta preta e efeito sobre variáveis de crescimento em tomateiro por preparados homeopáticos. Summa Phytopathologica. 41:126-132.
- Tuzun, S. 2001. The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. European Journal of Plant Pathology. 107:85-93.
- Vaughn, K. C. e Duke, S. O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. Plant Physiology. 60:106-112.
- Venturoso, L. R., Bacchi, L. M. A., Gavassoni, W. L., Pontim, B. C. A. e Conus, L. A. 2010. Influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 12: 499-505.
- Van der Biezen, E. A. e Jones, J. D. G. 1998. Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept. Trends Biochemical Science. 23:454-456.

- Vogelsang, R. e Barz, W. 1993. Purification, characterization and differential hormonal regulation of a β -1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Planta*. 189:60-69.
- Wulff, N. A. 1997. Caracterização parcial de elicitores de fitoalexinas em sorgo (*Sorghum bicolor*) obtidos a partir de *Saccharomyces cerevisiae*. 61 páginas. Dissertação Mestrado em Agronomia, São Paulo, SP.
- Ziegler, E. e Pontzen, R. 1982. Specific inhibition of glucan elicited glyceolin accumulation in soybeans by extracellular mannan-glycoprotein of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *Physiological Plant Pathology*. 20:321-333

Atividade *in vitro* de extratos metanólicos de secreções cutâneas de anfíbios sobre fitopatógenos

Resumo: A variedade de biomas reflete elevada diversidade biológica brasileira, abrigando, entre outras, uma riqueza de espécies de anfíbios especialmente da ordem Anura. Estes anfíbios possuem mecanismos bioquímicos de defesa derivados da secreção cutânea de moléculas bioativas com potencial antimicrobiano. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* de extratos metanólicos de secreções cutâneas de duas espécies de anfíbios da ordem Anura, PRG (espécie 1) e PRM (espécie 2), no controle de *Fusarium udum*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum truncatum*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Calonectria pseudometrosideri*. Avaliou-se crescimento micelial, produção de microescleródios, esporulação, germinação de conídios e inibição de apressórios. O extrato da espécie PRG (espécie 1) reduziu crescimento micelial dos patógenos *F. udum*, *F. solani*, *A. flavus* e *M. phaseolina* em algumas concentrações testadas. As concentrações 0,1 e 0,2 mg/mL deste extrato induziram crescimento micelial de *C. pseudometrosideri*. A concentração 0,5 mg/mL do extrato de PRM (espécie 2) em *C. truncatum* apresentou menor velocidade de crescimento micelial. Em *A. flavus*, as concentrações 0,1 e 0,5 mg/mL, apresentaram inibições no crescimento semelhantes ao controle químico (controle positivo). A produção de microescleródios de *R. solani* foi reduzida nas concentrações 0,2 e 0,3 mg/mL do extrato PRM. Os efeitos inibitórios do extrato de PRM (espécie 2) foram menores que os valores observados em PRG (espécie 1). Na esporulação e germinação de conídios, os extratos apresentaram percentuais de inibição diversos. Quanto à inibição de formação de apressórios em *C. truncatum*, no extrato PRG houve inibições de 85 a 99%, enquanto nas concentrações de PRM, 63 a 100%. Os resultados demonstrados ressaltam a importância de estudos com secreções cutâneas de anfíbios de espécies amazônicas sobre o desenvolvimento de fitopatógenos como possibilidade para obtenção de novas moléculas fungicidas.

Palavras-chave: inibição; atividade antimicrobiana; conídios; moléculas bioativas.

1. Introdução

Os defensivos agrícolas possuem importante papel nas atividades do setor, sendo responsáveis por manter a produtividade nas últimas décadas e, foram introduzidos como tentativa de prevenir e eliminar pragas e doenças para aumentar eficiência econômica do processo [1]. Diante disso, o setor agrícola brasileiro tem sido grande mercado para indústria mundial de defensivos agrícolas [2].

A indústria de defensivos agrícolas, tanto em termos globais como locais, caracteriza-se por ser altamente concentrada e por utilizar a inovação como principal estratégia competitiva [3]. Porém, esta inovação tecnológica precisa estar adaptada à exigências do mercado, com pesquisa e desenvolvimento de produtos que atendam às necessidades do ponto de vista ambiental, de segurança e qualidade dos alimentos e da contínua obrigação de oferecer soluções para que o produtor possa continuar apresentando ganhos sucessivos de produtividade e competitividade [2]. Dessa forma, mesmo para grandes companhias, que dispõem de portfólio de produtos bastante ampliado, ficou difícil encontrar algo mais

original [4] com desenvolvimento de produtos com ingredientes ativos que apresentem eficácia no controle de pragas e doenças.

Diversos estudos tem se dedicado à busca de novas substâncias para desenvolvimento de produtos inovadores a partir da biodiversidade, demonstrando que a importância econômica dos recursos naturais é crescente, com potencial científico e tecnológico. Porém, o Brasil está perdendo a oportunidade de ser o País com maior biodiversidade do mundo, onde a instalação de pesquisas em regiões estratégicas, poderia gerar conhecimentos necessários para que a biodiversidade brasileira seja conhecida e aproveitada plenamente [5].

Vários trabalhos desenvolvidos com compostos obtidos a partir de plantas da flora nativa, tem apresentado ação fungitóxica direta, inibindo germinação de esporos e crescimento micelial dos fitopatógenos ou pela indução de fitoalexinas, indicando presença de compostos com características elicitoras [6]. Portanto, a pesquisa de espécies nativas torna-se importante para descoberta de novas substâncias que sejam mais eficazes no controle de espécies de fungos que ameaçam a produção de inúmeras culturas [7].

Além das espécies nativas vegetais, avaliações relacionadas à utilização de secreções produzidas pelos animais pode nos dar alternativas inovadoras para controle de pragas e doenças, buscando substâncias com toxicidade baixa, ação rápida e amplo espectro de atividade antimicrobiana. Estas secreções podem conter venenos que são utilizados por alguns animais como defesa química na natureza. Nos anfíbios em geral, esses compostos são basicamente sintetizados pelo metabolismo do próprio animal [8].

Essa defesa química em anfíbios representa um conjunto de adaptações defensivas que atuam na proteção contra predadores, parasitas e microrganismos [9]. Essas adaptações, apesar de comuns, possuem enorme complexidade envolvida quanto à origem evolutiva e ecológica [10]. Entre os compostos químicos de defesa, estão mais de 850 alcaloides divididos em mais de 20 classes estruturais, representando grande arsenal de defesa distribuído em glândulas presentes na sua pele [11].

Os anfíbios anuros (Anura), por exemplo, podem ser considerados o maior depósito natural de compostos alcaloídicos do reino animal [12]. Além disso, as glândulas granulosas em sua pele, também conhecidas como glândulas de veneno, são responsáveis pela síntese e armazenamento de diversidade de compostos químicos com funções antibióticas [8,13]. Esse veneno inclui mecanismos bioquímicos derivados da secreção de moléculas bioativas a partir das glândulas dérmicas [14].

A composição deste veneno presente nestas secreções é um verdadeiro coquetel de substâncias com potencial ainda desconhecido, que necessitam de análises e pesquisas para testar seus efeitos sobre fitopatógenos, podendo ser utilizado pelas indústrias químicas como alternativa aos agroquímicos existentes ou mesmo na geração de novos fungicidas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* de extratos metanólicos de secreções cutâneas de duas espécies de anfíbios da ordem Anura, PRG (espécie 1) e PRM (espécie 2), no controle de *Fusarium udum* E.J. Butler, Mem., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & W.D. Moore, *Aspergillus flavus* Link, *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. e *Calonectria pseudometrosideri* R.F. Alfenas, L. Lombard, Crous & A.C. Alfenas.

2. Resultados e discussão

De acordo com resultados para o extrato metanólico de secreções cutâneas de PRG (espécie 1) houve diferença significativa no crescimento micelial dos patógenos *F. udum*, *F. solani*, *A. flavus*, *M. phaseolina* e *C. pseudometrosideri*, em relação à testemunha negativa (Tabela 1). Considerando índice de crescimento micelial verificou-se valores significativos nos tratamentos à base de extratos metanólicos de secreções cutâneas de PRG em *F. udum*, *F. solani*, *A. flavus*, *M. phaseolina* e *C. pseudometrosideri* (Figura 1).

Tabela 1. Crescimento micelial (CM) e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos patógenos submetidos à diferentes concentrações de extrato de secreções cutâneas de PRG (espécie 1), água estéril (controle negativo) e fungicidas: pyraclostrobina + metconazol* e azoxistrobina + ciproconazol** (controle positivo).

Tratamentos	Patógenos													
	<i>Fusarium udum</i>		<i>Fusarium solani</i>		<i>Colletotrichum truncatum</i>		<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Rhizoctonia solani</i>		<i>Macrophomina phaseolina</i>		<i>Calonectria pseudometrosideri</i>	
	CM	IVCM	CM	IVCM	CM	IVCM	CM	IVCM	CM	IVCM	CM	IVCM	CM	IVCM
Água estéril	6,60 c	0,94 c	7,18 c	0,90 c	6,30 a	0,53 a	6,78 c	0,75 c	6,48 b	2,16 b	7,94 d	2,65 c	5,88 a	0,42 a
Fungicida	1,37 a	0,20 a	3,56 a	0,45 a	6,52 a	0,54 a	2,53 a	0,28 a	2,48 a	0,83 a	1,07 a	0,36 a	5,00 a	0,36 a
0,1 mg/mL	6,62 c	0,95 c	5,71 b	0,71 b	6,33 a	0,53 a	4,20 b	0,47 b	7,73 b	2,58 b	6,88 b	2,29 b	6,64 b	0,47 b
0,2 mg/mL	6,74 c	0,96 c	5,96 b	0,75 b	6,60 a	0,55 a	5,99 c	0,67 c	8,06 b	2,69 b	7,53 c	2,51 c	7,36 b	0,53 b
0,3 mg/mL	6,82 c	0,97 c	5,48 b	0,69 b	6,37 a	0,53 a	6,02 c	0,67 c	7,64 b	2,55 b	7,76 c	2,59 c	5,04 a	0,36 a
0,4 mg/mL	6,84 c	0,98 c	5,62 b	0,70 b	6,74 a	0,56 a	5,67 c	0,63 c	8,03 b	2,68 b	7,92 d	2,64 c	5,23 a	0,37 a
0,5 mg/mL	5,21 b	0,74 b	5,84 b	0,73 b	6,41 a	0,53 a	4,13 b	0,46 b	8,19 b	2,58 b	8,10 d	2,70 c	4,92 a	0,35 a

Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Dados transformados em $(x + 1)^{0,5}$.

*Controle positivo utilizado nos ensaios de *Fusarium udum*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum truncatum*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina*.

** Controle positivo utilizado no ensaio de *Calonectria pseudometrosideri*.

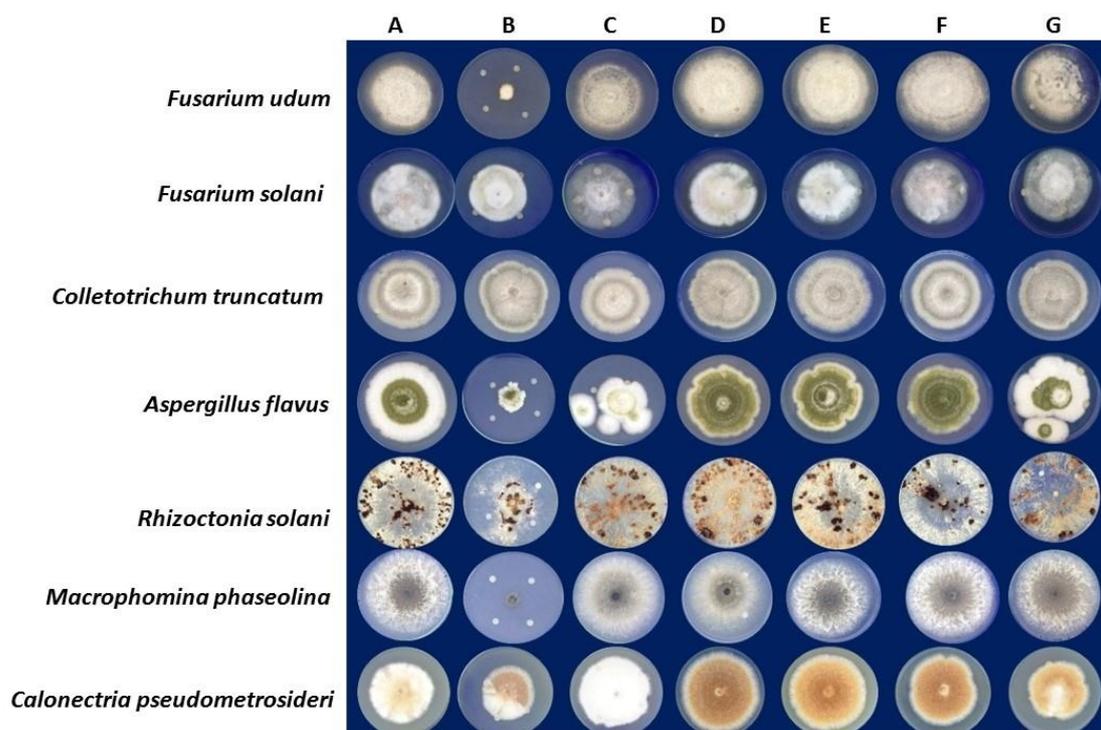


Figura 1. Crescimento micelial das colônias dos patógenos *Fusarium udum*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum truncatum*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Calonectria pseudometrosideri* submetidos ao extrato de PRG (espécie 1). Água estéril (A); Fungicida (B); 0,1 mg/mL (C); 0,2 mg/mL (D); 0,3 mg/mL (E); 0,4 mg/mL (F) e 0,5 mg/mL (G).

Para o isolado de *F. udum* observa-se que a concentração 0,5 mg/mL apresentou crescimento inferior ao demonstrado pelo controle negativo. A mesma concentração, 0,5 mg/mL, apresentou menor valor de IVCN, diferenciando-se do controle negativo. O mesmo isolado foi avaliado por Donato [15] com extrato de secreções cutâneas da espécie (LB) da ordem Anura, nas mesmas concentrações contidas neste trabalho, obtendo fungitoxicidade *in vitro* no crescimento micelial do patógeno na concentração 0,2 mg/mL, demonstrando o potencial de secreções de anfíbios, mesmo quando utiliza-se extratos de secreções de espécies diferentes.

Em geral, tanto a espécie LB quanto a espécie PRG, contém grande número de compostos biologicamente ativos presentes, incluindo amins biogênicas, esteroides, alcaloides, bufodienolídeos, peptídeos e proteínas. No entanto, como pode ser observado, o estudo realizado por Donato [12] demonstrou reduções significativas em menores concentrações (0,2 mg/mL) diferindo dos resultados demonstrados neste ensaio, onde a maior concentração, 0,5 mg/mL obteve menores estimativas de IVCN. Apesar das duas espécies apresentarem compostos biologicamente ativos semelhantes, o resultado pode ser atribuído à composição da secreção que evoluiu independentemente nos diferentes grupos de anfíbios de acordo com sua interação com meio ambiente [16] variando de forma qualitativa e quantitativa entre espécies [11].

No patógeno *F. solani*, houve menor crescimento micelial e IVCN independente da concentração do extrato de glândulas cutâneas de PRG em comparação ao controle negativo. No IVCN, o patógeno apresentou índices significativos nas concentrações 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL, quando comparados à água estéril. Menor IVCN foi observado no controle positivo (pyraclostrobina + metconazol) diferindo dos demais tratamentos.

Pode-se observar que o extrato apresenta efeito fungitóxico no desenvolvimento do isolado de *F. solani*, uma vez que, foram obtidos resultados satisfatórios a partir das menores concentrações. Com a utilização de extratos vegetais existem vários relatos de atividade fungitóxica em relação ao patógeno *F. solani*. Ao testar extratos bruto aquoso de partes de plantas obteve-se resultados satisfatórios na inibição do crescimento micelial com o uso de extrato botão floral de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) [17].

Em relação ao isolado *A. flavus*, as concentrações 0,1 e 0,5 mg/mL do extrato reduziram crescimento e IVCN do patógeno, diferenciando-se da água estéril. Estes resultados vem unir-se à diversas pesquisas empregando controle alternativo do gênero *Aspergillus* sp. P. Micheli ex Haller. Contudo, em sua maioria, estes estudos estão relacionados ao uso de extratos vegetais, como extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) no controle de *Aspergillus niger* Tiegh., apresentando potencial fungitóxico sobre crescimento micelial e esporulação [18].

Os gêneros *Fusarium* sp. Link e *Aspergillus* sp. também foram avaliados por Mossini [19] ao utilizar extratos e resíduos de folhas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) alcançando resultados satisfatórios, mostrando seus efeitos fungitóxicos e fungistáticos. A atividade antimicrobiana demonstradas nos estudos empregando cravo-da-índia, alho e nim é atribuída aos diversos metabólitos secundários bioativos produzidos pelas plantas.

Os compostos presentes nestas espécies vegetais variam, podendo ser: terpenos (eugenol), sesquiterpenos e derivados de fenilpropano (cravo-da-índia); compostos voláteis, compostos sulfurados, carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas (alho); e, à classe dos produtos naturais conhecidos por triterpenos, mais especificamente limonoides, ácidos graxos livres e tocoferóis (nim). Alguns destes grupos de compostos são semelhantes aos encontrados no extrato metanólico de secreções cutâneas da espécie PRG, podendo apresentar efeitos equivalentes na atividade fungitóxica.

Quanto ao patógeno *M. phaseolina*, observou-se redução no crescimento da colônia nas concentrações 0,1; 0,2 e 0,3 mg/mL, em relação à testemunha tratada com água estéril. Porém, menor desenvolvimento do micélio foi observado na concentração 0,1 mg/mL, diferindo das demais concentrações. No IVCN de *M. phaseolina*, obteve-se reduções com significância nas concentração 0,1 mg/mL.

Muitos são os estudos que sugerem efeito fungicida de substâncias de produtos naturais nativos, entretanto, nem sempre esses resultados adotam mesma tendência. Pode-se observar no patógeno *M. phaseolina* que, concentrações menores alcançaram efeito fungitóxico no desenvolvimento da colônia, enquanto, o mesmo não ocorreu com concentrações maiores. Provavelmente, por se tratar de extrato bruto, com vários compostos que possuem efeitos similares ou associação destes compostos, inibiram crescimento do patógeno nas menores concentrações.

É provável que a diferença de comportamento frente às concentrações do extrato relaciona-se ao efeito hormese onde há manifestação de um fenômeno de dose-resposta distinguido por estimulação a baixa dosagem e inibição em alta dosagem [20]. Os resultados com perfil hormético apresentam curva dose-resposta bifásica em forma de “U” invertido, com supressão no desenvolvimento da atividade biológica numa faixa de concentração plasmática quando a dose é reduzida abaixo do limite inferior da curva dose-resposta, mas torna a se manifestar em concentrações muito mais reduzidas [21].

Com base no crescimento micelial e IVCN do isolado *C. pseudometrosideri*, constatou-se que o extrato metanólico de secreções cutâneas da espécie PRG, nas concentrações 0,1 e

0,2 mg/mL provocaram maior desenvolvimento da colônia quando comparados à água estéril. Este fato pode estar associado à presença de compostos que possuem tanto atividade antifúngica, como também compostos que estimulam crescimento dos patógenos [22]. Segundo os autores, quantidade e longevidade destes compostos, assim como relação existente entre estes, podem resultar em determinados momentos, em maior ou menor inibição dos fitopatógenos.

Avaliando uso do extrato metanólico de secreções cutâneas da espécie PRM (espécie 2), verificou-se que não houve redução em relação ao crescimento micelial dos fitopatógenos em comparação à testemunha negativa (Tabela 2). Na presença do fungicida (controle positivo) os isolados de *F. udum*, *F. solani*, *A. flavus*, *R. solani* e *M. phaseolina*, apresentaram crescimento significativo menor que os demais tratamentos (Figura 2).

Os patógenos *C. truncatum* e *C. pseudometrosideri* não apresentaram reduções no crescimento micelial na presença do fungicida, não diferindo dos demais tratamentos. *C. pseudometrosideri* também não apresentou diferença nos valores de IVCM. Em ambos os ensaios de desenvolvimento micelial de *C. pseudometrosideri*, o isolado demonstrou crescimento lento, com média de 16 dias de análises após incubação do disco de micélio.

Tabela 2. Crescimento micelial (CM) e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos patógenos submetidos à diferentes concentrações de extrato de secreções cutâneas de PRM (espécie 2), água estéril (controle negativo) e fungicidas: pyraclostrobina + metconazol* e azoxistrobina + ciproconazol** (controle positivo).

Tratamentos	Patógenos													
	<i>Fusarium udum</i>		<i>Fusarium solani</i>		<i>Colletotrichum truncatum</i>		<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Rhizoctonia solani</i>		<i>Macrophomina phaseolina</i>		<i>Calonectria pseudometrosideri</i>	
	CM	IVCM	CM	IVCM	CM	IVCM	CM	IVCM	CM	IVCM	CM	IVCM	CM	IVCM
Água estéril	4,90 b	0,61 b	6,44 b	0,81 b	6,48 a	0,54 b	6,93 b	0,63 b	6,68 b	3,34 b	8,32 b	2,77 b	5,87 a	0,31 a
Fungicida	2,70 a	0,34 a	3,26 a	0,41 a	5,94 a	0,50 a	3,87 a	0,35 a	2,23 a	1,12 a	1,60 a	0,53 a	6,83 a	0,36 a
0,1 mg/mL	5,73 b	0,72 b	5,93 b	0,74 b	6,82 a	0,57 b	7,06 b	0,64 b	6,66 b	3,33 b	8,10 b	2,70 b	7,21 a	0,38 a
0,2 mg/mL	6,77 b	0,85 b	5,66 b	0,71 b	6,74 a	0,56 b	6,74 b	0,61 b	7,08 b	3,54 b	8,44 b	2,81 b	6,14 a	0,32 a
0,3 mg/mL	6,10 b	0,76 b	6,01 b	0,75 b	6,76 a	0,56 b	7,31 b	0,66 b	6,62 b	3,31 b	8,13 b	2,71 b	7,01 a	0,37 a
0,4 mg/mL	6,41 b	0,80 b	5,03 b	0,63 b	6,86 a	0,57 b	6,76 b	0,62 b	6,87 b	3,44 b	8,37 b	2,79 b	6,86 a	0,36 a
0,5 mg/mL	5,58 b	0,70 b	5,68 b	0,71 b	5,63 a	0,47 a	6,80 b	0,62 b	7,03 b	3,52 b	8,33 b	2,78 b	7,28 a	0,38 a

Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Dados transformados em $(x + 1)^{0,5}$.

*Controle positivo utilizado nos ensaios de *Fusarium udum*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum truncatum*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina*.

** Controle positivo utilizado no ensaio de *Calonectria pseudometrosideri*.

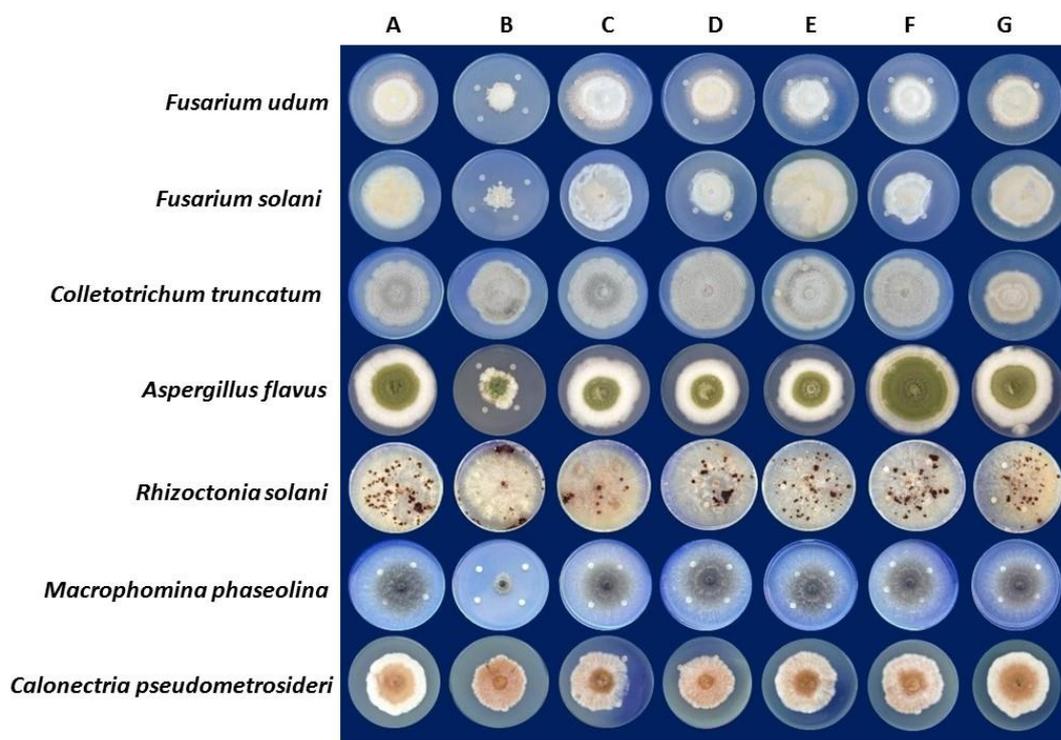


Figura 2. Crescimento micelial das colônias dos patógenos *Fusarium udum*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum truncatum*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Calonectria pseudometrosideri* submetidos ao extrato de PRM (espécie 2). Água estéril (A); Fungicida (B); 0,1 mg/mL (C); 0,2 mg/mL (D); 0,3 mg/mL (E); 0,4 mg/mL (F) e 0,5 mg/mL (G).

No índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do isolado de *C. truncatum*, houve redução no IVCM na concentração 0,5 mg/mL, em relação ao controle negativo (Tabela 2). A concentração 0,5 mg/mL do extrato de secreções cutâneas de PRM (espécie 2) apresentou IVCM semelhante ao demonstrado pelo fungicida pyraclostrobina + metconazol, não havendo diferença significativa entre os mesmos. O mesmo não foi observado nos ensaios frente aos demais patógenos.

A redução na velocidade de crescimento de *C. truncatum* torna-se promissora pois, o fungicida demonstrou baixa eficiência no controle do patógeno. Além disso, resultados satisfatórios com uso de extratos como agentes antimicrobianos apresenta baixo risco de aumento da resistência microbiana a sua ação, porque tratam-se de misturas complexas, fazendo com que haja maiores dificuldades para adaptabilidade microbiana [23].

Quando observa-se o uso de controle alternativo do gênero *Colletotrichum* sp. Corda, Deutshl. Flora, utilizando-se de extratos vegetais, diversos estudos com resultados promissores são descritos. Entre eles, [17] citaram atividade antifúngica do extrato aquoso de cravo-da-índia com supressão sobre crescimento de *Colletotrichum* sp. a partir da concentração de 7,4%. Óleos essenciais de sementes verdes de *Schinus terebinthifolius* Raddi foram avaliados sobre patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., e alcançaram resultados de 100% de inibição do crescimento do fungo [24].

Em relação à porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), o extrato de secreções cutâneas da espécie PRG (Tabela 3) inibiu crescimento de *F. udum*, na concentração 0,5 mg/mL (21,34%). Maior efeito inibitório foi observado no tratamento à base de pyraclostrobina + metconazol (controle positivo), com percentual de 79,25%, diferindo dos demais tratamentos. Em oposição aos resultados demonstrados neste estudo,

Mochko [25] não observou efeito de inibição no crescimento micelial de isolados de *Fusarium* sp. com uso de extratos glandulares de secreções de anfíbios.

Efeito inibitório significativo, também foi observado no crescimento micelial de *A. flavus*, nas concentrações 0,1 e 0,5 mg/mL, com inibições de 38,04 e 40,62%, respectivamente. Essas inibições foram semelhantes à demonstrada pelo fungicida (62,71%), não apresentando diferença significativa, evidenciando o efeito fungitóxico do extrato sobre este fungo.

Pela análise do percentual de inibição de *M. phaseolina*, nota-se diferença nas concentrações do extrato. Porém, o incremento na porcentagem de inibição foi menor ao demonstrado pelo fungicida. A partir dos resultados encontrados, pode-se inferir que a medida que as concentrações do extrato aumentaram, o efeito inibitório foi reduzido. Este efeito foi similar ao demonstrado no crescimento micelial e IVCN com efeito fungitóxico em menores concentrações.

Resultados semelhantes, de maior inibição em concentrações mais baixas, foram relatados ao utilizarem extratos brutos aquosos de gengibre (*Zinziber officinalis* Roscoe) em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. Link [26]. Estes autores relataram que o extrato de gengibre, na concentração 50 µg/mL, reduziu o crescimento micelial e, em concentrações mais elevadas (100, 200 e 400 µg/mL), esta inibição foi reduzida.

Nos ensaios de *C. pseudometrosideri* as concentrações 0,1 e 0,2 mg/mL apresentaram percentuais de supressão do crescimento do fungo, menores que os demais tratamentos. As concentrações 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL apresentaram indução similar ao fungicida azoxistrobina + ciproconazol.

Tabela 3. Porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC) dos patógenos submetidos à diferentes concentrações de extrato de secreções cutâneas de PRG (espécie 1) e PRM (espécie 2), água estéril (controle negativo) e fungicidas: pyraclostrobina + metconazol* e azoxistrobina + ciproconazol** (controle positivo).

Tratamentos	Patógenos													
	<i>Fusarium udum</i>		<i>Fusarium solani</i>		<i>Colletotrichum truncatum</i>		<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Rhizoctonia solani</i>		<i>Macrophomia phaseolina</i>		<i>Calonectria pseudometrosideri</i>	
	PRG	PRM	PRG	PRM	PRG	PRM	PRG	PRM	PRG	PRM	PRG	PRM	PRG	PRM
Fungicida	79,25 a	38,24 a	50,21 a	49,28 a	2,12 a	9,48 a	62,71 a	41,14 a	50,86 a	66,52 a	86,53 a	80,73 a	19,68 a	4,27 a
0,1 mg/mL	1,94 c	12,18 b	20,04 b	10,95 b	4,49 a	0,60 b	38,04 a	10,63 b	8,00 b	1,77 b	13,33 b	2,63 b	7,46 b	0,50 a
0,2 mg/mL	2,30 c	1,44 b	16,88 b	13,84 b	2,34 a	0,00 b	13,30 b	8,16 b	5,18 b	0,00 b	5,11 c	0,44 b	2,68 b	4,63 a
0,3 mg/mL	1,45 c	6,59 b	23,33 b	11,99 b	5,36 a	2,29 b	11,37 b	5,64 b	8,12 b	4,92 b	2,98 c	2,36 b	15,14 a	0,82 a
0,4 mg/mL	1,88 c	5,67 b	21,78 b	21,80 b	1,66 a	0,30 b	16,92 b	11,79 b	3,65 b	1,13 b	1,59 d	1,18 b	16,91 a	4,75 a
0,5 mg/mL	21,34 b	3,62 b	19,11 b	11,67 b	2,71 a	13,19 a	40,62 a	7,27 b	0,35 b	0,00 b	0,24 d	0,83 b	17,93 a	1,51 a

Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Dados transformados em $(x + 1)^{0,5}$.

*Controle positivo utilizado nos ensaios de *Fusarium udum*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum truncatum*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani* e *Macrophomia phaseolina*.

** Controle positivo utilizado no ensaio de *Calonectria pseudometrosideri*.

Quando utilizou-se extrato metanólico de secreções cutâneas de PRM em *C. truncatum*, observou-se inibição do crescimento micelial com percentual equivalente ao demonstrado pelo fungicida. Como pode ser observado nos parâmetros avaliados, este isolado manifestou-se de difícil controle. Avaliando IVCM dos ensaios de ambos os extratos, nota-se que apresentou, em média, índices menores, com crescimento lento em relação aos demais patógenos testados ampliando análises até 12 dias após incubação.

Os isolados de *F. udum*, *F. solani*, *A. flavus*, *R. solani* e *M. phaseolina*, apresentaram diferença inibitórias na presença do fungicida em relação ao extrato. Não foram observadas reduções em relação ao fungicida no isolado *C. pseudometrosideri*, cujas concentrações apresentaram inibições reduzidas.

Quando o parâmetro avaliado foi esporulação, verificou-se que o extrato de secreções cutâneas de PRG (espécie 1), nas concentrações 0,1 e 0,5 mg/mL, reduziu produção de conídios do patógeno *A. flavus*, com percentuais inibitórios de 93,12 e 83,68%, respectivamente (Tabela 4). Estes resultados foram semelhantes ao efeito evidenciado pelo tratamento químico pyraclostrobina + metconazol (95,98%). Nos resultados encontrados para *F. udum*, *F. solani*, *C. truncatum* e *C. pseudometrosideri* não houve efeito inibitório da produção de conídios entre concentrações do extrato e controle químico.

Tabela 4. Porcentagem de inibição de esporulação (PIE) dos patógenos submetidos à diferentes concentrações de extrato de secreções cutâneas de PRG (espécie 1) e PRM (espécie 2), água estéril (controle negativo) e fungicidas: pyraclostrobina + metconazol* e azoxistrobina + ciproconazol** (controle positivo).

Tratamentos	Patógenos									
	<i>Fusarium udum</i>		<i>Fusarium solani</i>		<i>Colletotrichum truncatum</i>		<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Calonectria pseudometrosideri</i>	
	PRG	PRM	PRG	PRM	PRG	PRM	PRG	PRM	PRG	PRM
Fungicida	6,67 a	84,65 a	18,50 a	53,18 a	20,00 a	40,00 a	95,98 a	85,70 a	60,00 a	39,14 a
0,1 mg/mL	0,00 a	77,35 a	58,21 a	35,29 a	0,00 a	20,00 a	93,12 a	35,82 b	12,50 a	49,97 a
0,2 mg/mL	20,00 a	71,84 a	55,51 a	17,41 a	40,00 a	27,69 a	18,35 b	17,57 b	18,75 a	31,76 a
0,3 mg/mL	20,00 a	79,00 a	27,82 a	29,74 a	40,00 a	40,00 a	29,14 b	11,14 b	52,50 a	26,82 a
0,4 mg/mL	20,00 a	72,19 a	64,63 a	15,63 a	20,00 a	18,46 a	45,48 b	54,98 a	38,75 a	40,55 a
0,5 mg/mL	6,67 a	66,33 a	25,28 a	32,48 a	20,00 a	40,00 a	83,68 a	42,17 b	58,75 a	38,39 a

Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Dados transformados em $(x + 1)^{0,5}$.

**Controle positivo utilizado nos ensaios de *Fusarium udum*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum truncatum* e *Aspergillus flavus*.

** Controle positivo utilizado no ensaio de *Calonectria pseudometrosideri*.

A ação *in vitro* do extrato de secreções cutâneas de PRM na inibição de esporulação de *F. udum* evidenciou que todas concentrações do extrato apresentaram inibições similares ao controle positivo, com inibições acima de 65%. Para *A. flavus*, o extrato também apresentou atividade antimicrobiana quando na concentração 0,4 mg/mL. Verificou-se redução na produção de conídios de 54,98%, com valor similar ao demonstrado pelo tratamento positivo (85,70%).

Esta redução na esporulação do patógeno *A. flavus*, para ambos extratos, torna-se de importância, principalmente devido à quantidade de conídios produzido pelo patógeno, aumentando sua disseminação. Na busca de controle alternativo do patógeno *Aspergillus flavus*, isolado da castanha-do-brasil, Pimentel e colaboradores [27] observaram redução significativa da esporulação com uso do óleo essencial de folhas frescas de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bureau & K. Schum., por meio das técnicas de contato e fumigação.

Para produção de microescleródios de *R. solani* sob o efeito do extrato metanólico de secreções cutâneas da espécie PRG (Tabela 5), não foram observadas diferenças para os tratamentos avaliados. Avaliando extrato da espécie PRM (Tabela 5), constatou-se que as concentrações 0,2 e 0,3 mg/mL, apresentaram inibições sobre produção desta estrutura de resistência em relação aos demais tratamentos. As concentrações demonstraram menor incidência na produção de microescleródios apresentando valores menores que o controle positivo (pyraclostrobina + metconazol).

A capacidade de inibição na produção de microescleródios por extrato, mostra-se importante pois, estas estruturas de resistência garantem sobrevivência do agente patogênico em condições adversas, tais como ausência do hospedeiro e/ou condições climáticas desfavoráveis, permanecendo no solo e na matéria orgânica, após final do cultivo de plantas infectadas, sendo inóculo para culturas subsequentes. Algumas pesquisas empregando fontes de controle alternativo de microescleródios vem apresentando resultados satisfatórios, como descrito por Kunieda-Alonso; Alfenas; Maffia [28] que relataram redução significativa na sobrevivência desta estrutura de *Rhizoctonia* sp. DC. no solo tratados com suspensão conidial de *Trichoderma longibrachiatum* Rifai e *Trichoderma inhamatum* Veerkamp & W. Gams. Segundo autores, ao longo de doze meses de avaliação, a sobrevivência dos escleródios decresceu progressivamente, atingindo 59% de inviabilidade ao final do primeiro mês.

Tabela 5. Nota de microescleródios do patógeno *Rhizoctonia solani* submetidos à diferentes concentrações de extrato de secreções cutâneas de PRG (espécie 1) e PRM (espécie 2), água estéril (controle negativo) e fungicidas: pyraclostrobina + metconazol (controle positivo).

Tratamentos	<i>Rhizoctonia solani</i>	
	PRG	PRM
Água estéril	4,00 a	3,80 b
Fungicida	4,00 a	3,20 b
0,1 mg/mL	4,00 a	4,00 b
0,2 mg/mL	4,00 a	2,40 a
0,3 mg/mL	4,00 a	1,00 a
0,4 mg/mL	3,20 a	4,00 b
0,5 mg/mL	3,80 a	4,00 b

Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Dados transformados em $(x + 1)^{0,5}$.

Avaliou-se germinação de conídios dos isolados *F. udum*, *C. truncatum* e *C. pseudometrosideri* sob influência dos extratos de secreções cutâneas de PRG (espécie 1) e PRM (espécie 2). Comparando-se os tratamentos dos ensaios do extrato de secreções cutâneas de PRG, nota-se que isolados *F. udum*, *C. truncatum* e *C. pseudometrosideri* apresentaram redução em relação à germinação de conídios, sendo mais acentuada no tratamento positivo (fungicida).

Tabela 6. Porcentagem de inibição de germinação de conídios (PIG) dos patógenos submetidos à diferentes concentrações de extrato de secreções cutâneas de PRG (espécie 1) e PRM (espécie 2), água estéril (controle negativo) e fungicidas: pyraclostrobina + metconazol* e azoxistrobina + ciproconazol** (controle positivo) e porcentagem de inibição de formação de apressórios (PIA) (*Colletotrichum truncatum*).

Tratamentos	Patógenos							
	<i>Fusarium udum</i>		<i>Colletotrichum truncatum</i>				<i>Calonectria pseudometrosideri</i>	
	PIG		PIG		PIA		PIG	
	PRG	PRM	PRG	PRM	PRG	PRM	PRG	PRM
Fungicida	83,99 a	93,58 a	95,60 a	95,49 a	100,00 a	100,00 a	95,76 a	91,61 a
0,1 mg/mL	0,00 c	67,76 b	41,43 b	55,94 b	85,39 b	100,00 a	38,30 c	18,10 b
0,2 mg/mL	31,67 b	66,09 b	52,85 b	42,69 b	99,22 a	98,21 a	37,64 c	28,97 b
0,3 mg/mL	55,50 a	59,34 b	43,52 b	41,55 b	95,63 a	95,14 a	50,99 b	27,53 b
0,4 mg/mL	33,97 b	57,10 b	39,34 b	42,40 b	98,30 a	98,26 a	55,47 b	27,03 b
0,5 mg/mL	33,06 b	53,04 b	26,94 c	21,62 c	85,91 b	63,11 b	50,96 b	30,62 b

Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Dados transformados em $(x + 1)^{0,5}$.

*Controle positivo utilizado nos ensaios de *Fusarium udum* e *Colletotrichum truncatum*.

** Controle positivo utilizado no ensaio de *Calonectria pseudometrosideri*.

Referente ao extrato de secreções cutâneas de PRG (espécie 1), nos patógenos *F. udum*, *C. truncatum* e *C. pseudometrosideri*, maiores efeitos inibitórios da germinação foram alcançados nas concentrações 0,3 (55,50%); 0,2 (52,85%) e 0,4 mg/mL (55,47%), respectivamente. No isolado *F. udum*, a concentração 0,1 mg/mL não apresentou efeito inibitório.

Com relação ao extrato de secreções cutâneas de PRM (espécie 2), constatou-se diferença na germinação dos conídios dos patógenos avaliados. As inibições com maiores valores, assim como nos ensaios com a espécie PRG, foram obtidas para tratamento à base de controle químico. Houve redução na germinação de conídios de *F. udum*, com percentuais acima de 50%, em todas as concentrações contendo extrato de secreções cutâneas da espécie PRM. Os demais patógenos apresentaram inibições menores, apresentando inibições intermediárias de 18,10 a 55,94%.

Resultados semelhantes foram obtidos com extratos de secreções cutâneas de uma espécie de anfíbio da ordem Anura na germinação de conídios de *F. udum*, alcançando inibições de até 46%, nas concentrações 0,4 e 0,5mg/mL [15]. O efeito do extrato da mesma espécie foi avaliado, sobre germinação e desenvolvimento de esporos de isolados do gênero *Fusarium* sp., apresentando inibição de até 95% e, quando estes conídios foram inoculados em meio de cultura BDA, não houve desenvolvimento dos mesmos [25].

A efetividade da ação dos extratos glandulares de anfíbios sobre germinação *in vitro* dos patógenos *C. truncatum* e *C. pseudometrosideri* ainda é desconhecida. O efeito antimicrobiano demonstrado neste estudo pode ser atribuído as substâncias encontradas nas secreções cutâneas das espécies PRG e PRM de anfíbios.

Nos ensaios de germinação de conídios de *C. truncatum* observou-se, visualmente, formação de apressórios, com reduções no desenvolvimento desta estrutura nos tratamentos à base dos extratos de secreções cutâneas de anfíbios (Tabela 6). No extrato PRG houve inibições de 85 a 99%, enquanto nas concentrações de secreções da espécie PRM, 63 a 100%. Este efeito inibitório na formação de apressórios, torna-se importante, pois, espécies de patógenos que apresentam estas estruturas tem capacidade de penetrar diretamente pela superfície intacta do hospedeiro, fixando no ponto de contato causando a dissolução do tecido formando um pequeno orifício.

Consequentemente, redução na emissão desta estrutura pode auxiliar no controle da doença provocada pelo patógeno *C. truncatum*, pois o apressório atua como estrutura de infecção especializada que se forma a partir de uma hifa ou tubo germinativo, sendo importante no processo de penetração do fungo através da superfície foliar do hospedeiro [29]. O gênero *Colletotrichum*, também foi estudado por Bonaldo; Pascholati [30] que, utilizando-se de suspensões de células da levedura *S. cerevisiae* Meyen, verificaram estímulo da germinação e formação de apressórios de conídios de *Colletotrichum sublineolum* Henn. ex Sacc. & Trotter.

As secreções cutâneas presentes nas glândulas das duas espécies avaliadas (PRG e PRM) são bioquimicamente semelhantes, compostas por alcaloide, proteínas, amins biogênicas e esteroides [8]. Porém, apesar de comuns, estes compostos químicos de defesa, apresentam enorme complexidade envolvida quanto à origem evolutiva e ecológica [10].

O isolamento dos compostos presentes nas secreções cutâneas das espécies estudadas demonstraram quantidades relevantes de amins biogênicas (dehidrobufotenina, N-metil-serotonina, serotonina e bufotenina) e esteroides, principalmente do tipo bufodienolídeo (bufalina, helebregenina, marinobufagina, resibufogenina e telocinobufagina) [8]. Atualmente, a marinobufagina é o membro mais amplamente estudado da família dos bufodienolídeos, com comprovada atividade antimicrobiana, podendo ser responsável pelas inibições no desenvolvimento dos patógenos demonstradas neste estudo. Cunha-Filho e colaboradores [31] comprovaram atividade antibacteriana da marinobufagina contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

3. Conclusões

O extrato de secreções cutâneas de PRG (espécie 1) proporcionou reduções no crescimento micelial dos patógenos *F. udum*, *F. solani*, *A. flavus* e *M. phaseolina*. O desenvolvimento micelial do isolado *C. pseudometrosideri* foi estimulado na presença deste extrato. Algumas concentrações do extrato, em alguns parâmetros, foram semelhantes ao fungicida. O extrato também apresentou inibição na esporulação do patógeno *A. flavus* e inibição de germinação de conídios acima de 50%, em algumas concentrações, em *F. udum*, *C. truncatum* e *C. pseudometrosideri*.

Extrato metanólico de secreções cutâneas de PRM (espécie 2) reduziu a velocidade do crescimento micelial do patógeno *C. truncatum* na maior concentração. A produção de microescleródios de *R. solani* foi reduzida sob efeito deste extrato. Todas as concentrações do extrato demonstraram efeito inibitório na produção e germinação de conídios de *F. udum*.

Os extratos de secreções cutâneas de PRG e PRM apresentaram efeito inibitório na formação de apressórios de *C. truncatum*, com inibições acima de 60%.

Os resultados demonstrados neste trabalho ressaltam a importância da avaliação dos efeitos das secreções cutâneas de espécies de anfíbios presentes na Amazônia sobre o desenvolvimento de fitopatógenos.

4. Material e métodos

4.1. Obtenção dos extratos e isolados

Os ensaios foram conduzidos utilizando-se secreções cutâneas de duas espécies de anfíbios da ordem Anura, PRG (espécie 1) e PRM (espécie 2), provenientes da Amazônia Meridional, coletadas pela equipe de biólogos da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), *Campus Sinop/Mato Grosso*, Brasil, sob coordenação do Prof. Dr. Domingos de Jesus Rodrigues (Licença de coleta do IBAMA nº 30034-1).

O material de cada espécie foi seco, extraído três vezes em metanol e evaporado em evaporador rotatório para obtenção do extrato metanólico. O extrato metanólico obtido foi pesado, diluído em água estéril e submetido à filtração em membrana Millipore® (0,22 µm).

Foram utilizados isolados de *Fusarium udum*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum truncatum*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Calonectria pseudometrosideri* provenientes das micotecas da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) *Campus Sinop/Mato Grosso*, Brasil.

Os patógenos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) preparado, utilizando-se 39 g do produto comercial (Acumedia) e, incubados em câmara BOD a 25°C por aproximadamente dez dias para realização dos testes. No patógeno *Calonectria pseudometrosideri* foram acrescentados ao meio de BDA preparado, 20 g/L de Agar-Agar (Micromed) para cultivo e realização dos ensaios.

Os ensaios para verificar efeito dos extratos metanólicos de secreções cutâneas de PRG e PRM sobre patógenos foram realizados utilizando concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL, além de dois controles: água estéril (controle negativo) e fungicidas pyraclostrobina + metconazol (500 mL/ha) para os patógenos *F. udum*, *F. solani*, *C. truncatum*, *A. flavus*, *R. solani* e *M. phaseolina* e, azoxistrobina + ciproconazol (450 mL/ha) para o patógeno *C. pseudometrosideri* como controle positivo.

4.2. Ensaios de atividade antimicrobiana

A atividade antifúngica dos extratos de secreções cutâneas de PRG (espécie 1) e PRM (espécie 2) foi avaliada sobre crescimento micelial através do teste de disco-difusão em meio BDA [32] nos patógenos *F. udum*, *F. solani*, *C. truncatum*, *A. flavus*, *R. solani*, *M. phaseolina* e *C. pseudometrosideri*. Utilizou-se quatro discos de papel filtro esterilizados, de 5,5 mm de diâmetro, dispostos equidistantes em cada placa de Petri (9 mm), embebidos na solução dos tratamentos, nas quais depositou-se, centralmente, disco de micélio fúngico de 5 mm de diâmetro. As placas foram vedadas e levadas à câmara incubadora BOD a 25°C no escuro, até um dos tratamentos do patógeno avaliado ter atingido 2/3 da superfície da placa de Petri. Cada tratamento constituiu-se de cinco repetições com medição diária do diâmetro da colônia (média de duas medidas diametralmente opostas) [33].

Os valores obtidos para crescimento micelial foram analisados e estimados em índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) utilizando-se a fórmula apresentada por Oliveira [34]:

$$\text{IVCM} = (D - D_a)/N$$

Sendo:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial.

D = diâmetro médio atual da colônia.

D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior.

N = número de dias após a inoculação.

A determinação da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), foi realizada por meio da fórmula proposta por Bastos [35]:

$$\text{PIC} = \left(\frac{\text{diâmetro da testemunha negativa} - \text{diâmetro do tratamento}}{\text{diâmetro da testemunha negativa}} \right) \times 100$$

Analisou-se o efeito dos extratos sobre esporulação de *F. udum*, *F. solani*, *C. truncatum*, *A. flavus* e *C. pseudometrosideri*, através da adição de 10 mL de água estéril em cada placa de Petri e, em seguida, efetivou-se raspagem das colônias após término do ensaio de crescimento micelial de cada patógeno. A suspensão resultante foi filtrada em gaze e a contagem dos conídios realizada em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico. Os dados obtidos foram transformados em porcentagem de inibição da esporulação (PIE) para cada tratamento em relação ao tratamento negativo [35]:

$$\text{PIE} = \left(\frac{\text{esporulação da testemunha negativa} - \text{esporulação do tratamento}}{\text{esporulação da testemunha negativa}} \right) \times 100$$

Para avaliar o efeito dos extratos de secreções cutâneas sobre produção de microescleródios do patógeno *R. solani*, após 21 dias de incubação do disco micelial, as placas de Petri foram divididas em quadrantes iguais partindo do disco micelial central. Foram considerados quadrantes com sinal negativo (-) para ausência e, positivo (+) para presença dos microescleródios. Foi estabelecida uma escala de nota visual para quantificação de microescleródios, sendo: (++++) Muito, (+++) Moderado, (++) Pouco, (+) Muito pouco, (-) Ausente. Obteve-se então, soma dos sinais que foram convertidos em escala numeral (0 a 4) para análise estatística.

A ação dos extratos sobre germinação dos conídios de *F. udum*, *C. truncatum* e *C. pseudometrosideri* foi realizada por meio de adaptação de metodologia [36]. Para obtenção da suspensão de esporos foram utilizadas colônias fúngicas dos patógenos cultivadas em meio BDA por aproximadamente dez dias. Acrescentou-se 10 mL de água estéril sobre as culturas fúngicas, realizando-se raspagem com alça de Drigalski para posterior filtragem com gaze esterilizada. Após filtragem, a suspensão, com auxílio de câmara de Neubauer, foi ajustada de acordo com concentrações: 1×10^4 , 1×10^5 e 5×10^4 conídios mL^{-1} para patógenos *C. pseudometrosideri*, *C. truncatum* e *F. udum*, respectivamente.

Na avaliação de germinação de conídios, empregou-se microplacas de titulação estéreis com 96 poços [37]. Foram depositados em cada pocinho 40 μL da suspensão do patógeno avaliado. Nestes pocinhos foram acrescentados 40 μL dos tratamentos, onde cada coluna constituiu-se um tratamento, com oito repetições/tratamento e sete tratamentos/patógeno.

As placas foram mantidas sob incubação à 25°C por 3; 6 e 24 horas para os patógenos *C. pseudometrosideri*, *C. truncatum* e *F. udum*, respectivamente. Após o período, a germinação foi paralisada com 20 μL de azul algodão e lactofenol. As avaliações foram realizadas em microscópio óptico (AF = 400X), avaliando 100 conídios/repetição, considerando germinados, conídios que apresentavam sinal de emissão de tubo germinativo. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de germinação (PIG), para cada tratamento em relação ao tratamento negativo, por meio da fórmula conforme Bastos [35]

$$\text{PIG} = \left(\frac{\text{germinação da testemunha negativa} - \text{germinação do tratamento}}{\text{germinação da testemunha negativa}} \right) \times 100$$

Para o patógeno *C. truncatum* realizou-se avaliações da emissão de apressórios, analisando emissão da estrutura nos ensaios de germinação de conídios [38]. Os valores obtidos foram calculados em porcentagem de inibição de formação de apressórios (PIA) em relação ao controle negativo (água estéril) utilizando-se a fórmula:

$$\text{PIA} = \left(\frac{\text{n}^\circ \text{ apressório da testemunha negativa} - \text{n}^\circ \text{ apressório do tratamento}}{\text{n}^\circ \text{ apressório da testemunha negativa}} \right) \times 100$$

4.3. Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), submetendo os resultados à análise de variância (ANOVA) e, quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) com auxílio do programa SISVAR [39].

5. Agradecimentos

À CAPES pela concessão de bolsa à primeira autora e à FAPEMAT pelo apoio financeiro ao projeto: Processo N° 219465/2015.

À FAPEMAT pela concessão de bolsa de iniciação científica ao autor Bryan Wender Debiasi, e ao CNPQ pelas concessões de bolsas Pibic/CNPQ às autoras Ana Gabriela Araújo Verçosa e Daiane Lopes de Oliveira.

6. Referências

1. Nakamura, C.S. Uso de defensivos agrícolas biológicos: uma análise técnica e de mercado. Monografia Graduação Engenharia Bioquímica. Universidade de São Paulo. Brasil. **2014**, 37.
2. Avaliação do Potencial de diversificação da indústria química Brasileira. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDS). Disponível *online*: http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/pr odutos/download/aep_fep/chamada_publica_FEPprospec0311_Defensivos.pdf (acesso em: 16 novembro 2016).
3. Beltrão, T.S.P.; Scalco, P.R. O uso da inovação como estratégia competitiva no mercado de defensivos agrícolas no Brasil. *Revista de Economia do Centro-Oeste*. **2016**, 2, 2-25.
4. Phillips, M. Novas moléculas para a agricultura. Pesquisa e desenvolvimento. *Agroanalysis*. **2012**. Disponível *online*: <http://bibliotecadigital.fgv.br/ojs/index.php/agroanalysis/article/viewFile/24464/23239> (acesso em: 16 novembro 2016).
5. Magnusson, W.E.; Ishikawa, N.K.; Lima, A.P.; Dias, D.V.; Costa, F.M.; Holanda, A.S.S.; Santos, G.G.A.; Freitas, M.A.; Rodrigues, D.J.; Pezzini, F.F.; Barreto, M.R.; Baccaro, F.B.; Emilio, T.; Vargas-Isla, R. A linha de véu: a biodiversidade brasileira desconhecida. *Parcerias Estratégicas, Políticas do SNCTI sobre meio ambiente*. **2016**, 21, 45-60.
6. Stangarlin, J.R.; Kuhn, O.J.; Assi, L.; Schwan-Estrada, K.R.F. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. In: Méndez-Vilas, A. (Org.). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. 1 ed. Badajoz: Formatex Research Center. **2011**, 2, 1033-1042.
7. Weir, T.L.; Park, S.W.; Vivanco, J.M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in PlantBiology*. **2004**, 7, 472-479.
8. Fontana, P.L.M. Estudo morfológico comparativo do sistema de defesa química cutânea em duas espécies de sapos amazônicos (*Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus*). Dissertação Mestrado em Ciências. Instituto Butantan. Brasil. **2012**, 103.
9. Savitzky, A.H.; Mori, A.; Hutchinson, D.A.; Saporito, R.A.; Burghardt, G.M.; Lillywhite, H.B.; Meinwald, J. Sequestered defensive toxins in tetrapod vertebrates: principles, patterns, and prospects for future studies. *Chemoecology*. **2012**, 22, 141-158.
10. Berenbaum, M.R. The chemistry of defense: theory and practice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1995**, 92, 2-8.
11. França, J.M.S. A composição do veneno do sapo-cururuzinho muda de acordo com a sua dieta? Dissertação Mestrado em Ecologia e Tecnologia Ambiental. Universidade Federal de Alfenas. Brasil. **2015**, 60.
12. Daly, J.W.; Noimai, N.; Kongkathip, B.; Kongkathip, N.; Wilham, J.M.; Garraffo, H.M.; kaneko, T.; Spande, T.F.; Nimit, Y.; Nabhitabhatad, J.; Chan-Ard, T. Biologically active

- substances from amphibians: preliminar studies on anurans from twenty- one genera of Thailand. *Toxicon*. **2004**, 44, 805-815.
13. Honorato, M. Análise peptidômica da secreção cutânea do anuro *Eupemphix nattereri* com ênfase na prospecção de peptídeos antimicrobianos. Dissertação Mestrado em Ecologia Animal. Universidade de Brasília. Brasil. **2009**, 74.
 14. Assis, A.B. Microbiota, secreções cutâneas e microclima: consequências para os anfíbios. *Revista da Biologia*. **2012**, 8, 45-48
 15. Donato, J.V. Fungitoxicidade de extratos de secreções de glândulas de sapos sobre fitopatógenos isolados de crotalária. Monografia Bacharelado em Agronomia. Universidade Federal de Mato Grosso. Brasil. **2016**, 53.
 16. Toledo, R.C.; Jared, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **1995**, 111, 1-29.
 17. Venturoso, L.R.; Bacchi, L.M.A.; Gavassoni, W.L.; Conus, L.A.; Pontim, B.C.A.; Souza, F.R. Inibição do crescimento *in vitro* de fitopatógenos sob diferentes concentrações de extratos de plantas medicinais. *Arquivos do Instituto Biológico*. **2011**, 78, 89-95.
 18. Souza, L.S.S.; Soares, A.C.F. Extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) no controle de *Aspergillus niger* causador da podridão vermelha em sisal. *Tecno-lógica*. **2013**, 17, 124-128.
 19. Mossini, S.A.G.; Kemmelmeier, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. **2005**, 24, 139-148.
 20. Brennecke, K.; Sossai, V.L.M.; Ferraz, F.M.; Carmelindo, B.A. Efeito de doses de herbicida inibidor do fotossistema II em plântulas de *Brachiaria decumbens* spp. *Revista Agrogeoambiental*. **2015**, 7, 19-26.
 21. Almeida, R.B.; Sotoriva, A.; Salvador, A.C.A.; Folchini, C.M.; Bordignon, J.C.; Valdez, R.H. Uso racional de medicamentos numa proposta integrada de educação em saúde. **2002**. 21p. Disponível online: [http://www.cff.org.br/userfiles/2013%20-%20Farmac%C3%AAAutico%20-%20Rodrigo%20Batista%20de%20Almeida%20-\(1\).pdf](http://www.cff.org.br/userfiles/2013%20-%20Farmac%C3%AAAutico%20-%20Rodrigo%20Batista%20de%20Almeida%20-(1).pdf) (acesso em: 20 janeiro 2017).
 22. Venturoso, L.R.; Bacchi, L.M.A.; Gavassoni, W.L. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. *Summa Phytopathologica*. **2011**, 37, 18-23.
 23. Daferera, D.J.; Ziogas, B.N.; Polissiou, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, **2003**, 22, 39-44.
 24. Santos, I.T.B.F.; Santos, T.S.; Silva, F.L.S.; Gagliardi, P.R.; Oliveira Júnior, L.F.G.; Blank, A.F. Óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi como controle alternativo de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Lasiodiplodia theobromae*, fungos fitopatogênicos de pós-colheita. *Revista GEINTEC*. **2014**, 4, 1409-1417.

25. Mochko, A.C.R. Fungitoxidade de extratos de venenos de sapos sobre *Fusarium* spp. Monografia Bacharelado em Agronomia. Universidade Federal de Mato Grosso. Brasil. **2014**, 46.
26. Rodrigues, E.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Cruz, M.E.S.; Fiori-Tutida, A.C.G. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. *Acta Scientiarum Agronomy*. **2006**, 28, 123-127.
27. Pimentel, F.A.; Cardoso, M.G.; Batista, L.R.; Guimarães, L.G.L.; Silva, D.M. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shumsobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). *Acta Amazonica*. **2010**, 40, 213-220.
28. Kunieda-Alonso, S.; Alfenas, A.C.; Maffia, L.A. Sobrevivência de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* tratados com *Trichoderma* spp., em restos de cultura de *Eucalyptus* sp. *Fitopatologia Brasileira*. **2005**, 30, 164-168.
29. Khan, A.; Hsiang, T. The infection process of *Colletotrichum graminicola* and relative aggressiveness on four turfgrass species. *Canadian Journal of Microbiology*. **2003**, 49, 433-442.
30. Bonaldo, S.M.; Pascholati, S.F. Efeito de frações parcialmente purificadas de *Saccharomyces cerevisiae* na germinação de conídios e formação de apressórios por *Colletotrichum sublineolum* e *Colletotrichum lagenarium*. *Summa Phytopathologica*. **2007**, 33, 233-238.
31. Cunha Filho, G.A.; Schwartz, C.A.; Resck, I.S.; Murta, M.M.; Lemos, S.; Castro, M.S.; Kyaw, C.; Pires Jr, O.R.; Leite, J.R.S.; Bloch, C.; Schwartz, E.F. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*. *Toxicon*. **2005**, 45, 777-782.
32. Brambilla, I.; Souza, M.G.; Cordeiro, A.O.; Souza, A.G.C.; Oliveira, M.R. Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais no Controle de *Moniliophthora perniciosa*. Anais...IX Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental. Brasil. **2010**, 51-57.
33. Abreu, M.G.P.; Ferreira, J.B.; Araújo, M.L.; Neves, Y.Y.B. Araújo, J.M. Efeito dos óleos de palmeiras da Amazônia sobre o desenvolvimento de *Fusarium solani*. *Enciclopédia Biosfera*. **2014**, 10, 890-896.
34. Oliveira, J.A. Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.). *Ciência e Prática*. Lavras. **1992**, 16, 42-47.
35. Bastos, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis* e outros fungos fitopatogênicos. *Fitopatologia Brasileira*. 1997, 22, 441-443.
36. Stangarlin, J.R.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Cruz, M.E.S.; Nozaki, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. **1999**,

2, 16-21.

37. Almeida, T.F.; Camargo, M.; Panizzi, R.C. Efeito de extratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. *Summa Phytopathologica*. **2009**, 35, 196-201.
38. Bonaldo, S.M.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Tessmann, D.J.; Scapim, C.A. Fungitoxicidade, Atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora**. *Fitopatologia Brasileira*. **2004**, 29, 128-134.
39. Ferreira, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*. **2008**, 6, 36-44.

CONCLUSÃO GERAL

Na produção de fitoalexinas, o extrato metanólico de secreções glandulares de PRG apresentou ação supressora na síntese deste mecanismo de defesa em cotilédones de soja da cultivar TMG 132 RR. Nos demais materiais vegetais analisados não houve ação sobre indução de fitoalexinas deste extrato. Nos ensaios com extrato PRM, houve indução de fitoalexinas em soja, nas cultivares TMG 132 RR e Monsoy 8372 IPRO e, em hipocótilos de feijão.

Nos ensaios de atividade enzimática, observou-se induções de PRG na atividade das enzimas peroxidases, polifenoloxidase e teor de proteínas totais na cultivar de soja TMG 132 RR. Em PRM houve ação indutora na atividade de peroxidases e polifenoloxidase nas cultivares Monsoy 8372 IPRO e TMG 132 RR, respectivamente. A atividade de β -1,3-glucanase nas cultivares TMG 132 RR e Monsoy 8372 IPRO é reduzida conforme aumento na concentração dos extratos PRG e PRM, respectivamente.

A atividade antimicrobiana do extrato metanólico de secreções glandulares de PRG confirmou-se em reduções do crescimento micelial nos patógenos *F. udum*, *F. solani*, *A. flavus* e *M. phaseolina*. Em contrapartida, o desenvolvimento micelial do isolado *C. pseudometrosideri* foi estimulado na presença deste extrato. Concentrações do extrato, em alguns parâmetros, foram similares ao controle químico. O extrato também apresenta ação fungitóxica na esporulação do patógeno *A. flavus* e inibição de germinação de conídios acima de 50%, em algumas concentrações, em *F. udum*, *C. truncatum* e *C. pseudometrosideri*.

Extrato metanólico de secreções glandulares de PRM reduziu a velocidade do crescimento micelial do patógeno *C. truncatum* na maior concentração. Os resultados demonstram que o extrato possui ação sobre a produção de microescleródios de *R. solani*. Todas as concentrações do extrato demonstraram efeito inibitório na produção e germinação de conídios de *F. udum*.

As atividades demonstradas pelos extratos neste estudo, revelam a presença de compostos nas secreções cutâneas das espécies com atividade antifúngica e elicitora de mecanismos de defesa em plantas. Esta pesquisa torna-se de grande importância na busca de novas moléculas de agroquímicos, utilizando-se de substâncias de origem natural, oriundas da biodiversidade da Amazônia Meridional.

Como pode ser observado, a relevância deste estudo não está somente nos resultados satisfatórios adquiridos, mas no aumento de informações e, conseqüente valorização de substâncias, até então, pouco exploradas.