

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Peptídeos antimicrobianos de *Hypsiboas cinerascens* (Spix, 1824).

RICHARDSON ALVES DE ALMEIDA

MANAUS, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Peptídeos antimicrobianos de *Hypsiboas cinerascens* (Spix, 1824).

RICHARDSON ALVES DE ALMEIDA

Dissertação apresentada à
Coordenação do Programa de Pós –
graduação em Química, da
Universidade Federal do Amazonas,
com parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Química Orgânica.

MANAUS, 2011

RICHARDSON ALVES DE ALMEIDA

Peptídeos antimicrobianos de *Hypsiboas cinerascens* (Spix, 1824).

Dissertação apresentada à
Coordenação do Programa de Pós –
graduação em Química, da
Universidade Federal do Amazonas,
com parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Química Orgânica.

Orientador: Túlio de Orleans Gadelha Costa

Co-orientador: Afonso Duarte Leão de Souza

MANAUS, 2011

ALMEIDA, Richardson Alves
Peptídeos antimicrobianos de *Hypsiboas*
cinerascens
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Dissertação de Mestrado

Palavras chaves:

1. Anfíbios
2. Anuros
3. Secreção
4. *Hypsiboas*
5. Peptídeos
6. Pele

Almeida, Richardson Alves de

A47p Peptídeos antimicrobianos de *Hypsiboas cinerascens* /
Richardson Alves de Almeida. - Manaus: UFAM, 2011.
83 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) — Universidade
Federal do Amazonas, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Túlio de Orleans Gadelha Costa

Co-orientador: Afonso Duarte Leão de Souza

1. Anfíbios 2. Anuros 3. *Hypsiboas* I. Costa, Túlio de Orleans
Gadelha (Orient.) II. Souza, Afonso Duarte Leão de (Co-orient.) III.
Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 597.8(043.3)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Amazonas, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição de quem interessar.

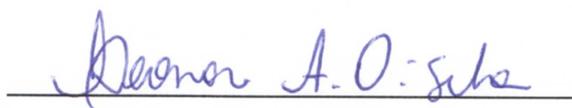
RICHARDSON ALVES DE ALMEIDA

Banca Examinadora



Dr. Túlio de Orleans Gadelha Costa

Universidade Federal do Amazonas - UFAM



Dr^a. Leonor Alves Oliveira da Silva

Universidade Federal do Amazonas - UFAM



Dr. Jorge Luis Lopez-Lozano

Universidade do Estado do Amazonas – UEA

Dedico esse trabalho a Deus, minha Mãe
Maria Zuleide, aos meus Irmãos, e todos
aqueles que sempre estiveram do meu
lado e me deram apoio.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, pela minha vida e por ter sempre me dado saúde e coragem para vencer meus desafios. Obrigado, Senhor!

De forma mais que especial, agradeço minha mãe, Maria Zuleide Alves do Nascimento, que sempre cuidou de mim, me educou e me ensinou os valores da vida como: simplicidade, honestidade, esforço e respeito. Obrigado, minha mãe, eu amo muito você! Agradeço, também, a toda a minha família, em especial aos meus irmãos, aqueles que sempre me ajudaram e que nunca negaram demonstrações de amor e carinho por minha pessoa.

Aos amigos, parte importantíssima em qualquer etapa na vida. Talvez seja difícil lembrar aqui o nome de todos, porém, em especial: Romildo, Rafael Sebastião, Rafael Castro, Felipe, João Vitor, Hector, Priscila e ao meu amor Elzalina que sempre esteve, e espero que sempre esteja ao meu lado nas próximas etapas da minha vida. Aos amigos do Grupo de Jovens Amigos de Cristo GRUTAC, por tantos anos de convivência familiar.

Obrigado aos amigos e companheiros de laboratório de espectrometria de massa (LEM) da EMBRAPA-BRASILIA, por tornarem a execução desse projeto uma atividade tão prazerosa e fazerem do ambiente de pesquisa um lugar no qual o tempo não importa: Eder, Eduardo, Jorge (Taquita), Bloch, Maura, Luciano, Guilherme, Flávio, Natália, Beatriz, Marcelo, Magali, Andreia, Sifú. Em especial a um grande amigo que me ajudou bastante, José de Lima Cardozo (Zé) que teve muita paciência comigo e sempre me apoiou até nas madrugadas de estudo. Obrigado a todos pelo auxílio intelectual, vocês todos fazem parte da minha formação.

Obrigado, Rafael, João Vitor e o Professor Túlio, pela companhia nas saídas de campo realizadas, por tornarem essas obrigações mais um momento prazeroso desse

projeto. Um obrigado muito justo e necessário aos meus orientadores e amigos, Túlio de Orlelha Gadelha Costa e Afonso Duarte Leão de Souza por toda a convivência, aprendizagem e por me aceitarem como aluno. Obrigado mais do que justo e especial aos professores Carlos Bloch Junior e Marcelo Porto Bemquerer por acreditarem em meu potencial e me aceitarem em seu laboratório me ensinando os valores da ciência. Com vocês tenho aprendido que a pesquisa é uma atividade séria, a qual requer muita responsabilidade, mas que deve ser realizada de forma prazerosa. Obrigado pelo exemplo singular de vida acadêmica e por apoiarem o projeto aqui apresentado.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal do Amazonas por me aceitar em seu corpo docente. Ao CAPES e FAPESAM pela bolsa de estudos propiciando o suporte necessário ao desenvolvimento desse projeto.

Por fim, obrigado a todos aqueles que de uma maneira ou de outra me apoiaram no desenvolvimento desse projeto.

I – ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01 – Distribuição de espécies de anfíbios no mundo (AMPHIBIAWEB).....	19
Figura 02 - Numero de espécies em perigo (AMPHIBIAWEB 2010)	20
Figura 03 - Corte histológico da derme de <i>Odontophrynus</i>	21
Figura 04 - Exemplos das diferentes classes de alcaloides encontrados em anfíbios	25
Figura 05 - Modelo Ação de detergente (Detergent-like).....	31
Figura 06 - Modelo barril (Barrel stave).....	32
Figura 07 - Poro toroidal (Toroidal Pore).....	32
Figura 08 – <i>Hypsiboas cinerascens</i>	39
Figura 09 – Distribuição Global (AMPHIAWEB 2010).....	39
Figura 10 – Obtenção da secreção de <i>H. cinerascens</i> por estimulação elétrica (EXHC).....	44
Figura 11. Produtos usados na síntese.	50
Figura 12. Mecanismo para desproteção da Resina	50
Figura 13. Mecanismo da reação de ativação do aminoácido.....	50
Figura 14. Mecanismo do acoplamento do primeiro resíduo de aminoácido.....	51
Figura 15. Reação geral de síntese.	51
Figura 16 - Fracionamento de extrato de <i>H. cinerascens</i> por cromatografia de fase reversa.....	54
Figura 17 – Espectro de massa de peptídeos presente na fração 24.....	55
Figura 18 - Espectro de massa de peptídeo presente fração 05.....	56
Figura 19 - Espectro de massa de peptídeo presente na fração 67.....	56
Figura 20 - Espectro de massa de peptídeo presente na fração 32.....	57
Figura 21. Pele seca de <i>H. cinerascens</i> fixada em uma placa de MALDI.	61
Figura 22. Área da pele a ser analisada por IMS.	62
Figura 23. Espectro de Massa total obtida por IMS.....	62
Figura 24. Ionização total da pele obtida por IMS.	63
Figura 25. IMS da fração 67.....	63
Figura 26. IMS fração 32.....	63
Figura 27. IMS peptídeo codificado pelo gene, com massa 2448.85 Da.....	64
Figura 28. IMS peptídeo codificado pelo gene com massa 2365.76 Da.....	64
Figura 29. IMS peptídeo codificado pelo gene com massa 2420.84 Da.....	64

Figura 30. IMS peptídeo codificado pelo gene com massa 1920.32 Da.....	65
Figura 31. IMS peptídeo codificado pelo gene com massa 1954.58 Da.....	65
Figura 32. Peptídeo intragênico de <i>Streptomyces albus</i> J1074.....	66
Figura 33. Espectro de massa de cinerascetina sintético bruto.....	66
Figura 34. Espectro de massa do peptídeo intragênico.....	67
Figura 35. Sequência peptídica de cinerascetina sintético.....	67
Figura 36. Sequência peptídica do peptídeo intragênico.....	68
Figura 37. Cromatograma do peptídeo sintético cinerascetina.....	69
Figura 38. Espectro de massa do peptídeo cinerascetina purificado.....	69
Figura 39. Cromatograma do derivado sintético de cinerascetina.....	70
Figura 40. Peptídeo intragênico purificado.....	70
Figura 41. Gráfico de taxa de crescimento da bactéria <i>Xantomonas axonopodis</i> pv. <i>Glycines</i> versus concentração do peptídeo.....	72
Figura 42. Ensaio antimicrobiano do peptídeo cinerascetina contra a bactéria <i>S. aureus</i>	72
Figura 43. Teste antimicrobiano do peptídeo cinerascetina contra a bactéria <i>B. cereus</i>	73
Figura 44. Teste antimicrobiano do peptídeo cinerascetina contra a bactéria <i>S. mutans</i>	73
Figura 45. Teste antimicrobiano do peptídeo cinerascetina contra a bactéria <i>C. albicans</i>	74

II – ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classes de Alcalóide de anfíbios.....	24
Tabela 2 – Exemplos de famílias de PAMs.....	34
Tabela 3. Peptídeos do gênero <i>Hypsiboas</i>	37
Tabela 4 - Frações obtidas por HPLC.	53
Tabela 5. Peptídeos encontrados no gene de <i>Hypsiboas cinerascens</i> e suas respectivas massas.	60

III - LISTA DE ABREVIACÕES

TTX -----	Tetrodotoxina.
PAMs -----	Peptídeos antimicrobianos.
mRNA -----	Ácido Ribonucleico mensageiro.
LPS -----	Lipopolissacarídeo.
CEEA -----	Comitê de Ética em Experimentação Animal
IBAMA -----	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
TFA -----	Ácido Trifluoroacético
CLAE -----	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EM -----	Espectrometria de Massa
IMS -----	Imagem por espectrometria de massa.
MALDI-TOF-TOF -----	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight - Time of Flight</i>
DNA -----	Ácido desoxirribonucleico
HBTU -----	Hexafluorofosfato de O-benzotriazola-N,N,N',N'-tetrametilurônio
DMF -----	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DIPEA -----	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
ACN -----	Acetonitrila
MIC -----	Concentração mínima Inibitória de Crescimento
N-Terminal -----	Amino – Terminal
C-Terminal -----	Carboxi – Terminal

IV – RESUMO

Secreções de pele de anfíbios são fontes ricas de substâncias biologicamente ativas com diversas funções fisiológicas e de defesa, a maioria de baixa massa molecular como as aminas biogênicas, alcaloides, esteroides, peptídeos e proteínas de massa molecular elevada.

O gênero *Hypsiboas*, pertencente à família Hylidae da classe dos anfíbios, apresenta-se como promissor fornecedor de peptídeos com potencial biológico. Peptídeos identificados de espécies de *Hypsiboas* apresentaram analogia a peptídeos antimicrobianos conhecidos. Neste trabalho foi realizado um estudo sistemático da secreção da cutânea de *Hypsiboas cinerascens* obtida por estimulação, onde foi possível identificar um novo peptídeo com ampla atividade antimicrobiana, o qual foi denominado de Cinerascetina. Sua sequência foi identificada por técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF) e confirmada por técnica de sequenciamento genético, sendo que através desse estudo de sequenciamento genético, também foi possível identificar seis novos peptídeos com possível atividade antimicrobiana.

Palavras Chave: anfíbios, anuros, secreção, *Hypsiboas*, peptídeo, pele.

V – ABSTRACT

Amphibian skin secretions are rich sources of biologically active substances with various physiological functions and defense, most of low molecular weight, as biogenic amines, alkaloids, steroids, peptides and proteins of high molecular weight. The genus *Hypsiboas*, belonging to the family Hylidae from class of amphibians, presents as promising supplier of peptides with biological potential. Peptides identified of species *Hypsiboas* are analogous to the known antimicrobial peptides. This work was realized a systematic study of the skin secretion of *Hypsiboas cinerascens* obtained by stimulation, where it was possible to identify a new peptide with wide antimicrobial activity, named cinerascetina. Its sequence was identified by techniques of high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MALDI-TOF-TOF) and confirmed by genetic sequencing, and was also possible identified six new peptides with possible antimicrobial activity.

Keywords: amphibiam, anura, secretion, *Hypsiboas*, peptide, skin.

SUMÁRIO

I – ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
II – ÍNDICE DE TABELAS.....	xii
III - LISTA DE ABREVIACÕES	xiii
IV – RESUMO	xiv
V – ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 – Alcaloides.	22
1.2 Peptídeos.	27
<i>1.2.1 Peptídeos Antimicrobianos.</i>	27
<i>1.2.1.1 Modo de ação de PAMs.</i>	29
1.3 Anuros Hylidae	36
<i>1.3.1 Gênero Hypsiboas</i>	36
<i>1.3.1.1 Hypsiboas cinerascens.</i>	38
2. JUSTIFICATIVA.....	40
3. OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivo Geral:	42
3.2 - Objetivos Específicos.	42
4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1. Coleta do Material.	43
4.2. Obtenção das Amostras.	43
<i>4.2.1. Estimulação Elétrica.</i>	43
4.3 – Isolamento e purificação dos constituintes.	45
4.4 – Dissecção da pele.	45
4.4 – Espectrometria de Massas.	46
<i>4.4.1. Espectrometria de Massas de Sistema MALDI-TOF-TOF.</i>	46
<i>4.4.1.1. Análise da imagem por MALDI.</i>	47
4.5 Identificação das Sequências Peptídicas.	48
4.6. Síntese peptídica em fase sólida.	48
4.7. Testes antimicrobianos.	52
5. RESULTADOS.....	52
5.1. Purificação do peptídeos.	52
5.2. Espectrometria de Massa (EM).	54
5.3. Identificação das sequências peptídicas.	57

5.4. Imagem por Espectrometria de Massas (IMS).	60
5.5 Síntese peptídica.	65
5.6. Testes antimicrobianos.	71
6. CONCLUSÃO.....	75
7. PERSPECTIVAS.	76
8. CRONOGRAMA SEMESTRAL DAS ATIVIDADES.	77
9. REFERÊNCIAS	78

1. INTRODUÇÃO

Desde o início dos tempos o homem sempre se apoiou na natureza para obter recursos e desenvolver-se, sem se preocupar com que podia acontecer com os recursos naturais. O ritmo com que algumas vegetações estão sendo eliminadas é assustador, as florestas tropicais no mundo foram reduzidas em quase 50% de seu tamanho em apenas um século, o que é mais grave, elas continuam sendo destruídas à razão de 130.000 km² por ano, o que leva milhares de espécies de todos os reinos a desaparecer, algumas que nem chegaram a serem estudadas causando prejuízos incalculáveis para o mundo (CÂMARA, 2001; FEARNSTIDE, 2006; LEITE, et al., 2006).

A Amazônia é a maior floresta tropical do mundo, também chamada de maior celeiro da biodiversidade da Terra, possui uma extensão total de 5.500.000 Km² (BARREIRO & BOLZANE, 2009).

Destes, cerca de 60% em território brasileiro conhecido como Amazônia Legal, que juntamente com a Mata Atlântica, Pantanal, Cerrado, Caatinga, Campos e Florestas Meridionais contribuem para que o Brasil seja detentor de um dos maiores bancos genéticos do planeta. O país abriga aproximadamente 20% de todas as espécies animais do planeta. A variedade da flora também é impressionante, possuindo cerca de 10 a 20% das 1,5 milhões de espécies já catalogadas. São 55.000 espécies de plantas, 524 de mamíferos, 1.677 de aves, 3.000 de peixes e, isso representa respectivamente 22%, 10,8%, 17,2% e 10,7% das espécies existentes no mundo (CAPOBIANCO, 2001; BARREIRO & BOLZANE, 2009).

Em relação aos anfíbios, os números também são extraordinários. São 833 espécies, equivalente a 12,6% das 6601 espécies estimadas no mundo (Figura 01), sendo estas agrupadas em três ordens: Anura (sapos, rãs e pererecas), Caudata ou

Urodela (salamandras) e Gymnophiona (cecílias ou cobras-cegas) correspondendo a respectivamente 88%, 9% e 3% (AMPHIBIAWEB, 2010).

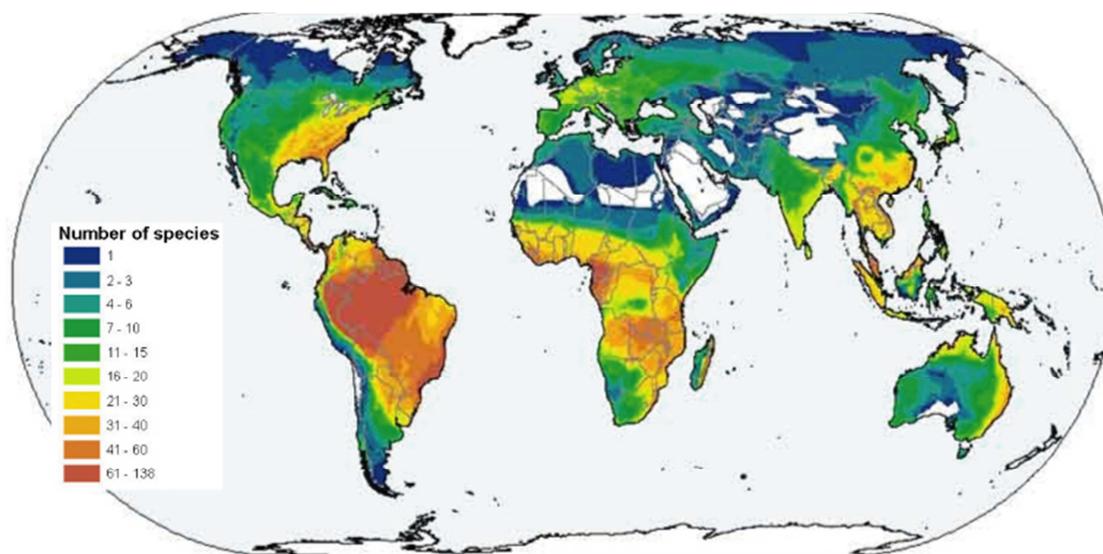


Figura 01 – Distribuição de espécies de anfíbios no mundo (AMPHIBIAWEB).

Historicamente os anfíbios estão associados às magias, mitos, crenças e lendas. Esses animais eram venerados pelas civilizações antigas; os egípcios atribuíram à criação do homem e de certos deuses a Heket, deusa que era representada por uma mulher com cabeça de rã. As mulheres, como gratidão, usavam um amuleto de metal na forma de rã pelos favores prestados; os chineses e indianos acreditavam que o mundo apoiava-se nas costas de um sapo gigante e que os terremotos eram provocados pela movimentação desse sapo.

As civilizações contemporâneas os vêem com certo asco, nojo e desprezo. Essa rejeição começou na Idade Média com os europeus que relacionavam esses animais com “coisas” do mal: bruxaria, pecado, hipocrisia, infertilidade e feiúra. Hoje, em processo de desmistificação, sabemos que são animais extremamente interessantes por sua grande diversidade de formas corporais, estratégias de vida e colorido, aspectos não observados

em nenhum outro grupo de vertebrado (LAMAR, 1997; DUELLMAN & TRUEB, 1986).

Os anfíbios constituem um elo importante na teia alimentar do ecossistema e possuem um grande valor farmacológico. São animais que passam parte da vida no meio aquático e meio terrestre, ou seja, dependem dos dois ambientes para sobreviver, essa característica os torna extremamente sensíveis a mudanças causadas em seu habitat natural sendo que o principal delas relacionadas às atividades humanas. Essa sensibilidade os torna grandes indicadores biológicos, são os primeiros a sofrer com as mudanças climáticas, predação, radiação ultravioleta, doenças, entre outros fatores que atuam isoladamente ou em conjunto provocando a redução do número de desovas e o aumento da mortalidade de embriões (MIGUEL, 2007).

Por essas e outras razões, suas populações estão declinando em diversos pontos do planeta (Figura 02), o que pode levar a um grave desequilíbrio da natureza com conseqüências desastrosas para o homem.

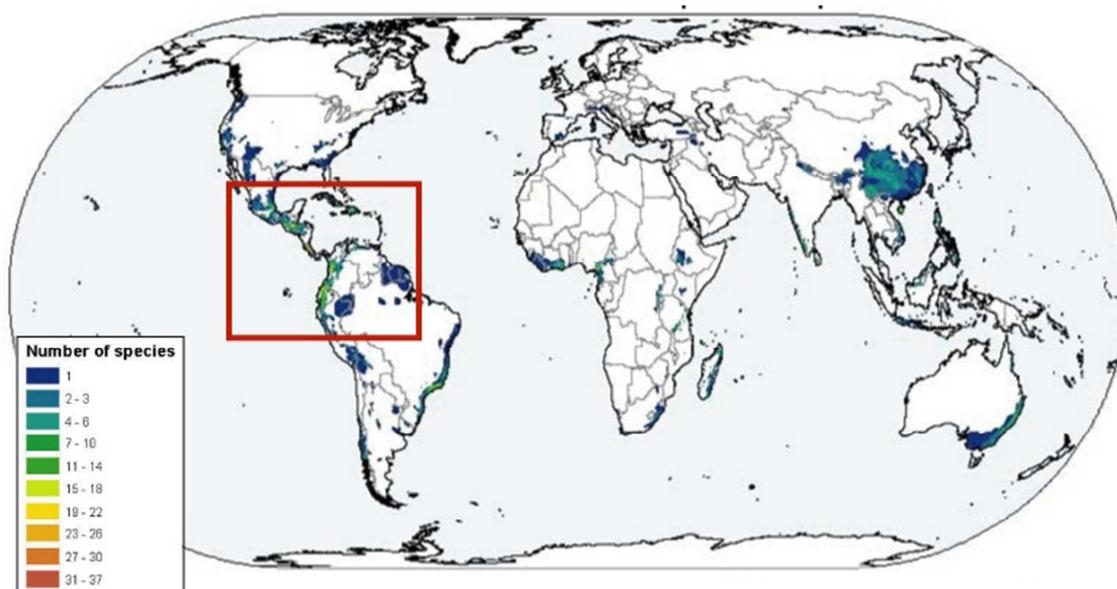


Figura 02 - Numero de espécies ameaçadas (AMPHIBIAWEB 2010)

Outro aspecto, tão importante quanto o ecológico, é o químico-farmacológico. Espécies que pertencem a essa classe (anfíbios), principalmente a ordem Anura, produzem, armazenam e secretam substâncias que podem trazer benefícios diretos ao homem (BERNARDE & SANTOS, 2009).

São animais de pele extremamente sensível, sendo que este é um órgão de grande importância que possui diversas funções como: respiração cutânea, transporte de água e solutos, regulação da temperatura entre outras (SEBBEN et al., 1993).

Na pele dos anuros são encontrados dois sistemas de glândulas totalmente distintas, as glândulas mucosas e as glândulas serosas (Figura 03). As glândulas mucosas são menores e distribuem-se por todo o corpo. São responsáveis por manter a pele úmida, propiciando a respiração cutânea. As glândulas serosas, são maiores e estão concentradas mais na parte superior da cabeça e são responsáveis pela produção e armazenamento substâncias biologicamente ativas, como: aminas biogênicas, alcaloides, esteroides, peptídeos, além de proteínas e glicoproteínas (ERSPAMER & MELCHIORRI, 1973; 1980; TOLEDO & JARED, 1995).



Figura 03 - Corte histológico da derme de *Odontophrynus*, evidenciando (E) epiderme, (M) glândulas mucosas e (G) glândulas serosas (SANDRA K. ACKERLEY, acesso 27/09/2010).

Nos últimos anos, ficou evidenciado que algumas substâncias presentes nas secreções cutâneas dos anuros possuem extraordinários efeitos farmacológicos, como por exemplo: irritantes locais, cardiotoxinas, miotoxinas e neurotoxinas, agentes colinomiméticos, simpatomiméticos, alucinogênicos, agentes citotóxicos e inibidores do crescimento de microrganismos (SEBBEN et al., 1993; LEITE et al., 2006; BRAND et al., 2006).

Destas substâncias encontradas as que mais se destacam são: os alcaloides e os peptídeos, principalmente os peptídeos antimicrobianos (PAMs).

1.1 – Alcaloides.

Os alcaloides constituem uma classe de metabólitos com grande diversidade em relação as suas estruturas e atividades farmacológicas, suas principais fontes no passado foram as plantas superiores (angiospermas). Porém, nos últimos anos observa-se um crescente aumento na identificação de alcaloides em animais, insetos, organismos marinhos, microorganismos, plantas inferiores e principalmente anfíbios, dos quais já são conhecidos mais de 800 diferentes tipos de alcaloides (DALY et al., 2005).

O mérito na identificação, isolamento, elucidação estrutural e atividade farmacológica dos alcaloides de anfíbios, em grande parte, pertence à DALY & WITKOP e seus colaboradores. Seus trabalhos e artigos de revisão (DALY & WITKOP, 1971; WITKOP & GOSSINGER, 1983; DALY et al., 1987; DALY et al., 1992; DALY, 1998; SPANDE et al., 1992a, 1992b; DALY et al., 2005; DALY et al., 2008) são a base para qualquer trabalho referente a alcaloides de anfíbios.

A presença de alcaloides provavelmente está relacionada com a dieta dos anfíbios. Esta hipótese é reforçada por estudos onde foi observado que os animais perderam sua toxicidade com a manutenção de adultos em cativeiro.

Além disso, indivíduos gerados por reprodução em cativeiro também não se apresentaram tóxicos (DALY et al., 1994, 1997; DALY, 1998). Formigas, besouros e centopeias que fazem parte da dieta de determinadas espécies de anfíbios, parecem ser a fonte de certos alcaloides das classes decaidroquinolina, izidina, coccinelina, e espiropirrolizidina presentes nos anfíbios.

A origem dos alcaloides pertencentes às principais classes como as pumiliotoxina, allopumiliotoxina e homopumiliotoxina, continuava um mistério, até que o trabalho de DALY e colaboradores (2002) mostrou que provavelmente eles também são originários da dieta desses animais e não de fatores genéticos como se imaginava.

Porém, estudos recentes colocam em dúvida essa hipótese, MEBS e seus colaboradores (2005) extraíram grandes quantidades de alcaloides dos grupos pumiliotoxina e hidroquinonas da pele *Melanophryniscus montevidensis* (Anura, Bufonidae), sendo que esses alcaloides não foram encontrados e nenhuma das vinte espécies de artrópodes coletados no mesmo ambiente do *M. montevidensis*, sendo que estes fazem parte da sua dieta.

A concentração de alcaloides na secreção cutânea pode variar qualitativamente e quantitativamente, inclusive entre populações diferentes de uma mesma espécie (SAPORITO et al., 2007). Nos anfíbios, a presença de alcaloides tóxicos, via de regra, é acompanhada por coloração aposemática, embora ocorram exceções (JUNIOR, 2002; SUGA, & MUNFSADA, 1988).

A classificação estabelecida por DALY et al., (2002) dos alcaloides detectados em pele de anfíbios inclui 22 classes estruturais diferentes com mais de 800 combinações (DALY et al., 2005).

Dentre as classes dos alcaloides de anfíbios destacam-se as seguintes: Batracotoxinas, Quinolizidinas, Indolizidinas, Pumiliotoxinas, Allopumiliotoxinas,

Deoxipumiliotoxina, Homopumiliotoxinas, Decaidroquinolina, Epibatidina, Tetradoxina, Histronicotoxina e Gephyrotoxina (tabela 01) (figura 04).

Tabela 01. Classes de Alcalóide de anfíbios.

Classe	Espécie	Exemplo	Referência
Batracotoxina	<i>Phyllobates terribilis</i>	Homobatracotoxina (01)	DALY et al., 2005
		Batracotoxinina A (02)	
Quinolizidinas	<i>Melanophryniscus klappenbachi</i>	275I (03)	DALY et al., 2008
	<i>Oophaga pumilio</i>	195C (04)	SAPORITO et al., 2007
Indolizidinas	<i>Oophaga pumilio</i>	167E (05)	DALY et al., 2005
		195B (06)	SAPORITO et al., 2007
Pumiliotoxinas	<i>Dendrobates pumilio</i>	307A (07)	DALY et al., 2005
		323B (08)	
Allopumiliotoxinas	<i>Oophaga pumilio</i>	267A (09)	SAPORITO et al., 2007
		323B (10)	
Deoxipumiliotoxinas	<i>Oophaga pumilio</i>	193H (11)	DALY et al., 2005
		235V (12)	
Homopumiliotoxinas	<i>Melanophryniscus klappenbachi</i>	249F (13)	DALY et al., 2008
	<i>Oophaga pumilio</i>	223G (14)	SAPORITO et al., 2007
Decaidroquinolina	<i>Dendrobates pumilio</i>	195A (15)	DALY et al., 2003
	<i>Epipedobates flavopictus</i>	219A (16)	MORTARI et al., 2004

Epibatidina	<i>Epipedobates tricolor</i>	Epibatidina (17)	DALY et al., 1980
		Phantasmidine (18)	FITCH et al., 2010
Tetrodotoxina	<i>Atelopus chiriquiensis</i>	TTX (19)	PAVELKA et al., 1977
Histrionicotoxina	<i>Dendrobates histrionicus</i>	283A (20)	DALY & WITKOP, 1971
	<i>Oophaga pumilio</i>	285A (21)	SAPORITO et al., 2007
Gephyrotoxina	<i>Dendrobates histrionicus</i>	Diidrogephyrotoxina (22)	DALY et al., 1987
		Gephyrotoxina (23)	

Para facilitar a nomenclatura desses alcaloides foi sugerido (DALY et al., 1978) um sistema de código que estabeleceu que eles fossem designados por suas respectivas massas moleculares nominais em negrito, e caso tivessem a mesma massa, uma ou mais letras seriam acrescentadas para diferenciá-los.

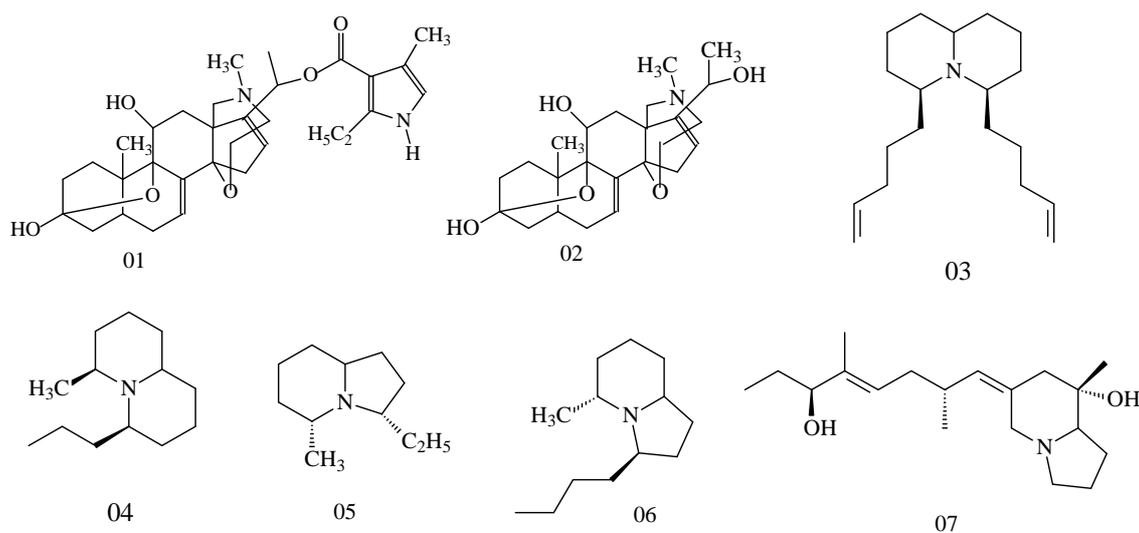


Figura 04 - Exemplos das diferentes classes de alcaloides encontrados em anfíbios

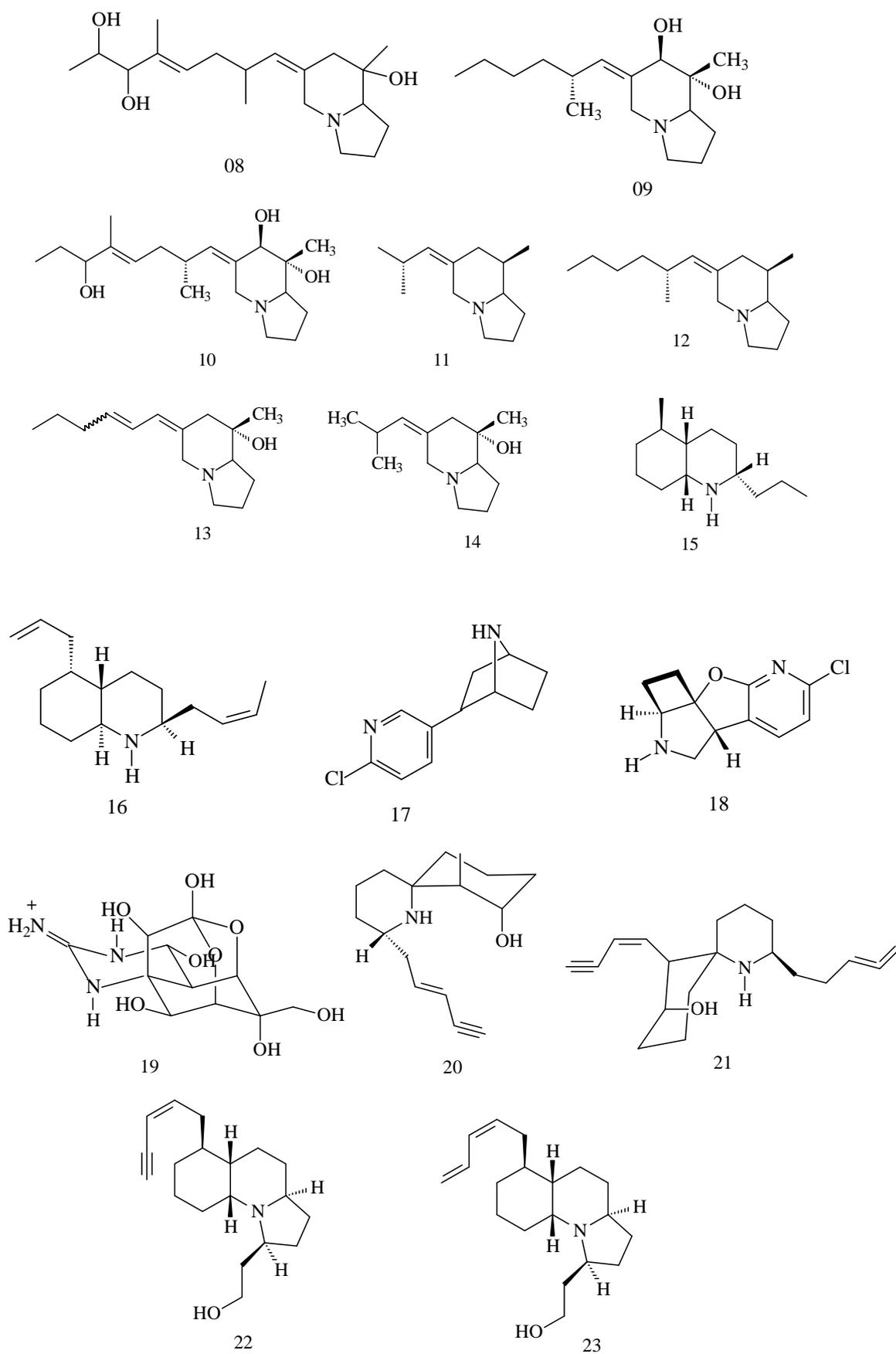


Figura 05 – Continuação.

1.2 Peptídeos.

Os peptídeos possuem propriedades farmacológicas bastante significativas. Contudo, a manipulação farmacológica e estudos sobre o modo de ação desses peptídeos ainda continua bastante defasada (RANG et al., 2000; HOSKIN & RAMAMOORTHY, 2008).

Esses peptídeos apresentaram, por meio de bio-ensaios, *in vitro* e *in vivo* espectro amplo de atividades, das quais se destacam as seguintes: atividades hemolítica, bactericida, anti-fúngica e hormonal. Alguns trabalhos estão destacando a enorme atividade anti-microbiana presente nas secreções de peles de anfíbios, especialmente contra fungos patogênicos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ZASLOFF, 2002; BOMAN, 1991), a qual apresenta um grande potencial terapêutico e farmacológico.

1.2.1 Peptídeos Antimicrobianos.

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) encontrados na secreção cutânea de anuros (sapos, rãs e pererecas), são sintetizados e processados a partir de uma única família de polipeptídeos precursores, sendo estes expressos na tradução de um RNA mensageiro característico, com regiões altamente conservadas entre os pertencentes às famílias Hylidae e Ranidae, o que sugere que espécies pertencentes a essas famílias possuem um ancestral em comum (NICOLAS et al., 2003).

Os peptídeos sintetizados e secretados por estes animais fazem parte de seu sistema imune inato de defesa, são potencialmente ativos contra um espectro largo de microorganismos patogênicos e alguns predadores, sendo que na maioria das vezes não apresentam toxicidade em células normais de mamíferos. Nesse sentido verifica-se que esses PAMs podem ser considerados modelos para produção de novos fármacos

(PRATES et al., 2004; BRAND et al., 2006; BOMAN, 1991; ZASLOFF, 1992; PIERRE, 2000).

A diversidade de PAMs é tão grande que se torna difícil categorizá-los, principalmente em relação à sua estrutura primária. Mas a maioria desses peptídeos possui características físico-químicas semelhantes, como: carga líquida positiva, devida à presença de resíduos catiônicos em sua estrutura primária. Todavia a principal delas consiste na habilidade do PAMs de dotar uma forma na qual grupamentos de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos fiquem espacialmente organizadas, adquirindo uma estrutura secundária em forma de α -hélice anfipática em meio apolar (ZASLOFF, 2002; NICOLAS et al., 2003).

A cada ano, vários novos PAMs são identificados a partir de espécies de anuros. Alguns desses novos peptídeos apresentam pouca ou nenhuma homologia com os já existentes, conseqüentemente novas famílias estão surgindo, sendo que atualmente esses peptídeos estão agrupados em, 28 famílias distintas (CONLON, et al., 2009e; ROLLINS – SMITH, 2009; ROLLINS-SMITH, L. A. & CONLON, J. M. 2005; NICOLAS et al., 2009; AMICHE et al., 2008).

Esses peptídeos apresentaram, por meio de bio-ensaios, *in vitro* e *in vivo* amplo espectro de atividades, contra fungos patogênicos, bactérias Gram-positivas e Gram – negativas (ABDEL-WAHAB, et al., 2008; MOR, et al., 1991; BOMAN, 1991;). Estima-se que esses efeitos estão inteiramente relacionados à suas características físico-químicas, comuns aos peptídeos antimicrobianos. (CHOU et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2008; BRAND et al., 2006; LEITE et al, 2005; BROGDEN, 2005; BECHINGER & LOHNER, 2006).

1.2.1.1 Modo de ação de PAMs.

O modo de ação dos PAMs ainda é conhecido de modo incompleto, mas o seu principal alvo parecem ser as membranas plásmáticas, sendo que a desestabilização dessas membranas ocasionando a morte celular a partir da sua lise, tem sido considerada o principal mecanismo pelo qual os PAMs exercem sua função. A diferença da estrutura e composição da membrana está diretamente relacionada com o modo de interação desses peptídeos. Estes são atraídos pelas superfícies das membranas das bactérias, através de ligações eletrostáticas, sendo este o ponto principal pelo qual os PAMs até agora caracterizados conseguem discriminar células procarióticas e eucarióticas. (BROGDEN, 2005; ZASLOFF, 2002).

A membrana plasmática de organismos procariontes e eucariontes difere em sua composição química, tanto no conteúdo do fosfolípídeos como na presença de outros componentes tais como esteroides (LEHNINGER, 2002).

As membranas bacterianas caracterizam-se por serem organizadas de tal forma que as regiões periféricas da bicamada lipídica voltada para o meio extracelular, possuem conteúdo elevado de fosfolípídeos carregados negativamente. Nas bactérias Gram-negativas, essa interação ocorre por meio dos lipopolissacarídeos (LPS) que são moléculas formadas de cadeias lipídicas e duas cadeias de oligossacarídeos, o oligossacarídeo central e a outra um oligossacarídeos específico (O-específica) o qual é o principal determinante do sorotipo da bactéria, sendo este carregado negativamente (HOSKIN & RAMAMOORTHY, 2008). Nas bactérias Gram-positivas essa interação ocorre com os ácidos teicoicos, que são polímeros de glicerol ou ribitol que não se apresentam entre as bactérias Gram-negativas. As unidades combinadas de ácidos teicoicos e lipídios denominam-se ácidos lipoteicoicos. Esses ácidos são carregados negativamente e, portanto contribuem para a interação dos PAMs com a membrana das

bactérias Gram-positiva (BROGDEN, 2005; HOSKIN & RAMAMOORTHY, 2008).

Em contraste a mesma face das membranas de animais é composta majoritariamente por fosfolipídeos neutros (fosfatidilcolina e esfingomielina), estando os fosfolipídeos carregados negativamente (fosfatidilserina e fosfatidilglicerol) voltados para o interior da célula, de frente para o citoplasma (BROGDEN, 2005). A presença de colesterol na membrana animal, também reduz a atividade de alguns PAMs, sendo que este efeito é causado pelo colesterol tornar a bicamada lipídica mais rígida, ocasionando uma maior estabilização, e dificultando assim interações possíveis entre o colesterol e os PAMs (ZASLOFF, 2002; EPAND & VOGEL, 1999).

Existem alguns modelos que tentam descrever como ocorre a interação dos PAMs com as membranas, os mais citados são: (1) ação de detergentes (Detergent-like), (2) formação de poros do tipo barril (Barrel stave) e (3) formação de poros toroidais (Toroidal Pore). Esses modelos podem ser separados em dois estágios cada. A primeira etapa, que ocorreria para todos os modelos, seria o PAMs interagindo com a membrana, posicionando-se na parte extracelular da membrana em forma de um tapete (HOSKIN & RAMAMOORTHY, 2008).

Modelo em que os PAMs agem como detergentes (Figura 05).

Após a formação do tapete, a uma grande quantidade de PAMs está presente na superfície da bicamada lipídica, onde a natureza anfipática do peptídeo permite que eles se comportem como detergentes arrancando pequenos pedaços da mesma e, ocasionando a desestruturação total da membrana plasmática, ocorrendo a formação de micelas a partir da membrana rompida (BROGDEN, 2005)

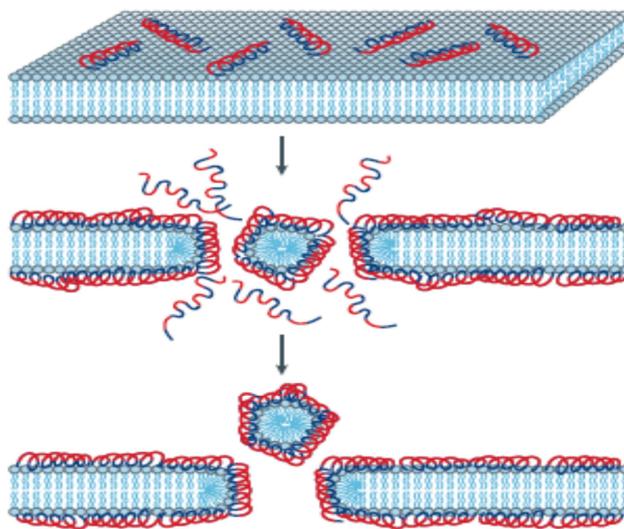
Modelo onde ocorre a formação de barril (Figura 06).

A formação de poros do tipo barril acontece quando os PAMs adquirem estrutura oligomérica, as regiões hidrofóbicas do peptídeo interagem com a região do

núcleo lipídico da bicamada e as regiões hidrofílicas peptídicas formam a região do interior dos poros, que podem medir $\approx 1,1$ nm (ZASLOFF, 2002; BROGDEN, 2005).

Modelo chamado Poro toroidal (Figura 07).

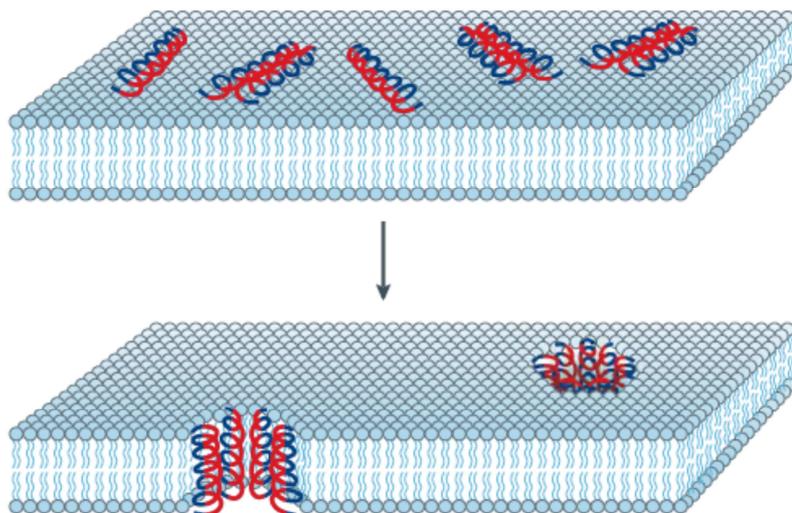
Os PAMs sobre a membrana inserem-se perpendicularmente, formando complexos com os fosfolipídeos, induzindo as monocamadas lipídicas a dobrarem-se formando pequenos poros permitindo a passagem de íons e macromoléculas. As regiões polares do PAMs se associam à cabeça polar da camada lipídica, em seguida a camada lipídica sofre uma curvatura que vai da parte externa até a face interna da camada lipídica. Portanto, ocorre a formação de um pequeno poro, que é revestido pelo peptídeo e pela camada lipídica (BROGDEN, 2005; HOSKIN & RAMAMOORTHY, 2008).



Fonte: BROGDEN, 2005

Figura 06 - Modelo Ação de detergente (Detergent-like).

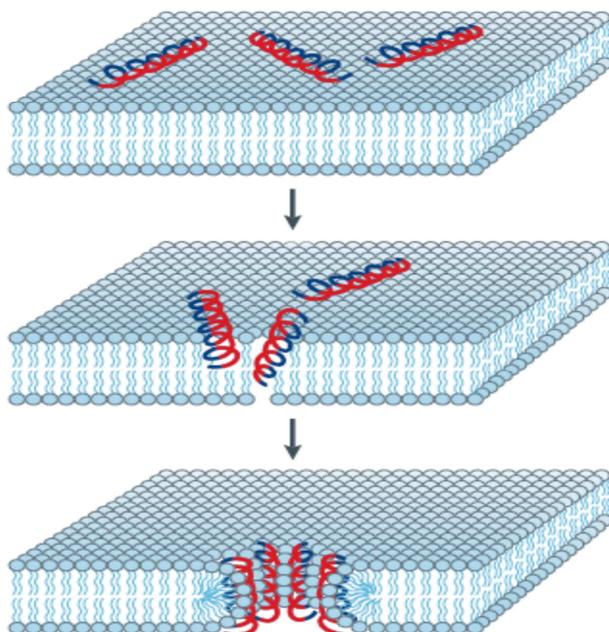
Esse modelo propõe que os peptídeos intercalam entre os grupos fosfolipídicos da bicamada causando tensão, curvatura e micelização. Regiões hidrofílicas são mostrados em vermelho e hidrofóbicas em azul.



Fonte: BROGDEN, 2005

Figura 07 - Modelo barril (Barrel stave).

Neste modelo, os peptídeos inserem-se na bicamada lipídica de modo que as regiões hidrofóbicas do peptídeo se alinhem com as regiões do núcleo lipídico, onde as regiões hidrofílicas do peptídeo formam a face interior do barril. As regiões hidrofílicas do peptídeo são mostrados em vermelho, e as regiões hidrofóbicas em azul.



Fonte: BROGDEN, 2005

Figura 08 - Poro toroidal (Toroidal Pore).

Neste modelo, uma pequena quantidade de peptídeos se agrega com a membrana, induzindo as monocamadas lipídicas a dobrarem-se. As regiões hidrofílicas do peptídeo são mostradas em vermelho, as regiões hidrofóbicas do peptídeo são mostradas em azul.

Como cada peptídeo vai agir frente à membrana plasmática está diretamente relacionado a como estão agrupados seus resíduos de aminoácidos e a que estrutura a molécula vai adquirir em meio extracelular. A quantidade de PAMs que presente no primeiro estágio também é um aspecto relevante.

O efeito final dos três modelos é ajudar na inserção dos PAMs nas membranas biológicas, ocasionando na morte celular (CHOU et al., 2010; BROGDEN, 2005; BECHINGER & LOHNER, 2006).

Além das atividades antimicrobianas, alguns desses peptídeos apresentam outras atividades farmacológicas, o que reforça ainda mais a sua utilização como agentes terapêuticos potentes. As Magaininas, que são reconhecidas como um potente antimicrobianos, apresentaram atividade antitumoral significativa (HOSKIN & RAMAMOORTHY, 2008; BAKER et al., 1993; CRUCIANE et al., 1991; OHSAKI et al., 1992). Alguns derivados sintéticos das magaininas possuem atividades antiviral contra herpes tipo I (GENCO et al., 2003) e magaininas A e C mostraram atividade espermicida (LAI et al., 2002). Os peptídeos polifemusina e taquifesina têm atividade anti-HIV (MALOY & KARI, 1995). A dermaseptina DS 01, isolada de *Phyllomedusa oreades*, apresentou atividade anti-*trypanosoma cruzi* (BRAND et al., 2002). Algumas bombininas possuem atividade hemolítica (MIELE et al., 1998). As Phylloseptinas, conhecidas por serem bactericidas, apresentaram também atividades anti-protozoário (LEITE, et al., 2005).

Tabela 02 – Exemplos de famílias de PAMs.

Família	Peptídeos	Estrutura	Espécie	Referência
Raniseptinas	RNSP 1	KVALGVAQNYLNPQQ	<i>Hypsiboas raniceps</i>	MAGALHÃES et al., 2008
Dermaseptinas	DShypo 4	GLWSTIKQKGKEAAIAAKA-AGKAVLNAASEAL	<i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	BRAND et al., 2006
Amolopinas	Amolopin P1	NILSSIVNGINRALSFF	<i>Amolops loloensis</i>	WANG et al.; 2008
Pleurainas-As	Pleurain-A1	SIITMTKEAKLPOLWKOIACRL-YNTC	<i>Rana pleuraden</i>	WANG et al., 2007
Esculentinas-2-AL	Esculentin-2-Ala	GIFALIKTAAKFVGNLLKQA-GKAGLEHLACKANNQC	<i>Amolops loloensis</i>	WANG et al., 2010
Temporinas	Temporin-CPa	IPPFIKKVLTTVF	<i>Lithobates capito</i>	CONLON et al., 2009c
Phylloseptinas	Phylloseptin-L2	FLSLIPHVISALSSL	<i>Hylomantis lemur</i>	YASSER et al., 2008
Brevininas-1	Brevinin-1BLc	FLPIIAGIAAKFLPKIFCTISKKC	<i>Lithobates blairi</i>	CONLON et al., 2009b
Brevininas-1	Brevinin-1LT1	FMGSALRIAAKVLPAALCQIFKCC	<i>Hylarana latouchii</i>	WANG et al., 2009
Temporinas	Temporin-LT1	FLPGLIAGIAKML	<i>Hylarana latouchii</i>	WANG et al., 2009
Shuchinas	Shuchin 1	NALSMPRNKCNRALMCFG	<i>Rana shuchinae</i>	ZHENG et al., 2010
Brevininas-1	Brevinin-1CDYb	FFPLALLCKVFKCC	<i>Rana dybowskii</i>	JIN et al., 2009
Nigrocinas -2	Nigrocin-2HSb	GLLGSIFGAGKKIACALSGLC	<i>Odorrana hosii</i>	CONLON et al., 2008
Temporinss	Temporin-PTa	FFGSVLKLIPKIL	<i>Hylarana picturata</i>	CONLON et al., 2008

Esculentinas-2	Esculentin – 2ERb	GILNTLKNVGLGVLKGAGKGAL-NAVLCCKMNNNC	<i>Hylarana erythraea</i>	AL-GHAFERI et al., 2010
Ranatueringas-2	Ranatueringin-2CPa	GIMDTIKDTAKTVAVGLLDKIKC-KITGC	<i>Lithobates capito</i>	CONLON et al., 2009c
Plasticinas	Plasticin-L1	GLVNGLLSSVLGGGQGGGGLLG-GIL	<i>Leptodactylus laticeps</i>	CONLON et al., 2009a
Ocellatins	Ocellatin-L2	GVVDILKGAADKDLAHLATKVM-DKLL	<i>Leptodactylus laticeps</i>	CONLON et al., 2009a
Bufoforins	Bufoforin II	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	<i>Bufo bufo gargarizans.</i>	CHO et al., 2009
Nigrocinas-2	Nigrocin-2HSa	GLLGSFLGAGKKVACALSGLC	<i>Hylarana picturata</i>	CONLON et al., 2008
Japocinas-1	Japocin-1CDYa	FFPLALLCKVFKKC	<i>Rana dybowskii</i>	JIN et al., 2009
Palustrinas-2	Palustrin-2Oa	GLWDNIKNFVKTFALNAIEKLKC-KITGGCPP	<i>Rana ornativentris</i>	OHNUMA et al., 2010
Dermatoxinas	DRT-J1	SLGGFLKGVGKALAGVGKVVAD-QFGNLLQAGQ	<i>Phasmahyla jandaia</i>	RATES et al., 2010
Alyteserinas	Alyteserins-1a	GLKDIFKAGLGSVLKGSVLKGI-AHVAN	<i>Alytes obstetricans</i>	CONLON et al., 2009d

1.3 Anuros Hylidae

As espécies pertencentes a família Hylidae estão distribuídas na América do Sul e do Norte, Índia Ocidental, Eurásia Temperada, extremo norte da África e no arquipélago japonês (AMPHIBIAN SPECIES OF THE WORLD 5.4 2010). Os animais variam de pequenos a grande em tamanho e geralmente têm discos adesivos na ponta dos dedos, distinguem-se pelo dedo do pé que contem uma pequena cartilagem da falange terminal, que pode ajudar na escalada (AMPHIBIAN SPECIES OF THE WORLD 5.4). Destaca-se entre as outras famílias por quantidade e diversidade de moléculas. principalmente os PAMs (NICOLAS et al., 2003).

Esta família foi taxonomicamente revista por FAIVOVICH et al., 2005. É constituída por 886 espécies agrupadas em três subfamílias, sendo a *Hylinae* com 631 espécies, a *Pelodyadinae* com 195 e e a *Phyllomedusinae* com 60 espécies (AMPHIBIAWEB, 2010).

1.3.1 Gênero *Hypsiboas*

O gênero *Hypsiboas* possui cerca de 83 espécies, são encontradas nos Trópicos na America do Sul desde a Nicarágua até a Argentina, e em Trinidad Tobago (AMPHIBIAN SPECIES OF THE WORLD 5.4) sendo que poucas foram estudadas no ponto de vista químico ou farmacológico. Até o momento das espécies de *Hypsiboas* que foram estudadas, foi possível identificar uma nova família de peptídeos antimicrobianos denominada raniseptina (MAGALHÃES et al.,2008) de *H. raniceps*, e quatro novos peptídeo antimicrobianos, Hylina a1 de *H. albopunctatus* (CASTRO et al., 2009), Hylaseptina P1 de *H. punctata* (PRATES et al., 2004) , Hylinas b1 e b2 de *H. lundii* (CASTRO et al.,2005) Tabela 03.

Tabela 03. Peptídeos do gênero *Hypsiboas*

Peptídeo	Estrutura	Atividade	Espécie	Referência
Hylaseptina P1	H-GILDAIKAIKAAG-OH	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Candida albicans</i>	<i>Hypsiboas punctata</i>	PRATES et al., 2004
Hylins b1	H- FIGAILPAIAGLVHGLINR- OH	Hemolítica	<i>Hypsiboas lundii</i>	CASTRO et al., 2005
RSP-1	H- KVALGVAQNYLNPQQ- OH	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Hypsiboas raniceps</i>	MAGALHÃES et al., 2008
Hylin a1	IFGAILPLALGALKNLIK	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Candida albicans, krusei e parapsilosis</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> Hemolítica	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	CASTRO et al., 2009

1.3.1.1 *Hypsiboas cinerascens*.

Hypsiboas cinerascens (Figura 09) é uma espécie que ocorre na Bacia Amazônica, Guiana, Suriname, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Guiana Francesa (Figura 10). O organismo é comum em áreas encharcadas próximas aos igarapés (LIMA et al., 2006).

Os machos medem cerca de 30-35 mm, e as fêmeas 33-37 mm. O seu dorso é verde-transparente, com pequenas manchas amarelas e manchas vermelhas diminutas. A região anterior do ventre é azulada e a posterior é verde-amarelada. A íris é laranja ou prateada, e existe uma membrana azul escura acima do olho (AMPHIBIAWEB, 2010).

Hypsiboas cinerascens possui hábitos noturnos e é encontrada nas folhas e nos galhos das árvores com altura máxima de 1,50 cm, são encontrados frequentemente em áreas pantanosas próximas a igarapés em floresta primária e em borda de floresta (LIMA et al., 2006). Os anfíbios reproduzem-se durante o ano inteiro, com pico na estação chuvosa, de novembro a maio (AMPHIBIAWEB, 2010). Os machos vocalizam escondidos sob folhas. As fêmeas depositam cerca de 400 ovos em pequenas poças, normalmente ao lado de igarapés. Os girinos ficam dispersos e escondidos na liteira nas poças (AMPHIBIAN SPECIES OF THE WORLD 5.4).

Como na maioria das espécies desse gênero, não há estudos na literatura sobre seu perfil químico ou farmacêutico e nem em seu sinônimo *Hyla granosa*.



Fonte: Eder A. Barbosa

Figura 09 – *Hypsiboas cinerascens*.



Figura 010 – Distribuição Global (AMPHIAWEB 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Basea-se nos dados resumidos acima o interesse para realização deste projeto de pesquisa, vendo à necessidade de explorar de forma adequada as riquezas da nossa fauna, no que se refere à classe dos anfíbios principalmente a ordem dos anuros.

A secreção cutânea dos anuros é uma fonte rica de novas moléculas biologicamente ativas, sendo que essas substâncias são distribuídas por todo o seu corpo, concentram-se mais na parte próxima a cabeça, o que nos mostra que elas são usadas inteiramente em sua defesa, tanto contra predadores e como agentes patogênicos (PRATES et al., 2004; ERSPAMER & MELCHIORRI, 1973; 1980; DALY, 1995; TOLEDO & JARED, 1995).

Em virtude de realizarem trocas gasosas através da pele e dependerem dos meios aquáticos e terrestres para sua sobrevivência, os anfíbios são considerados bioindicadores, são os primeiros a sofrerem com as mudanças climáticas e ambientais causadas pelo homem. Essas características os colocam no topo da lista de animais em extinção (MIGUEL, 2007).

Muitas dessas espécies já estão desaparecendo e levando com elas uma infinidade de novas moléculas biologicamente ativas, a maioria de massa molecular baixa como as aminas biogênicas, alcaloides, esteroides, e , além das proteínas de massa molecular elevada (ERSPAMER & MELCHIORRI, 1973; 1980; TOLEDO & JARED, 1995).

Além de atividades antimicrobianas também se destacam atividade antitumoral, como as Magaininas e Melittinas, atividade contra *Leshmania*, como as Dermaseptina-S1 e Dermaseptina-O1 e atividade contra *Trypanossoma Cruzi*, como as Dermaseptina-DI1 e DI2 (RIVAS, et al.,2009; HOSKIN, D. W. & RAMAMOORTHY, A., 2008; BAKER et al., 1993; CRUCIANE et al., 1991; OHSAKI et al., 1992). Portanto, a

identificação de moléculas presentes na secreção cutânea de tais animais ajuda a esclarecer como funciona, o complexo mecanismo de defesa baseado na secreção de substâncias biologicamente ativas (PRATES et al., 2004; BRAND et al., 2006). Outro aspecto importante é que este grupo de animais evoluiu e adaptou-se às diferentes pressões seletivas existentes no meio onde se encontram, já que em estudos genéticos de espécies das mesmas famílias, principalmente a Hylidae e Ranidae, foram encontrados polipeptídeos precursores com regiões altamente conservadas, indicando assim que as espécies pertencentes a essas famílias possuem um ancestral em comum (NICOLAS et al., 2003).

A espécie *Hypsiboas cinerascens* foi escolhida para ser estudada por ser uma espécie endêmica da nossa região, sendo assim de fácil acesso, já que ela foi capturada na mata da UFAM e não ser uma espécie em extinção, e por possuir um grande potencial biológico, já que das poucas espécies desse gênero que foram estudadas, de sua maioria obtiveram--se substâncias biologicamente ativas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

O presente trabalho tem como objetivo estudar os peptídeos presentes na secreção cutânea de *Hypsiboas cinerascens*, obtida por estimulação elétrica.

3.2 - Objetivos Específicos:

Isolar, purificar, identificar e sintetizar os constituintes da secreção cutânea de *Hypsiboas cinerascens*.

Comparar as estruturas primárias dos peptídeos encontrados com outras já depositadas em banco de dados.

Avaliar a atividade biológica de alguns peptídeos encontrados com possível atividade antimicrobiana.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta do Material

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas com N° 007/2010-CEEA. Os animais necessários à condução deste projeto foram capturados conforme permissão legal (Licença número: 22533-1) cedida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) após submissão e aprovação do projeto de pesquisa.

Os espécimes foram capturados manualmente durante o período noturno, tendo sido localizados por meio dos sons emitidos durante a vocalização. A coleta foi realizada no Campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), situado na periferia da cidade de Manaus/AM. Os espécimes foram identificados pelo Prof. MSc. Marcelo Gordo do Departamento de Ecologia da UFAM.

4.2. Obtenção das Amostras

Os espécimes foram cuidadosamente lavados em água corrente, e água Milli Q. As suas secreções cutâneas foram obtidas por estimulação elétrica.

4.2.1. Estimulação Elétrica.

Depois de lavados, foram submetidos à estimulação elétrica (Figura 10) com aproximadamente 8 V, os eletrodos foram colocados em contato diretamente sobre a superfície dorsal por um tempo de cinco a oito segundos por três a cinco vezes com intervalo de dois a quatro segundos, produzindo contração muscular involuntária, que resulta na compressão das glândulas granulares. As secreções cutâneas obtidas de *Hypsiboas cinerascens* (EXHC) foram congeladas com nitrogênio líquido, evitando-se

a degradação das substâncias, liofilizadas (Centrivap Concentrator LABCONCO) e armazenadas a -25 °C.

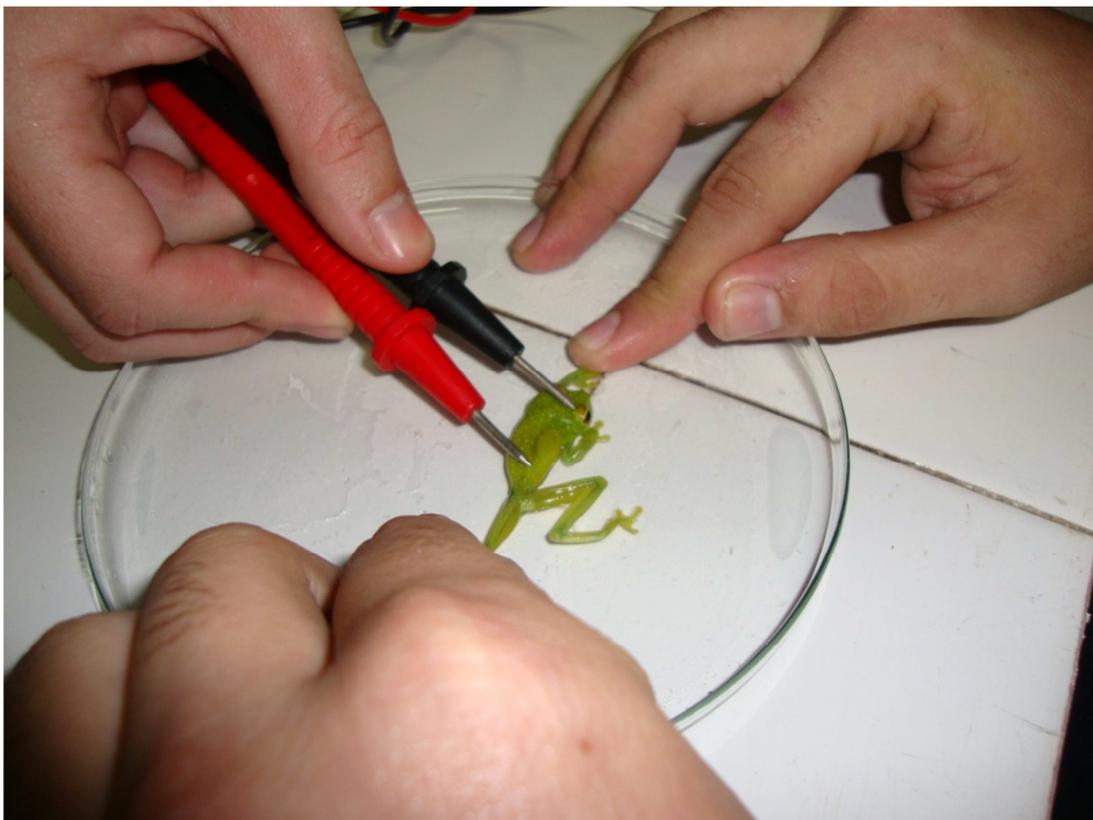


Figura 11 – Obtenção da secreção de *H. cinerascens* por estimulação elétrica (EXHC).

4.3 – Isolamento e purificação dos constituintes.

A secreção após processo de liofilização foi dissolvida em 600 μL de água Milli Q contendo TFA 0,1% (v/v).

Essas alíquotas foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (SHIMADZU, Classe LC10 AD-VP). A coluna utilizada foi de fase reversa, semipreparativa 218TP C18, 5 μ (10 X 250mm) da Vydac, que foi previamente equilibrada em solução aquosa de TFA a 0,1% (em volume). Utilizando-se um fluxo de 2,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, as frações foram coletadas manualmente. O experimento foi monitorado simultaneamente a 216 e 280 nm sob um gradiente linear de solução de acetonitrila contendo 0,1% (em volume) TFA (5 a 95% em 80 min) contendo água com TFA 0,1%. Melhor assim: $\text{H}_2\text{O}/\text{acetonitrila}/\text{TFA}$ (95/05/0,1; v/v/v), gradiente linear até $\text{H}_2\text{O}/\text{acetonitrila}/\text{TFA}$ (05/95/0,1; v/v/v) durante 80 min.

As frações obtidas foram liofilizadas, analisadas por espectrometria de massa, e as que apresentaram bom resultado (que é bom resultado?) foram redissolvidas em 200 μL de solução aquosa de TFA a 0,1% (v/v) e fracionadas por cromatografia de fase reversa, em coluna analítica com fluxo de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.4 – Dissecção da pele.

Os anfíbios foram eutanasiados por injeção de xilocaína, ocasionando morte cerebral. O tecido cutâneo dorsal foi retirado com o auxílio de pinças e tesouras. O tecido visando ao isolamento de RNA foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

O tecido visando aos experimentos de imagem por espectrometria de massa (IMS) foi devidamente esticado em uma lâmina de vidro para secagem à temperatura

ambiente. Após a secagem, os tecidos foram fixados em placa de MALDI utilizando fita adesiva dupla-face. Uma camada fina de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) para a ionização de peptídeos e proteínas foi aplicada sobre os tecidos de maneira uniforme com o auxílio de pipeta.

4.4 – Espectrometria de Massa.

4.4.1. Espectrometria de Massa de Sistema MALDI-TOF-TOF.

As frações coletadas foram submetidas à espectrometria de massas usando um sistema Ultra Flex III MALDI-TOF-TOF, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight - Time of Flight (Bruker Daltonics, Billerica, MA).

As frações oriundas da cromatografia analítica foram também, submetidas à mesma técnica para avaliar o grau de pureza. Após secas as amostras foram dissolvidas em alíquotas de 30 μ L de água Milli-Q, e dessas amostras foram retirados alíquotas de 3 μ L que foram misturadas com 9 μ L de uma solução de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (5 mg) dissolvida em água (200 μ L), acetonitrila (250 μ L) e solução aquosa de TFA a 3% (50 μ L), na proporção de 1:3 (v:v). A mistura foi agitada vigorosamente por cerca de um minuto em agitador. Um volume de 1 μ L das misturas foi aplicado sobre a placa do sistema MALDI em triplicata, e deixada em repouso à temperatura ambiente para cristalização. O equipamento foi operado no modo refletido e para análise MS² foi realizado em modo LIFT, ambas com calibração externa com mistura de peptídeos de acordo com a especificação do fabricante (*Peptide Calibration Standard I*, Bruker Daltonics, Alemanha).

Para a obtenção dos dados, as amostras foram bombardeadas com duzentos disparos de laser com pulso de 30 a 50% e detecção de faixa de massa de 100 a 3000 Da, principalmente nas áreas onde foi detectada a maior geração de sinais. Após análise, as frações com maior incidência de íons, e com melhor grau de fragmentação foram recromatografadas em cromatografia analítica e fragmentadas para identificação das sequências.

4.4.1.2. Análise da imagem por MALDI.

Para a análise de IMS foi seguida a metodologia de BRAND, et al., 2006. A pele foi posta em uma lâmina de vidro e deixada para secar ao ar livre durante três dias. Após a secagem, o tecido foi fixado em placa de MALDI utilizando fita adesiva dupla-face. Uma camada fina de matriz para a ionização de peptídeos e proteínas foi adicionada sobre os tecidos de maneira uniforme com o auxílio de pipeta, e deixado para secar por três horas.

A análise foi realizada em espectrômetro de massa UltraFlex III TOF-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA) no modo refletido. A varredura automática das amostras e a aquisição dos dados foram controladas com o programa computacional *FlexImaging* (Bruker Daltonics, Billerica, MA) ajustado para rastrear pontos de 200 μm em uma área pré-determinada, com cinquenta tiros sendo disparados em cada posição e laser com intensidade igual, ou aproximada, a 30%. O mapeamento foi ajustado para a detecção dos componentes com razão m/z entre 600 e 5000. A calibração do espectrômetro foi realizada utilizando-se um calibrante com peptídeos com massa conhecida, do qual foi depositada uma alíquota sobre o tecido a ser analisado.

4.5 Identificação das sequências peptídicas.

As frações peptídicas que tiverem pureza adequada terão suas sequências peptídicas identificadas, por método de degradação de Edman, ou por comparação com as sequências encontradas no gene, por meio do isolamento do RNA Total e síntese do C-DNA, seguindo a metodologia descrita em BARBOSA, 2010.

4.6. Síntese peptídica em fase sólida.

Os peptídeos de interesse foram sintetizados manualmente pelo método da fase sólida, com a utilização de estratégia Fmoc. Para a síntese do peptídeo com grupamento C-terminal aminado a resina usada foi Rink-Amide-MBHA (de que fabricante?).

A metodologia aplicada para síntese foi dividida em três partes (CHAN, et al., 2000):

Acoplamento do primeiro derivado de aminoácido na resina.

Acoplamento e desproteção dos Fmoc-aminoácidos da sequência peptídica.

E por última clivagem da ligação peptidil-resina e desproteção das cadeias laterais.

É necessário colocar um grupo ativador no aminoácido a ser acoplado para diminuir a diferença de energia entre os reagentes e o complexo ativado que seja um bom grupo de saída. Os reagentes ganharão energia e ficarão com uma energia mais próxima ao complexo ativado, havendo assim um favorecimento cinético da reação de formação da ligação amídica.

O processo de síntese é realizado da seguinte forma, primeiro é feito a desproteção da resina, pesa-se uma determinada quantidade da resina que é adicionada em uma seringa de 3 mL com um pequeno filtro, nessa seringa adiciona-se

aproximadamente 2 mL de piperidina, que sofre agitação constante durante 15 min, depois retira-se a piperidina por sistema a vácuo, esse processo deve ser repetido, ou seja, a desproteção ocorre em duas etapas.

Após a desproteção realiza-se o teste de Kaiser (ninidrina), para confirmação da desproteção, que é observada através da cor escura dos cristais da resina.

Após a confirmação do teste é adicionado uma determinada quantidade de resíduo do aminoácido com HBTU, DIPEA e DMF, é levado à agitação constante por uma hora e meia, depois essa mistura é lavada com metanol e DMF em sistema a vácuo, e em seguida é realizado novamente o teste de Kaiser, para confirmação do acoplamento que é verificada através da falta de cor dos cristais da resina. Esse processo de desproteção e acoplamento é repetido para cada resíduo de aminoácido.

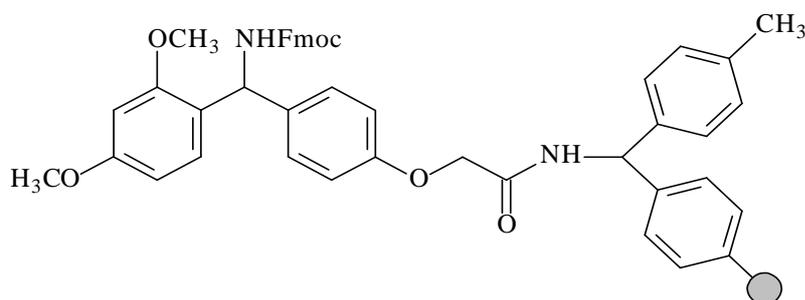
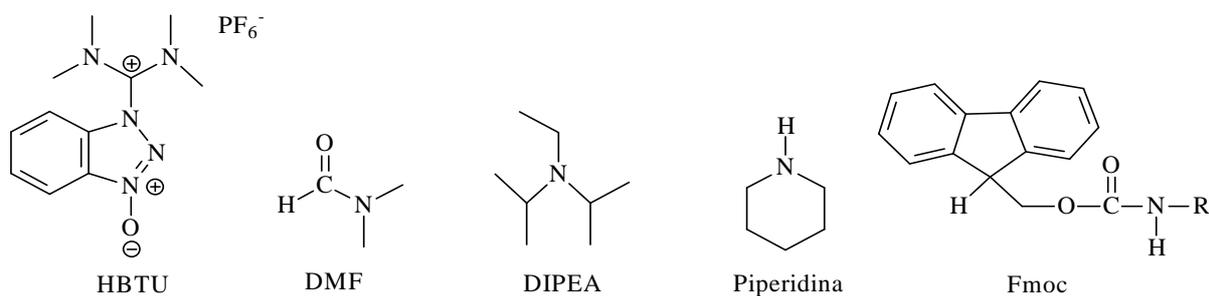
Os produtos usados na síntese são HBTU, piperidina, DMF, DIPEA, aminoácidos ligados ao grupo F-moc e a resina (Figura 11).

Mecanismo para desproteção da Resina (Figura 12).

Mecanismo da reação de ativação do aminoácido (Figura 13).

Mecanismo do acoplamento do primeiro resíduo de aminoácido (Figura 14).

Reação geral de síntese (Figura 15).



Rink-Amide-MBHA

Figura 12. Produtos usados na síntese.

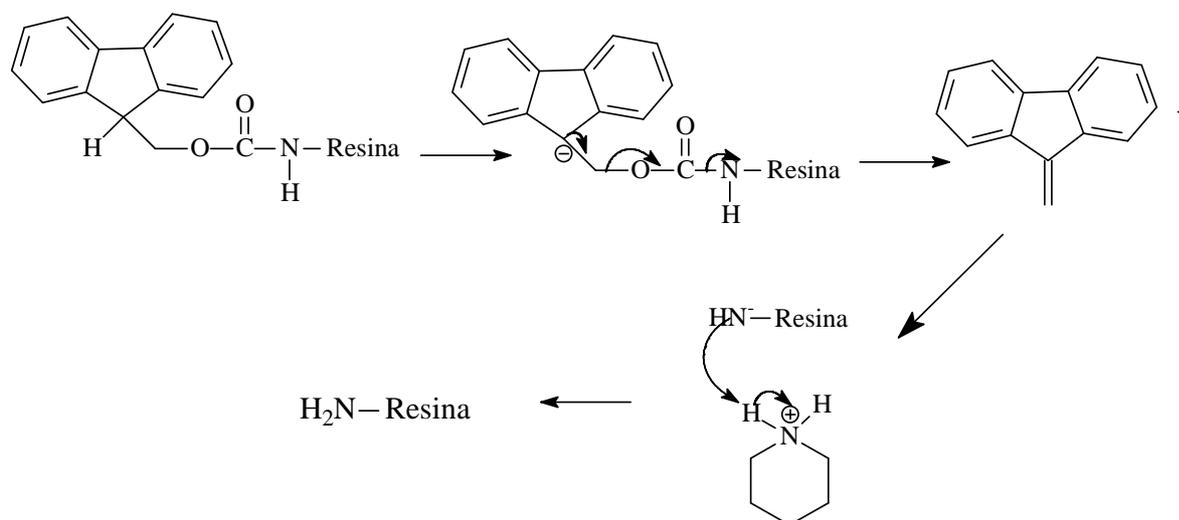


Figura 13. Mecanismo para desproteção da Resina

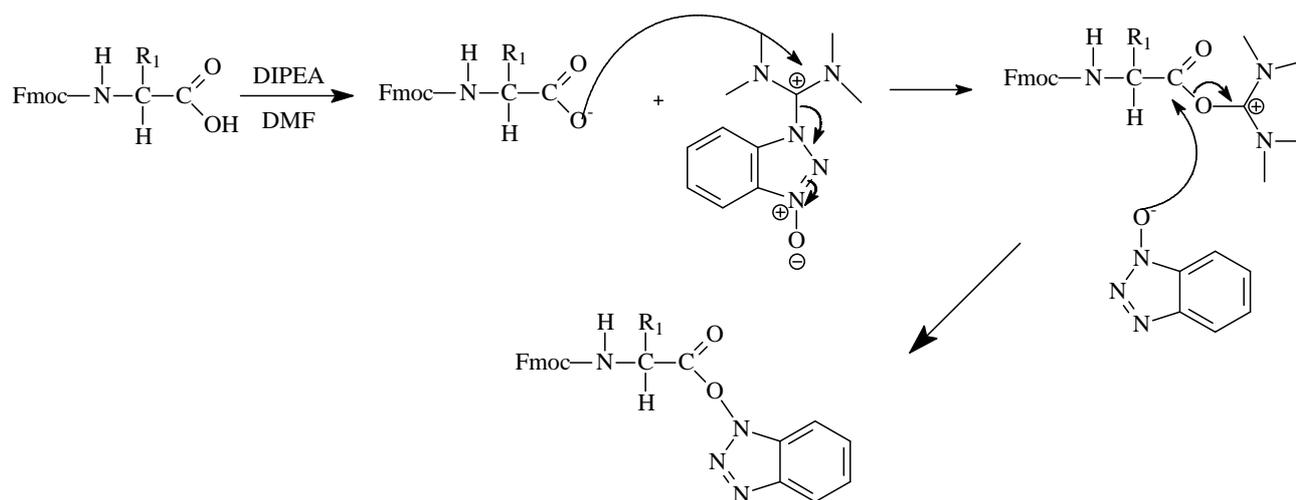


Figura 14. Mecanismo da reação de ativação do aminoácido.

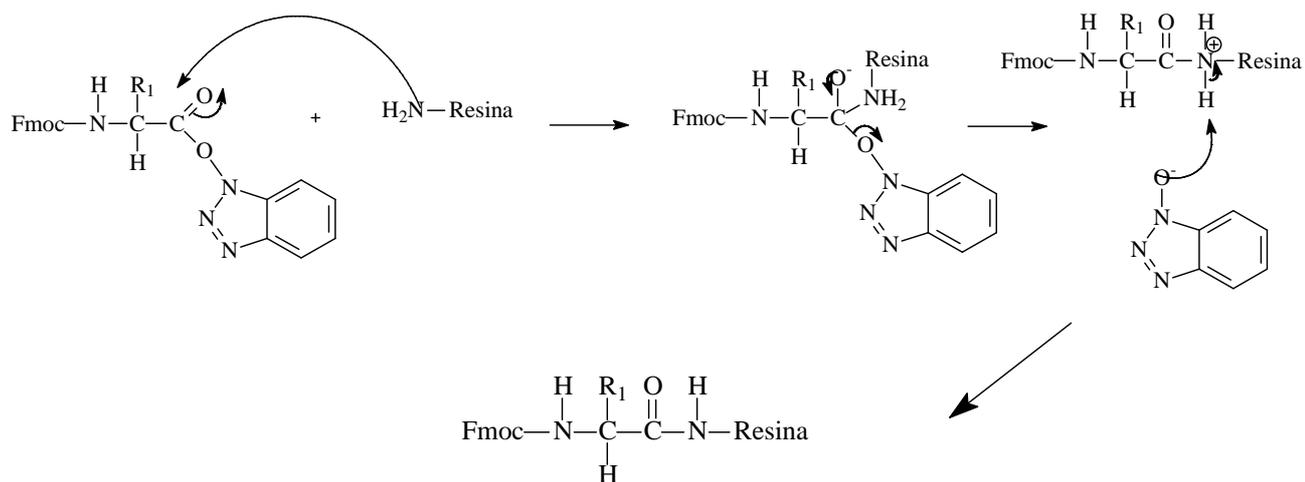


Figura 15. Mecanismo do acoplamento do primeiro resíduo de aminoácido.

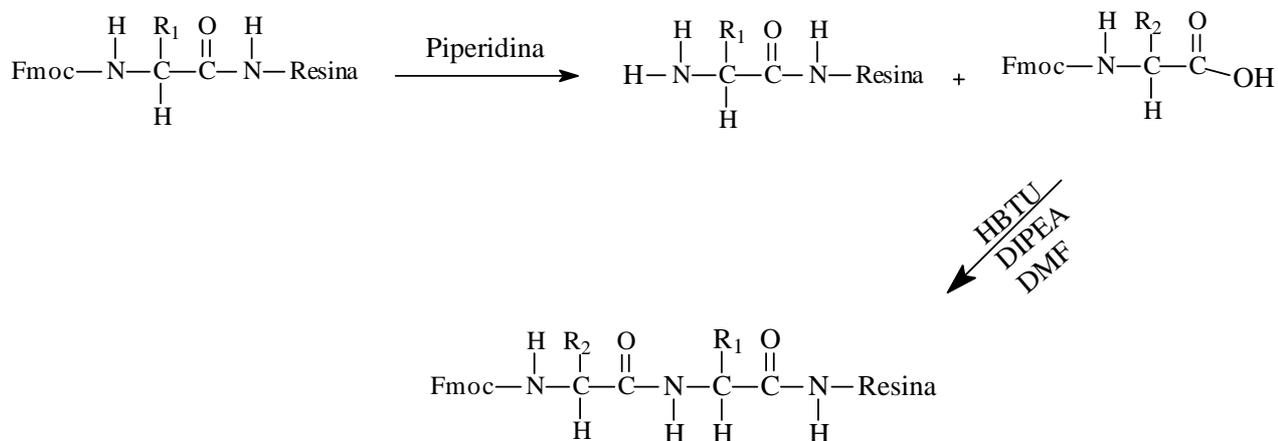


Figura 16. Reação geral de síntese.

4.7. Testes antimicrobianos.

Os testes antimicrobianos serão realizados no laboratório do GEMMA, localizado no LAPEC Setor sul da UFAM, sob a supervisão da Professora Dr^a Antônia Queiroz Lima de Souza.

Onde 2 mg dos peptídeos sintéticos puros, serão dissolvidos em 1mL de água Miili-Q, para a realização dos ensaios contra bactérias Gram – positivas e Gram – negativas em meio sólido.

Outro teste contra *Xantomonas axonopodis* pv. *Glycines*, será realizado no SIBE EMBRAPA – Recursos genéticos e Biotecnologia – DF.

5. RESULTADOS.

5.1. Purificação dos peptídeos.

A secreção de *H. cinerascens* foi submetida à cromatografia de fase reversa semipreparativa, a qual resultou em setenta frações (Tabela 03) que foram coletadas manualmente em tubos *Eppendorfs*. Após a coleta, as soluções foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas para verificação de pureza por espectrometria de massa. A cromatografia foi monitorada simultaneamente a 216 e 280 nm (Figura 16).

Tabela 4 - Frações obtidas por cromatografia líquida de fase reversa com tempo de retenção (rt).

Fração	rt	Fração	rt	Fração	rt	Fração	Rt
1	5,40	19	20,9	37	31,10	55	39,97
2	6,13	20	21,64	38	31,23	56	40,70
3	6,9	21	22,86	39	31,65	57	41,21
4	7,38	22	23,80	40	32,10	58	42,25
5	7,68	23	23,9	41	32,50	59	42,90
6	8,79	24	24,24	42	33,41	60	43,29
7	9,43	25	24,69	43	34,10	61	43,53
8	9,95	26	25,04	44	34,33	62	43,94
9	11,90	27	25,32	45	34,83	63	45,22
10	14,16	28	26,04	46	35,25	64	45,69
11	15,65	29	26,79	47	35,65	65	47,38
12	16,16	30	27	48	36,40	66	47,64
13	16,95	31	27,89	49	36,7	67	48,80
14	17,31	32	28,14	50	36,99	68	61,7
15	18,21	33	28,74	51	37,64	69	63,10
16	18,59	34	29,20	52	37,94	70	63,70
17	19,40	35	29,99	53	38,43		
18	20,04	36	30,19	54	38,64		

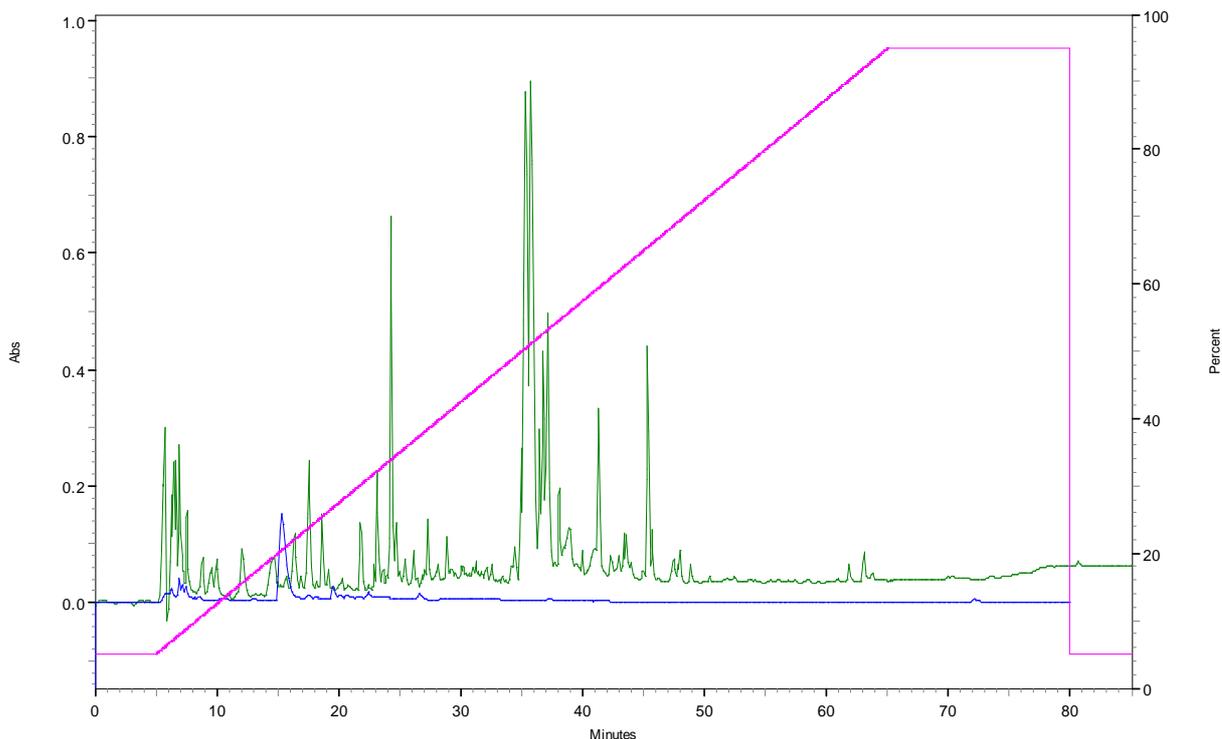


Figura 17 - Fracionamento de extrato de *Hypsiboas cinerascens* por cromatografia de fase reversa. Linha verde absorvância em 220 nm, azul em 280 nm e rosa gradiente ACN/Água 5 a 95% em 65min. Coluna C18. A temperatura ambiente

5.2. Espectrometria de Massa (EM).

Todas as frações foram submetidas à análise por EM e as que apresentaram maior grau de pureza e boa ionização foram submetidas a EM^2 , ou seja, fragmentadas para interpretação das estruturas primárias e sequenciamento.

As seqüências foram comparadas com peptídeos depositados no banco de dados on line Protein BLAST.

As seqüências obtidas a partir da fragmentação dos produtos da fração 24 e 05 foram comparadas com seqüências depositadas no Protein BLAST, o que revelou 70% e 90% de similaridade com peptídeo Hylaseptina (GILDAIKAIKAAG), sendo o

primeiro com C-terminal amidado e o segundo não KAAIKAAGEHL-NH₂, GVLDAIKAIKAAG respectivamente (figura17, 18).

A sequência obtida a partir da fragmentação do produto presente na fração 67 revelou ser composta pelas sequências dos peptídeos sequenciados das frações 24 e 05, evidenciando que esses dois peptídeos foram obtidos por meio da degradação do produto da fração 67, essa degradação poderia ocorrer naturalmente, por meio de ação de peptidases ou não através de degradação na extração (Figura 19) (MAGALHÃES, et al., 2008) . A sequência obtida a partir da fragmentação da molécula presente na fração 32 revelou 63% de similaridade com fragmento correspondente aos resíduos 46 a 61 de Ranatuerin 2C (FLDTLKGLAGKMLES�), FFFDTLKNLAGKVIGALT.

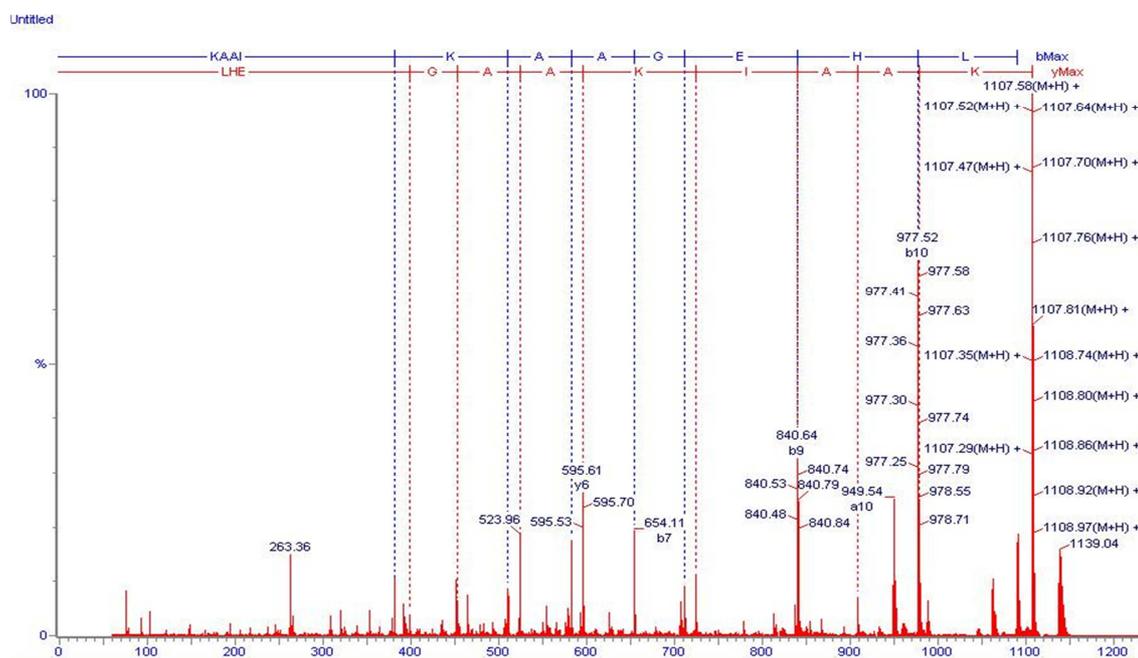


Figura 18 – Espectro de massa de peptídeos presente na fração 24.

Sequência da molécula presente na fração 24-KAAIKAAGEHL, com 70% de similaridade com hylaseptina GILDAIKAIKAAG.

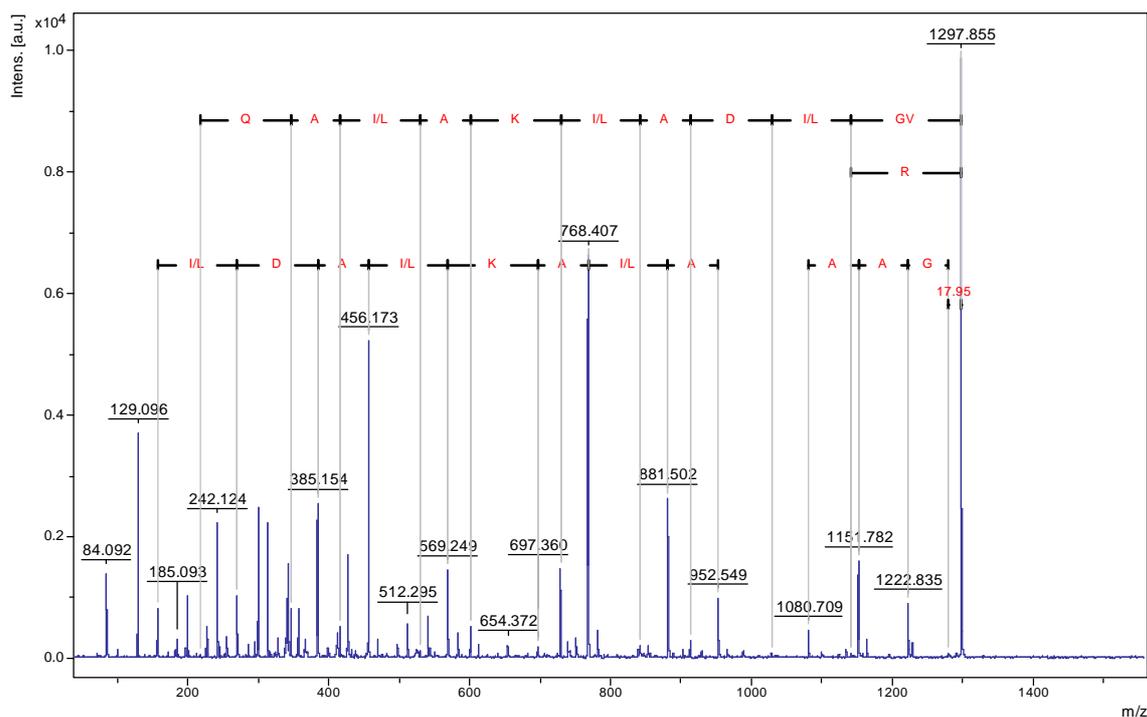


Figura 19 - Espectro de massa de peptídeo presente fração 05.

Sequencia de composto presente na fração 05-GVLDAIKAIKAAG, com 90% de similaridade com Hylaseptina GILDAIKAIKAAG.

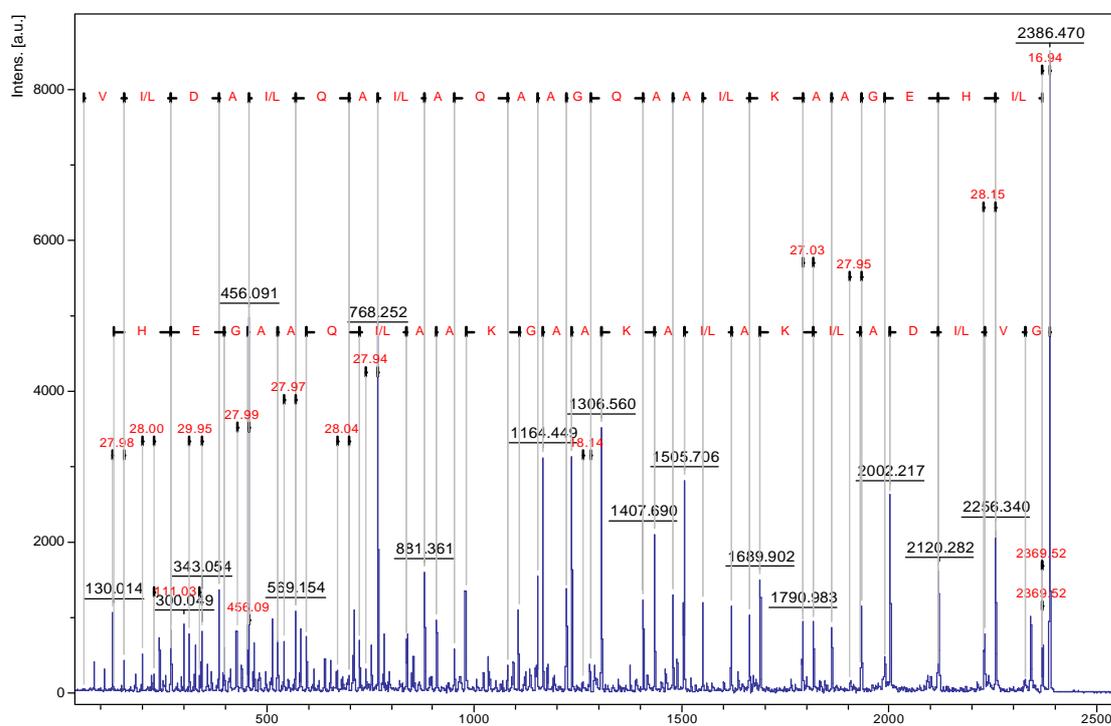


Figura 20 - Espectro de massa de peptídeo presente na fração 67.

Sequencia de molécula presente na fração 05-GVLDAIKAIKAAG, de componente da fração 24-KAAIKAAAGEHL, e de componente da fração 67- GVLDAIKAIKAAGKAAIKAAAGEHL-NH₂

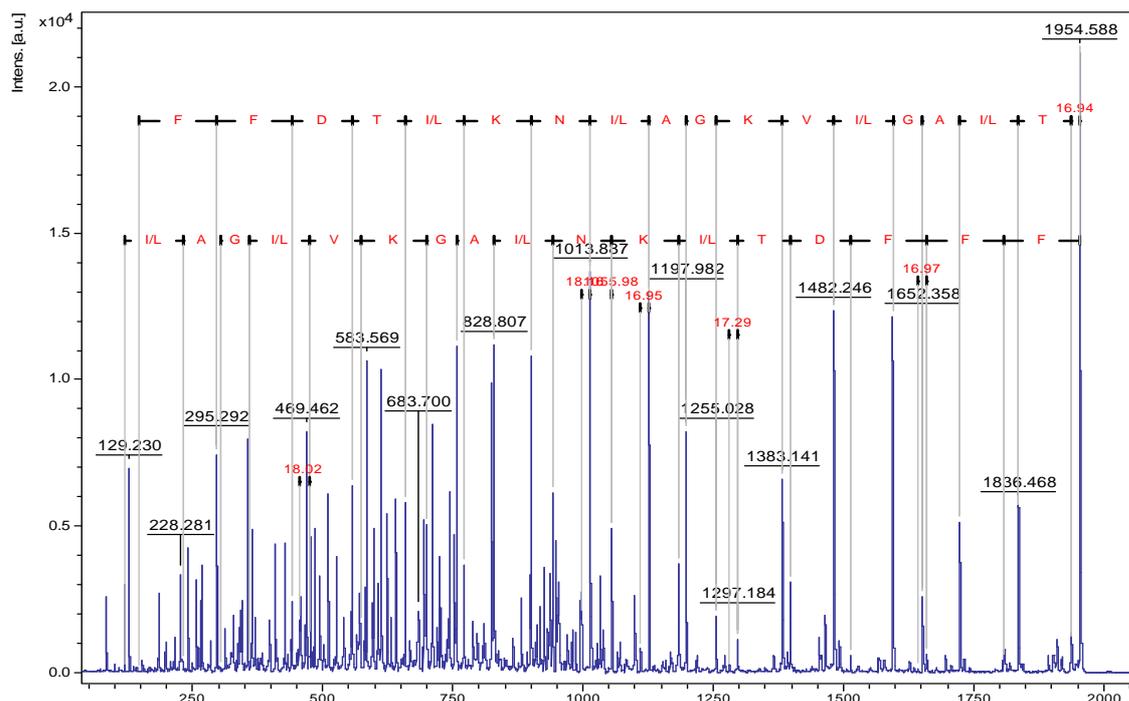


Figura 21 - Espectro de massa de peptídeo presente na fração 32

Sequencia de molécula presente na fração 32 FFFDTLKNLAGKVIGALT, com 63% de similaridade com segmento de Ranatuerin-2C, FLDTLKGLAGKMLESL.

5.3. Identificação das seqüências peptídicas.

Não foi realizada a identificação das seqüências peptídicas por método de Degradação de Edman, já que não se obteve 10 picomoles de peptídeo puro, que é a quantidade de material necessária para o uso do equipamento.

Por meio de isolamento do RNA Total e síntese do c-DNA, foi possível identificar sete novos peptídeos (Tabela 05), sendo que todos os sete peptídeos foram posteriormente localizados na pele do anfíbio anuro por estudos de imagem por espectrometria de massa e apenas dois haviam sido identificados por estudos de espectrometria de massa em sistema MALDI-TOF-TOF, que foram os das frações 32 e 67.

As letras em azul identificam o peptídeo sinal, as letras verdes mostram a peça ácida e em vermelho está representado o peptídeo ativo.

ATGGCTTTCCTGAAAAAATCCCTTTTTTTTTGTACTTTTCCTTGAATAGTTTTTTTTGTC
 CATCTGTCAAGATGAGAAAAGAGAGGGGACGAGCAGTATGAAGAGGAAGAAAATGAAG
 AGGCAAGTGAGGAAAAGAGAGGAGTACTTGATGCAATTAGAGCTATAGCGAAAGCAGCT
 GGTAAAGCCGCTTTTCAAGCTGCTGGTGAACACATAGGTTACGTTAATGATTCATCTT
 TATGGAACATAACTGTTAGTTGTGTCAGACATATAATAAAGCCTATTATTTGAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAGTCGACATCGATAAGGGTGGTCA

MAFLKKSFLFFVLFLGIVFLSICQDEKREGDEQYEEENESEEEKRGVLDAIRAIKAA
 GKAAFQAAGEHI**GSR**

ATGGCTTTCCTGAAGAAATCGCTTTTTTCTTGTACTATTCCTTGAATAGTTTCTCTGTC
 CATCTGTCAAGATGAGAAAAGAGAGGGAGACGAGCAGTACGAAGAGGAAGAAAATGAAG
 AGACAAGTGAGGAAAAGAGAGGAGTACTCGATGCAATTAAAGCTATAGCGAAAGCAGCT
 GGTAAAGCCGCTCTTCAAGCTGCTGGTGAACACATAGGTTACGTTAATGATTCATCTC
 TATGGAACATAACTGTTAGTTGTGTCAGACATATAATAAAGCATATTATCTGAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAGTCGACATCGATACGCGTGGTCA

MAFLKKSFLVLFLGIVSLSICQDEKREGDEQYEEENEETSEEKRGVLDAIKAIKAA
 GKAAALQAAGEHI**GSR**

ATGGCTTTCCTGAAGAAATCGCTTTTTTCTTGTACTATTCCTTGAATAGTTTCTCTGTC
 CATCTGTCAAGATGAGAAAAGAGAGGGAGACGAGCAGTACGAAGAGGAAGAAAATGAAG
 AGAGCAAGTGAGGAAAAGAGAGGAGTATTCGATGCAATAAAAGCTATAGCGAAAGCAGC
 TGGTAAAGCCGCTCTTCATGCTGCTGGTGAACACGTTAATGATTCATCT
 CTATGGAACATAAATGTTAGTTGTGTCAGACATATAATAAAGCAAATTATCTGAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAGTCGACATCGATACGCGTGGTCA

MAFLKRNLFSLYSLFLFPWQPVKMEKDRETRSMKRNEENASEEKRGVFDIAIKAIKA
 AGKAALHAAGDSI**GTR**

ATGGCTTCCtTGAAGAAATTTTTTTTTCCTTGTANTATTCCTTGAATAGTTTTTCTGTC
 CATCTGTCAAGATGAGAAAAGAGAGGGAGACGAGCAGTATGAAGAGGAAGAAAATGAAG
 AGGCAAGTGAGGAAAAGAGAGGAGTACTCGATGCAATTAAAGCTATAGCGAAAGCAGCT
 GGTAAAGCCGCTTTTCAAGCTGCTGGTGAACACATAGGTTACGTTAATGATTCATCTC
 TATGGAACATAACTGTTAGTTGTGTCAGACATATAATAAAGCATATTATTTGAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGACATCGANANGCGTGGTCA

MASLKKFFFLVNFVLGIVFLSICQDEKREGDEQYEEENESEEEKRGVLDIAIKAIKAA
 GKAAFQAAGEHI**GSR**

ATGGCTTTCCTGAAAAAGTCCCTTTTTCTTGTACTATTCCCTTGAATAGTTTCCCTGGC
AACCTGTGAAGAAGAGAAAAGAGAAGATGAGAAGGAAGAGGAAGAAAATGAAGAGGGAA
ATGAAGAAAATAGAGAAAAGAGATTTTCTTTGACACTTTAAAAAATATTGCTGGAAAAG
TCATTGGAGCTCTTACCGGTTGAAGTGTAACGTTTCATCCATAAGGAACATAACTATTT
GTTCCCTTACATATAATAAAGAGCACTATCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGACA
TCGATACGCGTGGTCA

MASLNSFPGNLVRREKRRIEGRGEKERGKEERKERKEIFFDTLKNIAGKVIGALTG

ATGGCTTTCCTGAAAAATCGCTTTTTCTTGTACTATTCCCTTGAATAGTTTCCCTGGC
AACCTGTGAAGAAGAGAAAAGAGAAGATGAGAAGGAAGAGGAAGAAAATGAAGAGGGAA
ATGAAGAAAATAGAGAAAAGAGATTTTCTTTGACACTTTAAAAAATATTGCTGGAAA
GTCATTGGAGCTCTTACCGGTTGAAGTGTAATGTTTCATCCATAAGGAACATAACTATT
TGTTCCCTTACATATAATAAAGAGCACTATCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
CTCGACATCGATACGCGTGGTCGACATCGATACGCGTGGTCA

MAFLKKSFLVLFLGIVSLATCEEEKREDEKEEEENEENEENREKRFFFDTLKNIAGK
VIGALTG

ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTTTTTCTTGTACTATTCCCTTGAATAGTTTCCCTTGC
AACCTGTCAAGATGAGAAAAGACAAGATGATGACCAGGAAGAGGAAGAAAATGAAGAGG
GATATGAAGAAAATAGAGAAAAGAGATTTTCTTTGACACTCTGAAAATTTGGCTGGA
AAAGTCATTGGAGCTCTTACCGGTTAAAGTGTAATGTTTAATCCCTAAGGAGCATAACN
NNTTGNTNCATACATATAATAAAGTGCATTATAAANAATCAAAAAAGTCGAATTCCA
GCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGNNC

MAFLKKSFLVLFLGIVSLATCQDEKRQDDQEEENEENEENREKRFFFDTLKNLAG
KVIGALTG

Tabela 5. Peptídeos encontrados no gene de *Hypsiboas cinerascens* e suas respectivas massas.

SEQUÊNCIA	Massa (Da)
GVLDAIRAIKAAGKAAFQAAGEHI GSR	2448.85
GVLDAIKAIKAAGKAAALQAAGEHI GSR	2386.82
GVFDAIKAIKAAGKAAALHAAGDSI GTR	2365.76
GVLDAIKAIKAAGKAAFQAAGEHI GSR	2420.84
IFFDTLKN IAGKVIGALTG	1920.32
FFDTLKN IAGKVIGALTG	1954.58
FFDTLKN LAGKVIGALTG	1954.58

Letras em verde indicam os resíduos de aminoácidos idênticos, em amarelo indicam os resíduos diferentes e letras em azul mostram sítio de clivagem.

5.4. Imagem por Espectrometria de Massas (IMS).

Pele seca presa com fita dupla face em uma placa de MALDI tomando cuidado para que não formasse bolha de ar (Figura 16).

A varredura total da pele ocorreu automaticamente durante 3 horas (Figura 17).

O espectro total da pele mostrou moléculas de 500 a 4500 Da (Figura 18).

Imagem dos íons formados (Figura 19)

De acordo com a imagem, pode-se observar que os peptídeos obtidos das frações 67 e 32 com massas 2386,47 e 1954,58 respectivamente, são secretados em sua forma adulta, e as moléculas presentes nas frações 24 e 05 não foram identificadas, já que estavam na forma truncada (Figuras 20 e 21). (Figura 20,21).

Também foram observados na imagem por espectrometria de massa (IMS) os peptídeos encontrados por análise dos RNA mensageiros.

Peptídeo – GVLDAIRAIKAAGKAAFQAAGEHI, com massa 2448.85 (Figura 22).

Peptídeo – GVFDAIKAIKAAGKAALHAAGDSI, com massa 2365.76
(Figura 23).

Peptídeo – GVLDAIKAIKAAGKAAFQAAGEHI, com massa 2420.84
(Figura 24).

Peptídeo – IFFDTLKNIAGKVIGALT, com massa 1920.32 (Figura 25).

Peptídeo – FFFDTLKNIAGKVIGALT, com massa 1954.58 (Figura 26).



Figura 22. Pele seca de *H. cinerascens* fixada em uma placa de MALDI.

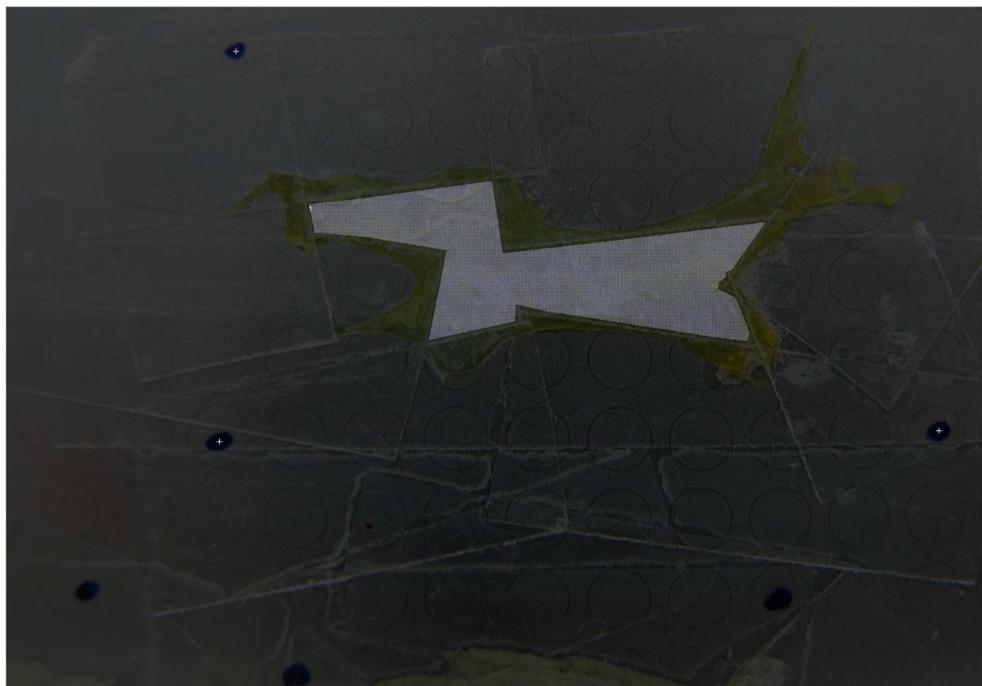


Figura 23. Área da pele a ser analisada por IMS.

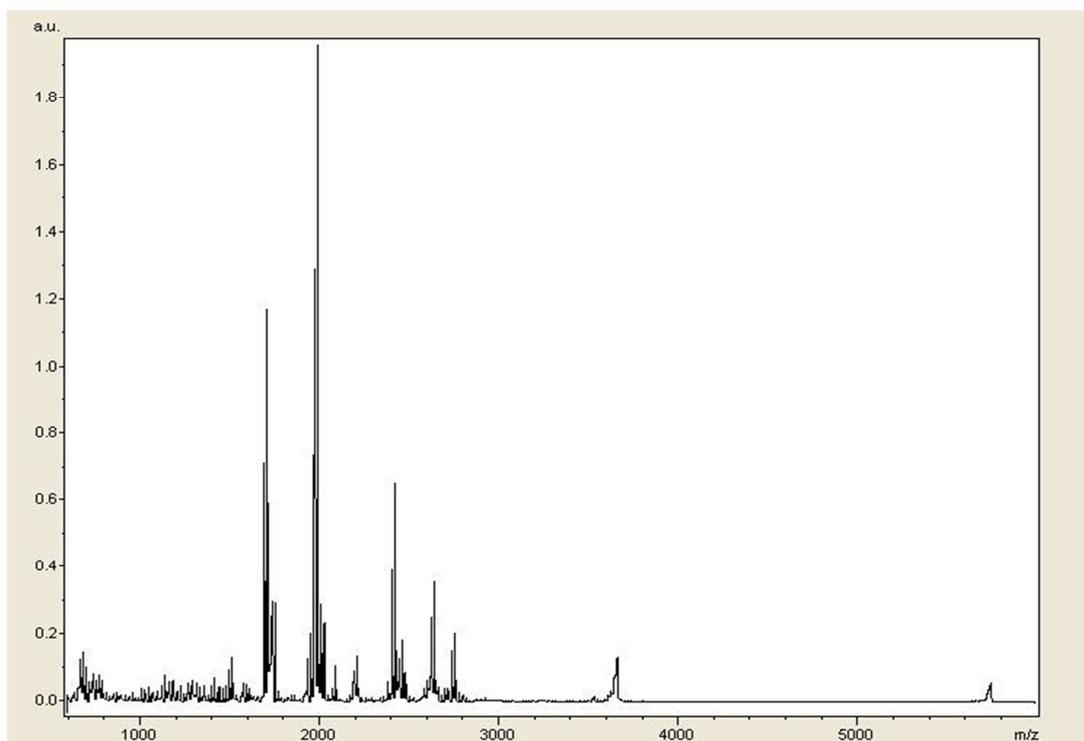


Figura 24. Espectro de Massa total obtida por IMS.

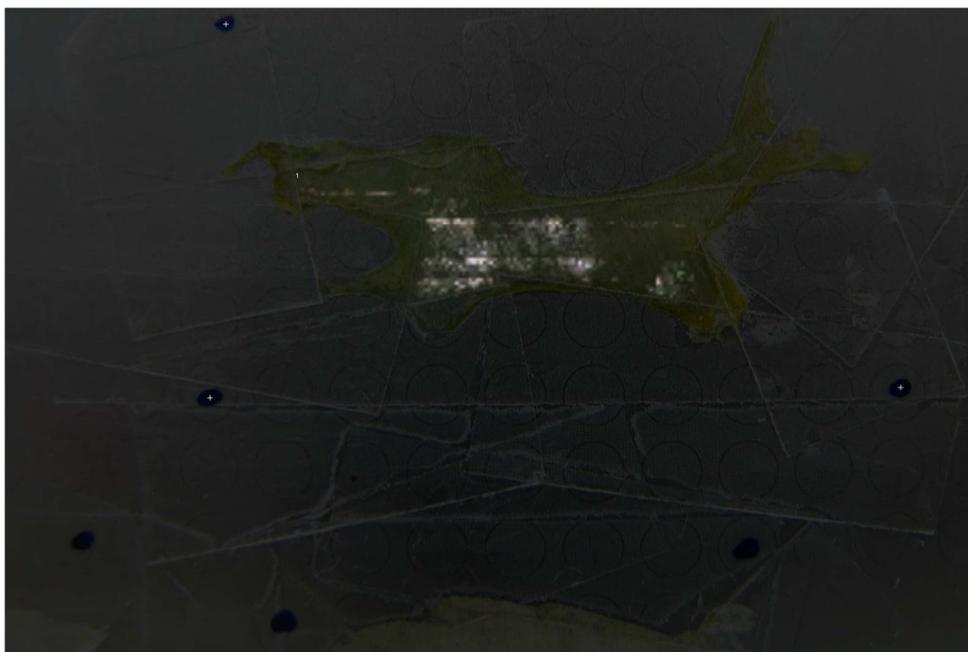


Figura 25. Ionização total da pele obtida por IMS.

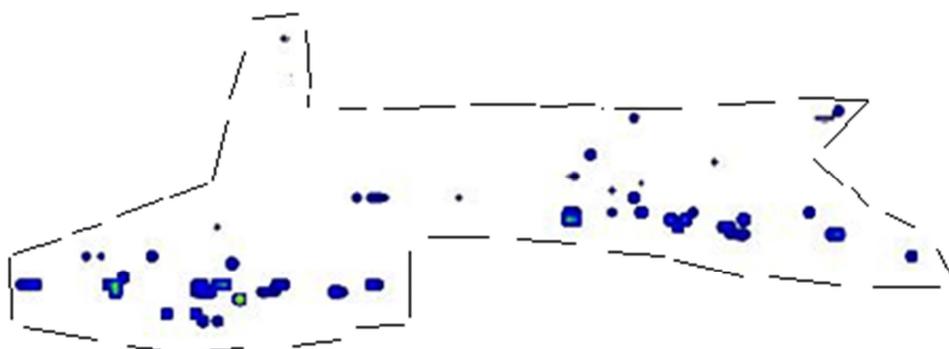


Figura 26. IMS da fração 67.

Representação pictórica da Imagem por Espectrometria de Massa (IMS) correspondente ao produto presente na fração 67 - massa 2386,47 Da

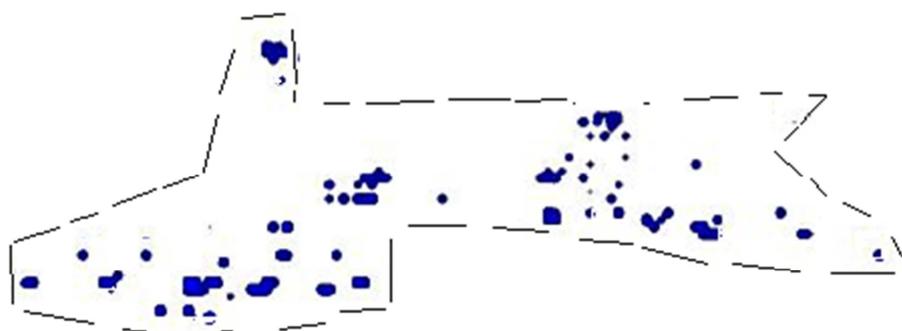


Figura 27. IMS fração 32.

Representação pictórica da Imagem por Espectrometria de Massa (IMS) correspondente a peptídeo presente na fração 32 - massa 1954,58 Da



Figura 28. IMS peptídeo codificado pelo gene, com massa 2448.85 Da.

Representação pictórica da Imagem por Espectrometria de Massa (IMS) correspondente a sequência peptídica: GVLDAIRAIKAAGKAAFQAAGEHI.

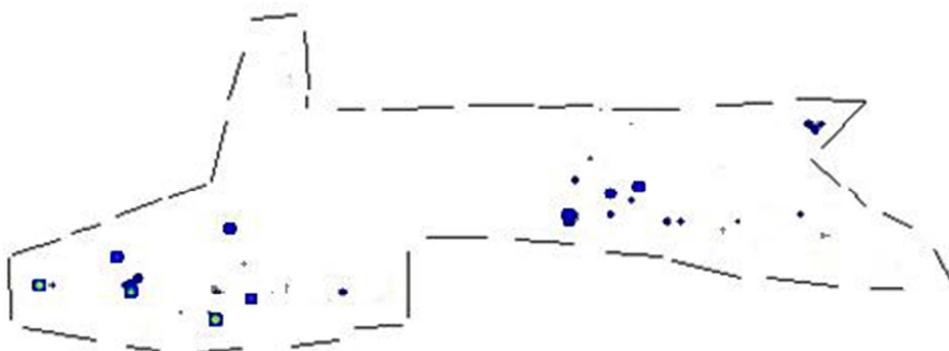


Figura 29. IMS peptídeo codificado pelo gene com massa 2365.76 Da.

Representação pictórica da Imagem por Espectrometria de Massa (IMS) correspondente a sequência peptídica: GVFDAIKAIKAAGKAALHAAGDSI.

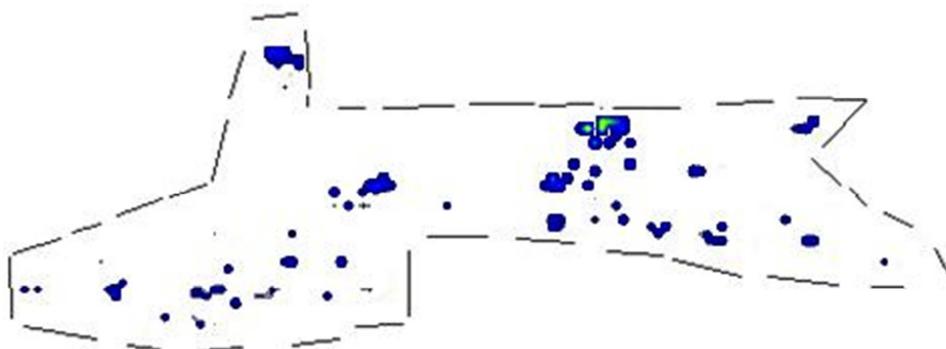


Figura 30. IMS peptídeo codificado pelo gene com massa 2420.84 Da.

Representação pictórica da Imagem por Espectrometria de Massa (IMS) correspondente a sequência peptídica: GVLDAIKAIKAAGKAAFQAAGEHI.

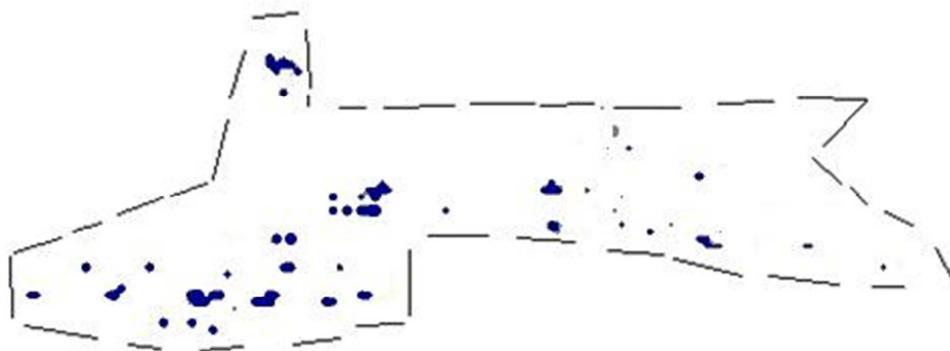


Figura 31. IMS peptídeo codificado pelo gene com massa 1920.32 Da.

Representação pictórica da Imagem por Espectrometria de Massa (IMS) correspondente a sequência peptídica: IFFDTLKNIAAGKVIGALT.

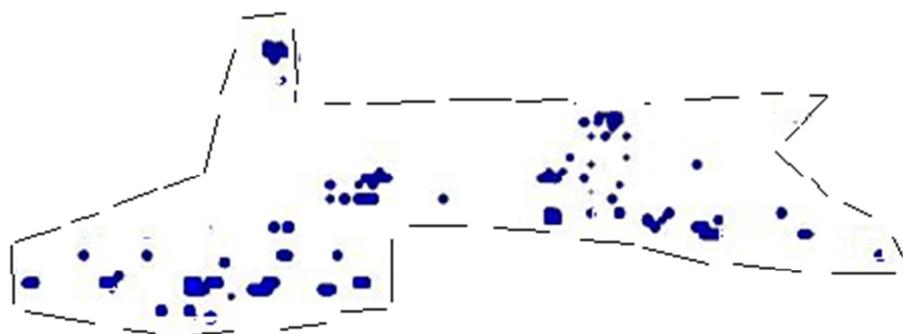


Figura 32. IMS peptídeo codificado pelo gene com massa 1954.58 Da.

Representação pictórica da Imagem por Espectrometria de Massa (IMS) correspondente a sequência peptídica: FFFDTLKNIAAGKVIGALT – Sendo que esse peptídeo tem massa idêntica ao encontrado na fração 32, já que a única diferença desse para o outro é uma isoleucina no lugar de uma leucina.

5.5 Síntese peptídica.

Após confirmação da sequência peptídica obtida por meio da análise dos peptídeos codificados pelos genes da espécie, o peptídeo GVLDAIKAIKAAGKAALQAAGEHI-NH₂ nomeado cinerascetina, foi escolhido para ser sintetizado, como um modelo para novos peptídeos farmacologicamente ativos proveniente da secreção cutânea de um novo anfíbio anuro. Foi escolhido outro peptídeo através de comparação no banco de dados, on line, Protein- Blast, para ser

sintetizado GILDAISGKASAAGKKALEYAAEQI-NH₂, sendo que este é um segmento de uma proteína com 361 resíduos de aminoácidos, sem função aparente, a qual é secretada por uma bactéria conhecida como *streptomyces albus* J1074 (Figura 32).

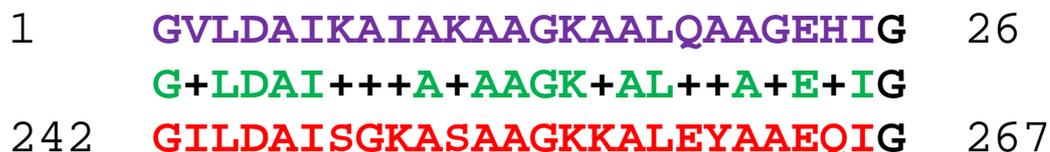


Figura 33. Peptídeo intragênico de *Streptomyces albus* J1074.

Letras em roxo representam o peptídeo de *Hypsiboas cinerascens* e em vermelho peptídeo intragênico correspondente ao segmento a-b da proteína coisa e tal de *streptomyces albus* J1074, em verde resíduo comuns para as duas moléculas.

A síntese completa dos peptídeos durou aproximadamente 55 horas cada peptídeo, após o termino da síntese, e clivagem entre o peptídeo e a resina que ocorre concomitantemente com a deproteção das cadeias laterais, obteve-se aproximadamente 40 mg de cada peptídeo bruto. Esses peptídeos foram levados à técnica de espectrometria de massa para confirmação da síntese por meio de análise de suas massas moleculares e de suas sequências peptídicas (Figuras 32, 33, 34 e 35).

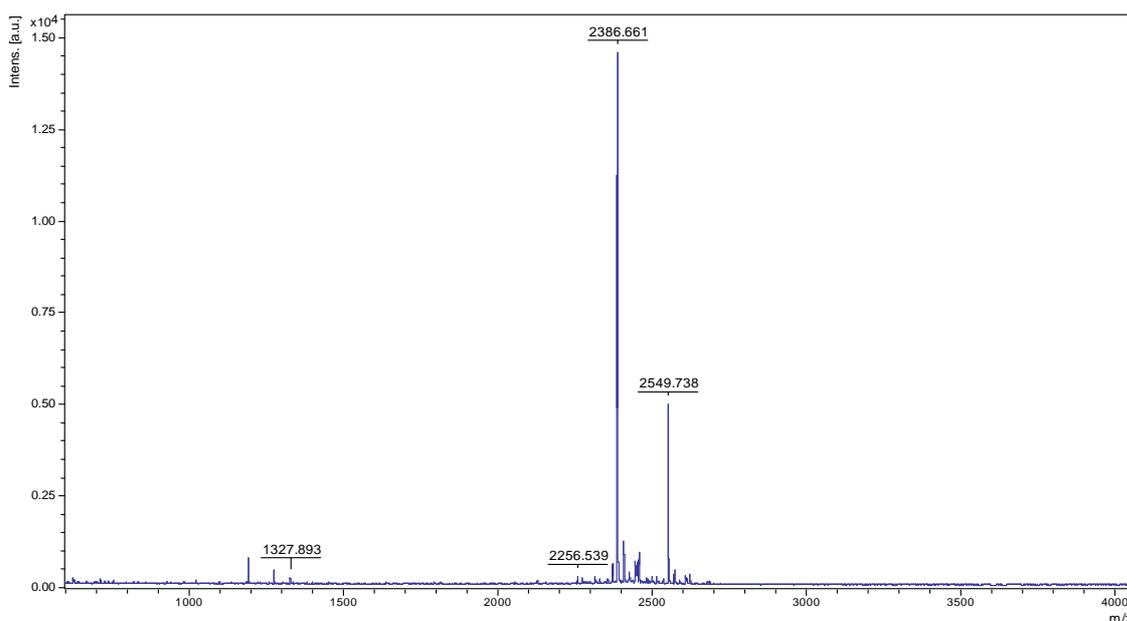


Figura 34. Espectro de massa de cinerascetina sintético bruto.

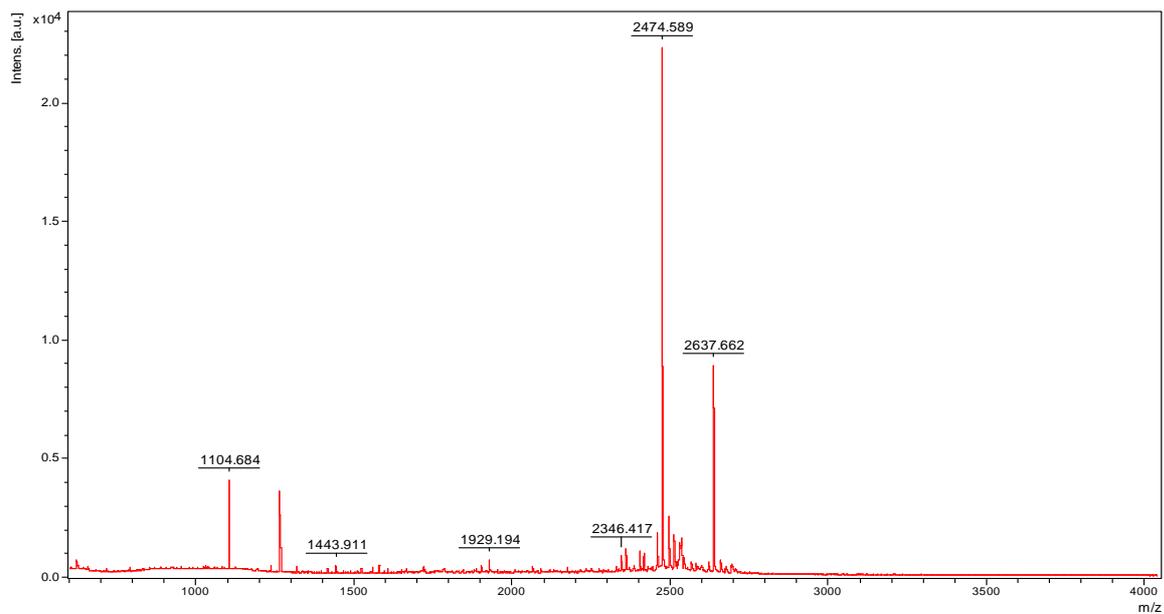


Figura 35. Espectro de massa do peptídeo intragênico.

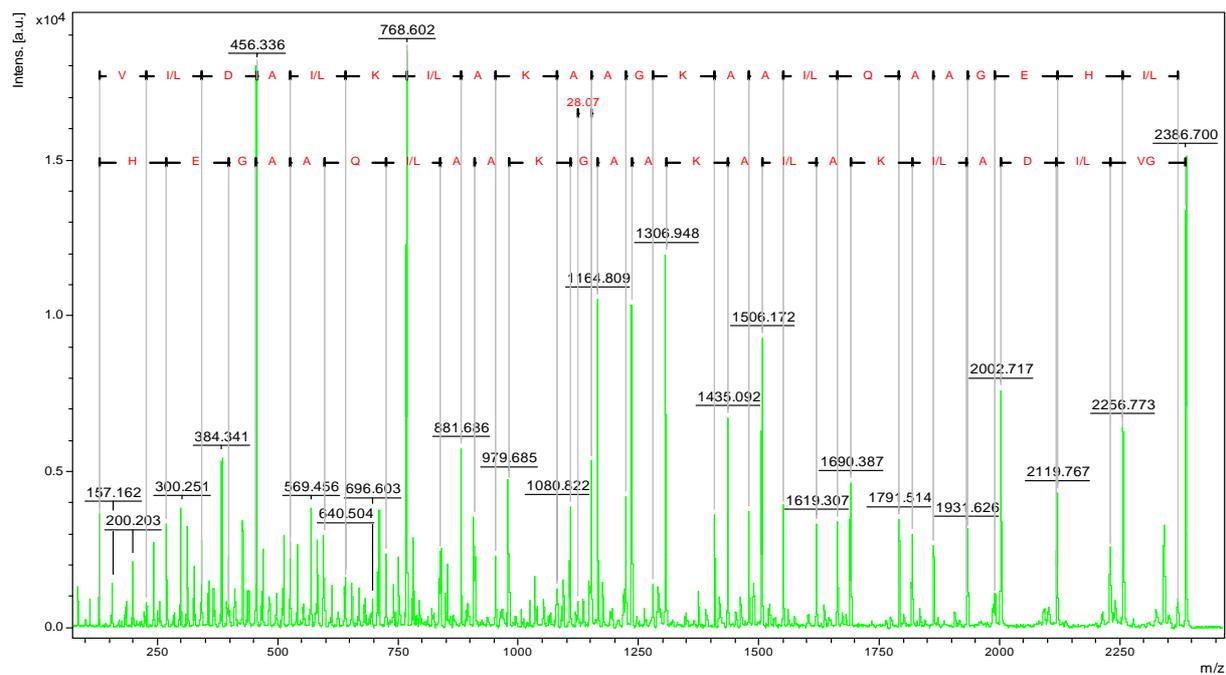


Figura 36. Sequência peptídica de cinerascetina sintético.

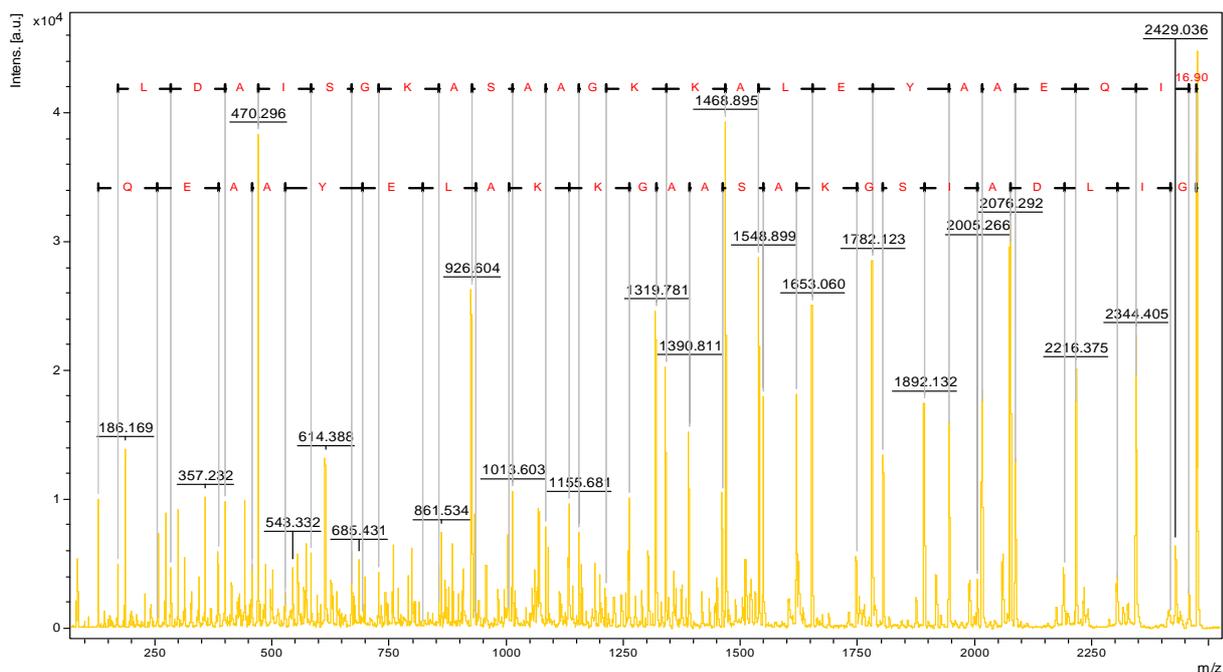


Figura 37. Sequência peptídica do peptídeo intragênico.

Após a confirmação da sequência peptídica por espectrometria de massa, foi conduzida a sua purificação por cromatografia semipreparativa de fase reversa. A concentração de acetonitrila em que o peptídeo eluiu no extrato bruto foi empregada como parâmetro para a construção dos programas de gradiente utilizados na purificação. Foram usados os seguintes gradientes seguindo esse padrão de 55 min. cada.

- 25 a 65% de ACN/ Água com TFA 0,1%.
- 35 a 65% de ACN/ Água com TFA 0,1%.
- 45 a 65% de ACN/ Água com TFA 0,1%.

Sendo, que desses gradientes o que teve melhor resultado para purificação foi o seguinte: H₂O:ACN:TFA (35/65/0,1; v/v/v), gradiente linear até H₂O:ACN:TFA (65/35/0,1; v/v/v) durante xy min para ambos os peptídeos (Figura 37 e 38).

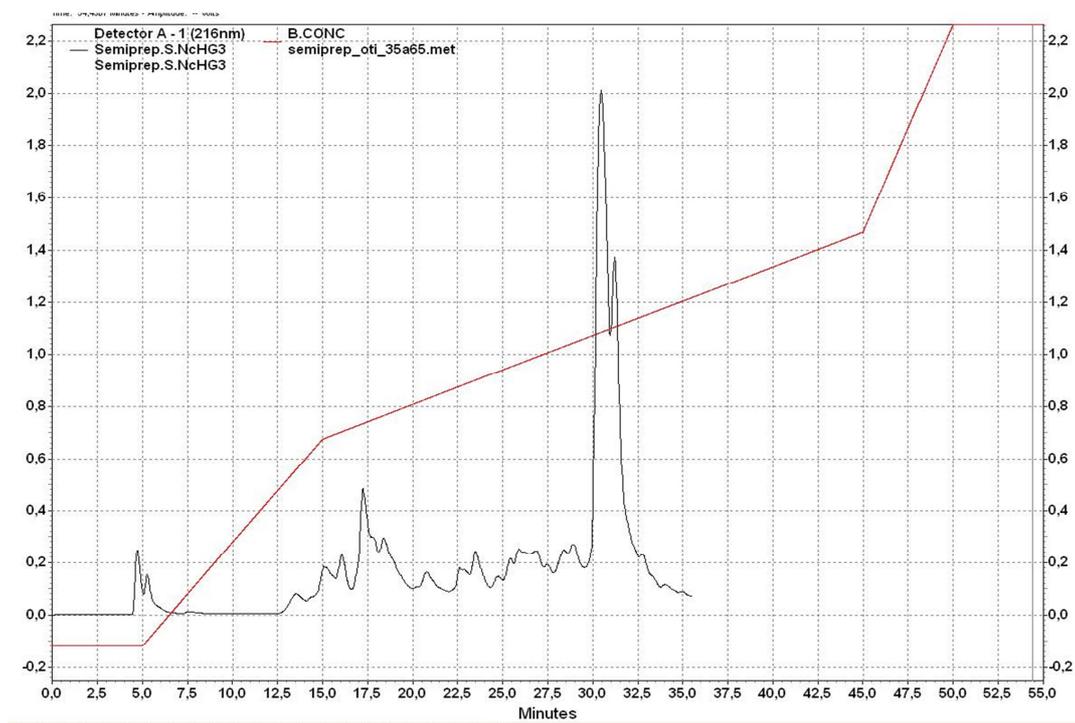


Figura 38. Cromatograma do peptídeo sintético cinerasetina.

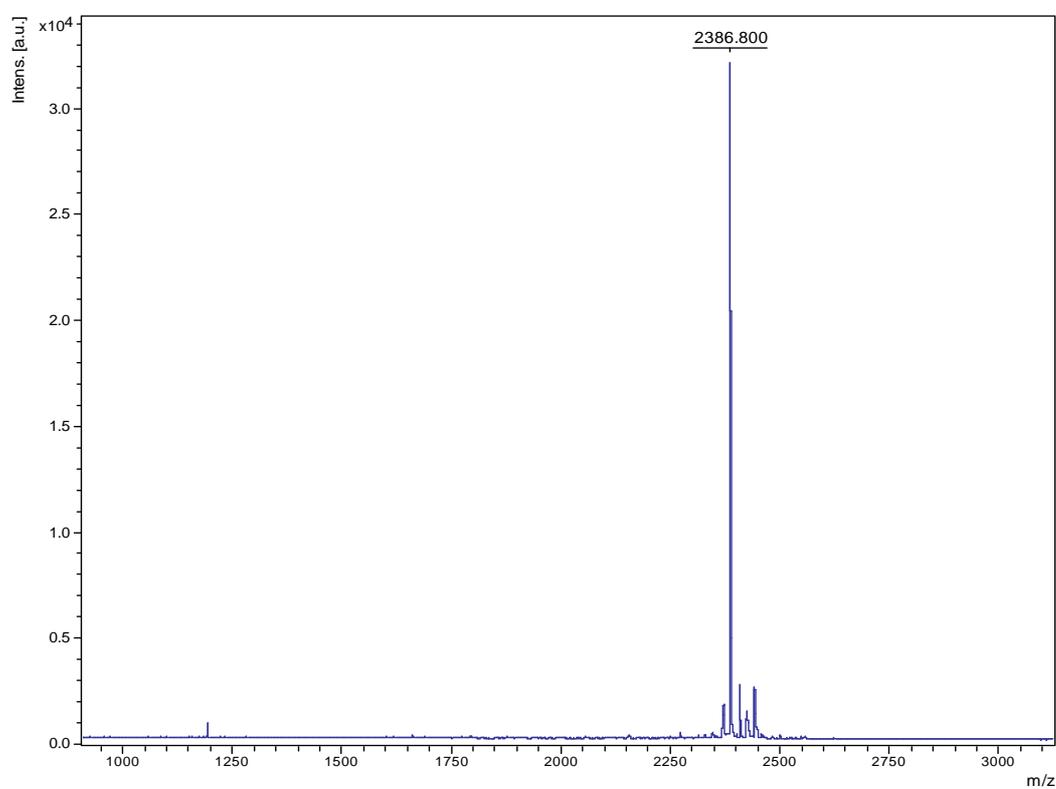


Figura 39. Espectro de massa do peptídeo cinerasetina purificado.

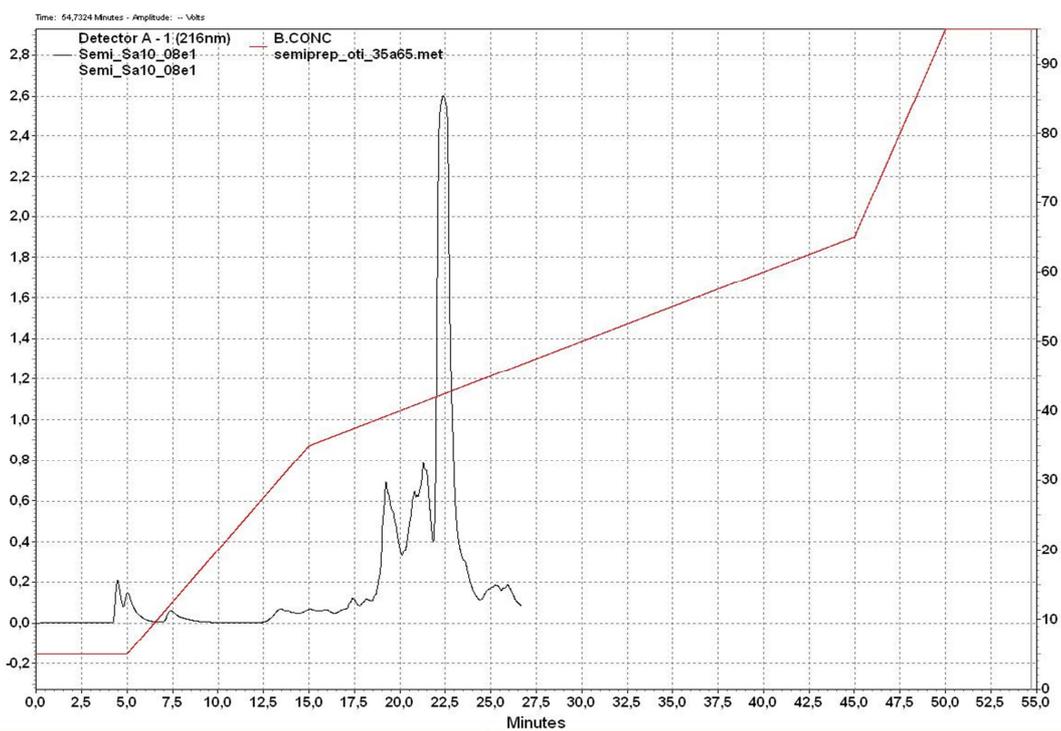


Figura 40. Cromatograma do derivado sintético de cinerasetina.

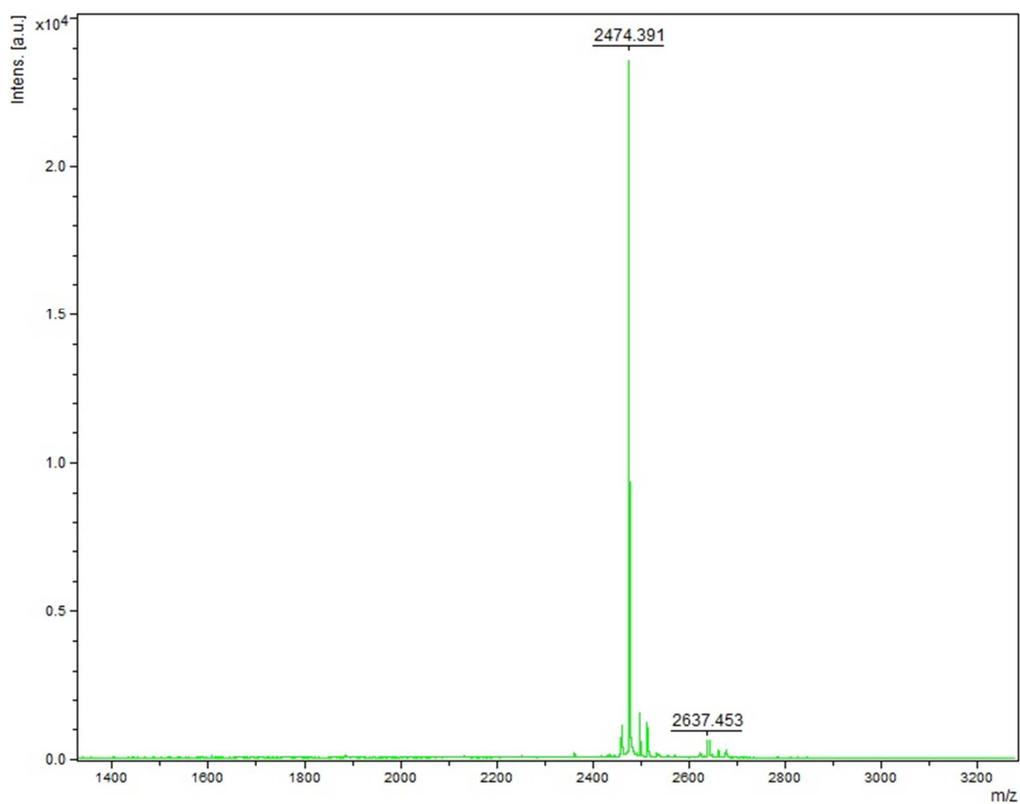


Figura 41. Peptídeo intragênico purificado.

5.6. Ensaio de atividade antimicrobiana.

O peptídeo Cinerascetina foi testado contra uma cepa bacteriana fitogênica: *Xantomonas axonopodis* pv. *Glycines* (Figura 41). E ainda contra três cepas bacterianas patogênicas: *Staphylococcus aureus* (Figura 42), *Bacillus cereus* (Figura 43) e *Streptococcus mutans* (Figura 44), todas do tipo Gram-positivas, variedades ATCC, esses testes foram realizados em triplicata menos a *S. aureus*, por falta de material.

No ensaio contra *Xantomonas axonopodis* pv. *Glycines*

O peptídeo Cinerascetina também foi testado contra o crescimento de fungo leveduriforme patogênico humano: *Candida albicans* do tipo ATCC. Foi determinada a concentração inibitória mínima de crescimento (MIC). Os testes foram realizados por meio de um ensaio de diluição seriada, em micro-placas de 96 poços partindo-se da concentração de 2 mg por mL⁻¹. A concentração inibitória mínima (MIC) do peptídeo Cinerascetina para *C. albicans* foi de 31, 25 µg .mL⁻¹.

O derivado sintético de Cinerascetina não apresentou atividade antifúngica e antibacteriana significativa até a concentração de 2mg por mL⁻¹.

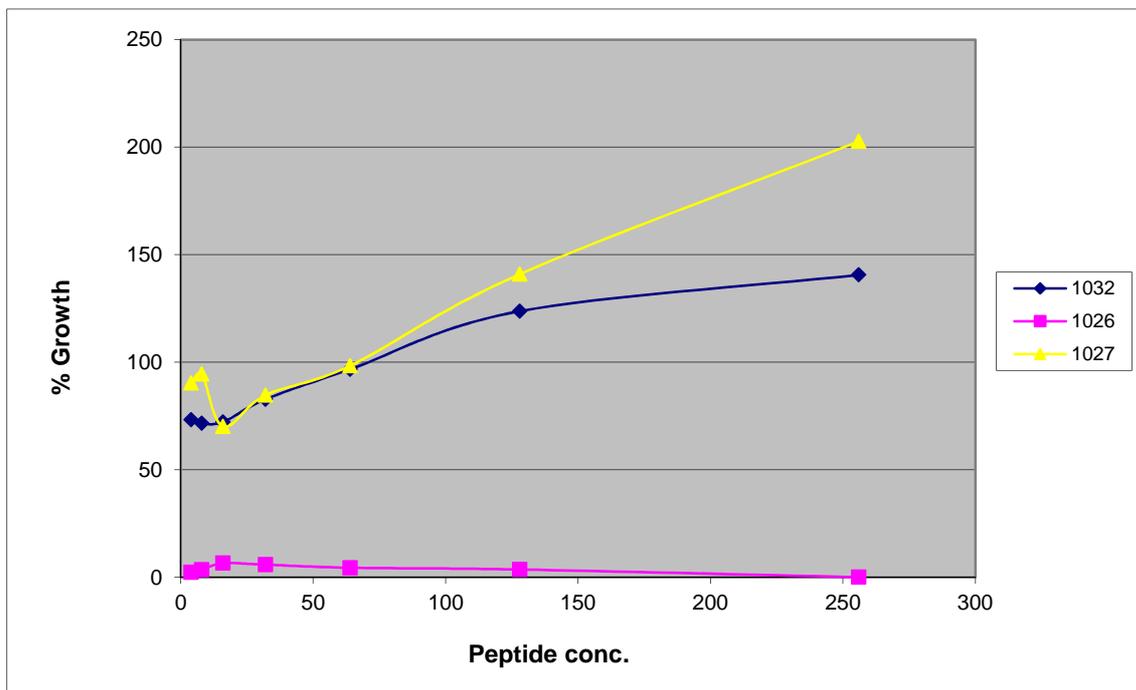


Figura 42. Gráfico de taxa de crescimento da bactéria *Xantomonas axonopodis* pv. *Glycines* versus concentração do peptídeo.

Linha Rosa: Peptídeo cinerascetina / Linha Amarela: Derivado sintético / Linha Azul: outro peptídeo.

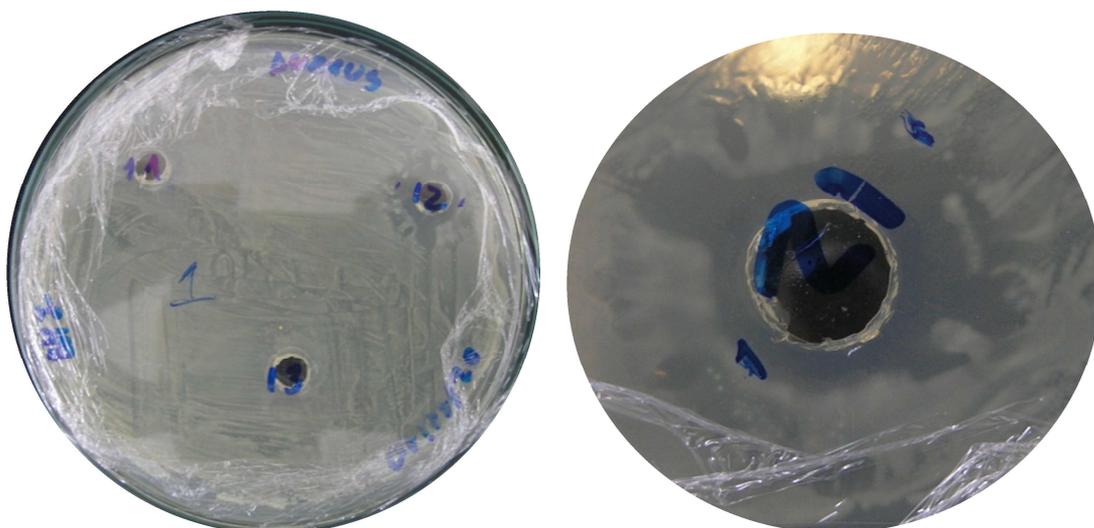


Figura 43. Ensaio antimicrobiano do peptídeo cinerascetina contra a bactéria *S. aureus*.

Esse ensaio foi realizado em duplicata, onde de 2 mg do peptídeo foi dissolvido 1 mL de água Miili-Q, que obtev-se resultado de inibição com média de $A_{600} = 1,2$ cm.

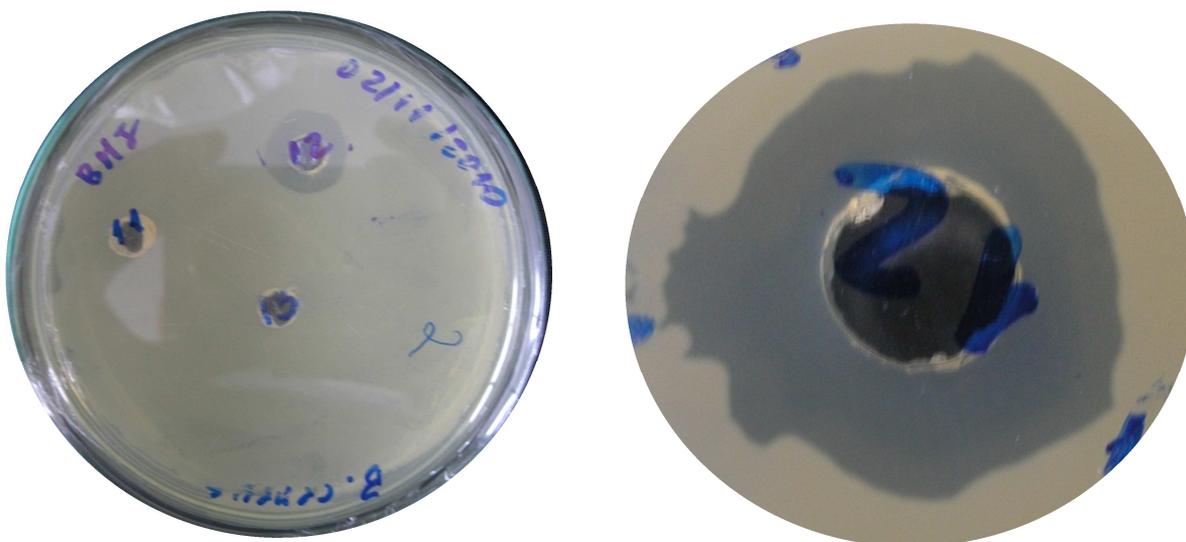


Figura 44. Teste antimicrobiano do peptídeo cinerascetina contra a bactéria *B. cereus*.

Esse ensaio foi realizado em triplicata, onde de 2 mg do peptídeo foi dissolvido 1 mL de água Miili-Q, que obtev-se resultado de inibição com média de $A_{50} = 1,5$ cm

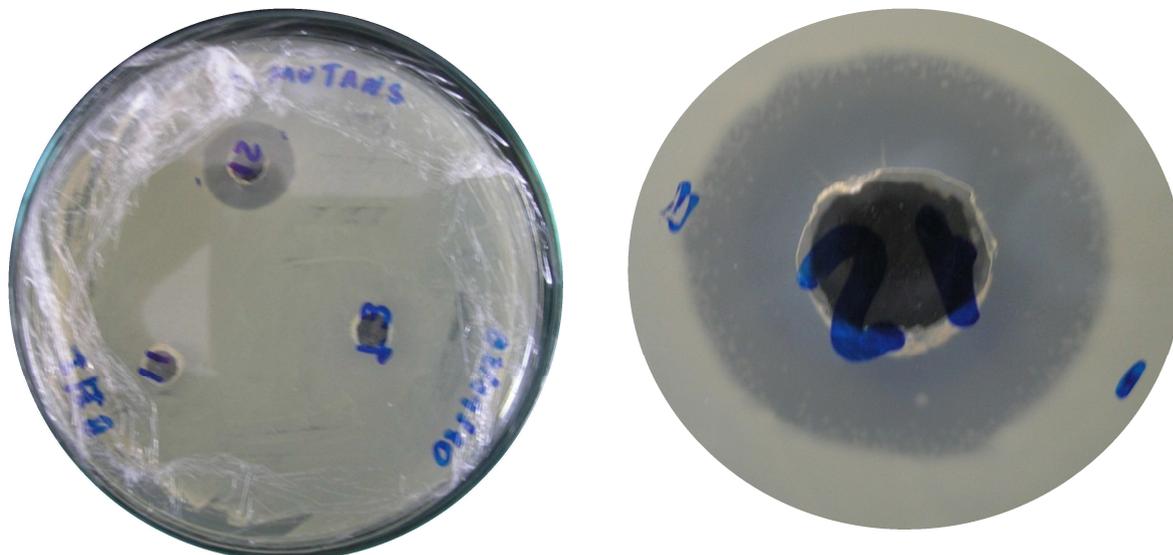


Figura 45. Teste antimicrobiano do peptídeo cinerascetina contra a bactéria *S. mutans*.

Esse ensaio foi realizado em triplicata, onde de 2 mg do peptídeo foi dissolvido 1 mL de água Miili-Q, que obtev-se resultado de inibição com média de $A_{50} = 1,8$ cm.



Figura 46. Teste antimicrobiano do peptídeo cinerascetina contra a bactéria *C. albicans*, realizado em triplicata.

Diluições de: 2 mg/mL – 1 mg/mL – 500 μ g/mL - 250 μ g/mL – 125 μ g/mL – 62,5 μ g/mL – 31,25 μ g/mL.

6. CONCLUSÃO.

As pesquisas para a busca de novos fármacos ou substâncias que sirvam de modelos para síntese de fármacos são uma necessidade imediata. Cada vez mais os microrganismos patogênicos estão ficando resistentes aos antibióticos utilizados, levando as comunidades médica e científica a ficarem em alerta.

A pele dos anfíbios, principalmente aqueles da ordem anura, por possuírem um arsenal de substâncias das mais variadas estruturas e atividades biológicas, entre elas os peptídeos antimicrobianos, que acabou tornando-se um dos principais alvos desses estudos. Nas últimas décadas, pesquisas mostraram que esses peptídeos presentes nas secreções de pele de anuros possuem extraordinários efeitos farmacológicos, algumas já em uso e outras em avançados testes ou servindo de modelo para fármacos.

Os peptídeos isolados e identificados neste trabalho confirmam o grande potencial biológico da espécie. Foi isolado, identificado e sintetizado um novo peptídeo, que foi denominado de Cinerascetina.

O peptídeo Cinerascetina sintético mostrou considerável atividade antimicrobiana e antifúngica, o que demonstra a viabilidade de se utilizar os análogos sintéticos dos peptídeos descobertos.

7. PESPECTIVAS.

Como perspectivas já existe uma proposta, a curto prazo, para continuar o estudo químico e farmacológico da espécie *Hypsiboas cinerascens*, objetivando principalmente identificar os outros constituintes de sua secreção.

Estudar a influência do seu habitat natural, na produção dos peptídeos antimicrobianos, podendo assim futuramente influenciar a espécie á produzirem determinados peptídeos, que possam ser usados no controle de doenças patogênicas.

8. CRONOGRAMA SEMESTRAL DAS ATIVIDADES.

Meta/Atividade	1º Sem.	2º Sem.	3º Sem.	4º Sem.
Levantamento Bibliográfico	R	R	R	R
Créditos obrigatórios	R	R	R	
Extração da secreção			R	
Separação e Purificação por Cromatografia			R	R
Espectrometria de Massa			R	R
Sequenciamento dos peptídeos			R	R
Síntese de peptídeos			R	R
Testes antimicrobianos			R	R
Preparação da dissertação	R	R	R	R
Apresentação da dissertação				X

9. REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB, Y. H. A.; POWER, G. J.; FLATT, P. R.; WOODHAMS, D. C.; ROLLINS-SMITH, L. A.; CONLON, J. M. 2008. A peptide of the phylloseptin family from the skin of the frog *Hylomantis lemur* (Phyllomedusinae) with potent in vitro and in vivo insulin-releasing activity. *Peptides*, 29: 2136 – 2143.

AL-GHAFFERI, N.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N.; COQUET, L.; JOUENNE, T.; LEPRINCE, J.; VAUDRY, H.; KING, J. D.; CONLON, J. M. 2010. Antimicrobial peptides from the skin secretions of the South-East Asian frog *Hylarana erythraea* (Ranidae). *Peptides*, 31: 548 – 554.

AMPHIBIAN SPECIES OF THE WORLD 5.4, Disponível em < <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.php> > acesso: 25/02/2010

AMPHIBIAWEB. Disponível em < www.amphibiaweb.org > acesso: 25/02/2010.

AMICHE, M.; LADRAM, A.; NICOLAS, P. 2008. Review A consistent nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily *Phyllomedusinae*. *Peptides*, 29: 2074 – 2082.

BAKER, M.A.; MALOY, W.L.; ZASLOFF, M.; JACOB, L.S. 1993. Anticancer of magainina 2 and analogue peptides. *Cancer Research*, 53:3052-3057.

BARBOSA, E. A. 2010. Avaliação da transcrição, expressão e indução de genes que codificam peptídeos antimicrobianos em *hypsiboas raniceps* por ferramentas de biologia molecular e espectrometria de massa. Dissertação de Mestrado. UNB, 1-92pg.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. 2009. Biodiversidade: Fonte potencial para descoberta de novos fármacos. *Quim Nova* 32: 679-688.

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

BECHINGER, B. & LOHNER. 2006. Detergent-like actions of linear amphipatic cationic antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*. 1758: 1529 – 1539.

BOMAN, H.G. 1991. Antibacterial peptides: Key components needed in immunity. *Cell*, 65: 205-207.

BRAND, G.D.; LEITE, J.R.S.A.; SILVA, L.P.; ALBUQUERQUE, S.; PRATES, M.V.; AZEVEDO, R.B.; CARREGARO, V.; SILVA, J.S.; SÁ, V.C.L.; BRANDÃO, R.A.; BLOCH JUNIOR, C. 2002. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:49332-49340.

BRAND, D. G.; LEITE, J. R. S. A.; MANDEL, S. M. S.; MESQUITA, D. A.; SILVA, L. P.; PRATES, M. V.; BARBOSA, E. A.; VINECKY, F.; MARTINS, G. R.; GALASSO, J. H.; KUCKELHAUS, S. A. S.; SAMPAIO, R. N. R.; JUNIOR, J. R.;

ANDRADE, A. C.; JUNIOR, C. B. 2006. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347: 739–746.

BROGDEN, K. A. 2005. Antimicrobial Peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews*, 3: 238-250.

CÂMARA, I. G. 2001. Megabiobiodiversidade Brasil. Editora sextante Artes (GMT Editores Ltda). 206p.

CAPOBIANCO, J. P. R.; VERÍSSIMO, A.; MOREIRA, A.; SAWYER, D.; SANTOS, I.; PINTO, L. P. 2001. Biodiversidade na Amazônia Brasileira. Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil. 540p.

CASTRO, M. S.; MATSUSHITA, R. H.; SEBBEN, A.; SOUSA, M.V.; FONTES, W. 2005. Hylinins: bombinins H structurally related peptides from the skin secretion of the Brazilian treefrog *Hyla biobeba*. *Protein Pept Let*, 12: 89 – 93.

CASTRO, M. S.; FERREIRA, T. C.; CILLI, E. M.; JUNIOR, E. C.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; SEBBEN, A.; RICART, C. A. O.; SOUSA, M. V.; FONTES, W. 2009. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* (“spotted treefrog”). *Peptides*, 30: 291-296

CONLON, J. M.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N.; LEPRINCE, J.; VAUDRY, H.; COQUET, L.; JOUENNE, T.; KING, J. D. 2008. Characterization of antimicrobial peptides from the skin secretions of the Malaysian frogs, *Odorrana hosii* and *Hylarana picturata* (Anura:Ranidae). *Toxicon*, 52: 465 – 473.

CONLON, J. M.; ABDEL-WAHAB, Y. H.; FLATT, P. R.; LEPRINCE, J.; HUBERT, V.; JOUENNE, T.; CONDAMINE, E. 2009a. A glycine-leucine-rich peptide structurally related to the plasticins from skin secretions of the frog *Leptodactylus laticeps* (Leptodactylidae). *Peptides*, 30: 888 – 892.

CONLON, J. M.; AHMEDA, E.; COQUET, L.; JOUENNE, T.; LEPRINCE, J.; VAUDRY, H.; KING, J. D. 2009b. Peptides with potent cytolytic activity from the skin secretions of the North American leopard frogs, *Lithobates blairi* and *Lithobates yavapaiensis*. *Toxicon*, 53: 699 – 705.

CONLON, J. M.; MEETANI, M. A.; COQUET, L.; JOUENNE, T.; LEPRINCE, J.; VAUDRY, H.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N.; KING, J. D. 2009c. Antimicrobial peptides from the skin secretions of the New World frogs *Lithobates capito* and *Lithobates warszewitschii* (Ranidae). *Peptides*, 30: 1775 – 1781.

CONLON, J. M.; DEMAND, A.; NIELSEN, P. F.; LEPRINCE, J.; VAUDRY, H.; WOODHAMS, D. C. 2009d. The alyteserins: Two families of antimicrobial peptides from the skin secretions of the midwife toad *Alytes obstetricans* (Alytidae). *Peptides*, 30: 1069 – 1073.

CONLON, J. M.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N. 2009e. Review Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1788: 1556 – 1563.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. 2000. Fmoc solid phase peptide synthesis. A practical approach. Oxford University Press, Oxford.

CHO, J. H.; SUNG, B. H.; KIM, S. C. 2009. Buforins: Histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1788: 1564 – 1569.

CHOU, H. T.; WEN, H. W.; KUO, T. Y.; LIN, C. C.; CHEN, W. J. 2010. Interaction of cationic antimicrobial peptides with phospholipid vesicles and their antibacterial activity. *Peptides*, 31: 1811–1820.

CRUCIANI, R.A.; BARKER, J.L.; ZASLOFF, M.; CHEN, H.C. 1991. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:3792-3796.

DALY, J.W.; WITKOP, B. Chemistry and pharmacology of frog venoms. In *Venomous Animals and their venoms*. Vol. 2, pags. 497-519. Academic Press, New York, 1971.

DALY, J. W.; BROWN, G. B.; MENSAH-BWUMAH, M.; MYERS, C. W. 1978 Classification of skin alkaloids from neotropical poison-dart frogs (Dendrobatidae). *Toxicon*, 16: 189-194.

DALY, J. W.; MYERS, C. W.; WHITTAKER, N. 1987. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic noxious substances in the amphibia. *Toxicon*, 25:1023-1095.

DALY, J. W.; SECUNDA, S. I.; GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F. 1992. Variability in alkaloid profiles in neotropical poison frogs (Dendrobatidae) - Genetic versus environmental determinants. *Toxicon*, 30:887-898.

DALY, J. W. 1998. Thirty years of discovering arthropod alkaloids in amphibian skin. *Journal Natural Product*, 61:162-172.

DALY, J. W.; KANEKO, T.; WILHAM, J.; GARRAFFO, H. M.; SPANDE, T. F.; ESPINOZA, A.; DONNELLY, M. A. 2002. Bioactive alkaloids of frog skin: combinatorial bioprospecting reveals that pumiliotoxins have an arthropod source. *Proceeding of the National Academy Sciences, USA* 99: 13996-11097.

DALY, J. W.; SPANDE, T. F.; GARRAFFO, H. M. 2005. Alkaloids from Amphibian Skin: A Tabulation of Over Eight-Hundred Compounds. *Journal Natural Product*, 68: 1556-1575.

DALY, J. W.; GARRAFFO, H. M.; SPANDE, T. F.; YEH, H. J. C.; PELTZER, P. M. CACIVIO, P. M. BALDO, J. D.; FAIVOVICH, J. 2008. Indolizidine 239Q and quinolizidine 275I. Major alkaloids in two Argentinian bufonid toads (*Melanophryniscus*). *Toxicon*, 52: 858-870.

- DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. 1986. *Biology of Amphibians*. New York: McGraw-Hill Book Company Publ. 228 pg.
- ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P. 1973. Active polypeptides of amphibian skin and their synthetic analogues. *Pure and applied Chemistry*, 35: 463-494.
- ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P. 1980. Active polypeptides: from amphibian skin to gastrointestinal tract and brain of mammals. *Trends Pharmacology Sciences*, 1: 391 – 395 .
- EPAND, R. M.; VOGEL, H. J. 1999. Review Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462: 11-28.
- FAIVOVICH, J.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. A.; FROST, D. R.; CAMPBELL, J. A.; WHEELER, W. C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: a phylogenetic analysis and taxonomic revision. 294: 1-240.
- FEARNSIDE, P. M. 2006. Desmatamento na Amazônia: dinâmica, impactos e controle. *Acta Amazônica*, 36: 395 – 400.
- FITCH, R. W.; SPANDE, T. F.; GARRAFFO, H. M.; YEH, H. J. C.; DALY, J. W. 2010. Phantasmidine: An Epibatidine congener from the Ecuadorian poison frog *Epipedobates anthonyi*. *Journal of Natural Product*, 73: 331–337.
- GENCO, C.A.; MALOY, W.L.; KARI, U.P.; MOTLEY, M. 2003. Antimicrobial activity of magainin analogues against anaerobic oral pathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21:75-78.
- HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. 2008. Review Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778: 357 – 375.
- JIN, L. L.; LI, Q.; SONG, S. S.; FENG, K.; ZHANG, D. B.; WANG, Q. Y.; CHEN, Y. H. 2009. Characterization of antimicrobial peptides isolated from the skin of the Chinese frog, *Rana dybowskii*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 174 – 178.
- LAI, R.; LIU, H.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. 2002. A novel proline rich bombesin-related peptide (PR-bombesina) from toad *Bombina maxima*. *Peptides*, 23: 437-442.
- LAMAR, W.W. 1997. *The World's Most Spectacular Reptiles and Amphibians*. Tampa: World Publications Inc. 208 pg.
- LEITE, J.R.S.A. ; SILVA, L.P. ; RODRIGUES, M.I.S. ; PRATES, M.V. ; BRAND, G.D. ; LACAVAL, B.M.; AZEVEDO, R.B. ; BOCCA, A.L. ; ALBUQUERQUE, S. ; BLOCH Jr., C. 2005. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the Phyllomedusa genus. *Peptides, USA*, v. 26 (4), p. 565-573

LEITE, J. R. S. A.; BARBOSA, E. A.; NORONHA, S. E. 2006. Levantamento de anuros (amphibia) na região do projeto Formoso-Araguaia e Arredores, Formoso do Araguaia, Tocantins, Brasil. *Sitientibus Série Ciências Biológicas*, 6: 56-63.

LEHNINGER, Albert Lester; DAVID L. Nelson; MICHAEL M. Cox 1917-1986. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. Traduzido por Arnaldo Antonio Simões, Wilson Roberto Navega Lodi 3. ed. São Paulo. Sarvier, 2002.

LIMA, A. P.; MAGNUSSON, W. E.; MENIN, M.; ERDTMAN, L. K.; RODRIGUES, D. J.; KELLER, C.; HODI, W. 2006. Guia de sapos da Reserva Adolpho Ducke, Amazônia Central. *Áttema Design Editorial*, 168p.

MALOY, W.I.; KARI, U.P. 1995. Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers*, 37:105-122.

MAGALHÃES, B. S.; MELO, J. A. T.; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. P.; PRATES, M. V.; VINECKY, F.; BARBOSA, E. A.; VERLY, R. M.; MEHTA, A.; NICOLI, J. R.; BEMQUERER, M. P.; ANDRADE, A. C.; JUNIOR, C. B. 2008. Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377: 1057–1061.

MEBS, D.; POGODAA, W.; MANEYROB, R.; KWETC, A. 2005. Studies on the poisonous skin secretion of individual red bellied toads, *Melanophryniscus montevidensis* (Anura, Bufonidae), from Uruguay. *Toxicon*, 46: 641–650.

MIELE, R.; PONTI, D.; BOMAN, H.G.; BARRA, D.; SIMMACO, M. 1998. Molecular cloning of a bombinin gene from *Bombina orientalis*: detection of NF- κ B and NF-IL6 binding sites in its promoter. *FEBS Letters*, 431:23-28.

MIGUEL, P. S; TAVELA, R. C.; MARTINS-NETO, R. G. 2007. O declínio populacional de anfíbios e suas conseqüências ecológicas. Sociedade de Ecologia do Brasil, Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil. Caxambu - MG

MORTARI, M. R.; SCHWART, E. N. F.; SCHWART, C. A.; JUNIOR, O. R. P.; SANTOS, M. M.; JUNIOR, C. B.; SEBBEN, A. 2004. Main alkaloids from the Brazilian dendrobatidae frog *Epipedobates flavopictus*: pumiliotoxin 251D, histrionicotoxin and decahydroquinolines. *Toxicon*, 43: 303–310.

MOR, A; NGUYEN, V. H.; DELFOUR, A.; MIGLIORE-SAMOUR, D.; NICOLAS, P. 1991. Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry*, 30: 8824-8830.

NICOLAS, P.; VANHOYE, D.; AMICHE, M. 2003. Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides. *Peptides*, 24: 1669 – 1680.

NICOLAS, P.; AMIRI, C. E. 2009. Review The dermaseptin superfamily: A gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1788: 1537 – 1550.

OHNUMA, A.; CONLON, J. M.; IWAMURO, S. 2010. Differential expression of genes encoding preprobrevinin-2, preproalustrin-2, and preproanatuerin-2 in developing larvae and adult tissues of the mountain Brown frog *Rana ornativentris*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 151:122 – 130.

OHSAKI, Y.; GAZDAR, A.F.; CHEN, H.C.; JOHNSON, B.E. 1992. Antitumor activity of magainin analogues against human lung cancer cell lines. *Cancer Research*, 52:3534-3538.

PAVELKA, L. A.; KIM, Y. H.; MOSHER, H. S. 1977 Tetrodotoxina and tetrodotoxin-like compounds from the eggs of the Costa Rican frog, *Atelopus chiriquiensis*. *Toxicon*, 15: 135.

PRATES, M. V.; FORÇA, M. L. S.; REGIS, W. C. B.; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. P.; PERTINHEZ, T. A.; ARAÚJO, A. L. T.; AZEVEDO, R. B.; SPISNI, A.; AND BLOCH, JR, C. 2004. The NMR-derived Solution Structure of a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Skin Secretion of the Anuran *Hyla punctata*. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 279, Nº 13: 13018 – 13026

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Pharmacology. Churchill Livingstone, a division of Copyright Harcourt Publishers Limited, 2000.

RATES, B.; SILVA, L. P.; IRENO, I. C.; LEITE, F. S. F.; BORGES, M. H.; BLOCH, C.; LIMA, M. E. ; PIMENTA, A. M. C. 2011. Peptidomic dissection of the skin secretion of *Phasmahyla jandaia* (Bokermann and Sazima, 1978) (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae). *Toxicon*, 57(1): 35 – 52.

ROLLINS-SMITH, L.A.; DOERSAM, J.K.; LONGCORE, J.E.; TAYLOR, S.K.; SHAMBLIN, J.C.; CAREY, C.; ZASLOFF, M.A. 2002. Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines. *Developmental & Comparative Immunology*, 26:63-72.

ROLLINS-SMITH, L. A.; CONLON, J. M. 2005. Review Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations. *Developmental and Comparative Immunology*. 29: 589 – 598.

SANDRA K. ACKERLEY: disponível em <
<http://www.uoguelph.ca/zoology/devobio/210labs/ecto5.html#frog>> acesso
 27/09/2010.

SAPORITO, R. A.; DONNELLYA, M. A.; JAINB, P.; GARRAFFO, H. M.; SPANDE, T. F.; DALY, J. W. 2007. Spatial and temporal patterns of alkaloid variation in the poison frog *Oophaga pumilio* in Costa Rica and Panama over 30 years. *Toxicon*, 50: 757–778.

SEBBEN, A.; SCHWARTZ, C.A.; CRUZ, J.S. 1993. A defesa química dos anfíbios. *Ciência Hoje*, 15: 25-33.

SPANDE, T. F.; GARRAFFO, H. M.; DALY, J. W. 1992a. Identification of histrionicotoxins by GC-MS and GC-FTIR: photo and chemical-artefacts and revised ^{13}C NMR assignments. *Tetrahedron*, 48: 1823-1836.

SPANDE, T. F.; GARRAFFO, H. M.; EDWARDS, M. W.; YEH, H. J. C.; PANNELL, L.; DALY, J. W. 1992b. Epibatidine: a novel (chloropyridyazabicycloheptane with potent analgesic activity from Ecuadoran Poison Frog. *Journal American Chemical Society*. 114:3475-3478.

SUGA, T.; MUNFSADA, K. 1988. The Pigments in the dorsal skin of frogs. *Journal of Natural Product*, 51:713-714.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. 1995. Review Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Camp. Biochem. Physiol.* Vol. IIIA, No. I, pp. 1 – 29.

WANG, X.; SONG, Y.; LI, J.; LIU, H.; XU, X.; LAI, R.; ZHANG, K. 2007. A new family of antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana pleuraden*. *Peptides*. 28: 2069 – 2074.

WANG, A.; WANG, J.; HONG, J.; FENG, H.; YANG, H.; YU, X.; MA, YUFANG.; LAI, REN. 2008. A novel family of antimicrobial peptides from the skin of *Amolops loloensis*. *Biochimie*, 90: 863 – 867.

WANG, H.; YAN, X.; YU, H.; HU, Y.; YU, Z.; ZHENG, H.; CHEN, Z.; ZHANG, Z.; LIU, J. 2009. Isolation, characterization and molecular cloning of new antimicrobial peptides belonging to the brevinin-1 and temporin families from the skin of *Hylarana latouchii* (Anura: Ranidae). *Biochimie*, 91: 540 – 547.

WANG, M.; WANG, Y.; WANG, A.; SONG, Y.; MA, D.; YANG, H.; MA, Y.; LAI, R. 2010. Five novel antimicrobial peptides from skin secretions of the frog, *Amolops loloensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 155: 72 – 76.

WANG, L.; CHEN, Y.; YANG, M.; ZHOU, M.; CHEN, T.; SUI, D. Y. 2010. Peptide DV-28 amide: An inhibitor of bradykinin-induced arterial smooth muscle relaxation encoded by *Bombina orientalis* skin kininogen-2. *Peptides*, 31(5): 979 – 982.

WITKOP, B.; GOSSINGER, E. 1983. Amphibian alkaloids. In: *The Alkaloids. Academic Press, New York*, 21: 139-253

ZASLOFF, M. 1992. Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 4:3-7.

ZASLOFF, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415: 383-395.

ZHENG, R.; YAO, B.; YU, H.; WANG, H.; BIAN, J.; FENG, F. 2010. Novel family of antimicrobial peptides from the skin of *Rana shuchinae*. *Peptides*, 31: 1674 – 1677.