AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ISOLAMENTO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE ANUROS DA FAUNA
BRASILEIRA.**

Daniele Gordillo Fernandes

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientador:
Prof.Dr. Patrick Jack Spencer**

**São Paulo
2014**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ISOLAMENTO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE ANUROS DA FAUNA
BRASILEIRA.**

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientador:
Prof.Dr. Patrick Jack Spencer

Versão Original

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda minha família, principalmente ao meu pai Marcos e minha mãe Olga, por toda ajuda e apoio. A minha irmã Marina por todo seu carinho.

Ao Henrique Nazzaro, por sempre me escutar e apoiar.

Ao meu orientador Patrick Jack Spencer, pela oportunidade e companheirismo no decorrer do trabalho.

Aos meus companheiros de laboratório: Tamara Fucase, por sua dedicação e sempre me socorrer quando precisei; Paula Juliana Nishimura, por ser minha amiga em todas as horas; Vincent Louis Viala, por sempre ser tão atencioso; Bruno Baessa, Ed Carlos dos Santos, Karina Corleto, Samuel de Brito e José Pedro Prezotto Neto, pelo companheirismo.

A todos os meus colaboradores: Carlos Jared, pelo fornecimento dos animais; Daniel Pimenta, pelos experimentos de espectrometria de massa; Cecilia M. Abe.

À Capes, pelo apoio financeiro.

ISOLAMENTO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE ANUROS DA FAUNA BRASILEIRA.

Daniele Gordillo Fernandes

RESUMO

O aparecimento de cepas microbianas com resistência aos antibióticos comumente usados em âmbito mundial constitui um sério problema de saúde pública, estimulando a busca por novos compostos antimicrobianos para os quais a resistência ainda não foi adquirida. A secreção cutânea de várias espécies de anuros (rãs, sapos e pererecas) é uma rica fonte de peptídeos com amplo espectro de atividade antibacteriana e antifúngica, com grande potencial para o desenvolvimento de fármacos. O presente trabalho visou à investigação da presença de agentes antimicrobianos na secreção cutânea das espécies brasileiras *Dermatonotus muelleri*, *Leptodactylus labyrinthicus*, *Phyllomedusa burmeisteri*, *Rhinella icterica*, *Trachycephalus resinifictrix*. Utilizando a estimulação mecânica do tegumento para extração e posteriormente a liofilização dessas secreções. Os testes antimicrobianos foram realizados através da técnica de disco difusão, onde as secreções testadas foram solubilizadas em diferentes solventes e em placas contendo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. As secreções com maior potencial antibacteriano foram fracionadas por Cromatografia líquida de alta eficiência – fase reversa em uma coluna C8 e C18 5µm. Tendo suas frações também testadas em disco-difusão. As frações que formaram halos de inibição foram submetidas à espectrometria de massa para a identificação de suas moléculas. Desta forma foi comprovado a ação antimicrobiana das secreções de *Rhinella icterica*, *Phyllomedusa burmeisteri* e *Trachycephalus resinifictrix* e de suas receptivas frações.

ISOLATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF FROGS OF THE BRAZILIAN FAUNA.

Daniele Gordillo Fernandes

ABSTRACT

The appearance of microbial strains that are resistant to common antibiotics used in a global scope represents a serious public health issue, stimulating the search for new antimicrobial compounds that resistance was not acquired yet. The cutaneous secretion of several anurans species (frogs, toads and tree frogs) is a rich source of peptides with a broad spectrum of antimicrobial and antifungal activity, with a big potential to drug development. The present work aimed the investigation of the presence of antimicrobial agents in the cutaneous secretion of the Brazilian species *Dermatonotus muelleri*, *Leptodactylus labyrinthicus*, *Phyllomedusa burmeisteri*, *Rhinella icterica*, *Trachycephalus resinifictrix*. For the extraction of these secretions it was utilized the integument mechanical stimulation and later on these secretions were lyophilized. For the antimicrobial tests it was used the disk diffusion technique, where the test secretions were solubilized in different solvents and in plates containing Gram-negative and Gram-positive bacteria. The secretions with the highest antimicrobial potential were fractionated by a high-performance liquid chromatography – reverse phase in the columns C8 and C18 5µm. These fractions were also tested in disk diffusion. The fractions that formed inhibition zones were submitted to mass spectrometry for the identification of their molecules. This way it was evidenced antimicrobial activity of secretions from *Rhinella icterica*, *Phyllomedusa burmeisteri* and *Trachycephalus resinifictrix* and from their respective fractions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração de um corte ventral da pele de um anfíbio

Figura 2 – Fotos da espécie de *Dermatonotus muelleri*

Figure 3 - Fotos da espécie de *Leptodactylus labyrinthicus*

Figure 4 - Fotos da espécie de *Phyllomedusa burmeisteri*

Figure 5 - Fotos da espécie de *Rhinella icterica*

Figure 6 - Fotos da espécie de *Trachycephalus resinifictrix*

Figura 7.a – Foto demonstrando o preparo do anuro para a extração por estimulação mecânica do tegumento

Figura 7.b – Foto demonstrando a estimulação mecânica do tegumento em um macho de *Leptodactylus labyrinthicus*

Figura 8: Método por esgotamento utilizado para isolar culturas puras de bactérias

Figura 9.a- Atividade antimicrobiana de *Staphilococcus aureus* com o veneno da glândula paratoide de *R. icterica*

Figura 9.b- Atividade antimicrobiana de *Citrobacter freindii* com a secreção cutânea da *R. icterica*.

Figura 10 - Atividade antimicrobiana de *Staphilococcus aureus* com a secreção cutânea de *Trachycephalus resinifictrix*

Figura 11- Atividade antimicrobiana de *Citrobacter freindii* com a secreção cutânea de *Trachycephalus resinifictrix*

Figura 12 - Perfil cromatografico obtido por fracionamento da secreção cutânea de *P.burmeisteri* utilizando-se uma coluna (C₈)

Figura 13 – Perfil cromatografico obtido por fracionamento da secreção cutânea de *R.icterica* utilizando-se uma coluna (C₈)

Figura 14- Atividade antimicrobiana de *P.aeruginosa* com as frações da secreção cutânea de *P.burmeisteri*

Figura 15 - Atividade antimicrobiana de *P.aeruginosa* com as frações da secreção cutânea de *R.icterica*

Figura 16 - Atividade antimicrobiana de *P.aeruginosa* com as frações da secreção de *R.icterica*.

Figura 17 - Perfil cromatografico obtido por fracionamento da secreção bruta cutânea de *R.icterica* utilizando-se uma coluna (C₈), leitura em 220nm

Figura 18 - Perfil cromatografico obtido por fracionamento da secreção cutânea bruta de *R.icterica* utilizando-se uma coluna (C₈), leitura em 280nm

Figura 19 - Perfil cromatografico obtido por fracionamento do veneno da glândula paratoide de *R.icterica* utilizando-se uma coluna (C₈)

Figura 20 - Perfil cromatografico obtido por fracionamento da secreção cutânea liofilizada de *R.icterica* utilizando-se uma coluna (C₈), leitura em 220nm

Figura 21 - Perfil cromatografico obtido por fracionamento da secreção cutânea liofilizada de *R.icterica* utilizando-se uma coluna (C₈), leitura em 280nm

Figura 22- Perfil cromatográfico obtido por fracionamento da secreção cutânea liofilizada de *Trachycephalus resinifictrix* utilizando-se uma coluna (C₈)

Figura 23 - Atividade antimicrobiana de *S.aureus* contendo os picos do fracionamento da secreção cutânea de *R.icterica*

Figura 24 - Atividade antimicrobiana de *S.aureus* contendo os picos do fracionamento da secreção cutânea de *P.burmeisteri*

Figura 25 - Atividade antimicrobiana de *C. freindii* com picos do fracionamento da secreção cutânea de *Trachycephalus resinifictrix*

Figura 26- Gel SDS 15% com os venenos de *R.icterica* e *L.labyrinthicus*

Figura 27 - Perfil cromatografico obtido por fracionamento da fração 7 liofilizada de *R.icterica* utilizando-se uma coluna (C₈)

Figura 28 - Perfil cromatografico obtido por fracionamento da fração 6 liofilizada de *R.icterica* utilizando-se uma coluna (C₈)

Figura 29 - Perfil cromatografico obtido por fracionamento da fração 16 liofilizada de *P.burmeisteri* utilizando-se uma coluna (C₈)

Figura 30 - Atividade antimicrobiana de *S.aureus* com as frações do tubo 7 da secreção cutânea de *R.icterica*

Figura 31 - Atividade antimicrobiana *P.auriginosa* com as frações da secreção cutânea de *R.icterica*

Figura 32 - Atividade antimicrobiana de *S.aureus* com as frações do tubo 16 da secreção da *P.burmesteri*

LISTA DE TABELAS

Quadro 1 - Dosagem de proteínas lidas no espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm.

Tabela 1- Resumo da ação antimicrobiana da secreção de todas as espécies testadas.

Tabela 2- Resumo da ação antimicrobiana das frações das secreções testadas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Resistência Microbiana	12
1.2 Espécies brasileiras estudadas	14
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral:	19
2.2 Objetivos específicos:	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Coleta da secreção	20
3.2 Análise antimicrobiana	21
3.2.1 Prevenção de contaminação	21
3.2.2 Preparação das bactérias	21
3.2.3 Preparação das placas de Petri	23
3.3 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford	23
3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência - fase reversa (RP-HPLC)	23
3.4.1 Preparação da secreção bruta para fracionamento	24
3.5 Espectrometria de massa.....	24
3.6 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-SDS 15% (SDS-PAGE)	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Testes antimicrobianos	26
4.1.1 Teste antimicrobiano com veneno de <i>Dermatonotus muelleri</i> , <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> , <i>Phyllomedusa burmeisteri</i> , <i>Rhinella icterica</i> (glândula e secreção da pele) apenas liofilizados.	27
4.1.2 Teste microbiano com a secreção de <i>Trachycephalus resinifictrix</i>	28
4.2 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford	29
4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência - fase reversa (RP-HPLC) C8.....	29
4.3.1 Teste antimicrobiano com os picos de <i>D.mulleri</i> , <i>L.labyrinthicus</i> <i>P.burmeisteri</i> e <i>R.icterica</i>	30
4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência - fase reversa (RP-HPLC) C18....	34
4.4.1 Teste antimicrobiano com os picos de <i>R.icterica</i> e <i>P.burmesteri</i>	38

4.4.2 Teste antimicrobiano com os picos de <i>Trachycephalus resinifictrix</i>	39
4.5 Teste antimicrobiano com os picos de <i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	41
4.6. Gel SDS 15% não reduzido dos venenos de <i>R.icterica</i> e <i>L.labyrinthicus</i> . ..	41
4.7. Cromatografia líquida de alta eficiência - fase reversa (RP-HPLC) C8 com os picos de <i>P.burmesteri</i> e <i>R.icterica</i>	42
4.8. Teste antimicrobiano com picos da secreção de <i>R.icterica</i> (pele) e <i>P.burmesteri</i>	45
4.9 Tabelas de resultados antimicrobianos	47
5. DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

A maior variedade de anfíbios do planeta é encontrada no Brasil. Já foram reconhecidas 946 espécies das 7.246 descritas no mundo. A classe Amphibia é dividida entre as ordens Anura (rãs, sapos e pererecas) com 6.388 espécies, Caudata (tritões e salamandras) com 659 e Gymnophiona (cecílias) com 199. No Brasil, esse número de anfíbios está dividido em 913 Anuros, 1 Caudata e 32 Gymnophionas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, 2012. AMPHIBIAN WEB, 2014). Com uma fonte tão diversa e abundante de espécies é necessário um grande esforço dos herpetologistas e de toda comunidade científica para coletar informações sobre esses animais e seus benefícios para a humanidade. Porém, esse trabalho acaba muitas vezes se tornando uma corrida contra o tempo, devido ao declínio de várias populações de anfíbios, tornando seu estudo um desafio. Um dos focos principais dessa pesquisa foi a identificação de novas moléculas presentes na secreção cutânea desses animais.

O tegumento dos anuros é composto pela epiderme externa e a derme subjacente. A epiderme é constituída por duas ou três camadas de células quando o indivíduo se encontra em sua forma larval, e de cinco a sete camadas na fase juvenil e adulta. Neste tecido, localiza-se o estrato germinativo, responsável por produzir camadas sucessivas de células o qual é separado da derme por uma membrana basal fina. A derme é a camada mais espessa, contendo diversos tipos de células e estruturas, incluindo as células de pigmento, glândulas mucosas e granulares, vasos sanguíneos e nervos, inseridos em uma matriz de tecido conjuntivo (VITT E CALDWELL, 2009).

Quando os animais estão na água doce ocorre o influxo osmótico de água. A osmorregulação atua promovendo a recaptção ativa de sal devido a perda excessiva de solutos pela excreção de uma urina altamente diluída. A respiração cutânea oscila de acordo com a disponibilidade de O_2 e variações no ambiente. Em altas temperaturas e maiores concentrações de O_2 , os

pulmões são os principais responsáveis pelas trocas gasosas, já em baixas temperaturas e concentrações reduzidas de O_2 , a respiração cutânea é a principal responsável pela sua captação (SCHMIDT-NIELSEN, 2010).

A pele desses animais desempenha varias funções como de osmorregulação, termorregulação e respiração, além de proteger o animal contra predadores e micro-organismos por meio da secreção de substâncias tóxicas (SEBBEN; SCHARTZ; CRUZ, 1993). Como mecanismo de defesa esses animais produzem substâncias que ficam armazenadas em dois tipos de glândulas, as mucosas e as granulares.

Figura 1- Ilustração da pele de anfíbio. Representando um corte ventral da pele.

Fonte: Modificado de Vitt e Caldwell (2009).

As glândulas mucosas são menores e mais numerosas, cerca de 10 glândulas mucosas para uma granular. Elas estão localizadas principalmente no dorso do animal, secretando continuamente um muco claro e viscoso rico em mucina (glicoproteína), formando uma película úmida sobre a pele. Já as glândulas granulares, maiores e em menor número, estão mais distribuídas na cabeça, corpo e membros. Sendo responsáveis pela produção, armazenamento e liberação de moléculas bioativas como peptídeos antimicrobianos (CHEN et. al., 2005; VITT E CALDWELL, 2009). Os peptídeos encontram-se confinados nas glândulas granulares, envolvidos em miócitos invados por fibras simpáticas. A estimulação adrenérgica dos

miócitos em resposta ao stress causa compressão das células granulares que contêm substâncias capazes de produzir efeitos cardiotoxícos, neurotóxicos, miotóxicos, citotóxicos, alucinógenos e anestésicos, além de substâncias antimicrobianas como a *bombinina*, *magaininas*, *dermaseptinas*, *brevininas*, *esculetinas* e *temporinas* (DOCKRAY; HOPKINS, 1975; TOLEDO; JARED, 1995). Esses peptídeos tem origem a partir de um processamento proteolítico de precursores polipeptídicos constituídos por três regiões principais: O peptídeo-sinal (endereço o polipeptídeo a glândula granular antes do processamento proteolítico), sequência espaçadora acídica (rica nos aminoácidos hidrofílicos aspartato e glutamato) e domínio C-terminal (contem a sequência do peptídeo maduro). Então ocorrem duas clivagens proteolíticas até a liberação do peptídeo maduro. Na primeira o peptídeo-sinal é removido da glândula granular, expondo a sequência acídica, que se hidrata para manter o polipeptídeo ainda inativo. Assim a segunda clivagem se inicia removendo a sequência acídica e liberando peptídeos ativos (apenas quando a atividade secretora for estimulada). Esses peptídeos depois de liberados, ainda sofrem processos de clivagem, sugerindo que a glândula granular estoque e secrete proteases junto com os peptídeos (NASCIMENTO et. al., 2004).

Os compostos secretados pelas glândulas descritas acima são extremamente importantes para a sobrevivência destes animais que habitam ambientes ricos em matéria orgânica em decomposição, como lodo, serapilheira, lagos, ou mesmo poças de água que favorecem a proliferação de várias espécies de bactérias e fungos (SEBBEN; SCHARTZ; CRUZ, 1993).

Sendo assim, a secreção cutânea de várias espécies de anuros (rãs, sapos e pererecas) é uma rica fonte de peptídeos com amplo espectro de atividade antibacteriana e antifúngica, com potencial para desenvolvimento de fármacos (PÁL, et al., 2006). Dentre os princípios ativos encontrados na pele dos anfíbios estão moléculas alifáticas, aromáticas e heterocíclicas, além de uma

diversificada gama de esteróides, alcalóides, aminas biogênicas, derivados guanidínicos, proteínas e peptídeos (BERNARDE; SANTOS, 2009).

1.1 Resistência Microbiana

A necessidade da criação de novos fármacos vem crescendo devido ao grande número de doenças infecciosas causadas por bactérias que estão desenvolvendo resistência aos fármacos já existentes. Os antimicrobianos são desenvolvidos para tratar os verdadeiros patógenos e não seus comensais fazendo com que vários fatores de transferência de resistência sejam transmitidos para linhagens sensíveis ao fármaco. Através do contato entre as células, onde muitos fatores de virulência, como, por exemplo, os de *Staphylococcus aureus*, são transportados por plasmídeos, essa resistência adquirida pode ser transmitida para diferentes linhagens de bactérias, propiciando um rápido espalhamento para a formação de linhagens com resistência múltipla aos fármacos disponíveis no mercado (PRATES; BLOCK, 2000).

A procura por antimicrobianos que tenham seu efeito potencializado e que não sejam tóxicos às células de mamíferos vem crescendo no decorrer dos últimos anos, fato que está ligado ao aumento de cepas microbianas resistentes aos antibióticos de uso convencional (POWERS; HANCOCK, 2003; YEAMAN; YOUNT, 2003 apud CARVALHO, 2011).

Atualmente com o aparecimento de cepas microbianas resistentes aos antibióticos comumente usados, foi se estabelecendo um alerta mundial devido ao sério risco à saúde pública, estimulando assim a busca por novos compostos antimicrobianos para os quais a resistência ainda não foi adquirida (CONLON; SONNEVEND, 2010).

Esse crescente impacto surge pelo fato das bactérias carregarem sua virulência por plasmídeos que podem ser passados entre diferentes linhagens das mesmas, sendo um mecanismo de rápida dispersão. A ação dos peptídeos antimicrobianos, que apresentam uma natureza hidrofóbica e catiônica, é uma

alternativa ao combate de bactérias resistentes, uma vez que estes são capazes de induzir defeitos em sua membrana agindo diretamente sobre esses microrganismos, levando-os a uma morte por lise celular (CARVALHO, 2011).

Nos peptídeos não existem motivos estruturais conservados responsáveis pela atividade antimicrobiana, no entanto a vasta maioria destes peptídeos é catiônica por conter múltiplos resíduos de lisina, além de apresentar hidrofobicidade devido à ocorrência de resíduos de leucina e isoleucina (CONLON; IWAMURO; KING, 2009).

O mecanismo pelo qual estas moléculas induzem morte celular não envolve a ligação a receptores específicos da membrana celular, mas uma interação inespecífica com os fosfolípidios de membrana. Consequentemente, o desenvolvimento de resistência à ação destes peptídeos ocorre em taxas que estão a várias ordens de magnitude abaixo das observadas para antibióticos convencionais (ZASLOFF, 2002).

Muitos fármacos já são desenvolvidos através das substâncias presentes na secreção cutânea de Anuros como a Magainina 1 e 2 extraída da espécie *Xenopus laevis* isolada por Zasloff em 1987 (CARVALHO, 2011). Até o presente momento, já foram identificados mais de cinquenta peptídeos de anuros, sendo que dentre os mais conhecidos, estão as bombinas, as taquicinas, os peptídeos opióicos, as magaininas, as cerulinas e a xeropsina. A magainina é usada no tratamento de úlceras em pés de diabéticos, além de possuir ação contra elementos patogênicos sexualmente transmissíveis, e podendo ser usado futuramente como contraceptivo, além de terem sido observadas atividades antitumorais em seus análogos (DORNELLES; MARQUES; RENNER, 2010).

O principal obstáculo para o uso destas moléculas para fins terapêuticos, particularmente no caso da administração sistêmica, é a sua atividade citolítica em células do tegumento de mamíferos e a sua curta meia-vida na circulação sanguínea. No entanto, estes peptídeos aplicados à epiderme infectada ou lesionada, na forma de spray ou unguento, podem penetrar o estrato córneo

para eliminar micro-organismos, tendo assim potencial para uso tópico (GE, et al., 1999; KYLE; DAHL, 2004).

Contudo, a procura por antimicrobianos que tenham seu efeito potencializado e que não sejam tóxicos às células de mamíferos vem crescendo no decorrer dos últimos anos, fato este que está ligado ao aumento de cepas microbianas resistentes aos antibióticos de uso convencional (POWERS; HANCOCK, 2003; YEAMAN; YOUNT, 2003; CARVALHO, 2011).

Vários trabalhos descrevem o isolamento e a caracterização de peptídeos antimicrobianos em anuros (DOCKRAY; HOPKINS, 1975; GE, et. al., 1999; ZASLOFF, 2002; KYLE; DAHL, 2004; CONLON; SONNEVEND, 2010). No entanto, pouco se sabe a respeito de tais moléculas presentes em espécies da fauna Brasileira.

O presente trabalho visou isolar e caracterizar biomoléculas com potencial atividade terapêutica a partir de anfíbios da nossa fauna.

1.2 Espécies brasileiras estudadas

Dermatonotus muelleri (BOETTGER, 1885): Espécie endêmica encontrada no clima semi-árido do Brasil. Apresenta atividade de forrageamento e durante o período de estivação inicia a construção de uma câmara subterrânea junto com uma especialização alimentar para poder sobreviver a época de poucos recursos. Sua dieta é composta basicamente por cupins (NOMURA, 2003).

Figura 2- *Dermatonotus muelleri* à esquerda encontra-se parcialmente enterrado. O mesmo animal à direita depois de lavado.

Fonte: Fernandes (2012).

Leptodactylus labyrinthicus (SPIX, 1824): Rã de grande porte, conhecida também como rã-pimenta, é encontrada no Paraguai, Bolívia, norte da Argentina e em grande parte do território nacional, tanto no cerrado quanto na caatinga, ao longo de rios e lagos temporários (RIBEIRO-JÚNIOR E BERTOLUCI, 2009). Já foram identificados peptídeos antimicrobianos em sua secreção cutânea, tais como ocelatina-P1 (pentadactilina) e ocelatina-F1 (falaxina) (MÁRQUEZ, 2012).

Figura 3 - *Leptodactylus labyrinthicus*.

Fonte: Fernandes (2012).

Phyllomedusa burmeisteri (BOULENGER, 1882): Perereca encontrada em grande parte do sudeste, com ampla distribuição na Mata Atlântica. Essa espécie de anfíbio pertence à subfamília Phyllomedusinae, conhecido pela produção de polipeptídeos em sua pele. Nesse grupo já foram extraídos de seu tegumento peptídeos como a [Lys⁷] dermorfina, substância com atividade analgésica 40 vezes mais potente que a morfina (NEGRI et. al., 1992).

Figura 4- *Phyllomedusa burmeisteri*

Fonte: Fernandes (2012).

Rhinella icterica (SPIX, 1824): Vulgarmente conhecido como sapo, possui a pele seca, grossa e glandular. Com ampla distribuição na Floresta Atlântica, ocorrendo na Argentina, Paraguai e Brasil. É um animal terrestre, que se alimenta de invertebrados, especialmente Coleoptera e Formicidae. (BENÍCIO; RODRIGUES; SALLE, 2011). Esse sapo possui glândulas paratóides localizadas na região posterior à órbita ocular que produz e estoca um líquido mucoso e esbranquiçado como mecanismo de defesa contra predadores. Essa secreção possui toxinas como as bufogeninas, as bufotoxinas, as bufoteninas a epinefrina, a serotonina, o ergosterol, o colesterol e a 5-hidroxitriptamina. As bufogeninas e bufotoxinas, são esteroides cardioativos, capaz de levar um cão de 14 Kg a óbito com uma dose de 100 mg (SONNE, et al., 2008)

Figura 5 - *Rhinella icterica*.

Fonte: Fernandes (2013).

Trachycephalus resinifictrix (GOELDI, 1907): Essa espécie pode ser encontrada desde a Amazônia do Brasil, Bolívia, Peru, Equador e Colômbia; Venezuela, Guiana, Suriname e Guiana Francesa. Estes são arborícolas e noturnos, e de difícil localização devido aos seus hábitos arborícolas e noturnos (LIMA, et al., 2008).

Figura 6 - *Trachycephalus resinifictrix*.

Fonte: Jared (2010)

Os anfíbios selecionados para este trabalho possuem características específicas de hábito e habitat, que permitem uma análise mais abrangente dos

diversos micro-organismos presentes em seu microambiente e em sua pele. Assim, estes animais apresentam uma ampla variedade de compostos dentre eles os peptídeos antimicrobianos, cuja atividade foi o foco de nosso estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Analisar as moléculas bioativas com atividade antimicrobiana da secreção cutânea das espécies brasileiras de *Dermatonotus muelleri*, *Leptodactylus labyrinthicus*, *Phyllomedusa burmeisteri*, *Rhinella icterica*, *Trachycephalus resinifictrix*.

2.2 Objetivos específicos:

- Identificar dentre as secreções testadas, aquelas que apresentam atividade antimicrobiana.
- Fracionar os compostos ativos por meio de cromatografia de fase reversa

3. MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho possui autorização de licença permanente para coleta de material zoológico emitido pelo SISBIO número 15964-1 e registro do IBAMA número 2675789 pelo Instituto Butantan.

3.1 Coleta da secreção

No Instituto Butantan foi realizada a coleta da secreção cutânea das espécies de anuros *Dermatonotus muelleri*, *Leptodactylus labyrinthicus*, *Phyllomedusa burmeisteri*, *Rhinella ictérica* e *Trachycephalus resinifictrix* por meio de estimulação manual do tegumento com os animais brevemente lavados em água corrente (para retirada de impurezas na pele), mergulhados em água destilada (Figura 7.a) e em seguida imersos em um béquer, contendo aproximadamente 5 mL de água MilliQ[®], onde foi feita a estimulação cutânea (Figura 7.b). O material coletado foi armazenado em tubos Falcon[®] de 50 mL e mantido sob-refrigeração no gelo no decorrer do transporte para o Ipen (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares). Todo o material foi liofilizado e mantido em freezer a -20°C.

Figura 7.a - *Dermatonotus muelleri* imerso em água destilada.
Fonte: Fernandes (2012).

Figure 7.b - Estimulação mecânica do tegumento em um macho de *Leptodactylus labyrinthicus*.
Fonte: Fernandes (2012).

3.2 Análise antimicrobiana

3.2.1 Prevenção de contaminação

Todos os procedimentos descritos a seguir foram realizados em condições de esterilidade dentro de um fluxo laminar com o uso de luvas (descartáveis) e jaleco para evitar contaminações. Os materiais usados no experimento também foram previamente esterilizados.

3.2.2 Preparação das bactérias

As bactérias utilizadas (*Gram-positivas: Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Gram-negativas: Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas hydrophila*) foram obtidas no Instituto Butantan (no laboratório de microbiologia com a Dr^a Monamaris marques

Borges), conservadas em eppendorfs® de 1,5mL, com glicerol 50% e mantidas em freezer -80 °C. Posteriormente inóculos das bactérias foram coletadas com o auxílio de uma alça de platina previamente esterilizada e transferidas para tubos de ensaio. Para cada inóculo de bactéria foi utilizado um tubo de ensaio, ou seja, 5 tubos contendo 3 mL do meio de cultura líquido Luria-Bertani-LB (10g de Triptona, 10g de NaCl e 5g de Extrato de Levedura diluídos em 1 L de Água MilliQ®).

Em seguida os mesmos foram colocados no agitador, em temperatura de 37° C por aproximadamente 24 h.

Após o crescimento das bactérias em meio líquido, estas foram transferidas para uma placa de Petri com meio de cultura sólido (LB+Agar 1,5%) com o objetivo de isolar uma colônia pelo método de esgotamento por estrias (figura 8). Para realização desta parte experimental utilizou-se uma alça de platina, previamente esterilizada. A alça é introduzida no tubo de ensaio com a cultura líquida e em seguida aplicado na placa onde são desenhadas estrias sobre a superfície do meio LB Agar contido na placa de Petri. As placas prontas foram colocadas em estufa à temperatura de 37 °C por cerca de 24 h.

Decorridas às 24 h, observou-se formação de algumas colônias isoladas. Tais colônias foram coletadas com o auxílio da alça de platina e transferidas para o meio líquido LB, conforme o primeiro procedimento citado anteriormente.

Figura 8: Placa de Petri com estrias de bactéria ilustrando o método por esgotamento. As séries de estrias vão reduzindo cada vez mais o número de células. Até obter colônias de bactérias bem isoladas.

Fonte: Fernandes (2014).

3.2.3 Preparação das placas de Petri

Nas placas de Petri com meio LB Agar foram feitos poços para a aplicação das secreções cutâneas dos anuros e seu respectivo controle (representado pela solução que o veneno foi diluído). Posteriormente receberam 10 µL do meio líquido LB contendo uma colônia de bactéria isolada e mais 190 µL de PBS (*Phosphate buffered saline*) estéril, sendo homogeneizada por toda superfície da placa com uma alça Drigalski de vidro.

3.3 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

As amostras utilizadas nesse trabalho tiveram sua concentração de proteína determinada pelo método de Bradford (1976). Essa metodologia baseia-se na observação da interferência das proteínas com absorvância do corante Coomassie Brillante Blue G-250, em meio altamente ácido resulta em modificações proporcionais da cor detectável. As cores variam de azul a um vermelho claro, onde a coloração vermelha é convertida em azul quando se liga à proteína e a tonalidade varia conforme a concentração de proteína. A leitura das amostras foi realizada em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm.

3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência - fase reversa (RP-HPLC)

Para fracionar os compostos presentes nas secreções cutâneas coletadas, foi selecionada a técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência - fase reversa (RP-HPLC).

Essa técnica foi desenvolvida inicialmente para separar misturas de substâncias apolares, como lipídeos. Porém também é eficaz na separação de substâncias polares, sendo muito utilizado para a separação de peptídeos (VOET, 2013).

Nesse trabalho foram utilizadas 2 colunas, a Vydac C8 e a Symmetry C18 5µm (Waters), com comprimento de 4,6 x 250 mm e 3,9 x 300 mm, respectivamente. A fase móvel usada nessa técnica de separação foi uma solução de Ácido fórmico 0,05% e uma de Acetonitrila mais 10% Ácido fórmico 0,05%. As soluções foram filtradas com o auxílio de uma bomba de vácuo e armazenada em um recipiente escuro fora da geladeira. A cromatografia foi realizada com fluxo de 1 mL/minuto, usando gradiente linear e detecção simultânea em 220 e 280 nm.

3.4.1 Preparação da secreção bruta para fracionamento

Alíquotas (1 mg) da secreção bruta de *L.labyrinthicus*, *D.mulleri* e *T.resinifictrix* foram centrifugadas por 10 min a 15.887 g. As secreções de *P.burmeisteri* e de *R.ictérica* estavam liofilizadas e foram diluídas em 1mL de ácido fórmico 0,05% O sobrenadante obtido foi aplicado em na coluna analítica C₈ de fase reversa essa eluição foi realizada empregando-se fluxo de 1 mL/min. As frações foram manualmente coletadas e armazenadas a -20°C.

3.5 Espectrometria de massa

Os picos das amostras mais promissoras na inibição microbiana foram analisados por espectrometria de massa. Em uma primeira etapa a massa monoisotópica das enzimas foi determinada por MALDI-TOF. A seguir, essas mesmas enzimas foram digeridas com tripsina e os fragmentos obtidos foram analisados por LC-MS/MS, para “fingerprinting” e sequenciamento *de novo*. Os dados foram analisados e confrontados com os bancos de dados, usando os softwares específicos MASCOT e PEAKS versão 6. Essas análises foram realizadas no laboratório de bioquímica do Instituto Butantan (realizado pelo Dr.Daniel Carvalho Pimenta).

3.6 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-SDS 15% (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel é um método para separar macromoléculas. A técnica para separar proteínas somente por seu tamanho é chamada de SDS-PAGE (SDS- Polyacrylamide Gel Electrophoresis). O SDS é um detergente aniônico forte, que se liga aos resíduos positivamente carregados das proteínas, conferindo às mesmas uma carga final negativa e causando a desnaturação. O gel de poliacrilamida é formado por duas partes. O gel de empilhamento, com menor concentração de poliacrilamida e poros grandes que permitem a migração uniforme das proteínas, independentemente das massas moleculares, levando-as a empilharem-se em uma faixa estreita. Após o empilhamento, as proteínas na segunda parte que é o gel de separação, onde os poros são menores, e a velocidade de migração passa a ser dependente das massas moleculares. Uma corrente contínua de ~300 V passa através do gel durante um período de tempo suficiente (30 a 90 minutos) para separar os componentes macromoleculares em uma série de bandas.

4. RESULTADOS

As secreções cutâneas dos anuros estudados mostraram-se, em geral secreções ricas e complexas. As que mais se destacaram nos testes antimicrobianos foram as secreções de *Phyllomedusa burmeisteri*, *Rhinella ictérica* e *Trachycephalus resinifictrix*. Os testes antimicrobianos com a secreção bruta podem ser observados nas FIGURAS 9.a e 9.b com a bactéria Gram-positiva *S.aureus* e Gram-negativa *C.freundii* e a secreção diluída da espécie *Trachycephalus resinifictrix* com as mesmas bactérias nas FIGURAS 10 e 11. Posteriormente foi realizada a dosagem de proteínas pelo método de Bradford e o perfil cromatográfico com uma coluna de fase reversa C₈ das secreções. Onde as frações coletadas das cromatografias foram testadas

4.1 Testes antimicrobianos

Para avaliar a ação microbiana de cada secreção foram realizados 3 tipos de abordagens diferentes, sendo testadas as secreções brutas (não liofilizadas), as secreções somente liofilizadas e as secreções diluídas (solução). Para a preparação das soluções foram testados 4 solventes, Acetonitrila, Acetato pH5, Ácido fórmico 0,05%, Ácido trifluoroacético 0,05 % (TFA). Foram utilizados diferentes solventes devido as particularidades de cada amostra que apresentam diferentes composições. Assim foram testadas diferentes combinações de secreção e solvente na busca de encontrar uma solução mais homogênea e eficaz.

O veneno da glândula paratoide liofilizado foi pesado e dividida em três eppendorfs® cada um com aproximadamente 1 mg do veneno. Dada a baixa solubilidade das secreções liofilizadas, foram testados três solventes distintos; Acetato (pH 5,0), Formiato (pH 3,0) e Citrato (pH 4,0). Cada fração foi diluída em 900µL de solvente.

A seguir, estão ilustradas as placas que apresentaram resultados promissores para atividade antimicrobiana de cada teste realizado.

4.1.1 Teste antimicrobiano com veneno de *Dermatonotus muelleri*, *Leptodactylus labyrinthicus*, *Phyllomedusa burmeisteri*, *Rhinella icterica* (glândula e secreção da pele) apenas liofilizados.

Foram preparadas 5 placas de Petri cada uma semeada com cepa de bactéria, divididas em Gram-negativas (*P.aerugina*, *C.freundii* e *A.hydrophita*) e Gram-positivas (*S.aureus* e *S.epidermidis*). Em cada uma das placas foram feitos 5 poços, onde foram aplicados os venenos liofilizados e um poço como controle usando PBS 1X. As placas prontas foram incubadas por 16h em estufa a 37°C.

Foi observado um resultado positivo para a inibição microbiana no poço contendo o veneno da glândula de *R.icterica* na placa de *S.aureus*, apresentando um halo bem definido porem com um pequeno crescimento microbiano rente ao poço (Figura 9.a). Na placa de *C.freundii* com o poço contendo a secreção da pele de *R.icterica* também é observado uma redução no crescimento das bactérias (Figura 9.b) .

Figura 9.a- Placa de *S. aureus*, onde se pode observar a formação de um grande halo em volta do poço nº4 que contém o veneno da glândula paratoide de *R.icterica* além de um crescimento de algumas colônias em seu entorno.

Fonte: Fernandes (2013).

Figura 9.b- Placa de *C. freundii*, mostrando uma diminuição no crescimento microbiano no poço nº 3 que contem a secreção cutânea da *R. icterica*.

Fonte: Fernandes (2013).

4.1.2 Teste microbiano com a secreção de *Trachycephalus resinifictrix*

Figura 10 - Placa de *Staphylococcus aureus* com as ampliações dos halos formados destacando o disco nº 5 (secreção de *T. resinifictrix* concentração de 1mg/mL em Acido fórmico 1%) e o disco nº 6 contendo apenas ácido fórmico como controle.

Fonte: Fernandes (2012).

Figura 11 - Placa de *Citrobacter freundii* com as ampliações dos halos formados com o nº 3 (concentração 1mg/mL TFA 0,5%) nº4 (Ácido trifluoroacético como controle) nº 5 (concentração de 1mg/mL Acido fórmico 1%) e o disco nº 6 contendo apenas ácido fórmico como controle.

Fonte: Fernandes (2012).4.2 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

4.2 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

As secreções cutâneas coletadas pela estimulação manual do tegumento foram analisadas pelo método de Bradford. Abaixo o quadro com os resultados.

Espécies	Concentração da amostra
<i>Dermatonotus muelleri</i>	0,027 mg/mL
<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	0,013 mg/mL
<i>Phyllomedusa burmeisteri</i>	0,32 mg/mL
<i>Rhinella icterica</i>	0,065 mg/mL

Quadro 1- Resultados referentes à dosagem de proteínas lidas no espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm.

Fonte: Fernandes (2013).

4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência - fase reversa (RP-HPLC) C8

Figura 12- Fracionamento da secreção cutânea da *P. burmeisteri* em 280 nm. em coluna de fase reversa (Vydac C₈). Foram diluídos 1ml/g da secreção em 1mL de ácido fórmico 0,05%. Fluxo de 1mL/min em 280nm. Em destaque o pico 16 representando a fração mais promissora.

Figura 13- Fracionamento da secreção cutânea da *R. ictERICA* em coluna de fase reversa (Vydac C₈). Foram diluídos 1ml/g da secreção em 1mL de ácido fórmico 0,05%. Fluxo de 1mL/min em 280nm. Em destaque os picos numeros 2,6 e 7 representando as frações mais promissoras.

4.3.1 Teste antimicrobiano com os picos de *D.mulleri*, *L.labyrinthicus* *P.burmeisteri* e *R.ictERICA*

Foram realizados testes com bactérias Gram-negativas e (*P.aeruginosa*) e Gram-positivas (*S.aureus*) com as frações das cromatografias acima. Depois de coletado os tubos foram liofilizados e solubilizados em Acetato pH 5. Aos tubos que continham 2mL de cada pico antes da liofilização, foram adicionados 1mL de Acetato pH 5, e aos de 1 mL 500µL.

As placas testadas com as frações de *D.mulleri* e *L.labyrinthicus* não apresentaram inibição. Apenas nas placas de *P.burmeisteri* e *R.ictERICA* se formaram halos de inibição, como mostra a figura a seguir.

Figura 14- Placa de *P.aeruginosa* com as frações da secreção de *P.burmeisteri*. Destaque para o numero 15 e 16, onde se pode observar a formação de halos de inibição, já no controle (acetato pH 5) representado pela letra c não é visualizada nenhuma inibição.

Fonte: Fernandes (2013).

Figura 15- Placa de *P.aeruginosa* com as frações da secreção de *R.icterica*. Destaque para o numero 2, onde se pode observar a formação um halo de inibição, já no controle (acetato pH 5) representado pela letra c não é visualizada nenhuma inibição.

Fonte: Fernandes (2013).

Figura 16- Placa de *P.aeruginosa* com as frações da secreção de *R.icterica*. Nessa placa é visível halos em todas as frações, em destaque o numero 14 o halo mais promissor, no controle (acetato pH 5) representado pela letra c não é visualizada nenhuma inibição.

Fonte: Fernandes (2013).

4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência - fase reversa (RP-HPLC) C₁₈

Abaixo estão retratados os perfis cromatográficos das secreções do veneno da glândula paratoide e da secreção cutânea da *R.icterica* (FIGURAS 17 a 19), da *P.burmesteri* (FIGURAS 20 a 21) e da *T. resinifictrix* (FIGURA 22) em coluna de fase reversa C₁₈

Figura 17- Fracionamento da secreção cutânea da *R.icterica*. em coluna de fase reversa (Symmetry C₁₈). Foram diluídos 1ml/g da secreção em 1mL de ácido fórmico 0,05%. Fluxo de 1mL/min. Em vermelho a leitura em 220nm e em azul a de 280nm. A seta mostra os picos coletados.

Figura 18- Fracionamento da secreção cutânea bruta da *R. icterica*. em coluna de fase reversa (Symmetry C₁₈). Leitura em 280nm.

Figura 19- Fracionamento do veneno da glândula paratoide da *R. icterica*. em coluna de fase reversa (Symmetry C₁₈). Foram diluídos 1ml/g da secreção em 1mL de ácido fórmico 0,05%. Fluxo de 1mL/min. Em vermelho a leitura em 220nm e em azul a de 280nm. O pico coletado esta indicado na pela seta.

Figura 20- Fracionamento da secreção cutânea liofilizada de *P.burmesteri* em coluna de fase reversa (Symmetry C₁₈). Foram diluídos 1ml/g da secreção em 1mL de ácido fórmico 0,05%. Fluxo de 1mL/min. Em vermelho a leitura em 220nm e em azul a de 280nm.

Figura 21- Fracionamento da secreção cutânea liofilizada de *P.burmesteri* em coluna de fase reversa (Symmetry C₁₈). Foram diluídos 1ml/g da secreção em 1mL de ácido fórmico 0,05%. Fluxo de 1mL/min em 280nm.

Figura 22- Fracionamento da secreção cutânea da *Trachycephalus resinifictrix* em coluna (Source C₁₈). Foram diluídos 1ml/g da secreção em 1mL de ácido fórmico 0,05%. Fluxo de 1mL/min em 280nm. Em destaque o pico número 6.

4.4.1 Teste antimicrobiano com os picos de *R.icterica* e *P.burmesteri*

Figura 23- Placa de *S.aureus* contendo os picos da cromatografia da secreção cutânea de *R.icterica* em uma coluna C_{18} . É possível visualizar pequenos halos nos poços em destaque para o numero 3. Como controle foi usado a fase móvel usada na corrida (40% Acetonitrila e 60% Acido fórmico), pois os picos não estavam liofilizados.

Fonte: Fernandes (2014).

Figura 24- Placa de *S.aureus* contendo os picos da cromatografia de fase reversa da secreção cutânea de *P.burmeisteri* em uma coluna C₁₈. É possível visualizar pequenos halos nos poços. Como controle foi usado a fase móvel usada na corrida (40% Acetonitrila e 60% Ácido fórmico), pois os picos não estavam liofilizados.

Fonte: Fernandes (2014).

4.4.2 Teste antimicrobiano com os picos de *Trachycephalus resinifictrix*

Foi utilizada uma coluna Source 15 RPC 4.6/150, com detecção simultânea em 280 e 220 nm e fluxo de 1 ml/minuto com condições de eluição conforme acima.

Nessa coluna foram injetados 100 µL do veneno de *Trachycephalus resinifictrix* com uma seringa de 1 mL. Após a o fracionamento, foram coletados

7 picos do veneno, sendo todos armazenados em tubos e posteriormente liofilizados e mantidos em freezer -20 °C.

Como citado acima os 7 picos coletados na purificação de fase reversa liofilizados foram solubilizados em TFA. Posteriormente foram preparados 4 placas de Petri, sendo duas com a bactéria *Staphylococcus aureus* e as outras duas a bactéria *Citrobacter freundii*. Os picos foram separados entre as placas, sendo que cada pico foi testado em ambas as bactérias citadas. A disposição final das placas ficou da seguinte forma: na primeira placa de Petri com a *Staphylococcus aureus* foram adicionados 5 discos de papel filtro com 10 µL dos picos 1, 2, 3, 4 e um controle contendo apenas TFA diluído em PBS. A segunda placa ficou com os picos 5, 6, 7 e o controle ambos com os mesmos 10 µL cada um. A primeira e a segunda placa de *Citrobacter freundii* seguiram o mesmo modelo descrito acima.

Figura 25 - Placa de *C. freindii* onde cada número representa o pico correspondente e a letra C o controle.

Fonte: Fernandes (2012).

4.5 Teste antimicrobiano com os picos de *Leptodactylus labyrinthicus*

Os picos coletados do veneno de *Leptodactylus labyrinthicus* foram liofilizados e solubilizados em 10µL de DMSO (dimetilsulfóxido), 10µL de TFA 0,05% (5 de TFA + 995 de H₂O) e 130µL de H₂O estéril.

Essa solução foi colocada em placas de Petri previamente semeadas com as bactérias *S.aureus* e *C.freundii*, cada placa continha 6 poços onde foram adicionados 10µL da solução. As placas prontas ficaram incubadas por 16h em estufa a 37°C. Nenhum halo de inibição foi formado.

4.6. Gel SDS 15% não reduzido dos venenos de *R.icterica* e *L.labyrinthicus*.

Foram coletados 80µL de veneno de cada espécie e adicionado mais 20µL de tampão. Em cada poço do gel foram aplicados 10µL. No primeiro poço foi adicionado o veneno de *L.labyrinthicus* e no segundo o de *R.icterica* (secreção da pele). Porém a segunda amostra não pode ser visualizada no gel com mostra a figura 26.

Figura 26- Gel SDS 15% com os venenos de *R.icterica* e *L.labyrinthicus*. O numero 1 representa o poço que contem o veneno de *L.labyrinthicus*. Foram aplicados 10µL/poço.
Fonte: Fernandes (2012).

4.7. Cromatografia líquida de alta eficiência - fase reversa (RP-HPLC) C₈ com os picos de *P.burmesteri* e *R.icterica*

Os picos das secreções cutâneas de *R.icterica* e *P.burmesteri* da fase reversa com a coluna C₈ Vydac foram coletados e submetidos ao teste antimicrobiano. Os que apresentaram maior potencial antimicrobiano foram separados. Posteriormente foi realizado uma nova cromatografia com uma coluna C₈ Vydac, onde os tubos 16 e 17 da *P.burmesteri* e os tubos 2,6,7,13 e 14 da *R.icterica* foram selecionados. Abaixo seguem os cromatogramas.

Figura 27- Fracionamento do tubo 7 da secreção cutânea da *R.icterica* em coluna de fase reversa (Vydac C₈). Foram diluídos 1ml/g da secreção em 1mL de ácido fórmico 0,05%. Fluxo de 1mL/min em 280nm.

Figura 28 - Fracionamento do tubo 6 da secreção cutânea da *R. icterica* em coluna de fase reversa (Vydac C₈). Foram diluídos 1ml/g da secreção em 1mL de ácido fórmico 0,05%. Fluxo de 1mL/min em 280nm.

Figura 29 - Fracionamento do com o tubo 16 da secreção de *P.burmeisteri* em coluna de fase reversa (Vydac C₈). Foram diluídos 1ml/g da secreção em 1mL de ácido fórmico 0,05%. Fluxo de 1mL/min em 280nm.

4.8. Teste antimicrobiano com picos da secreção de *R.icterica* (pele) e *P.burmesteri*

Os picos da cromatografia com a coluna C₈ Vydac com os tubos 16 da *P.burmesteri* e os tubos 2,6,7,13 e 14 da *R.icterica* foram selecionados. Depois todos os tubos foram liofilizados e ressuspensos em Ácido fórmico 0,05% e realizados testes microbianos. A seguir as placas com os resultados mais promissores.

Figura 30- Placa de *S.aureus* os números representam os tubos coletados do tudo 2 da *R.icterica* e a letra c o controle de Ácido fórmico 0,05%. Halos de inibição podem ser observados, destaque para o numero 26 e 11.

Fonte: Fernandes (2012).

Figura 31- Placa de *P.auriginosa* os números representam os tubos coletados do tudo 7 da *R.icterica* e a letra c o controle de Ácido fórmico 0,05%. Halos de inibição podem ser observados, destaque para o numero 5.

Fonte: Fernandes (2013).

Figura 32- Placa de *S.aureus* os números representam os tubos coletados do tudo 16 da *P.burmesteri* e a letra c o controle de Ácido fórmico 0,05%. Halos de inibição podem ser observados, destaque para o numero 19.

Fonte: Fernandes (2013).

4.9 Tabelas de resultados antimicrobianos

A tabela a seguir resume os resultados dos testes antimicrobianos realizados com as amostras coletadas das espécies de anuros. Apenas a espécie *R.icterica* apresenta dois tipos de coleta, a da glândula paratóide e a secreção cutânea. Essa tabela apresenta as secreções antes de seu fracionamento.

Espécies	Secreção	Bactérias Gram (+)	Bactérias Gram (-)
<i>D.muelleri</i>	cutânea	Não	Não
<i>L.labyrinthicus</i>	cutânea	Não	Não
<i>P. burmeisteri</i>	cutânea	Sim	Não
<i>R. icterica</i>	cutânea/glândula	Sim (glândula)	Sim (cutânea)
<i>T. resinifictrix</i>	cutânea	Sim	Sim

Tabela 1- Resumo dos testes antimicrobianos, onde **Não** representa as secreções que não apresentaram ação antimicrobiana, e **Sim** representa que a secreção que formou halo de inibição microbiana.

A segunda tabela contém apenas as secreções das espécies que apresentaram inibição no primeiro teste e posteriormente em suas frações. A secreção do veneno da glândula paratóide da *R. icterica* não apresentou ação antimicrobiana quando fracionada, por isso a secreção citada na tabela é apenas a cutânea.

Espécies	Bactérias Gram (+)	Bactérias Gram (-)
<i>P. burmeisteri</i>	Sim	Sim
<i>R. icterica</i>	Sim	Sim
<i>T. resinifictrix</i>	Não	Sim

Tabela 2- Resumo dos testes antimicrobianos, onde **Não** representa as secreções que não apresentaram ação antimicrobiana, e **Sim** representa as secreções que formaram halos de inibição microbiana.

5. DISCUSSÃO

A metodologia de extração e coleta da secreção cutânea de anuros utilizada nesse trabalho mostrou-se eficiente, sendo uma técnica não invasiva, que preserva a integridade física do animal, possibilitando a obtenção das secreções de espécies ameaçadas de extinção, além de extrair a forma ativa dos peptídeos, pois as glândulas granulares mantêm os peptídeos em sua forma inativa e estes, apenas quando expelidos por algum estímulo, se tornam ativos, portanto as técnicas de extração de pele que levam o animal a óbito para a obtenção de substâncias antimicrobianas se mostram ineficazes (PUKALA et. al., 2006).

A produção de peptídeos antimicrobianos em anfíbios faz parte do sistema imune inato, sendo estes sintetizados e processados a partir da tradução de um RNA mensageiro característico. Os genes responsáveis pela tradução de RNA que codificam peptídeos antimicrobianos possuem em sua estrutura pelo menos dois éxons separados por uma região não codificadora pequena, onde o 'éxon1' codifica a sequência de aminoácidos que forma uma região de peptídeo sinal num local com vários resíduos de aminoácidos negativamente carregados chamada de região ácida. O 'éxon2' codifica o restante da sequência de aminoácidos da região ácida e a sequência de aminoácidos responsável pelo desenvolvimento um peptídeo ativo (CHEN et al, 2005). A maioria dos peptídeos antimicrobianos é sintetizada como um pré-pró-peptídeo contendo uma sequência sinal N-terminal, um pró-segmento, e um peptídeo catiônico na região C-terminal, o qual apresentará atividade antimicrobiana após sua clivagem. A porção sinal desse precursor direciona o peptídeo para a região apropriada da glândula antes de ser clivado por uma endoprotease, liberando assim a parte inativa do peptídeo (PUKALA et. al., 2006).

Quando o animal é atacado, estimulado ou está doente, uma segunda endoprotease cliva o pró-peptídeo e o peptídeo maduro é então secretado na pele ou no trato gastrointestinal (NASCIMENTO; CARAMASCHI; CRUZ, 2005).

Esses fatos comprovam que o animal precisa receber estímulos externos para sua produção de peptídeos.

Os peptídeos antimicrobianos provenientes do veneno de anuros possuem algumas características em comum, tais como: 10–50 resíduos de aminoácidos, um grande número de resíduos hidrofóbicos, usualmente possuem uma carga total positiva, conformação em α -hélice anfipática, momento hidrofóbico alto e uma ampla face apolar em contraste com uma pequena face polar (BROGDEN, 2005; SHAI, 1999), razão pelo qual foi escolhida uma coluna de cromatografia de fase reversa (RP-HPLC). Essa técnica cromatográfica é utilizada para obter a purificação final, em razão da velocidade e poder de resolução que opera em pequenas escalas com grande sensibilidade e velocidade, utilizando tampões voláteis que não vão interferir nas análises (ARAÚJO; SOUZA, 2007). Esta técnica permite à alta-resolução, análise e separação de proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos, separando suas moléculas de acordo com suas diferenças e hidrofobicidades, detectando peptídeos em 215 nm (MANUAL DA GE HEALTHCARE, 2006). O qual apresentou resultados satisfatórios para a realização dos testes antimicrobianos com as frações coletadas.

Peptídeos helicoidais e anfipáticos geralmente se encontram desestruturados em soluções e são eletrostaticamente atraídos pelos grupos negativamente carregados presentes na superfície das células, tais como ácidos teicóicos e peptideoglicanos em bactéria Gram-positivas e a camada externa rica em LPS em Gram-negativas (ROLLINS-SMITH et.al.,2002; ZASLOFF, 2002). Devido a essa atração podemos observar a formação de halos nas placas de Petri tanto nas bactérias Gram-negativas que continham as frações da secreção cutânea de *P.burmeisteri* e *R.icterica*, e a bactéria *C. freindii* com a fração da secreção de *T.resinifictrix*. E na Gram-positiva *S.aureus* pode-se observar a formação de um halo de inibição no veneno extraído da glândula paratóide da *R.icterica* e na fração da secreção de *T.resinifictrix*. Porém quando diluído e fracionado o veneno da glândula parótide da *R.icterica* perdeu sua ação antimicrobiana observada anteriormente.

A bactéria *S.aureus* produz muitas toxinas que aumentam sua habilidade de invadir o corpo e danificar tecidos. É um problema comum em hospitais, por sua habilidade de desenvolver resistência rapidamente a antibióticos. Ela também produz uma enterotoxina que causa vômitos e náuseas quando ingerida, comum causa de intoxicação alimentar. Os bacilos Gram-negativos da *P.aeruginosa* são amplamente distribuídos no solo e em fontes de água, é um patógeno oportunista resistente a muitos antibióticos, causam frequentes surtos de dermatites. E a *C. freindii* causa infecções do trato urinário e infecções de feridas cirúrgicas (TORTORA, 2012).

As secreções de *D. muelleri* e *L. labyrinthicus* apresentaram ausência na inibição microbiana. Fato que pode estar relacionado ao ambiente limpo que os anuros são mantidos no Instituto Butantan, tendo assim pouco estímulo para a produção de peptídeos antimicrobianos. Outro fator associado a esse resultado negativo é a degradação dos peptídeos presentes na secreção cutânea dos anuros quando desidratada, que podem perder seu poder de ação (CONLON; SONNEVEND, 2010). Porém, mesmo que essas secreções não tenham demonstrado o efeito desejável, não se pode descartá-las para outros estudos ou ações farmacológicas não abordadas nesse trabalho.

Foram testados diversos solventes (Acetato pH 5, Formiato pH 3, Citrato pH 4, Ácido fórmico 0,05% e TFA) na busca de produzir uma solução mais homogênea das secreções liofilizadas. Pois cada secreção apresenta particularidades que dificultavam sua solubilização. Os solventes que apresentaram boa diluição das secreções foram o acetato pH 5, ácido fórmico 0,05% e o TFA, mostrando afinidade maior por solventes apolares. Mesmo os solventes terem apresentados uma ação antimicrobiana, fica visível nas placas que os halos são potenciados com a adição da secreção.

Outro fator que pode influenciar a atividade e produção de peptídeos antimicrobianos é quando, a exposição desses animais a micro-organismos patogênicos é reduzida, tendo sua produção estabilizada novamente apenas quando eles são novamente introduzidos em ambiente rico em micro-organismos, sendo somente quando exposto ao ambiente natural à síntese dos

peptídeos pode ser observada melhor. (CONLON; SONNEVEND, 2010; PUKALA et. al., 2006).

A secreção cutânea da espécie de *L. labyrinthicus*, foi coletada de um espécime capturado e mantido em cativeiro por anos, ou seja, sua produção de peptídeos pode estar comprometida e ter interferido nos resultados. No caso do *D. muelleri*, por ser um animal de hábitos subterrâneos, antes da coleta da secreção o animal era lavado em água corrente para retirar os resíduos de terra. Essa limpeza mesmo que superficial, pode ter empobrecido a quantidade de peptídeos presentes na estimulação mecânica realizada logo após a retirada de terra. Seria interessante em um trabalho futuro, comparar a ação microbiana da secreção cutânea coletada desses animais mantidos em cativeiro, que recebem uma alimentação constante e pouco diversificada, com a secreção de animais recém-coletados, em um ambiente pouco antropizado e rever a forma de coletar a secreção cutânea no caso da espécie de *D. muelleri*.

Segundo Colon o sistema imune inato dos anuros permite a colonização de bactérias simbiotes benéficas que auxiliam no combate contra patógenos, mostrando que essa relação potencializa a produção de peptídeos antimicrobianos e antifúngicos. Assim a destruição ou a mudança de habitat pode ser responsável pela diminuição de secreções antimicrobianas que protegem o animal.

As constantes mudanças causadas no meio ambiente pela alteração do clima e as interferências antropológicas contribuem para surtos de doenças em varias espécies de anfíbios. Uma provavelmente vulnerabilidade dos anfíbios está relacionada às características de pele, pois, sendo esse um substrato muito permeável, permite a livre passagem de elementos disponíveis no ambiente e está mais sujeito às infecções por micro-organismos (ASSIS, 2012).

Evidências sugerem que a microbiota simbiote pode ser importante na prevenção de doenças em anfíbios (HARRIS et al., 2006; HARRIS et al., 2009; LAUER et al., 2007; WOODHAMS et al., 2007). Esses atributos inerentes à pele dos anfíbios podem ser afetados pelas condições ambientais às quais os animais são expostos e de que pode haver relação entre as secreções

cutâneas e o perfil de microbiota residente. Se isso de fato ocorrer, haveria então uma relação complexa na qual o ambiente pode afetar os mecanismos de proteção da pele – secreções e microbiota – e essas mudanças, por sua vez, podem afetar a susceptibilidade dos indivíduos à ação de agentes patogênicos. Após remoção dessa microbiota, o hospedeiro pode se tornar mais susceptível à infecção por patógenos e ao desenvolvimento de doenças (WOODHAMS et al., 2007).

O uso de peptídeos com propriedades bactericidas pode contornar o problema da resistência bacteriana aos antibióticos convencionais, por apresentar um mecanismo de ação imediato atuando de forma específica que leva a lise celular das bactérias. Em contrapartida o mecanismo de ação dos antibióticos clássicos é baseado na inibição de determinadas enzimas e necessita de um determinado tempo para se mostrar eficiente (NASCIMENTO et. al., 2004). Mostrando ser uma alternativa eficaz no combate às bactérias resistentes aos antibióticos convencionais por ter outro mecanismo de ação sobre as mesmas, impedindo a criação de novas resistências.

Por fim, este estudo demonstra a importância do estudo desses peptídeos como modelo para o combate de bactérias resistentes aos antibióticos existentes.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi mostrada a ação antimicrobiana das secreções cutâneas das espécies de *R.icterica*, *P.burmesterie* *T.resinifictrix*, apresentando halos de inibição microbiana em algumas de suas frações, sendo estas promissoras para o possível desenvolvimento de novos fármacos.

Foi possível visualizar halos de inibição nas bactérias Gram-negativas e Gram-positiva.

Os solventes mais eficazes e eficientes para as secreções testadas foram acetato pH 5, ácido fórmico 0,05% e o TFA.

Embora a espectrometria de massa não tenha detectado as moléculas dessas frações, observamos que a atividade antimicrobiana foi detectável em todas as etapas de fracionamento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMPHIBIA web. California. Information on amphibian biology and conservation. Disponível em: <<http://amphibiaweb.org/>>. Acesso em: 15 de março de 2014.

ARAÚJO, H. S. S. de; SOUZA, D. H. F. de. **Métodos em Toxinologia**: toxinas de serpentes, São Carlos: EdUfscar, 2007. p. 258.

ASSIS, A. B. de. Microflora, skin secretions and microclimate: implications for amphibians. **Revista da Biologia** v. 8, p.45-48. 2012.

BERNARDE, P. S.; SANTOS, R. A. **Utilização medicinal da secreção (“vacina-do-sapo”) do anfíbio kambô (*Phyllomedusa bicolor*) (Anura: Hylidae) por população não-indígena em Espigão do Oeste, Rondônia, Brasil.** Biotemas, v. 22, n. 3, p. 213-220, set. 2009.

BENÍCIO, T.; RODRIGUES, R. A.; SALLES, R. O. L. **Herbivoria em *Rhinella icterica* (amphibia: anura: bufonidae).** Saúde & Amb. Rev., Duque de Caxias, v.6, n.1, p.01-03, 2011.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptide: pore formers or metabolic inhibitor in bacteria? **Nature Reviews Microbiology.** v. 3, p. 238-250. 2005.

CARVALHO, A. C. **Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos isolados das secreções cutâneas de anuros dos gêneros *Proceratophrys*, *Physalaemus* e *Hypsiboas*.** 124f. Dissertação (Mestrado em biologia animal)– Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

CHEN, T.; GAGLIARDO, R.; WALKER, B.; ZHOU, M.; SHAW, C. Partial structure of the phylloxin gene from the giant monkey frog, *Phyllomedusa bicolor*: parallel cloning of precursor cDNA and genomic DNA from lyophilized skin secretion. **Peptides**, v. 26, p.2624-2628, 2005.

CONLON, J. M.; IWAMURO, S.; KING, J. D. Dermal cytolytic peptides and the system of innate immunity in anurans. **Annals of the New York Academy Sciences**, v.1163, p.75-82, 2009.

COLON, J. M.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N. Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, n. 8, p. 1556-1563, 2009.

CONLON, J.M.; SONNEVEND, A. Antibacterial peptides in frog skin secretions. **Methods Molecular Biology**, v. 618, p. 3-14, 2010.

DALY, J.W.; MYERS, C.W. 1967. Toxicity of Panamanian poison frogs (*Dendrobates*): Some biological and chemical aspect. **Science**, v.156, n. 3777, p. 970-973, maio. 1967.

DOCKRAY, G. J.; HOPKINS, C.R. Caerulein secretion by dermal glands in *xenopus laevis*. **J. Cell Biol**, v. 64, n. 3, p. 724–733, 1975.

DORNELLES, M. F.; MARQUES, M. da G. B.; RENNER, M. F. Revisão sobre toxinas de Anura (Tetrapoda, Lissamphibia) e suas aplicações biotecnológicas. **Ciência em Movimento**, ano 12, n. 24, 2010.

FAIVOVICH, J.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. A.; FROST, D. R.; CAMPBELL, J. A.; WHEELER, W. C. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, n. 294, 2005.

GE, Y.; MACDONALD, D.; HENRY, M. M.; HAIT, H. I.; NELSON, K. A.; LIPSKY, B. A.; ZASLOFF, M. A.; HOLROYD, K. J. In vitro susceptibility to pexiganan of bacteria isolated from infected diabetic foot ulcers. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 35, n.1, p. 45-53, 1999.

GOTTLER, L. M.; RAMAMOORTHY, A. Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan- a highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1788, n. 8, p.1680-1686, 2009.

HARRIS, R. N.; JAMES, T. Y.; LAUER, A.; SIMON, M. A. & PATEL, A. **Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species.** *EcoHealth*, v.3, p. 53–56, 2006.

HARRIS, R. N. **Symbiotic bacteria contribute to innate immune defences of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*.** *Biological Conservation*, v. 138, p, 390–398, 2007.

HARRIS, R. N.; BRUCKER, R. M.; WALKE, J. B.; BECKER, M. H.; SCHWANTES, C.R.; FLAHERTY, D. C.; LAM, B. A.; WOODHAMS, D. C.; BRIGGS, C. J.; VREDENBURG, V. T. & MINBIOLE, K. P. C. **Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus.** *The ISME Journal*, v.3, p. 818-824, 2009.

JURETIĆ, D.; VUKICEVIĆ, D.; ILIĆ, N.; ANTČEVA, N.; TOSSI, A. Computational design of highly selective antimicrobial peptides. **J Chem Inf Model**, v. 49, p. 2873-82, 2009.

KYLE, A. A.; DAHL, M. V. Topical therapy for fungal infections. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 5, n. 6, p. 443–451, 2005.

LAUER, A.; SIMON, M. A.; BANNING, J. L.; ANDRE, E.; DUNCAN, K. & HARRIS, R. N. **Common cutaneous bacteria from the eastern red-backed salamander can inhibit pathogenic fungi**. *Copeia*, v. 2007, n. 3, p. 630–640, 2007.

LIMA, A. P.; MAGNUSSORI, W. E.; MENIN, M.; ERDTMANN, L. K.; RODRIGUES, D. J.; KELLER, C.; HÖDL, W. **Guia de sapos da Reserva Adolpho Ducke: Amazônia Central**. Manaus: Attema Design Editorial, 2008. p.168.

MANUAL da GE Healthcare. Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography: principles and methods. General Electric Company, 2006.

MÁRQUEZ, C. A. P. **Purificação e caracterização de um análogo da ocelatina-P1 isolado da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus***. 74f. Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília. Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, 2012.

NASCIMENTO, A. C. C.; ZANOTTA, L. C.; KYAW, C. M.; SHWARTZ, E. N. F.; SHWARTZ, C. A.; SEBBEN, A.; SOUSA, M. V.; FONTES, W.; CASTRO, M. S..Ocellatins: New antimicrobial peptides from the skin secretion of the South America frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). **The protein Journal**, v.23. p. 501-508, 2004.

NASCIMENTO, A. C. C.; ZANOTTA, L. C.; KYAW, C. M.; SHWARTZ, E. N. F.; SHWARTZ, C. A.; SEBBEN, A.; SOUSA, M. V.; FONTES, W.; CASTRO, M. S..Ocellatins: New antimicrobial peptides from the skin secretion of the South

America frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). **The protein Journal**. v. 23. p. 501-508. 2004.

NASCIMENTO, L. B.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C.A.G. Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomps* Jiménez-de-la-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindacher, 1863 (amphibia, anura, leptodactylidae). **Arq. MUs. Nac.**, Rio de Janeiro. v. 63. p. 297-320. 2005.

NEGRI, L.; ERSPAMER, G. F.; SEVERINI, C.; POTENZA, L. L.; MELCHIORRI, P.; ERSPAMER, V. Dermorphin – related peptides from the skin of “*Phyllomedusa bicolor*” and their amidated analogs activate two μ opioid receptor subtype that modulate antinociception and catalepsy in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 89. p. 7203-7207, 1992.

NOMURA, F.. **Ecologia reprodutiva e comportamento de forrageio e escavação de *Dermatonotus muelleri* (Boettger, 1885) (Anura, Microhylidae)**. 95f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2003.

PÁL, T.; ABRAHAM, B.; SONNEVEND, Á.; JUMAA, P.; CONLON, J. M. **Brevinin-1BYa: a naturally occurring peptide from frog skin with broad-spectrum antibacterial and antifungal properties**. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 27, n. 6, p. 525-529, 2006.

PRATES, M. V.; BLOCH, J. C. **Peptídeos antimicrobianos**. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, vol.3, n. 17, nov. – dez. 2000.

PUKALA, T. L.; BOWIE, J. H.; MASELLI, V. M.; MUSGRAVE, I. F.; TYLER, M. J. Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. **The Royal Society of Chemistry**. v. 23. p. 368-393. 2006.

RIBEIRO-JÚNIOR, J. W. & BERTOLUCI, J. **Anurans of the cerrado of the Estação Ecológica and the Floresta Estadual de Assis, southeastern Brazil**. Biota Neotrop., 9(1):<http://www.biotaneotropica.org.br/v9n1/en/abstract?inventory+bn027090> 12009. 2009.

ROLLINS-SMITH, L. A.; DOORSSAM, J. K.; LONGCORE, J. E.; TAYLOR, S. K.; SHAMBLIN, J. C.; CAREY, C.; ZASLOFF, M. A. Antimicrobial peptide defense against pathogens associated with global amphibian declines. **Development and Comparative Immunology**. v. 26. p. 63-72. 2002

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal Adaptação e Meio Ambiente**. 5.ed. São Paulo: Santos, 2010. 611p.

SEBBEN, A.; SCHARTZ, C. A.; CRUZ, J. S.. A defesa química dos Anfíbios. **Ciência Hoje**. v.15. p. 25-33. 1993

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462. p. 55–70. 1999.

SILVA, M. O. da. **História natural de *Trachycephalus mesophaeus* (HENSEL, 1867) (anura: hylidae) no parque florestal do rio da onça, município de matinhos, estado do Paraná**. 88f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/?page_id=652. Acesso em 15 de março de 2014.

SONNE, L.; ROZZA, D. B.; WOLFFENBÜTTEL, A. N.; MEIRELLES, A. E. W. B.; PEDROSO, P. M. O.; OLIVEIRA, E. C. de; DRIEMEIER, David. **Intoxicação por veneno de sapo em um canino**. *Ciência Rural*, v.38, n.6, p.1787-1789, 2008.

SUGAI, J. L. M. M. **Comunidade de anuros e influência da estrutura ambiental de veredas na composição de espécies em parte da bacia do alto taquari, norte do mato grosso do sul**. 77f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação)- Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.

TOLEDO, R. C.; JARED, C.. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comp Biochem Physiol**, v. 111. p. 1–29. 1995

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 301-414p.

VITT, L. J.; CALDWELL, J. P.. **Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**. 3. ed. San Diego: Elsevier, 2009. 697p.

VOET, D; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 1481p.

WANDERLEY, P. S. **Anatomia comparativa da vascularização e conformação do trato gastrointestinal e morfometria do ducto colédoco no gênero *Pseudis* (Anura, Helidae, Hylinae)**. 70f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal)- Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

WOODHAMS, D. C.; VREDENBURG, V. T.; SIMON, M. A.; BILLHEIMER, D.; SHAKHTOUR, B.; SHYR, Y.; BRIGGS, C. J.; ROLLINS-SMITH, L. A. & HARRIS, R. N. **Symbiotic bacteria contribute to innate immune defences of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa***. *Biol. Conserv.* v. 138. p. 390–398, 2007.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides in health and disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 15, p. 1199-1200, 2002.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**. v. 415. p.389-395. 2002.