UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise proteômica comparativa das secreções das glândulas parotoides e
mucosas do sapo *Rhinella schneideri* e avaliação, *in vitro*, da atividade
antimicrobiana**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Toxicologia para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado: Fernando Antonio Pino Anjolette

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani
Arantes Braga

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia em 03/09/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Anjolette, Fernando Antonio Pino

Análise proteômica comparativa das secreções das glândulas parotoides e mucosas do sapo *Rhinella schneideri* e avaliação, *in vitro*, da atividade antimicrobiana. Ribeirão Preto, 2015

140 p. : il. , 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia

Orientadora: **Braga, Eliane Candiani Arantes**

1. Análise proteômica. 2. *Rhinella schneideri*. 3. Atividade antimicrobiana

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernando Antonio Pino Anjolette

Análise proteômica comparativa das secreções das glândulas parotóides e mucosas do sapo *Rhinella schneideri* e avaliação, *in vitro*, da atividade antimicrobiana

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani
Arantes Braga

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

**Dedico este trabalho aos
meus pais Antônio Edes e
Maria de Fátima e ao meu
irmão Cristiano. Obrigado
pela força e compreensão.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais. A força que eu sempre recebi de vocês me alavancou a sempre querer ir mais longe nas minhas conquistas. Vocês, que sempre me apoiaram, terão minha eterna gratidão e meu amor. Suas orações e seus pensamentos positivos fortalecem a minha caminhada. Ao meu querido irmão! Irmão que eu tenho muito orgulho. Você é o irmão que todos gostariam de ter, mas apenas eu tive a sorte de tê-lo.

À professora Dra. Eliane Candiani Arantes pela orientação, disponibilidade, críticas e pelas inúmeras sugestões relevantes durante todo o meu doutorado. Obrigado pela força e por não ter desistido de mim. Seu incentivo me faz ter coragem de abraçar a pesquisa com grande carinho e seguir em frente.

À professora Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro, pela colaboração nos experimentos antimicrobianos. Muito obrigado pelo acolhimento no seu laboratório e por todo o direcionamento na minha pesquisa. Pesquisadores que amam o que fazem, como a senhora, sempre nos incentivam a continuar no caminho acadêmico.

Aos professores Dr. Loïc Quinton e Edwin De Pauw (Laboratório de Espectrometria de Massas da Universidade de Liège – Bélgica). Obrigado pela oportunidade de estagiar e por contribuírem na realização desta tese. *Je ne sais pas comment vous remercier pour votre aide. Je vous suis vraiment reconnaissant pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci mille fois.*

Ao professor Norberto Peporine Lopes, por toda ajuda imediata e pelos conselhos sobre espectrometria de massas.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP-USP, assim como ao programa de pós-graduação em toxicologia. Ao serviço de pós-graduação, Rosana Florêncio e a secretária Rosemary Ioshimine, obrigado pela paciência e pela ajuda em todos esses anos. Vocês sempre terão meu carinho e respeito.

À grande amiga e companheira, Karla de Castro Figueiredo Bordon (Karlinha). Não acredito que o destino coloque pessoas aleatórias na nossa vida. Eu tenho plena convicção que, o ser humano incrível que você é, me ajudou muito no que sou. Serei sempre grato pela ajuda e pela maravilhosa companhia durante estes 7 anos. Sou muito sortudo por ter uma amiga sincera e tão doce como você. Obrigado por tudo!

À técnica e amiga Iara Aimê Cardoso (Iarinha). Obrigado pela ajuda com os meus experimentos nos dias mais complicados e cansativos do meu doutorado.

Ao técnico do laboratório de biotecnologia -Unesp (Araraquara) Rodrigo Sorrechia. Obrigado pela amizade, paciência e por toda a ajuda com os ensaios antimicrobianos.

Aos meus amigos do Laboratório de Toxinas Animais (LTA-FCFRP-USP). Não há como não agradecer à esta grande família científica que formamos. Somos em muitos, com nossas particularidades e complexidades, mas sempre caminhando com harmonia e companheirismo. Vou levar um pouco de cada um, pois vocês sempre serão parte da minha vida. Sempre me lembrarei do jeito especial de cada um. Sou muito grato a todos vocês por permitirem, um dia, eu fazer parte do mundo de vocês. Aos meus queridos amigos e amigas: Cidinha, Karlinha, Camis, Jo, Manu, Carol, Elisa, Felipe, Fefs, Fran, Mateus, Er, Gi, Dora, Isa, Pri, Rê, Helô e Chá. Minha eterna gratidão por ter, com certeza, me ajudado de alguma forma, seja em conversas, explicações, risadas, apoio ou até mesmo pelo simples fato de estarem perto, fazendo-me sentir seguro.

Aos meus velhos amigos e companheiros que eu pude fazer durante a minha caminhada. Vocês estão longe fisicamente, mas o carinho que eu sinto por cada um é como se estivéssemos juntos, todos os dias. O apoio de vocês me ajudou a ficar em pé e seguir em frente, mesmo quando eu estava sem forças. Ao meu querido irmão que, um dia, apareceu na minha vida, “Catito”, e aos que estiveram mais presentes durante este meu período: Bregge, Dani, Gabi, Nadinha e Rô. Muito obrigado!

Aos meus queridos e amados companheiros de cada dia: Samu e Thaís. O apoio que vocês me dão, todos os dias, traz cor aos meus dias nublados. Com vocês, aprendi que a distância pode até machucar, mas nunca acabará com o carinho e amor que sempre existirá.

A todos que estiveram direta e indiretamente relacionados com a concretização deste projeto. Muito obrigado!

**“Saber quando se deve esperar
é o grande segredo do sucesso”**

Xavier de Maistre

RESUMO

ANJOLETTE, F.A.P. **Análise proteômica comparativa das secreções das glândulas parotoides e mucosas do sapo *Rhinella schneideri* e avaliação, *in vitro*, da atividade antimicrobiana.** 2015. 140 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Nas secreções glandulares de anfíbios, muitos dos compostos isolados apresentam ação antifúngica e/ou antibacteriana, cuja função é protegê-los contra infecções, uma vez que estes animais habitam ambientes inóspitos. Os peptídeos têm-se destacado dentre os compostos com atividade antimicrobiana isolados de venenos de diversos animais. Além disso, compostos de natureza não proteica presentes nestas secreções têm demonstrado ação antimicrobiana. O objetivo deste estudo foi, primeiramente, isolar e caracterizar, estruturalmente, compostos com atividade antifúngica relevante. Em um segundo momento, foi realizar um estudo comparativo, através de técnicas ômicas, dos compostos presentes nas secreções das glândulas mucosas e parotoides. Os ensaios antimicrobianos, *in vitro*, foram realizados com fungos, leveduras e bactérias. O material de baixa massa molecular da água de diálise das secreções das glândulas parotoides apresentou atividade antimicrobiana sobre, principalmente, os fungos filamentosos. Este mesmo material foi submetido a uma filtração em gel, resultando em 11 frações as quais foram testadas contra *Microsporium canis* no ensaio de diluição seriada. A fração 9 mostrou atividade antifúngica e foi submetida a uma cromatografia de fase reversa, resultando em 9 frações, as quais foram testados contra *M. canis*. Destas frações, as frações 1 e 9 demonstraram, respectivamente, atividade fungicida e fungistática contra *M. canis*. No segundo momento, as secreções de ambas as glândulas foram analisadas por nanocromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um espectrômetro de massas de alta resolução. Desta análise, foram obtidos 11.034 compostos, distribuídos entre as secreções de ambas as glândulas. Todos os íons obtidos foram fragmentados (MS/MS) e submetidos à análise no programa PEAKS 6. Foram obtidas 511 sequências de peptídeos e/ou sequências parciais de proteínas das secreções das glândulas mucosas, enquanto que para as secreções das glândulas parotoides foram obtidas 110 sequências. Nas secreções das glândulas mucosas, a maior parte das sequências de aminoácidos são de compostos com massas moleculares entre 1 e 3 kDa, o que corresponde a 82% das sequências obtidas. Já para as secreções das glândulas parotoides, a maioria das sequências de aminoácidos são correspondentes aos peptídeos/proteínas com massas moleculares entre 1 e 2 kDa, o que representa 55% do total de sequências obtidas para esta secreção. As sequências foram analisadas pelo BLAST e revelou que um peptídeo presente nas secreções das glândulas parotoides apresenta 66,7% de identidade com o peptídeo antimicrobiano conhecido como ponerisin-G2. Entre as sequências encontradas para as secreções das glândulas mucosas, o destaque foi para o precursor do peptídeo brevinin-1, com identidade de 31,2%. Todas as frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas e parotoides foram direcionadas à análise por espectrometria de massas MALDI-TOF, o que resultou em maiores informações sobre a natureza dos compostos presentes nestas frações. A fração 8 das secreções das glândulas mucosas foi fracionada por cromatografia de fase reversa, resultando em 7 frações denominadas Pep1-Pep7. O composto denominado Pep7 teve sua massa molecular (6,012 kDa) determinada através da espectrometria de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier com ionização por electrospray. Os peptídeos Pep4, Pep6 e Pep7 foram sequenciados pelo método de degradação de Edman. Estes peptídeos mostraram identidades com peptídeos antimicrobianos das famílias das tigerinin, shepherin e microcin e brevinins, respectivamente. Este estudo demonstrou que há compostos com atividade antimicrobiana significativa nestas secreções, principalmente para fungos filamentosos. Além disso, foi o primeiro a fazer uma análise comparativa dos compostos presentes nas secreções das glândulas mucosas e parotoides de *R. schneideri*, destacando a presença de peptídeos antimicrobianos.

Palavras-chave: antimicrobianos, espectrometria de massas, proteoma, *R. schneideri*, secreções das glândulas mucosas e parotoides.

ABSTRACT

ANJOLETTE, F.A.P. **Comparative proteomic analysis of mucous and parotoid gland secretions of *Rhinella schneideri* toad and *in vitro* evaluation of their antimicrobial activity**. 2015. 140 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

In amphibian glandular secretions, many of the isolated compounds have antifungal and/or antibacterial action, whose function is to protect the animal against infections, since they usually inhabit inhospitable environments. Peptides have been highlighted among antimicrobial compounds isolated from several venomous animals. In addition, non-proteic compounds present in these secretions have demonstrated antimicrobial action. The aim of this study was to isolate and structurally characterize antifungal compounds from *Rhinella schneideri* parotoid and mucous secretions. Moreover, in this study it was also performed a comparative study of the composition of mucous and parotid gland secretion by omics techniques. The low molecular weight material from parotoid gland secretion showed antimicrobial activity against filamentous fungi and bacteria. The low molecular weight material that showed antimicrobial activity was subjected to gel filtration, resulting in 11 fractions that were tested against *Microsporum canis* in serial dilution assay. The fraction 9 showed antifungal activity and it was subjected to a reversed phase chromatography, resulting in 9 fractions, which were tested against *M. canis*. Among them, fraction 1 and 9 showed fungicidal and fungistatic activity against *M. canis*, respectively. Gland secretion and the respective low molecular weight material were subjected to gel filtration and, each obtained fraction was analyzed by SDS-Tricine-PAGE. Secretion of the both glands were also quantitatively analyzed by nano ultra-performance liquid chromatography hyphenated to a high-resolution mass spectrometer. It was obtained 6,460 compounds distributed among secretions of both glands. All obtained ions were fragmented (MS/MS) and analyzed by PEAKS 6 program. 511 sequences were obtained from mucous gland secretion, against 110 sequences from parotoid gland secretion. In mucous gland secretion, most of the amino acid sequences (82%) are compounds with molecular masses between 1 and 3 kDa, while for parotoid gland secretion, most of sequences (55%) correspond to peptides/proteins with molecular masses between 1 and 2 kDa. Sequences were analyzed by BLAST, revealing a peptide in parotoid gland secretion that presents 66.7% of identify with an antimicrobial peptide known as ponicin-G2. Among sequences found in mucous gland secretion, the highlight was to one presenting 31.2% of identify with brevinin-1 precursor. All fractions obtained from gel filtration of the mucous and parotoid gland secretions were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry, which resulted in more informations about the nature of the compounds present in these secretions. Fraction 8 from mucous gland secretion was fractionated by reversed phase chromatography on C18 column, resulting in seven fractions denominated Pep1-Pep7. Pep7 presented a molecular mass of 6.012 kDa when analyzed by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. In this analysis, six precursor ions were identified, but no sequence was obtained. Pep4, Pep6 and Pep7 were sequenced by Edman degradation method. These peptides showed identity with tigerinin, shepherin and microcin and brevinins, respectively. This study revealed compounds with significant antimicrobial activity in the analyzed secretions, especially to filamentous fungi. In addition, it was the first to perform a comparative analysis of compounds present in mucous and parotoid gland secretion from *R. schneideri* toad, highlighting the presence of antimicrobial peptides.

Keywords: antimicrobial; mass spectrometry; proteome; *R. schneideri*; mucous and parotoid gland secretions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica da espécie de <i>Rhinella schneideri</i> na América do Sul.....	1
Figura 2. <i>Rhinella schneideri</i> (Rs).....	3
Figura 3. Bufodienolídeos.....	7
Figura 4. Principais modelos de mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos (PAMs).....	10
Figura 5. Desenvolvimento da resistência microbiana.....	12
Figura 6. Principais mecanismos biológicos de resistência microbiana.....	13
Figura 7. Agentes antimicrobianos aprovados pelo FDA.....	14
Figura 8. Organograma da metodologia utilizada no primeiro capítulo.....	17
Figura 9. Protocolo da atividade antifúngica contra <i>C. albicans</i>	24
Figura 10. Diluição seriada em microplaca de 96 poços.....	31
Figura 11. Perfil de eluição da filtração em gel em coluna <i>HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR</i> (GE Healthcare, Suécia) de 25 mg das secreções mucosas e parotídeas dispersos 1 mL de uma solução AMBIC 0,2 mol/L e SDS-Tricina-PAGE das frações correspondentes de cada perfil de eluição.....	34
Figura 12. Perfil de eluição da filtração em gel em coluna <i>HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR</i> (GE Healthcare, Suécia) de 25 mg do material de baixa massa molecular das secreções das glândulas mucosas e parotídeas dispersos 1 mL de uma solução AMBIC 0,2 mol/L e SDS-Tricina-PAGE das frações correspondentes de cada perfil de eluição..	35
Figura 13. Perfil cromatográfico da fração 9 do material das secreções das glândulas parotídeas difundido na água de diálise em coluna de fase reversa Luna PFP (2) 3 µm (pentafluorofenil propilo).....	38
Figura 14. Perfil eletroforético e análise densitométrica das secreções das glândulas mucosas e parotídeas de <i>Rhinella schneideri</i>	42
Figura 15. Tecnologias ômicas.....	58

Figura 16. Fluxograma geral para análise proteômica.....	60
Figura 17. Organograma sobre a metodologia utilizada no segundo capítulo.....	66
Figura 18. Perfil de varredura no <i>modo full scan</i> das secreções das glândulas parotoides (A) e mucosas (B) por nanoACQUITY UPLC acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Orbitrap.....	73
Figura 19. População de massas moleculares das secreções das glândulas de <i>R. schneideri</i>	74
Figura 20. Compostos de mesmas massas moleculares compartilhados entre as secreções de ambas as glândulas.....	75
Figura 21. Distribuição das massas moleculares (kDa) e suas porcentagens no total de sequências obtidas pelo programa PEAKS.....	76
Figura 22. Alinhamento realizado no <i>MultAlin</i> entre o peptídeo das secreções das glândulas parotoides identificado no programa PEAKS com o peptídeo ponerisin-G2 (UniProtKB: P82415).....	83
Figura 23. Alinhamento realizado no <i>MultAlin</i> entre o peptídeo das secreções das glândulas mucosas identificado no programa PEAKS e o precursor do brevinin-1 (sem peptídeo sinal) (UniProtKB: U6E4H5) e a forma madura ativa do peptídeo brevinin-1 (UniProtKB: P32423).....	84
Figura 24. Eletroforese SDS-Tricina-PAGE da fração 8 das secreções das glândulas mucosas.....	91
Figura 25. Perfil cromatográfico da fração 8 das secreções das glândulas mucosas em coluna semipreparativa C18 (fase reversa).....	92
Figura 26. Espectro de massas do composto Pep7 obtido por MALDI-TOF no modo linear positivo utilizando matriz DHB.....	94
Figura 27. Espectro de massas do Pep7 obtido por espectrometria de ressonância ciclônica de íons por transformada de Fourier com ionização por electrospray (ESI) (SolariX XR).....	95
Figura 28. Alinhamento realizado no <i>MultAlin</i> entre o Pep7 e outros peptídeos antimicrobianos pertencentes à família brevinin-1.....	97

Figura 29. Alinhamento realizado no *MultAlin* entre o peptídeo Pep6 e outros peptídeos antimicrobianos depositados nos bancos de dados..... **99**

Figura 30. Alinhamento realizado no *MultAlin* entre o Pep4 e outros peptídeos antimicrobianos pertencentes à família tigerinin..... **100**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Toxicidade e efeitos dos componentes presentes nas secreções de anfíbios..	4
Tabela 2. Principais peptídeos com atividade antimicrobiana encontrados nas secreções da pele ou em outros órgãos de anfíbios.....	6
Tabela 3. Microrganismos utilizados nos testes antimicrobianos.....	22
Tabela 4. Recuperação das frações eluídas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas e parotóides e do material das secreções das glândulas mucosas e parotóides difundido na água de diálise.....	36
Tabela 5. Recuperação das frações eluídas da cromatografia de fase reversa em coluna Luna PFP (2) 3 µm (pentafluorofenil propilo) do material das secreções das glândulas parotóides difundido na água de diálise obtido das secreções das glândulas parotóides.....	39
Tabela 6. Densidade óptica (%) de cada banda das secreções das glândulas mucosas e parotóides da SDS-PAGE.....	44
Tabela 7. Valores dos halos de inibição de crescimento contra <i>C. albicans</i>	47
Tabela 8. Valores das C.I.Ms e das C.F.Ms utilizando secreções das glândulas parotóides e mucosas e material da água da diálise das glândulas parotóides frente às leveduras.....	48
Tabela 9. Valores das C.I.Ms e das C.F.Ms utilizando as secreções das glândulas parotóides, glândulas mucosas e material de baixa massa molecular da água de diálise das glândulas parotóides frente aos fungos filamentosos.....	51
Tabela 10. Valores das C.I.Ms e das C.B.Ms utilizando secreções das glândulas parotóides e mucosas e material de baixa massa molecular da água de diálise das glândulas parotóides frente às bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	52
Tabela 11. Valores das C.I.Ms e das C.F.Ms utilizando frações resultantes da filtração molecular das secreções das glândulas parotóides difundido na água de diálise frente ao <i>M. canis</i>	54
Tabela 12. Valores das C.I.Ms e das C.F.Ms utilizando as frações resultantes do fracionamento por cromatografia de fase reversa (Luna PFP) da fração 9 do material de baixa massa molecular da água de diálise das glândulas parotóides frente ao <i>M. canis</i>	55

Tabela 13. Principais peptídeos antimicrobianos encontrados através da análise proteômica das secreções de anfíbios.....	63
Tabela 14. Identificação dos compostos majoritários no perfil de eluição das secreções das glândulas parotoides através do tempo de retenção observado na análise realizada pelo nanoACQUITY UPLC acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Orbitrap.....	78
Tabela 15. Identificação dos compostos majoritários no perfil de eluição das secreções das glândulas mucosas através do tempo de retenção observado na análise realizada pelo nanoACQUITY UPLC acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Orbitrap.....	79
Tabela 16 Espécies iônicas moleculares detectadas nas frações das secreções das glândulas mucosas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF (modo linear com matriz DHB e modo refletido com matriz HCCA) e as espécies iônicas moleculares encontradas pelo Q-Exactive.....	87
Tabela 17. Espécies iônicas moleculares detectadas nas frações das secreções das glândulas parotoides por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF (modo linear com matriz DHB e modo refletido com matriz HCCA) e as espécies iônicas moleculares encontradas pelo Q-Exactive.....	89
Tabela 18. Recuperação das frações eluídas da fração 8 das secreções das glândulas mucosas em coluna de fase reversa semipreparativa C18.....	93
Tabela 19. Sequenciamento e parâmetros físicos e químicos dos peptídeos eluídos da fração 8 das secreções das glândulas mucosas em coluna de fase reversa semipreparativa C18.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN: acetonitrila

ALC: *Average Local Confidence*

AMBIC: bicarbonato de amônio

AMPs: *antimicrobial peptides*

APD: *Antimicrobial peptides Database*

ANF: anfotericina

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC: *American Type Culture Collection*

AZT: anilinothiazolinona

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

C.B.M.: concentração bactericida mínima

CDC: *Centers for Diseases Control and Prevention*

C.F.M.: concentração mínima fungicida

CG-EM: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

C.I.M.: concentração inibitória mínima

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DDA: modo de dados análise dependente

DDT: diclorodifeniltricloroetano

DHB: ácido 2,5-dihidróxido benzóico

DMSO: dimetilsulfóxido

EIM-M-MR: Espécie Iônica Molecular Detectada pelo MALDI - Massa Relativa

EIM-QE-MR: Espécie Iônica Molecular Detectada pelo Q-Exactive Orbitrap - Massa Relativa

ESI: ionização por electrospray

FDA: *Food and Drug Administration*

FOC: Fundação Oswaldo Cruz

FPLC: cromatografia líquida rápida de proteínas

HCCA: (ácido α -ciano- 4-hidroxicinâmico

HCD: *high-energy dissociation*

IAA: iodoacetamida

ID: identidade

INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

KPC: *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*

MS: espectrometria de massas

MS/MS: espectrometria de massas em tandem

MS-ESI: espectrometria de massas com ionização por electrospray

MALDI: *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*

MDR-TB: *multidrug-resistant tuberculosis*

MGMD: material das secreções das glândulas mucosas difundido na água de diálise

MGPD: material das secreções das glândulas parotoides difundido na água de diálise

MOPS: ácido 3-[N-Morfino] propanosulfônico

MRSA: *methicilin resistente Staphylococcus aureus*

MW: massa molecular experimental

m/z: razão massa/carga

NDM-1: *New Delhi Metallobetalactamase-1*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

PAMs: peptídeos antimicrobianos

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PDA: *potato dextrose agar*

PMF: *Peptide Mass Fingerprinting*

PMM: padrão de massa molecular

PTC: feniltiocarbamil

PTH: feniltiohidantoína

RNA_m: RNA mensageiro

PFP: pentafluorofenil propilo

ppm: erro do precursor da massa em partes por milhão

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

Rs: *Rhinella schneideri*

SDS: dodecil sulfato de sódio

SIM: *selected ion monitoring*

SGM: secreções das glândulas mucosas

SGP: secreções das glândulas parotoides

TFA: ácido trifluoroacético

TOF: *time of flight*

TR: tempo de retenção

UPLC: *Ultra Performance Liquid Chromatography*

UFC: unidades formadoras de colônia

APRESENTAÇÃO

Atualmente, há um interesse elevado do setor de desenvolvimento de fármacos pelo estudo de venenos animais, visto que suas toxinas são consideradas poderosas ferramentas para a investigação e elucidação de eventos biológicos em nível celular e molecular e apresentam grande potencial biotecnológico.

O estudo das secreções glandulares de diferentes espécies de anuros tem caracterizado uma ampla variedade de compostos biologicamente ativos com grande potencial terapêutico.

Muitos dos compostos isolados das secreções glandulares de anfíbios apresentam ação antifúngica e/ou antibacteriana, cuja função é protegê-los contra infecções. Com o surgimento de microrganismos resistentes a diversos antibióticos, o estudo de compostos com atividades antimicrobianas torna-se essencial a fim de assegurar o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos específicos e eficientes.

Dentre os compostos isolados de toxinas animais com atividade antimicrobiana, os compostos de natureza peptídica têm-se destacado. No entanto, outras classes de moléculas presentes nestes venenos também apresentam ação antimicrobiana. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi o isolamento e caracterização estrutural e funcional de compostos presentes nas secreções glandulares (mucosas e parotoides) de *Rhinella schneideri* com relevante atividade antimicrobiana, além da análise proteômica comparativa das secreções de ambas as glândulas por espectrometria de massas.

Este estudo descreve, no primeiro capítulo, a avaliação, *in vitro*, da atividade antimicrobiana das secreções das glândulas mucosas e parotoides do sapo *R. schneideri*. Nesse capítulo, a partir do fracionamento do veneno bruto de ambas as glândulas, todas as frações foram testadas em ensaios antimicrobianos e o(s) composto(s) responsável(is) pela atividade foram purificados e identificados.

No segundo capítulo estão apresentados os resultados da análise comparativa das secreções das glândulas mucosas e parotoides do sapo *R. schneideri* por espectrometria de massas, fornecendo um panorama dos compostos presentes em ambas as secreções glandulares. Essas secreções apresentam inúmeros compostos, os quais foram identificados e sequenciados, destacando aqueles com significativa ação antimicrobiana.

As informações obtidas deste estudo sobre a estrutura e função dos compostos presentes nas secreções glandulares do sapo *R. schneideri* contribuem para ampliar o conhecimento referente à composição destas secreções, visto que os principais estudos

envolvendo este animal estão restritos aos compostos não proteicos. O conhecimento adquirido neste estudo, e apresentado nas próximas páginas, amplia as possibilidades de aplicações dos compostos bioativos presentes nestas secreções como ferramentas moleculares, bem como para desenvolvimentos biotecnológicos.

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	iv
Lista de abreviaturas e siglas.....	v
Apresentação.....	vi

CAPÍTULO I

Avaliação, *in vitro*, da atividade antimicrobiana das secreções das glândulas mucosas e parotóides do sapo *Rhinella schneideri*

1. Introdução.....	1
1.1. Anfíbios.....	1
1.2. Toxinas de anfíbios.....	3
1.3. Peptídeos antimicrobianos.....	8
1.4. Resistência aos antimicrobianos.....	10
2. Objetivos.....	16
3. Material e Métodos.....	17
3.1. Obtenção das secreções glandulares.....	17
3.1.1. Glândulas parotóides.....	18
3.1.2. Glândulas mucosas.....	18
3.1.3. Diálise das secreções das glândulas parotóides e mucosas.....	18
3.2. Fracionamento das amostras.....	19
3.2.1. Filtração em gel.....	19
3.2.2. Cromatografia de fase reversa em coluna Luna PFP (2) (pentafluorofenil propilo).....	19
3.3. Caracterização bioquímica.....	20
3.3.1. SDS-Tricina-PAGE.....	20
3.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) e densitometria.....	20
3.4. Ensaio de atividade antimicrobiana.....	21
3.4.1. Atividade antifúngica contra <i>Candida albicans</i>	22
3.4.2. Teste de difusão em ágar (atividade bactericida).....	25
3.4.3. Determinação da concentração inibitória mínima (C.I.M.) e da concentração bactericida mínima (C.B.M.) para as bactérias <i>E. coli</i> (ATCC 25922) e <i>S. aureus</i> (ATCC 25923).....	26
3.4.4. Teste de difusão em ágar (atividade antifúngica).....	27
3.4.5. Determinação da concentração inibitória mínima (C.I.M.) e da concentração fungicida mínima (C.F.M.) para leveduras e fungos filamentosos.....	28
3.4.5.1. Preparo das amostras.....	28
3.4.5.2. Padronização da suspensão de leveduras.....	28

3.4.5.3. Padronização da suspensão de fungos filamentosos.....	30
3.4.6. Determinação da concentração inibitória mínima (C.I.M.) e da concentração fungicida mínima (C.F.M.) para <i>Microsporium canis</i> para as frações obtidas da filtração em gel.....	31
3.4.7. Determinação da concentração inibitória mínima (C.I.M.) e da concentração fungicida mínima (C.F.M.) para <i>Microsporium canis</i> utilizando as frações obtidas da cromatografia de fase reversa em coluna Luna PFP (2) 3 µm (pentafluorofenil propilo).....	32
4. Resultados e Discussão.....	33
4.1. Fracionamento das amostras.....	33
4.1.1. Filtração em gel das secreções das glândulas e do material difundido na água de diálise das glândulas mucosas e parotoides de <i>Rhinella schneideri</i>	33
4.1.2. Cromatografia de fase reversa em coluna Luna PFP (2) 3 µm (pentafluorofenil propilo)	38
4.2. Caracterização bioquímica.....	39
4.2.1. SDS-Tricina-PAGE.....	39
4.2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agente desnaturante (SDS-PAGE) e densitometria	41
4.3. Ensaios de atividade antimicrobiana.....	45
4.3.1. Atividade antifúngica contra <i>Candida albicans</i>	45
4.3.2. Teste de difusão em ágar (atividade bactericida).....	45
4.3.3. Teste de difusão em ágar (atividade antifúngica).....	46
4.3.4. Determinação da concentração inibitória mínima (C.I.M.) e da concentração fungicida mínima (C.F.M.) frente às leveduras.....	48
4.3.5. Determinação da concentração inibitória mínima (C.I.M.) e da concentração fungicida mínima (C.F.M.) frente aos fungos filamentosos.....	49
4.3.6. Determinação da concentração inibitória mínima (C.I.M.) e da concentração bactericida mínima (C.B.M.) frente às bactérias <i>E. coli</i> (ATCC 25922) e <i>S. aureus</i> (ATCC 25923).....	52
4.3.7. Determinação da concentração inibitória mínima (C.I.M.) e da concentração fungicida mínima (C.F.M.) frente ao <i>Microsporium canis</i>	53
4.3.8. Determinação da concentração inibitória mínima (C.I.M.) e da concentração fungicida mínima (C.F.M.) para <i>Microsporium canis</i> utilizando as frações obtidas da cromatografia de fase reversa em coluna Luna PFP (2) 3 µm (pentafluorofenil propilo).....	55

CAPÍTULO II

Análise comparativa das secreções das glândulas mucosas e parotoides do sapo *Rhinella schneideri* por espectrometria de massas

5. Introdução.....	58
5.1. Proteômica.....	58
5.2. Proteômica das secreções de anfíbios.....	61

6. Objetivos.....	65
7. Material e Métodos.....	66
7.1. Obtenção das secreções glandulares.....	66
7.2. Análise proteômica.....	66
7.2.1. Análise por nanoACQUITY UPLC acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Orbitrap.....	67
7.2.2. Redução e alquilação das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas e parotoides.....	67
7.2.3. Análise das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas e parotoides por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF.....	68
7.2.4. SDS-Tricina-PAGE.....	69
7.2.5. Cromatografia de fase reversa da fração 8 das secreções das glândulas mucosas em coluna semipreparativa C18.....	69
7.2.6. Espectrometria de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier com ionização por electrospray (ESI).....	69
7.2.7. Digestão com Tripsina.....	70
7.2.8. <i>Peptide Mass Fingerprinting (PMF)</i>	70
7.2.9. Sequenciamento amino-terminal.....	71
8. Resultados e Discussão.....	72
8.1. Análise proteômica.....	72
8.1.1. Análise por nanoACQUITY UPLC acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Orbitrap.....	72
8.1.2. Redução e alquilação das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas e parotoides.....	84
8.1.3. Análise das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas e parotoides por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF.....	85
8.1.4. SDS-Tricina-PAGE.....	90
8.1.5. Cromatografia de fase reversa da fração 8 das secreções das glândulas mucosas em coluna semipreparativa C18.....	91
8.1.6. Espectrometria de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier com ionização por electrospray (ESI).....	93
8.1.7. <i>Peptide Mass Fingerprinting (PMF)</i>	96
8.1.8. Sequenciamento amino-terminal.....	96
9. Conclusões.....	102
10. Referências.....	103
11. Anexos.....	122
12. Apêndice.....	126

CAPÍTULO I

Avaliação, *in vitro*, da atividade antimicrobiana das secreções das glândulas mucosas e parotoides do sapo *Rhinella schneideri*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Anfíbios

Atualmente, são conhecidas 7.131 espécies de anfíbios, das quais 6.478 espécies (88%) pertencem à ordem Anura (sapos, rãs e pererecas), 648 (9%) são Caudata e 192 (3%) são Gymnophiona (AMPHIBIAWEB SPECIES NUMBERS, 2014; POUG; JANIS; HEISER, 2008).

Os anuros datam do período Jurássico (150 milhões de anos) e estão amplamente distribuídos entre os mais diversos habitats, apesar do modo de reprodução aquático e da pele permeável à água (HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2002). A ordem Anura é composta por 55 famílias, distribuídas em 430 gêneros. As maiores famílias são Hylidae (948 espécies), Strabomantidae (613 espécies) e Bufonidae (590 espécies) (AMPHIBIAWEB SPECIES NUMBERS, 2014).

A família Bufonidae está distribuída em todos os continentes, exceto na Antártica. Espécies dessa família foram introduzidas no Caribe, Oceania (Austrália e países vizinhos) e Filipinas (VITT; CALDWELL, 2014) como alternativa para o combate de pragas (controle biológico).

O gênero *Rhinella*, pertencente à família Bufonidae, é composto por 88 espécies com ampla distribuição nas regiões neotropicais. No Brasil, são descritas, aproximadamente, 40 espécies e, entre elas, a espécie *Rhinella schneideri*, presente em todas as regiões brasileiras (Fig. 1) (MACIEL et al., 2010). Por ser uma espécie abundante e pouco explorada quanto às toxinas presentes em suas secreções glandulares, essas secreções tornaram-se objeto deste estudo.

Figura 1. Distribuição geográfica da espécie *Rhinella schneideri* na América do Sul. A região em verde destaca a vasta distribuição deste anuro pelo Brasil e por alguns países da América do Sul, como Argentina, Bolívia e Paraguai. Imagem adaptada de Maciel et al. (2010).

Ainda que não seja totalmente eficiente para prevenir a morte, os anfíbios apresentam a forma de defesa passiva (JARED; ANTONIAZZI et al., 2009). A pele dos anfíbios é importante para a maior parte das funções vitais (respiração, contra dessecação, contra diversos microrganismos, etc). As inúmeras glândulas distribuídas por toda a superfície corpórea do animal produzem e secretam quantidades pequenas e constantes de veneno (JARED; ANTONIAZZI et al., 2009). Atualmente, as secreções desses animais têm sido o foco de inúmeras pesquisas, resultando em importantes contribuições relacionadas, principalmente, à identificação de toxinas com significativas ações farmacológicas. Técnicas sofisticadas para o isolamento de compostos presentes nos venenos de anfíbios têm permitido a obtenção de várias toxinas inéditas (DORNELLES; MARQUES; RENNER, 2010).

Dois tipos de glândulas são encontrados na pele dos anfíbios: as glândulas granulares, também denominadas serosas ou venenosas (responsáveis pela defesa passiva do animal), que produzem secreções tóxicas a um grande número de vertebrados, e as glândulas mucosas que são menores que as glândulas granulares e produzem secreções de natureza química diferenciada. As glândulas granulares são divididas em parotoides (agregado de glândulas formando duas protuberâncias nas porções pós-orbitais) e lombares (DORNELLES; MARQUES; RENNER, 2010). Já as glândulas mucosas situam-se dorsalmente e são mais numerosas do que as glândulas parotoides (Fig. 2) (VITT; CALDWELL, 2014). Alguns estudos revelam que, além da defesa contra predadores, a secreção das glândulas dos anfíbios exerce outra função importantíssima: proteção contra microrganismos do ambiente (MONTI; CARDELLO, 1994). Se porventura a pele do animal ficasse livre das secreções dessas glândulas, o animal poderia ser acometido por infecções e este quadro certamente acabaria evoluindo para o óbito (MONTI; CARDELLO, 1994).

De acordo com Almeida e colaboradores (2007), as glândulas mucosas secretam substâncias claras, aquosas e/ou viscosas, que auxiliam na lubrificação da pele do animal, além de exercerem efeito bacteriostático. Já as glândulas granulares produzem uma secreção esbranquiçada, que é mais tóxica do que a produzida nas glândulas mucosas e é responsável pela proteção contra infecções bacterianas e fúngicas, além de auxiliar na defesa contra predadores.

Figura 2. *Rhinella schneideri* (Rs). Destaque para as glândulas mucosas e glândula serosa/granular ou venenosa (parotoide). Acervo de fotos do Laboratório de Toxinas Animais (LTA) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP.

1.2. Toxinas de anfíbios

Os compostos presentes nas secreções glandulares de anfíbios (Tab. 1) são objetos de inúmeros estudos que vêm crescendo desde o final da década de 80 (HABERMEHL, 1981). Na secreção bruta das glândulas dos anfíbios, há uma variedade de substâncias como, por exemplo, aminas biogênicas (adrenalina, noradrenalina e dopamina), peptídeos, esteroides e alcaloides (DALY et al., 1987; ERSPAMER, 1971; HABERMEHL, 1981; JARED; ANTONIAZZI et al., 2009; LAI et al., 2003; MONTI; CARDELLO, 1994). Farmacologicamente, esses compostos podem ser miotóxicos, neurotóxicos, cardiotoxicos, hemotóxicos, colinomiméticos ou simpatomiméticos, vasoconstritores, entre outros (HABERMEHL, 1981; JARED; ANTONIAZZI et al., 2009). Substâncias derivadas das secreções da pele de sapos podem ser usadas como analgésicos, como medicamentos em problemas cardíacos, na terapêutica contra neoplasias e contra bactérias resistentes à diversos antimicrobianos (GARG; HIPPARGI; GANDHARE, 2008).

De acordo com Sakate e Lucas de Oliveira (2000), sinais clínicos de envenenamento são observados principalmente em animais de pequeno porte, como por exemplo, cães e gatos. Irritação da mucosa oral e salivação são considerados sinais clínicos de envenenamento

leve. O quadro de envenenamento moderado é caracterizado por depressão, fraqueza, ataxia e movimentos em círculos, anormalidades no ritmo cardíaco, defecação e uremia, além da irritação da mucosa oral e salivação. No envenenamento grave, adicionalmente a estes sintomas, observam-se dor abdominal, depressão respiratória, pupilas não responsivas à luz, convulsões, sinais de edema pulmonar e cianose, culminando, muitas vezes, com a morte.

Tabela 1: Toxicidade e efeitos dos componentes presentes nas secreções de anfíbios.

<i>COMPOSTOS</i>	<i>CLASSE</i>	<i>ESPÉCIE</i>	<i>EFEITOS</i>	<i>DL₅₀</i> ($\mu\text{g/kg}$)*
Batracotoxina	Alcaloide esteroidal	<i>Phyllobates aurotaenia</i>	Cardio e neurotóxico	2
Zetekitoxina AB	Alcaloide	<i>Atelopus spp.</i>	Convulsivante e cardiotoxico	11
Serotonina	Amina biogênica	<i>Hyla spp.</i>	Vasoconstritor	300
Bufotoxina	Esteroides	<i>Rhinella spp.</i>	Cardiotóxico	400
Pumiliotoxina C	Alcaloide	<i>Dendrobates spp.</i>	Miotóxico	1200
Pumiliotoxina B	Alcaloide	<i>Dendrobates spp.</i>	Miotóxico	1500
Samandarina	Alcaloide esteroidal	<i>Salamandra spp.</i>	Convulsivante	1500
Pumiliotoxina A	Alcaloide	<i>Dendrobates spp.</i>	Miotóxico	2500
Norepinefrina	Amina biogênica	<i>Bufo spp.</i>	Hipertensivo	5000
Dehidrobufotenina	Alcaloide	<i>Leptodactylus spp.</i>	Convulsivante	6000
O-metil-bufotenina	Alcaloide	<i>Bufo spp.</i>	Alucinógeno	75000

* DL₅₀: dose letal 50, dose capaz de levar a óbito 50% da população de camundongos à qual a dose foi administrada (HABERMEHL, 1981).

Na maioria dos venenos e/ou peçonhas, há uma complexa mistura de peptídeos, geralmente com as mais diversas e seletivas aplicações farmacológicas (LEWIS; GARCIA, 2003). Peptídeos bioativos têm sido utilizados em muitos ensaios como, por exemplo, contração uterina, alteração da pressão sanguínea, contração da vesícula biliar e muitas outras (BEVINS; ZASLOFF, 1990). Vários peptídeos bioativos da pele de anfíbios, entre eles os peptídeos antibacterianos, foram isolados e bem caracterizados (PRATES; BLOCH JR, 2000; WEI et al., 2015). Os peptídeos antimicrobianos são amplamente encontrados na natureza em inúmeras bactérias, protozoários, plantas e animais (CARRANZA et al., 2015; ZELEDZETSKY et al., 2004). Muitos destes peptídeos antimicrobianos têm sido isolados da

peçonha de aranhas, marimbondos, abelhas e serpentes (DE OLIVEIRA JUNIOR et al., 2013; KRISHNAKUMARI et al., 1997; YAN; ADAMS, 1998).

Diversos estudos mostram que já foram isolados inúmeros peptídeos (Tab. 2), caracterizados principalmente por sua natureza catiônica e capacidade de lisar membranas de microrganismos. Os diversos peptídeos isolados são provenientes de indivíduos de diferentes gêneros, pertencentes ou não à mesma subfamília. Como exemplo, a bombinina, presente nas secreções glandulares de *Bombina variegata*, foi descrita em 1970 como peptídeo antibacteriano e hemolítico (PRATES; BLOCH JR., 2000; SIMMACO et al., 2009).

Os peptídeos antimicrobianos presentes nas secreções de pele de sapos são capazes de lisar muitas bactérias patogênicas, vírus, protozoários, leveduras e fungos (PAPO; SHAI, 2003; SIMMACO et al., 2009). Estes peptídeos possuem propriedades químicas características como, por exemplo, tamanho relativamente pequeno (20 a 46 resíduos de aminoácidos), natureza básica (ricos em lisina ou arginina) e propriedades anfipáticas (NICOLAS; MOR, 1995; VRIES et al., 2015).

Com o aumento da resistência de fungos e bactérias aos antimicrobianos disponíveis no mercado, a descoberta de novos medicamentos torna-se importante. A adaptação e rápida multiplicação dos microrganismos acabam tornando mais fácil o processo de disseminação de doenças (DORNELLES; MARQUES; RENNER, 2010). Diversas áreas da medicina têm pesquisado a utilização de peptídeos antibióticos, porém apenas um pequeno número destes peptídeos encontra-se em fase pré-clínica, dada a complexidade de pesquisas nesta área. A principal forma de utilização desses peptídeos é no tratamento contra infecções locais (DORNELLES; MARQUES; RENNER, 2010).

A maioria dos estudos descritos até hoje abordam ensaios referentes à atividade antibacteriana (ZASLOFF, 2002). Poucos peptídeos foram estudados frente à atividade antifúngica. Como exemplo, tem-se a drosomicina, o primeiro peptídeo com propriedades antifúngicas, isolado de inseto (MICHAUT et al., 1996).

Tabela 2. Principais peptídeos com atividade antimicrobiana encontrados nas secreções da pele ou em outros órgãos de anfíbios.

<i>PEPTÍDEOS</i>	<i>ANUROS</i>	<i>PEPTÍDEOS</i>	<i>ANUROS</i>
Bombininas	<i>Bombina sp.</i>	Levitídeo (fragmento precursor)	<i>Xenopus laevis</i>
Brevininas	<i>Rana brevipoda</i>	Maculatinas	<i>Litoria genimaculata</i>
Buforina	<i>Bufo bufo</i>	Magaininas	<i>Xenopus sp.</i>
Caerinas	<i>Litoria sp.</i>	PGLa	<i>Xenopus laevis</i>
Ceruleína	<i>Litoria cerulea</i>	Pipininas	<i>Rana pipiens</i>
Ceruleína (fragmento precursor)	<i>Xenopus laevis</i>	Ranalexinas	<i>Rana catesbeiana</i>
Dermaseptinas	<i>Phyllomedusa sp.</i>	Rugosinas	<i>Rana rugosa</i>
Esculentinas	<i>Rana esculenta</i>	Temporinas	<i>Rana temporaria</i>
Frenatina	<i>Litoria infrafronata</i>	Xenoxinas	<i>Xenopus sp.</i>
Gaegurinas	<i>Rana rugosa</i>	Xenopsina (fragmento precursor)	<i>Xenopus laevis</i>

Adaptado de Prates e Bloch Jr (2000).

Além dos peptídeos antimicrobianos presentes nas secreções de anfíbios, outros compostos com atividade antimicrobiana também foram identificados. Os Bufodienolídeos (compostos esteroidais), marinobufaginas e telocinobufaginas, encontrados na secreção de pele do sapo *Bufo rubescens* (atualmente *Rhinella rubescens*), apresentam atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (CUNHA-FILHO, et al., 2005). Em outro estudo, os alcaloides *cis*-2-metil-6-*trans*-*n*-undecacilpiperidina e pumiliotoxina, isolados de anfíbios, mostraram atividade bactericida e antifúngica (DALY; SPANDE; GARRAFFO, 2005).

Estes estudos reforçam que as atividades antimicrobianas, observadas em secreções de anfíbios, não são únicas e exclusivas dos peptídeos. Há uma gama de compostos que ainda necessitam de melhores estudos quanto às suas propriedades antimicrobianas. Na figura 3 estão apresentados alguns destes compostos não proteicos encontrados, principalmente, em gêneros do sapo *Rhinella*.

Adicionalmente, moléculas bioativas das secreções das peles de anfíbios apresentam grande potencial terapêutico para o desenvolvimento de novos fármacos, considerando que os mesmos apresentam atividade cardiotônica, antiarrítmica, antidiabética, imunomodulatória,

antimicrobiana, antiparasitária, antiviral, antineoplásica, analgésica, contraceptiva, endócrina, entre outras (GOMES et al., 2007, 2011; TEMPONE et al., 2008).

Figura 3. Bufodienólídeos. Esteroides cardioativos (Bufodienólídeos) presentes nas secreções glandulares de anfíbios, principalmente no gênero *Rhinella* (CHEMSPIDER SYNTHETIC PAGES, 2015).

1.3. Peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) ou *Antimicrobial peptides* (AMPs) são peptídeos produzidos por uma grande variedade de organismos, quer como parte da sua linha de defesa primária (eucariotos), quer como estratégia de competição por nutrientes e por espaço (procariotos). Estes peptídeos são, geralmente, pequenos (10 a 100 resíduos de aminoácidos) e com carga positiva (+2 a +9), apesar de existirem alguns peptídeos com cargas negativas (aniônicos). São peptídeos anfipáticos e já foram isolados de diversas bactérias, plantas e animais, incluindo o homem (ANDREU; RIVAS, 1998; BAHAR; REN, 2013; JENSSEN et al., 2006; LEE et al., 2015; NGUYEN et al., 2011).

Conhecer a estrutura dos peptídeos antimicrobianos é importante para o design de novos medicamentos. Estruturalmente, os PAMs são caracterizados de acordo com a sua estrutura secundária, sendo classificados em quatro tipos de estruturas secundárias: alfa hélice (α -hélice), folha/fita beta (folha/fita β), estendidos e com loops. Entre estas estruturas, as α -hélice e folha/fita β são as mais comuns, encontradas na grande maioria dos PAMs caracterizados (BAHAR; REN, 2013; HEGEDÜS; MARX, 2013; JENSSEN et al., 2006; LEE et al., 2015; NGUYEN et al., 2011; POWERS; HANCOCK, 2003; VAARA, 2009).

Geralmente, na atividade antimicrobiana dos PAMs não estão envolvidos mecanismos enzimáticos. Os mecanismos de ação podem variar de acordo com o tipo do PAM, sua concentração e o organismo com o qual ele interage. O mecanismo pelo qual os PAMs causam danos à membrana plasmática baseia-se nas interações eletrostáticas. Os modelos de mecanismos de ação propostos para os PAMs que interagem com a membrana plasmática são: modelo “tábua de barril” (*Barrel-stave*); modelo “tapete” (*Carpet*); modelo “poro toroidal” (*Toroidal pore*); modelo “eletroporação molecular” (*Molecular electroporation*) e o modelo de perfuração “jangada lipídica” (*Lipid raft*). Além destes modelos, outros modelos estão associados com a inibição da síntese de ácidos nucleicos, proteínas e parede celular, assim como inibição da atividade de algumas enzimas (ANDREU; RIVAS, 1998; BAHAR; REN, 2013; BRADSHAW, 2003; DAWSON; LIU, 2008; JENSSEN et al., 2006; NGUYEN et al., 2011; POWERS; HANCOCK, 2003).

No modelo “tábua de barril”, os PAMs catiônicos interagem uns com os outros sobre a superfície da membrana, formando um complexo. Os PAMs deste complexo se orientam perpendicularmente ao plano da membrana, permitindo que a região hidrofóbica do peptídeo interaja com a região hidrofóbica da membrana, deixando a região hidrofílica do peptídeo

orientada para dentro, formando um canal (canal hidrofílico) que se expande ao longo da membrana. Assim, o canal (poro) formado provoca a saída de solutos que, eventualmente, resulta na lise celular (BAHAR; REN, 2013; ZHAO et al., 2005).

O modelo do “tapete” propõe que os PAMs catiônicos se ligam aos fosfolipídios na camada externa da membrana, concentrando-se como um “tapete” na superfície, sem qualquer inserção na membrana. No início, os peptídeos estão paralelos à superfície da membrana. Após atingir uma concentração crítica dos PAMs na superfície, estes rodam e reorientam-se para o núcleo hidrofóbico da membrana, resultando na formação de micelas que, consequentemente, levam ao colapso da membrana. Neste modelo, o estágio inicial é baseado nas interações eletrostáticas entre as cargas positivas dos PAMs com as cargas negativas das cabeças dos fosfolipídios, enquanto que, no segundo estágio, a formação dos poros é resultado da interação entre as regiões hidrofóbicas dos PAMs com o centro hidrofóbico da membrana. Este modelo explica o mecanismo de ação da maioria dos PAMs menores que 23 ou 24 resíduos de aminoácido que não atravessam a membrana plasmática (BAHAR; REN, 2013; SHAI, 1995; ZHAO et al., 2005).

No modelo “poro toroidal”, inicialmente os PAMs catiônicos se orientam paralelamente à superfície da membrana e se ligam às regiões das cabeças polares dos fosfolipídios. Quando a concentração crítica destes PAMs sobre a superfície é ultrapassada, os peptídeos são reorientados perpendicularmente ao plano da superfície da membrana e, em conjunto com vários lipídios que o cercam, eles se invertem em direção ao interior da região hidrofóbica da membrana. Como resultado, há a formação de um complexo chamado “complexo dinâmico peptídeo-lipídio supramolecular” que causa a ruptura irreversível da membrana (BAHAR; REN, 2013; HUANG et al., 2000; SHAI, 1995; ZHAO et al., 2005).

No modelo da “eletroporação molecular”, os PAMs catiônicos associados à membrana do microrganismo geram uma diferença de potencial elétrico através dela, levando à formação de um poro. Este poro é formado quando a diferença de potencial atinge 0,2 V (BAHAR; REN, 2013; DAWSON; LIU, 2008; ZHAO et al., 2005).

O modelo “jangada lipídica” propõe que a ligação dos PAMs causaria um desequilíbrio de massas (peso) e, consequentemente, um aumento da curvatura da membrana, o que proporcionaria uma força suficiente para eles se translocarem através da membrana. Assim, as associações entre os PAMs levariam a um afundamento da membrana, gerando um poro transitório (BAHAR; REN, 2013; ZHAO et al., 2005).

Na figura a seguir (Fig. 4) estão apresentados os principais modelos de mecanismo de ação dos PAMs que interagem com a membrana plasmática (modelo “tábua de barril”; modelo “tapete” e modelo “poro toroidal”).

Figura 4. Principais modelos de mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos (PAMs). (A) Modelo “tábua de barril”. (B) Modelo “tapete”. (C) Modelo “poro toroidal”.

A descoberta de novos peptídeos antimicrobianos em diversos organismos transformou estas moléculas naturais nos compostos básicos para o design de novas e potentes gerações de medicamentos contra inúmeras doenças. Atualmente, alguns PAMs sintéticos foram introduzidos em ensaios de fase clínica e pelo menos 15 peptídeos ou compostos miméticos estão em ensaios clínicos como agentes antimicrobianos ou imunomoduladores (FJELL et al., 2012; LEE et al., 2015).

1.4. Resistência aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos é um problema mundial e vem aumentando nas últimas décadas. Diversos estudos apontam para o crescimento da resistência antimicrobiana aos atuais medicamentos disponíveis na clínica médica (CENTERS FOR DISEASE

CONTROL AND PREVENTION, 2014; MOELLERING-JR, 2011; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012).

Muitos microrganismos resistentes são capazes de cruzar países e se espalhar entre os continentes com enorme facilidade. A velocidade com que estes microrganismos se espalham tem despertado preocupações em inúmeros líderes mundiais, os quais têm considerado esta resistência como “uma ameaça catastrófica” às pessoas de todos os países. Diversos estudos do CDC (*Centers for Diseases Control and Prevention*) estimam 23.000 mortes causadas por doenças relacionadas à resistência antimicrobiana para, aproximadamente, 2.000.000 de pessoas com doenças que apresentam microrganismos resistentes (*Centers for Diseases Control and Prevention*) (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014).

O desenvolvimento da resistência antimicrobiana entre os anos de 1940 e 2011 é apresentado na figura 5, passando pela introdução da penicilina em 1943 e da ceftarolina em 2010.

No Brasil, a introdução da ceftarolina (ceftarolina fosamila) no combate a infecções complexas da pele, foi aprovada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) somente em janeiro de 2014, após 4 anos de sua aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (BRASIL, 2014).

Figura 5. Desenvolvimento da resistência microbiana. Linha do tempo dos principais eventos-chave do desenvolvimento da resistência microbiana entre os anos de 1940 e 2011. XD: *extensively drug*; PD: *pan drug*. Imagem adaptada do CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), um em cada três tratamentos de saúde têm apresentado resistência à antimicrobianos (BOUCHER et al., 2009). Esta resistência observada é devida, principalmente, ao uso indiscriminado de antimicrobianos (prescrição inadequada e automedicação), o que promove a seleção de cepas resistentes (BOUCHER et al., 2009).

Os principais mecanismos da resistência microbiana incluem modificação molecular do alvo (transformação enzimática), ativação da bomba de efluxo, expressão de genes de resistência, além da alteração na permeabilidade da membrana (Fig. 6). A resistência surge de forma passiva (resultado de mecanismos inatos pré-existentes) ou de forma ativa através da aquisição de novo material genético por meio de elementos genéticos móveis (plasmídeos ou transposões) (LEVY; MARSHALL, 2004; ODDS; BROWN; GOW, 2003; WRIGHT; SUTHERLAND, 2007). Esse fato tem despertado uma grande preocupação que cresce a cada dia frente à escassez de novos medicamentos disponíveis à terapêutica (INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, 2010; MOELLERING-JR; 2011). O aumento do número de casos de pacientes imunocomprometidos, pacientes em tratamento quimioterápico e/ou pacientes em terapia com imunossupressores tem contribuído para um quadro geral de resistência aos antimicrobianos, assim como o uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro (PEREA; PATTERSON, 2002; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012).

Figura 6. Principais mecanismos biológicos de resistência microbiana. Na imagem é possível observar os principais mecanismos biológicos de resistência para bactérias (transformação enzimática, ativação da bomba de efluxo, presença de genes que conferem resistência e produção de enzimas capazes de degradar antimicrobianos). Imagem adaptada de Levy e Marshall (2004).

Além da preocupação com os microrganismos resistentes, há uma emergente difusão de bactérias altamente resistentes, chamadas de “superbactérias” ou, em inglês, “superbugs” (LOWY, 2007; MORRIS, KELLNER; LOW, 1998; QUEIROZ, 2011; WRIGHT, 2000). Entre as superbactérias mais conhecidas estão: MRSA (*Methicilin Resistante Staphylococcus aureus*), KPC (*Klebsiella penumoniae carbapenemase*, produção da enzima carbapenemase que confere resistência), NDM-1 – (*New Delhi Metallobetalactamase-1*, produção da enzima metallobetalactamase que confere resistência à *Escherichia coli*), MDR-TB (*Multidrug-resistant tuberculosis*). No Brasil, todas as superbactérias citadas foram isoladas e identificadas (MONTEIRO et al., 2009; OLIVEIRA; FARIA; LEVY, 2001; PEIRANO et al., 2009; ROZENBAUM et al., 2009; SUTHAR et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2001; VALIM et al., 2000).

Com os avanços na identificação de novas fontes de compostos antimicrobianos, novos medicamentos serão desenvolvidos, resultando em uma ampliação das estratégias terapêuticas atualmente empregadas (WRIGHT; SUTHERLAND, 2007). O número de agentes antimicrobianos aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) tem diminuído nos últimos 30 anos. Em 2012, menos de 4 agentes antimicrobianos foram aprovados pelo FDA (Fig. 7), o que demonstra a necessidade do desenvolvimento de novas classes de antimicrobianos e de destinar maiores investimentos para estudos das atuais classes, já que as mesmas apresentam um perfil de segurança conhecido (SHLAES et al., 2013; SPELLBERG et al., 2004).

Figura 7. Agentes antimicrobianos aprovados pelo FDA. O número de novos agentes antimicrobianos é mostrado a partir de 1983 até 2012. Imagem adaptada de Shlaes et al. (2013).

Dada a importância do estudo de venenos e peçonhas animais para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e, considerando-se a necessidade de novas alternativas aos antibióticos e antimicóticos atualmente em uso, este projeto visou, em um primeiro momento, o isolamento e caracterização de novos compostos com ação antimicrobiana, presentes nas secreções das glândulas do sapo *Rhinella schneideri*.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Este primeiro capítulo teve como objetivo o isolamento e caracterização estrutural e funcional do(s) componente(s) presente(s) no veneno de *Rhinella schneideri* com atividade inibitória sobre o crescimento de bactérias, fungos filamentosos e leveduras.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para isso, foram realizados os seguintes procedimentos:

- Avaliação da atividade antimicrobiana do veneno de *Rhinella schneideri* sobre diferentes bactérias, fungos filamentosos e leveduras;
- Isolamento do(s) componente(s) que apresentou(aram) atividade antimicrobiana por filtração em gel e cromatografia de fase reversa;
- Identificação do composto antimicrobiano isolado por espectrometria de massas de alta resolução.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O organograma a seguir (Fig. 8) ilustra a estrutura metodológica desenvolvida neste capítulo.

Figura 8. Organograma da metodologia utilizada no primeiro capítulo. A metodologia descrita neste primeiro capítulo inicia-se na extração das secreções das glândulas mucosas e parotóides e triagem inicial da atividade antimicrobiana dessas frações. Posteriormente, a secreção com atividade antimicrobiana foi fracionada e cada fração obtida foi testada em ensaios antimicrobianos até resultar no composto isolado e caracterizado, responsável pela ação antimicrobiana. CG-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; MS-ESI: espectrometria de massas com ionização por electrospray.

3.1. Obtenção das secreções glandulares

Foram utilizadas secreções glandulares (pool) do sapo *Rhinella schneideri*, comum na região de Ribeirão Preto – SP. As secreções das glândulas mucosas e parotóides (veneno) do sapo *Rhinella schneideri* foram extraídas e fornecidas pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto. No anexo estão o Certificado de

Regularidade do Biotério Central emitido pelo IBAMA e a autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético nº 010159/2014-2.

3.1.1. *Glândulas parotoídes:*

As secreções, retiradas por pressão manual das glândulas parotoídes de animais previamente limpos, foram imediatamente dessecadas em dessecador e armazenadas a -20°C até o momento de uso.

3.1.2. *Glândulas mucosas:*

As secreções das glândulas mucosas foram obtidas pela técnica de coleta de secreção dermal, de acordo com o método de Tyler, Stone e Bowie (1992), com adaptações. O animal foi eletricamente estimulado (6 - 20 V) por 40 segundos e, posteriormente, lavado com água ultrapura (milli-Q). Todo o material proveniente da eletroestimulação foi congelado, liofilizado e armazenado a -20° C até o momento de uso.

3.1.3. *Diálise das secreções das glândulas parotoídes e mucosas*

Às secreções das glândulas parotoídes (500 mg) foram dispersas em 20 mL de água ultrapura (milli-Q) e colocadas em uma membrana semipermeável de diálise (*Regenerated Cellulose Tubular Membrane - FISHERBRAND®* - com poros que retêm moléculas maiores que 6 kDa). Essa membrana foi fixada às bordas de um béquer e imersa em 500 mL de água ultrapura (milli-Q), sob agitação. O sistema foi fechado com filme plástico e mantido a 4°C.

Este mesmo processo foi realizado para as secreções das glândulas mucosas. Cem miligramas (100 mg) das secreções das glândulas mucosas foram dispersos em 10 mL de água ultrapura (milli-Q) e colocados em uma membrana semipermeável de diálise, a qual foi fixada às bordas de um béquer e imersa em 250 mL de água ultrapura (milli-Q), sob agitação.

Cada processo de diálise foi realizado em três dias, obtendo-se duas águas de diálise, as quais foram congeladas a -20°C e, posteriormente, liofilizadas. A primeira água da diálise foi obtida após 15 horas e a segunda após 25 horas. As águas de diálise foram congeladas, liofilizadas e armazenadas a -20°C em tubo de fundo cônico envolto com folha de alumínio para evitar a exposição à luz.

3.2. Fracionamento das amostras

3.2.1. Filtração em gel

Foram pesados 25 mg das secreções das glândulas mucosas, parotoides e do material de baixa massa molecular difundido na água de diálise de ambas as glândulas. As amostras foram dispersas em 1 mL de solução de bicarbonato de amônio (AMBIC – NH_4HCO_3) 0,2 mol/L, pH 7,8, em banho de gelo, centrifugadas a $16.000 \times g$ por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em uma membrana de 0,22 μm e aplicado à coluna HiPrep Sephacryl S-100 HR (1,6 cm x 60 cm) (GE Healthcare, Suécia) acoplada ao sistema de Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas (FPLC) Äkta UPC10 (GE Healthcare, Suécia).

A eluição das amostras ocorreu sob vazão de 0,3 mL/min em tampão bicarbonato de amônio 0,2 mol/L, pH 7,8 e pressão máxima de 0,25 MPa. A eluição do material foi completada após passar 250 mL de fase móvel (AMBIC 0,2 mol/L, pH 7,8). Frações de 1,0 mL por tubo foram coletadas e a absorbância foi determinada automaticamente em 214 nm.

Todas as frações obtidas foram coletadas, congeladas, liofilizadas e armazenadas a -20°C.

3.2.2. Cromatografia de fase reversa em coluna Luna PFP (2) (pentafluorofenil propilo)

Quatrocentos microgramas (400 μg) da fração 9 do material de baixa massa molecular das secreções das glândulas parotoides (fração ativa na inibição do fungo filamentoso *Microsporium canis*) foram dispersos em 1 mL de ácido fórmico 0,1% e submetida à cromatografia líquida rápida de proteínas em coluna de fase reversa Luna PFP (2) 3 μm (0,46 x 15 cm, Phenomenex, EUA). Nesta cromatografia, foi utilizado um gradiente descontínuo de concentração até 100% da fase móvel de ácido fórmico 0,1% + acetonitrila (ACN) 80% no Sistema FPLC Äkta Purifier UPC10 (GE). Foram coletadas frações de 500 μL sob vazão de 0,7 mL/min. Todas as frações resultantes deste processo cromatográfico foram reunidas conforme seus respectivos picos de absorbância e, posteriormente, congeladas, liofilizadas e armazenadas a -20°C.

3.3. Caracterização bioquímica

3.3.1. SDS-Tricina-PAGE

Esta eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio e tricina (SDS-Tricina) foi realizada conforme descrito por Schagger e von Jagow (1987). Foi utilizado um gel de separação a 16,5%, sobreposto por um gel de empacotamento a 5%.

O tampão do eletrodo da região superior da cuba da eletroforese (cátodo), previamente preparado, consistiu de Tris-HCl 0,1 mol/L, tricina 0,1 mol/L e SDS 0,1%, pH 8,25. O tampão do eletrodo inferior (ânodo), consistiu de Tris-HCl 0,2 mol/L, pH 8,9. Após a montagem do sistema, amostras e o padrão de massa molecular foram adicionados em seus respectivos poços dentro de uma capacidade limite de 10 µL. Como dispersante das amostras, foi utilizado o tampão de amostra de eletroforese contendo Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10% e azul de bromofenol 1 mmol/L. Concluída a adição das amostras, acertaram-se as condições para a corrida que foram: tensão 85 V, corrente elétrica de 10 mA (por gel) e potência de 10 W. A corrida seguiu nestas condições até atingir o gel inferior, quando o valor limite da amperagem foi dobrado (20 mA por gel). A corrida durou aproximadamente 5 horas, tempo necessário para que o indicador atingisse o final do gel. Concluída a corrida, o gel foi corado com *PlusOne Coomassie Blue PhastGel® R-350* (GE Healthcare, Suécia).

3.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) e densitometria

Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida 13,5% (m/V) com SDS conforme descrito por Laemmli (1970). Foi utilizado um gel de separação a 13,5%, sobreposto por um gel de empacotamento a 5%.

O tampão do eletrodo, previamente preparado, consistiu de Tris-HCl 0,025 mol/L, pH 8,3, glicina 0,192 mol/L e SDS 0,1%. Como dispersante das amostras, foi utilizado o tampão de amostra de eletroforese contendo Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10% e azul de bromofenol 1 mmol/L. A eletroforese foi realizada seguindo as seguintes condições: tensão 90 V, corrente elétrica de 40 mA e potência de 15 W por 1 hora e 40 minutos. Concluída a corrida, o gel foi corado com *PlusOne Coomassie Blue PhastGel® R-*

350 (GE Healthcare, Suécia). Como marcador de massa molecular foram utilizados o marcador de ultrabaixa massa molecular M3546 (Sigma-Aldrich, EUA) e marcador de massa molecular 161-0317 (Biorad, EUA).

A análise densitométrica foi realizada usando um densitômetro DenGo (Qualitem, Brasil) para eletroforese em gel e o software que acompanha o equipamento.

3.4. Ensaios de atividade antimicrobiana

Todos os ensaios relacionados à atividade antimicrobiana foram realizados em colaboração com o Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Unesp, sob responsabilidade da Profa. Dra. Rosimeire C. L. R. Pietro.

A ação antimicrobiana das secreções glandulares e do material de baixa molecular das secreções das glândulas parotoides difundido na água de diálise foi avaliada sobre leveduras, fungos filamentosos e bactérias (Tab. 3).

Tabela 3. Microrganismos utilizados nos testes antimicrobianos.

	MICRORGANISMO	COLEÇÃO
Leveduras	<i>Candida albicans</i>	ATCC* 64548
	<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258
	<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019
Fungos filamentosos	<i>Trichophyton rubrum</i>	INCQS** 40004
	<i>Trichophyton rubrum</i>	Isolado clínico (Fundação Oswaldo Cruz)
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	INCQS 40051
	<i>Microsporum canis</i>	Isolado clínico
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	ATCC 343
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Isolado clínico (Fundação Oswaldo Cruz)
	<i>Beauveria bassiana</i>	ATCC 4531
Bactérias	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922

*ATCC: “American Type Culture Collection”

**INCQS: “Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde”

3.4.1. Atividade antifúngica contra *Candida albicans*

Para este ensaio, as seguintes etapas foram realizadas:

- *Etapas 1: preparo da suspensão de leveduras*

Alíquotas de uma cultura em meio líquido Sabouraud de 24 h a 35°C contendo *C. albicans* foram dispersas em 5 mL de solução salina 0,9% esterilizada, agitada por 20 segundos com auxílio de um *Vortex*® e padronizada na escala de 0,5 McFarland (turbidez), relativa a 1×10^6 a 5×10^6 células (leveduras) / mL de salina. Após padronização da suspensão, uma diluição dessa suspensão foi realizada obtendo uma nova suspensão na escala de $2,5 \times 10^3$ unidades formadoras de colônias (UFC) /mL (5 µL da suspensão padronizada na escala de 0,5 McFarland foram dispersos em 995 µL de solução salina 0,9% esterilizada (1:400)), chamada de suspensão de trabalho.

- *Etapa 2: preparo das amostras (secreções)*

As secreções das glândulas mucosas (2 mg) e parotóides (2 mg) e do material obtido da diálise das secreções das glândulas parotóides (2 mg) do sapo *Rhinella schneideri* foram dispersos em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) puro. Após total dispersão das amostras, foram adicionados 900 µL de solução salina 0,9% esterilizada em cada amostra, resultando em uma solução final de 1 mL (1:10).

- *Etapa 3: incubação (6 h)*

A suspensão de leveduras (100 µL) foi incubada com 100 µL de cada amostra (etapa 2) por 6 h a 35°C. Após o período de incubação, cada amostra foi diluída, inicialmente 10 vezes, ou seja, 20 µL da solução incubada com 180 µL de solução salina 0,9% esterilizada. Destes 200 µL resultantes da diluição, 100 µL foram dispersos em placa de Petri contendo meio Sabouraud, com auxílio de uma alça de Drigalsky. Após dispersão, cada placa foi incubada por 24 e 48 h. Dos 100 µL restantes da diluição, 10 µL foram dispersos em 990 µL de solução salina 0,9% esterilizada, obtendo 1 mL. Destes, 100 µL foram dispersos em placa de Petri contendo meio Sabouraud, com auxílio de uma alça de Drigalsky e cada placa foi incubada por 24 e 48 h. Como controles, placas foram semeadas com *C. albicans* (50 µL) na escala de 5×10^3 , $2,5 \times 10^2$ e 25 UFC/mL. Uma placa dividida em 4 quadrantes foi utilizada como placa controle das amostras e DMSO 10%. Nesta placa, 50 µL de DMSO 10% e 50 µL das amostras (10 µL da solução de preparo de cada amostra com 90 µL de solução de salina 0,9% esterilizada) foram dispersos, com auxílio de uma alça de platina.

- *Etapa 4: incubação (24 h)*

Os 180 µL restantes da incubação de 6 h foram adicionalmente incubados por 24 h a 35°C. Com o término da incubação, os mesmos procedimentos descritos na etapa 3 foram realizados.

Na figura 9, observa-se o protocolo elaborado para este teste de atividade antifúngica contra *C. albicans*. Este ensaio foi realizado em dias diferentes, em triplicata.

3.4.2. Teste de difusão em ágar (atividade bactericida)

Neste teste foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro as quais continham meio ágar Müller-Hinton implementado com 2% de *d*-glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno (Norma M44-A2 de 2009 do *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*). As bactérias *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 29213) foram ajustadas na escala de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Após ajuste, ambas foram diluídas 1:10 em meio ágar Müller-Hinton e com auxílio de um *swab*, foram estriadas em três placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton, resultando em seis placas (3 placas com *E. coli* e 3 placas com *S. aureus*).

Para esse teste, 25 mg das secreções das glândulas mucosas e parotóides e do material de baixa massa molecular das secreções das glândulas parotóides difundido na água da diálise foram dispersos em 1 mL de solução salina 0,9% esterilizada. A partir da dispersão, diluições em série foram realizadas partindo de 25 mg/mL até 1,6 mg/mL. Com o auxílio de um *Vortex*® (Phoenix, Brasil), todas as amostras foram agitadas por 1 minuto ou até que sua dispersão tivesse sido quase que completa. Após agitação, as mesmas foram levadas ao *Vortex*® (Phoenix, Brasil) por 1 minuto. Após 1 minuto, 50 µL de cada amostra em suas respectivas diluições foram aplicadas em poços (profundidade mediana) feitos nas placas com auxílio de uma ponteira P100 cortada na ponta. Foram feitos 7 poços: 5 poços para as 5 diferentes concentrações e 2 poços para os controles (controle positivo: 25 µL de uma solução de Ampicilina 500 mg/mL – controle negativo: 50 µL de solução salina 0,9% esterilizada). Após a aplicação das amostras e dos controles (50 µL), as placas foram incubadas por 24 h a 35°C. Ao término da incubação, o diâmetro dos halos de inibição foi medido com auxílio de um paquímetro digital *Absolute*, 200 mm com resolução de 0,01 mm (Mitutoyo, Brasil).

Outro teste de difusão em ágar foi realizado utilizando, agora, discos de papéis impregnados com amostras de veneno. Para este teste, foram utilizadas as bactérias *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923). A mesma metodologia descrita acima foi realizada neste teste. As bactérias *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923) foram ajustadas na escala McFarland para $0,5 \times 10^8$ UFC/mL. Após ajuste, ambas foram diluídas 1:10 em meio ágar Müller-Hinton e com auxílio de um *swab*, foram estriadas em placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton, resultando em 2 placas (1 placa com *E. coli* e 1 placa com *S. aureus*) para cada amostra testada.

Foram realizadas diluições das secreções das glândulas mucosas e parotoides e do material de baixa massa molecular das secreções das glândulas parotoides difundidos na água de diálise, seguindo o mesmo protocolo acima discutido. Concentrações de 25 mg/mL até 1,6 mg/mL foram realizadas. Das diluições, 20 µL de cada uma foram aplicados nos discos de papel e, após secagem, dispostos na placa de Petri contendo ágar Müller-Hinton, levadas a estufa por 24 h a 35°C. Ao término da incubação, a presença ou ausência de halos de inibição foram observadas.

3.4.3. Determinação da concentração inibitória mínima (C.I.M.) e da concentração bactericida mínima (C.B.M.) para as bactérias *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923)

Para este ensaio foram utilizadas as bactérias *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923). O ensaio foi realizado utilizando meio ágar Müller-Hinton implementado com 2% de *d*-glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno, de acordo com a metodologia de diluição em microplaca (Norma M44-A2 de 2009 do *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*), com modificações.

As amostras de secreções glandulares testadas foram preparadas de acordo com o item 3.4.1. A suspensão de bactérias (*E. coli* e *S. aureus*) utilizada neste ensaio foi ajustada para 0,5 na escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Após ajuste, ambas foram diluídas 1:10 em meio ágar Müller-Hinton (200 µL suspensão padronizada de bactérias com mais 1.800 µL de meio ágar Müller-Hinton).

Na microplaca, 100 µL de meio ágar Müller-Hinton implementado com 2% de *d*-glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno foram transferidos para cada poço da microplaca de 96 poços. Em seguida, 100 µL de cada amostra (item 3.4.1.) foram transferidos para os primeiros poços da microplaca. A partir desses poços iniciais, diluições seriadas de 100 µL foram realizadas, seguida da adição de 100 µL da suspensão de bactérias padronizadas. Como controle positivo foi utilizado Ampicilina (500 mg/mL). Como controle negativo, poços contendo meio ágar Müller-Hinton, solução salina 0,9% esterilizada e DMSO 10% foram utilizados.

Após a montagem da microplaca, esta foi colocada em estufa a 35°C durante 24 h. Com o término das 24 h, em cada poço da microplaca foi observada a presença ou ausência do crescimento bacteriano. Os resultados foram registrados e iniciou-se o ensaio da Concentração Bactericida Mínima (C.B.M.). Neste ensaio, após a observação da presença ou

ausência de turvação em cada poço da microplaca que ficou incubada por 24 h a 35°C, uma subcultura foi realizada. Para esta subcultura, uma alíquota de cada poço foi transferida, com auxílio de palitos de madeira esterilizados, para uma placa de Petri de 12 cm de diâmetro contendo meio ágar Sabouraud, mantendo a mesma sequência e padrões estabelecidos da montagem na microplaca. Esta subcultura foi levada à estufa por 24 h a 35° C para a determinação da concentração bactericida mínima (ausência ou presença do crescimento bacteriano).

Após a transferência de alíquotas de cada poço da microplaca como citado anteriormente, a inibição do crescimento das bactérias na microplaca foi demonstrada através da adição de 20 µL de solução aquosa de resazurina (um indicador redox) em cada poço com incubação a 35°C por, no mínimo, 2 h. Após estas 2 h, a leitura da microplaca foi realizada de forma manual (visual) pela mudança da coloração azul da resazurina para coloração rosa quando há viabilidade de células bacterianas.

3.4.4. Teste de difusão em ágar (atividade antifúngica)

Novamente, foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio ágar Müller-Hinton implementado com 2% de *D*-glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno (Norma M44-A2 de 2009 do *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*). A suspensão de leveduras contendo *Candida albicans* foi ajustada na escala McFarland (1×10^6 a 5×10^6 UFC/mL). Em três placas de Petri, a suspensão padronizada de *C. albicans* foi incorporada ao meio de cultura e em outras três placas foi dispersa na superfície do meio de cultura, com auxílio de uma alça de Drigalsky. Foram utilizados 100 µL da suspensão de leveduras padronizadas para cada placa.

As mesmas diluições das amostras das secreções glandulares realizadas no teste anterior (teste de difusão em ágar – atividade bactericida – item 3.4.2.) foram empregadas para este teste. Cada amostra foi aplicada nos poços de 6 mm de diâmetro interno em moldes de aço denominados de “*templates*” contendo 6 poços cada. Estes foram dispostos dentro das placas de Petri sobre o meio ágar solidificado. Cinquenta microlitros (50 µL) de cada amostra foram adicionados em seu poço correspondente. Após aplicação, as placas foram incubadas por 24 h a 35°C. Terminada a incubação, os “*templates*” foram retirados e em cada poço foi observado à presença ou ausência de halos de inibição. A medida dos halos de inibição, quando presentes, foi feita com auxílio de um paquímetro digital *Absolute*, 200 mm com

resolução de 0,01 mm (Mitutoyo, Brasil). Como controle de inibição do crescimento das leveduras, 50 µL de Anfotericina B (64 µg/mL) foram utilizados. Este teste foi realizado em dias diferentes, em quadruplicata.

3.4.5. Determinação da concentração inibitória mínima (C.I.M.) e da concentração fungicida mínima (C.F.M.) para leveduras e fungos filamentosos

3.4.5.1. Preparo das amostras

Cada amostra (10 mg das secreções das glândulas parotóides, glândulas mucosas e material de baixa massa molecular das secreções das glândulas parotóides difundido na água de diálise) foi dispersa em 125 µL de DMSO puro, com auxílio de um agitador de tubos *Vortex*[®] (Phoenix, Brasil). Após dispersão foram adicionados 1.125 µL de solução salina 0,9% esterilizada (PBS), totalizando 1.250 µL e levados ao agitador de tubos *Vortex*[®] (Phoenix, Brasil) para melhor dispersão. As três amostras, após dispersão, foram centrifugadas por 15 minutos a 13.000 $\times g$ e, posteriormente, filtradas em membranas de 0,22 µm no fluxo laminar, resultando em uma solução com concentração de 8.000 µg/mL.

3.4.5.2. Padronização da suspensão de leveduras

O ensaio de determinação da C.I.M. (Concentração Inibitória Mínima) utilizando as leveduras *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* foi realizado de acordo com a metodologia de diluição em microplaca (Norma M27-A2 de 2002 do *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*) com modificações. O meio de cultura em caldo RPMI-1640 foi padronizado para este ensaio. Este meio foi suplementado com ácido 3-[N-Morfino] propanosulfônico (MOPS) na concentração de 0,165 mol/L em pH 7,0, além de glutamina e vermelho de fenol na composição sem adição de bicarbonato de sódio e esterilizado por filtração.

O preparo da suspensão de leveduras (*Candida spp*) foi realizado da seguinte maneira: o meio de cultura líquido RPMI-1640 (50 µL) contendo *Candida spp* foi disperso em um tubo de ensaio com 5 mL de solução salina 0,9% esterilizada. A solução foi dispersa no *Vortex*[®] (Phoenix, Brasil) por 20 segundos. Desta solução, 20 µL foram retirados, levados à câmara de Neubauer e contado o número de células (leveduras) nos quatro quadrantes externos. Do número obtido da contagem das leveduras, a média foi calculada e multiplicada por 10⁴ (volume máximo contido nos quadrantes de leitura das leveduras na câmara de

Neubauer). O valor obtido corresponde a 1 mL da suspensão de leveduras (Unidades Formadoras de Colônias - UFC por mL). Com o valor resultante, padronizou-se a solução de *Candida spp* contendo $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

Após padronização da solução de leveduras, a montagem na microplaca de 96 poços foi realizada seguindo o seguinte protocolo (Fig. 10): 100 µL de meio RPMI-1640 foram transferidos para cada poço da microplaca de 96 poços. Em seguida, 100 µL de cada amostra foram transferidos para os primeiros poços da microplaca. A partir desses poços iniciais, diluições seriadas de 100 µL foram realizadas, seguida da adição de 100 µL da suspensão de leveduras padronizadas. Como controle positivo foi utilizado Anfotericina B (100 µL de meio RPMI-1640 com 100 µL de Anfotericina B na concentração de 64 µg/mL). Como controle negativo, poços contendo meio RPMI-1640, solução salina 0,9% esterilizada e DMSO 10% foram utilizados.

Finalizando a montagem da microplaca, esta foi colocada em estufa a 35°C sob agitação constante de 110 rpm durante 48 h. Com o término das 48 h, em cada poço da microplaca foi observada a presença ou ausência do crescimento de leveduras. Os resultados foram registrados e iniciou-se o ensaio da Concentração Fungicida Mínima (C.F.M.).

Neste ensaio, após a observação da presença ou ausência de turvação em cada poço da microplaca que ficou incubada, uma subcultura foi realizada. Para esta subcultura, uma alíquota de cada poço foi transferida, com auxílio de palitos de madeira esterilizados, para uma placa de Petri de 12 cm de diâmetro contendo meio ágar Sabouraud, mantendo a mesma sequência e padrões estabelecidos da montagem na microplaca. Esta subcultura foi levada à estufa por 48 h a 35°C para a determinação da concentração fungicida mínima (ausência ou presença do crescimento de leveduras).

Após a transferência das alíquotas de cada poço da microplaca como citado anteriormente, a inibição do crescimento das leveduras na microplaca foi demonstrado através da adição de 20 µL de solução aquosa de resazurina (um indicador redox) na concentração de 10 mg/mL (solução aquosa) em cada poço com incubação a 35°C por, no mínimo, 2 h. Após este tempo, a leitura da microplaca foi realizada de forma manual (visual) pela mudança da coloração azul da resazurina para coloração rosa quando há viabilidade de células leveduriformes. Testes realizados em triplicata, em dias e com cepas diferentes das mesmas leveduras.

3.4.5.3. Padronização da suspensão de fungos filamentosos

Assim como no ensaio anteriormente citado, o ensaio de determinação da Concentração Inibitória Mínima (C.I.M.) utilizando os fungos filamentosos *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. rubrum* (isolado clínico – Fundação Oswaldo Cruz – FOC), *M. anisopliae*, *M. anisopliae* (isolado clínico – Fundação Oswaldo Cruz – FOC) e *B. bassiana* foi realizado de acordo com a metodologia de diluição em microplaca (Norma M38-A2 de 2008 do *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*) com modificações. O meio de cultura em caldo RPMI-1640 com glicose foi padronizado para este ensaio.

A suspensão de fungos filamentosos foi preparada da seguinte maneira: com o auxílio de uma alça de platina, uma pequena porção do fungo, presente na placa de cultivo, foi retirada e dispersa em um tubo de ensaio contendo 5 mL de solução salina 0,9% esterilizada. A solução foi dispersa com auxílio de um *Vortex*[®] (Phoenix, Brasil) por 1 min ou até total dispersão do material. Desta solução, 20 µL foram retirados e levados à câmara de Neubauer e contado o número de esporos e/ou hifas nos quatro quadrantes externos. Do número obtido da contagem dos esporos e/ou hifas, a média resultante foi multiplicada por 10⁴ (fator da câmara de Neubauer). O valor obtido corresponde a 1 mL da suspensão de fungos filamentosos (Unidades Formadoras de Colônias - UFC por mL). Com o valor obtido, padronizou-se a solução de fungos filamentosos contendo 5 x 10³ UFC/mL.

Após padronização da solução com fungos filamentosos, o seguinte protocolo para montagem do ensaio em microplaca foi realizado (Fig. 10): 100 µL de meio RPMI-1640 com glicose foram transferidos para cada poço da microplaca de 96 poços. Em seguida, 100 µL de cada amostra foram transferidos para os primeiros poços da microplaca. A partir desses poços iniciais, diluições de 100 µL foram realizadas, seguida da adição de 100 µL da suspensão de fungos filamentosos padronizadas. Como controle positivo foi utilizado Anfotericina B (100 µL de meio RPMI-1640 com glicose com 100 µL de Anfotericina B na concentração de 64 µg/mL). Como controle negativo, poços contendo meio RPMI-1640 com glicose, solução salina 0,9% esterilizada e DMSO 10% foram utilizados.

Após a montagem da microplaca, esta foi colocada em estufa a 28°C sob agitação constante de 110 rpm durante 7 dias. Decorrido esse período, em cada poço da microplaca foi observada a presença ou ausência do crescimento de fungos filamentosos. Os resultados foram registrados e iniciou-se o ensaio da Concentração Fungicida Mínima (C.F.M.).

Neste ensaio, após a observação da presença ou ausência de turvação em cada poço da microplaca, que ficou incubada por 7 dias a 28°C sob agitação constante de 110 rpm, uma subcultura foi realizada. Para esta subcultura, uma alíquota (5 µL) de cada poço foi transferida, com auxílio de palitos de madeira esterilizados, para uma placa de Petri de 12 cm de diâmetro contendo meio ágar PDA mantendo a mesma sequência e padrões estabelecidos da montagem nas microplacas (Fig. 10). As placas de Petri foram levadas à estufa por 7 dias a 28°C para a determinação da Concentração Fungicida Mínima (ausência ou presença do crescimento de fungos filamentosos).

Após a transferência de alíquotas de cada poço da microplaca como citado anteriormente, a inibição do crescimento dos fungos filamentosos na microplaca foi demonstrada através da adição de 20 µL de solução aquosa de resazurina (um indicador redox) na concentração de 10 mg/mL (solução salina) em cada poço com incubação a 28°C por, no mínimo, 2 h. Após este tempo, a leitura da microplaca foi realizada de forma manual pela mudança da coloração azul da resazurina para coloração rosa quando há viabilidade de células fúngicas. Este teste foi realizado em diferentes dias, em quintuplicata.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○

Figura 10. Diluição seriada em microplaca de 96 poços. Círculos roxos representam os venenos (amostras). Círculos amarelos representam a Anfotericina B (concentração inicial de 64 µg/mL) e os círculos laranja representam os controles: 2 poços controles do meio padronizado; 2 poços controles do PBS; 2 poços controles do DMSO 10% e 2 poços controles dos microrganismos.

3.4.6. Determinação da concentração inibitória mínima (C.I.M.) e da concentração fungicida mínima (C.F.M.) para *Microsporium canis* para as frações obtidas da filtração em gel

Este ensaio foi realizado seguindo as mesmas condições propostas no item 3.4.5.3. Foram testadas neste ensaio as frações obtidas da filtração em gel do material de baixa massa molecular das secreções das glândulas parotóides na água de diálise. De cada fração, 2 mg

foram dispersos, com auxílio de um *Vortex*[®] (Phoenix, Brasil) em 250 µL de salina 0,9% esterilizada, filtrados em membrana de poro 0,22 µm e utilizados no ensaio.

*3.4.7. Determinação da concentração inibitória mínima (C.I.M.) e da concentração fungicida mínima (C.F.M.) para *Microsporium canis* utilizando as frações obtidas da cromatografia de fase reversa em Luna PFP (2) 3 µm (pentafluorofenil propilo)*

Este ensaio foi realizado seguindo as mesmas condições propostas no item 3.4.5.3. Todas as frações obtidas da cromatografia de fase reversa em coluna Luna PFP (2) (pentafluorofenil propilo) foram dispersas salina 0,9% esterilizada e filtradas em membrana de poro 0,22 µm. Para cada fração foi realizada a C.I.M. e C.F.M. em faixas de concentrações diferentes, variando de acordo com a quantidade do material disponível de cada fração. Este ensaio foi realizado em duplicata.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1. Fracionamento das amostras

4.1.1. Filtração em gel das secreções das glândulas e do material difundido na água de diálise das glândulas mucosas e parotoides de *Rhinella schneideri*

Na figura 11 e 12 estão apresentados os perfis de eluição da filtração em gel na etapa inicial do fracionamento dos componentes presentes nas secreções das glândulas mucosas e parotoides e do material difundido na água de diálise obtido de ambas as glândulas (item 3.2.1.). As amostras, 25 mg de cada uma, foram dispersas em 1 mL de tampão bicarbonato de amônio 0,2 mol/L, pH 7,8, filtradas em membranas de 0,22 µm e aplicadas em coluna *HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR* acoplada ao Sistema de Cromatografia Líquida Äkta UPC-10 (GE Healthcare, Suécia). Estão, também, apresentados os perfis eletroforéticos (eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e tricina – SDS-Tricina-PAGE) das frações obtidas.

Figura 11. Perfil de eluição da filtração em gel em coluna *HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR* (GE Healthcare, Suécia) de 25 mg das secreções mucosas e parotídeas dispersos em 1 mL de uma solução **AMBIC** 0,2 mol/L e eletroforese em gel de poliacrilamida com **SDS-Tricina-PAGE** das frações correspondentes de cada perfil de eluição. Filtração em gel em coluna de 1,6 x 60 cm, equilibrada com solução de **AMBIC** 0,2 mol/L, eluída sob vazão de 0,3 mL/min, com volume coletado por tubo de 1 mL. **SDS-Tricina-PAGE:** gel de concentração a 5% e gel de resolução a 16,5% em acrilamida. Corrida de 5h a 85V e 10 mA (para cada gel). (A) Perfil de eluição da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas. (B) **SDS-Tricina-PAGE** das frações obtidas da eluição das secreções mucosas – 1. Marcador de massa molecular; 2. Marcador de ultrabaixa massa molecular. 3. Fração 1; 4. Fração 2; 5. Fração 3; 6. Fração 4; 7. Fração 5; 8. Fração 6; 9. Fração 7; 10. Fração 8; 11. Fração 9; 12. Marcador de massa molecular; 13. Vazio; 14. Fração 10; 15. Fração 11; 16. Fração 12; 17. Fração 13; 18. Fração 14; 19. Fração 15; 20. Fração 16; 21 e 22. Vazio; 23. Marcador de ultrabaixa massa molecular. (C) Perfil de eluição da filtração em gel das secreções das glândulas parotídeas. (D) **SDS-Tricina-PAGE** das frações obtidas da eluição das secreções parotídeas – 1. Marcador de ultrabaixa massa molecular; 2. Fração 1; 3. Fração 2; 4. Fração 3; 5. Fração 4; 6. Fração 5; 7. Fração 6; 8. Fração 7; 9. Fração 8; 10. Fração 9; 11. Fração 10; 12. Fração 11; 13. Fração 12; 14. Marcador de massa molecular. Foram aplicados 10 µL (solução saturada) de cada fração no seu poço correspondente.

Figura 12. Perfil de eluição da filtração em gel em coluna *HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR* (GE Healthcare, Suécia) de 25 mg do material de baixa massa molecular das secreções das glândulas mucosas e parotídeas dispersos em 1 mL de uma solução AMBIC 0,2 mol/L eletroforese em gel de poli-acrilamida com SDS-Tricina-PAGE das frações correspondentes de cada perfil de eluição. Filtração em gel em coluna de 1,6 x 60 cm, equilibrada com solução de AMBIC 0,2 mol/L, eluída sob vazão de 0,3 mL/minuto, com volume coletado por tubo de 1 mL. SDS-Tricina-PAGE: Gel de 0,6 x 8,0 cm x 0,7 mm, contendo gel de concentração a 5% e gel de resolução a 16,5% em acrilamida. Corrida de 5h a 85V e 10 mA (para cada gel). (A) Perfil de eluição da filtração em gel do material da água da diálise das secreções das glândulas mucosas. (B) SDS-Tricina-PAGE das frações obtidas da eluição do material da água da diálise das secreções mucosas – 1. Marcador de massa molecular; 2. Fração 1; 3. Fração 2; 4. Fração 3; 5. Fração 4; 6. Fração 5; 7. Fração 6; 8. Fração 7; 9. Fração 8; 10. Fração 9; 11. Fração 10; 12. Fração 11; 13. Fração 12; 14. Marcador de ultrabaixa massa molecular. (C) Perfil de eluição da filtração em gel do material da água da diálise das secreções parotídeas. (D) SDS-Tricina-PAGE das frações obtidas da eluição do material da água da diálise das secreções parotídeas – 1. Marcador de ultrabaixa massa molecular 2. Fração 1; 3. Fração 2; 4. Fração 3; 5. Fração 4; 6. Fração 5; 7. Fração 6; 8. Fração 7; 9. Fração 8; 10. Fração 9; 11. Fração 10; 12. Fração 11; 13. Vazio; 14. Marcador de massa molecular. Foram aplicados 10 µL (solução saturada) de cada fração no seu poço correspondente.

A primeira etapa de purificação consistiu de uma filtração em gel em coluna *HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR* (GE Healthcare, Suécia). Esta coluna é capaz de separar os componentes de acordo com sua forma e massa molecular (faixa de massa molecular: 1.000 até 100.000).

A tabela 4 apresenta a recuperação das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas e parotoides e do material de ambas as secreções das glândulas difundido na água de diálise.

Tabela 4. Recuperação das frações eluídas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas e parotoides e do material das secreções das glândulas mucosas e parotoides difundido na água de diálise.

Frações	Recuperação* (%)			
	SGM (%) ¹	SGP (%) ²	MGMD (%) ³	MGPD (%) ⁴
Fração 1	2,92	2,70	3,06	0,48
Fração 2	3,79	17,35	8,92	1,36
Fração 3	11,06	0,97	1,93	11,90
Fração 4	2,49	6,42	2,27	1,67
Fração 5	3,98	6,79	1,76	12,21
Fração 6	3,43	0,63	2,22	4,77
Fração 7	2,30	0,81	3,90	4,84
Fração 8	5,93	1,37	4,10	17,94
Fração 9	1,48	26,59	3,31	37,46
Fração 10	1,40	31,63	20,47	4,46
Fração 11	2,59	3,36	28,40	2,91
Fração 12	8,97	1,38	19,66	-----
Fração 13	35,85	-----	-----	-----
Fração 14	13,81	-----	-----	-----
Recuperação Total	100	100	100	100

*Recuperação calculada pelo software Unicorn 5.2 (GE Healthcare, Suécia) através da relação entre a área do pico correspondente e a somatória das áreas de todos os picos eluídos.

¹ SGM: Secreções das Glândulas Mucosas; ² SGP: Secreções das Glândulas Parotoides; ³ MGMD: Material das secreções das Glândulas Mucosas difundido na água de Diálise; ⁴ MGPD: Material das secreções das Glândulas Parotoides difundido na água de Diálise.

Os procedimentos cromatográficos utilizados para o fracionamento das secreções e do material difundido na água de diálise de ambas as glândulas apresentaram alta reprodutibilidade, indicando que estes são ideais para uma primeira etapa de fracionamento. Mesmo utilizando amostras diferentes, todos os perfis de eluição após 120 mL (1 volume de coluna) foram semelhantes, indicando similaridade de massas moleculares entre os componentes das amostras.

Comparando-se os perfis de eluição obtidos das secreções das glândulas parotoides (Fig. 11C) e do material difundido na água de diálise desta glândula (Fig. 12C), observa-se a eluição de várias frações (6-12) após 120 mL, indicando a presença de compostos de baixa massa molecular. No perfil de eluição da filtração em gel das secreções das glândulas parotoides nota-se que, antes dos 100 mL, eluem compostos de massas moleculares maiores, os quais ficaram retidos na membrana de diálise e não difundiram para a água de diálise, como comprovado quando se compara os perfis de eluição da filtração em gel das secreções das glândulas parotoides (Fig. 11C) e do material de baixa massa molecular da água de diálise (Fig. 12C).

Componentes com massas moleculares maiores são observados no perfil de eluição das secreções das glândulas mucosas (Fig. 11A). Ao contrário do perfil de eluição do material das secreções desta mesma glândula difundido na água de diálise (Fig. 12A), compostos de massas moleculares maiores foram retidos no processo da diálise, eluindo, assim, compostos com massas moleculares menores. Observa-se, também, que após 120 mL de ambas as eluições, os perfis são muito semelhantes, revelando muitos compostos com baixas massas moleculares.

Inúmeros compostos de variadas massas moleculares estão presentes nas amostras. Com esta etapa inicial de fracionamento, observa-se que, além de terem diferentes massas moleculares, apresentam natureza tanto proteica como não proteica. Alguns estudos revelam a presença de vários componentes de distintas naturezas nas secreções de sapos da família Bufonidae, tornando-os uma rica fonte de substâncias com grande potencial biotecnológico (DALY, 1995; DALY et al., 1987; ERSPAMER, 1971; GOMES et al. 2007; LAI et al., 2003; MONTI; CARDELLO, 1994; PRATES et al., 2012; PRATES; BLOCH JR, 2000; RASH, 2011; TOLEDO; JARED, 1995).

Entre estes componentes de baixa massa molecular têm-se, principalmente, os compostos não proteicos, como os bufodienolídeos esteroidais, alcaloides e aminas biogênicas

(SCIANI et al., 2013), com massas moleculares que variam de 200 a 800 Da (CLARKE, 1997; CUNHA-FILHO et al., 2010; DALY et al., 2007; MACIEL et al., 2003).

4.1.2. Cromatografia de fase reversa em coluna Luna PFP (2) 3 μm (pentafluorofenil propilo)

Deste fracionamento resultaram 9 frações, como apresentadas na figura 13. Esta coluna é utilizada para exclusiva seletividade em fase reversa, uma vez que ela consegue detectar mudanças posicionais em um analíto devido à altíssima eletronegatividade dos átomos de flúor presente no grupamento pentafluorofenil propilo ligado à superfície da sílica na coluna. Compostos polares e/ou aromáticos podem ser detectados com a utilização desta coluna, uma vez que ela apresenta quatro tipos de mecanismos para resolver isômeros, através das interações de ligação de hidrogênio, dipolo-dipolo, aromáticas e hidrofóbicas.

Figura 13: Perfil cromatográfico da fração 9 do material difundido na água de diálise das secreções das glândulas parotoides em coluna de fase reversa Luna PFP (2) 3 μm (pentafluorofenil propilo). Foram aplicados 400 μg da fração 9 dispersos em 500 μL de ácido fórmico 0,1%. A coluna (0,46 x 15 cm, Phenomenex, EUA) foi primeiramente equilibrada com ácido fórmico 0,1% e a fração foi inicialmente eluída com solução de fase móvel A (ácido fórmico 0,1%) à temperatura de 25°C. Em seguida, iniciou-se um gradiente de concentração de acetonitrila, chegando a 100% da solução de fase móvel B (ácido fórmico 0,1% e ACN 80%). A vazão foi de 0,7 mL/min e o volume coletado por tubo foi de 500 μL . A linha verde tracejada representa o gradiente de concentração de acetonitrila.

Com base na seletividade desta coluna, observam-se 9 frações do fracionamento da amostra com atividade antimicrobiana (fração 9 do material de baixa massa molecular das secreções das glândulas parotoides difundido na água de diálise) os quais apresentam diferentes volumes de eluição. Cada fração resultante dessa análise foi separada, congelada e liofilizada para posterior ensaio de atividade antimicrobiana.

A tabela 5 apresenta a recuperação das frações obtidas na cromatografia em coluna Luna PFP (2) 3 µm (pentafluorofenil propilo) em fase reversa da fração 9 (material de baixa massa molecular das secreções das glândulas parotoides).

Tabela 5. Recuperação das frações eluídas da cromatografia de fase reversa em coluna Luna PFP (2) 3 µm (pentafluorofenil propilo) do material das secreções das glândulas parotoides difundido na água de diálise obtido das secreções das glândulas parotoides.

Frações	Recuperação* (%)
1	2,38
2	1,96
3	18,81
4	2,69
5	59,92
6	2,56
7	1,22
8	0,7
9	9,76
Recuperação Total	100,0

*Recuperação calculada pelo software Unicorn 5.2 (GE Healthcare, Suécia) através da relação entre a área do pico correspondente e a somatória das áreas de todos os picos eluídos.

4.2. Caracterização bioquímica

4.2.1. SDS-Tricina-PAGE

Cada fração eluída do processo cromatográfico (coluna *HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR*, GE Healthcare, Suécia) foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida com

SDS-Tricina, evidenciando a complexa composição das secreções glandulares de *Rhinella schneideri* em compostos proteicos de variadas massas moleculares.

No perfil eletroforético das frações das secreções das glândulas mucosas (Fig. 11B), são observados inúmeros compostos proteicos, concentrados principalmente nas primeiras frações. Nota-se pela coloração que nos poços de 3 a 7, compostos de alta e baixa massa molecular estão presentes e foram corados com maior intensidade. A partir do poço 8, observa-se uma diminuição de bandas proteicas, consequência tanto da quantidade de amostra nestes poços, quanto da presença de compostos menores não proteicos, que não são corados pelo corante, presentes nas mesmas. Perry (2000), através de uma SDS-PAGE observou que há compostos proteicos com massas moleculares que variam de 30,5 a 54 kDa nas secreções das glândulas parotoides de sapos do gênero *Rhinella*.

As frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas parotoides (Fig. 11D) apresentam diversos compostos de alta e baixa massa molecular, assim como observado no gel de poliacrilamida das frações das secreções das glândulas mucosas (Fig. 11B). Os poços de 1 a 3 mostram diversos compostos de variadas massas, quando comparados com os poços 1 e 14 em que foram aplicados os padrões de massas moleculares. A partir do poço 4, observam-se, principalmente, peptídeos de baixa massa molecular, presentes nestas secreções. Do poço 7 ao 13 não foi possível observar a presença de muitos compostos, provavelmente porque as amostras são compostas por substâncias não proteicas. As amostras de todas as frações foram preparadas pesando-se de 100 – 200 µg.

Na figura 12B (material das secreções das glândulas mucosas difundido na água de diálise) observam-se poucos compostos, diferentemente do observado na figura 12D (secreções das glândulas parotoides), já que o material analisado neste gel foi previamente dialisado. Compostos de natureza proteica são observados principalmente nos poços 2 a 4.

No gel de poliacrilamida da figura 12D, há poucos compostos proteicos, provavelmente por causa da diálise que selecionou apenas compostos de baixa massa molecular (abaixo de 8 kDa). Observa-se que nos poços 2, 3 e 11 há compostos com massas moleculares maiores, provavelmente devido a agregados formados, já que este material foi dialisado contra água ultrapura em membranas de diálise com poros de 6 kDa.

Utilizando as secreções das glândulas parotoides de sapos do gênero *Bufo*, Perry (2000), mostrou diversas proteínas de alta e baixa massa molecular em gel de SDS-PAGE, além de estimar a concentração proteica pelo método de Bradford e Biureto das soluções de secreções secas e congeladas dessas glândulas (25 – 35% de proteínas por massa seca).

4.2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agente desnaturante (SDS-PAGE) e densitometria

Ambas as secreções das glândulas de *R. schneideri* foram submetidas a uma SDS-PAGE (Fig. 14A) seguida de uma análise densitométrica do gel (Fig. 14B e C).

Estas secreções glandulares apresentam alguns compostos com massas moleculares semelhantes, os quais são evidenciados através das bandas proteicas na SDS-PAGE (Fig. 14A) assim como pela análise densitométrica do gel (Fig. 14B e C). Na figura 14A, observamos 23 bandas proteicas para ambas as secreções glandulares em perfis eletroforéticos diferentes.

Na análise densitométrica das secreções das glândulas mucosas (Fig. 14B), nota-se que as 5 bandas mais intensas são correspondes aos números 13, 12, 11, 5 e 9 (ordem decrescente de intensidade), o que corresponde aos compostos proteicos com massas moleculares entre 70 a 23 kDa. Já na análise densitométrica das secreções das glândulas paratoides (Fig. 14C), as 5 bandas mais intensas são representadas pelos números 1, 6, 3, 2 e 12 (ordem decrescente de intensidade), representando os compostos com massas moleculares entre 198 a 32 kDa.

Algumas proteínas já foram identificadas na pele ou nas secreções glandulares de sapos. A partir da análise do extrato da pele de *Bufo andrewsi* (*Rhinella andrewsi*) foi isolado um inibidor de tripsina de aproximadamente 22 kDa denominado de BATI (ZHAO et al., 2005). Outros inibidores também foram isolados ou identificados por técnicas de biologia molecular. Entre eles estão o BSTI (*Bombina bombina*), BMTI (*Bombina máxima*), BOTI (*Bombina variegata*) e BVTI (*Bombina variegata*), compostos por aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos e identificados ou isolados por técnicas de biologia molecular e/ou fracionamento das secreções glandulares (CHEN; SHAW, 2003; LAI et al., 2002a; MIGNOGNA et al., 1996).

Figura 14. Perfil eletroforético e análise densitométrica das secreções das glândulas mucosas e parotoides de *Rhinella schneideri*. **(A)** SDS-PAGE (13,5%) realizada a 90 V por 1 hora e 40 minutos, com limites máximos de 40 mA e 15 W. Foram aplicados 15 μ L (1mg/mL) de cada secreção de glândula. SGM (secreções das glândulas mucosas) e SGP (secreções das glândulas parotoides). Em “a” e em “b” foram adicionados 5 μ L dos padrões de massa molecular da 161-0317 (BioRad, EUA) e ultra massa molecular M3546 (Sigma Aldrich, EUA), respectivamente. A seta na vertical indica o sentido da migração eletroforética (do polo negativo para o positivo). Gel corado com *PlusOne Coomassie Blue PhastGel® R-350* (GE Healthcare, Suécia). **(B-C)** Perfil densitométrico das bandas obtidas da SDS-PAGE das secreções das glândulas **(B)** mucosas (linha vermelha) e **(C)** parotoides (linha azul). A absorbância foi determinada em 550 nm e o espectro foi criado pelo software DenGo. **(D)** Sobreposição do perfil densitométrico das bandas obtidas da SDS-PAGE das secreções das glândulas mucosas (linha vermelha) e parotoides (linha azul). A absorbância foi determinada em 550 nm e o espectro foi criado pelo software DenGo.

A figura 14D apresenta a sobreposição das densidades ópticas de ambas secreções glandulares para cada banda proteica, juntamente com seus respectivos perfis eletroforéticos.

Pela sobreposição das análises densitométricas de ambos os géis, foi possível comparar a intensidade de cada banda e seu correspondente em cada secreção. Como as secreções das glândulas mucosas apresentaram bandas proteicas em maior número e mais intensas (Fig. 14A) do que as secreções das glândulas parotoides (Fig. 14B), embora tenham sido aplicadas na mesma concentração, pode-se concluir que as secreções das glândulas mucosas são mais ricas em compostos proteicos.

Referente à numeração dos picos, as bandas foram numeradas aleatoriamente pelo software, conforme eram detectadas. Assim, apenas algumas bandas que apresentam a mesma migração eletroforética receberam a mesma numeração, como, por exemplo, a banda 3 de ambas as secreções. Observa-se ainda que a banda 13 apresenta o pico com maior intensidade nas secreções das glândulas mucosas, o qual corresponde à banda 12 nas secreções das glândulas parotoides. Nessa última amostra, o pico mais intenso é aquele correspondente à banda 1.

Uma grande diferença é observada na banda 23 das secreções das glândulas parotoides. Observa-se que a mesma banda corresponde ao mesmo padrão de numeração para ambas as secreções, porém está ausente nas secreções das glândulas mucosas qualquer evidência de material proteico. Por serem secreções diferentes, esta informação auxilia no melhor entendimento sobre os compostos presentes em cada secreção glandular.

Na tabela a seguir (Tab. 6) estão as densidades ópticas (%) de cada banda eletroforética obtida pela análise densitométrica de ambas as secreções glandulares.

Comparando as densidades ópticas das bandas e a porcentagem proteica, ambas as secreções mostraram algumas bandas proteicas iguais, com variações nas porcentagens das densidades ópticas, mesmo sendo aplicadas no gel nas mesmas concentrações (15 μ L, 1mg/mL).

As bandas 3 e 5 são as mesmas em ambas as secreções, porém a banda 3 das secreções das glândulas parotoides está em maior quantidade (10,9%), quando comparada com as secreções das glândulas mucosas (4,6%). O inverso ocorre quando observamos a banda 5, a qual está em maior quantidade nas secreções das glândulas mucosas (11,6%) do que nas secreções das glândulas parotoides. Estas bandas representam compostos com massas moleculares entre 50 a 100 kDa.

Nas bandas proteicas das secreções das glândulas parotoides, a banda 3 (10,9%) e 23 (1,2%) estão em maiores quantidades proteicas, quando comparadas às suas respectivas bandas nas secreções das glândulas mucosas. A banda proteica 11, sendo a mesma para ambas as secreções, está em maior quantidade nas secreções das glândulas mucosas (8,2%), enquanto que nas secreções das glândulas parotoides corresponde a 4,4%. No entanto, por serem secreções diferentes, as mesmas bandas proteicas encontradas nas mesmas posições nos géis de cada secreção não correspondem necessariamente às mesmas moléculas.

Tabela 6: Densidade óptica (%)* de cada banda das secreções das glândulas mucosas e parotoides da SDS-PAGE.

BANDAS ELETROFORÉTICAS	SECREÇÕES DAS GLÂNDULAS MUCOSAS	SECREÇÕES DAS GLÂNDULAS PAROTOIDES
1	3,8	7,2
2	6,1	5,9
3	4,6	10,9
4	3,7	2,9
5	11,6	6,0
6	4,3	12,9
7	3,8	3,5
8	5,8	4,4
9	5,1	4,8
10	2,8	2,6
11	8,2	4,4
12	4,5	11,6
13	10,8	3,1
14	2,3	1,4
15	3,5	1,0
16	2,2	4,1
17	5,3	0,9
18	2,5	3,7
19	4,4	2,9
20	1,7	3,9
21	2,1	0,2
22	0,8	0,5
23	0,1	1,2
TOTAL	100	100

*Porcentagem da densidade óptica calculada pelo software Dengo.

4.3. Ensaios de atividade antimicrobiana

4.3.1. Atividade antifúngica contra *Candida albicans*

As leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por cerca de 80% das infecções hospitalares reportadas e documentadas, representando um enorme desafio às pesquisas destinadas ao desenvolvimento de novos antifúngicos (BANERJEE, et al., 1991; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

As espécies do gênero *Candida*, principalmente *C. albicans*, são patógenos oportunistas, encontrados em diversas partes do corpo, prontas para crescer e infectar como resposta às alterações fisiológicas do hospedeiro. Assim, inúmeros estudos e técnicas vêm sendo empregadas a fim de entender melhor o mecanismo de patogênese envolvendo *Candida spp* (SOLL, 2002). Frente a isso, a busca por novos compostos com grande espectro antifúngico torna-se necessária, uma vez que os atuais antifúngicos disponíveis estão cada vez menos eficazes no combate às patologias fúngicas.

O ensaio antimicrobiano envolvendo *C. albicans* incubadas com as secreções das glândulas mucosas, parotoides e do material obtido da diálise das secreções das glândulas parotoides revelaram que nenhuma das amostras apresentaram efeito antifúngico. Nas concentrações testadas (2 mg/mL), as secreções das glândulas mucosas e parotoides e o material das secreções das glândulas parotoides de *Rhinella schneideri* difundido na água de diálise não apresentaram efeito contra *C. albicans*.

4.3.2. Teste de difusão em ágar (atividade bactericida)

Nas concentrações avaliadas (25,0; 12,5; 6,2; 3,1 e 1,6 mg/mL), as secreções das glândulas mucosas e parotoides e do material das glândulas parotoides difundido na água de diálise mostraram-se incapazes de inibir o crescimento das bactérias *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 29213) nos testes de difusão em ágar. Estudos disponibilizados na literatura revelam a presença de lectinas em secreções de sapos *Bufo arenarum* (*Rhinella arenarum*) que são responsáveis por atividades bacteriostáticas contra bactérias gram-negativas (*E. coli* K12 4100 e contra cepas selvagens de *E. coli* e *Proteus morganii*) e contra bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*) (RIERA et al., 2003). Assim como as lectinas, os bufodienolídeos isolados das secreções de sapos *Bufo rubescens* (*Rhinella rubescens*)

(marinobufagina e telocinobufagina) mostraram efeitos bactericidas sobre *E. coli* (ATCC 25992) e *S. aureus* (ATCC 29213) em meio líquido Müller-Hinton (CUNHA-FILHO, et al., 2005).

4.3.3. Teste de difusão em ágar (atividade antifúngica)

Pelo método de difusão em ágar (Norma M44-A2 de 2009 do *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*) com moldes de aço denominados de “*templates*” de 6 orifícios de 6 mm de diâmetro, as secreções das glândulas parotóides, mucosas e o material obtido da água da diálise das secreções das glândulas parotóides foram testados contra *C. albicans*.

Nas três placas em que a levedura foi incorporada ao meio de cultura, não foi possível observar a presença de halos de inibição utilizando as secreções de ambas as glândulas e do material da água da diálise das secreções das glândulas parotóides. Neste teste, também não foi possível observar a presença de halos no controle de inibição (Anfotericina B), indicando que o teste não apresentou resultado satisfatório e não deverá ser utilizado nos estudos subsequentes.

Ao contrário das placas em que as leveduras foram incorporadas ao meio, nas placas em que as leveduras foram dispersas com auxílio de uma alça de Drigalsky, melhores resultados foram observados. Na tabela 7 estão apresentados a média e o desvio padrão dos valores dos halos de inibição observados para as diferentes amostras e concentrações testadas, bem como para o controle de inibição do crescimento (Anfotericina B: 64 µg/mL) utilizado nas diferentes placas.

Tabela 7. Valores dos halos de inibição de crescimento contra *C. albicans*.

Concentração (mg/mL)	SGP ¹	SGM ²	MGPD ³
25,0	S.H.*	15,15±3,21	S.H.
12,5	S.H.	18,23±4,62	S.H.
6,2	S.H.	S.H.	S.H.
3,1	11,21±0,15	14,37±2,40	S.H.
1,6	12,24±0,73	S.H.	S.H.
CONTROLE			
Anfotericina B (64 µg/mL)	18,46±1,27	17,21±5,96	23,80±2,68

Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão (n = 4), em milímetros (mm). *S.H. (Sem Halo); ¹ SGP: Secreções das Glândulas Parotoides; ² SGM: Secreções das Glândulas Mucosas; ³ MGPD: Material das secreções das Glândulas Parotoides difundido na água de Diálise.

Nos resultados da tabela 7, observam-se que nas menores concentrações (3,1 e 1,6 mg/mL) das secreções das glândulas parotoides há halos de inibição, diferente do observado para as secreções das glândulas mucosas e do material de baixa massa molecular da água de diálise das secreções das glândulas parotoides. É provável que nas secreções das glândulas parotoides existam componentes que possam servir como nutrientes e também componentes com ação antimicrobiana, por se tratar de veneno bruto. Nas menores concentrações, a ação dos antimicrobianos seria mais evidente porque os possíveis nutrientes estariam em menores proporções, resultando, assim, na formação do halo de inibição.

Esperava-se observar halos de inibição no material de baixa massa molecular da água de diálise por ser um material originado das glândulas parotoides, mas não foram detectados. Assim, provavelmente, os compostos de massas moleculares acima de 6 kDa, presentes nas secreções das glândulas parotoides, seriam os responsáveis por estes halos de inibição.

Já nas secreções das glândulas mucosas, halos de inibição foram observados nas concentrações de 25, 12,5 e 3,1 mg/mL. Correlacionando os halos de inibição das secreções dessas glândulas com o controle de inibição de crescimento (Anfotericina B), nota-se que os mesmos apresentam diâmetros semelhantes ao observados no controle, indicando que esta amostra apresenta boa ação antifúngica.

4.3.4. Determinação da concentração inibitória mínima (C.I.M.) e da concentração fungicida mínima (C.F.M.) frente às leveduras

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (C.I.M.) e da Concentração Fungicida Mínima (C.F.M.) utilizando secreções das glândulas parotóides e mucosas e do material de baixa massa molecular da água de diálise das secreções das glândulas parotóides contra a *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* estão apresentadas na tabela 8.

Tabela 8. Valores das C.I.Ms e das C.F.Ms utilizando secreções das glândulas parotóides e mucosas e material da água de diálise das glândulas parotóides frente às leveduras.

AMOSTRAS	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>	
	C.I.M.	C.F.M.	C.I.M.	C.F.M.	C.I.M.	C.F.M.
SGP	> 2.000	> 2.000	> 2.000	> 2.000	> 2.000	> 2.000
SGM	> 2.000	> 2.000	> 2.000	> 2.000	> 2.000	> 2.000
MGPD	> 2.000	> 2.000	> 2.000	> 2.000	> 2.000	> 2.000
Anfotericina B	4	4	32	32	8	8

C.I.Ms e C.F.Ms para as amostras (secreções das glândulas parotóides e mucosas e material da água de diálise das glândulas parotóides) e Anfotericina B estão expressas em µg/mL.

¹ SGP: Secreções das Glândulas Parotóides.

² SGM: Secreções das Glândulas Mucosas.

³ MGPD: Material das secreções das Glândulas Parotóides difundido na água de Diálise.

Os valores das C.I.Ms e das C.F.Ms encontrados utilizando as secreções das glândulas parotóides e mucosas e para o material de baixa massa molecular da água de diálise das glândulas parotóides revelam que as mesmas não apresentaram atividade antifúngica nas concentrações utilizadas neste ensaio (concentração máxima de 2.000 µg/mL), não descartando a possibilidade de concentrações maiores ou suas substâncias isoladas apresentarem o efeito antimicrobiano.

Nos ensaios realizados para determinar os valores das C.I.Ms e das C.F.Ms para o controle de inibição (Anfotericina B), a concentração de 4 µg/mL apresentou efeito antimicrobiano, resultado semelhante ao encontrado na literatura para *C. albicans* (HAWSER; ISLAM, 1999; PFALLER; DIEKEMA, 2012). Os valores de C.I.Ms e C.F.Ms determinados para *C. krusei* (32 µg/mL) e *C. parapsilosis* (8 µg/mL) são maiores que os descritos na

literatura. Foram encontrados valores entre 0,25 - 2 µg/mL para *C. krusei* e 0,5 - 2 µg/mL para *C. parapsilosis*, mostrando que as leveduras utilizadas no teste apresentaram maior resistência à Anfotericina B (PFALLER; DIEKEMA, 2012; SWINNE; WATELLE; NOLARD, 2005).

A inibição do crescimento das leveduras também foi demonstrada pela adição de 20 µL de uma solução aquosa de resazurina (indicador de oxidação ou aerobiose) 10 mg/mL em cada poço da microplaca. A resazurina de cor azul reage na presença de células viáveis, transformando-se em resofurina, substância de coloração rosa, o que facilita verificar a presença de crescimento microbiano (STOPPA, et al. 2009).

Após a incubação da microplaca por 2 h a 35°C com resazurina, a cor rosa foi observada em todos os poços que continham a suspensão de leveduras, indicando o crescimento/viabilidade celular das mesmas.

4.3.5. Determinação da concentração inibitória mínima (C.I.M.) e da concentração fungicida mínima (C.F.M.) frente aos fungos filamentosos

Os resultados obtidos na determinação da C.I.M. e da C.F.M. utilizando as secreções das glândulas parotoides e mucosas e o material da água da diálise das glândulas parotoides contra fungos filamentosos estão apresentados na tabela 9.

Os valores das C.I.Ms encontrados utilizando as secreções das glândulas mucosas e parotoides mostram que as amostras não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações utilizadas neste ensaio (concentração máxima de 2.000 µg/mL), o que não descarta a possibilidade de que valores maiores do que os usados neste ensaio apresentem atividade antimicrobiana. Para o material de baixa massa molecular da água de diálise das secreções das glândulas parotoides, foi possível verificar que a concentração de 500 µg/mL apresentou atividade antimicrobiana satisfatória frente aos fungos *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*. Para o isolado clínico *Trichophyton rubrum*, não foi possível observar atividade antimicrobiana nas concentrações testadas, não descartando, também, a possibilidade de que em outras concentrações acima de 2.000 µg/mL do material da água da diálise apresentem efeito.

Nos estudos desenvolvidos por Pujol et al. (2002), as C.I.Ms de Anfotericina B encontradas frente aos mesmos fungos filamentosos deste ensaio, com exceção do isolado clínico, mostraram valores entre 0,25 - 8 µg/mL, 0,25 - 0,5 µg/mL e 0,12 - 1 µg/mL para *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*, respectivamente.

Vale ressaltar que a C.I.M. encontrada neste ensaio (500 µg/mL) foi com base em uma amostra bruta, sem fracionamento, indicando que nesta mistura há compostos que, quando isolados, poderão demonstrar atividade antimicrobiana em concentrações bem menores.

Como controle, a Anfotericina B apresentou C.I.M. de 1 µg/mL, 4 µg/mL e 4 µg/mL para os fungos *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*, respectivamente. A determinação das C.F.Ms neste ensaio não foi possível.

Tabela 9. Valores das C.I.Ms e das C.F.Ms utilizando as secreções das glândulas parotoides, glândulas mucosas e material de baixa massa molecular da água de diálise das glândulas parotoides frente aos fungos filamentosos.

Amostras	<i>M. canis</i>		<i>T. mentagrophytes</i>		<i>T. rubrum</i>		<i>T. rubrum</i> (IC)		<i>M. anisopliae</i>		<i>M. anisopliae</i> (IC)		<i>B. bassiana</i>	
	C.I.M.	C.F.M.	C.I.M.	C.F.M.	C.I.M.	C.F.M.	C.I.M.	C.F.M.	C.I.M.	C.F.M.	C.I.M.	C.F.M.	C.I.M.	C.F.M.
SGP¹	> 2.000	-----	> 2.000	-----	> 2.000	-----	> 2.000	-----	> 2.000	-----	> 2.000	-----	> 2.000	-----
SGM²	> 2.000	-----	> 2.000	-----	> 2.000	-----	> 2.000	-----	> 2.000	-----	> 2.000	-----	> 2.000	-----
MGPD³	500	-----	500	-----	500	-----	> 2.000	-----	> 2.000	-----	> 2.000	-----	> 2.000	-----
Anf. B⁴	1	-----	4	-----	4	-----	0,062	-----	8	-----	4	-----	16	-----

C.I.Ms e C.F.Ms para as amostras (secreções das glândulas parotoides e mucosas e material de baixa massa da água de diálise das glândulas parotoides) e Anfotericina B estão expressas em µg/mL.

¹SGP: Secreções das Glândulas Parotoides.

²SGM: Secreções das Glândulas Mucosas.

³MGPD: Material das secreções das Glândulas Parotoides difundido na água de Diálise.

⁴Anf. B: Anfotericina B.

4.3.6. Determinação da concentração inibitória mínima (C.I.M.) e da concentração bactericida mínima (C.B.M.) frente às bactérias *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923)

Os valores das C.I.Ms. e das C.B.Ms encontrados frente às bactérias *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923) estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10. Valores das C.I.Ms e das C.B.Ms utilizando secreções das glândulas parotóides e mucosas e do material de baixa massa molecular da água de diálise das glândulas parotóides frente às bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

Amostras	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	
	C.I.M. ^a	C.B.M. ^a	C.I.M. ^a	C.B.M. ^a
SGP ¹	> 2.000	> 2.000	> 2.000	> 2.000
SGM ²	> 2.000	> 2.000	> 2.000	> 2.000
MGPD ³	> 2.000	> 2.000	1.000	1.000
Ampicilina ^b	7,81	7,81	15,62	15,62

^aC.I.Ms e C.B.Ms para as amostras (secreções das glândulas parotóides, mucosas e material da água de diálise das secreções das glândulas parotóides) estão expressas em µg/mL.

^bC.I.Ms e C.B.Ms para Ampicilina estão expressas em mg/mL.

¹SGP: Secreções das Glândulas Parotóides.

²SGM: Secreções das Glândulas Mucosas.

³MGPD: Material das secreções das Glândulas Parotóides difundido na água de Diálise.

Observa-se na tabela 10 que os valores das C.I.Ms. e das C.B.Ms utilizando as secreções das glândulas mucosas e parotóides não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações utilizadas neste ensaio ($C_{m\acute{a}x}$ de 2.000 µg/mL), não descartando a possibilidade de que valores maiores dos testados poderão apresentar atividade antimicrobiana. Foi possível verificar atividade antimicrobiana para o material das secreções das glândulas parotóides difundido na água de diálise na concentração de 1.000 µg/mL. Cunha-Filho e colaboradores (2005) demonstraram atividade antimicrobiana dos bufodienolídeos marinobufagina (massa monoisotópica 400,225006 Da) e telocinobufagina (massa monoisotópica: 402,240631 Da) isolados das secreções das glândulas parotóides do sapo *Rhinella rubescens*. C.I.Ms de 128 µg/mL de telocinobufagina e de 64 µg/mL de marinobufagina foram encontrados para *E. coli* (ATCC 25922) e C.I.Ms de 128 µg/mL de telocinobufagina e de 16 µg/mL de marinobufagina para *S. aureus* (ATCC 25213) (CUNHA-FILHO et al., 2005). Os possíveis mecanismos de ação desses compostos ainda não foram elucidados.

Por serem moléculas pequenas, estes bufodienolídeos citados por Cunha-Filho (2005) poderão ser os responsáveis pela atividade antimicrobiana observada neste ensaio, pois o material com atividade aqui testado tem origem de um sapo do mesmo gênero (*Rhinella*) e de uma amostra muito rica em compostos de baixa massa molecular (< 6 kDa) que é o material da água de diálise. Menores concentrações inibitórias poderão ser encontradas, já que o material em teste não está purificado.

4.3.7. Determinação da concentração inibitória mínima (C.I.M.) e da concentração fungicida mínima (C.F.M.) frente ao *Microsporum canis*

Infecções fúngicas (micoses) estão entre as infecções superficiais mais conhecidas mundialmente (AGGARWAL; GOINDI, 2012). Comum na prática veterinária, dermatoses felinas causadas por *Microsporum canis* são comumente encontradas. É uma importante zoonose devido ao seu caráter disseminativo, atingindo seres humanos (DeBOER; MORIELLO, 1994).

Como o material das secreções das glândulas parotóides difundidos na água de diálise apresentou atividade inibitória na triagem inicial contra *M. canis*, o fracionamento deste material em uma filtração em gel foi realizado e todas as frações resultantes desta etapa foram testadas no ensaio de diluição seriada em microplaca de 96 poços. As C.I.Ms e C.F.Ms estão apresentadas na tabela 11.

Observa-se que a fração 9 demonstrou atividade antifúngica (fungicida) na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$. Este dado revela a importância do estudo desta fração, pois uma vez isolado(s) o(s) composto(s) ativo(s), forte(s) candidato(s) poderá(ão) estar disponível(eis) no combate/terapêutica desta dermatose. Como controle positivo, a Anfotericina B apresentou C.I.M. e C.F.M. de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, concentração esta menor quando comparada aos controles obtidos nos ensaios anteriores (item 4.3.5.).

Sabe-se atualmente que os principais alvos de agentes antifúngicos são: parede celular (Equinocandinas, Niquomicinas), membrana celular (Polienos), síntese do ergosterol e do retículo endoplasmático (Azoles, Alilaminas), síntese do DNA e RNA (Flucitosina), interferência na montagem dos microtúbulos (Griseofulvina) e síntese de proteínas (Sordarinas) (ODDS, 2003). Entre os medicamentos mais utilizados no tratamento das infecções fúngicas causadas por *Microsporum canis*, os derivados de azóis são amplamente empregados, agindo no bloqueio da síntese do ergosterol (GHANNOUM; RICE, 1999; UTHMAN, 2005).

Tabela 11. Valores das C.I.Ms e das C.F.Ms utilizando frações resultantes da filtração molecular das secreções das glândulas parotóides difundido na água de diálise frente ao *M. canis*.

FRAÇÕES	<i>Microsporum canis</i>	
	*C.I.M.	*C.F.M.
Fração 1	> 2000	> 2000
Fração 2	> 2000	> 2000
Fração 3	> 2000	> 2000
Fração 4	> 2000	> 2000
Fração 5	> 2000	> 2000
Fração 6	> 2000	> 2000
Fração 7	> 2000	> 2000
Fração 8	> 2000	> 2000
Fração 9	250	250
Fração 10	> 2000	> 2000
Fração 11	> 2000	> 2000
Anfotericina B	0,5	-----

*C.I.Ms e C.F.Ms utilizando as frações do material das secreções das glândulas parotóides difundido na água de diálise estão expressas em µg/mL. C.I.Ms e C.B.Ms para Anfotericina B estão expressas em µg/mL.

Inúmeras toxinas animais e diversos compostos vegetais com atividade antimicrobiana já foram descritos na literatura. Vários peptídeos antimicrobianos de anfíbios foram caracterizados e, geralmente, apresentam natureza catiônica, tamanho relativamente pequeno e capacidade de lisar as membranas de diversos microrganismos (NICOLAS; MOR, 1995; PAPO; SHAI, 2003; PRATES; BLOCH JR., 2000). Outros estudos apontam para a ação antifúngica de compostos originados do metabolismo secundário de fungos. Como exemplos, a massarigenin D, spiromassaritone e paecilospirone, metabólitos secundários do fungo *Massarison sp* apresentaram atividade antifúngica sobre *C. albicans*, *Cryptococcus*

neoformans, *Trichophyton rubrum* e *Aspergillus fumigatus* (SUN, 2011). Sautour e colaboradores (2004) demonstraram atividade antifúngica de saponinas esteroidais de *Dioscorea cayenensis* contra *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. No entanto, são raros os estudos que demonstram os possíveis mecanismos de ação destes compostos bioativos.

4.3.8. Determinação da concentração inibitória mínima (C.I.M.) e da concentração fungicida mínima (C.F.M.) para *Microsporium canis* utilizando as frações obtidas da cromatografia de fase reversa em coluna Luna PFP (2) 3 µm (pentafluorofenil propilo)

Neste ensaio, foram utilizadas nove frações resultantes da cromatografia de fase reversa em coluna Luna PFP (2) da fração 9 do material de baixa massa molecular das secreções das glândulas parotóides. Para cada fração, uma faixa de concentração específica foi utilizada, respeitando a quantidade (massa - µg) de cada fração.

Na tabela a seguir (Tab. 12) estão apresentados os valores das C.I.Ms e C.F.Ms para cada fração.

Tabela 12. Valores das C.I.Ms e das C.F.Ms utilizando frações resultantes do fracionamento por cromatografia de fase reversa (Luna PFP) da fração 9 do material de baixa massa molecular da água de diálise das glândulas parotóides frente ao *M. canis*.

Fração	C.I.M.*	C.F.M.*	Faixa de concentração (µg/mL)
1	506,25	506,25	1012,50 – 7,91
2	>275,00	>275,00	275,00 – 2,14
3	>87,50	>87,50	87,50 – 0,68
4	>337,50	>337,50	337,50 – 2,63
5	>850,00	>850,00	850,00 – 6,64
6	>100,00	>100,00	100,00 – 0,78
7	>25,00	>25,00	25,00 – 0,19
8	>12,50	>12,50	12,50 – 0,09
9	50	>50	50,00 – 0,39
Anf. B	4,00	4,00	16,00 – 0,12

*C.I.Ms e C.F.Ms utilizando a fração 9 do material das secreções das glândulas parotóides difundido na água de diálise estão expressas em µg/mL. C.I.Ms e C.B.Ms para Anfotericina B estão expressas em µg/mL.

Observa-se que a fração 1 demonstrou atividade fungicida na concentração de 506,25 µg/mL, enquanto que a fração 9 demonstrou atividade fungistática (50 µg/mL). Nas secreções glandulares de *Xenopus*, *Silurana*, *Hymenochirus* e *Pseudhymenochirus* foram encontrados vários peptídeos com atividades antimicrobianas e citotóxicas (CONLON; MECHKARSKA, 2014). Além dos peptídeos antimicrobianos, compostos sintetizados a partir de alcaloides encontrados nas secreções de anfíbios ou nas peçonhas de artrópodes, já demonstraram atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* (MICHAEL, 2007).

Entre as frações acima testadas, a fração 4 foi analisada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) e por espectrometria de massas de alta resolução com ionização via electrospray (ESI-MS), sugerindo que esta fração seja o alcaloide alucinógeno conhecido como bufotenina (5-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina) (dados não apresentados). Este composto é amplamente distribuído entre as famílias de anuros e age como um potente alucinógeno, apresentando atividade similar ao LSD (COSTA et al., 2005). Futuramente, todas as frações testadas nesse ensaio serão analisadas e elucidadas estruturalmente, principalmente as frações ativas no fungo filamentoso *M. canis*.

O uso de metodologias proteômicas na Toxinologia têm permitido a obtenção de inúmeras informações pertinentes sobre a composição proteica de peçonhas e venenos animais. Portanto, como uma alternativa para a investigação dos componentes presentes nas secreções das glândulas mucosas e parotóides do sapo *Rhinella schneideri*, foi realizada a análise proteômica comparativa das mesmas, abordada no segundo capítulo desta tese, que forneceu uma visão holística sobre suas composições proteicas.

CAPÍTULO II

Análise comparativa das secreções das glândulas mucosas e parotoides do sapo *Rhinella schneideri* por espectrometria de massas

5. INTRODUÇÃO

5.1. Proteômica

A nomenclatura para as ciências ômicas incluem a genômica para variações de DNA, transcriptômica para RNA mensageiros (RNA_m) e proteômica para peptídeos e proteínas (Fig. 15) (BLANKENBURGO et al., 2009; ELLIS et al., 2007). O termo “proteoma” originou a partir da fusão das palavras “proteína” e “genoma”. Este termo foi usado, pela primeira vez, por Marc Wilkins em 1994 e representa o conjunto de proteínas codificadas pelo genoma de um sistema biológico (célula, tecido, órgão, fluido biológico ou organismo) em um momento específico sob determinadas condições (MISHRA, 2010; PHIZICKY et al., 2003).

Figura 15. Tecnologias ômicas. Visão geral dos campos das análises “ômicas”. A genômica fornece informações do conjunto completo de genes de um sistema biológico complexo enquanto que a transcriptômica fornece uma descrição completa dos RNAs mensageiros do genoma. A proteômica oferece informações das proteínas expressas pelo genoma.

O proteoma varia com o estágio de desenvolvimento da célula, com estresse o qual o organismo está sujeito, além de ser alterado devido à própria natureza do órgão ou tecido. A análise proteômica permite o entendimento de toda função, estrutura e interação de todas as proteínas contidas em um sistema biológico. Proteínas defeituosas são as principais causas de doenças e, assim, podem servir como indicadores úteis no desenvolvimento de doenças

específicas. Como as proteínas são os alvos da maioria dos medicamentos, elas tornam-se, então, os principais alvos para o desenvolvimento de novos medicamentos (MISHRA, 2010; PHIZICKY et al., 2003). Assim, as análises proteômicas têm um papel importante na descoberta de novos fármacos e novos diagnósticos, além de fornecer diversas outras ferramentas para a compreensão dos mecanismos envolvidos na conexão entre proteínas e doenças (CUTLER et al., 1999; WASINGER; CORTHALS, 2002).

O transcriptoma e o proteoma são mais complexos do que o genoma, já que respostas distintas podem ser atribuídas a partir do mesmo gene, além de diversas proteínas poderem ser traduzidas a partir do mesmo RNA_m (BERNOT, 2004; TWYMAN, 2004). O genoma é uma fonte de informação estática, diferente do transcriptoma e do proteoma, os quais são fontes de informações dinâmicas. Estes podem variar drasticamente sob diferentes condições devido ao processamento de RNA, à regulação da transcrição, síntese proteica e a diversas modificações na proteína (BERNOT, 2004). Diversos transcritos podem ser gerados por *splicing* alternativo, promotor alternativo ou uso de sítios de poliadenilação. Modificações (como por exemplo, glicosilação e fosforilação) podem ser realizadas de várias maneiras, durante ou após a tradução, fazendo com que uma proteína possa ser modificada de muitas maneiras, originando inúmeras variantes (TWYMAN, 2004).

A ampla diversidade de instrumentos comercialmente disponíveis para a análise proteômica baseada na espectrometria de massas faz com que a escolha da instrumentação seja complexa e difícil (THOMPSON; SCHAEFFER-REISS; UEFFING, 2008). A escolha dos instrumentos para a análise depende principalmente do tipo do material a ser analisado (peçonha, veneno, tecidos, células em cultura, organelas, fluidos) e da estratégia escolhida para a identificação dos compostos de interesse (THOMPSON; SCHAEFFER-REISS; UEFFING, 2008). Atualmente, a espectrometria de massas tornou-se o pilar principal entre os métodos analíticos empregados nos estudos proteômicos para a identificação e caracterização dos compostos proteicos presentes nos mais variados sistemas biológicos (THOMPSON; SCHAEFFER-REISS; UEFFING, 2008).

Na análise proteômica, uma das principais vantagens está no estudo, em larga escala, da expressão de proteínas em diversos sistemas biológicos complexos, em momentos e em condições peculiares (BARBOSA et al., 2012). A abordagem proteômica é um processo analítico dividido em quatro etapas: 1. Condicionamento das amostras (crescimento de células, coleta e armazenamento); 2. Preparação das amostras (extração, concentração e purificação); 3. Separação (métodos cromatográficos e/ou eletroforese); 4. Quantificação e

identificação de peptídeos/proteínas (espectrometria de massas, cromatografia líquida de alta eficiência, focalização isoeletrica, eletroforese em gel de poliacrilamida, *peptide mass fingerprint* e *peptide fragmentation fingerprint*) (DERACINOIS et al., 2013). Geralmente, a análise proteômica inicia-se de uma mistura heterogênea de proteínas. Desta mistura, as proteínas são clivadas em peptídeos e estes são analisados em espectrômetros de massas a fim de obter informações sobre a estrutura primária dos peptídeos (Fig. 16) (LIEBLER, 2002).

Figura 16. Fluxograma geral para análise proteômica. Abordagem proteômica realizada em 4 etapas. 1. Condicionamento da amostra (coleta do veneno/peçonha); 2. Preparação da amostra (digestão); 3. Separação da amostra (extração, concentração e purificação). 4. Quantificação e identificação de peptídeos/proteínas (análise por espectrometria de massas – MS).

Organismos com genomas não sequenciados, incluindo a maioria dos animais peçonhentos e venenosos, representam a maioria das espécies na biosfera. Assim, algumas abordagens metodológicas, nestes casos, são realizadas iniciando-se com o fracionamento do veneno ou da peçonha bruta por cromatografia líquida de alta eficiência, seguida pela inicial caracterização de cada fração proteica por combinação de técnicas de SDS-PAGE ou eletroforese bidimensional, sequenciamento N-terminal e espectrometria de massas (CALVETE et al., 2009).

O elevado interesse nas análises proteômicas tem levado ao desenvolvimento de novas tecnologias analíticas e aperfeiçoamento de muitas outras como eletroforese capilar

para separação de peptídeos, cromatografia de exclusão molecular como etapa de fracionamento inicial, desenvolvimento de novas placas para MALDI para transferência de analitos a partir de um gel de eletroforese bidimensional diretamente para a placa e muitas outras (ARAKI et al., 2011; HU et al., 2007, 2010; TANAKA et al., 2009).

O uso da proteômica para o estudo de sistemas biológicos (peçonhas e venenos animais) tem se destacado nos últimos anos. Diversas análises proteômicas, assim como transcriptômicas, têm revelado uma vasta quantidade de compostos proteicos com grande potencial farmacológico e biotecnológico (ABDEL-RAHMAN; QUINTERO-HERNANDEZ; POSSANI, 2013; dos SANTOS et al., 2009; FOX; SERRANO, 2008; VEJAYAN; KHOON; IBRAHIM, 2014).

Entre estas análises, destacamos o estudo proteômico das peçonhas de serpentes (GONÇALVES-MACHADO et al.; LUNA et al., 2013), de escorpiões (FUZITA et al., 2015; XU et al., 2014), de aranhas (JIANG et al., 2010; RICHARDSON et al., 2006), formigas (AILI et al., 2014; COLOGNA et al., 2013; WIESE et al., 2006) e de muitos outros animais venenosos e peçonhentos.

5.2. Proteômica das secreções de anfíbios

O emprego de técnicas ômicas no estudo da secreção da pele de rãs tem revelado inúmeras famílias de peptídeos e proteínas com diversos efeitos, entre os quais podemos destacar os analgésicos, neurotoxinas, antimicrobianos e inibidor de proteases (WU et al., 2011). Além disso, a determinação da estrutura primária dos peptídeos e proteínas auxilia na complementação de análises morfológicas e moleculares, contribuindo para o melhor entendimento da taxonomia e filogenética dos anuros (CONLON; BEVIER, et al., 2007; KING et al., 2013; MECHKARSKA et al., 2014).

As secreções de anfíbios são complexos proteomas, contendo inúmeros componentes proteicos de famílias “distintas” (WANG et al., 2012). Podem apresentar compostos análogos a peptídeos reguladores endógenos de vertebrados, assim como compostos de estrutura única e função desconhecida (WANG et al., 2012). De acordo com Bernot (2004), a análise proteômica pode identificar um enorme número de proteínas, mas suas funções são frequentemente desconhecidas, como por exemplo, apenas 8.000 proteínas humanas entre as 20.000 conhecidas têm alguma função conhecida.

A análise proteômica (peptidômica) das secreções de anfíbios destaca-se pela busca por peptídeos antimicrobianos (Tab. 13). Estes peptídeos mostraram atividade contra bactérias gram-negativas e positivas e contra leveduras. Poucos exibem atividade contra fungos, principalmente fungos filamentosos (CONLON, et al., 2007a; CONLON, et al., 2007b; CONLON et al., 2015; GENG et al., 2015; HU et al., 2014; KING et al., 2013; RATES et al., 2011; THOMPSON et al., 2007; WU et al., 2011).

Além da busca por peptídeos antimicrobianos nos proteomas das peles de anfíbios, busca-se peptídeos como a habilidade de estimular a liberação de insulina os quais poderão ser utilizados para o desenvolvimento de novos medicamentos. A análise peptidômica das secreções da pele de rãs *Lithobates catesbeianus* (bullfrog) revelou que o peptídeo denominado de ranatuerin-2CBd é um promissor candidato ao desenvolvimento de um valioso agente terapêutico para o tratamento de pacientes com diabetes do tipo 2. Assim como este peptídeo, outros como a brevinin-2 e brevinin-2GUb demonstraram efeito significativo sobre a taxa de liberação de insulina (MECHKARSKA et al., 2011).

Na proteômica da pele da salamandra gigante chinesa (*Andrias davidianus*), muitas das proteínas encontradas estão envolvidas em diversas atividades fisiológicas, sendo observada uma abundante expressão de collagenases, proteínas relacionadas à resposta inflamatória, proteínas de adesão celular, proteínas relacionadas com a organização extracelular da pele e muco (GENG et al., 2015). Peptídeos/proteínas com atividades antimicrobianas não foram encontrados neste estudo, embora a maioria das análises proteômicas referentes a anfíbios, particularmente as rãs, revelam uma ampla diversidade de compostos proteicos antimicrobianos.

A maioria dos estudos proteômicos de anfíbios estão baseados nas análises das secreções das glândulas de rãs, o que torna o banco de dados para sapos quase inexistente. Há poucas informações sobre peptídeos e proteínas de sapos, especificamente o sapo *Rhinella schneideri*. Neste sentido, o objetivo deste capítulo é a análise proteômica comparativa das secreções das glândulas mucosas e parotídeas deste sapo, já que não há um estudo desta natureza para este animal.

Tabela 13. Principais peptídeos antimicrobianos encontrados através da análise proteômica das secreções de anfíbios.

Peptídeo	Sequência de aminoácidos	MT ¹ (Da)	ME ² (Da)	Anfíbio	NA ³	Referência
Pha-T1	RPPSWIPK	979.56	979.60	<i>P. hypochondrialis azurea</i>	P84945	THOMPSON et al., 2007
Pha-T2-1	FPPWF-NH ₂	691.34	691.28	<i>P. hypochondrialis azurea</i>	P84952	THOMPSON et al., 2007
Pha-T2-2	FPPWE-NH ₂	673.32	673.38	<i>P. hypochondrialis azurea</i>	P84943	THOMPSON et al., 2007
Pha-T2-3	FPPWL-NH ₂	657.36	657.39	<i>P. hypochondrialis azurea</i>	P84942	THOMPSON et al., 2007
Pha-T2-4	FPPWM-NH ₂	675.32	675.31	<i>P. hypochondrialis azurea</i>	P84948	THOMPSON et al., 2007
Pha-T2-5	LPPWIG-NH ₂	680.40	680.40	<i>P. hypochondrialis azurea</i>	P84941	THOMPSON et al., 2007
Pha-T2-6	KP-HYP-WRL-NH ₂	810.52	810.46	<i>P. hypochondrialis azurea</i>	P84946	THOMPSON et al., 2007
Pha-T2-7	KPWERL-NH ₂	826.48	826.43	<i>P. hypochondrialis azurea</i>	P84947	THOMPSON et al., 2007
Pha-T2-8	KPWERE-NH ₂	842.44	842.47	<i>P. hypochondrialis azurea</i>	P84953	THOMPSON et al., 2007
Pha-T2-9	VPPIGWF	814.43	814.40	<i>P. hypochondrialis azurea</i>	P84944	THOMPSON et al., 2007
Pha-T3-1	pEDKPFWPPPIYIM	1613.80	1613.91	<i>P. hypochondrialis azurea</i>	P84949	THOMPSON et al., 2007
Hyposin-HA1	LRPAVIRPKGK-NH ₂	1232.82	1232.89	<i>P. hypochondrialis azurea</i>	P84954	THOMPSON et al., 2007
Hyposin-HA2	LRPAFIRPKGK-NH ₂	1280.82	1280.87	<i>P. hypochondrialis azurea</i>	P84955	THOMPSON et al., 2007
Hyposin-HA3	LRPAVIVRTKGK-NH ₂	1335.88	1335.87	<i>P. hypochondrialis azurea</i>	P84956	THOMPSON et al., 2007
Hyposin-HA4	FRPALIVRTKGTRL-NH ₂	1626.02	1626.12	<i>P. hypochondrialis azurea</i>	P84957	THOMPSON et al., 2007
[Hyp] 6 -Dermorphin	YAFGYPS-NH ₂	818.39	818.38	<i>P. hypochondrialis azurea</i>	_____	THOMPSON et al., 2007

¹ Massa Molecular Teórica; ² Massa Molecular Experimental; ³ Número de Acesso (UniProtKB)

Tabela 13. Principais peptídeos antimicrobianos encontrados através da análise proteômica das secreções de anfíbios (Continuação).

Peptídeo	Sequência de aminoácidos	MT (Da) ¹	ME (Da) ²	Anfíbio	NA ³	Referência
TRP-HA1	VMYYSLRPV-NH ₂	1222.65	1222.72	<i>P. hypochondrialis azurea</i>	P84951	THOMPSON et al., 2007
GRP-HA1	pEQGEGGPYGGLSPLRFS	1731.82	1731.86	<i>P. hypochondrialis azurea</i>	P84959	THOMPSON et al., 2007
PRP-HA1	FLFFAFPHPL-NH ₂	1233.67	1233.77	<i>P. hypochondrialis azurea</i>	P84960	THOMPSON et al., 2007
Ascaphin-1M	GFRDVLKGAAKEFVKTVAGHIAN-NH ₂	2426.3	2426.4	<i>A. montanus</i>	_____	CONLON, et al., 2007a
Ascaphin-3M	GFREVLKGAAKAFVKTVAGHIANI	2496.5	2496.4	<i>A. montanus</i>	_____	CONLON, et al., 2007a
Ascaphin-4M	GFKDWIKGAACKLIKTVASNIANQ	2600.5	2600.5	<i>A. montanus</i>	_____	CONLON, et al., 2007a
Ascaphin-5Ma	GIKDWIKGAACKLIKTVASSHIANQ	2589.9	2589.5	<i>A. montanus</i>	_____	CONLON, et al., 2007a
Ascaphin-5Mb	GIKDWIKGAACKLIKTVASSHIANQ	2562.5	2562.5	<i>A. montanus</i>	_____	CONLON, et al., 2007a
Ascaphin-7M	GFKDWIKSAACKLIKTVASNIANQ	2630.4	2630.5	<i>A. montanus</i>	_____	CONLON, et al., 2007a
Ranalexin-HKa	FLGGLIKIIPAAFCAVTKKC	2090.2	2090.2	<i>R. heckscheri</i>	_____	CONLON, et al., 2007b
Ranatuerin-2HKa	GLFLDTLKGAAKDIAGIALEKCLKCKITGCKP	3212.8	3212.8	<i>R. heckscheri</i>	_____	CONLON, et al., 2007b
Temporin-1HKa	SIFPAIVSFLSKFL	1566.9	1566.9	<i>R. heckscheri</i>	_____	CONLON, et al., 2007b
Ranalexin-OLa	FMGGIMKAIPAMICAMTKKC	2142.0	2142.1	<i>R. okaloosae</i>	_____	CONLON, et al., 2007b
Ranatuerin-2OLa	GLFVDTLKGLAGKMLESCLKCKIAGCKP	2817.6	2817.5	<i>R. okaloosae</i>	_____	CONLON, et al., 2007b
Temporin-10La	FLPFLKSILGKIL	1487.1	1487.0	<i>R. okaloosae</i>	_____	CONLON, et al., 2007b
Temporin-20La	GFLDIKDTGKDFAVKILNNLKCKLAGGCPR	3344.5	3344.8	<i>R. okaloosae</i>	_____	CONLON, et al., 2007b

¹ Massa Molecular Teórica; ² Massa Molecular Experimental; ³ Número de Acesso (UniProtKB).

6. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Este segundo capítulo tem como objetivo a caracterização de proteínas e peptídeos antimicrobianos através da análise proteômica, baseada em espectrometria de massas, das secreções das glândulas mucosas e parotoides do sapo *Rhinella schneideri*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para isso foram realizados os seguintes procedimentos:

- Avaliação inicial por espectrometria de massas das frações obtidas nos processos de fracionamento;
- Análise das secreções das glândulas mucosas e parotoides de *Rhinella schneideri* por cromatografia líquida de ultra performance acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução.

7. MATERIAL E MÉTODOS

O organograma a seguir (Fig. 17) foi criado para melhor representar a estrutura metodológica desenvolvida neste capítulo.

Figura 17. Organograma sobre a metodologia utilizada no segundo capítulo. A metodologia descrita neste segundo capítulo inicia-se na análise das frações do primeiro fracionamento de ambas as secreções por MALDI-TOF e análise das secreções íntegras por nanoACQUITY UPLC acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Orbitrap. As frações das secreções das glândulas mucosas foram fracionadas em um segundo passo cromatográfico (coluna semipreparativa C18) e as frações resultantes tiveram seu sequenciamento amino-terminal realizado. MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*): ionização-dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massas por tempo de voo; ESI-MS: espectrometria de massas com ionização por electrospray.

7.1. Obtenção das secreções glandulares

As secreções das glândulas mucosas e parótidas foram obtidas de acordo com a descrição no item 3.1. do primeiro capítulo.

7.2. Análise proteômica

Toda a análise proteômica abordada neste capítulo foi realizada no Laboratório de Espectrometria de Massas da Universidade de Liège (Bélgica) em colaboração com os professores Dr. Loïc Quinton e Dr. Edwin de Pawn.

7.2.1. Análise por nanoACQUITY UPLC acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Orbitrap

Para esta análise, foram realizadas soluções supersaturadas das secreções (glândulas mucosas e parotoides) em 30 μ L de ácido fórmico 0,2% (V/V). Estas soluções foram purificadas em mini coluna de fase reversa do tipo *ZipTip* C18 (8 μ g) (Merck Millipore, Holanda), equilibrada com ácido fórmico 0,2% (V/V). Os componentes presentes nas amostras que interagiram com a coluna foram eluídos com 15 μ L de solução contendo 0,2% de ácido fórmico e 80% de ACN. Estes 15 μ L resultantes de cada amostra foram concentrados para 10 μ L com auxílio do *speed vac concentrator* (3 min a 37° C). Após concentração do volume, estas amostras foram analisadas em um sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Reino Unido) acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Orbitrap controlado pelo software *Excalibur 2.2* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Foi utilizada uma coluna capilar monolítica *PepSwiff* 100 μ m x 25 cm (Thermo Fisher Scientific, EUA). A eluição dos compostos foi feita com gradiente de 3% de solução de ácido fórmico 0,1% até 50% de solução de acetonitrila, com vazão de 0,7 μ L/minuto até 60 minutos. Os resultados foram obtidos por *full MS scan*. As análises foram realizadas no modo de dados análise dependente (DDA) usando acionamento automático dos experimentos de MS/MS. Os valores-alvos do controle automático foram de 3.10e6 para os procedimentos de MS e 2.10e5 para os procedimentos de MS/MS. Os picos obtidos a partir do *scan* do MS foram fragmentados por dissociação de alta energia (*high-energy dissociation* – HCD) e seus correspondentes espectros MS/MS foram adquiridos no analisador Orbitrap. Os dados MS/MS foram enviados ao software *PEAKS 6* (Bioinformatics solution, Canadá). O *score* do ALC (*Average Local Confidence* – ALC) foi considerado 60%.

7.2.2. Redução e alquilação das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas e parotoides

Todas as frações da cromatografia em gel filtração (*Sephacryl S-100 HR -High Resolution*, GE Healthcare, Suécia) das secreções das glândulas mucosas e parotoides, além das secreções dos venenos de ambas, foram reduzidas e alquiladas. Dez microgramas das frações e das secreções dos venenos foram dispersos em 15 μ L de ácido fórmico 0,2%. Cada amostra foi purificada em mini coluna de fase reversa do tipo *ZipTip* C18 (5 μ g) (Merck Millipore, Holanda), equilibrada com ácido fórmico 0,2% (V/V) resultando em 15 μ L de

solução final. Para cada amostra, em 5 μL da solução final foram adicionados 4,5 μL de solução de bicarbonato de amônio 50 mM e 0,5 μL de DDT (diclorodifeniltricloroetano) para concentração final de 25 nM e incubados por 1 h a 58° C no *ThermoStat plus* - Thermoblock (Eppendorf, Alemanha) sob constante agitação (400 rpm). Após 1 h, foram adicionados 2,9 μL de IAA (Iodoacetamida) para concentração final de 70 nM com mais 2,1 μL de solução de bicarbonato de amônio 50 nM e, novamente, colocados no *ThermoStat plus* - Thermoblock (Eppendorf, Alemanha) por 1 h à 37° C sob agitação constante (400 rpm). Com o término na incubação, as amostras foram centrifugadas no *speed vac concentrator* por 3 min a 37° C ou até volume final de 10 μL e congeladas para posterior análise. Esta análise foi realizada por espectrometria de massas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time-of-flight*), em um aparelho Ultraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Alemanha) para a determinação das pontes dissulfeto nos peptídeos/proteínas dessas frações (QUINTON et al., 2007). Os espectros de massas foram obtidos nos modos positivo/refletido e positivo linear utilizado como matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) e ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB).

7.2.3. Análise das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas e parotoides por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF

As frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas e parotoides foram inicialmente analisadas por espectrometria de massas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time-of-flight*), em um aparelho Ultraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Alemanha), equipado com uma fonte de laser do tipo *Nd-YAG Smartbeam laser* (MLN 202, LTB) e controlado pelo programa FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics, Alemanha). Uma pequena porção de cada fração (2 μg) foi dispersa em 20 a 50 μL de TFA 0,2% e purificados em mini coluna de fase reversa do tipo *ZipTip C18* (Merck Millipore, Holanda), equilibrada com TFA 0,2% (V/V). Os componentes presentes nas frações que interagiram com a coluna foram eluídos com 10 μL de solução contendo TFA 0,2% e ACN 80%. Esta solução foi então misturada com as matrizes HCCA (ácido α -ciano- 4-hidroxicinâmico) ou DHB (ácido 2,5-dihidróxido benzóico) (1:1, V/V) e a mistura (2 μL) foi aplicada na placa de amostra.

Os espectros de massas foram obtidos nos modos positivo/refletido (matriz HCCA) e positivo/linear (matriz DHB). Inicialmente, o aparelho foi calibrado com padrões externos (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo usado o *PeptidCalib Standard Mono*, (Faixa de massa

molecular: 754,4 a 3.147,5 Da), para ensaios com a matriz HCCA, e o *Pep Mix3 Laser biolabs AVE* (faixa de massa molecular: 3.257 a 8.565 Da), para ensaios com a matriz DHB. Para a obtenção dos espectros, a potência do laser foi ajustada para 32% (matriz HCCA) ou 55% (matriz DHB) com incidência de 500 a 2.000 tiros, de forma a gerar uma razão sinal/ruído satisfatória. Os dados foram analisados utilizando-se o programa FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Alemanha).

7.2.4. SDS-Tricina-PAGE

Eletroforese realizada de acordo com o item 3.3.1. Foram aplicados 10 µL da fração 8 obtidos da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas. Concluída a corrida, o gel foi corado pelo método de coloração de prata *PlusOne Silver Staining Kit, Protein* (GE Healthcare, Suécia).

7.2.5. Cromatografia de fase reversa da fração 8 das secreções das glândulas mucosas em coluna semipreparativa C18

Cento e trinta e sete miligramas (137 mg) da fração 8 (item 7.2.5.) das secreções das glândulas mucosas foram dispersos em 5 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e submetidos à cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC) de fase reversa em coluna C18 com finalidade semipreparativa C18 (5µ 300 Å, 250 mm x 10 mm, Jupiter®, Phenomenex, EUA). Foi utilizado gradiente descontínuo de concentração até 100% da solução B (TFA 0,1% + Acetonitrila (ACN) 80%) no Sistema FPLC Äkta Purifier UPC10 (GE Healthcare, Suécia). Frações de 1,5 mL foram coletadas sob vazão de 5 mL/min. Todas as frações resultantes desta cromatografia foram reunidas conforme seus respectivos picos de absorbância, congeladas, liofilizadas e armazenadas a -20°C.

7.2.6. Espectrometria de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier com ionização por electrospray (ESI)

Cinco microlitros do composto denominado Pep7 foram adicionados com 5 µL de ácido fórmico 0,2% em ACN. A solução resultante foi diluída 10x, sendo que 10 µL da solução diluída foram adicionados em uma microplaca de 96 poços de fundo cônico. Esta microplaca foi acoplada no espectrômetro de massas e analisada por espectrometria de

ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier com ionização por electrospray (ESI) SolariX XR, (Bruker Daltonics, Alemanha). Íons positivos foram externamente gerados por nano-ESI através do NanoMate (Advision Biosciences, EUA). Os espectros foram adquiridos na faixa de m/z 4.000-7.000 e analisados pelo software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha).

7.2.7. Digestão com Tripsina

A digestão com tripsina foi realizada para o composto Pep7. Para este ensaio, foram necessários 7 μg do Pep7 em 10 μL água ultrapura. As mesmas etapas de redução e alquilação descritas anteriormente foram realizadas (item 7.2.2.). Foram adicionados 1,62 μL de solução de tripsina (0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) na amostra e a mesma foi incubada por 2 h a 37° C no *ThermoStat plus* - Thermoblock (Eppendorf, Alemanha) sob agitação constante de 400 rpm. Com o término da incubação, foram adicionados 5 μL de ácido fórmico 1% para finalizar a reação. A solução resultante da digestão foi purificada em mini coluna de fase reversa do tipo *ZipTip* C18 (5 μg) (Merck Millipore, Holanda), equilibrada com ácido fórmico 0,2% (V/V) e congelada a - 20° C.

7.2.8. Peptide Mass Fingerprinting (PMF)

A solução resultante da digestão com tripsina (item 7.2.7.) foi injetada no espectrômetro de massas *Synapt G2* (Waters, Reino Unido) acoplado a um sistema de cromatografia líquida (nano UPLC, Waters, Reino Unido) com ionização por electrospray. A análise foi realizada no modo positivo nano-ESI-MS [nano-ESI (+)-MS] e nano- ESI-MS/MS (baixa dissociação induzida por colisão) usando um espectrômetro de massas Q-TOF (Waters, Reino Unido) híbrido com alta resolução e alta acurácia (5 ppm). As voltagens para o capilar e os cones foram ajustadas para 3.000 e 50V, respectivamente, com temperatura de dessolvatação de 80° C. Os espectros de massas foram expressos com intensidades de íons individuais $[M + H]^+$ e os íons com intensidade relativa < 10% não foram incluídos. Para análise das massas dos compostos foi utilizado o software MassLunx 4.0v.

7.2.9. Sequenciamento amino-terminal

Os sequenciamentos dos peptídeos obtidos do fracionamento da fração 8 das secreções das glândulas mucosas foram realizados pelo sequenciador automatizado Shimadzu PPSQ-33A do laboratório de Toxinas Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFR – USP. Todas as frações foram congeladas e liofilizadas. Após liofilização, cada fração foi dispersa em 60 µL de água ultrapura e aplicados numa membrana de fibra de vidro (Shimadzu) em 4 aplicações de 15 µL. Com o término da aplicação das amostras na membrana, a câmara de reação do sequenciador foi fechada e iniciou-se a análise. O sequenciamento foi realizado através do método de degradação de Edman (EDMAN; BEGG, 1967). A cada ciclo de degradação, o aminoácido N-terminal da sequência polipeptídica foi removido na forma instável conhecida como anilino-tiazolinona (AZT). Cada AZT-aminoácido é extraído da membrana de fibra de vidro em solvente orgânico e transferido a outra câmara chamada de conversor, onde é hidrolisado rapidamente para um feniltiocarbamil (PTC)-aminoácido. O PTC-aminoácido formado se converte em um feniltiohidantoína (PTH)-aminoácido, que é identificado cromatograficamente (cromatografia líquida de alta eficiência) por comparação com um padrão de um PTH-aminoácidos padrão.

8. RESULTADOS e DISCUSSÃO

8.1. Análise proteômica

A análise proteômica tem contribuído para o crescente interesse nos estudos da expressão de proteínas/peptídeos de sistemas biológicos em condições específicas (BARBOSA et al., 2012). O proteoma, além de ser o conjunto de produtos traduzidos por meio das sequências genômicas, também inclui as proteínas/peptídeos decorrentes de processos pós-transcricionais e pós-traducionais (BARBOSA et al., 2012).

O enorme potencial dos venenos e peçonhas como fontes de novos fármacos torna-se muito mais real, a cada dia, principalmente devido às investigações ou análises proteômicas (peptidômicas) que vêm oferecendo inúmeras possibilidades para a descoberta e desenvolvimento de medicamentos (CALVETE et al., 2007; ESCOUBAS; RASH, 2004; LEWIS; GARCIA, 2003).

Os estudos proteômicos/peptidômicos, voltados à análise das secreções de anfíbios, têm demonstrado uma enormidade de peptídeos, principalmente com atividade antimicrobiana contra bactérias e leveduras (CONLON, et al., 2007a; CONLON, et al., 2007b; CONLON et al., 2015; GENG et al., 2015; HU et al., 2014; KING et al., 2013; RATES et al., 2011; THOMPSON et al., 2007; WU et al., 2011).

Neste estudo é apresentado um panorama dos compostos presentes nas secreções das glândulas mucosas e paratíreas de *R. schneideri* através de técnicas proteômicas, sendo destacados diversos peptídeos e proteínas encontrados, além de avaliar suas identidades sequenciais com outras proteínas depositadas em bancos de dados.

8.1.1. Análise por nanoACQUITY UPLC acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Orbitrap

Na análise das secreções de ambas as glândulas (veneno bruto) por nanoACQUITY UPLC acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Orbitrap é possível identificar a abundância relativa de cada composto presente na amostra em função do tempo de eluição (Fig. 18).

Figura 18. Perfil de varredura no modo *full scan* das secreções das glândulas parotídeas (A) e mucosas (B) por nanoACQUITY UPLC acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Orbitrap. Nestes perfis são observadas a abundância relativa dos íons relativos presentes nessas secreções em relação ao tempo de eluição. As amostras foram eluídas inicialmente com fase móvel A (ácido fórmico 0,1%) a temperatura de 25° C. Em seguida, iniciou-se um gradiente de concentração de acetonitrila (ACN) de 3% até 50% da fase móvel B (ácido fórmico 0,1% e ACN 50%). A vazão foi de 0,7 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 60 min de análise.

Os 10 íons mais intensos foram fragmentados (MS/MS) e submetidos à análise no programa PEAKS 6. Este programa é capaz de analisar todos os dados de estudos proteômicos obtidos por espectrometria de massas através do sequenciamento “*De novo*”, através de buscas de sequências de aminoácidos em bancos de dados, assim como avaliar identidades com diversas sequências.

Através do processamento dos dados obtidos pelo perfil de varredura no modo *full scan* de ambas as secreções, foi possível identificar as massas moleculares dos compostos presente nessas secreções. Observa-se que ambas as secreções glandulares compartilham as mesmas populações de massas moleculares (Fig. 19).

Figura 19. População de massas moleculares das secreções das glândulas de *R. schneideri*. As massas moleculares foram agrupadas a cada 800 Da. As populações de massas moleculares obtidas das secreções das glândulas mucosas e parotoides estão representadas em azul e vermelho, respectivamente.

A maioria das massas dos compostos, em ambas as secreções, está compreendida na faixa de 400 a 6.800 Da. Os compostos com massas moleculares de 400 a 2.000 Da estão em maior quantidade nas secreções das glândulas parotoides do que nas secreções das glândulas mucosas, apesar de que há muitos compostos nesta faixa em ambas as secreções. Observa-se que nas secreções das glândulas parotoides há uma predominância de compostos de baixa massa molecular, principalmente entre 400 e 1.200 Da. Nessa faixa de massa molecular estão os bufodienólídeos (grande maioria) e outros compostos não proteicos como os alcaloides e

aminas biogênicas. Na caracterização das secreções das glândulas mucosas e parotoides de *Bufo biporcatus philippinicus* Inger, foi observado que os compostos predominantes são as aminas biogênicas e os bufodienolídeos, destacando entre estes a bufalina, gamabufalina e resibufogenina (GIRON-MALIGALIG; CASTILLO, 2014).

Foram obtidos 11.034 compostos, distribuídos entre as secreções de ambas as glândulas. Para as secreções das glândulas mucosas, foram obtidos 6.505 compostos, enquanto que para as secreções das glândulas parotoides, 4.529 compostos. Subsequentemente, o diagrama de Venn foi construído para identificar as mesmas massas moleculares dos compostos comuns às duas secreções (Fig. 20). Foram identificados 2.233 compostos com as mesmas massas moleculares em ambas as secreções, evidenciando a grande diferença de compostos produzidos por essas glândulas.

Figura 20. Compostos de mesmas massas moleculares compartilhados entre as secreções de ambas as glândulas. Os números de compostos de massas moleculares exclusivas das secreções das glândulas mucosas e parotoides estão apresentados em azul e vermelho, respectivamente. O número de compostos de ambas as secreções que apresentam as mesmas massas moleculares está representado em preto.

Este estudo nos direciona para resultados até então, inéditos. Embora existam inúmeros estudos caracterizando, por técnicas ômicas, os compostos presentes nas secreções da pele de diversas rãs (CONLON, et al., 2007a; CONLON, et al., 2007b; CONLON et al., 2015; HU et al., 2014; KING et al., 2013; RATES et al., 2011; THOMPSON et al., 2007; WU et al., 2011), até o momento, não havia estudo algum comparando as secreções das glândulas mucosas e parotoides do sapo *Rhinella schneideri*.

No estudo da peçonha de formiga *Dinoponera quadriceps* de quatro regiões distintas do Brasil, Cologna e colaboradores (2013) identificaram, em média, 335 compostos, dentre os quais, 48 compostos foram encontrados em todas as peçonhas, independente da região de coleta da formiga. Destes compostos, a maioria apresentou massa molecular de 1.200 a 2.000 Da.

Os espectros obtidos pela fragmentação (MS/MS) das secreções de ambas as glândulas foram submetidos à análise no programa PEAKS 6, o qual gerou diversas sequências de resíduos de aminoácidos. As sequências obtidas foram selecionadas de acordo com o *score* do ALC (*Average Local Confidence*) o qual foi ajustado para 60%.

Foram obtidas 511 sequências de peptídeos e/ou sequências parciais de proteínas das secreções das glândulas mucosas, enquanto que para as secreções das glândulas parotóides foram obtidas 110 sequências (Fig. 21).

Figura 21. Distribuição das massas moleculares (kDa) e suas porcentagens no total de sequências obtidas pelo programa PEAKS. (A) Massas moleculares das 511 sequências de peptídeos/proteínas encontradas na análise das secreções das glândulas mucosas. (B) Massas moleculares das 110 sequências de peptídeos/proteínas encontradas na análise das secreções das glândulas parotóides.

Pelo programa PEAKS, observamos que nas secreções das glândulas mucosas, a maior parte das sequências de aminoácidos são de compostos com massas moleculares entre 1 e 3 kDa, o que corresponde a 82% das sequências obtidas. Para as sequências resultantes da análise das secreções das glândulas parotóides, observamos que a maioria das sequências de aminoácidos são correspondentes aos peptídeos com massas moleculares entre 1 e 2 kDa, o que representa 55% do total de sequências dos compostos sequenciados a partir das secreções desta glândula. Além disso, os componentes com massas moleculares menores que 1 kDa

representam 24% das sequências obtidas para as secreções das glândulas parotoides, sendo que para as secreções das glândulas mucosas, estes peptídeos representam apenas 7%.

As sequências destes peptídeos ou fragmentos proteicos foram, posteriormente, analisadas pelo algoritmo de comparação de sequências primárias de aminoácidos, BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), usando como organismo opcional *amphibians* (taxid: 8292) ou consulta com *antimicrobial*, no campo *entrez query*. As sequências de aminoácidos dos principais picos observados no perfil de varredura no modo *full scan* das secreções das glândulas parotoides e mucosas estão apresentadas nas tabelas a seguir (Tab. 14 e 15, respectivamente) por nanoACQUITY UPLC acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Orbitrap.

Tabela 14: Identificação dos compostos majoritários no perfil de eluição das secreções das glândulas parotóides através do tempo de retenção observado na análise realizada pelo nanoACQUITY UPLC acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Orbitrap.

PEPTÍDEO IDENTIFICADO					ANFÍBIOS		ANTIMICROBIANOS	
TR ¹	SEQUÊNCIA	ALC ² (%)	MM ³ exp.	ppm ⁴	ALINHAMENTO (NOME/ESPÉCIE)	ID ⁵	ALINHAMENTO (NOME/ESPÉCIE)	ID ⁵
29,61	MPGCTEDYLS ¹⁰ LLLNR	82	1.723,83	-0,6	3 GCTEDYL 9 GCTEDYL 53 GCTEDYL 59 (Tandem C2 domains nuclear protein/ <i>Xenopus</i> <i>(Silurana) tropicalis</i>)	100	1 MPGCTEDYLSLLLN 14 MP C EDYLS LN 470 MP-CAEDYLSVVLN 482 (Chain A, Recombinant Human Serum Albumin With Palmitic Acid. Synthetic Cationic Antimicrobial Peptides Bind With Their Hydrophobic Parts To Drug Site Ii Of Human Serum Albumin)	71
31,15	AKPCDWLKKK ¹⁰ GEWLKAKGLG ²⁰ PVKAALKAAV ³⁰ E	65	3.331,93	3,7	5 DW-----LKKKGEWLK 15 DW KKKGEW+K 4030 DWKNLELQIKKKGEWMK 4047 (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit/ <i>Xenopus</i> (<i>Silurana</i>) <i>tropicalis</i>)	50	5 DWLKK-KGEWLKAKGLGPVKAALKAA 29 DWLKK K EWLKAKG G VKAAL AA 4 DWLKKGK-EWLKAKGPGIVKAALQAA 28 (Ponericin-G2/ <i>Pachycondyla goeldii</i>)	81
38,36	LVGLLAFGWY ¹⁰ LQQCGPFDEH ²⁰ VK	65	2.519,27	0,7	1 LV---GLLAF-----GWYLQQCGP 16 LV GL AF GW LQ CGP 144 LVVSGGLQAFFGVTGLCGWILQNCGP 169 (Solute carrier family 23 member 3 isoform X2 <i>/Xenopus</i> (<i>Silurana</i>) <i>tropicalis</i>)	50	1 LVGLLAFGWYLQQCGPFDEHVK 22 LV L AF YLQQC PF++HVK 46 LV-LIAFAQYLQQC-PFEDHVK 65 (Chain A, Recombinant Human Serum Albumin With Palmitic Acid. Synthetic Cationic Antimicrobial Peptides Bind With Their Hydrophobic Parts To Drug Site Ii Of Human Serum Albumin)	68

¹TR: Tempo de retenção; ²ALC: Average Local Confidence; ³MM: Massa molecular experimental; ⁴ppm: Erro do precursor da massa em partes por milhão; ⁵ID: identidade.

Tabela 15: Identificação dos compostos majoritários no perfil de eluição das secreções das glândulas mucosas através do tempo de retenção observado na análise realizada pelo nanoACQUITY UPLC acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Orbitrap.

PEPTÍDEO IDENTIFICADO					ANFÍBIOS		ANTIMICROBIANOS	
TR ¹	SEQUÊNCIA	ALC ² (%)	MM ³ exp.	ppm ⁴	ALINHAMENTO (NOME/ESPÉCIE)	ID ⁵	ALINHAMENTO (NOME/ESPÉCIE)	ID ⁵
22,58	RGPGPAQVMS ¹⁰ PGGRP GTW	70	1806,89	-1,3	12 GGRP GTW 18 GGRP GTW 316 GGRP GTW 322 (Mucin-2-like/ <i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>)	100	8 VMSP--GGRP G 16 VMSP GGRP G 87 VMSPHGGRP G 97 (Superoxide dismutase/ <i>Burkholderia sp.</i> MSh1)	82
23,57	SQKGSQEADD ¹⁰ RPSYGVPLA ²⁰ FPGVVDR	64	2871,41	4,1	19 LAFPGVVDR 27 LAFP VVDR 8 LAFPSVVDR 16 (Protein Simiate/ <i>Xenopus laevis</i>)	89	18 PLAFPGVV 25 PLAFPGVV 102 PLAFPGVV 109 (Hydantoinase/ <i>Burkholderia sp.</i> MSh2)	100
24,58	PVLEDDSGAD ¹⁰ STKSEVTEDW ²⁰ MPTQVEHMDS ³⁰ DYDSMGCVHF ⁴⁰	65	4519,83	0,1	12 TKSEVTEDWMP TQ ----- VEHMDSDYDSM 35 TKSE ED Q VE M+S+Y+ + 130 TKSE-KED ---- QIIHLRREVENMESEYENL 155 (Protein 153 isoform X1/ <i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>)	39	2 VLEDDSGADST--KSEVTEDWMP TQVEHMDSDYDS 34 VL++D T K E TEDWMP V MD DS 460 VLQND ----- TLQK-ENTEDWMP--V--MD--DS 481 (Cytochrome C/ <i>Ruminococcus gauvreauii</i>)	49
25,08	WSEQLLKGKV ¹⁰ EQLMRDDAEQ ²⁰ SEVQTEGDS ³⁰ YDHEFE	62	4269,89	-0,3	3 EQLLKGKVEQLMRDDAEQSEVQTEGD 28 E LL KVEQ+M + +S ++ GD 34 ENLLSEKVEQMEWSSRRSVIRMGND 59 (LOC733408 protein/ <i>Xenopus laevis</i>)	47	2 SEQLLKGKVEQLMRDDAEQSEV 23 SEQ VEQL RD+ E EV 76 SEQ ----- VEQLIRDEEELAEV 92 (Hypothetical protein BPABA577_00320/ <i>Acinetobacter phage YMC13/03/R2096</i>)	55

25,74	WSLPGEPLS ¹⁰ GHF	78	1382,66	2,8	<p>4 PGEPLSG 11 2631 PGEPLSG 2638 PGEPLSG</p> <p>(Collagen alpha-1(VII) chain /<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>)</p>	100	<p>1 WSLPGEPLS 10 WSLP PGLS 30 WSLPAAPGLS 39</p> <p>(Hypothetical protein PA1645/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)</p>	80
30,37	EEDPLSGGLK ¹⁰ TSWLPGEPL ²⁰ SGHF	92	2509,21	-0,2	<p>11 TSWLP-----GEPGLSGH 23 TSWLP EP LSG+ 327 TSWLPTHPRASEPELSGQ 344</p> <p>(Transcription factor-like 5 protein/<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>)</p>	56	<p>2 EDPLSGGLK^{TSWLP} 15 EDPL GGLK LP 77 EDPLGGGLK---LP 87</p> <p>(ABC transporter permease/<i>Streptomyces aureocirculatus</i>)</p>	58
31,46	EGMCGLFDLL ¹⁰ PGE	73	1378,62	0,1	<p>4 CGLFDLLPG 12 CGL+DLL G 2240 CGLYDLLRG 2248</p> <p>(Lysosomal-trafficking regulator/<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>)</p>	78	<p>3 M-CGLFD-LLPGE 13 M CGLFD LLPG+ 16 MDCGLFDQLLPGD 28</p> <p>(Cyclic nucleotide-binding domain protein/<i>Pseudomonas sp.</i> P482)</p>	77
31,55	EGCMGLFYSL ¹⁰ PGQ	70	1400,61	2,7	<p>1 EGCMGLFYSLP 11 E C+G FYSLP 2 ENCLG-FYSLP 11</p> <p>(Tumor suppressor, partial/<i>Xenopus laevis</i>)</p>	73	<p>4 MGLFYS-LP 11 MGLFYS LP 68 MGLFYSRLP 76</p> <p>(Formate/nitrite transporter family protein/<i>Pseudomonas sp.</i> P482)</p>	89
32,17	SMCPAANGMS ¹⁰ FPLLDL	73	1665,75	4,2	<p>2 MCPAANGMSF 11 MCP NG SF 121 MCPGGNGTSF 130</p> <p>(Microfibrillar-associated protein 3 precursor/<i>Xenopus laevis</i>)</p>	70	<p>9 MSFPLLDL 16 MSFPLL L 176 MSFPLLLAL 183</p> <p>(Glutathione S-transferase/<i>Pantoea agglomerans</i> Eh318)</p>	88

32,33	NPDYDMDVFL ¹⁰ PLPGGP	66	1761,79	-1,8	1 NPDYDMDV ----- FLPL 12 NPD +MDV FLPL 36 NPD-EMDVVVEKRFLPL 51 (Brevinin-1 precursor/ <i>Amolops wuyiensis</i>)	59	1 NPDYDMDV ----- FLPL 12 NPD +MDV FLPL 36 NPD-EMDVVVEKRFLPL 51 (Brevinin-1 precursor/ <i>Amolops wuyiensis</i>)	59
34,42	PEEDLDTPLS ¹⁰ GTSGTPSMCS ²⁰ FPL	64	2396,03	-3,6	1 PEEDLD -- TPLSGTSGTPSMCSF 21 P+EDLD TP S S T S SF 985 PQEDLDATTPVSISSTVSVSF 1007 (Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 4/ <i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>)	57	2 EEDL ----- DTPLSG--TSGT 15 EE+L DTPLSG T GT 465 EEELPDGWDTPLSGAFTDGT 484 (Hypothetical protein/ <i>Streptomyces aurantiacus</i>)	60
34,46	DPMTDGMSVF ¹⁰ PLLPDL	72	1762,81	2,3	8 SVFPLLP 14 SVFPLLP 7 SVFPLLP 13 (Immunoglobulin Y heavy chain constant region splice variant 3, partial/ <i>Andrias davidianus</i>)	100	4 TDGMSVFPLLPDL 16 TDGM F LLP L 98 TDGMA-FSLLPGL 109 (LysR family transcriptional regulator/ <i>Pantoea agglomerans</i> Eh318)	69
35,61	PCCSALGNFP ¹⁰ LLP	64	1330,64	-0,1	8 NFPLLP 13 NFPLLP 925 NFPLLP 930 (Uncharacterized protein LOC101731638/ <i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>)	100	5 ALGNFPLLP 13 ALG FPLLP 153 ALGVFPLLP 161 (Transcriptional regulator/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1)	89
37,01	QTDREVEQSEL ¹⁰ KTRTLPF	65	2047,06	-4,2	1 QTDREVEQS 8 QTDREV+QS 126 QTDREVDQS 133 (Ctnn protein/ <i>Xenopus laevis</i>)	88	6 EQSELKTRTLPF 17 EQS+L RTL F 83 EQSDLRNRTLGF 94 (ABC transporter/ <i>Desulfovibrio oxyclinae</i>)	67

39,31	PEEDLMMDEV ¹⁰ FLPLNPDEP ²⁰ NDPDP	64	2897,22	1,8	2 EEDLM-MDEVF-LPLN-----PDDE 19 EEDL MD+V L LN PDDE 687 EEDLIKMDDVLDLTLNFKKNVRAWGSPDDE 716 (Protein CLEC16A isoform X4/ <i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>)	47	1 PEEDLMMDEVFLPLNPD 17 PE DLM D VFL L+ D 180 PEIDLKDSVFLILDQD 196 (Efflux ABC transporter, permease protein/ <i>Clostridium hylemonae</i> DSM 15053)	65
-------	--	----	---------	-----	--	----	---	----

¹TR: Tempo de retenção; ²ALC: *Average Local Confidence*; ³MM: Massa molecular experimental; ⁴ppm: Erro do precursor da massa em partes por milhão; ⁵ID: identidade.

Em estudos proteômicos de anfíbios, a maioria das sequências parciais de proteínas apresentam funções associadas a atividades fisiológicas, além de participarem da organização extracelular da pele e/ou muco (GENG et al., 2015). Já os peptídeos, estes geralmente estão associados com alguma atividade antimicrobiana (CONLON, et al., 2007a; CONLON, et al., 2007b; CONLON et al., 2015; HU et al., 2014; KING et al., 2013; RATES et al., 2011; THOMPSON et al., 2007; WU et al., 2011).

As sequências primárias obtidas para as secreções das glândulas parotóides foram comparadas com as sequências depositadas nos bancos de dados de anfíbios, e apresentaram identidade sequencial com proteínas e peptídeos relacionados a processos fisiológicos do próprio animal. Quando as sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas nos bancos de dados de antimicrobianos, foi possível identificar que uma das sequências compartilha uma identidade sequencial de 66,7% com o peptídeo antimicrobiano conhecido como ponericin-G2 (ponericina-G2), encontrado em artrópodes como, por exemplo, em formigas (ORIVEL et al., 2001). O alinhamento (Fig. 22) da ponericin-G2 com a sequência do peptídeo obtida pela análise das secreções das glândulas parotóides foi realizado no programa *MultAlin* (<http://MultAlin.toulouse.inra.fr/MultAlin/>) (CORPET, 1988). A porcentagem de identidade sequencial foi calculada pelo programa *ClustalW* (LARKIN et al., 2007) e a figura criada no programa *ESPrpt* (GOUET et al., 1999).

	1	10	20	30	ID (%)																											
Peptídeo de Rs	A	K	P	C	D	W	L	K	K	G	E	W	L	K	A	K	G	L	G	P	V	K	A	A	L	K	A	A	V	E	100,0	
Ponericin-G2	.	G	W	K	D	W	L	K	K	G	K	E	W	L	K	A	K	G	P	G	I	V	K	A	A	L	Q	A	A	T	Q	66,7

Figura 22. Alinhamento realizado no *MultAlin* entre o peptídeo das secreções das glândulas parotóides identificado no programa PEAKS com o peptídeo ponericin-G2 (UniProtKB: P82415). Os aminoácidos destacados em vermelho delimitam as regiões conservadas (alto consenso) e os aminoácidos escritos em vermelho indicam os resíduos de baixo consenso. Rs: *Rhinella schneideri*; ID: identidade.

O peptídeo ponericin-G2, isolado da peçonha da formiga predatória *Pachycondyla goeldii*, é composto por 30 resíduos de aminoácidos (Fig. 22) e apresenta propriedades antimicrobianas, inseticida e hemolítica. Possui atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e negativas e demonstrou atividade inseticida contra larvas de baratas (ORIVEL et al., 2001).

Quinton e colaboradores (2007). A diferença da relação massa/carga (m/z) entre os espectros adquiridos para as mesmas amostras não tratadas (não reduzidas/alquiladas) e tratadas (reduzidas/alquiladas) deveria ser de 57 Da a mais na massa do peptídeo analisado.

Entretanto, não foi possível identificar a presença de pontes dissulfeto nas amostras analisadas. Esse resultado não descarta a possibilidade de serem encontrados peptídeos com pontes dissulfeto, mas não permite afirmar que existam apenas peptídeos lineares nas frações analisadas.

8.1.3. Análise das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas e parotídeas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF

A caracterização de venenos e peçonhas por *peptide mass fingerprinting* constitui a abordagem básica na exploração dessas complexas misturas de compostos bioativos. Esta caracterização envolve a análise de amostras não fracionadas de venenos, ou a análise de frações individuais resultantes de um processo prévio de separação, usualmente por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. O conjunto de dados gerado por *peptide mass fingerprinting* de amostras brutas ou fracionadas, resulta em uma visão geral do veneno, que permite avaliar a complexidade dos compostos presentes (revelada pelo número total de íons no espectro), além de deduzir a natureza dos componentes moleculares (devido à massa molecular que apresentam) (ESCOUBAS; QUINTON; NICHOLSON, 2008).

Diante disso, as frações obtidas da eluição dos 25 mg das secreções das glândulas mucosas e a parotídeas foram inicialmente analisadas, por espectrometria de massas MALDI-TOF. Para análise das frações, os seguintes procedimentos foram realizados:

1º MALDI-TOF com matriz HCCA (ácido α -ciano- 4-hidroxicinâmico) e obtenção de espectros no modo refletido, para avaliar os peptídeos na faixa de 500 a 4.000 Da;

2º MALDI-TOF com matriz DHB (ácido 2,5-dihidróxido benzoico) e obtenção de espectros no modo linear, para avaliar as proteínas na faixa de 3.000 a 10.000 Da.

Por ser considerada uma técnica de ionização “branda”, o MALDI nos permite a observação de espécies iônicas moleculares com pouca ou nenhuma fragmentação (ESPECTROMETRIA DE MASSAS, PRINCÍPIOS E APLICAÇÕES, 2013). Assim, a utilização de um analisador de massas tipo TOF acoplado com a técnica de MALDI possibilita ionizar macromoléculas sem instigar fragmentação. Desse modo, inúmeros compostos ionizados não fragmentados de diferentes massas são observados nos espectros do modo refletido com matriz HCCA.

Todos os espectros de massas das frações das secreções das glândulas mucosas e paratoides obtidos por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF em ambos os modos e matrizes encontram-se no apêndice.

As massas moleculares obtidas pelos espectros de massas foram comparadas com as massas das sequências obtidas pela análise por nanoACQUITY UPLC acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Orbitrap (Waters, Reino Unido) e analisadas pelo programa PEAKS. As massas moleculares obtidas por estas duas análises para as frações das secreções das glândulas mucosas estão correlacionadas na tabela 16.

A espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF é uma das principais técnicas analíticas utilizada nos estudos de amostras biológicas (ALBRETHSEN, 2011) como, por exemplo, peçonhas e venenos. O perfil da intensidade do pico obtido pelo MALDI está correlacionado com a quantidade de proteína (ALBRETHSEN, 2007; 2011). No entanto, o perfil do MALDI requer uma crítica interpretação devido à variação da eficiência de ionização dos diferentes peptídeos e proteínas, além de diversos outros fatores os quais dificultam a interpretação dos espectros de massas (ALBRETHSEN, 2011).

Neste estudo, as análises por MALDI-TOF permitiram a identificação das massas moleculares dos compostos presentes nas secreções das glândulas mucosas, as quais foram comparadas com as massas moleculares das sequências de aminoácidos obtidas pelo programa PEAKS para essas mesmas secreções. Os valores próximos para as massas moleculares identificadas indicam a possibilidade de os mesmos compostos terem sido identificados em ambas as análises. No entanto, é importante ressaltar que as massas moleculares identificadas pela análise utilizando o Q-Exactive Orbitrap são muito mais precisas do que aquelas obtidas pela análise no MALDI (MICHALSKI et al., 2011).

Nas análises realizadas pelo MALDI, a preparação da amostra pode ser crucial, pois o número de íons varia tanto com o tipo de matriz, quanto com a presença de impurezas. Os íons são pouco fragmentados, mas a formação de adutos de íons entre a matriz e a amostra analisada pode levar a uma má interpretação da massa molecular (HERBERT; JOHNSTONE, 2002).

Tabela 16: Espécies iônicas moleculares detectadas nas frações das secreções das glândulas mucosas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF (modo linear com matriz DHB e modo refletido com matriz HCCA) e as espécies iônicas moleculares encontradas pelo Q-Exactive.

EIM-M ¹ MR (DA)	EIM-QE ² MR (DA)	SEQUÊNCIAS (PROGRAMA PEAKS)	ALC* (%)
589,4	588,2	CTPLGV	72
879,1	879,4	PSWPSLGH	69
882,9	882,4	VPAVGCPGSP ¹⁰	65
1075,8	1074,5	PSCCVFPLLP ¹⁰	80
1159,8	1159,6	EGPDL SGLGK ¹⁰ TS	76
1316,4	1316,6	ELGDDCVFPL ¹⁰ LP	64
1395,9	1395,6	SCPCS LFDLV ¹⁰ KGQ	69
1551,1	1551,7	MEEADGMSVF ¹⁰ PLVK	74
1586,9	1585,8	EAPETSVVTT ¹⁰ TGPAVE	74
1609,1	1608,9	ETVGKNLLKT ¹⁰ YSSGL	65
1879,4	1879,9	PDETYLLTGS ¹⁰ LCMGGVPK	64
1895,6	1895,9	DPADLKWKTS ¹⁰ ADLPGE PG	76
2065,8	2066,9	LPMCAAPMGD ¹⁰ CVEEVFGKR	63
2375,0	2375,1	PTGAMGNAPC ¹⁰ CSVFPPYVKD ²⁰ LGH	75
2377,9	2378,2	KPTGCHLSNL ¹⁰ KTSWLGPEGP ²⁰ KE	71
2379,8	2379,1	PEEDLDTPTG ¹⁰ PCPYVCPCSF ²⁰ PL	80
2380,2	2380,2	HADLSNLVFM ¹⁰ KQPGEPGLSG ²⁰ HF	65
2510,2	2509,2	EEDPLSGGLK ¹⁰ TSWLPGE PGL ²⁰ SGHF	92
2605,8	2605,3	DPALGPSNVL ¹⁰ SGGLMLELLG ²⁰ PEGPGTV	71
2776,4	2776,4	PDAPAPSKSS ¹⁰ LNKTS GGKGP ²⁰ GEPGLSGHF	74
4121,3	4120,7	RSPYGPVPVLM ¹⁰ MDDDAEQSEV ²⁰ QTEGDSDEPC ³⁰ GVPNDEN	67
4504,4	4503,9	SFDYDPNAYD ¹⁰ SDGETQVESQ ²⁰ EADDRPYKPD ³⁰ VLTVPSHTFA ⁴⁰	68
4675,8	4676,2	YGYFLLPVLE ¹⁰ DDSAGDSSEE ²⁰ PEDLTPGSMG ³⁰ NAAQPVQFPL ⁴⁰ VHW	69

¹ Espécie Iônica Molecular Detectada pelo MALDI - Massa Relativa (Dalton)

² Espécie Iônica Molecular Detectada pelo Q-Exactive Orbitrap - Massa Relativa (Dalton)

*ALC: Average Local Confidence

O uso da espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF aplicada às análises de amostras complexas tem se destacado como uma poderosa ferramenta com diversas aplicações na proteômica de venenos/peçonhas animais e vegetais, além de relevantes aplicações nas áreas médicas (BIASS et al., 2009; EIGNER et al., 2009; ESCOUBAS et al., 2008; ILINA et al., 2009; LOPES et al., 2014).

Na Toxinologia, as espectrometrias de massas do tipo MALDI e por ESI têm auxiliado nos estudos de modificações pós-traducionais, como amidação da região C-terminal, adição do ácido piroglutâmico na região N-terminal, hidroxilação de prolina, gamacarboxilação do ácido glutâmico, bromação do aminoácido triptofano, glicosilações, entre outras. Além disso, a busca por marcadores moleculares de várias espécies por técnicas de espectrometria de massas tem contribuído em muitos estudos taxonômicos e filogenéticos em diversas áreas, principalmente na microbiologia (ESCOUBAS et al., 2008).

Na tabela a seguir (Tab. 17) encontram-se as espécies iônicas moleculares detectadas pela espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF para as frações das secreções das glândulas paratoides comparadas com as espécies iônicas moleculares detectadas pela análise por nanoACQUITY UPLC acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Orbitrap.

Tabela 17: Espécies iônicas moleculares detectadas nas frações das secreções das glândulas parotoides por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF (modo linear com matriz DHB e modo refletido com matriz HCCA) e as espécies iônicas moleculares encontradas pelo Q-Exactive.

EIM-M ¹ MR (DA)	EIM-QE ² MR (DA)	SEQUÊNCIAS (PROGRAMA PEAKS)	ALC* (%)
624,6	624,3	KSPFF	67
671,5	670,4	LPALCR	62
700,4	700,4	VTMVRP	63
712,5	712,4	WVPGVR	62
721,9	713,4	KTTAPPT	66
728,4	728,4	KSHVYP	65
730,4	730,4	LPSRMK	94
731,4	731,4	SPLTTKS	70
776,2	776,5	KKPHRL	60
847,3	846,4	LPDWLFG	88
852,9	853,6	KKPLSALV	63
879,1	880,5	KVMPFL	61
996,6	996,4	FPGFDDWN	60
1355,7	1354,6	FAPGFDDCRK ¹⁰ VT	66
1356,6	1357,7	TMGKCLHDVL ¹⁰ LE	61
1566,9	1566,7	DAFLGSFLYE ¹⁰ YSR	74
1750,9	1751,8	MPGCTEDYLD ¹⁰ LLNR	76
1890,9	1890,8	MLCLDPEGQQ ¹⁰ ENTLPFG	66
1906,0	1906,9	LFTFHADLGC ¹⁰ TLPDTEK	94
2094,2	2095,0	LDFPDFEADT ¹⁰ TSGKLRFH	84
2466,5	2466,2	LVGMTHAQCC ¹⁰ GLLLRPFDEH ²⁰ VK	68

¹ Espécie Iônica Molecular Detectada pelo MALDI - Massa Relativa (Dalton)

² Espécie Iônica Molecular Detectada pelo Q-Exactive Orbitrap - Massa Relativa (Dalton)

*ALC: Average Local Confidence

Diferente do observado para as frações das secreções das glândulas mucosas, poucas massas moleculares acima de 1 kDa são observadas quando comparamos as análises por espectrometria de massas do tipo MALDI e pelo Q-Exactive Orbitrap (Tab. 17). As frações das secreções das glândulas parotoides limitam-se aos compostos de baixa massa molecular,

geralmente não proteicos como, por exemplo, os bufodienolídeos (DALY et al., 1987; ERSPAMER, 1971; LAI et al., 2003; MONTI; CARDELLO, 1994)

A espectrometria de massas do tipo MALDI tem sido empregada nas análises de metabólitos secundários de extratos, tecidos e plantas (LI et al., 2008; MOCO et al., 2009). Em sapos, as principais técnicas analíticas aplicadas na análise dos compostos não proteicos são a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e métodos espectroscópicos combinados com análise de difração em raio X (MEBS et al., 2005; 2007; HU et al., 2011; TIAN et al., 2010).

Sabe-se que, além dos compostos proteicos presentes nas secreções das glândulas paratoides, há inúmeros outros compostos de natureza não proteica como alcaloides, esteroides, aminas biogênicas entre outros compostos (DALY et al., 1987; ERSPAMER, 1971; LAI et al., 2003; MONTI; CARDELLO, 1994), os quais já foram identificados por espectrometria de massas em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa (LTA – Laboratório de Toxinas Animais – FCFRP-USP) (BALDO et al., 2012).

8.1.4. SDS-Tricina-PAGE

Na figura 24 observa-se uma banda proteica de aproximadamente 6,5 kDa presente na fração 8 das secreções das glândulas mucosas, a qual foi posteriormente fracionada em cromatografia de fase reversa em coluna semipreparativa C18, na tentativa do isolamento desse componente majoritário.

Figura 24. Perfil eletroforético em SDS-Tricina-PAGE (16,5%). Gel de 0,6 x 8,0 cm x 0,7 mm, contendo gel de concentração a 5% e gel de resolução a 16,5% em acrilamida. Corrida de 5h a 85V e 10 mA a 10 V. PMM (Padrão de Massa Molecular) da BioRad. Foram aplicados 10 μ L da fração 8 (0,2 mg/mL) das secreções das glândulas mucosas. Gel corado pelo método de coloração com prata *PlusOne Silver Staining Kit* (GE Healthcare, Suécia).

Observa-se que o componente majoritário da fração 8 das secreções das glândulas mucosas apresenta massa molecular de aproximadamente 6,5 kDa. Peptídeos antimicrobianos geralmente são constituídos por número reduzido de resíduos de aminoácidos (10 a 40 resíduos), sendo assim, é pouco provável que sequências primárias com mais de 60 resíduos apresentem potencial antimicrobiano. No entanto, Barberio, Delfino e Mastronei (1987), isolaram uma proteína de *Bombina variegata* com aproximadamente 6,7 kDa a qual demonstrou atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Klebsiella pneumoniae* e *S. aureus*.

Entre os compostos com cerca de 6 kDa encontrados em sapos, além da possibilidade de serem detectados peptídeos antimicrobianos, já foram identificados peptídeos inibidores de proteases (MIGNOGNA et al., 1996; LAI, LIU, et al., 2002; CHEN e SHAW, 2003).

8.1.5. Cromatografia de fase reversa da fração 8 das secreções das glândulas mucosas em coluna semipreparativa C18

O perfil cromatográfico da fração 8, obtida da filtração molecular da secreção das glândulas mucosas e recromatografada em coluna de fase reversa semipreparativa C18 está apresentado na figura 25.

Figura 25: Perfil cromatográfico da fração 8 das secreções das glândulas mucosas em coluna semipreparativa C18 (fase reversa). O fracionamento foi realizado em sistema FPLC Äkta UPC-10 com coluna C18 (5 μ m, 300 Å, 250 mm x 10 mm), equilibrada com a solução A (TFA 0,1%), sob vazão de 5 mL/min e temperatura de 25°C. A amostra (137 mg da fração 8 dispersos em 5 mL de TFA 0,1%) foi inicialmente eluída com solução A, seguindo-se um gradiente de concentração de acetonitrila, chegando a 100% da fase móvel B (TFA 0,1% e ACN 80%), representado pela linha verde. Volume coletado por tubo: 1,5 mL.

A tabela 18 apresenta a recuperação das frações obtidas do fracionamento da fração 8 das secreções das glândulas mucosas em cromatografia de fase reversa em coluna semipreparativa C18.

Tabela 18. Recuperação das frações eluídas da fração 8 das secreções das glândulas mucosas em coluna de fase reversa semipreparativa C18.

FRAÇÕES	RECUPERAÇÃO (%)*
Pep1	30,4
Pep2	12,1
Pep3	11,3
Pep4	7,6
Pep5	5,5
Pep6	28,0
Pep7	5,1
Recuperação* Total	100

*Recuperação calculada pelo software Unicorn 5.2 (GE Healthcare, Suécia) através da relação entre a área do pico correspondente e a somatória das áreas de todos os picos eluídos.

Eluíram 7 frações (Fig. 25), as quais foram separadas, congeladas, liofilizadas e tiveram seu N-terminal sequenciado por degradação de Edman. Adicionalmente, o pico Pep7 foi analisado por espectrometria de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier com ionização por electrospray SolariX XR (Bruker Daltonics, Alemanha).

8.1.6. Espectrometria de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier com ionização por electrospray (ESI)

Nesta análise foi possível confirmar, com precisão, a massa do composto buscado no fracionamento da fração 8 (secreções das glândulas mucosas) por cromatografia de fase reversa em coluna semipreparativa C18 (250 mm x 10 mm, com partículas 5 µm e poro de 300 Å, Jupiter®, Phenomenex, EUA). Este composto, denominado de Pep7, é o principal

composto proteico observado em gel de SDS-Tricina-PAGE para proteínas de ultrabaixa massa molecular (Fig. 24).

Na SDS-Tricina-PAGE da fração 8 das secreções das glândulas mucosas (Fig. 24), foi observada uma intensa e majoritária banda proteica. Esta banda encontra-se logo após a banda proteica do marcador de massa molécula de 6,5 kDa, indicando uma massa molecular próxima de 6 kDa.

O composto Pep7 foi analisado por espectrometria de massas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time-of-flight*) (Fig. 26) e por espectrometria de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier com ionização por electrospray (ESI) Solarix XR (Bruker Daltonics, Alemanha) (Fig. 27). Essa última análise permitiu determinar, com exatidão, a massa molecular real do composto denominado Pep7 eluído da fração 8 das secreções das glândulas mucosas.

Figura 26. Espectro de massas do Pep7 obtido por MALDI-TOF no modo linear positivo utilizando matriz DHB. No espectro de massas da fração 8 é possível observar uma massa de 6,034 kDa [M + H].

Figura 27. Espectro de massas do Pep7 obtido por espectrometria de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier com ionização por electrospray (ESI) SolariX XR (Bruker Daltonics, Alemanha). Na figura estão destacadas a massa monoisotópica do composto e a fórmula utilizada para a determinação da massa (M_v : Massa; m/z : razão massa/carga do composto; z : carga do composto).

A massa do composto Pep7 determinada obtido por espectrometria de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier com ionização por electrospray (ESI) SolariX XR (Bruker Daltonics, Alemanha) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$M_v = [(m/z) * z] - [z * (1,007280)]$$

Razão massa/carga é a unidade adimensional formada pela divisão da massa de um íon pelo seu número de carga (VESSECCHI et al., 2011). Conhecendo os valores da razão massa/carga (m/z 1504,2) e do número de cargas do ($z = 4$) do composto Pep7 (Fig. 27), foi possível determinarmos a massa de 6,012 kDa para o composto Pep7. Já pelo MALDI-TOF, determinou-se a massa média de 6,034 kDa $[M+H]$.

A espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF determina a massa molecular média do composto, enquanto a espectrometria de ressonância ciclotrônica de íons SolariX

XR (Bruker Daltonics, Alemanha) determina a massa exata. Apesar de ambos os resultados serem confiáveis, a espectrometria de ressonância ciclotrônica de íons apresentou maior resolução, sendo a escolhida para a determinação proposta.

A massa molecular para o composto Pep7 (6,012 kDa) corrobora o valor estimado para a banda proteica majoritária observada na fração 8 (Fig. 24), a qual apresentou migração semelhante à do padrão de massa molecular de 6,5 kDa.

8.1.7. Peptide Mass Fingerprinting (PMF)

Após o peptídeo Pep7 ser digerido com tripsina, este foi injetado no espectrômetro de massas Synapt G2 (Waters, Reino Unido) acoplado a um sistema de cromatografia líquida (nano UPLC, Waters, Reino Unido) com ionização por electrospray. A identificação dos fragmentos do Pep7 foi realizada através da varredura das massas monoisotópicas adquiridas nos programas MASCOT (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) e ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/aldente/>).

Dessa análise, seis íons precursores foram identificados (íon 489, 490, 569, 783, 854 e 1200). Contudo, nenhuma sequência de aminoácidos foi obtida a partir da fragmentação desses íons. Provavelmente a determinação da sequência primária desse composto ficou comprometida pelo fato de haver pouca informação sobre peptídeos/proteínas das secreções das glândulas de *Rhinella schneideri* nos bancos de dados.

As secreções de anfíbios têm sido amplamente exploradas como potenciais fontes de componentes com atividades antimicrobianas (GOMES et al., 2007). Entre os diversos peptídeos encontrados em anfíbios, um peptídeo termoestável de 6,7 kDa isolado de *Bombina variegata pachypus* apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e negativas (BARBERIO; DELFINO; MASTROMEI, 1987; GOMES et al., 2007).

8.1.8. Sequenciamento amino-terminal

O sequenciamento amino-terminal dos peptídeos eluídos da fração 8 das secreções das glândulas mucosas estão apresentados na tabela 19. Todas as sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados de peptídeos antimicrobianos (ADP - *The Antimicrobial peptides Database*, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) (WANG; WANG, 2004; WANG et al., 2009) e os parâmetros físicos e químicos foram calculados no ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) (GASTEIGER et al., 2005).

Tabela 19. Sequenciamento e parâmetros físicos e químicos dos peptídeos eluídos da fração 8 das secreções das glândulas mucosas em coluna de fase reversa semipreparativa C18.

Peptídeo	Sequência de a.a.	R.H.* (%)	M.M.T.** da sequência obtida	pI da sequência obtida
Pep7	WPVVAPGW ¹⁰ PV ¹⁰ VTIVDCCF ^{TY20} ...	60	2.252,6 Da	3,80
Pep6	WPCGGGGGG ¹⁰ CGGGCGGCC ²⁰ GC...	36	1.764,9 Da	5,48
Pep4	GVPYYPGCT...	22	956,0 Da	5,52

*R.H. (%): porcentagem de resíduos hidrofóbicos.

**M.M.T.: massa molecular teórica.

Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos estão destacados em vermelho. Os resíduos de glicina e prolina estão destacados em azul.

Entre as características essenciais para um peptídeo apresentar atividade antimicrobiana está o caráter hidrofóbico, que deve ser entre 30 e 70% (NIELSEN et al., 2007). Na tabela 19 estão destacados a porcentagem de resíduos hidrofóbicos dos peptídeos sequenciados. Observa-se também que esses peptídeos apresentam pI ácido, ou seja, esses peptídeos apresentam-se carregados positivamente em valores de pH abaixo de seus pIs. Adicionalmente, esses peptídeos são ricos em glicina e prolina (destacados em azul), os quais auxiliam na interação com as membranas de microrganismos (SIMMACO et al., 1998; LEE et al., 2015).

O Pep7 possui 20 resíduos de aminoácidos e apresentou identidade com outros peptídeos da família brevinin-1 (Fig. 28), como apresentado no alinhamento realizado pelo programa *MultAlin* (<http://MultAlin.toulouse.inra.fr/MultAlin/>) (CORPET, 1988). Sua identidade foi calculada pelo programa *ClustalW* (LARKIN et al., 2007) e a figura criada no programa *ESPrpt* (GOUET et al., 1999).

	1	10	ID (%)
Pep7	...P	VVA PGWP VVTI VDCCF TY..	100
Brevinin-1JDC	FLP	AVLR VAAKVVP TVFCLISKKC	20
Brevinin-1SY	FLP	VVAGLAAKVLPS IICAVTKKC	15
Brevinin-1PRb	FLP	VLAGLTPSIVPKLVCLLTKKC	15
Brevinin-1CPa	FLP	LV.R VAAKLIPSVVCAISKRC	20
Brevinin-1TP3	FLP	GLIK VAVGVGST ILLCKITKKC	15

Figura 28. Alinhamento realizado no *MultAlin* entre o Pep7 e outros peptídeos antimicrobianos pertencentes à família brevinin-1. Os aminoácidos destacados em vermelho delimitam as regiões conservadas (alto consenso) e os aminoácidos escritos em preto indicam os resíduos sem consenso. Pep7: peptídeo 7; ID: identidade.

Os peptídeos brevinins apresentam amplo espectro antimicrobiano contra bactérias gram-positivas e negativas e cepas de fungos patogênicos. Os peptídeos que compõem esta superfamília compartilham algumas características como, por exemplo, são lineares, anfipáticos e catiônicos. Além disso, a maioria desses peptídeos possui a região do C-terminal amidada. A família brevinin-1 tem quatro resíduos de aminoácidos invariáveis que são: Ala⁹, Cys¹⁸, Lys²³ e Cys²⁴, enquanto que na família brevinin-2 os quatro resíduos de aminoácidos conservados são: Lys⁷, Cys²⁷, Lys²⁸ e Cys³³. Com exceção desses resíduos de aminoácidos conservados, ambas as famílias apresentam estrutura primária pouco conservada (MATTUTE et al., 2000; CONLON et al., 2005; CONLON et al., 2009; CONLON et al., 2011; LIU et al., 2012; GUO et al., 2014).

Ambas as famílias de brevinins apresentam três mecanismos básicos de atividade antimicrobiana: 1º): modelo “tábua de barril” (*barrel-stave*) com formação de um poro, em que os resíduos de aminoácidos polares encontram-se no lado interno do canal (poro), enquanto que os resíduos hidrofóbicos estão em contato com os fosfolipídios da membrana do microrganismo; 2º): modelo “tapete” (*carpet-like*), resultado do acúmulo maciço de peptídeos na membrana do microrganismo, ocasionando uma perturbação da integridade da membrana; 3º): modelo “dois estados” ou “poro toroidal” (*two states - toroidal*), aceito como uma variante do modelo “tapete”, porém com resultado final do modelo “tábua de barril”. Inicia-se com um maciço acúmulo dos peptídeos na superfície da membrana, gerando uma tensão mecânica. Para reduzir esta tensão, os peptídeos adotam uma orientação transmembrana, o que leva a formação de um poro misto entre peptídeos e os fosfolipídios da membrana. Consequentemente, este poro perde sua integridade da membrana, levando-a uma desestabilização que resulta na perda da sua integridade (CHAN et al., 2006; COLON et al., 2005; SHAI et al., 1999).

Os peptídeos isolados das secreções de pele de *Bombina orientalis*, conhecidos como bombinin-like, contêm 27 resíduos de aminoácidos e apresentam forte atividade antimicrobiana (GIBSON et al., 1991; LAI et al., 2002b). Entre as rãs do gênero *Rana*, foram isolados inúmeros peptídeos conhecidos, entre os quais brevinins, esculentins, ranalexins, gaegurins, rugosins, temporins, ranatuerins, tigerinins, nigrocins, japonicins, palustrin e ranacyclins. Todos esses peptídeos apresentam amplo espectro antimicrobiano contra bactérias, fungos e leveduras (ALI et al., 2002; CONLON et al., 2006; KIM et al., 2001; MANGONI et al., 2003; MORIKAWA et al., 1992; PARK et al., 2001; SAI et al., 2001; SIMMACO et al., 1996; XU et al., 2006).

		1		10			20		ID (%)
Pep6	.	. .	. W P C	G G G G G G C C G G	.	.	G C G G C C C G C	.	100
Shepherin	.	G Y	G G H G G H G G H G G H	G G H G G H	.	H G G H	G H G G G G H G	.	45,4
Microcin	V	G I	G G G	G G G G G S C G G	O G G	.	G C G G C S N G C	S G G N G G S G G S G S H	72,7

O peptídeo Pep6 apresentou identidade com os peptídeos antimicrobianos shepherin e microcin. Shepherin-1 e 2 são peptídeos antimicrobianos com cadeia polipeptídica simples, compostos de 28 e 38 resíduos de aminoácidos, respectivamente. Os shepherins foram isolados das raízes de *Capsella bursa-pastoris* (planta conhecida como Bolsa de Pastor), são ricos em glicina (67,9%) e histidinas (28,6%), apresentam a repetição, em sequência, de seis *motifs* de glicina-glicina-histidina (Gly-Gly-Hys) e ausência de cisteínas. São ativos contra bactérias gram-negativas e leveduras (PARK et al., 2000; DE SOUZA CANDIDO et al., 2014; REMUZGO et al., 2014; SALAS et al., 2015).

O peptídeo Pep6 compartilhou a maior identidade sequencial (72,7%) com o peptídeo microcin (ou microcina). Microcins são peptídeos antimicrobianos encontrados em bactérias gram-negativas, cujas estruturas e síntese são similares às de muitas outras bacteriocinas de diversas fontes. São peptídeos lineares e podem agir na membrana citoplasmática assim como inibir funções intracelulares de DNA girase, RNA polimerase ou translação do RNA mensageiro. Estes peptídeos são, geralmente, hidrofóbicos, altamente estáveis em relação à temperatura e valores extremos de pHs, assim como a proteases. Apresentam uma grande diversidade de modificações pós-traducionais, o que sugere uma grande variedade de mecanismos de ação. Como mecanismo de ação geral, estes peptídeos levam à formação de um poro na membrana (SALOMON; FARIAS, 1992; JACK; JUNG, 2000; SEVERINOV; NAIR, 2012).

A figura 30 apresenta o alinhamento entre o peptídeo Pep4 e os peptídeos com os quais compartilhou identidade sequencial. O alinhamento foi realizado no programa *MultAlin* (<http://MultAlin.toulouse.inra.fr/MultAlin/>) (CORPET, 1988). Sua identidade foi calculada pelo programa *ClustalW* (LARKIN et al., 2007) e a figura criada no programa *ESPrpt* (GOUET et al., 1999).

	1	ID (%)
Pep4	 G V P Y Y P G C T	100
Tigerinin-2	R V C F A I P L . P I C H	22,2
Tigerinin-3	R V C Y A I P L . P I C Y	22,2
Tigerinin-4	R V C Y A I P L . P I C .	22,2

Figura 30. Alinhamento realizado no *MultAlin* entre o Pep4 e outros peptídeos antimicrobianos pertencentes à família tigerinin. Os aminoácidos destacados em vermelho delimitam as regiões conservadas (alto consenso) e os aminoácidos escritos em preto indicam os resíduos sem consenso. Pep4: peptídeo 4; ID: identidade.

O sequenciamento do peptídeo Pep4 identificou uma pequena sequência de 9 resíduos de aminoácidos. Esta sequência apresentou identidade sequencial com peptídeos antimicrobianos conhecidos como tigerinin. Esses peptídeos são constituídos por 11 a 12 resíduos de aminoácidos, com predomínio de peptídeos hidrofóbicos; apresentam uma simples ponte dissulfeto, região C-terminal amidada e não apresentam alfa hélice. Como principal mecanismo de ação, estes peptídeos exercem ação antimicrobiana por permeabilização da membrana do microrganismo. Além disso, podem agir na inibição da biossíntese do DNA, RNA e/ou outras proteínas (SAI et al., 2001; SITARAM et al., 2002; OJO et al., 2011).

Outros peptídeos, como as magainins (6 a 23 resíduos de aminoácidos), isolados das secreções de pele do sapo africano *Xenopus laevis*, exibem um amplo espectro antimicrobiano contra bactérias gram-negativas e positivas e leveduras, assim como as dermaseptins (peptídeos com 28 a 34 resíduos de aminoácidos), encontradas nas secreções da pele de gêneros de rãs *Phyllomedusa* (LEITE et al., 2005; SIMMACO et al., 1991).

No gênero de rãs *Litoria*, foram identificados os peptídeos conhecidos como frenatins, caerins, maculatins e citropins (APPONYI et al., 2004; RAFTERY et al., 1996; ROZEK et al., 1998; STEINBORNER et al., 1998; WABNITZ et al., 1999). Entre o gênero *Leptodactylus*, foram descritos os peptídeos fallaxin e pentadactylin (DOURADO et al., 2007; KING et al., 2005). Outros potentes antimicrobianos como a kassinatuerin (*Kassina*

senegalensis) e pseudins (*Pseudis paradoxa*) exibem amplo espectro entre os mais variados organismos (MATTUTE et al., 2000; OLSON et al., 2001).

Embora inúmeros peptídeos ou compostos antimicrobianos isolados de venenos e peçonhas de animais sirvam como modelos para o desenho e síntese de novos fármacos ou como ferramentas terapêuticas, até a presente data ainda não há fármacos antimicrobianos baseados em estudos toxicológicos disponíveis no estágio clínico (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2015).

9. CONCLUSÕES

As secreções das glândulas mucosas e parotoides e o material da água de diálise das glândulas parotoides foram capazes de inibir o crescimento de microrganismos (bactérias, fungos e leveduras), indicando a presença de moléculas com grande potencial antimicrobiano. Os componentes ativos que demonstraram os melhores resultados nos testes realizados foram obtidos do material da água de diálise das secreções das glândulas parotoides.

Este estudo foi o primeiro a demonstrar a inibição do crescimento de fungos filamentosos dermatófitos por componentes presentes nas secreções das glândulas parotoides de *Rhinella schneideri*.

A análise proteômica possibilitou a dedução de sequências de peptídeos que apresentaram identidade com PAMs descritos na literatura, demonstrando, pela primeira vez, a presença de prováveis PAMs nas secreções de *Rhinella schneideri*.

Este foi o primeiro estudo proteômico comparativo entre as secreções de ambas as glândulas desta espécie de sapo.

Estas secreções ainda são pouco exploradas, mas se mostraram uma rica fonte de novas moléculas com atividade antimicrobiana.

10. REFERÊNCIAS¹

- ABDEL-RAHMAN, M. A.; QUINTERO-HERNANDEZ, V.; POSSANI, L.D. Venom proteomic and venomous glands transcriptomic analysis of the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* (Arachnida: Scorpionidae). **Toxicon**, Oxford, v. 74, p.193-207, 2013.
- AGGARWAL, N.; GOINDI, S. Preparation and evaluation of antifungal efficacy of griseofulvin loaded deformable membrane vesicles in optimized guinea pig model of *Microsporum canis* - Dermatophytosis. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 437, n.1-2, p. 277-287, 2012.
- AILI, S. R. et al. Diversity of peptide toxins from stinging ant venoms. **Toxicon**, Oxford, v. 92, p. 166-78, 2014.
- ALBRETHSEN, J. Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, New York, v. 53, n. 5, p. 852-8, 2007.
- ALBRETHSEN, J. The first decade of MALDI protein profiling: a lesson in translational biomarker research. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 74, n. 6, p. 765-73, 2011.
- ALI, M. F. et al. Antimicrobial peptides and protease inhibitors in the skin secretions of the crawfish frog, *Rana areolata*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1601, n. 1, p. 55-63, 2002.
- ALMEIDA, P. G. et al. Morphological re-evaluation of the parotoid glands of *Bufo ictericus* (Amphibia, Anura, Bufonidae). **Contributions to Zoology**, Leiden, v. 76, n. 3, p. 145-152, 2007.
- AMPHIBIAWEB. AmphibiaWeb Species Numbers. Disponível em: <<http://www.amphibiaweb.org/amphibian/speciesnums.html>>. Acesso em: 03 Dez. 2014.
- ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, New York, v. 47, n. 6, p. 415-33, 1998.
- APPONYI, M. A. et al. Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. **Peptides**, New York, v. 25, n. 6, p. 1035-54, 2004.
- ARAKI, Y. et al. Quantitative peptidomic analysis by a newly developed one-step direct transfer technology without depletion of major blood proteins: its potential utility for monitoring of pathophysiological status in pregnancy-induced hypertension. **Proteomics**, Weinheim, v. 11, n. 13, p. 2727-37, 2011.

¹ Normatizado de acordo com ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 10520*: informação e documentação: apresentação de citações em documentos. Rio de Janeiro, 2002.

- BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 6, n. 12, p. 1543-75, 2013.
- BALDO et al., 2012. New Perspective for Therapy Against Seizures Using Molecules From *Rhinella schneideri* toad poison. **Toxicon**, Oxford, v. 60, n. 2, p. 103-104, 2012.
- BANERJEE, S. N. et al., 1991. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. **American Journal of Medicine**, New York, vol. 91, v. 3B, p. 86-89, 1991.
- BARBERIO, C.; DELFINO, G.; MASTROMEI, G. A low molecular weight protein with antimicrobial activity in the cutaneous venom of the yellow-bellied toad (*Bombina variegata* pachypus). **Toxicon**, Oxford, v. 25, n. 8, p. 899-909, 1987.
- BARBOSA, E. B. et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 58, n. 3, p. 366-375, 2012.
- BERNOT, A. The Proteome. In:_____. **Genome, Transcriptome and Proteomics Analysis**. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2004. cap. 6, p. 147-149.
- BEVINS, C. L.; ZASLOFF, M. Peptides from frog skin. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 59, p. 395-414, 1990.
- BIASS, D. et al. Comparative proteomic study of the venom of the piscivorous cone snail *Conus consors*. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 210-8, 2009.
- BLANKENBURG et al. High-throughput omics technologies: potential tools for the investigation of influences of EMF on biological systems. **Current Genomics**, Hilversum, v. 10, n. 2, p. 86-92, 2009.
- BONHOMME, J.; d'ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 16, n. 4, p. 398-403, 2013.
- BOUCHER, H. W. et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, Chicago, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2009.
- BRADSHAW, J. Cationic antimicrobial peptides: issues for potential clinical use. **BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy**, Mairangi Bay, v. 17, n. 4, p. 233-40, 2003.

CALVETE, J. J.; JUAREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry: JMS**, Chichester, v. 42, n. 11, p. 1405-14, 2007.

CALVETE, J. J. et al. Venoms, venomomics, antivenomics. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 583, n. 11, p. 1736-43, 2009.

CARRANZA, M. G. et al. Antibacterial activity of native California medicinal plant extracts isolated from *Rhamnus californica* and *Umbellularia californica*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials [electronic resource]**, London, v. 14, n. 1, p. 29, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>>. Acesso em: 01 Dez. 2014.

CHAN, D. I.; PRENNER, E. J.; VOGEL, H. J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1758, n. 9, p. 1184-202, 2006.

CHEMSPIDER SYNTHETIC PAGES. ChemSpider SyntheticPages. Disponível em: <<http://cssp.chemspider.com/>>. Acesso em: 05 Fev. 2015.

CHEN, T.; SHAW, C. Identification and molecular cloning of novel trypsin inhibitor analogs from the dermal venom of the Oriental fire-bellied toad (*Bombina orientalis*) and the European yellow-bellied toad (*Bombina variegata*). **Peptides**, New York v. 24, n. 6, p. 873-880, 2003.

CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, London, v. 72, n. 3, p. 365-379, 1997.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. CLSI document M27-A2. Wayne, Pennsylvania: CLSI 2002.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. CLSI document M38-A2. Wayne, Pennsylvania: CLSI 2008.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal disk Diffusion Susceptibility Testing for Yeasts. Approved Guideline. CLSI document M44-A2. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2009.

- COLOGNA, C. T. et al. Peptidomic comparison and characterization of the major components of the venom of the giant ant *Dinoponera quadriceps* collected in four different areas of Brazil. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 94, p. 413-22, 2013.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Brasília, vol. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.
- CONLON, J. M. et al. Peptides with antimicrobial activity of the brevinin-1 family isolated from skin secretions of the southern leopard frog, *Rana sphenoccephala*. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, New York, v. 54, n. 6, p. 522-527, 1999.
- CONLON, J. M. et al. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin secretions of the carpenter frog *Rana virgatipes* (Ranidae, Aquarana). **Regulatory Peptides**, Amsterdam, v. 131, n. 1-3, p. 38-45, 2005.
- CONLON, J. M. et al. Antimicrobial peptides from diverse families isolated from the skin of the Asian frog, *Rana grahami*. **Peptides**, New York, v. 27, n. 9, p. 2111-7, 2006.
- CONLON, J. M. et al. Peptidomic analysis of skin secretions supports separate species status for the tailed frogs, *Ascaphus truei* and *Ascaphus montanus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & Proteomics**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 121-5, 2007a.
- CONLON, J. M. et al. Peptidomic analysis of skin secretions from *Rana heckscheri* and *Rana okaloosae* provides insight into phylogenetic relationships among frogs of the Aquarana species group. **Regulatory Peptides**, Amsterdam, v. 138, n. 2-3, p. 87-93, 2007b.
- CONLON, J. M.; KOŁODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N. Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1788, n. 8, p. 1556-63, 2009.
- CONLON, J. M. et al. Antimicrobial peptides from the skin secretions of the New World frogs *Lithobates capito* and *Lithobates warszewitschii* (Ranidae). **Peptides**, New York, v. 30, n. 10, p. 1775-81, 2009.
- CONLON, J. M. et al. Host defense peptides in skin secretions of the Oregon spotted frog *Rana pretiosa*: implications for species resistance to chytridiomycosis. **Developmental and Comparative Immunology**, Tarrytown, v. 35, n. 6, p. 644-9, 2011.
- CONLON, J. M.; MECHKARSKA, M. Host-defense with therapeutic potential from skin secretions of frog from the family Pipidae. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 7, n. 1, p. 58-77, 2014.
- CONLON, J. M. et al. Evidence from peptidomic analysis of skin secretions that allopatric populations of *Xenopus gilli* (Anura:Pipidae) constitute distinct lineages. **Peptides**, New York, v. 63, p. 118-25, 2015.

- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, London, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.
- COSTA et al. Occurrence of bufotenin in the *Osteocephalus* genus (Anura: Hylidae). **Toxicon**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 371-375, 2005.
- CUNHA-FILHO, G. A. et al. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated a major component from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*. **Toxicon**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 777-782, 2005.
- CUNHA-FILHO, G. A. et al. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Toxicon**, Oxford, v. 56, n. 3, p. 339-48, 2010.
- CUTLER, P. et al. Proteomics in pharmaceutical research and development. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 27, n. 4, p. 555-559, 1999.
- DALY, J. W.; MYERS, C. W.; WHITTAKER, N. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the amphibia. **Toxicon**, Oxford, v. 25, n. 10, p. 1023-1095, 1987.
- DALY, J. W. The chemistry of poisons in amphibian skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Philadelphia, v. 92, n. 1, p. 9-13, 1995.
- DALY, J. W.; SPANDE, T. F.; GARRAFFO, H. M. Alkaloids from amphibian skin: a tabulation of over eight-hundred compounds. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 68, n. 10, p. 1556-1575, 2005.
- DALY, J. W. et al. Alkaloids in bufonid toads (*melanophryniscus*): temporal and geographic determinants for two argentinian species. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 33, n. 4, p. 871-87, 2007.
- DAWSON, R. M.; LIU, C. Q. Properties and applications of antimicrobial peptides in biodefense against biological warfare threat agents. **Critical Reviews in Microbiology**, London, v. 34, n. 2, p. 89-107, 2008.
- DeBOER, D. J.; MORIELLO, K. A. Development of an experimental model of *Microsporium canis* infection in cats. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 42, n.4, p. 289-295, 1994.
- de OLIVEIRA JUNIOR, N. G.; E SILVA CARDOSO, M. H.; FRANCO, O. L. Snake venoms: attractive antimicrobial proteinaceous compounds for therapeutic purposes. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, Basel, v. 70, n. 24, p. 4645-58, 2013.

- de SOUZA CANDIDO, E. et al. The use of versatile plant antimicrobial peptides in agribusiness and human health. **Peptides**, New York, v. 55, p. 65-78, 2014.
- DERACINOIS, B. et al. Comparative and Quantitative Global Proteomics Approaches: An Overview. **Proteomes**, Basel, v. 1, n. 3, p. 180-218, 2013.
- DORNELLES, M. F.; MARQUES, M. G. B.; RENNER, M. F. Revisão sobre toxinas de Anura (Tetrapoda, Lissamphibia) e suas aplicações biotecnológicas. **Revista Ciência em Movimento - Biociências e Saúde**, Porto Alegre, v. 12, n. 24, p. 103-117, 2010.
- dos SANTOS, L.D. et al., Brown Recluse Spider Venom: Proteomic Analysis and Proposal of a Putative Mechanism of Action. **Protein and Peptide Letters**, Hilversum, v. 18, n. 8, p. 933-943.
- DOURADO, F. S. et al. Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus syphax*. **Toxicon**, Oxford, v. 50, n. 4, p. 572-80, 2007.
- EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 1, n. 1, p. 80-91, 1967.
- EIGNER, U. et al. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. **Clinical laboratory**, Heidelberg, v. 55, n. 7-8, p. 289-96, 2009.
- ELLIS, D. I. et al. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. **Pharmacogenomics**, London, v. 8, n. 9, p. 1243-1266, 2007.
- ERSPAMER, V. Biogenic amines and active polypeptides of amphibian skin. **Annual Review of Pharmacology**, Palo Alto, v. 11, p. 327-350, 1971.
- ESCOUBAS, P.; QUINTON, L.; NICHOLSON, G.M. Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 43, n. 3, p. 279-295, 2008.
- ESCOUBAS, P.; RASH, L. Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. **Toxicon**, Oxford, v. 43, n. 5, p. 555-74, 2004.
- ESPECTROMETRIA DE MASSAS – PRINCÍPIOS E APLICAÇÕES. Disponível em: <<http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=8&codassunto=31&numero=7>>. Acesso em: 20 Maio 2013.
- FJELL, C. D. et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature Reviews. Drug Discovery**, London, v. 11, n. 1, p. 37-51, 2012.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. **Proteomics**, Weinheim, v. 8, n. 4, p.909-920, 2008.

FUZITA, F. J. et al. Biochemical, transcriptomic and proteomic analyses of digestion in the scorpion *Tityus serrulatus*: insights into function and evolution of digestion in an ancient arthropod. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 4, p. e0123841, 2015.

GARG, A. D.; HIPPARGI, R.; GANDHARE, A. N. Toad skin-secretions: Potent source of pharmacologically and therapeutically significant compounds. **The Internet Journal of Pharmacology**, Sugar Land, v. 5, n. 2, 2008.

GENG, X. et al. Proteomic analysis of the skin of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*). **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 119, p. 196-208, 2015.

GASTEIGER, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: John M. Walker. **The Proteomics Protocols Handbook**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2005.cap. 52, pp. 571-607.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GIBSON, B. W. et al. Bombinin-like peptides with antimicrobial activity from skin secretions of the Asian toad, *Bombina orientalis*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, n. 34, p. 23103-11, 1991.

GIRON-MALIGALIG, M. D.; CASTILLO, E. M. Predominant amines and bufodienolides from the skin secretions of *Bufo biporcatus philippinicus* Inger. **Asia Life Sciences**, Laguna, v. 23, n. 1, p. 343-350, 2014.

GONÇALVES-MACHADO, L. et al. Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, 2015. In press. Disponível em: < http://ac.els-cdn.com/S1874391915002213/1-s2.0-S1874391915002213-main.pdf?_tid=c9c78838-09fe-11e5-a115-00000aab0f01&acdnat=1433342741_32ea3333661f11cbfb689edd8fcf36cd > Acesso em: 20 Maio 2015.

GOMES, A. et al. Anticancer activity of a low immunogenic protein toxin (BMP1) from Indian toad (*Bufo melanostictus*, Schneider) skin extract. **Toxicon**, Oxford, v. 58, n. 1, p. 85-92, 2011.

- GOMES, A. et al. Bioactive molecules from amphibian skin: Their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 45, n. 7, p. 579-593, 2007.
- GOUET, P. et al. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 305-308, 1999.
- GUO, C. et al. Identification of multiple peptides with antioxidant and antimicrobial activities from skin and its secretions of *Hylarana taipehensis*, *Amolops lifanensis*, and *Amolops granulatus*. **Biochimie**, Paris, v. 105, p. 192-201, 2014.
- HAWSER, S.; ISLAM, K. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 43, n. 3, p. 411-413, 1999.
- HABERMEHL, G. G. Amphibia (Amphibians). In:_____. **Venomous Animals and Their Toxins**. New York: Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 1981. cap. 6, p. 112-116.
- HEGEDÜS, N.; MARX, F. Antifungal proteins: More than antimicrobials? **Fungal Biology Reviews**, Manchester v. 26, n. 4, p. 132-145, 2013.
- HERBERT, C. H.; JOHNSTONE, R. A. W. Laser Desorption Ionization (LDI). In:_____. **Mass Spectrometry Basics**. Boca Raton: CRC Press, 2003. cap. 2, p. 27-30.
- HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. The early tetrapods and modern amphibians. In:_____. **Animal Diversity**. Softcover: 2002. cap. 7, p. 333.
- HU, L. et al. Comprehensive Peptidome Analysis of Mouse Livers by Size Exclusion Chromatography Prefractionation and NanoLC-MS/MS Identification. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 6, n. 2, p. 801-808, 2007.
- HU, L.; YE, M.; ZOU, H. Peptidome Analysis of Mouse Liver Tissue by Size Exclusion Chromatography Prefractionation. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v.615, p. 207-216, 2010.
- HU, Y. et al. Peptidomic analysis of antimicrobial peptides in skin secretions of *Amolops mantzorum*. **Zoological Science**, Tokyo, v. 31, n. 3, p. 143-51, 2014.
- HUANG, H. W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. **Biochemistry**, Washington, v. 39, n. 29, p. 8347-52, 2000.

- ILINA, E. N. et al. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic *Neisseria*. **The Journal of Molecular Diagnostics: JMD**, Bethesda, v. 11, n. 1, p. 75-86, 2009.
- INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. The 10 × 20 initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 50, n. 8, p. 1081-1083, 2010.
- JACK, R. W.; JUNG, G. Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chemical diversity. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 4, n. 3, p. 310-7, 2000.
- JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M. Anfíbios: biologia e venenos. In: CARDOSO et al. (Ed.). **Animais Peçonhetos no Brasil**. 2. ed. São Paulo: SARVIER, 2009. cap. 31, p. 317-328.
- JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.
- JIANG, L. et al. Venomics of the spider *Ornithoctonus huwena* based on transcriptomic versus proteomic analysis. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & Proteomics**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 81-8, 2010.
- KIM, J. B. et al. Antimicrobial peptides from the skin of the Japanese mountain brown frog, *Rana ornativentris*. **The Journal of Peptide Research: Official Journal of the American Peptide Society**, Copenhagen, v. 58, n. 5, p. 349-56, 2001.
- KING, J. D. et al. Pentadactylin: an antimicrobial peptide from the skin secretions of the South American bullfrog *Leptodactylus pentadactylus*. **Comparative Biochemistry and Pphysiology. Toxicology & Pharmacology: CBP**, New York, v. 141, n. 4, p. 393-7, 2005.
- KING, J. D. et al. Peptidomic analysis of skin secretions provides insight into the taxonomic status of the African clawed frogs *Xenopus victorinus* and *Xenopus laevis* *sudanensis* (Pipidae). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & Proteomics**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 250-4, 2013.
- KRISHNAKUMARI, V.; NAGARAJ, R. Antimicrobial and hemolytic activities of crabrolin, a 13-residue peptide from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*, and its analogs. **The Journal of Peptide Research: Official Journal of the American Peptide Society**, Copenhagen, v. 50, n. 2, p. 88-93, 1997.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage "T4". **Nature**, London, v. 227, 680-685, 1970.

- LAI, R. et al. Identification and cloning of a trypsin inhibitor from skin secretions of Chinese red-belly toad *Bombina maxima*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford, v. 131, n. 1, p. 47-53, 2002a.
- LAI, R. et al. Antimicrobial peptides from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima*. **Peptides**, New York, v. 23, n. 3, p. 427-35, 2002b.
- LAI, R. et al. Identification and cloning of a trypsin inhibitor from skin secretions of Chinese red-belly toad *Bombina maxima*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford, v. 131, n.1, p. 47-43, 2003.
- LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 2947-8, 2007.
- LEE, H. T. et al. A Large-Scale Structural Classification of Antimicrobial Peptides. **BioMed Research International**, New York, v. 2015, p. 6, 2015.
- LEITE, J. R. et al. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. **Peptides**, New York, v. 26, n. 4, p. 565-73, 2005.
- LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, New York, v. 10, n. 12 Suppl, p. S122-9, 2004.
- LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 2, n. 10, p. 790-802, 2003.
- LI, Y.; SHRESTHA, B.; VERTES, A. Atmospheric pressure infrared MALDI imaging mass spectrometry for plant metabolomics. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 80, n. 2, p. 407-20, 2008.
- LIEBLER, D.C. Introduction to proteomics. Tools for the new biology. In:_____. **Proteomics and the New Biology**. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2002. cap. 1, p. 3-7.
- LIU, J. et al. Antimicrobial peptides from the skin of the Asian frog, *Odorrana jingdongensis*: de novo sequencing and analysis of tandem mass spectrometry data. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 75, n. 18, p. 5807-21, 2012.
- LOPES, R. B. et al. MALDI-TOF mass spectrometry applied to identifying species of insect-pathogenic fungi from the *Metarhizium anisopliae* complex. **Mycologia**, New York, v. 106, n. 4, p. 865-78, 2014.

- LOWY, F. D. Secrets of a superbug. **Nature Medicine**, New York, v. 13, n. 12, p. 1418-1420, 2007.
- LUNA, M. S. et al. Activation of Bothrops jararaca snake venom gland and venom production: a proteomic approach. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 94, p. 460-72, 2013.
- MACIEL, N. M. et al. Composition of indolealkylamines of Bufo rubescens cutaneous secretions compared to six other Brazilian bufonids with phylogenetic implications. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 134, n. 4, p. 641-649, 2003.
- MANGONI, M. L. et al. Ranacyclins, a new family of short cyclic antimicrobial peptides: biological function, mode of action, and parameters involved in target specificity. **Biochemistry**, Washington, v. 42, n. 47, p. 14023-35, 2003.
- MATTUTE, B.; KNOOP, F. C.; CONLON, J. M. Kassinatuerin-1: a peptide with broad-spectrum antimicrobial activity isolated from the skin of the hyperoliid frog, Kassina senegalensis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 268, n. 2, p. 433-6, 2000.
- MECHKARSKA, M. et al. Peptidomic analysis of skin secretions from the bullfrog Lithobates catesbeianus (Ranidae) identifies multiple peptides with potent insulin-releasing activity. **Peptides**, New York, v. 32, n. 2, p. 203-8, 2011.
- MECHKARSKA, M. et al. Host-defense peptides from skin secretions of the octoploid frogs Xenopus vestitus and Xenopus wittei (Pipidae): insights into evolutionary relationships. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & Proteomics**, Amsterdam, v. 11, p. 20-8, 2014.
- MEBS, D. et al. Studies on the poisonous skin secretion of individual red bellied toads, Melanophryniscus montevidensis (Anura, Bufonidae), from Uruguay. **Toxicon**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 641-50, 2005.
- MEBS, D.; MANEYRO, R.; POGODA, W. Further studies on pumiliotoxin 251D and hydroquinone content of the skin secretion of Melanophryniscus species (Anura, Bufonidae) from Uruguay. **Toxicon**, Oxford, v. 50, n. 1, p. 166-9, 2007.
- MICHAEL, J. P. Indolizidine and quilolizidine alkaloids. **Natural Product Reports**, London, v. 24, p. 191-222, 2007.
- MICHALSKI, L. Et al., 2011. Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole orbitrap mass spectrometer. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, Bethesda, v.10, n. 9, p. M111.011015, 2011.

- MICHAUT, L. et al. Determination of the disulfide array of the first inducible antifungal peptide from insects: drosomycin from *Drosophila melanogaster*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 395, n. 1, p. 6-10, 1996.
- MIGNOGNA, G. et al. BSTI, a trypsin inhibitor from skin secretions of *Bombina bombina* related to protease inhibitors of nematodes. **Protein Science : a Publication of the Protein Society**, New York, v. 5, n. 2, p. 357-362, 1996.
- MISHRA, N.C. **Introduction to Proteomics: Principles and Applications**. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., p. 7-9, 2010.
- MOELLERING-JR, R. C. Discovering new antimicrobial agents. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 2-9, 2011.
- MOCO, S.; SCHNEIDER, B.; VERVOORT, J. Plant Micrometabolomics: The Analysis of Endogenous Metabolites Present in a Plant Cell or Tissue. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 8, n. 4, p. 1694-1703, 2009.
- MONTI, R.; CARDELLO, L. Bioquímica do veneno de anfíbios. In: BARRAVIERA, B. **Venenos Animais: uma Visão Integrada**. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas, 1994. cap. 15, p. 225-231.
- MONTEIRO, J. et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.53, n.1, p.333-4, 2009.
- MORRIS, A.; KELLNER, J. D.; LOW, D. E. The superbugs: evolution, dissemination and fitness. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 1, n. 5, p. 524-529, 1998.
- MORIKAWA, N.; HAGIWARA, K.; NAKAJIMA, T. Brevinin-1 and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog, *Rana brevipoda porsa*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v .189, n.1, p. 184–190, 1992.
- NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, Barking, v. 29, n. 9, p. 464-72, 2011.
- NICOLAS, P.; MOR, A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense of vertebrates. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 277-304, 1995.
- NIELSEN, S. L. et al. Strucuture-activity study on the antibacterial peptide fallaxin. **Protein Science: a Publication of the Protein Society**, New York, v. 16, n. 9, p. 1969-1976.

- ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **TRENDS in Microbiology**, Cambridge, v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.
- OJO, O. O. et al. Tigerinin-1R: a potent, non-toxic insulin-releasing peptide isolated from the skin of the Asian frog, *Hoplobatrachus rugulosus*. **Diabetes, Obesity & Metabolism**, Oxford, v. 13, n. 12, p. 1114-22, 2011.
- OLIVEIRA, G.A. et al. Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: an Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, Salvador, v. 5, n. 4, p. 163-170, 2001.
- OLSON, L. 3rd et al. Pseudin-2: an antimicrobial peptide with low hemolytic activity from the skin of the paradoxical frog. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 288, n. 4, p. 1001-5, 2001.
- ORIVEL, J. et al. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 21, p. 17823-9, 2001.
- PARK, C. J. et al. Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 44, n. 2, p. 187-97, 2000.
- PAPO, N., SHAI, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? **Peptides**, New York, v. 24, n. 11, p. 1693-1703, 2003.
- PEIRANO, G. et al. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 63, n. 2, p. 265-268, 2009.
- PERRY, D. Proteins of parotoid gland secretions from toads of the genus *Bufo*. **Contemporary Herpetology**, Louisiana, v. 2000, n. 3, 2000.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp by use of clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 9, p. 2.846-2.856, 2012.
- PHIZICKY, E. et al. Protein analysis on a proteomic scale. **Nature**, London, v. 422, n. 6928, p. 208-215, 2003.

- PRATES, I. et al. Skin glands, poison and mimicry in Dendrobatid and Leptodactylid amphibians. **Journal of Morphology**, Philadelphia, v. 273, n. 3, p. 279-290, 2012.
- PRATES, M. V.; BLOCH-JR, C. Peptídeos antimicrobianos: uma alternativa no combate a microorganismos resistentes. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.17, p. 30-36, 2000.
- POUG, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. Salamandras, Anuros e Cecílias. In:_____.**A Vida dos Vertebrados**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. cap. 10, p. 239-261.
- POWERS, J. P.; HANCOCK, R. E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, New York, v. 24, n. 11, p. 1681-91, 2003.
- PUJOL, I. et al. Use of the sensititre colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 40, n. 7, p. 2.618-2.621, 2002.
- QUEIROZ, A. C. **Manual de Bacteriologia**. 1. ed. São Paulo: Editora Giz, 2011.
- QUINTON, L. et al. New Method for characterizing highly disulfide-bridged peptides in complex mixtures: application to toxin identification from crude venoms. **Journal of Proteomics Research**, Washington, v. 6, n. 8, 3216-3223, 2007.
- RASH, L. D. et al. De novo sequencing of peptides from the parotid secretion of the cane toad, *Bufo marinus* (*Rhinella marina*). **Toxicon**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 208-216, 2011.
- RATES, B. et al. Peptidomic dissection of the skin secretion of *Phasmahyla jandaia* (Bokermann and Sazima, 1978) (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae). **Toxicon**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 35-52, 2011.
- REMUZGO, C. et al. Chemical synthesis, structure-activity relationship, and properties of shepherdin I: a fungicidal peptide enriched in glycine-glycine-histidine motifs. **Amino Acids**, Wien, v. 46, n. 11, p. 2573-86, 2014.
- RICHARDSON, M. et al. Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP**, New York, v. 142, n. 3-4, p. 173-87, 2006.
- RIERA, A. S. et al. Antibacterial activity of lactose-binding lectins from *Bufo arenarum* skin. **BIOCELL**, Mendoza, v. 27, p. 37-46, 2003.

- ROZENBAUM, R. et al. The first report in Brazil of severe infection caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 42, n. 8, p.756-760, 2009.
- ROZEK, T. et al. The maculatin peptides from the skin glands of the tree frog *Litoria genimaculata*: a comparison of the structures and antibacterial activities of maculatin 1.1 and caerin 1.1. **Journal of Peptide Science: an Official Publication of the European Peptide Society**, Chichester, v. 4, n. 2, p. 111-5, 1998.
- SAI, K. P. et al. Tigerinins: novel antimicrobial peptides from the Indian frog *Rana tigerina*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 4, p. 2701-7, 2001.
- SAKATE, M.; LUCAS DE OLIVEIRA, P. C. Toad envenoming in dogs: effects and treatment. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v. 6, n. 1, p. 52-62, 2000.
- SALAS, C. E. et al. Biologically active and antimicrobial peptides from plants. **BioMed Research International [electronic resource]**, New York, v. 2015, p. 102129, 2015.
- SALOMON, R. A.; FARIAS, R. N. Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, n. 22, p. 7428-35, 1992.
- SAUTOUR, M. et al. Antifungal steroid saponins from *Dioscorea cayenensis*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 70, n. 1, p. 90-92, 2004.
- SEVERINOV, K.; NAIR, S. K. Microcin C: biosynthesis and mechanisms of bacterial resistance. **Future Microbiology**, London, v. 7, n. 2, p. 281-9, 2012.
- SCHÄGGER, H.; von-JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.
- SCIANI, J. M. et al. Differences and similarities among parotoid macrogland secretions in South American toads: a preliminary biochemical delineation. **The Scientific World Journal**, New York, v. 2013, p. 937407, 2013.
- SIMMACO, M. et al. A family of bombinin-related peptides from the skin of *Bombina variegata*. **European Journal of Biochemistry/FEBS**, Berlin, v. 199, n. 1, p. 217-22, 1991.
- SIMMACO, M. et al. Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. **European Journal of Biochemistry/FEBS**, Berlin, v. 242, n. 3, p. 788-92, 1996.
- SIMMACO, M.; MIGNOGNA, G.; BARRA, D. Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? **Biopolymers**, New York, v. 47, n. 6, p. 435-50, 1998.

SIMMACO, M.; KREIL, G.; BARRA, D. Bombinins, antimicrobial peptides from Bombina species. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1788, n. 8, p. 1551-5, 2009.

SITARAM, N. et al. Structure-function relationship studies on the frog skin antimicrobial peptide tigerinin 1: design of analogs with improved activity and their action on clinical bacterial isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 46, n. 7, p. 2279-83, 2002.

SHAI, Y. Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. **Trends in Biochemical Sciences**, Cambridge, v. 20, n. 11, p. 460-4, 1995.

SHLAES, D. M. et al. The FDA Reboot of Antibiotic Development. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 57, n. 10, 4605-4607, 2013.

SOLL, D. R. Candida commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. **Acta Tropica**. Basel, v. 81, n. 2, p. 101-110, 2002.

SPELLBERG, B. et al. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. **Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, Chicago, v. 38, n. 9, p. 1279-1286, 2004.

STEINBORNER, S. T. et al. New antibiotic caerin 1 peptides from the skin secretion of the Australian tree frog Litoria chloris. Comparison of the activities of the caerin 1 peptides from the genus Litoria. **The Journal of Peptide Research: an Official Journal of the American Peptide Society**, Copenhagen, v. 51, n. 2, p. 121-6, 1998.

TIAN, H. Y. et al. New bufadienolides and C(23) steroids from the venom of Bufo bufo gargarizans. **Steroids**, New York, v. 75, n. 12, p. 884-90, 2010.

STOPPA, M.A. et al. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo Eucast para avaliação da atividade antifúngica. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 498-502, 2009.

SUN, Z. L.; ZHANG, M.; ZHANG, J. F; FENG, J. Antifungal and cytotoxic activities of the secondary metabolites from endophytic fungus Massrison sp. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 18, n. 10, p. 859-862, 2011.

SUTHAR, S.K. et al. Superbug NDM-1: A global health problem. **Der Pharmacia Lettre - Scholars Research Library**, Gurgaon, v. 4, n. 4, p. 1183-1187, 2012.

TANAKA, K. et al. A new rapid and comprehensive peptidome analysis by one-step direct transfer technology for 1-D electrophoresis/MALDI mass spectrometry. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 379, n. 1, p. 110-4, 2009.

TEMPONE, A. G. et al. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. **Toxicon**, Oxford, v. 52, n. 1, p. 13-21, 2008.

TEIXEIRA, L. et al. Infection and disease among household contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: the Official Journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 5, n. 4, p. 321-328, 2001.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Oxford, v. 111, n.1, p. 1-29, 1995.

THOMPSON, J. D.; SCHAEFFER-REISS, C.; UEFFING, M. Functional proteomics. Methods and protocols. In: SCHAEFFER-REISS, C. **A brief summary of the different types of mass spectrometers used in proteomics**. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2008. cap.1, p. 3-7.

THOMPSON, A. H. et al. Amphibian Skin Secretomics: Application of Parallel Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry and Peptide Precursor cDNA Cloning to Rapidly Characterize the Skin Secretory Peptidome of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*: Discovery of a Novel Peptide Family, the Hyposins. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 6, n. 9, p. 3604-3613, 2007.

TWYMAN, R.M. Principles of proteomics. In:_____. **From genomics to proteomics**. Taylor & Francis Group: Abingdon, 2004. cap. 1, p. 1-8.

TYLER, M. J.; STONE, D. J. M.; BOWIE, J. H. A novel method for the release and collection of dermal, glandular secretions from the skin of frogs. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v. 28, n. 4, p. 199-200, 1992.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Drug and biological approval and IND activity reports. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/DrugandBiologicApprovalReports/default.htm>>. Acesso em: 24 Maio 2015.

UTHMAN, et al. Fluconazole upregulates *sconC* expression and inhibits sulphur metabolism in *Microsporum canis*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, n. 8, p. 719-725, 2005.

VAARA, M. New approaches in peptide antibiotics. **Current Opinion in Pharmacology**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 571-6, 2009.

- VALIM, A. R. M. et al. Mutations in the rpoB Gene of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 8, p. 3119-3122, 2000.
- VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S; COSTE, A.T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. **International Journal of Microbiology**, New York, v. 2012, p. 1-26, 2012.
- VEJAYAN, J.; KHOON T. L.; IBRAHIM, H. Comparative analysis of the venom proteome of four important Malaysian snake species. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 20, n. 6, 1-9, 2014.
- VITT, L. J; CALDWELL, J. P. Frogs. In_____ **Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**. 2. ed. California: Academic Press, 2014, cap. 17, p.471-490.
- VRIES, R. et al. Next-generation nanoantibacterial tools developed from peptides. **Nanomedicine**, London, v. 10, n. 10, p. 1643-61, 2015.
- WABNITZ, P. A. et al. The citropin peptides from the skin glands of the Australian Blue Mountains tree frog *Litoria citropa*. Part 2: sequence determination using electrospray mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM**, Chichester, v. 13, n. 17, p. 1724-32, 1999.
- WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, n. suppl 1, p. D933-D937, 2009.
- WANG, Z.; WANG, G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, n. suppl 1, p. D590-D592, 2004.
- WANG, H. et al. Functional peptidomics of amphibian skin secretion: a novel Kunitz-type chymotrypsin inhibitor from the African hyperoliid frog, *Kassina senegalensis*. **Biochimie**, Paris, v. 94, n. 3, p. 891-9, 2012.
- WASINGER, V. C.; CORTHALS, G. L. Proteomic tools for biomedicine. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 771, n. 1-2, p. 33-48, 2002.
- WIESE, M. D. et al. Proteomic analysis of *Myrmecia pilosula* (jack jumper) ant venom. **Toxicon**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 208-17, 2006.
- WRIGHT, G. D. Resisting resistance: new chemical strategies for battling superbugs. **Chemistry & Biology**, New York, v. 7, n. 6, p. R127-132, 2000.

- WRIGHT, G. D.; SUTHERLAND, A. D. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. **TRENDS in Microbiology**, Cambridge, v. 13, n. 6, p. 260-267, 2007.
- WU, J. et al. Proteomic analysis of skin defensive factors of tree frog *Hyla simplex*. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 10, n. 9, p. 4230-4240, 2011.
- YAN, L.; ADAMS, M. E. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 4, p. 2059-2066, 1998.
- XU, X. et al. Two antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana grahami*. **Toxicon**, Oxford, v. 47, n. 4, p. 459-64, 2006.
- XU, X. et al. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Mesobuthus martensii*. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 106, p. 162-80, 2014.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, London, v. 414, n. 6870, p. 389-395, 2002.
- ZHAO, Y. et al. Structural and charge requirements for antimicrobial peptide insertion into biological and model membranes. In: MENESTRINA, G.; DALA-SERRA, M.; LAZAROVICI, P. **Pore-forming Peptides and Protein Toxins**. New York: Taylor & Francis Group, 2003. cap. 9, p. 151-177, 2003.
- ZHAO, Y. et al. Isolation and preliminary characterization of a 22-kDa protein with trypsin inhibitory activity from toad *Bufo andrewsi* skin. **Toxicon**, Oxford, v. 46, n. 3, p. 277-81, 2005.
- ZELEZETSKY, I. et al. Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 434, n. 2, p. 358-364, 2004.

ANEXO

ANEXO: Certificado de Regularidade do Biotério Central emitido pelo IBAMA para utilização de diferentes venenos animais e a autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético nº 010159/2014-2.

Ministério do Meio Ambiente Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
CADASTRO TÉCNICO FEDERAL CONSULTA PÚBLICA A CERTIFICADO DE REGULARIDADE - CR													
Registro n.º:	1506748	Data da consulta:	01/06/2015	CR emitido em:	01/06/2015	CR válido até:	01/09/2015						
Dados básicos													
CNPJ:	63.025.530/0026-62												
Razão social:	FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP												
Nome fantasia:	FMRP - CRIADOURO CIENTÍFICO DA USP												
Data de abertura:	21/05/1952												
Endereço													
Logradouro:	AV. BANDEIRANTES 3900			Complemento:	CAMPUS DA USP								
N.º:	3900			Município:	RIBEIRÃO PRETO								
Bairro:	MONTE ALEGRE			UF:	SP								
CEP:	14049-900												
Cadastro Técnico Federal de Atividades Potencialmente Poluidoras e Utilizadoras de Recursos Ambientais – CTF/APP													
<table border="1"><thead><tr><th>Categoria</th><th>Detalhe</th></tr></thead><tbody><tr><td>20 - Uso de Recursos Naturais</td><td>41 - utilização do patrimônio genético natural - coleta de material biológico com finalidade científica ou didática</td></tr><tr><td>20 - Uso de Recursos Naturais</td><td>45 - criação científica de fauna silvestre para fins de pesquisa</td></tr></tbody></table>				Categoria	Detalhe	20 - Uso de Recursos Naturais	41 - utilização do patrimônio genético natural - coleta de material biológico com finalidade científica ou didática	20 - Uso de Recursos Naturais	45 - criação científica de fauna silvestre para fins de pesquisa				
Categoria	Detalhe												
20 - Uso de Recursos Naturais	41 - utilização do patrimônio genético natural - coleta de material biológico com finalidade científica ou didática												
20 - Uso de Recursos Naturais	45 - criação científica de fauna silvestre para fins de pesquisa												
<p>Conforme dados disponíveis na presente data, a pessoa jurídica acima possui Certificado de Regularidade em conformidade com as obrigações cadastrais e de prestação de informações ambientais sobre as atividades desenvolvidas sob controle e fiscalização do Ibama, por meio do CTF/APP.</p> <p>O certificado de regularidade emitido pelo CTF/APP não desobriga a pessoa inscrita de obter licenças, autorizações, permissões, concessões, alvarás e demais documentos exigíveis por instituições federais, estaduais, distritais ou municipais para o exercício de suas atividades.</p> <p>O Certificado de Regularidade do CTF/APP não habilita o transporte e produtos e subprodutos florestais e faunísticos.</p>													
Fechar

4280900596381670

AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010159/2014-2

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 104/2011, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

Instituição: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO - USP

CNPJ: 630.255.300/0001-04

Representante Legal: MARCO ANTONIO ZAGO

Cargo/Função: Pró-Reitor de Pesquisa

CPF: XXX-XXX **RG:** XXX-XXX

Projeto: Isolamento, caracterização estrutural e avaliação in vitro da atividade antifúngica de toxinas das glândulas parótoides e mucosas do sapo *Rhinella schneideri*

Coordenador do Projeto: Eliane Candiani Arantes

CPF: XXX-XXX **RG:** XXX-XXX

Finalidade do projeto: Considerados como ricas fontes de compostos biologicamente ativos, os anfíbios, particularmente os sapos e as rãs, apresentam em suas glândulas inúmeras substâncias altamente diversificadas como, peptídeos, aminas biogênicas, proteínas, alcaloides, compostos esteroidais e muitas outras. Atualmente, há um interesse elevado do setor de desenvolvimento de fármacos pelo estudo de venenos animais, já que suas toxinas são consideradas poderosas ferramentas para a investigação e elucidação de eventos biológicos em nível celular e molecular e apresentam grande potencial farmacológico. Muitos dos compostos isolados de venenos de anfíbios apresentam ação antifúngica e/ou antibacteriana, cuja função é protegê-los contra infecções. Com o surgimento de microrganismos resistentes a diversos antibióticos, o estudo de compostos com atividades antimicrobianas torna-se essencial a fim de propiciar o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos específicos e eficientes. Dentre os compostos isolados de toxinas animais com atividade antimicrobiana, os peptídeos têm-se destacado. No entanto, outras classes de moléculas presentes nestes venenos também apresentam ação antimicrobiana. Assim, o objetivo deste trabalho é o isolamento e caracterização estrutural e funcional dos compostos que apresentem atividade antifúngica relevante. A purificação das toxinas será realizada por cromatografia de troca iônica, fase reversa, filtração molecular, ou outros procedimentos que se tornarem necessários. Para os peptídeos isolados serão determinados o pI, a massa molar e a sequência em aminoácidos. A estrutura de moléculas pequenas será determinada por ressonância magnética nuclear. Os compostos isolados serão avaliados sobre seus efeitos em leveduras e no crescimento e alterações morfológicas de fungos filamentosos.

Amostras a serem acessadas:

Grupos Taxonômicos: *Rhinella schneideri*

Tipo de material/quantidade de amostras: Serão utilizados cerca de 15g de veneno bruto das glândulas parótoides e mucosas do sapo *Rhinella schneideri* para obtenção de toxinas.

Local de depósito de subamostra: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Equipe do projeto: ELIANE CANDIANI ARANTES / CPF XXX-XXX

FERNANDO ANTONIO PINO ANJOLETTE / CPF XXX-XXX

ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO / CPF XXX-XXX

IARA AIME CARDOSO / CPF XXX-XXX

KARLA DE CASTRO FIGUEIREDO / CPF XXX-XXX

Validade da Autorização: 15/05/2014 a 01/04/2016

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio do Coordenador do Projeto, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº 4.946/2003. O roteiro para confecção do relatório está disponível em <http://www.cnpq.br/web/guest/relatorio-de-atividades>. Os relatórios devem ser enviados ao CNPq em meio eletrônico, para o endereço apg@cnpq.br e, preferencialmente, em formato .pdf.

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010159/2014-2. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

Se ocorrer coleta de espécie não autorizada ou não identificada, deverá ser observado o que consta no Decreto nº 6.514, de 22/07/2008, no que refere à flora e fauna, e em particular sobre espécies ameaçadas de extinção ou de endemismo estrito.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRTM). A remessa para instituições nacionais está isenta de autorização prévia. Contudo, a remessa para instituições sediadas no exterior depende de autorização prévia do CNPq, nos termos das resoluções do CGEN 15/2004 e 20/2006. Os modelos dos termos, assim como as citadas resoluções, estão disponíveis em <http://www.cnpq.br/web/guest/remessa-e-transporte> e devem ser enviados ao CNPq em meio eletrônico para o endereço apg@cnpq.br, preferencialmente em formato .pdf. Ainda, para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, por meio de formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRTM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, especialmente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 15 de Maio de 2014

Marcelo Marcos Morales

Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 4280900596381670 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.

APÊNDICE

Figura suplementar 1: Espectros de massas das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas no modo linear positivo com matriz DHB. (A) Espectros de massas obtidos da fração 1. (B) Espectros de massas obtidos da fração 2. (C) Espectros de massas obtidos da fração 3. (D) Espectros de massas obtidos da fração 4.

Figura suplementar 2: Espectros de massas das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas no modo linear positivo com matriz DHB. (A) Espectros de massas obtidos da fração 5. (B) Espectros de massas obtidos da fração 6. (C) Espectros de massas obtidos da fração 7. (D) Espectros de massas obtidos da fração 8.

Figura suplementar 3: Espectros de massas das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas no modo linear positivo com matriz DHB. (A) Espectros de massas obtidos da fração 9. **(B)** Espectros de massas obtidos da fração 10. **(C)** Espectros de massas obtidos da fração 11. **(D)** Espectros de massas obtidos da fração 12.

Figura suplementar 4: Espectros de massas das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas no modo linear positivo com matriz DHB. (A) Espectros de massas obtidos da fração 13. (B) Espectros de massas obtidos da fração 14. (C) Espectros de massas obtidos da fração 15. (D) Espectros de massas obtidos da fração 16.

Figura suplementar 5: Espectros de massas das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas no modo refletido positivo com matriz HCCA. **(A)** Espectros de massas obtidos da fração 1. **(B)** Espectros de massas obtidos da fração 2. **(C)** Espectros de massas obtidos da fração 3. **(D)** Espectros de massas obtidos da fração 4.

Figura suplementar 6: Espectros de massas das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas no modo refletido positivo com matriz HCCA. (A) Espectros de massas obtidos da fração 5. (B) Espectros de massas obtidos da fração 6. (C) Espectros de massas obtidos da fração 7. (D) Espectros de massas obtidos da fração 8.

Figura suplementar 7: Espectros de massas das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas no modo refletido positivo com matriz HCCA. (A) Espectros de massas obtidos da fração 9. (B) Espectros de massas obtidos da fração 10. (C) Espectros de massas obtidos da fração 11. (D) Espectros de massas obtidos da fração 12.

Figura suplementar 8: Espectros de massas das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas mucosas no modo refletido positivo com matriz HCCA. (A) Espectros de massas obtidos da fração 13. (B) Espectros de massas obtidos da fração 14. (C) Espectros de massas obtidos da fração 15. (D) Espectros de massas obtidos da fração 16.

Figura suplementar 9: Espectros de massas das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas parotídeas no modo linear positivo com matriz DHB. (A) Espectros de massas obtidos da fração 1. (B) Espectros de massas obtidos da fração 2. (C) Espectros de massas obtidos da fração 3. (D) Espectros de massas obtidos da fração 4.

Figura suplementar 10: Espectros de massas das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas parotóides no modo linear positivo com matriz DHB. (A) Espectros de massas obtidos da fração 5. (B) Espectros de massas obtidos da fração 6. (C) Espectros de massas obtidos da fração 7. (D) Espectros de massas obtidos da fração 8.

Figura suplementar 11: Espectros de massas das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas parotoides no modo linear positivo com matriz DHB. (A) Espectros de massas obtidos da fração 9 (B) Espectros de massas obtidos da fração 10. (C) Espectros de massas obtidos da fração 11. (D) Espectros de massas obtidos da fração 12.

Figura suplementar 12: Espectros de massas das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas parotídeas no modo refletido positivo com matriz HCCA. (A) Espectros de massas obtidos da fração 1. (B) Espectros de massas obtidos da fração 2. (C) Espectros de massas obtidos da fração 3. (D) Espectros de massas obtidos da fração 4.

Figura suplementar 13: Espectros de massas das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas parotídeas no modo refletido positivo com matriz HCCA. (A) Espectros de massas obtidos da fração 5. **(B)** Espectros de massas obtidos da fração 6. **(C)** Espectros de massas obtidos da fração 7. **(D)** Espectros de massas obtidos da fração 8.

Figura suplementar 14: Espectros de massas das frações obtidas da filtração em gel das secreções das glândulas parotídeas no modo refletido positivo com matriz HCCA. (A) Espectros de massas obtidos da fração 9. (B) Espectros de massas obtidos da fração 10. (C) Espectros de massas obtidos da fração 11. (D) Espectros de massas obtidos da fração 12.