

Douglas Oscar Ceolin Mariano

Análise do conteúdo da secreção cutânea
do anuro *Pipa carvalhoi* a procura de possíveis
moléculas com atividades biológicas relevantes

Trabalho apresentado ao programa de
Pós-graduação em Toxinologia do
Instituto Butantan, para obtenção do
título de Mestre em Toxinologia.

São Paulo
2014

Douglas Oscar Ceolin Mariano

Análise do conteúdo da secreção cutânea
do anuro *Pipa carvalhoi* a procura de possíveis
moléculas com atividades biológicas relevantes

Trabalho apresentado ao programa de
Pós-graduação em Toxinologia do
Instituto Butantan, para obtenção do
título de Mestre em Toxinologia.

Orientador: Daniel Carvalho Pimenta

São Paulo
2014

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DO TRABALHO

Eu, Douglas Oscar Ceolin Mariano mestrando pelo Programa de Pós-Graduação em Toxinologia, autorizo a reprodução deste trabalho no site da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo.

Douglas Oscar Ceolin Mariano

Daniel Carvalho Pimenta

São Paulo, 31/ 01/2014

**POS-GRADUAÇÃO EM TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN**

RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MESTRADO

NOME DO ALUNO:.....

DATA DO EXAME:...../...../.....

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovado	Reprovado
_____	_____	()	()
(Presidente)			
_____	_____	()	()
_____	_____	()	()

DECISÃO FINAL: APROVADO () REPROVADO ()

Comentários da Banca (opcional):

COMITÊ DE ÉTICA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br


CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Análise do conteúdo da secreção cutânea do anuro *Pipa carvalhoi* a procura de moléculas com possíveis atividades biológicas relevantes", **protocolo nº 892/12**, sob a responsabilidade de Daniel Carvalho Pimenta e Douglas Oscar Ceolin Mariano - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 11/4/12.

We certify that the research entitled "Analysis of the skin secretion of the anura *Pipa carvalhoi* searching for new molecules with relevant biological activities", **protocol number 892/12**, under the responsibility of Daniel Carvalho Pimenta and Douglas Oscar Ceolin Mariano - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research - is in agreement with Brazilian laws for use of experimental animals and the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 4/11/12.

Vigência do Projeto: 04/2012 - 03/2014 Laboratório de Bioquímica e Biofísica	Nº de animais/espécie 31 anfíbios <i>Pipa carvalhoi</i> (M,F)
--	---

São Paulo, 18 de abril de 2012


Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

Aos meus pais, minha irmã,
familiares e amigos pelo apoio
tanto nos momentos ruins
quanto nas horas boas:
chimarrão, churrascos e tragos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Mário e Rosenéri por sempre me apoiarem e me darem força para enfrentar esta etapa da minha vida longe de casa. A minha irmã Luísa, minha avó (Dona Alide) e a todos os familiares por tudo. Também homenageio minha avó Ocy e meu avô Ilário. Além disto, faço aqui uma pequena lembrança ao meu tio Alisson Roggia Ceolin, cuja ausência faz uma falta imensa.

Não posso deixar de agradecer ao meu orientador, Daniel Carvalho Pimenta, por ter me aceito como aluno, sem nem mesmo me conhecer e ainda, ter vindo de longe. Nestes dois anos aprendi muito e principalmente, “compartilhamos o conhecimento científico”.

Reservo um parágrafo para a Karine H. Brondani. Obrigado pela força, paciência e incentivos em vários momentos, e principalmente pela companhia. Desejo-te tudo de bom e sucesso.

Aos meus amigos e colegas de biologia, que volta e meia nos encontramos e confabulamos sobre ciência. E também aos colegas e amigos do laboratório de bioquímica toxicológica da UFSM e ao Dr. João B. T. da Rocha por ter me aceitado na iniciação científica em seu laboratório.

Agradeço aos colegas de laboratório e amigos: Juliana, Hugo, Rene, Ingrid, Aline e Ricardo. E a todos os funcionários do Laboratório de Bioquímica e Biofísica.

Ao Dr. Carlos Jared e a Dra. Marta Antoniazzi por ajudarem no projeto; e também ao pessoal do laboratório de biologia celular pela ajuda.

Aos colaboradores: Dra. Rita de Cássia Ruiz, do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, Dr Massuo Jorge Kato, Professor Titular do Departamento de Química Fundamental do IQ/USP e a Dra. Lydia Fumiko Yamaguchi, o Dr. Katsuhiko Konno, do Departamento de Kampo-farmacêutica, do Instituto de Medicina Natural, da Universidade de Toyama, Japão, Dr. Luis Roberto de Camargo Gonçalves, do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan.

Agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro (processo: 2012/02510-3).

“Prefiro ser parente de um macaco que de um homem que usa eloquência para destruir a verdade.”

Thomas Huxley

“Se o conhecimento pode criar problemas, não é através da ignorância que podemos solucioná-los.”

Isaac Asimov

RESUMO

Mariano, Douglas Oscar Ceolin. Análise do conteúdo da secreção cutânea do anuro *Pipa carvalhoi* a procura de possíveis moléculas com atividades biológicas relevantes. 102 f. Dissertação (Toxinologia). Instituto Butantan, São Paulo, 2014.

A busca por novas moléculas com atividades biológicas e/ou aplicações biotecnológicas cresce atualmente, principalmente moléculas ativas contra microrganismos. Em função disto, os peptídeos vêm sendo estudados, principalmente pelo fato de que a ação antimicrobiana se deve a interações físico-químicas com a membrana bacteriana, levando a uma menor chance de a bactéria desenvolver resistência. Sendo assim, vários animais vêm sendo estudados, dentre eles os anfíbios, os quais são capazes de sintetizar e secretar diferentes classes de moléculas, como alcaloides, esteroides, peptídeos e proteínas. Após a descoberta das Magaininas, peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea de *Xenopus laevis*, cresceram a procura por outros peptídeos antimicrobianos nos anfíbios. Devido à relação evolucionária com o *X. laevis*, nós analisamos bioquimicamente a secreção cutânea do anuro *Pipa carvalhoi*, inicialmente procurando identificar a presença de peptídeos antimicrobianos. A secreção cutânea de *P. carvalhoi* foi obtida através da estimulação química (administrando cloridrato de noradrenalina 1 ou 50 nmol/g), mecânica ou na ausência de estímulo. Obteve-se também a secreção de anuros recém-coletados e trazidos para o biotério. As secreções foram liofilizadas, ressuspensas e filtradas em membranas de corte molecular (10 kDa). Somente utilizou-se neste estudo a fração menor que 10 kDa. Este material foi analisado através da cromatografia líquida (RP – HPLC) e da espectrometria de massas. Após as análises cromatográficas, as secreções coletadas apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, independente de estímulo químico ou mecânico ou se o animal era recém-coletado ou se já estava aclimatado no biotério. A comparação dos cromatogramas sugere que *P. carvalhoi* é capaz de secretar, na sua pele, níveis basais dos principais componentes. Nas análises por espectrometria de massas, os materiais obtidos tanto pela estimulação mecânica quanto química mostraram possuir as mesmas moléculas majoritárias

(mesmas relações m/z), evidenciando que na secreção existe um grupo de moléculas que não varia em função da coleta. Além disto, corrobora a eficácia da utilização da estimulação mecânica para a obtenção do material, preferencialmente à estimulação química. A secreção cutânea foi fracionada em 14 frações por RP-HPLC, sendo estas analisadas por espectrometria de massas (ESI – IT – TOF) e testadas em ensaios antimicrobianos. As análises não identificaram a presença de peptídeos, sendo encontradas somente moléculas de baixa massa molecular (< 800 Da). Entre os vários testes biológicos realizados, a fração 11 foi capaz de reduzir o crescimento microbiano de bactérias gram-positivas (aproximadamente 95 %). Quando reanalisada por RP – HPLC, a fração 11 foi subdividida em 9 frações (11.1 - 11.9). As frações 11.7 - 11.8 foram efetivas novamente em bactérias gram-positivas. Nas análises por espectrometria de massas, foi observado que as frações 11.6 – 11.8 contêm as mesmas relações m/z (m/z 577 Da), sugerindo que se trata de isômeros. Esta molécula possivelmente protege o animal contra as infecções bacterianas, como a exemplo das magaininas ou outros peptídeos antimicrobianos em *X. laevis*. O pico majoritário da secreção de *P. carvalhoi* (m/z 188) foi purificado e submetido à caracterização estrutural (NMR), sendo identificado como ácido quinurênico. No entanto, neste estudo, ainda não foi possível associar um efeito biológico ao ácido quinurênico.

Palavras-chave: Venenos, Atividades Biológicas, Anura, Pipidae, *Xenopus laevis*.

ABSTRACT

Mariano, Douglas Oscar Ceolin. Analysis of the skin secretion of the anura *Pipa carvalhoi* searching for new molecules with relevant biological. 102 p. Master thesis (Toxinology). Instituto Butantan, São Paulo, 2014.

The search of new molecules presenting relevant biological activities or biotechnology applications is constantly increasing, mostly against microorganism. Different peptides are being studied, since antimicrobials effects occurs by physical-chemical membrane interactions, it would be difficult to bacteria develop resistance. Thus, innumerous animals have been studied, including amphibians that could produce and secrete promising molecules, such as alkaloids, peptides, proteins and steroids. Since the discovery of Magainins, antimicrobial peptides present in the skin secretion of the frog *Xenopus laevis*, the search for new molecules with antimicrobial activity was intensified in others amphibians. Due to the evolutionary relationship with *X. laevis*, we studied biochemically the skin secretion of the frog *Pipa carvalhoi*, aiming to identify antimicrobial peptides. Skins secretion solutions from *P. carvalhoi* were obtained after chemical (administration of 1 or 50 nmol/g norepinephrine hydrochloride) or mechanical stimuli, or in the absence of stimulus. Moreover, the skin secretion from freshly collected anuran was analyzed. This skin secretion solution was lyophilized, resuspended and filtered in membrane cut-off filters (10 kDa). In this study, only the fraction under 10 kDa was used. The material was analyzed by liquid chromatography (RP – HPLC) and mass spectrometry. After chromatographic analyzes, we observe that the secretions solutions showed similar chromatographic profile, regardless of stimulus (chemical or mechanical) or if anurans were recently collected or being acclimated in the laboratory. Also, it was possible to observe that *P. carvalhoi* presented a basal level of this secretion in its skin. Spectrometry analysis reveals that both stimulation (chemically or mechanically) present the same main molecules (same m/z), showing that this skin secretion have a group of molecules that did not vary as a function of collection. In addition to this, these results show the efficacy of mechanical stimulation to obtain the material. A total of 14 fractions were obtained from skin secretion by RP-HPLC, and each one

was analyzed by mass spectrometry (ESI – IT – TOF) and tested for antimicrobial assay. No fraction showed to contain peptides, only low molecular mass molecules (< 800 Da). Antimicrobials assays show that fraction 11 decreased the growth of gram-positive bacteria (circa 95 %). When reanalyzed by RP - HPLC, fraction 11 was subdivided in 9 fractions (11.1 - 11.9). Fractions 11.7 - 11.8 were effective again against gram-positive bacteria. Mass spectrometric analyses reveal that fractions 11.6 - 11.8 contain the same ions (m/z 577 Da), suggesting the presence of isomers. This molecule could be responsible for protecting the animal from bacterial infections, as magainins or other antimicrobials peptides do in *Xenopus*. The major peak present in this skin secretion (m/z 188) was purified, submitted to structural characterization (NMR) and identified as Kynurenic Acid; nevertheless, no biological activity has been identified yet.

Key words: Poisons, Biological Activities, Anura, Pipidae, *Xenopus laevis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação geral da interação entre os peptídeos antimicrobianos nas membranas celulares bacterianas ou eucarióticas.....	20
Figura 2 - Modelos propostos para a ação antimicrobiana de alguns PAMs.....	21
Figura 3 - Alvos intracelulares dos peptídeos antimicrobianos.....	22
Figura 4 – Representantes da classe Amphibia.....	23
Figura 5 - Glândulas granulares presentes na superfície cutânea dos anuros.....	24
Figura 6 - Representantes da família Pipidae.....	26
Figura 7 - Filogenia proposta para a família Pipidae.....	27
Figura 8 - Sequência primária das Magaininas.....	28
Figura 9 - Comparação entre o peptídeo antimicrobiano Magainina II e o seu análogo Pexiganan.....	30
Figura 10 - Perfil cromatográfico das coletas realizadas utilizando 1nmol/g de cloridrato de noradrenalina.....	41
Figura 11 - Perfil cromatográfico obtido através da estimulação química com 50 nmol/g de cloridrato de noradrenalina.....	42
Figura 12 - Perfil cromatográfico obtido através da estimulação mecânica.....	44
Figura 13 - Perfil cromatográfico obtido na ausência de estímulo.....	45
Figura 14 - Perfis cromatográficos das secreções analisadas por LC-MS.....	46
Figura 15 - Representação quantitativa das m/z presentes nas secreções obtidas nas diferentes metodologias.....	47
Figura 16 - Análise comparativa entre a secreção cutânea dos anuros mantidos em cativeiro e recém-coletados.....	48
Figura 17 - Representação quantitativa das m/z presentes nas secreções dos anuros mantidos em cativeiro ou recém-coletados.....	49
Figura 18 - Fracionamento da secreção cutânea de <i>P. carvalhoi</i>	49
Figura 19 - Razão m/z de algumas frações coletadas da secreção cutânea de <i>P. carvalhoi</i>	51
Figura 20 - Análise cromatográfica da secreção cutânea na ausência das frações 8 e 11.....	52
Figura 21 - Elucidação da estrutura molecular da fração 8.....	53

Figura 22 - Perfil cromatográfico da fração 11.....	56
Figura 23 - Espectrometria de massas dos constituintes da fração 11.	58
Figura 24 - Análise por RP-HPLC e espectrometria de massas das frações 11.6, 11.7 e 11.8.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das coletas realizadas para a obtenção da secreção cutânea de <i>P. carvalhoi</i>	40
Tabela 2 - Ressonância Nuclear Magnética (2 D – NMR) mostrando a correlação entre os núcleos acoplados do ^1H and ^{13}C do ácido quinurênico.....	53
Tabela 3 - Atividade antimicrobiana das frações coletadas da secreção cutânea produzida pelo anuro de <i>P. carvalhoi</i>	55
Tabela 4 - Atividade antimicrobiana dos picos que constituem a fração 11.....	59
Tabela 5 - Atividade antimicrobiana das frações 11.6 – 8.	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Peptídeos Antimicrobianos	18
1.2. Classe Amphibia	23
1.2.1. Ordem Anura	25
1.2.2. Família Pipidae	26
1.2.2.1. Magaininas.....	28
1.2.2.2. PAMs na família Pipidae	30
1.2.3. Gênero <i>Pipa</i>	31
2. OBJETIVOS	32
2.1. Objetivo Geral	32
2.2. Objetivos Específicos	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Fluxograma de Trabalho	33
3.2. Animais	34
3.3. Obtenção da secreção cutânea de <i>Pipa carvalhoi</i>	34
3.3.1. Protocolo	34
3.3.2. Estimulação química.....	34
3.3.3. Ausência de estímulo	35
3.4. Preparo do Material	35
3.5. Caracterização Bioquímica	35
3.5.1. Análise e fracionamento da secreção cutânea de <i>Pipa carvalhoi</i>	35
3.5.2. Espectrometria de massas das frações coletadas	36
3.5.3. Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS) da secreção cutânea de <i>Pipa carvalhoi</i>	36
3.5.4. Espectro de Absorção e Fluorescência	37

3.5.5. Ressonância magnética nuclear (NMR)	38
3.5.6. Isolamento da fração ativa.....	38
3.6. Ensaio Biológico	38
3.6.1. Atividade Antimicrobiana das frações coletadas	38
3.6.2. Atividade Antimicrobiana dos constituintes da fração ativa....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Obtenção e análise da secreção cutânea de <i>P. carvalhoi</i> por HPLC	40
4.1.1. Estimulação Química.....	40
4.1.2. Estimulação mecânica.....	43
4.1.3. Ausência de Estímulo	43
4.2. Análise da secreção cutânea de <i>Pipa carvalhoi</i> por LC-MS ..	45
4.3. Variação na constituição da secreção cutânea de <i>P. carvalhoi</i>	48
4.4. Fracionamento do material	49
4.5. Espectrometria de massas das frações coletadas	50
4.6. Reanálise da secreção cutânea de <i>P. carvalhoi</i>	50
4.7. Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética	53
4.7. Testes Biológicos	54
4.7.1 Atividade antimicrobiana das frações	54
4.8. Isolamento da fração ativa	55
4.9. Espectrometria de massas das frações 11.1 - 11.9	56
4.10. Atividade Antimicrobiana das frações 11.1 - 11.9.....	59
4.11. Análise das frações 11.6, 11.7 e 11.8	60
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Peptídeos Antimicrobianos

A atividade antimicrobiana em secreções, no sangue ou em tecidos linfáticos foi inicialmente descrita no final do século XIX. No entanto, somente entre os anos de 1920 e 1950 que os pesquisadores conseguiram isolar algumas moléculas com ação antimicrobiana, agindo tanto em bactérias gram-positivas quanto em gram-negativas, a partir destas secreções e fluidos biológicos (SKARNES; WATSON, 1957; BROGDEN, 2005). Logo após, substâncias antimicrobianas purificadas em extratos de grânulos de fagócitos foram correlacionadas a compostos catiônicos de baixa massa molecular (HIRSCH, 1956; BROGDEN, 2005). Finalmente, após os estudos independentes realizados pelos grupos dos pesquisadores Hans Boman, Michael Zasloff e Robert Lehrer entre os anos de 1970 e 1990, ao qual conseguiram isolar e purificar Peptídeos Antimicrobianos (PAMs) em insetos, anfíbios e mamíferos, intensificou-se a procura desta classe de moléculas em inúmeros organismos (STEINER et al., 1981; ZASLOFF, 1987; GANZ et al., 1990; PASUPULETI et al., 2012).

Os PAMs fazem parte da resposta imune inata, sendo o principal sistema de defesa contra infecções causadas por muitos microrganismos patogênicos (JENSSEN et al., 2006). Sendo geralmente pequenos (6 – 40 aminoácidos), estes peptídeos são moléculas anfipáticas, hidrofóbicas, aniônicas ou catiônicas, e possuem baixa toxicidade contra células eucarióticas (ZASLOFF, 2002; BROGDEN, 2005; GIULIANI et al., 2007).

Esses peptídeos podem ser agrupados em subgrupos de acordo com os aminoácidos que os constituem e também, com sua estrutura. O primeiro subgrupo compreende os peptídeos aniônicos, ricos em ácido glutâmico e ácido aspártico, como por exemplo, a Maximina H5 presente no anuro *Bombina maxima* (LAI et al., 2002; BROGDEN, 2005). No segundo subgrupo estão presentes os peptídeos catiônicos lineares α -hélice, como as cecropinas e as magaininas. No terceiro subgrupo encontram-se os peptídeos catiônicos ricos em aminoácidos específicos, como a prolina ou arginina ou glicina ou triptofano ou histidina. Os peptídeos

aniônicos ou catiônicos que contém cisteína e formam pontes dissulfeto estão incluídos no quarto subgrupo, como por exemplo, a Defensina A presente nos insetos (COCIANCICH et al., 1993). Por último, encontramos os peptídeos aniônicos ou catiônicos oriundos da clivagem de proteínas, como o peptídeo Casocidina I resultante da clivagem da caseína em humanos (BROGDEN, 2005).

As membranas celulares são os principais alvos para o mecanismo de ação dos PAMs. Estas membranas organizadas em bicamadas estão arranjadas na forma de um mosaico fluido de proteínas e fosfolipídios, contendo regiões hidrofóbicas ou hidrofílicas. Porém, a constituição lipídica das mesmas varia entre as membranas procarióticas e eucarióticas, sendo que esta diferença está relacionada à eficácia dos PAMs (PASUPULETI et al., 2012).

As membranas celulares bacterianas são compostas por fosfolipídios, como por exemplo, a cardiolipina, o fosfatidilglicerol e a fosfatidilserina (CRONAN, 2003), cujos grupos carregados negativamente encontram-se voltados para a face externa da membrana. As bactérias gram-negativas diferem das gram-positivas pela presença de uma fina camada de peptidoglicano, uma camada externa e, além disto, a membrana citoplasmática contém Lipopolissacarídeos (LPS) (HANCOCK, 2001). Já os fungos apresentam uma membrana rica em polímeros de manose ligados a peptídeos, a fosfatidilinositol, a fosfatidilserina, a difosfatidilglicerol, aos quais atribuem uma alta carga negativa na superfície externa das membranas (PRASAD; GHANNOUM, 1996; YOUNT; YEAMAN, 2006; JIANG et al., 2008).

Contudo, as membranas celulares dos mamíferos são ricas em fosfolipídios eletricamente neutros, como a fosfatidilcolina, a esfingomiélnina e a fosfatidiletanolamina. Os lipídios carregados negativamente também se encontram presente nestas membranas, porém os seus grupos carregados estão voltados principalmente para a face interna da membrana (TYTLER et al., 1995; MATSUZAKI, 1999; ZASLOFF, 2002).

Essa diferença de cargas entre as membranas exerce um papel fundamental para a atividade antimicrobiana dos PAMs. Inicialmente, através de uma combinação de interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre os peptídeos aniônicos ou catiônicos e estruturas da superfície bacteriana, os peptídeos acabam concentrando-se na superfície microbiana. Logo em seguida, os PAMs precisam atravessar a parede celular bacteriana para conseguirem interagir com a bicamada lipídica da membrana celular (fig. 1) (BROGDEN, 2005).

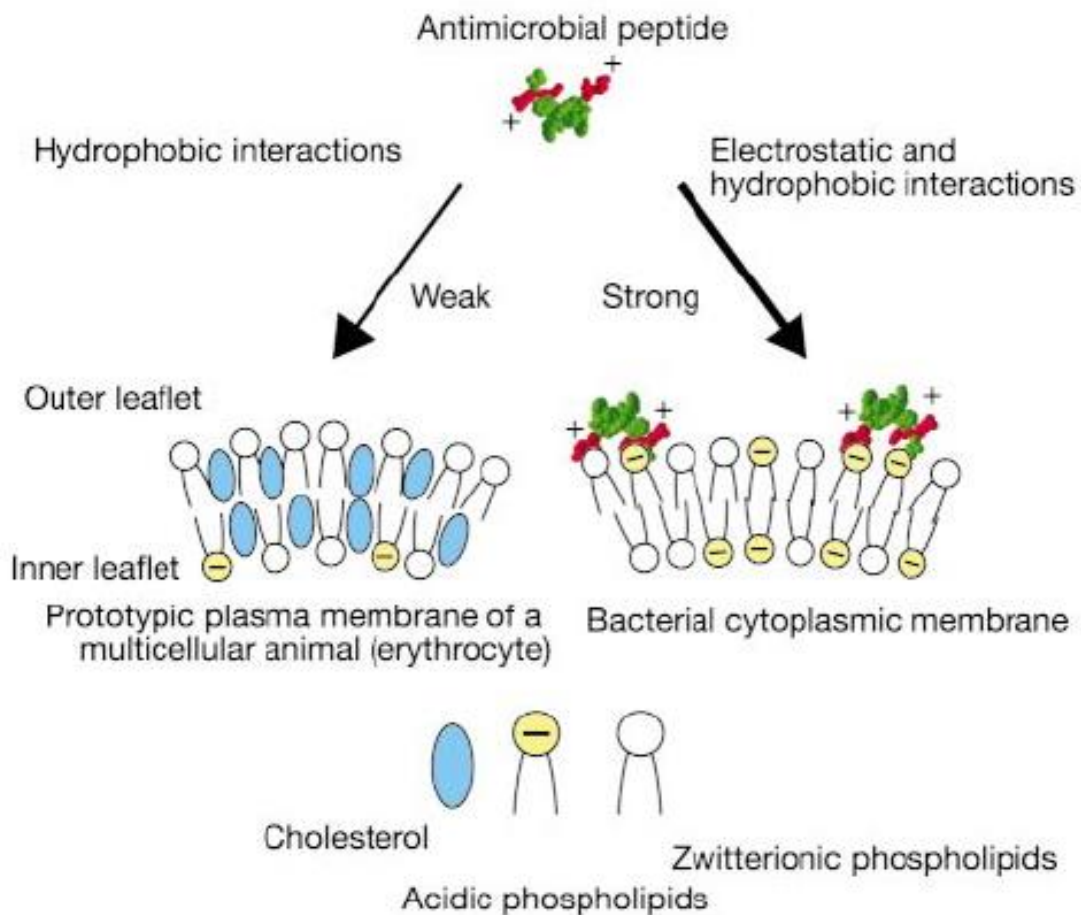


Figura 1 - Representação geral da interação entre os peptídeos antimicrobianos nas membranas celulares bacterianas ou eucarióticas.

A face externa da membrana celular bacteriana é constituída por muitos fosfolípidos carregados negativamente. No entanto, a superfície externa das membranas celulares de plantas e animais é composta principalmente por lípidios neutros. Esta diferença de cargas entre as membranas exerce um papel fundamental para a atividade antimicrobiana dos PAMs, pois através de uma combinação de interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre os peptídeos e estruturas da superfície bacteriana, os peptídeos acabam concentrando-se na superfície microbiana. Fonte: Zasloff, 2002.

No entanto, os mecanismos de permeabilização nas membranas e consequente ação antimicrobiana não são completamente definidos, sendo propostas algumas possibilidades: Formação de barril (Barrel Stave) (fig. 2A), formação de tapete (Carpet-Like) (fig. 2B), formação do poro toroidal (fig. 2C) (ZASLOFF, 2002; BROGDEN, 2005; GIULIANI, et al., 2007).

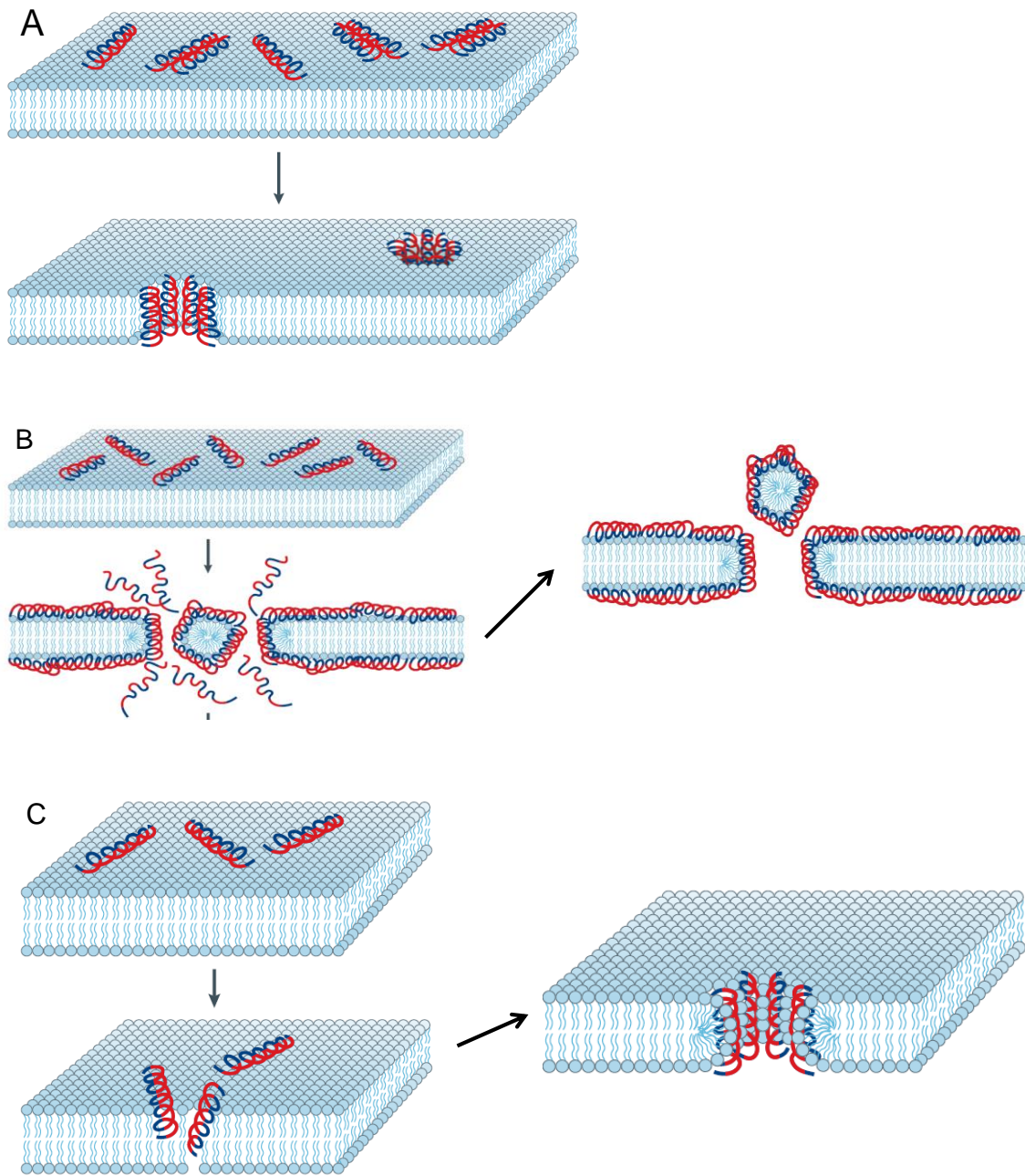


Figura 2 - Modelos propostos para a ação antimicrobiana de alguns PAMs.

(A) Modelo Formação de Barril (Barril Stave): Ao se acumularem, os peptídeos se inserem na bicamada lipídica; a região hidrofóbica do peptídeo alinha-se com a região hidrofóbica da membrana bacteriana, já a região hidrofílica localiza-se no interior do poro; em azul: região hidrofóbica do peptídeo; em vermelho: região hidrofílica do peptídeo; Fonte: Brogden, 2005; (B) Modelo Formação do Carpete: Ao se concentrarem na superfície das membranas, estes peptídeos acabam rompendo-as, orientando-se paralelamente a bicamada lipídica, assim formando uma extensa camada; em azul: região hidrofóbica do peptídeo; em vermelho: região hidrofílica do peptídeo; Fonte: Brogden, 2005; (C) Formação do Poro Toroidal: Neste modelo os peptídeos se agregam e induzem a monocamada lipídica a se curvar continuamente através do poro, de forma que a passagem hidrofílica do canal é resultado do alinhamento das faces polares dos peptídeos inseridos e das cabeças dos lipídios; em azul: região hidrofóbica do peptídeo; em vermelho: região hidrofílica do peptídeo; Fonte: Brogden, 2005.

Além de atuarem na membrana celular, alguns peptídeos são capazes de atravessá-la, assim exercendo o seu efeito em alvos intracelulares (ZHANG et al., 2001; PATRZYKAT et al., 2002). Estudos mostram que este efeito antimicrobiano ocorre por meio da inibição da síntese do ácido desoxiribonucleico (SUBBALAKSHMI; SITARAM, 1998; PATRZYKAT et al., 2002), síntese do ácido ribonucleico (PARK et al., 1998), síntese proteica (CARLSSON et al., 1991; BOMAN et al., 1993; SUBBALAKSHMI; SITARAM, 1998), inibição da atividade enzimática (OTVOS et al., 2000; KRAGOL et al., 2001), ou inibição da síntese da parede celular (BRUMFITT et al., 2002; ZASLOFF, 2002; BROGDEN, 2005; PASUPULETI et al., 2012) (fig 3).

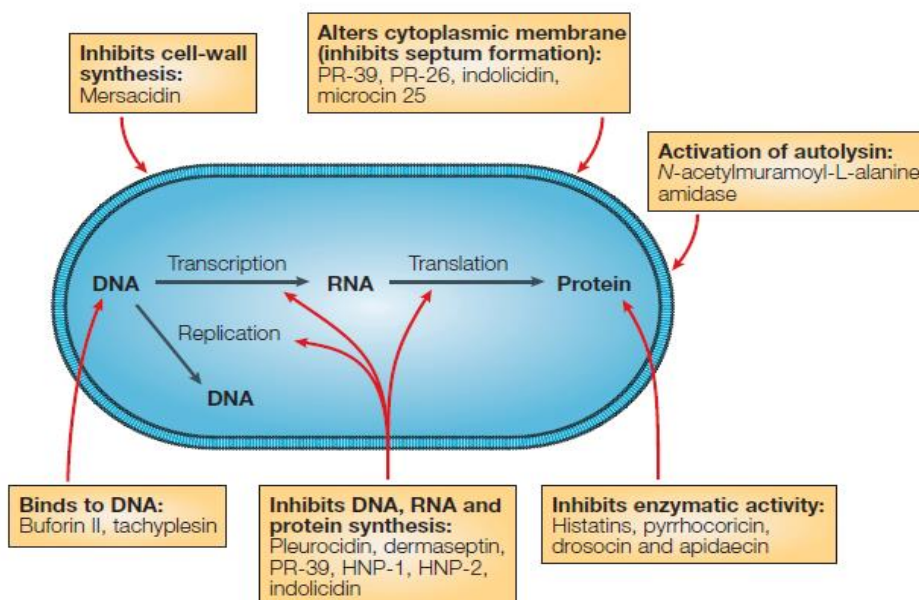


Figura 3 - Alvos intracelulares dos peptídeos antimicrobianos.

Após atravessarem a membrana celular, alguns peptídeos são capazes de exercer o seu efeito antimicrobiano em diferentes alvos intracelulares, como por exemplo, a inibição da síntese do ácido desoxiribonucleico (DNA), síntese do ácido ribonucleico (RNA), síntese proteica, inibição da atividade enzimática, ou inibição da síntese da parede celular. Fonte: Brogden, 2005.

A resistência microbiana aos PAMs é pouco provável, pois como atuam nas membranas, as bactérias teriam que redesenhá-la, além de alterar a composição e a organização lipídica, um processo muito custoso para o microrganismo (ZASLOFF, 2002). Apesar disto, algumas bactérias adquiriram esta resistência, como exemplo a *Staphylococcus aureus* consegue transportar o aminoácido D-Alanina do citoplasma para a superfície do ácido teicóico, assim reduzindo a sua carga negativa. Outras bactérias conseguem sintetizar enzimas proteolíticas capazes de degradar os PAMs

(RESNICK et al., 1991; GROISMAN, 1994; ROLAND et al., 1994; BELAS et al., 2004).

Atualmente, mais de 1500 PAMs já foram descritos em diferentes organismos. Dentre estes podemos destacar os animais que compreendem a classe Amphibia.

1.2. Classe Amphibia

A Classe Amphibia compreende os primeiros vertebrados a ocuparem o ambiente terrestre, sendo encontrados registros fósseis datados da era Paleozóica, no período Devoniano (CARROLL et al., 1999; SCHOCH, 2009). Atualmente, os anfíbios encontram-se todos classificados na sub-classe Lissamphibia, totalizando 7044 espécies descritas e agrupadas em 3 ordens: Anura (sapos, rãs e pererecas), Caudata (salamandras e tritões) e Gymnophiona (cecílias) (fig. 4) (ZARDOYA; MEYER, 2001; FROST, 2014).



Figura 4 – Representantes da classe Amphibia.

Esta classe é composta atualmente por três ordens: Ordem Anura (A) (*Hemiphractus Johnsoni*). Fonte: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Anura/pictures/collections/contributors/phil_myers/classic/bird2_131/?start=120.

Ordem Caudata (B) (*Tylototriton verrucosus*). Fonte: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Amphibia/pictures/collections/contributors/james_harding/Tylototriton_shanjing/?start=570.

E Ordem Gymnophiona (C) (*Siphonops paulensis*). Fonte: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Caeciliidae/pictures/collections/contributors/janalee_caldwell/S_paulensis/.

A presença dos anfíbios no ambiente terrestre deu-se em função de adaptações morfofuncionais e comportamentais que ocorreram gradualmente. Dentre estas adaptações podemos destacar a pele, um órgão responsável por importantes funções biológicas, tais como as trocas gasosas, a termorregulação, a proteção, o equilíbrio osmótico e iônico (TOLEDO; JARED, 1993, 1995; CLARKE, 1997; LARSEN; RAMLØV, 2013).

Para auxiliar nessas funções biológicas, os anfíbios secretam um muco composto principalmente por glicosaminoglicanos e proteoglicanos. Este muco, produzido pelas glândulas mucosas presentes por toda a superfície cutânea, atua mantendo a pele destes animais úmida e lubrificada, além de auxiliar na termorregulação e osmorregulação (TOLEDO; JARED, 1993; AMEY; GRIGG, 1995; LARSEN; RAMLØV, 2013).

Além dessas importantes funções biológicas, a pele também atua como um mecanismo de defesa química passiva contra predadores ou microrganismos patogênicos (TOLEDO; JARED, 1995; CLARKE, 1997; LARSEN; RAMLØV, 2013). Neste órgão estão presentes glândulas chamadas granulares ou de veneno (fig. 5). Estas glândulas encontram-se distribuídas na superfície cutânea dos anfíbios, podendo ser encontradas tanto uniformemente distribuídas quanto agrupadas em uma determinada região do anfíbio, formando macroglândulas (TOLEDO; JARED, 1995).

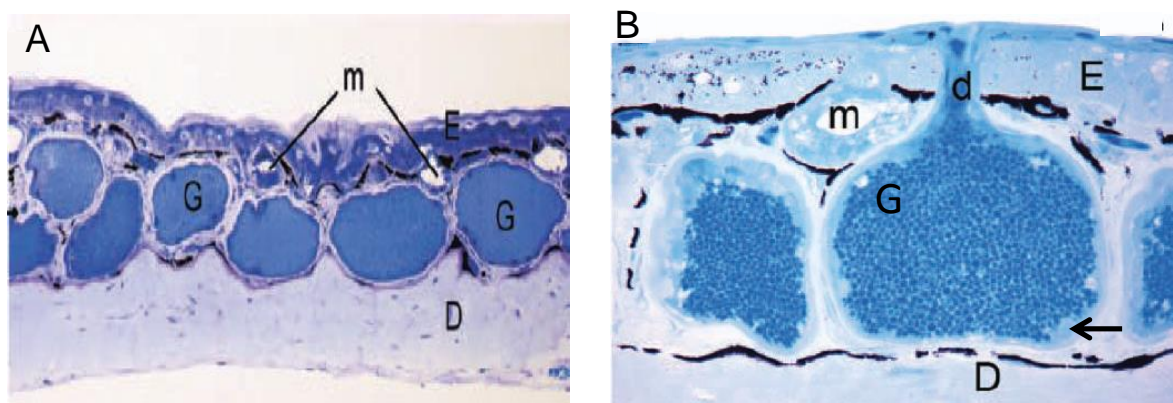


Figura 5 - Glândulas granulares presentes na superfície cutânea dos anuros.

(A) Exemplo da distribuição das glândulas granulares presente na região dorsal da pele do anuro *Leptodactylus lineatus*. (B) Morfologia das glândulas granulares. A secreção cutânea liberada pelos anuros encontra-se armazenada no alvéolo da glândula granular, podendo ser visualizada na forma de grânulos, presentes em diferentes tamanhos e formas, através da microscopia eletrônica. Uma camada de células mioepiteliais contorna o alvéolo. Também está presente nas glândulas granulares um ducto por onde ocorre o extravasamento da secreção na pele do anuro. D: derme; E: epiderme; G: glândula granular; d: ducto; m: glândula mucosa; seta: camada de células mioepiteliais. Fonte: de Prates et al., 2012.

Encontramos nessas glândulas diferentes classes de moléculas, como alcaloides, esteroides, peptídeos biologicamente ativos e proteínas (ERSPAMER, 1971; ERSPAMER; MELCHIORRI, 1973; ERSPAMER et al., 1986; BEVINS; ZASLOFF, 1990; DALY, 1995; CLARKE, 1997). Estas moléculas estão presentes entre as diversas espécies de anfíbios, sendo a elas atribuídas inúmeras atividades biológicas, tais como uma ação antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, antileishmania, anti-tripanosossômica, vasoativa, entre outras (ERSPAMER et al., 1986; ZASLOFF, 1987; TEMPONE et al., 2008; CONCEIÇÃO et al., 2009; SCIANI et al., 2013b).

1.2.1. Ordem Anura

A ordem Anura representada por sapos, rãs e pererecas, é o grupo mais diversificado dos anfíbios. Até o momento já foram descritos em torno de 6200 espécies, onde estão agrupados em 54 famílias (FROST, 2014). O Brasil abriga a maior diversidade de anuros do planeta, as quais se encontram distribuídas em 20 famílias (FROST, 2014).

Essa diversidade associada a uma grande capacidade de sintetizar diferentes moléculas biológicas e armazena-las nas glândulas granulares os torna uma rica fonte para a procura de moléculas com potencial farmacológico. Por exemplo, os anuros presentes no gênero *Leptodactylus* (família Leptodactylidae) possuem uma secreção rica em proteínas e peptídeos, estando presentes também moléculas de baixa massa molecular como serotonina e histamina (TOLEDO; JARED, 1995; PRATES et al., 2012).

Também encontramos a presença de proteínas no gênero *Rhinella* (família Bufonidae), no entanto, os principais constituintes desta secreção são alcaloides e esteroides, pequenas moléculas que exibem diferentes atividades biológicas (TOLEDO; JARED, 1995; SCIANI et al., 2013a). Porém, no gênero *Phyllomedusa* (família Hylidae), os principais componentes presentes são peptídeos (TOLEDO; JARED, 1995; CONCEIÇÃO et al., 2009).

1.2.2. Família Pipidae

Dentro da ordem Anura encontramos a família Pipidae, a qual possui registros fósseis datados do período Cretáceo (ESTES, 1975; BÁEZ; PÚGENER, 1998) e atualmente é composta por 5 gêneros: *Hymenochirus*, *Pseudhymenochirus*, *Silurana* e *Xenopus*, encontrados na África, e o gênero *Pipa*, presente na América do Sul (fig. 6). Quanto à filogenia deste táxon, é amplamente aceito que cada gênero que compõem esta família seja considerado monofilético, assim como é aceito que as relações (*Xenopus* + *Silurana*) e (*Hymenochirus* + *Pseudhymenochirus*) formam cada uma um clado. Além disto, muitos estudos concordam que a família Pipidae seja um clado irmão da família *Rhinophrynidae* (fig. 7) (ROELANTS; BOSSUYT, 2005; IRISARRI et al., 2011; BEWICK et al., 2012).

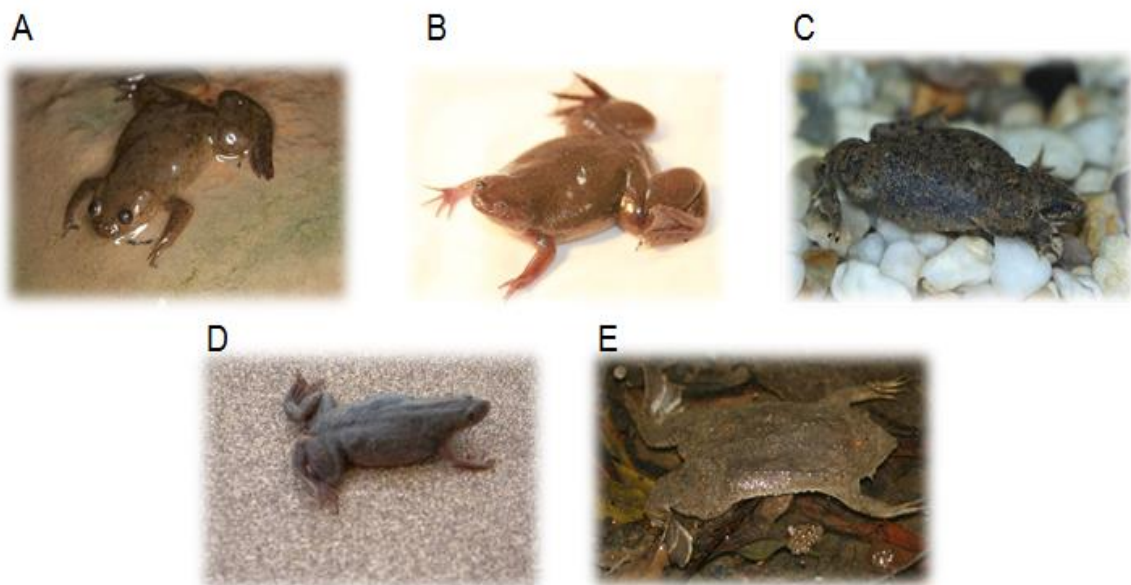


Figura 6 - Representantes da família Pipidae. (A) Gênero *Xenopus* (*X. laevis*). Fonte: http://eol.org/data_objects/24877242. (B) Gênero *Silurana* (*S. epitropicalis*). Fonte: http://eol.org/data_objects/26693716. (C) Gênero *Hymenochirus* (*H. curtipes*). Fonte: <http://eol.org/pages/42953/overview>. (D) Gênero *Pseudhymenochirus* (*P. merlini*). Fonte: <http://eol.org/pages/103544/overview>. (E) Gênero *Pipa* (*P. pipa*). Fonte: http://eol.org/data_objects/25001064.

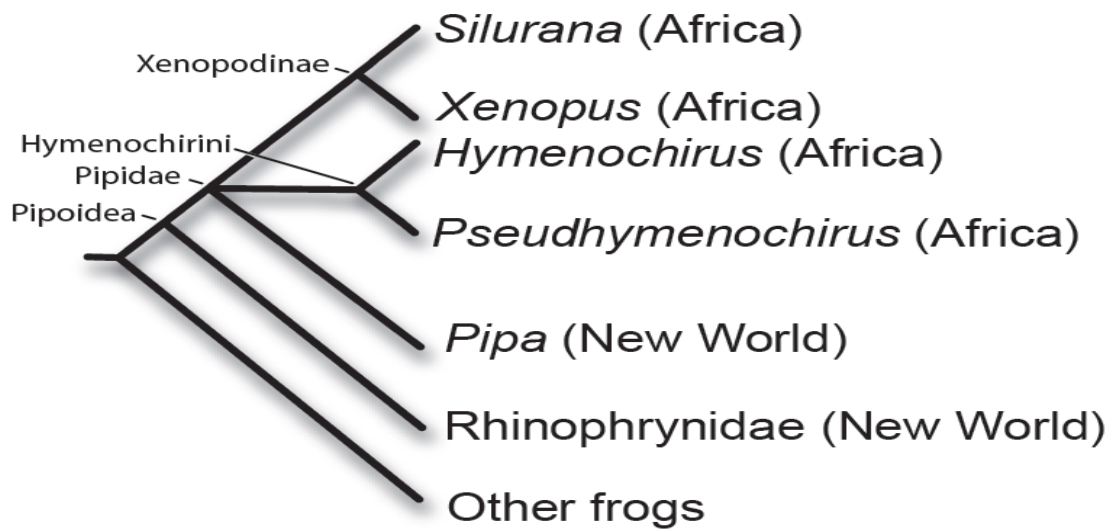


Figura 7 - Filogenia proposta para a família Pipidae.

Baseados em dados morfológicos e moleculares, conseguiu-se estabelecer a monofilia entre *Silurana* + *Xenopus*, *Hymenochirus* + *Pseudhymenochirus* e Pipidae + *Rhinophrynidae*. No entanto, ainda não foi possível estabelecer uma relação entre os três principais gêneros da família Pipidae (*Xenopus*, *Hymenochirus* e *Pipa*). Fonte: Bewick et al., 2012.

O anuro mais estudado dessa família é a espécie *Xenopus laevis* (gênero *Xenopus*) (fig. 6A), devido à facilidade na sua manutenção e reprodução em cativeiro. Inicialmente, *X. laevis* foi utilizado em muitos países como uma alternativa para a realização de testes de gravidez (GURDON; HOPWOOD, 2000). Atualmente, este anfíbio encontra-se presente em muitos laboratórios de pesquisa, sendo considerado um organismo modelo nas áreas de desenvolvimento, biologia celular e molecular (GURDON; HOPWOOD, 2000; LILLO et al., 2011).

Em uma dessas pesquisas, ao estudar a expressão do Ácido Ribonucleico (RNA) em oócitos de *X. laevis*, Michael Zasloff notou que após passarem por procedimentos cirúrgicos não estéreis, eram extremamente raros os casos onde os anuros desenvolviam infecções. Curioso com esta observação, Zasloff resolveu estudar a pele destes animais. Finalmente, no ano de 1987, ele acabou publicando um trabalho aonde mostrava o isolamento e a caracterização de uma nova família de potentes peptídeos antimicrobianos de amplo espectro, ao qual chamou de Magaininas (oriundo da palavra “magain” em hebreu, significando “escudo”) (ZASLOFF, 1987).

1.2.2.1. Magaininas

Ao estudar a pele de fêmeas de *X. laevis*, Zasloff (1987) encontrou uma nova classe de peptídeos antimicrobianos, as Magaininas, identificados como magainina I e magainina II (ZASLOFF, 1987). No entanto, estes mesmos peptídeos já haviam sido descritos anteriormente por Giovannini et al. (1987), quando ao estudar o conteúdo da secreção das glândulas granulares de *X. laevis*, por meio da estimulação com noradrenalina, eles acabaram identificando e sequenciando vários peptídeos, entre eles um denominado PGS (peptídeo entre glicina e serina – Magainina II) e um outro chamado [Gly10, Lys22] PGS (Magainina I) (fig. 8).

As magaininas possuem 23 resíduos de aminoácidos, diferindo em apenas 2 posições: na posição 10 (magainina I: Glicina; magainina II: Lisina) e na posição 22 (magainina I: lisina; magainina II: asparagina) (GIOVANNINI et al., 1987; ZASLOFF, 1987). Esta pequena modificação reflete numa diferença nas atividades biológicas exibidas por estes peptídeos. A sequência de aminoácidos revela a presença de seis cargas positivas na extremidade amino-terminal da magainina 2, diferindo assim da magainina 1, a qual apresenta 5 cargas positivas nesta mesma extremidade. Esta região carregada positivamente forma uma hélice anfipática ao interagir com as membranas carregadas negativamente. Existindo esta diferença de cargas, a interação eletrostática entre as membranas é mais forte com a magainina 2 em comparação com a magainina 1, explicando assim o efeito antimicrobiano mais acentuado presente na magainina 2 (MATSUZAKI et al., 1991).

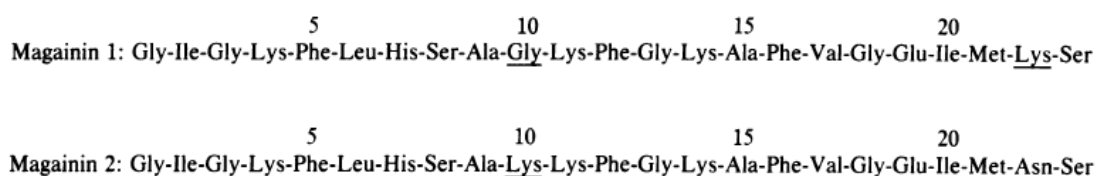


Figura 8 - Sequência primária das Magaininas.
Fonte: Zasloff, 1987.

Ao realizar estudos com o peptídeo sintético da magainina 2, Zasloff (1988) descobriu que a remoção dos 3 primeiros resíduos de aminoácidos na extremidade amino-terminal (Glicina – Isoleucina – Glicina) não alterava a sua ação antimicrobiana. No entanto, a remoção do quarto resíduo amino-terminal (Lisina) reduz drasticamente este efeito, assim como a remoção do resíduo de Serina presente na extremidade carboxi-terminal da magainina 2 (ZASLOFF, 1988).

Esses peptídeos apresentam uma ação antimicrobiana de amplo espectro, atuando tanto em bactérias gram-positivas quanto gram-negativas, além de fungos e protozoários, utilizando diferentes concentrações (10 – 100 µg/ml; ± 4 – 42 µM). (ZASLOFF, 1987; CHEN et al., 1988; ZASLOFF et al., 1988; BESSALLE et al., 1990; MALOY; KARI, 1995; MATSUZAKI et al., 1997). As magaininas também mostraram ser capazes de exibir uma ação antitumoral (CRUCIANI et al., 1991; LEHMANN et al., 2006; RIEDL et al., 2011).

Por serem catiônicas, as magaininas organizam-se em uma estrutura de alfa hélice anfipática ao interagir com membranas fosfolipídicas negativamente carregadas (DUCLOHIER et al., 1989; CRUCIANI et al., 1992; MATSUZAKI, 1999). Após ocorrer a interação magainina-membrana, estes peptídeos se reorganizam e acabam orientando-se perpendicularmente a membrana fosfolipídica, formando o poro toroidal (GESSEL, et al., 1997; MURZYN; PASENKIEWICZ-GIERULA, 2003; YEAMAN; YOUNT, 2003; LEHMANN et al., 2006) (fig. 2C).

Através de estudos relacionando a estrutura molecular e atividade biológica, Zasloff e os seus colaboradores da companhia biotecnológica “Magainin Pharmaceuticals” conseguiram desenvolver um peptídeo antimicrobiano análogo a magainina 2 e com potencial uso terapêutico (fig. 9). Pexiganan ou MSI-78 é um peptídeo linear de 22 aminoácidos desenvolvido para ser aplicado na pele, na forma de creme, objetivando o combate de úlceras de pé causadas pelo diabetes. No entanto, no ano de 1999 o órgão governamental americano “Food and Drug Administration” (FDA) não aprovou este produto logo após o término do estudo clínico na fase III, pois este tratamento não foi mais efetivo quando comparados aos tratamentos disponíveis (GOTTLER; RAMAMOORTHY, 2009).

1.2.3. Gênero *Pipa*

O único representante da família Pipidae na América do Sul é o gênero *Pipa*. Neste táxon, além dos anuros apresentarem modificações morfológicas internas e externas quando comparadas aos outros gêneros, há a presença de um cuidado parental diferenciado (TRUEB; CANNATELLA, 1986; TRUEB et al., 2000; GREVEN; RICHTER, 2009, FERNANDES et al., 2011).

Após a realização do amplexo e a fertilização dos ovos, os mesmos são armazenados em câmaras de criação, localizadas na região dorsal das fêmeas, sendo uma câmara para cada ovo (TRUEB; CANNATELLA, 1986; GREVEN; RICHTER, 2009, FERNANDES et al., 2011). Algumas espécies como a *P. parva*, *P. myersi* e *P. carvalhoi*, os girinos eclodem após um período de desenvolvimento nos ovos. Entretanto, nas espécies *P. pipa*, *P. arrabali*, *P. snethlageae* e *P. aspera* a fase larval ocorre totalmente no interior dos ovos, sendo eclodidos na forma de imagos (TRUEB; CANNATELLA, 1986).

No entanto, não há informações na literatura quanto ao conteúdo da secreção liberada pelas glândulas granulares nos anuros do gênero *Pipa*. Devido à presença de diferentes peptídeos antimicrobianos na secreção cutânea de vários anuros da família Pipidae, será que o gênero *Pipa* também desenvolveu este mecanismo de defesa?

Neste sentido, iremos analisar a secreção cutânea do anuro *Pipa carvalhoi*, procurando isolar e caracterizar os seus constituintes, além de relacioná-las a uma ação antimicrobiana.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar bioquimicamente o conteúdo da secreção cutânea de *Pipa carvalhoi* e verificar se há peptídeos semelhantes às magaininas.

2.2. Objetivos Específicos

Padronizar uma metodologia para a obtenção da secreção cutânea de *P. carvalhoi*;

Estabelecer uma metodologia analítica baseada em cromatografia líquida;

Isolar as moléculas que constituem a secreção;

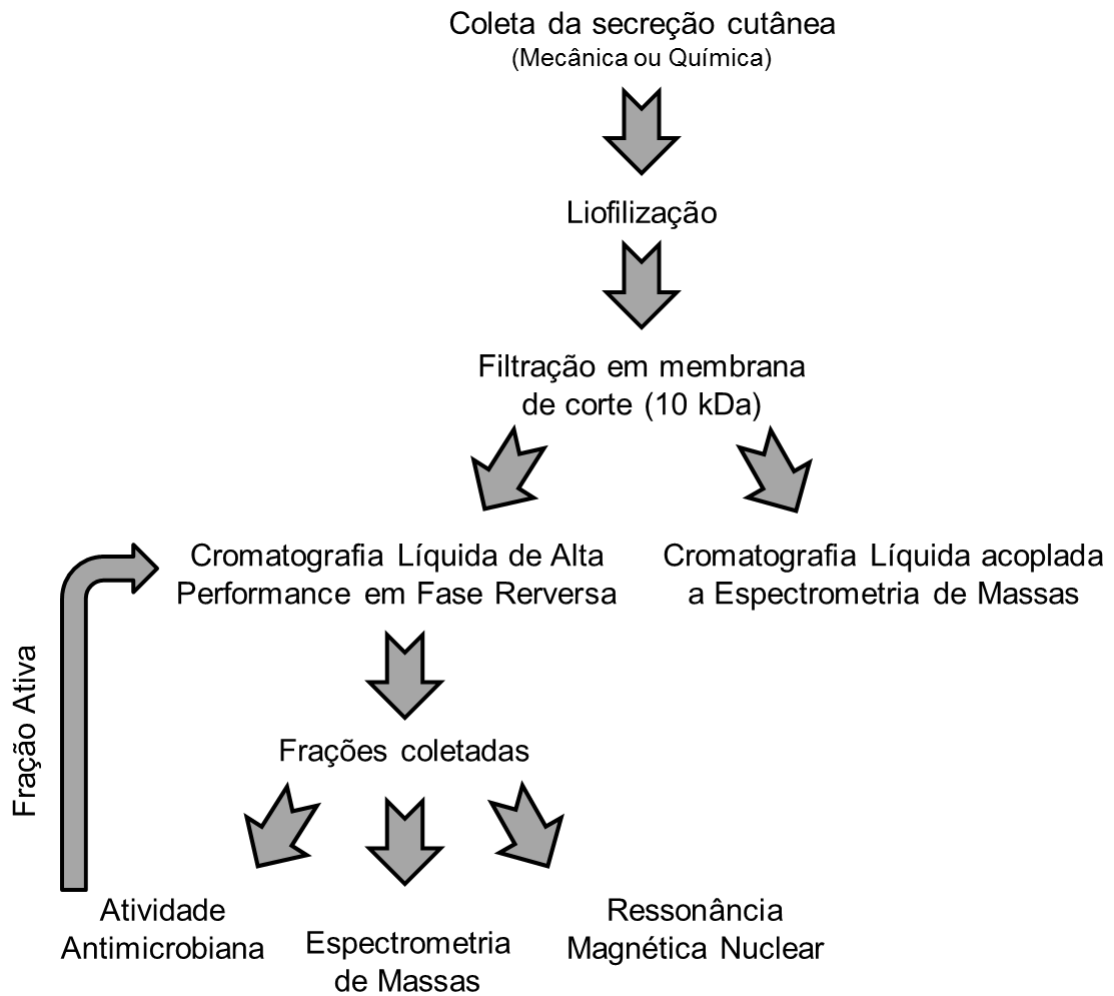
Caracterizar bioquimicamente as moléculas encontradas (estrutura/sequência);

Caracterizar biologicamente as moléculas encontradas (atividade/função);

Comparar as moléculas presentes na secreção cutânea de *P. carvalhoi* com aquelas já descritas nas secreções cutâneas dos anuros da família Pipidae, procurando relacionar evolutivamente estes anfíbios.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Fluxograma de Trabalho



3.2. Animais

Os anuros da espécie *Pipa carvalhoi* foram coletados em setembro de 2010 e em maio de 2013, na cidade de Ilhéus, Bahia. Os animais foram mantidos em um tanque de aço (200 L de água) contendo um sistema de aclimação (filtração e aquecimento) (FERNANDES et al., 2011) no biotério do laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, sob os cuidados do Dr. Carlos Alberto Gonçalves Silva Jared (ZIMMERMANN, 1995). Utilizou-se 10 anuros de cada coleta, ambos os sexos (visualmente não há dimorfismo sexual), idade indeterminada e pesando cerca de 20 g.

3.3. Obtenção da secreção cutânea de *Pipa carvalhoi*

3.3.1. Protocolo

O protocolo para a obtenção da secreção cutânea de *Pipa carvalhoi* foi submetido e aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) (protocolo 892/12).

3.3.2. Estimulação química

Inicialmente os animais foram lavados com água destilada. Logo em seguida, administraram-se 200 µL de Cloridrato de Norepinefrina (1 ou 50 nmol/g) (Anexo A.1) (Sigma) na região dorsal de cada anuro (ALI et al., 2001; MECHKARSKA et al., 2011a). Após a administração, os animais foram imersos e mantidos juntos em um recipiente contendo uma solução de acetato de amônio (25 mM, pH 7,0) (100 mL para cada animal) durante 30 min. Terminada a imersão, os anuros foram removidos do recipiente e devolvidos aos seus tanques. Também foi testada a presença do cloridrato de noradrenalina na solução de acetato de amônio, sem que houvesse a administração no animal, seguindo-se o protocolo descrito.

3.3.3. Estimulação mecânica

Os anuros foram lavados com água destilada e estimulados a liberarem as suas secreções ao terem as suas glândulas comprimidas manualmente, tanto na região dorsal quanto ventral dos seus corpos, durante 5 min, em uma solução de acetato de amônio (25 mM, pH 7,0). Em seguida, eles foram retirados da solução e devolvidos aos seus tanques (CONCEIÇÃO et al., 2009; SCIANI et al., 2013a).

3.3.3. Ausência de estímulo

Os anuros foram simplesmente imersos em uma solução de acetato de amônio (25 mM, pH 7,0), durante 30 min. Em seguida, eles foram removidos e devolvidos aos seus tanques.

3.4. Preparo do Material

Logo após cada coleta, a solução contendo o “pool” da secreção cutânea foi liofilizada, ressuspensa em água / 0,1% Ácido Trifluoroacético (TFA) / 5% Acetonitrila (ACN) e filtrada (Millex-GV 0,22 µm, Millipore).

Logo em seguida, o material passou por um filtro de corte molecular de 10 kDa (Amicon Ultra-4, Millipore). No delineamento experimental deste estudo utilizou-se apenas a fração contendo as moléculas menores de 10 kDa.

3.5. Caracterização Bioquímica

3.5.1. Análise e fracionamento da secreção cutânea de *Pipa carvalhoi*

O material foi primeiramente analisada através da Cromatografia Líquida de Alta Performance em Fase Reversa (RP-HPLC), em um sistema HPLC binário (20A Prominence, Shimadzu Co., Japan).

Uma abordagem típica inicial para análise compreende a separação em uma coluna C18 (ACE C18, 5 µm, 100 Å, 250 mm x 4.6 mm), tendo como solventes (A) TFA / água (1:999) e (B) TFA / ACN / água (1:900:99). Por meio de um fluxo

constante de 1 mL/min, o gradiente variou de 0 a 100% de solvente B durante 20 min, a 37 °C, e monitorado a 214 nm por um detector Shimadzu SPD-M20A PDA.

Após a obtenção e análise do perfil cromatográfico, através de RP-HPLC, o material foi fracionado de acordo com o número de picos e/ou com a facilidade em coletá-los.

3.5.2. Espectrometria de massas das frações coletadas

As análises por espectrometria de massas foram realizadas no próprio Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, utilizando um espectrômetro do tipo Electrospray - Ion Trap - Time of Flight (ESI-IT-TOF) (Shimadzu Co., Japão).

As frações coletadas foram secas e ressuspendidas em água / 0,5% ácido fórmico, para as análises no modo positivo, ou em metanol para as análises no modo negativo. Em seguida, as amostras foram inseridas diretamente no espectrômetro por injeção manual, em um injetor Rheodyne, a um fluxo de 50 µL/min, sendo 25 µL/min de solução A (água / 0,5% Ácido fórmico) e 25 µL/min de solução B (90% ACN / água / 0,5% ácido fórmico) para as análises no modo positivo. Para o modo negativo, utilizou-se 25 µL/min de solução A (água) e 25 µL/min de metanol. A voltagem utilizada da interface foi de 4,5 KV e a voltagem do detector, 1,76 KV, com temperatura de 200°C, a fragmentação foi causada por gás de colisão argônio, com 50% de energia. Os espectros foram obtidos na faixa de 50 a 2000 m/z. Os dados obtidos pela espectrometria de massas foram analisadas pelo software LabSolutions (LCMSsolution versão 3.60.361, Shimadzu).

3.5.3. Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS) da secreção cutânea de *Pipa carvalhoi*

O material também foi analisado por LC-MS utilizando um sistema UFLC binário (20A Prominence, Shimadzu Co., Japan) acoplado ao ESI-IT-TOF (Shimadzu Co., Japão). A separação do material foi realizada em uma coluna C18 (Discovery C18, 5 µm, 50 mm x 2.1 mm ou Discovery C18, 5 µm, 150 mm x 2.1 mm), tendo como solventes (A) ácido fórmico / água (5:995) (v/v) e (B) ácido fórmico / ACN /

água (5:900:95) (v/v). Por meio de um fluxo constante de 0,2 mL/min, o gradiente variou de 0 a 100% de solvente B, a 37 °C, e foi monitorado a 214 nm por um detector Shimadzu SPD-M20A PDA.

Após a separação e detecção em 214nm dos componentes da secreção, os mesmos foram analisados pela espectrometria de massas. A voltagem utilizada da interface foi de 4,5 KV e a voltagem do detector, 1,76 KV, com temperatura de 200°C, a fragmentação foi causada por gás de colisão argônio, com 50% de energia. Os espectros foram obtidos na faixa de 50 a 2000 m/z.

Os dados obtidos pela espectrometria de massas foram analisadas pelo software LabSolutions. Para a obtenção das massas presentes nas amostras estudadas, primeiramente selecionou-se o período de tempo relativo à etapa cromatográfica. Em seguida, foi gerada uma tabela contendo todas as massas presentes neste intervalo. No entanto, as massas com intensidades relativas inferiores a 4% da intensidade absoluta do pico base (pico que apresenta a maior intensidade no sinal durante o período de tempo selecionado) foram consideradas ruídos ou contaminantes e descartadas. Por fim, a tabela de massas das amostras analisadas foi comparada a tabela de massas geradas do branco (LC – MS realizado sem a aplicação de nenhuma amostra), e as massas presentes em ambos os grupos foram descartadas (considerou-se o sinal como ruído ou contaminante as massas com semelhança a partir de duas casas após a vírgula).

3.5.4. Espectro de Absorção e Fluorescência

Determinou-se a capacidade da fração principal dessa secreção em absorver luz ou emitir fluorescência em diferentes comprimentos de onda. Para isto, a amostra foi seca e ressuspensa em 1 mL de metanol e analisada em um espectrofluorímetro (SpectraMax M2, Molecular Devices) utilizando uma cubeta de quartzo. O espectro de absorção foi obtido variando-se o comprimento de onda entre 200 a 750 nm, em intervalos de leitura de 10 nm. Já a emissão da fluorescência foi obtida usando-se como comprimento de onda de excitação 344 nm e comprimento de onda de emissão de 398 nm (WU et al., 2010).

3.5.5. Ressonância magnética nuclear (NMR)

Para determinar a estrutura molecular do componente majoritário da secreção cutânea de *P. carvalhoi*, experimentos em ressonância magnética nuclear para ^1H e ^{13}C foram realizados na Central Analítica (CA) do Instituto de Química da USP. As amostras foram diluídas em 500 μL de solvente deuterado e inseridas em um equipamento Bruker DRX 500 MHz, de acordo com a rotina de análises da CA. O tempo de aquisição de dados varia conforme a concentração da amostra. A coleta e a interpretação dos dados foram realizadas na central analítica, através de uma colaboração com o grupo do Dr Massuo Jorge Kato, Professor Titular do Departamento de Química Fundamental do IQ/USP e a Dra. Lydia Fumiko Yamaguchi.

3.5.6. Isolamento da fração ativa

A fração ativa foi analisada novamente por RP-HPLC e um novo método foi desenvolvido para a purificação das moléculas que constituem esta fração. Foi novamente utilizado uma coluna C18 (ACE C18, 5 μm , 100 \AA , 250 mm x 4.6 mm), tendo como solventes (A) TFA / água (1:999) e (B) TFA / ACN / água (1:900:99). Por meio de um fluxo constante de 1 mL/min, o gradiente variou de 15 a 35% de solvente B durante 20 min, a 37 $^{\circ}\text{C}$, e monitorado a 214 nm

3.6. Ensaio Biológico

3.6.1. Atividade Antimicrobiana das frações coletadas

Este experimento foi realizado em colaboração com a Dra. Rita de Cássia Ruiz, do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

As frações provenientes das etapas cromatográficas foram testadas quanto a uma ação antimicrobiana, utilizando 4 linhagens de bactérias: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Foi empregada uma variação da

metodologia de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido (BULET et al., 1993).

Resumidamente, foi feito um pré-cultivo de uma colônia de cada espécie de bactéria, durante 12 h, em meio (TSB). Após este período, foram adicionados 40 µL de cada colônia em 3 mL de meio pobre (PB) e mantidas por 2 horas, sob agitação a 250 rpm, a 37°C. Logo após, mensurou-se a densidade da turbidez (proporção do crescimento microbiano) de cada cultura, em 595 nm.

Adicionou-se 90 µL de cada cultura de bactérias (dose óptica ajustada para 0,001) em microplacas estéreis (96 poços). Em seguida, acrescentou-se 10 µL de cada fração coletada da secreção cutânea de *P. carvalhoi* (as frações foram secas e ressuspensas no meio de cultivo PB). No grupo controle, foi adicionada apenas a cultura de bactérias; porém, no grupo controle positivo, além da cultura de bactérias acrescentou-se 10 µL de Ampicilina, um antibiótico de amplo espectro, na concentração de 1 mg/mL. Por fim, as microplacas foram incubadas a 37 °C, durante 18 h, e mantidas sob agitação a 150 rpm.

Ao final do experimento, mensurou-se a absorvância de todas as amostras a 595 nm. A capacidade inibitória das frações testadas foi comparada aos respectivos controles.

3.6.2. Atividade Antimicrobiana dos constituintes da fração ativa

Após a separação cromatográfica das moléculas que compõem a fração ativa, as mesmas foram testadas quanto à ação antimicrobiana. A metodologia utilizada foi à mesma descrita no tópico anterior (3.6.1), porém além das bactérias *E. coli*, *M. luteus*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, foram utilizadas outras 4 espécies: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Klebsiella sp.*, *Shigella flexneri* (M90T) e *Staphylococcus epidermidis*.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção e análise da secreção cutânea de *P. carvalhoi* por HPLC

Foram utilizadas diferentes metodologias para a coleta da secreção cutânea de *P. carvalhoi*, ocorrendo também variações quanto ao número de animais utilizados, devido à disponibilidade dos mesmos, e a sua origem (tab. 1).

Tabela 1 - Descrição das coletas realizadas para a obtenção da secreção cutânea de *P. carvalhoi*.

Coletas realizadas			
	Data da coleta	Número de animais	Concentração de Cloridrato de Noradrenalina
1°	29/02/2012	6	1 nmol/g
2°	22/05/2012	10	1 nmol/g
3°	26/07/2012	10	1 nmol/g
4°	12/12/2012	4	1 nmol/g
5°	12/03/2013	1	50 nmol/g
6°	23/04/2013	1	50 nmol/g
7° #	28/05/2013	3	50 nmol/g
		3	*
8 ° *	05/08/2013	9	*
		1	+

+ A secreção foi obtida na ausência de estímulos;

Foram utilizados anuros coletados no dia 24/05/13;

* A secreção cutânea foi obtida através da estimulação mecânica;

4.1.1. Estimulação Química

Ao compararmos os perfis cromatográficos das coletas realizadas após a administração de cloridrato de noradrenalina, na concentração de 1 nmol/g, observamos que as secreções cutâneas produzidas por estes animais são semelhantes (fig. 10 A - E). Existem variações quantitativas relativas entre as coletas, mas não qualitativas.

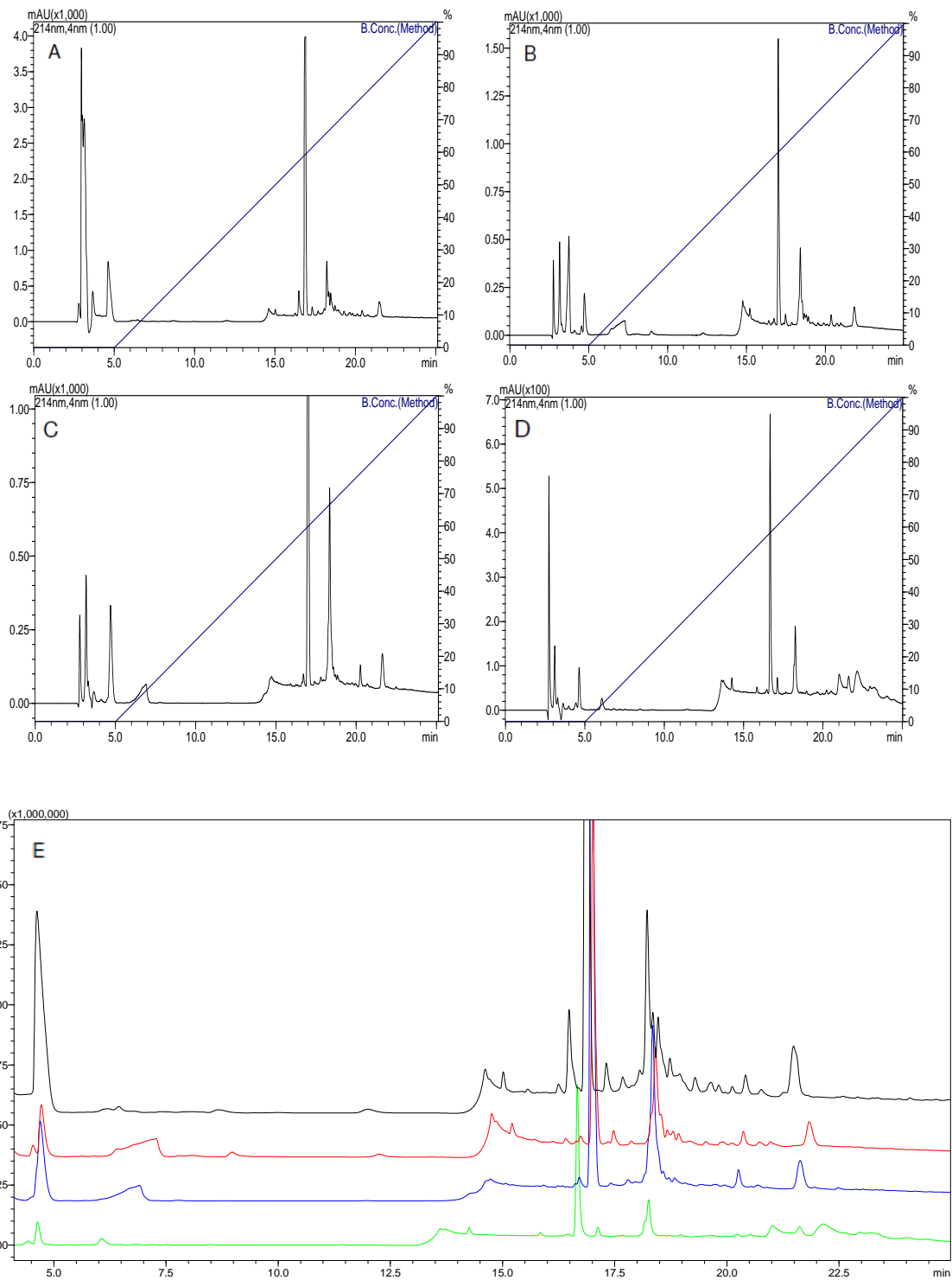


Figura 10 - Perfil cromatográfico das coletas realizadas utilizando 1nmol/g de cloridrato de noradrenalina.

Todas as secreções foram analisadas em uma coluna C-18 (250 x 4,6 mm), mantendo fluxo constante de 1 mL/min e tendo a concentração de B variando entre 0 – 100, durante 20 min. (A) Perfil da primeira, (B) segunda, (C) terceira e (D) quarta coleta. (E) Comparação entre as 4 coletas realizadas (1° coleta: preto; 2° coleta: vermelho; 3° coleta azul; 4° coleta: verde), evidenciando a semelhança entre os perfis obtidos.

Administrando-se 50 nmol/g de cloridrato de noradrenalina nos anuros, o perfil cromatográfico revelou um aumento na intensidade do sinal de 2 picos (fig. 11 A). Quando comparamos as coletas realizadas através da estimulação química, observamos a presença dos mesmos componentes majoritários (fig. 11 B), demonstrando que ambas as concentrações utilizadas foram eficazes em estimular a secreção cutânea do anuro. E, além disto, apesar de não ficar evidente no cromatograma, a maior concentração foi capaz de enriquecer quantitativamente os principais componentes deste material.

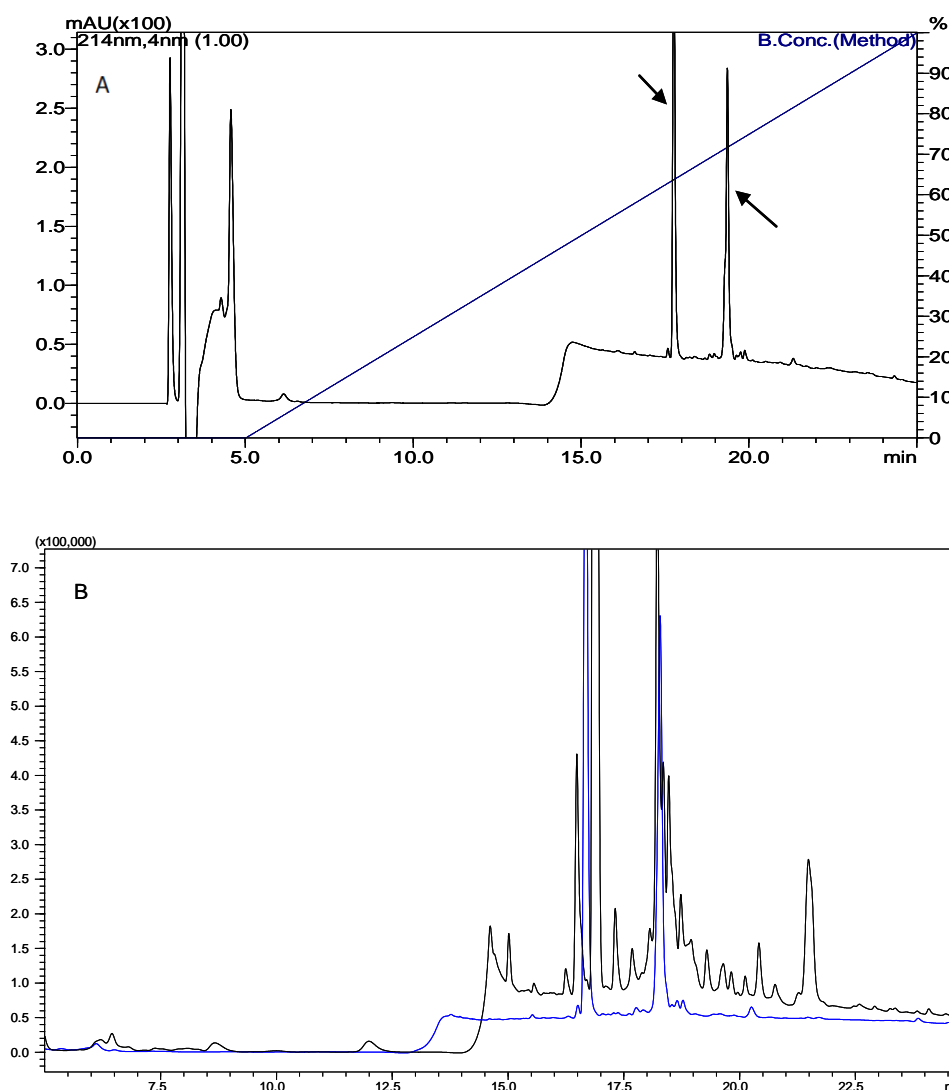


Figura 11 - Perfil cromatográfico obtido através da estimulação química com 50 nmol/g de cloridrato de noradrenalina.

(A) O material foi analisado em uma coluna C-18 (250 x 4,6 mm), mantendo o fluxo constante de 1 mL/min e tendo a concentração de B variando entre 0 – 100, durante 20 min. As setas destacam a presença dos componentes majoritários da secreção. (B) Análise Comparativa entre uma coleta realizada administrando-se 1 (preto) ou 50 nmol/g (azul) de cloridrato de noradrenalina, evidenciando a semelhança entre os perfis cromatográficos obtidos.

Testou-se uma abordagem alternativa para a estimulação química, aonde foi adicionado cloridrato de noradrenalina na solução em que os animais eram mantidos imersos. No entanto, não foi obtido algum êxito ao empregar esta metodologia (Anexo B).

Outro teste realizado foi verificar uma possível contaminação do cloridrato de noradrenalina na secreção cutânea, uma vez que após aumentarmos a dose, os constituintes majoritários da secreção tornaram-se mais abundante. Porém, os resultados mostram que o cloridrato de noradrenalina não interage com a coluna C-18, acabando por ser detectada na etapa anterior a separação cromatográfica (Anexo A.2 e A.3).

4.1.2. Estimulação mecânica

Na estimulação mecânica, o perfil cromatográfico mostrou a presença de um pico majoritário. Observou-se também a presença de outros picos, porém estes se encontram pouco intensos (fig. 12 A). Quando comparamos esta abordagem com o método químico, os perfis cromatográficos mostram-se semelhantes, variando quantitativamente os componentes da secreção (fig. 12 B).

4.1.3. Ausência de Estímulo

Quando analisamos o perfil cromatográfico obtido na ausência de qualquer estímulo, podemos destacar apenas a presença de um único pico, o qual se encontra pouco intenso (fig. 13 A). Este pico encontra-se evidente nas secreções obtidas pelas diferentes formas de estimulação, sugerindo uma fraca liberação da secreção cutânea do animal. No entanto, quando compararmos este material com outro obtido pela estimulação química, por exemplo, há uma enorme diferença entre os perfis cromatográficos (fig. 13 B). Isto evidencia a necessidade de empregar a estimulação química ou mecânica para a obtenção da secreção cutânea de *P. carvalhoi*.

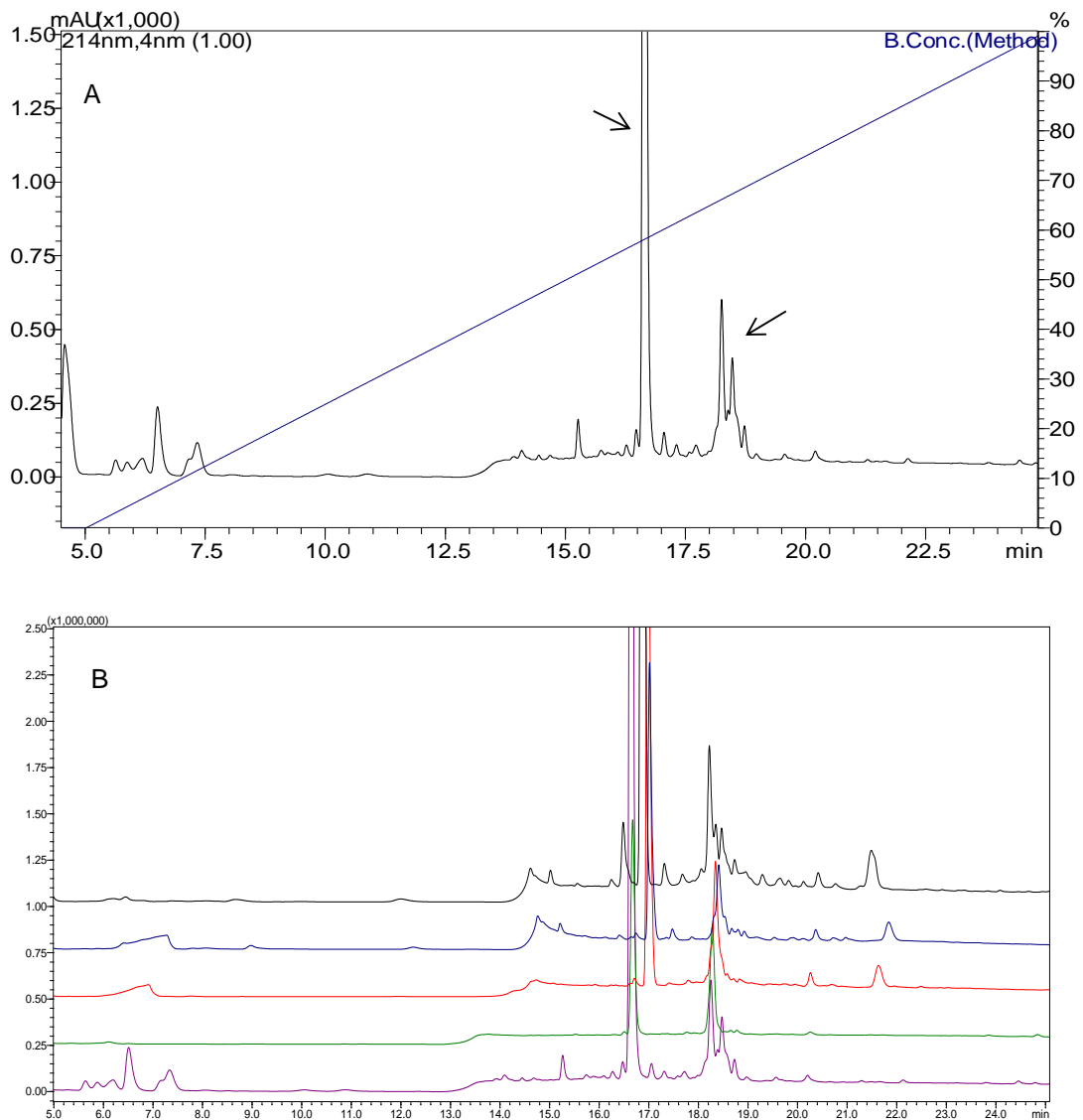


Figura 12 - Perfil cromatográfico obtido através da estimulação mecânica.

(A) O material foi obtido após compressão das suas glândulas em uma solução de 25 mM acetato de amônio, pH 7,0. Após o preparo da material, o mesmo foi analisado em uma coluna C-18 (250 x 4,6 mm), mantendo fluxo constante de 1 mL/min e variando a concentração de B entre 0 – 100, durante 20 min. As setas evidenciam os picos majoritários presentes no material. (B) Análise comparativa entre os perfis cromatográficos obtidos pela estimulação química (preto, azul e vermelho: 1 nmol/g; verde: 50 nmol/g) ou mecânica (roxo), novamente evidenciando a semelhança entre os materiais analisados.

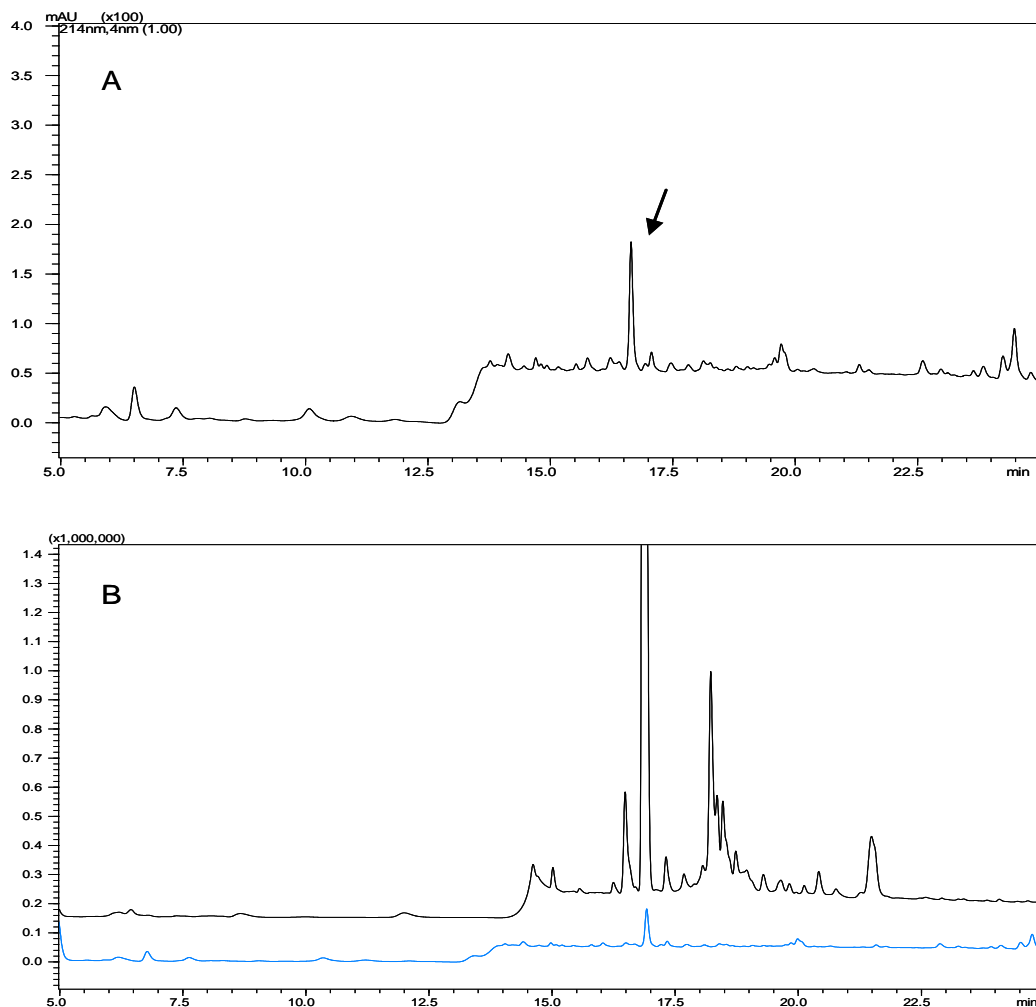


Figura 13 - Perfil cromatográfico obtido na ausência de estímulo.

O anuro foi somente mantido imerso em uma solução de 25 mM acetato de amônio, pH 7,0, durante 15 min. Logo em seguida, o animal foi retirado do recipiente e a solução foi preparada para as análises cromatográficas. (A) Perfil cromatográfico obtido após análise em uma coluna C18 (250 x 4,6 mm), com um fluxo constante de 1 mL/min e variando a concentração de B entre 0 – 100, durante 20 min. A seta destaca a presença do único pico evidente no material, o qual se encontra pouco intenso. (B) Análise comparativa entre uma coleta realizada através da estimulação química (preto: 1nmol/g de cloridrato de noradrenalina) e na ausência de estímulo (azul). Nota-se a presença de um único pico presente nas duas amostras, o qual possuem tempos de retenção próximos, sugerindo uma fraca liberação da secreção cutânea na ausência de qualquer estimulação.

4.2. Análise da secreção cutânea de *Pipa carvalhoi* por LC-MS

As secreções obtidas pelas diferentes metodologias também foram analisadas por LC-MS. Nesta abordagem, após a etapa cromatográfica, conseguiu-se verificar qual a razão massa/carga (m/z) das moléculas presentes nas secreções.

Quando analisamos os cromatogramas obtidos durante a fase de separação, tanto nas secreções obtidas pela estimulação mecânica quanto na estimulação

química, fica evidente apenas a presença de um pico (fig. 14 A-B), com tempos de retenção semelhantes, variando quanto a sua intensidade. Também notamos a presença do mesmo pico na ausência de qualquer tipo de estimulação (fig. 14 C), estando presente em baixa intensidade.

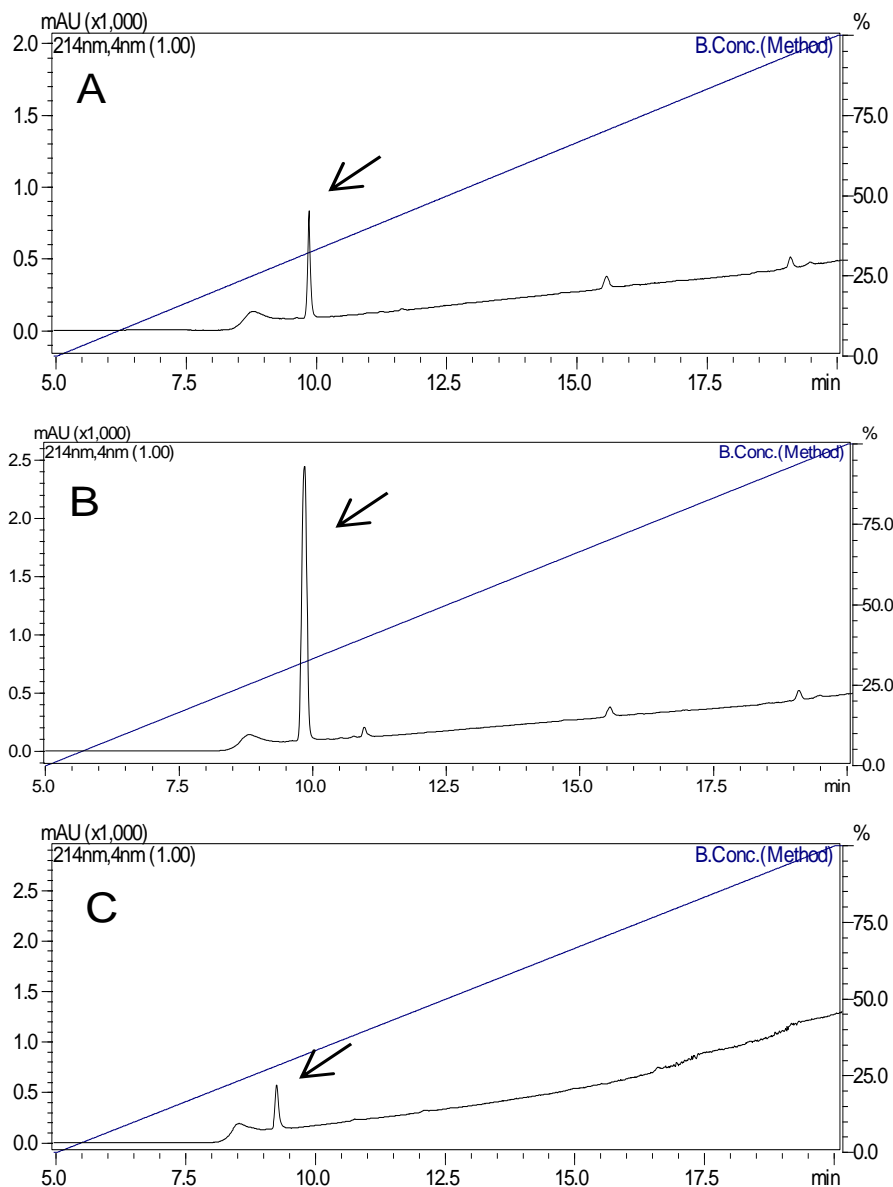


Figura 14 - Perfis cromatográficos das secreções analisadas por LC-MS. As secreções foram obtidas através da estimulação mecânica (A), estimulação química (50 nmol/g de cloridrato de noradrenalina) (B) e na ausência de estímulos (C). Os materiais foram analisados em uma coluna C18 (50 x 2,1 mm), mantendo-se um fluxo constante de 0,2 mL/min, e variando a concentração do solvente B de 0 – 100%, durante 15 min. As setas indicam a presença de um único pico evidente nas amostras analisadas, estando este mesmo presente nas três condições analisadas.

No entanto, com as análises por espectrometria de massas foi possível gerar uma lista com diferentes m/z presentes nas amostras (Anexo C). Apesar da intensidade dos sinais obtidos serem fracos e da presença de possíveis contaminantes nos solventes, os resultados sugerem que a secreção cutânea de *P. carvalhoi*, após realizarmos a filtragem molecular, é composta principalmente por moléculas de baixa massa (< 800 Da).

Quando comparamos os dados gerados, podemos notar que em ambas as estimulações, tanto a mecânica quanto a química, compartilham a presença de moléculas com m/z iguais (fig. 15). Isto sugere a eficiência dos métodos aplicados para a obtenção da secreção cutânea e também, corrobora as comparações cromatográficas, uma vez que os perfis cromatográficos obtidos em ambos os casos apresentam-se semelhantes. Além disto, foi possível mostrar que mesmo o anuro não sendo estimulado, ele foi capaz de secretar a sua secreção cutânea a níveis basais (fig. 15).

Após essas análises, adotou-se como padrão a obtenção do material através da estimulação mecânica.

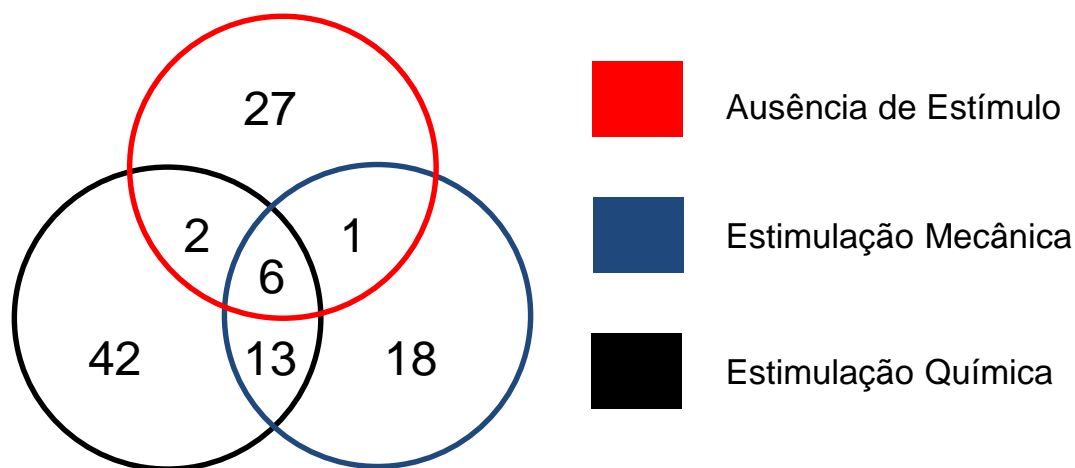


Figura 15 - Representação quantitativa das m/z presentes nas secreções obtidas nas diferentes metodologias.

Na ausência de estímulos, ou através da estimulação mecânica ou química (50 nmol/g de cloridrato de noradrenalina), podemos destacar a presença de m/z semelhantes quando comparamos a estimulação química e mecânica. Também observamos a presença que m/z presentes nas três condições estudadas, sugerindo uma baixa liberação do conteúdo da secreção cutânea nos animais que não sofreram nenhum tipo de estimulação.

4.3. Variação na constituição da secreção cutânea de *P. carvalhoi*

Também foi analisada preliminarmente a existência de possíveis variações nos constituintes que compõem a secreção cutânea do anuro *P. carvalhoi*. Para isto, comparou-se através do HPLC e da espectrometria de massas a secreção dos animais mantidos no biotério, com a secreção obtida pelas *P. carvalhoi* recém-coletadas e introduzidas no biotério, através da estimulação química.

Novamente, observamos uma semelhança nos perfis cromatográficos, existindo variações quantitativas em relação aos constituintes da secreção cutânea (fig. 16). Quanto à m/z das moléculas obtidas pela espectrometria de massas (Anexo D), também notamos a presença de m/z de baixa massa molecular semelhantes, sugerindo que ao menos algumas moléculas possam compor invariavelmente a secreção cutânea desses anuros (fig. 17).

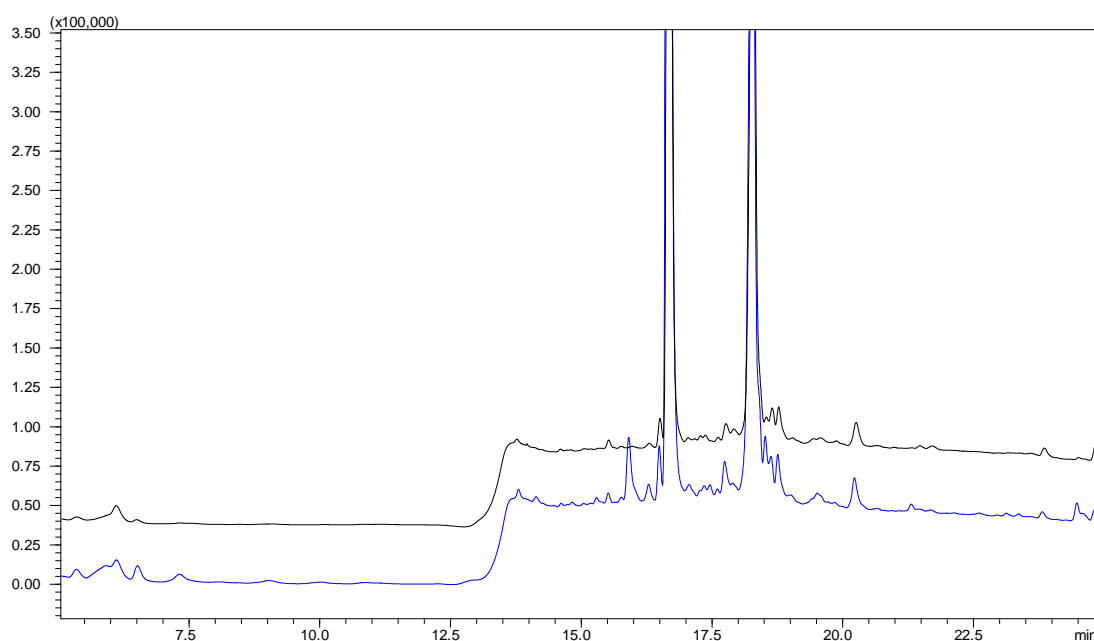


Figura 16 - Análise comparativa entre a secreção cutânea dos anuros mantidos em cativeiro e recém-coletados.

A obtenção da secreção foi feita por meio da estimulação química (50 mmol/g de cloridrato de noradrenalina). Os materiais foram eluídos em um fluxo constante de 1 mL/min, utilizando uma coluna C-18 (250 x 4,6 mm), com a concentração de B variando de 0 – 100 durante 20 min. Os perfis cromatográficos das secreções cutâneas obtidos com os animais mantidos em cativeiro (preto) assemelham-se à secreção obtida dos animais recém coletados e trazidos para o biotério (azul).

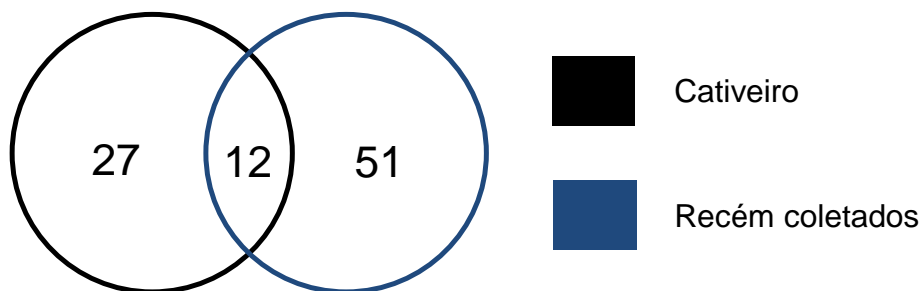


Figura 17 - Representação quantitativa das m/z presentes nas secreções dos anuros mantidos em cativeiro ou recém-coletados.

O material foi obtido através da estimulação química (50 nmol/g de cloridrato de noradrenalina). Podemos destacar a presença de m/z semelhantes nos dois grupos de animais, sugerindo que pelo menos algumas moléculas podem integrar invariavelmente a secreção cutânea de *P. carvalhoi*.

4.4. Fracionamento do material

A secreção cutânea produzida pelos anuros foi separada em 14 frações (fig. 18). Cada fração foi coletada individualmente, seca e preparada tanto para as análises por espectrometria de massa quanto para o ensaio biológico. A região que apresentou a maior variabilidade nos cromatogramas corresponde à do material não retido, a qual acabou sendo desconsiderada no delineamento experimental deste projeto.

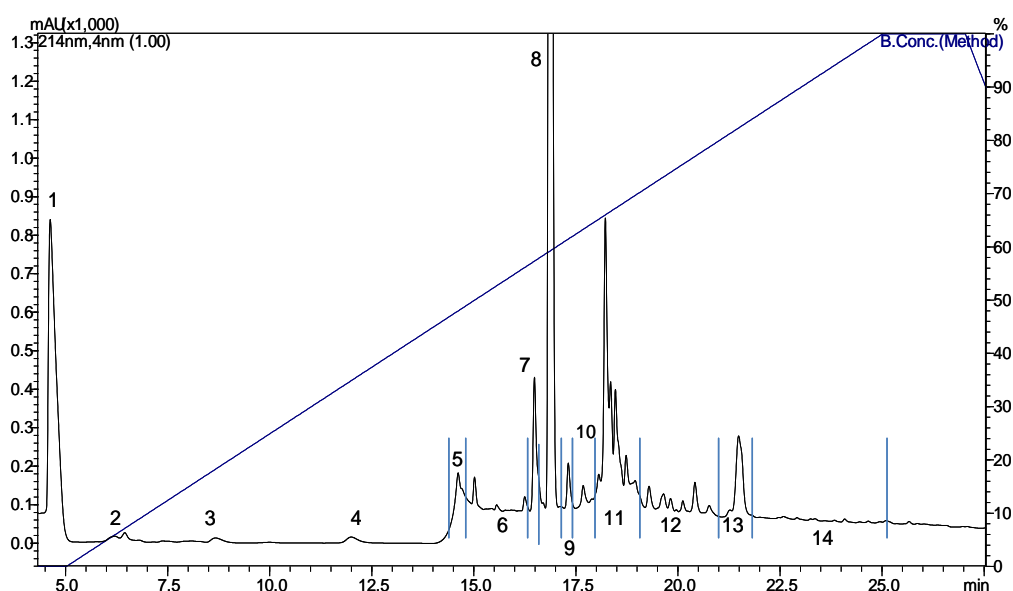


Figura 18 - Fracionamento da secreção cutânea de *P. carvalhoi*.

O material foi eluído em uma coluna C18 (250 x 4,6 mm), mantendo fluxo constante de 1 mL/min, e tendo a concentração de B variando entre 0 – 100 durante 20 min. Ao todo foram coletadas 14 frações, sendo cada uma seca e preparada para a realização de outras análises.

4.5. Espectrometria de massas das frações coletadas

Ao serem analisadas, as frações coletadas mostraram uma razão massa/carga (m/z) entre 150 - 800 Da (Fig. 19 A - D). Estas análises iniciais mostram que aparentemente a secreção cutânea de *P. carvalhoi* é constituída principalmente por moléculas de baixa massa molecular.

4.6. Reanálise da secreção cutânea de *P. carvalhoi*

Procurando identificar a presença de peptídeos na secreção cutânea de *P. carvalhoi*, o material foi reanalisado. Nesta abordagem, os constituintes majoritários da secreção cutânea (frações 8 e 11) foram removidos do restante das outras frações que compõem a secreção.

Inicialmente, o material foi fracionado por RP - HPLC, utilizando as mesmas condições descritas na metodologia, porém a coleta do material foi realizada de outra forma: as frações 1 - 7, 9, 10 e 12 - 14 foram todas coletadas no mesmo recipiente; já as frações 8 e 11, os constituintes majoritários, foram cada uma coletadas individualmente.

O material não contendo as frações 8 e 11 foi analisado por RP - HPLC, utilizando sempre as condições cromatográficas padronizadas. Por meio dessa abordagem, conseguiu-se enriquecer o material, revelando a presença de outros picos que constituem a secreção cutânea de *P. carvalhoi* (fig. 20 A). Esta metodologia torna-se mais evidente quando comparamos os perfis cromatográficos com o material obtido pela coleta com a estimulação mecânica (fig. 20 B).

As análises por espectrometria de massas (LC-MS) novamente mostraram a presença de moléculas de baixa massa (< 800 Da), não sendo identificada a presença de peptídeos (Anexo E).

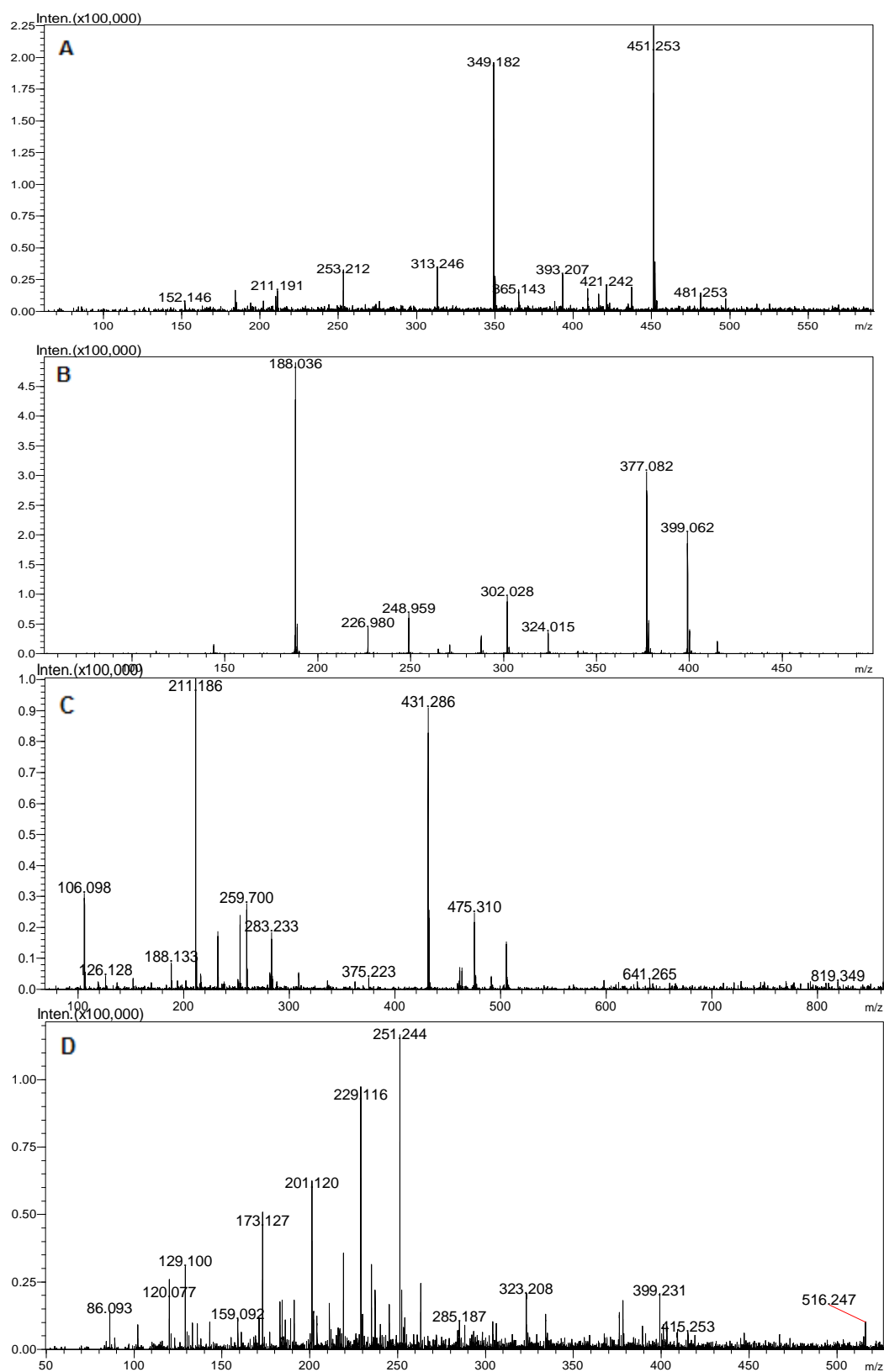


Figura 19 - Razão m/z de algumas frações coletadas da secreção cutânea de *P. carvalhoi*. As secreções foram analisadas por espectrometria de massas utilizando tanto o modo positivo (A: fração 7; C: fração 11; e D: fração 13) quanto o negativo (B: fração 8) para a ionização das moléculas presente nas frações.

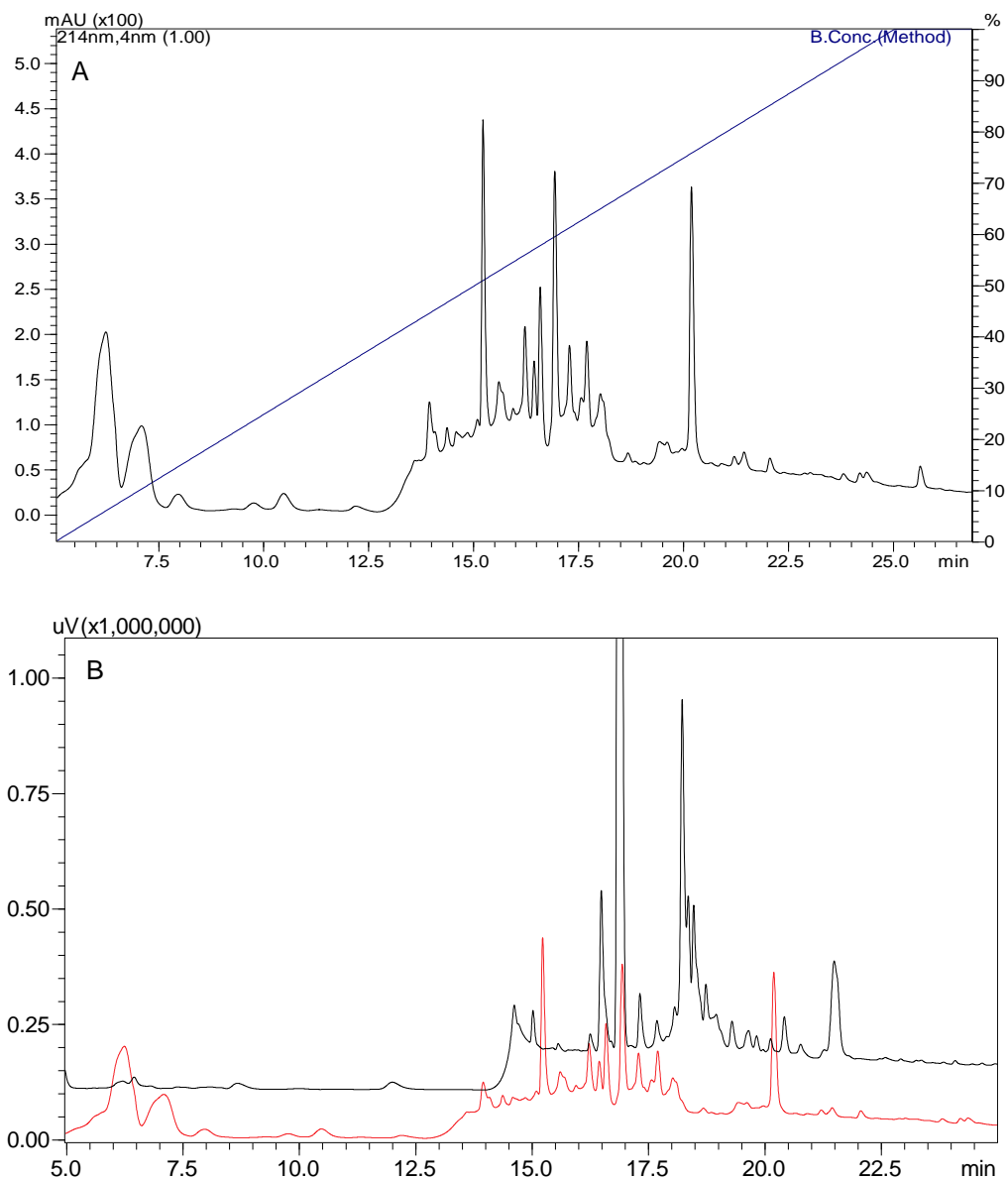


Figura 20 - Análise cromatográfica da secreção cutânea na ausência das frações 8 e 11. (A) Após o fracionamento e a retirada dos constituintes majoritários (frações 8 e 11) da secreção de *P. carvalhoi*, o material foi reanalisado por RP - HPLC, utilizando uma coluna C18 (250 x 4,6 mm), mantendo um fluxo constante de 1 mL/min e variando a concentração de B de 0 – 100 em 20 min. Podemos notar a presença de vários picos no material, porém pouco intensos. (B) Quando comparamos o material sem as frações 8 e 11 (vermelho) com a secreção de *P. carvalhoi* (preto), é possível visualizar que as frações 8 e 11 por serem os constituintes majoritários, acabam suprimindo o sinal correspondente a outras frações.

4.7. Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética

Devido à baixa quantidade de material obtida das frações, foi possível analisar e identificar apenas o pico majoritário da secreção. De acordo com a interpretação realizada por nossos colaboradores do Instituto de Química, a fração 8 corresponde a molécula Ácido Quinurênico, uma molécula derivado do aminoácido L - Triptofano (fig. 21) (tab. 2) (Anexo F).

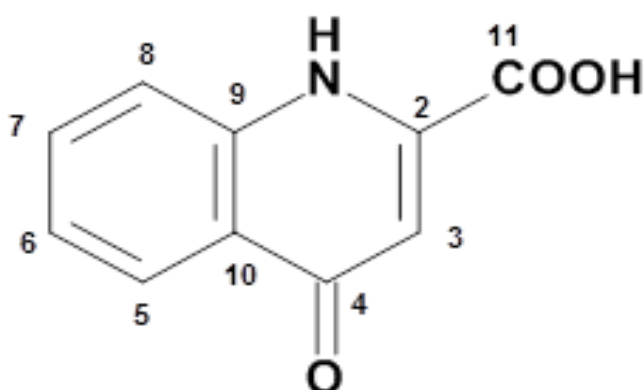


Figura 21 - Elucidação da estrutura molecular da fração 8. Através da estrutura molecular, conseguiu-se identificar a molécula como sendo o Ácido Quinurênico, m/z 188,037, um produto derivado do aminoácido L-Triptofano.

Tabela 2 - Ressonância Nuclear Magnética (2 D – NMR) mostrando a correlação entre os núcleos acoplados do ^1H and ^{13}C do ácido quinurênico

Position	δ_{H} (m, J/Hz)	δ_{C}	HMBC
2	-	140.00	-
3	6.99 (s)	110.45	C4,C10
4	-	164.00	-
5	7.86 (d, 8.2)	120.00	C6,C10
6	7.45 (dt, 0.9, 8.2)	124.54	C5,C10
7	7.76 (t, 8.2)	133.63	C6,C9
8	8.26 (d, 8.2)	125.00	C7,C9,C11
9	-	140.05	-
10	-	125.6	-
11	-	177.5	-

Para corroborar os resultados obtidos da fração 8, a mesma foi analisada por espectrometria de massas em outro laboratório independente, pertencentes a um dos colaboradores do grupo, Prof. Dr. Katsuhiko Konno, do Departamento de Kampo-farmacêutica, do Instituto de Medicina Natural, da Universidade de Toyama, Japão (Anexo G.1). Além disto, foram obtidos os espectros de absorção de UV e emissão de fluorescência desta fração (Anexo G.2). Ao compararmos os resultados obtidos com os dados fornecidos pela literatura (BARTH et al., 2009; WU et al., 2010), podemos afirmar que o constituinte majoritário da secreção cutânea de *P. carvalhoi* (fração 8) é o íon m/z 188,036, no modo negativo, ou o íon 190,048, no modo positivo, correspondendo ao ácido quinurênico.

4.7. Testes Biológicos

4.7.1 Atividade antimicrobiana das frações

A secreção cutânea de *P. carvalhoi* foi capaz de exibir uma ação antimicrobiana evidente apenas na bactéria *M. luteus* (tab. 3). Entre as frações testadas, a fração 11 foi a que mais se destacou, inibindo o crescimento das bactérias gram-positivas em mais de 90%. No entanto, nas bactérias gram-negativas, a fração 11 causou apenas uma leve redução no crescimento da *P. aeruginosa* e na *E. coli*. A fração 12 também mostrou agir contra bactérias gram-negativas, porém em estudos preliminares este efeito não havia sido observado (tab. 3).

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana das frações coletadas da secreção cutânea produzida pelo anuro de *P. carvalhoi*.

	Atividade Antimicrobiana			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>
	Inibição ^a	Inibição ^a	Inibição ^a	Inibição ^a
Ampicilina ^b	100,00	100,00	100,00	100,00
<i>P. carvalhoi</i> ^c	6,20	0,00	29,74	94,01
Fração 1	0,00	0,00	-11,83	6,43
Fração 2	0,00	7,18	-10,62	2,73
Fração 3	0,00	-11,57	-12,07	-10,13
Fração 4	22,17	11,75	-26,82	6,78
Fração 5	1,99	18,22	-18,48	0,44
Fração 6	0,00	0,00	-38,41	-16,65
Fração 7	0,00	0,00	-37,93	16,30
Fração 8	0,66	0,00	-34,76	2,47
Fração 9	4,14	0,00	-16,53	6,43
Fração 10	1,65	-14,07	-26,09	11,81
Fração 11	20,93	8,25	94,73	97,27
Fração 12	3,47	12,40	58,91	75,86
Fração 13	10,26	4,39	-23,01	6,78
Fração 14	1,41	-16,85	-38,65	32,16

^a Porcentagem de inibição antimicrobiana foi calculada de acordo com a fórmula:
 $100 - (\text{amostra abs}/\text{controle abs}) * 100$

^b Antibiótico (1mg/ml)

^c Secreção bruta

4.8. Isolamento da fração ativa

Após exibir uma ação antimicrobiana, a fração 11 foi reanalisada por RP-HPLC. Utilizando uma coluna C18 (ACE C18, 5 µm, 100 Å, 250 mm x 4,6 mm), tendo como solventes (A) TFA / água (1:999) e (B) TFA / ACN / água (1:900:99), o material foi eluído em um gradiente variando de 15 – 35% de solvente B, a um fluxo constante de 1 mL/min, durante um período de 20 min, a 37 °C. Os componentes da fração foram analisados em 214 nm, sendo coletados 9 picos identificados como: 11.1 – 11.9 (fig. 22).

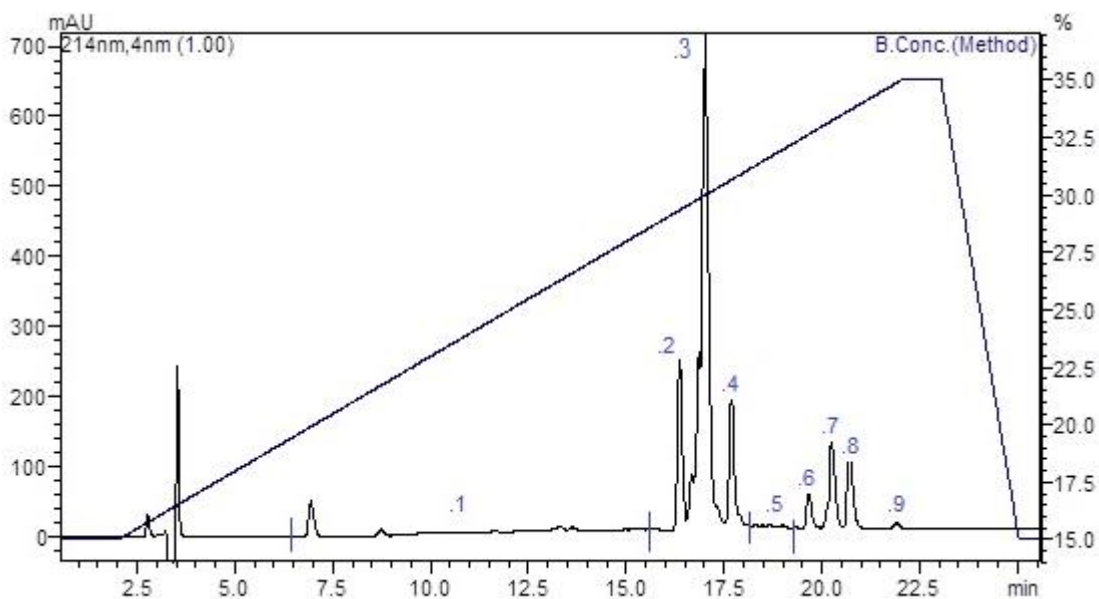
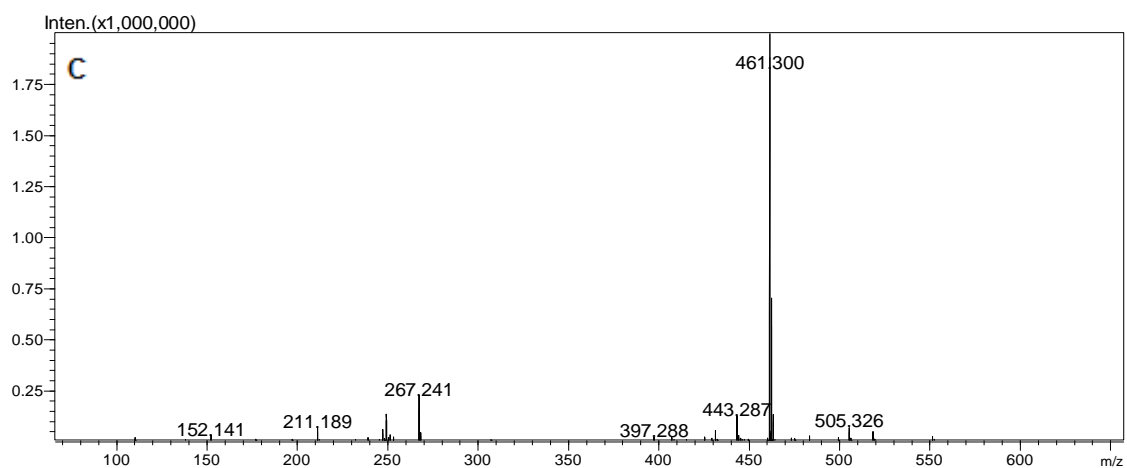
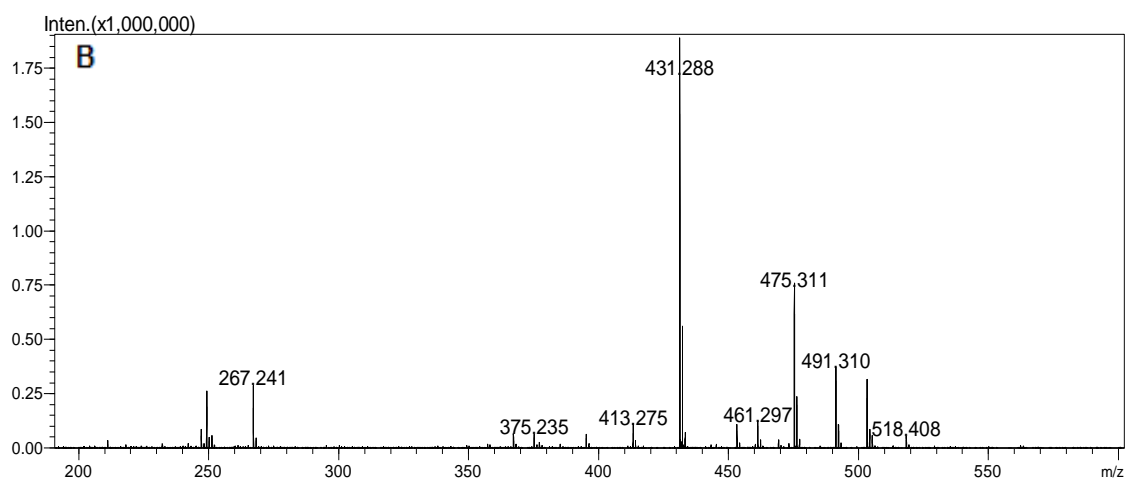
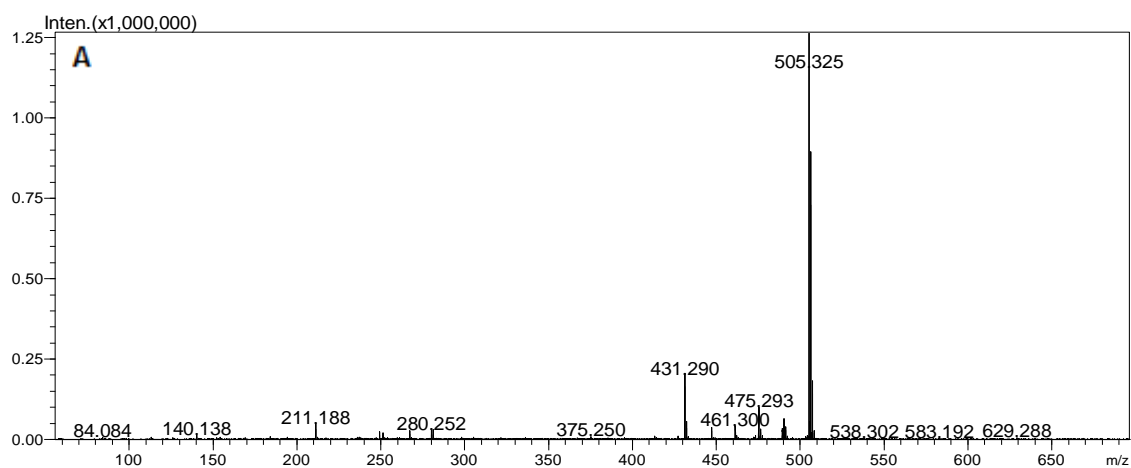


Figura 22 - Perfil cromatográfico da fração 11.

Utilizando uma coluna C18 e variando o gradiente do solvente B de 15 – 35 %, durante 20 min a um fluxo de 1mL/min, notamos que esta fração é constituída por novos picos. Cada pico foi coletado isoladamente e preparado para as análises por espectrometria de massas e para o ensaio biológico.

4.9. Espectrometria de massas das frações 11.1 - 11.9

As análises das frações 11.1 – 11.9 por espectrometria de massas evidenciaram a presença de moléculas de baixa massa molecular (m/z entre 150 - 800 Da) (Fig. 23 A - F) (Anexo H). Inusitadamente, as frações 11.6, 11.7 e 11.8 evidenciaram a presença de moléculas com massas semelhantes (m/z : 577, 463, 253 e 211).



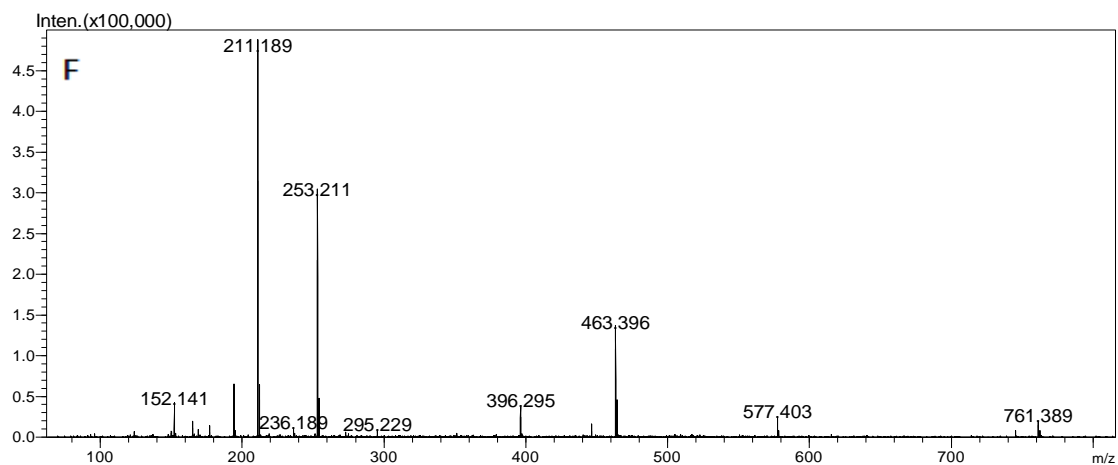
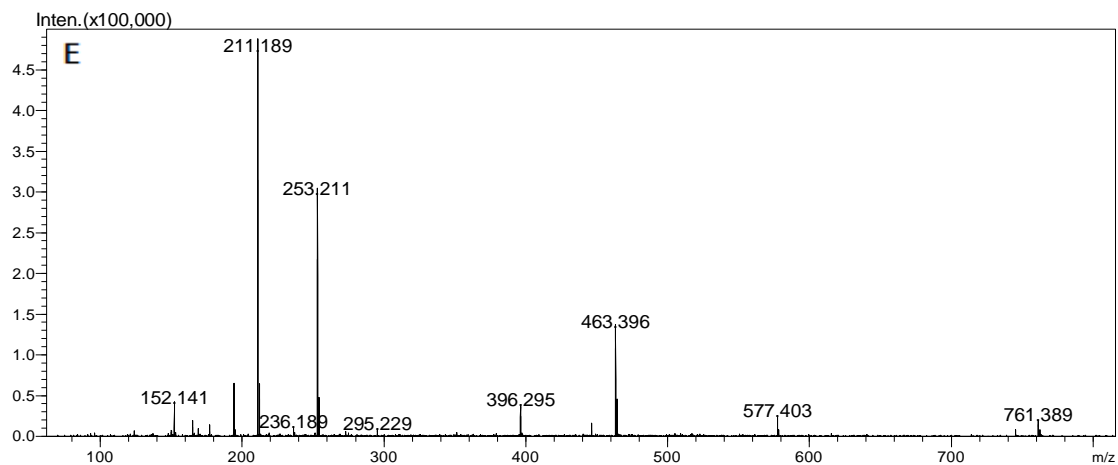
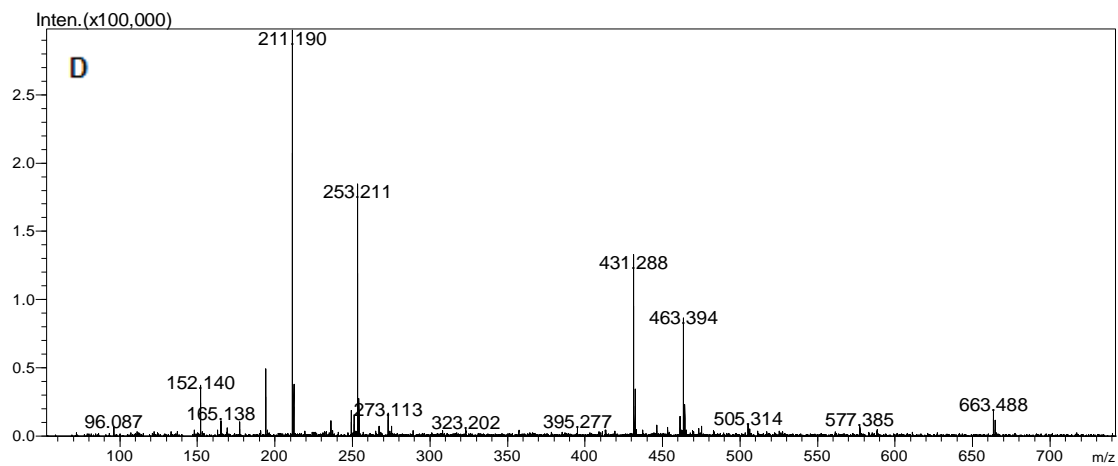


Figura 23 - Espectrometria de massas dos constituintes da fração 11. As análises foram feitas utilizando o modo positivo e evidenciam a presença de moléculas com uma razão m/z entre 150 – 800 Da. (A) 11.2; (B) 11.3; (C) 11.4; (D) 11.6; (E) 11.7; (F) 11.8.

4.10. Atividade Antimicrobiana das frações 11.1 - 11.9

Ao serem testadas, as frações 11.7 e 11.8 conseguiram reduzir o crescimento das bactérias gram-positivas entre 45 e 65% quando comparadas ao grupo controle (tab. 4). Quanto às outras frações testadas, não foram observados nenhum efeito antimicrobiano superior a 25%.

Tabela 4 - Atividade antimicrobiana dos picos que constituem a fração 11.

	Atividade Antimicrobiana			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>
	Inibição ^a	Inibição ^a	Inibição ^a	Inibição ^a
Ampicilina ^b	100,00	100,00	100,00	100,00
Fração 11	20,93	8,25	94,73	97,27
Fração 11.1	6,29	0,00	-43,19	13,74
Fração 11.2	0,00	0,00	-48,78	0,00
Fração 11.3	0,00	0,00	-41,09	5,11
Fração 11.4	0,00	-30,98	-27,80	14,89
Fração 11.5	11,08	-11,87	-23,10	21,59
Fração 11.6	0,00	15,25	17,26	-15,15
Fração 11.7	0,00	12,28	45,54	64,76
Fração 11.8	0,33	10,74	54,54	41,85
Fração 11.9	3,47	18,99	-13,53	19,12

^a Porcentagem de inibição antimicrobiana foi calculada de acordo com a fórmula:
 $100 - (\text{amostra abs}/\text{controle abs}) * 100$

^b Antibiótico (1mg/ml)

Devido ao efeito antimicrobiano em bactérias gram-positivas, as frações 11.6 – 8 foram testadas em outras 4 linhagens de bactérias: *Bacillus subtilis*, *Klebsiella sp.*, *Shigella flexneri* e *Staphylococcus epidermidis*.

Novamente, a secreção cutânea de *P. carvalhoi* não apresentou nenhuma ação antimicrobiana (tab. 5). Também podemos observar que as frações testadas não foram eficazes, novamente, nas bactérias gram-negativas. No entanto, as frações 11.7 e 11.8 foram eficazes em inibir o crescimento microbiano de outra bactéria gram-positiva (*Bacillus subtilis*). Já a fração 11.6 reduziu o seu crescimento em torno de 50%. Apesar de não exibir um efeito antimicrobiano na bactéria gram-

positiva *S. epidermidis*, os resultados sugerem um efeito antimicrobiano específico para as bactérias gram-positivas.

Tabela 5 - Atividade antimicrobiana das frações 11.6 – 8.

	Atividade Antimicrobiana			
	<u><i>Shigella flexneri</i></u> Inibição ^a	<u><i>Klebsiella sp.</i></u> Inibição ^a	<u><i>S. epidermidis</i></u> Inibição ^a	<u><i>Bacillus subtilis</i></u> Inibição ^a
Ampicilina ^b	100,00	-11,83	100,00	100,00
<i>P. carvalhoi</i>	-175,22	-13,74	-23,26	2,24
Fração 11	-7,19	7,79	-23,70	100,00
Fração 11.6	-34,70	-5,65	-25,29	47,33
Fração 11.7	-2,48	5,50	-9,19	100,00
Fração 11.8	-6,44	6,49	-	100,00

^a Porcentagem de inibição antimicrobiana foi calculada de acordo com a fórmula:

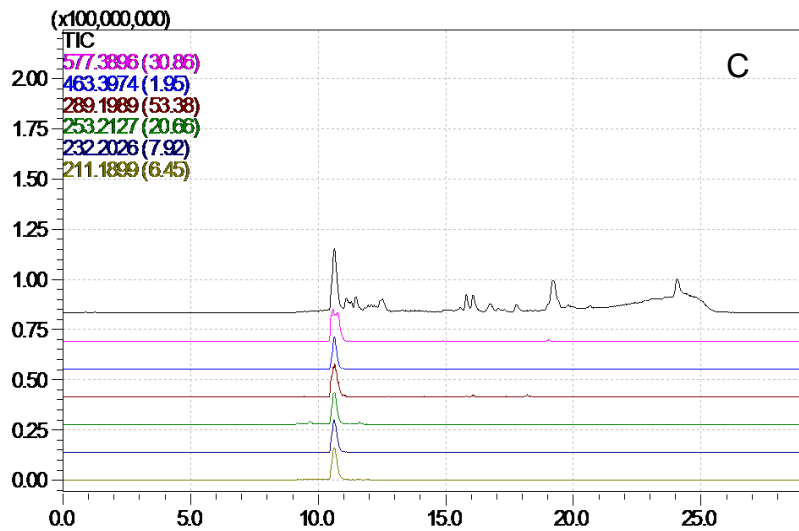
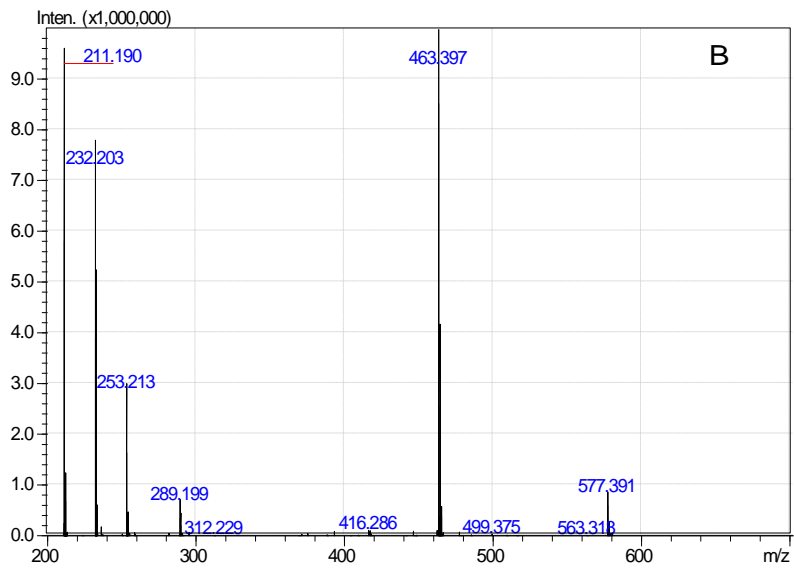
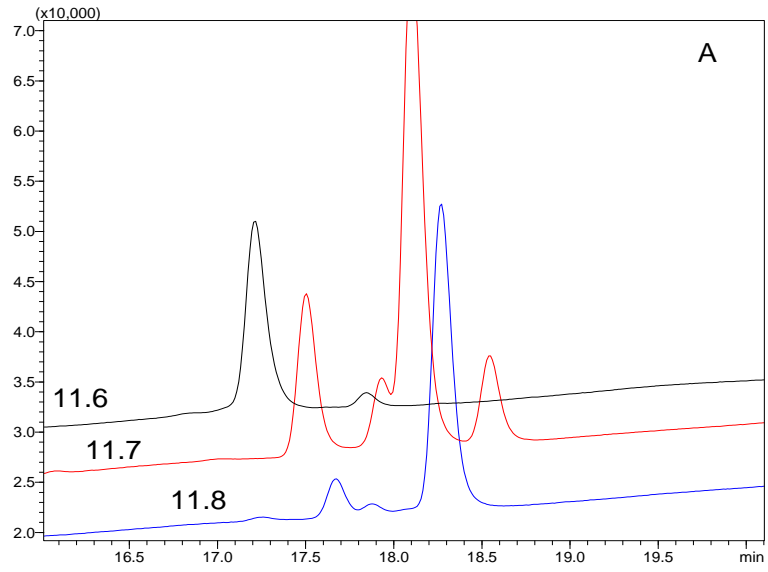
100 - (amostra abs/controle abs) * 100

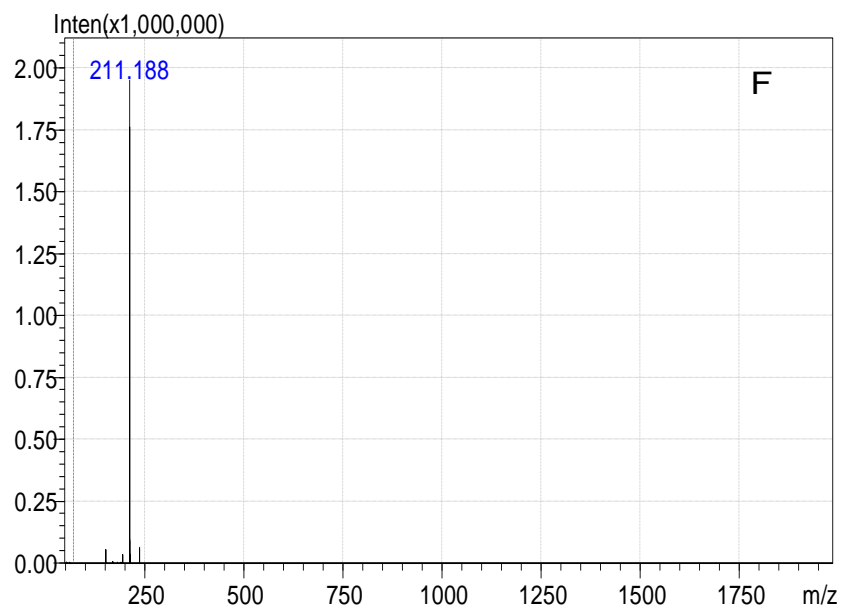
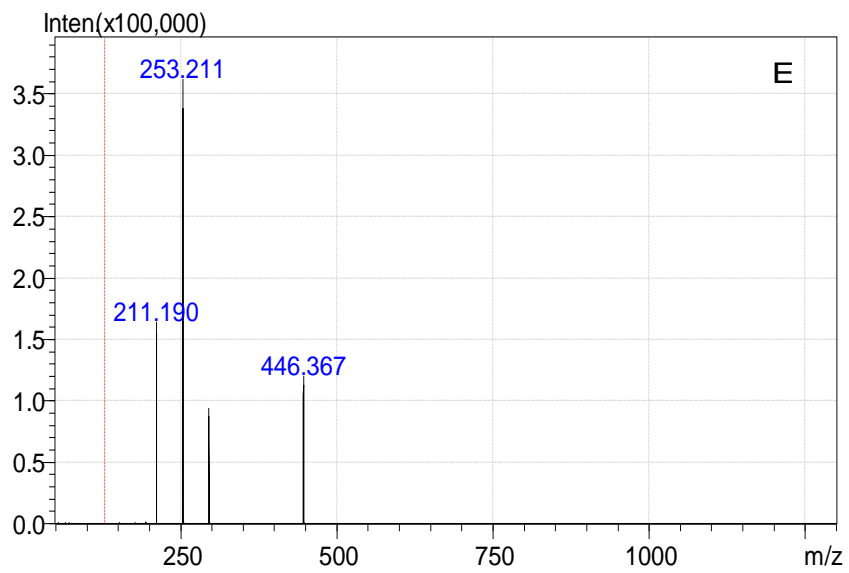
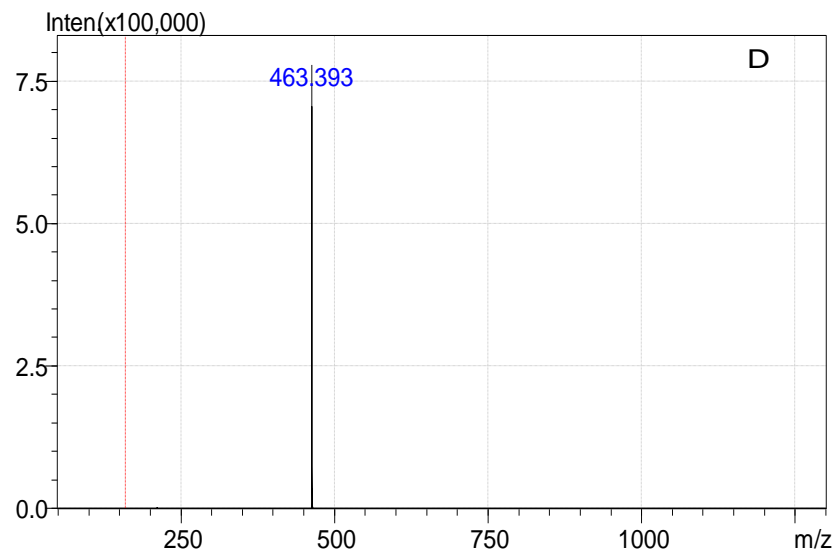
^b Antibiótico (1mg/ml)

4.11. Análise das frações 11.6, 11.7 e 11.8

As frações 11.6, 11.7 e 11.8, por possuírem moléculas com razão m/z semelhantes, foram reanalisadas por RP-HPLC. Após aplicarmos as frações isoladamente, mantendo as mesmas condições utilizadas para a separação da fração 11, observamos que aparentemente as frações não se encontram puras (fig. 24 A).

No entanto, as análises por espectrometria de massas revelam que as 3 frações apresentam uma molécula em comum (m/z 577), sendo os outros íons oriundos da sua fragmentação espontânea (fig. 24 B - G). Particularmente, a figura 24 C mostra que todos os íons presentes ocorrem simultaneamente no cromatograma, indicando que talvez esteja ocorrendo uma fragmentação espontânea do íon precursor comum ($[M+H]^+ = 577,39$ m/z e/ou $[M+2H]^{2+} = 289.19$ m/z). Nas figuras 24 D - F nota-se que ao selecionarmos diferentes precursores presentes na amostra (MS^1), todos os perfis obtidos após a fragmentação (MS^2) contêm os mesmo íons presentes no espectro MS^1 da amostra pura (24B), que se fragmenta espontaneamente.





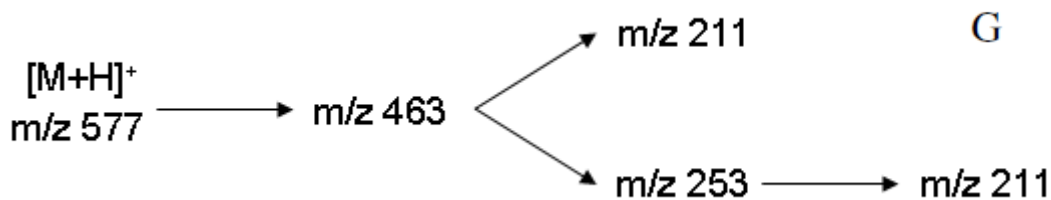


Figura 24 - Análise por RP-HPLC e espectrometria de massas das frações 11.6, 11.7 e 11.8. (A) Sobreposição de perfis cromatográficos monitorados em 214 nm dos componentes 6, 7 e 8 da fração 11, em C-18 e variando o gradiente de solvente B de 15 – 35 %, durante 20 min, a um fluxo constante de 1mL/min. (B) Espectro de massa mostrando os íons presentes nas análises de massa das frações testadas. (C) Sobreposição dos perfis cromatográficos monitorados em diferentes valores determinados de m/z (SIM = single ion monitoring), conforme código de cores a esquerda. (D) Espectro de fragmentação (MS²) do íon precursor m/z 577. (E) Espectro de fragmentação (MS²) do íon m/z 463. (F) Espectro de fragmentação (MS²) do íon m/z 253. (G) Modelo proposto para a fragmentação espontânea do íon precursor (m/z 577) presente nas frações 11.6 – 11.8.

As frações 11.6 – 11.8 também foram analisadas por espectrometria de massa em outro laboratório independente, novamente pelo Prof. Dr. Katsuhiko Konno, da Universidade de Toyama, Japão. Os resultados também mostram a presença de vários íons nestas frações, sendo a maioria dos m/z semelhantes aos obtidos nas nossas análises de espectrometria de massas (Anexo I.1). As fragmentações de alguns íons geradas nesta análise independente também mostram resultados parecidos (Anexo I.2), o que reforça ainda mais a ideia de que esteja ocorrendo uma fragmentação espontânea no íon precursor comum ([M+H]⁺ = 577,39 m/z e/ou [M+2H]²⁺ = 289.19 m/z).

5. DISCUSSÃO

O produto das glândulas granulares dos anuros constitui uma forma de defesa passiva química do animal, procurando evitar a sua predação ou possíveis infecções causadas por microrganismos. Isto fica evidenciado quando analisamos os constituintes e as diversas atividades biológicas exibidas pelos componentes que integram estas secreções cutâneas (ERSPAMER et al., 1986; ZASLOFF, 1987; TOLEDO; JARED, 1995; TEMPONE et al., 2008; CONCEIÇÃO et al., 2009; SCIANI et al., 2013b).

Na literatura encontramos vários estudos envolvendo os anuros da família Pipidae, sendo muitos destes focados na identificação de novos peptídeos antimicrobianos. A metodologia utilizada para a obtenção da secreção cutânea destes animais é sempre por meio da estimulação química. Nesta abordagem, a noradrenalina inoculada no anuro liga-se aos receptores α -adrenérgicos, os quais estimulam a contração das células mioepiteliais que revestem a glândula granular, assim causando a liberação dos grânulos na pele (BENSON; HADLEY, 1969; DOCKRAY; HOPKINS, 1975; GAMMILL et al., 2012).

Apesar de ser um método eficaz, há poucos estudos quanto aos possíveis efeitos colaterais causados pela administração exógena de noradrenalina. Gammill et al. (2012) ao estudarem a liberação da secreção cutânea de *X. laevis*, observaram que repetitivas administrações de noradrenalina, em doses relativamente altas (80 nmol/g), causavam uma grande depleção das glândulas granulares, sugerindo que este fato poderia tornar o animal mais susceptível a infecções. Além disto, os autores notaram algumas alterações fisiológicas no animal, como vasodilatação, edema e depleção das glândulas mucosas.

Ao utilizarmos a estimulação química (1 ou 50 nmol/g de noradrenalina) para a obtenção da secreção cutânea de *P. carvalhoi*, ambas as doses foram eficazes ao promover a liberação do material. A maior dose foi capaz de promover uma maior liberação da secreção, observado principalmente pelo aumento na intensidade dos constituintes majoritários.

A estimulação mecânica já vem sendo utilizada para a obtenção da secreção cutânea em outros anuros, como na *Phyllomedusa nordestina* (CONCEIÇÃO et al.,

2009), na *Ameerega picta* e *Leptodactylus lineatus* (PRATES et al., 2012) e também em anuros do gênero *Rhinella* (SCIANI et al., 2013a). Quando empregamos esta metodologia nas *P. carvalhoi*, também observamos a liberação da secreção cutânea após a análise dos dados cromatográficos.

As moléculas que compõem a secreção cutânea dos anuros são sintetizadas pelo seu próprio metabolismo, existindo grandes variações em termos de constituintes. Sciani et al. (2013a) ao estudarem diferentes anuros da família Bufonidae (gêneros *Rhaebo* e *Rhinella*), verificaram que estas espécies secretam tanto alcaloides quanto esteroides, e que a presença dos mesmos varia entre as espécies estudadas.

Já nos anuros do gênero *Phyllomedusa* (família Hylidae) ou *Xenopus* (família Pipidae), as secreções são ricas em peptídeos (ERSPAMER et al., 1985; MECHKARSKA et al., 2010, CONLON et al., 2011). Também podemos destacar o leptodactilídeos, cuja secreção cutânea produzida é rica em proteínas (PRATES et al., 2012).

No entanto, em algumas espécies de anuros há evidências da influência da dieta nos constituintes das secreções cutâneas. No caso da família Dendrobatidae, os animais após serem coletados e mantidos em cativeiro, apresentam uma redução drástica nos alcaloides presentes na sua pele no decorrer do tempo. Porém, nos anuros deste mesmo táxon nascidos em laboratório, estes alcaloides não foram detectados, sugerindo que fatores como a dieta possam interferir na constituição das secreções dos animais mantidos em laboratório (DALY et al., 1992, 1994).

Recentemente, Hantak et al. (2013) encontraram indícios de sequestro de alcaloides em uma espécie de anuro do gênero *Bufonidae*. Através de experimentos laboratoriais, envolvendo variações na dieta dos animais, os autores descobriram a incorporação e a presença de alguns alcaloides lipofílicos na secreção cutânea de *Melanophryniscus stelzneri*.

Na secreção cutânea de *P. carvalhoi* mantidas em cativeiro e estimuladas quimicamente, podemos notar uma grande semelhança entre todos os perfis cromatográficos obtidos, principalmente os constituintes majoritários. Esta semelhança manteve-se mesmo após compararmos estes resultados com os perfis cromatográficos originados da secreção dos anuros recém-introduzidos no biotério, através da estimulação química. Apesar de a estimulação mecânica ter sido realizada apenas com os animais recém-coletados, não podemos deixar de destaca-

la, uma vez que existe pouca diferença em termos cromatográficos ao relaciona-la com os dados oriundos da estimulação química.

As análises por espectrometria de massas corroboraram os dados obtidos pelas comparações cromatográficas. Podemos sempre notar a presença de um grupo de moléculas encontradas em todas as secreções obtidas. Apesar de existirem alguns problemas nas análises referentes à detecção das moléculas pouco concentradas, como a presença de contaminantes nos solventes ou o fraco sinal obtido, isto sugere que estas moléculas constituem, invariavelmente, a secreção cutânea de *P. carvalhoi*.

Com isso, tanto as análises cromatográficas como as de espectrometria de massas revelam a eficiência da estimulação mecânica nessa espécie. Sendo assim, talvez esta abordagem seja uma alternativa menos agressiva, em termos fisiológicos, para obtenção do material do anuro.

Ao começarmos a estudar a secreção cutânea de *P. carvalhoi*, o material passou por um filtro de corte de massa molecular. Isto direcionou o estudo a procura de moléculas inferiores a 10 kDa. A presença de peptídeos já vem sendo descrita em algumas famílias de anuros (TOLEDO; JARED, 1995; CONLON et al., 2004; CONCEIÇÃO et al., 2009; PRATES et al., 2012), sendo a família Pipidae uma das mais estudadas (ZASLOFF, 1987; CONLON et al., 2012; MECHKARSKA et al., 2012; CONLON et al., 2013). Recentemente, Conlon e Mechkarska (2014) publicaram um artigo na qual fazem uma revisão da literatura e comentam sobre alguns peptídeos antimicrobianos, presentes nos pipídios, com possíveis aplicações terapêuticas (CONLON; MECHKARSKA, 2014).

Porém, as análises por LC-MS e de espectrometria de massas das frações coletadas da secreção cutânea, aqui apresentada, apontam para a ausência dessas moléculas em *P. carvalhoi*. Todos os dados obtidos neste estudo indicam apenas a presença de moléculas de baixa massa molecular (< 800 Da), mesmo após a retirada dos constituintes majoritários da secreção e posterior análise.

Quando comparamos a secreção produzida pela *P. carvalhoi* com a de outras espécies de anuros da família Pipidae, notamos uma diferença entre o conteúdo das secreções. Há poucos estudos na literatura descrevendo a presença de moléculas de baixa massa molecular nos pipídios. Em um destes trabalhos, Roseghini et al. (1988) relatam a presença da 5-hydroxytryptamine (5-HT – serotonina) e Bufotenidine (um derivado amino quaternário do 5-HT) no gênero *Xenopus*.

A descoberta das magaininas em 1987, em *X. laevis* (ZASLOFF, 1987), conduziu a procura subsequente de outros peptídeos antimicrobianos. Ao procurarmos na literatura a presença destas moléculas nos pipídios, podemos destacar os gêneros *Silurana* e *Xenopus*. Estes dois gêneros compreendem 21 (*Xenopus*: 19 sp.; *Silurana*: 2 sp.) das 33 espécies de anuros da família Pipidae (FROST, 2014). Até o momento, já foram descritas a presença destes peptídeos em 10 espécies do gênero *Xenopus* e 2 do gênero *Silurana*, sendo que eles compartilham algumas famílias de peptídeos antimicrobianos, como a PGLa, a CPF e a XPF (ALI et al., 2001; CONLON et al., 2010, 2011, 2012; MECHKARSKA et al., 2010, 2011; CONLON; MECHKARSKA, 2014).

No ano de 2011, Mechkarska et al. (2012) caracterizaram a presença de peptídeos antimicrobianos no gênero *Hymenochirus*. No total, foram encontrados 5 peptídeos na espécie *H. boettgeri*, os quais possuem baixa similaridade estrutural em comparação aos peptídeos isolados nas secreções dos anuros do gênero *Silurana* e *Xenopus* (MECHKARSKA et al., 2012; CONLON; MECHKARSKA, 2014). Recentemente, Conlon et al. (2013) também identificaram e caracterizaram a presença de 13 peptídeos antimicrobianos no anuro *Pseudhymenochirus merlini* (gênero *Pseudhymenochirus*). Destes, 10 peptídeos possuíam similaridades estruturas com os detectados na espécie do gênero *Hymenochirus* (*H. boettgeri*).

Na literatura, existem apenas relatos de estudos envolvendo a secreção cutânea de anuros do gênero *Pipa*. Conlon et al. (2011) apenas citam que não foram detectados peptídeos antimicrobianos na pele de *P. pipa*, não publicando os seus dados. Eles argumentam que apesar de estarem presentes na mesma família do gênero *Xenopus*, talvez o gênero *Pipa* não sintetize esta classe de moléculas (CONLON et al., 2009, 2011).

Quando analisamos os cromatogramas obtidos com as secreções dos anuros da família Pipidae, notamos uma clara diferença (Anexo K). Os trabalhos publicados que descrevem a presença de peptídeos nas secreções cutâneas dos pipídios africanos evidenciam a presença de um conjunto de moléculas (traduzido pela distribuição dos picos ao longo do cromatograma) aparentemente semelhantes entre si (CONLON et al., 2010, 2012, 2013; MECHKARSKA et al., 2012). No entanto, quando comparadas ao perfil cromatográfico de *P. carvalhoi*, através da análise cromatográfica em fase reversa (HPLC) e utilizando condições cromatográficas

semelhantes, podemos notar uma drástica diferença aos cromatogramas analíticos obtidos neste trabalho.

Ao analisarem e compararem as sequências de DNA codificadoras para diferentes peptídeos com atividades antimicrobianas, oriundas de 3 linhagens de anuros (Neobatrachia, Bombinatoridae e Pipidae), König e Bininda-Emonds (2011) sugerem que talvez o aparecimento destes peptídeos possa ter evoluído de uma maneira convergente. Eles sugerem que esta convergência possa ter ocorrido em pelo menos 3 eventos independentes, pois encontraram 3 “motif” diferentes dentro da sequência de peptídeo sinal referente a cada linhagem. Portanto, cada “motif” corresponderia a uma linhagem evolucionária diferente (Neobatrachia, Bombinatoridae e Pipidae), e quando comparados entre si são altamente divergentes.

A filogenia da família Pipidae não está claramente elucidada. É amplamente aceito algumas relações filogenéticas. No entanto, não existe um consenso quanto ao gênero *Pipa*, assim existindo 3 topologias (fig. 7): (*Pipa* (*Hymenochirus* (*Silurana*, *Xenopus*))), (*Hymenochirus* (*Pipa* (*Silurana*, *Xenopus*))) ou (*Hymenochirus*, *Pipa*) (*Silurana*, *Xenopus*).

Irisarri et al. (2011) ao analisarem sequências nucleotídicas de genes mitocondriais de anuros da família Pipidae, propõem que o gênero *Pipa* seja considerado o grupo mais basal entre os pipídios. Contudo, Bewick et al. (2012) ao analisarem sequências nucleotídicas de múltiplos genes nucleares, sugerem outra relação evolutiva: (*Hymenochirus*, *Pipa*) (*Silurana*, *Xenopus*). Além disto, eles propõem que a divergência entre o clado Xenopodinae (*Silurana* e *Xenopus*) e o clado Pipinae (*Hymenochirus* e *Pipa*) ocorreu entre 109 – 143 milhões de anos atrás.

Os autores sugerem que a cladogênese dos pipídios tenha acontecido em função da deriva continental (BEWICK et al., 2012) (Anexo J). Então, após a separação da América do Sul do continente Africano, há cerca de 100 milhões de anos atrás, talvez tenha aumentado a divergência entre o gênero *Pipa* em relação aos outros pipídios (BEWICK et al., 2012).

Dessa forma, através do isolamento geográfico podemos inferir uma explicação para a ausência de peptídeos antimicrobianos na secreção cutânea de *P. carvalhoi*. Porém, não podemos deixar de comentar que talvez a ausência destas moléculas esteja associada à falta de pressões evolutivas, como a ausência de uma co-evolução com microrganismos infecciosos.

Apesar de não terem sido encontrados peptídeos antimicrobianos na secreção cutânea de *P. carvalhoi*, conseguimos identificar uma molécula de baixa massa molecular com esta ação biológica. O íon ($[M+H]^+ = 577,39$ m/z e/ou $[M+2H]^{2+} = 289,19$ m/z), o qual se mostra instável nas condições analíticas empregadas e acaba se fragmentando durante a análise. No entanto, ao reanalisarmos isoladamente as frações 11.6 – 11.8 por RP – HPLC, observamos a presença de íons comuns. Uma possível explicação seria o fato de que esta molécula apresente isomeria geométrica, e em função do gradiente raso empregado (baixa taxa de variação da concentração de B em função do tempo) e da alta eficiência da coluna cromatográfica empregada, estes isômeros foram separados cromatograficamente.

Este fenômeno não é uma novidade. A isomeria cis-trans de prolinas é bastante comum, por exemplo, em hormônios peptídicos e peptídeos do tipo potenciadores de bradicinina (BPPs) de serpentes. Isto muitas vezes causa o desdobramento cromatográfico de picos que correspondem, na verdade, a mesma molécula (NISHIKAWA et al., 1996; O'NEAL et al., 1996).

Essa molécula exibiu uma especificidade para as bactérias gram-positivas. Contudo, pouco se pode inferir em relação ao seu mecanismo de ação ou a sua concentração efetiva, uma vez que ainda não conseguimos caracteriza-la estruturalmente.

O constituinte majoritário (fração 8) da secreção de *P. carvalhoi* foi identificado, por RNM, como sendo o ácido quinurênico. Foram feitas algumas análises complementares em função da sua caracterização (Anexo G 1-2). Quando comparamos os nossos dados com aqueles presentes na literatura, corroboramos a identidade desta molécula (BARTH et al., 2009; WU et al., 2010).

A partir de reações enzimáticas envolvendo o aminoácido L-Triptofano, pode ocorrer à síntese do ácido quinurênico no cérebro e nos tecidos periféricos (Anexo F) (LUGO-HUITRÓN et al., 2011). Uma vez produzido, ele pode atuar como um antagonista dos receptores de glutamato e dos receptores nicotínicos α -7. Além disto, age como um antagonista no sítio de ligação do glutamato e no sítio de ligação alostérico da glicina no receptor N-metil-D-Aspartato (NMDA) (STONE; DARLIGTON, 2002; BARTH et al., 2009).

Alguns estudos identificaram o ácido quinurênico como sendo um agonista do receptor acoplado a proteína G (GPR35). Barth et al. (2009) ao verificarem que este receptor é altamente expresso em monócitos humanos, testaram a hipótese de que o ácido quinurênico possa agir como uma quimiocina interação entre endotélio-leucócito durante um fluxo vascular fisiológico. Os dados obtidos por eles mostram que houve um aumento na ativação de neutrófilos e também, um aumento na adesão de monócitos e neutrófilos no endotélio (BARTH et al., 2009).

Wang et al. (2010) ao estudarem o tônus vascular, verificaram que o ácido quinurênico foi ineficiente em relaxar artérias pré-contraídas (houve um relaxamento em torno de 10 % em relação ao controle). No entanto, o precursor do ácido quinurênico, a quinurenina (Anexo F), foi capaz de reduzir a pressão sanguínea de maneira dose dependente em ratos espontaneamente hipertensos (WANG et al., 2010).

Outro possível efeito biológico associado ao ácido quinurênico seria a presença de uma potencial ação antioxidante. Neste trabalho, os autores encontraram uma redução na oxidação de proteínas, na lipoperoxidação e na geração de espécies reativas de oxigênio nos grupos tratados com o ácido quinurênico (LUGO-HUITRÓN et al., 2011).

O ácido quinurênico já foi identificado em diferentes gêneros alimentícios, como nas frutas, nas verduras, em carnes e também no mel produzido pelas abelhas (TURSKI et al., 2009). Porém, até o momento, ele não havia sido descrito na secreção cutânea dos anfíbios.

Contudo, outro derivado do L-triptofano está presente na urina de fêmeas do salmão *Oncorhynchus masou*. Yambe et al. (2006) identificaram a presença da L-quinurenina na urina de fêmeas em épocas reprodutivas. Por atrair os machos da sua espécie para a reprodução, esta molécula é considerada um feromônio sexual neste salmão (YAMBE et al., 2006). Estando presente nos peixes, os receptores olfatórios acoplados a proteína G vem sendo propostos como os responsáveis pelo reconhecimento dos feromônios sexuais (ALIOTO; NGAI, 2005; 2006).

A utilização de moléculas pelos animais como forma de comunicação química vem sendo estudada também nos anfíbios. Os feromônios podem ser voláteis, não voláteis ou solúveis em água, sendo detectados pelo órgão vomeronasal ou pelo epitélio olfatório principal (WOODLEY, 2010). Já foram identificados a presença de

genes relacionados a 4 famílias de receptores quimiossensoriais nos anfíbios, sendo estes associados a comunicação por feromônios (DATE-ITO et al., 2008).

Por exemplo, a salamandra *Cynops pyrrhogaster* é capaz de secretar na água um peptídeo chamado “sodefrin”, responsável por atrair ou estimular sexualmente as fêmeas da sua espécie. Outra salamandra terrestre, *Plethodon shermani*, esfrega a sua glândula submandibular na fêmea durante a corte, assim entregando os seus feromônios. Ao serem detectados pelo órgão vomeronasal, este estímulo químico, composto por várias proteínas, tornam as fêmeas mais receptivas ao acasalamento (HOUCK, 2009; WOODLEY, 2010).

Já nos anuros, foi identificada a presença de um peptídeo (“Splendipherin”) na secreção cutânea de machos da espécie *Litoria splendida*. Quando secretado, este peptídeo foi capaz de atrair as fêmeas desta espécie em experimentos laboratoriais (HOUCK, 2009). Nos pipídios, também existem evidências desse tipo de comunicação. Ao realizarem alguns experimentos comportamentais com uma espécie do gênero *Hymenochirus*, Pearl et al. (2000) perceberam que as fêmeas escolhiam o caminho do labirinto onde estava sendo mantido o macho da sua espécie. Em outro teste, eles removeram as glândulas sexuais da pele dos machos e homogeneizaram-nas. Em seguida, o homogeneizado foi posto em um dos lados do labirinto. Os pesquisadores também observaram a capacidade das fêmeas de *Hymenochirus sp.* em seguir o caminho no qual o material foi adicionado (PEARL et al., 2000).

Uma vez que *P. carvalhoi* habita exclusivamente ambientes aquáticos, talvez a existência da comunicação química possa auxiliar na localização destes anuros ou na reprodução destes anfíbios. Apesar de o ácido quinurênico ser o constituinte principal da secreção cutânea, nós não conseguimos associa-lo a nenhuma função defensiva para o animal. Curiosamente, podemos perceber que mesmo o animal não sendo estimulado, ele aparentemente secreta um nível basal desta molécula na pele (fig. 13A). Quando analisada por HPLC, notamos a presença de apenas um pico, que corresponde ao ácido quinurênico. Talvez, a liberação desta molécula possa ser um indício de uma possível forma de comunicação química. Entretanto, mais estudos precisam ser realizados para podermos corroborar esta hipótese.

6. CONCLUSÕES

- A secreção cutânea produzida pelo anuro *P. carvalhoi* apresentou perfis cromatográficos muito semelhantes quando analisadas por RP-HPLC, independente da metodologia utilizada para a sua obtenção;
- As análises por espectrometria de massas identificaram moléculas com mesmo m/z nas secreções estudadas, independente da metodologia de extração, indicando a presença de um conjunto constante de moléculas na secreção que, tudo indica, é independente de variações por sexo, idade, dieta ou sazonalidade.
- Independente da origem e do tipo de preparo da amostra, nenhum peptídeo (ou sinal de massa correspondente a um peptídeo) foi encontrado na secreção estudada, sendo identificadas somente moléculas de baixa massa molecular (<800 kDa);
- A fração 11 exibiu uma ação antimicrobiana específica para bactérias gram-positivas. Ao ser reanalisada, foi identificada a molécula m/z 577, sendo atribuído a ela este efeito biológico.
- O constituinte majoritário da secreção (fração 8) é o Ácido Quinurênico. No entanto, ainda não foi associado nenhum efeito biológico a esta molécula.

REFERÊNCIAS

- ALI, M. F.; SOTO, A.; KNOOP, F. C.; CONLON, J. M. Antimicrobial peptides isolated from skin secretions of the diploid frog, *Xenopus tropicalis* (Pipidae). **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1550, n. 1, p. 81-89, 2001.
- ALIOTO, T. S.; NGAI, J. The odorant receptor repertoire of teleost fish. **BMC Genomics**, v. 6, p. 173-187, 2005.
- ALIOTO, T. S.; NGAI, J. The repertoire of olfactory C family G protein-coupled receptors in zebrafish: candidate chemosensory receptors for amino acids. **BMC Genomics**, v. 7, p. 309-327, 2006.
- AMEY, A. P.; GRIGG, G. C. Lipid-reduced evaporative water loss in two arboreal hylid frogs. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 111, n. 2, p. 283-291, 1995.
- ANDREU, D.; ASCHAUER, H.; KREIL, G.; MERRIFIELD, R. B. Solid-phase synthesis of PYLa and isolation of its natural counterpart, PGLa [PYLa-(4-24)] from skin secretion of *Xenopus laevis*, **Eur. J. Biochem.**, v. 149, n. 3, 531-535, 1985.
- BAEZ, S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. **Microvasc. Res.**, v.5, p. 384-394, 1973.
- BÁEZ, A. M.; PÚGENER, L. A. A new paleocene pipid frog from northwestern Patagonia. **J. Vert. Paleontol.**, v. 18, n. 3, p. 511-524, 1998.
- BARTH, M. C.; AHLUWALIA, N.; ANDERSON, T. J.; HARDY, G. J.; SINHA, S.; ALVAREZ-CARDONA, J. A.; PRUITT, I. E.; RHEE, E. P.; COLVIN, R. A.; GERSZTEN, R. E. Kynurenic acid triggers firm arrest of leukocytes to vascular endothelium under flow conditions. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 29, p. 19189-19195, 2009.
- BELAS, R.; MANOS, J.; SUVANASUTHI, R. *Proteus mirabilis* ZapA metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 9, p. 5159-5167, 2004.
- BENSON, B. J.; HADLEY, M. E. *In vitro* characterization of adrenergic receptors controlling skin gland secretion in two anurans *Rana pipiens* and *Xenopus laevis*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 30, n. 5, p. 857-864, 1969.

BESSALLE, R.; KAPITKOVSKY, A.; GOREA, A.; SHALIT, I.; FRIDKIN, M. All-D-magainin: chirality, antimicrobial activity and proteolytic resistance. **FEBS Letters**, v. 274, n.1–2, p. 151–155, 1990.

BEWICK, A. J.; CHAIN, F. J. J.; HELED, J.; EVANS, B. J. The Pipid Root. **Syst. Biol.**, v. 61, n. 6, p.913-926, 2012.

BEVINS, C. L.; ZASLOFF, M. Peptides from frog skin. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 59, n. 1, p. 395-414, 1990.

BOMAN, H. G.; AGERBERTH, B.; BOMAN, A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 7, p. 2978–2984, 1993.

BROGDEN, K. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature**, v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005.

BRUMFITT, W.; SALTON, M. R.; HAMILTON-MILLER, J. M. Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *enterococci*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 50, n. 5, p. 731–734, 2002.

BULET, P.; DIMARCO, J. L.; HETRU, C.; LAGUEUX, M.; CHARLET, M.; HEGY, G., VAN DORSSELAER, A.; HOFFMANN, J. A. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 20, 14893-14897, 1997.

CARLSSON, A.; ENGSTROM, P.; PALVA, E. T.; BENNICHI, H. Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with omp gene transcription. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 9, p. 3040–3045, 1991.

CARROLL, R. L.; KUNTZ, A.; ALBRIGHT, K. Vertebral development and amphibian evolution. **Evol. Dev.**, v. 1, n. 1, p. 36–48, 1999.

CHEN, H.; BROWN, J. H.; MORELL, J. L.; HUANG, C. M. Synthetic magainin analogues with improved antimicrobial activity. **FEBS Letters**, v. 236, n. 2, p. 462–466, 1988.

CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biol. Rev.**, v. 72, n. 3, p. 365-379, 1997.

COCIANCICH, S.; GHAZI, A.; HETRU, C.; HOFFMANN, J. A.; LETELLIER, L. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 26, p. 19239–19245, 1993.

CONCEIÇÃO, K.; BRUNI, F. M.; SCIANI, J. M.; KONNO, K.; MELO, R. L.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; LOPES-FERREIRA, M.; PIMENTA, D. C. Identification of bradykinin: related peptides from *Phyllomedusa nordestina* skin secretion using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a single-step liquid chromatography. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v. 15, n. 4, p. 633-652, 2009.

CONLON, J. M.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1696, n. 1, p. 1-14, 2004.

CONLON, J. M.; AL-GHAFFERI, N.; AHMED, E.; MEETANI, M. A.; LEPRINCE, J.; NIELSEN, P. F. Orthologs of magainin, PGLa, procaerulein-derived, and proxenopsin derived peptides from skin secretions of the octoploid frog *Xenopus amietii* (Pipidae). **Peptides**, v.31, n. 6, p. 989-994, 2010.

CONLON, J. M.; MECHKARSKA, M.; AHMED, E.; LEPRINCE, J.; VAUDRY, H.; KING, J. D.; TAKADA, K. Purification and properties of antimicrobial peptides from skin secretions of the Eritrea clawed frog *Xenopus clivii* (Pipidae), **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v. 153, n. 3, p. 350–354, 2011.

CONLON, J. M.; MECHKARSKA, M.; PRAJEEP, M.; SONNEVEND, A.; COQUET, L.; LEPRINCE, J.; JOUENNE, T.; VAUDRY, H.; KING, J. D. Host-defense peptides in skin secretions of the tetraploid frog *Silurana epítropicalis* with potent activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Peptides**, v. 37, n. 1, p. 113-119, 2012.

CONLON, J. M.; PRAJEEP, M.; MECHKARSKA, M.; COQUET, L.; LEPRINCE, J.; JOUENNE, T.; VAUDRY, H.; KING, J. D. Characterization of the host-defense peptides from skin secretions of Merlin's clawed frog *Pseudhymenochirus merlini*: Insights into phylogenetic relationships among the Pipidae. **Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics**, v. 8, n. 4, pp. 352-357, 2013.

CONLON, J. M.; MECHKARSKA, M. Host-defense peptides with therapeutic potential from skin secretions of frogs from the family pipidae. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 1, p. 58-77, 2014.

CRONAN, J. E. Bacterial membrane lipids: Where do we stand? **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 203-224, 2003.

CRUCIANI, R. A.; BARKER, J. L.; ZASLOFF, M.; CHEN, H. C.; COLAMONICI, O. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 9, p. 3792–3796, 1991.

CRUCIANI, R. A.; BARKER, J. L.; RAGHUNATHAN, G.; GUY, H. R.; ZASLOFF, M.; STANLEY, E. F. Magainin 2, a natural antibiotic from frog skin, forms ion channels in lipid bilayer membranes. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 226, n. 4, p. 287–296, 1992.

DALY, J. W.; SECUNDA, S. I.; GARRAFFO, H. M.; SPANDE, T. F.; WISNIESKI, A.; NISHIHARA, C.; COVER JR, J. F. Variability in alkaloids profiles in neotropical poison frogs (Dendrobatidae): genetic versus environmental determinants. **Toxicon**, v. 30, n. 8, p. 887-898, 1992.

DALY, J. W.; SECUNDA, S. I.; GARRAFFO, H. M.; SPANDE, T. F.; WISNIESKI, A.; COVER JR, J. F. An uptake system for dietary alkaloids in poison frogs (Dendrobatidae). **Toxicon**, v. 32, n. 6, p. 657-663, 1994.

DALY, J. W. The chemistry of poisons in amphibian skin. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 92, n.1, p. 9-13, 1995.

DATE-ITO, A.; OHARA, H.; ICHIKAWA, M.; MORI, Y.; HAGINO-YAMAGISHI, K. *Xenopus* V1R vomeronasal receptor family is expressed in the main olfactory system. **Chem. Senses.**, v. 33, n. 4, p. 339-346, 2008.

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

DUCLOHIER, H.; MOLLE, G.; SPACH, G. Antimicrobial peptide magainin I from *Xenopus* skin forms anion-permeable channels in planar lipid bilayers. **Biophys. J.**, v. 56, n. 5, p. 1017-1021, 1989.

ERSPAMER, V. Biogenic amines and active polypeptides of the amphibian skin. **Ann. Rev. Pharmacol.**, v. 11, n. 1, p. 327-350, 1971.

ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P. Active polypeptides of the amphibian skin and their synthetic analogues. **Pure App. Chem.**, v. 35, n. 4, p. 463-494, 1973.

ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P.; ERSPAMER, G. F.; MONTECUCCHI, P. C.; DE CASTIGLIONE, R. *Phyllomedusa* skin: a huge factory and store-house of a variety of active peptides. **Peptides**, v. 6, p. 7-12, 1985;

ERSPAMER, V.; ERSPAMER, G. F.; CEI, J. M. Active peptides in the skins of two hundred and thirty American amphibian species. **Comp. Biochem. Physiol., Part C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol.**, v. 85, n. 1, p. 125-137, 1986.

ESTES, R. Fossil *Xenopus* from the Paleocene of South America and the zoogeography of pipid frogs. **Herpetologica**, v. 31, n. 3, p.263-278, 1975.

FERNANDES, T. L.; ANTONIAZZI, M. M.; CERRI, E. S.; EGAMI, M. I.; LIMA, C.; RODRIGUES, M. T.; JARED, C. Carrying progeny on the back: reproduction in the brazilian aquatic frog *Pipa carvalhoi*. **SAJH**, v. 6, n. 3, p. 161-176, 2011.

FROST, D. R. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**, versão 5.6. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>. Acesso em: 02 jan. 2014.

GAMMILL, W. M.; FITES, J. S.; ROLLINS-SMITH, L. A. Norepinephrine depletion of antimicrobial peptides from the skin glands of *Xenopus laevis*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.

GANZ, T.; SELSTED, M. E.; LEHRER, R. I. Defensins. **Eur. J. Haematol.**, v. 44, n. 1, p. 1–8, 1990.

GIBSON, B.W.; POULTER, L.; WILLIAMS, D. H.; MAGGIO, J. E. Novel peptide fragments originating from PGLa and the caerulein and xenopsin precursors from *Xenopus laevis*. **J. Biol. Chem.**, v.261, n. 12, p. 5341–5349, 1986.

GIOVANNINI, M. G.; POULTER, L.; GIBSON, B. W.; WILLIAMS, D. H. Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones. **Biochem. J.**, v. 243, n. 1, p. 113-120, 1987.

GIULIANI, A.; PIRRI, G.; NICOLETTO, S. F. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. **Cent. Eur. J. Biol.**, v. 2, n.1, p. 1–33, 2007.

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

GREVEN, H.; RICHTER, S. Morphology of skin incubation in *Pipa carvalhoi* (Anura : Pipidae). **J. Morphol.**, v. 270, n. 11, p. 1311-1319, 2009.

GROISMAN, E. A. How bacteria resist killing by host-defense peptides. **Trends Microbiol.**, v. 2, n. 11, p. 444–448, 1994.

GURDON, J. B.; HOPWOOD, N. The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 44, n. 1, p. 43-50, 2000.

HANCOCK, R. E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. **Lancet Infect. Dis.**, v. 1, n. 3, p. 156–164, 2001.

HANTAK, M. M.; GRANT, T.; REINSCH, S. MCGINNITY, D.; LORING, M.; TOYOOKA, N.; SAPORITO, R. A. Dietary alkaloid sequestration in a poison frog: an experimental test of alkaloid uptake in *Melanophryniscus stelzneri* (Bufonidae). **J. Chem. Ecol.**, v. 39, n. 11-12, p. 1400-1406, 2013.

HIRSCH, J. G. Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. **J. Exp. Med.**, v. 103, n. 5, p. 589–611, 1956.

HOFFMANN, W.; BACH, T. C.; SELIGER, H.; KREIL, G. Biosynthesis of caerulein in the skin of *Xenopus laevis*: partial sequences of precursors as deduced from cDNA clones, **EMBO J.**, v. 2, n. 1, p. 111-114, 1983.

HOUCK, L. D. Pheromone Communication in Amphibians and Reptiles. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 71, p. 161-176, 2009.

IRISARRI, I.; VENCES, M.; MAURO, D. S.; GLAW, F.; ZARDOYA, R. Reversal to air-driven sound production revealed by a molecular phylogeny of tongueless frogs, family Pipidae. **BMC Evol. Biol.**, v.11, n. 1, p. 114, 2011.

JAMES, S.; GIBBS, B. F.; TONEY, K.; BENNET, H. P. J. Purification of antimicrobial peptides from an extract of the skin of *Xenopus laevis* using heparin-affinity HPLC: Characterization by ion-spray mass spectrometry. **Anal. Biochem.**, v. 217, n. 1, p. 84-90, 1994.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, n. 3, p. 491–511, 2006.

JIANG, Z.; KULLBERG, B. J.; VAN DER LEE, H.; VASIL, A. I.; HALE, J. D.; MANT, C. T.; HANCOCK, R. E.; VASIL, M. L.; NETEA, M. G.; HODGES, R. S. Effects of hydrophobicity on the antifungal activity of alpha-helical antimicrobial peptides. **Chem. Biol. Drug. Des.**, v. 72, n.6, p. 483–495, 2008.

KRAGOL, G.; LOVAS, S.; VARADI, G.; CONDIE, B. A.; HOFFMANN, R.; OTVOS, L. Jr. The antibacterial peptide pyrrococin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. **Biochemistry**, v. 40, n.10, p. 3016–3026, 2001.

KÖNIGA, E.; BININDA-EMONDSB, O. R. P. Evidence for convergent evolution in the antimicrobial peptide system in anuran amphibians. **Peptides**, v. 32, n.1, p. 20-25, 2011.

LAI, R.; LIU, H.; HUI LEE, W.; ZHANG, Y. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 295, n. 4, p. 796–799, 2002.

LARSEN, E. H.; RAMLØV, H. Role of cutaneous surface fluid in frog osmoregulation. **Comp. Biochem. Physiol. Part A**, v. 165, n. 3, p. 365-370, 2013.

LEHMANN, J.; RETZ, M.; SIDHU, S. S.; SUTTMANN, H.; SELL, M.; PAULSEN, F.; HARDER, J.; UNTEREGGER, G.; STÖCKLE, M. Antitumor activity of the antimicrobial peptide magainin II against bladder cancer cell lines. **Eur. Urol.**, v. 50, n. 1, p. 141–147, 2006.

LILLO, F.; FARAONE, F. P.; VALVO, M. L. Can the introduction of *Xenopus laevis* affect native amphibian populations? Reduction of reproductive occurrence in presence of the invasive species. **Biolog. Invas.**, v. 13, n. 7, p. 1533–1541, 2011.

LUGO-HUITRÓN, R.; BLANCO-AYALA, T.; UGALDE-MUÑIZ, P.; CARRILLO-MORA, P.; PEDRAZA-CHAVERRÍ, J.; SILVA-ADAYA, D.; MALDONADO, P. D.; TORRES, I.; PINZÓN, E.; ORTIZ-ISLAS, E.; LÓPEZ, T.; GARCÍA, E.; PINEDA, B.; TORRES-RAMOS, M.; SANTAMARÍA, A.; LA CRUZ, V. P. On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. **Neurotoxicol. Teratol.**, v. 33, n. 5, p. 538-547, 2011.

MALOY, W. L.; KARI, U. P. Structure–activity studies on magainins and other host defense peptides. **Biopolymers**, v. 37, n. 2, p. 105–122, 1995.

MATSUZAKI, K.; HARADA, M.; FUNAKOSHI, S.; FUJII, N.; MIYAJIMA, K. Physicochemical determinants for the interactions of magainins 1 and 2 with acidic lipid bilayers. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1063, n.1, p. 162-170, 1991.

MATSUZAKI, K.; SUGISHITA, K.; HARADA, M.; FUJII, N.; MIYAJIMA, K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1327, n. 1, 119-130, 1997.

MATSUZAKI, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1462, n. 1-2, p. 1-10, 1999.

MECHKARSKA, M.; AHMED, E.; COQUET, L.; LEPRINCE, J.; JOUENNE, T.; VAUDRY, H.; KING, J. D.; CONLON, J. M. Antimicrobial peptides with therapeutic potential from skin secretions of the Marsabit clawed frog *Xenopus borealis* (Pipidae). **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v. 152, n. 4, p. 467-472, 2010.

MECHKARSKA, M.; AHMED, E.; COQUET, L.; LEPRINCE, J.; JOUENNE, T.; VAUDRY, H.; KING, J. D.; CONLON, J. M. Peptidomic analysis of skin secretions demonstrates that the allopatric populations of *Xenopus muelleri* (Pipidae) are not conspecific. **Peptides**, v. 32, n. 7, p. 1502–1528, 2011a.

MECHKARSKA, M.; AHMED, E.; COQUET, L.; LEPRINCE, J.; JOUENNE, T.; VAUDRY, H.; KING, J. D.; TAKADA, K.; CONLON, J. M. Genome duplications within the Xenopodinae do not increase the multiplicity of antimicrobial peptides in *Silurana paratropicalis* and *Xenopus andrei* skin secretions, **Comp. Biochem. Physiol. D Genomics Proteomics**, v. 6, n. 2, p. 206–212, 2011b.

MECHKARSKA, M.; PRAJEEP, M.; COQUET, L.; LEPRINCE, J.; JOUENNE, T.; VAUDRY, H.; KING, J. D.; CONLON, J. M. The hymenochirins: A family of host-defense peptides from the Congo dwarf clawed frog *Hymenochirus boettgeri* (Pipidae). **Peptides**, v. 35, n. 1, p. 269-275, 2012.

Murzyn, K.; Pasenkiewicz-Gierula, M. Construction of a toroidal model for the magainin pore. **J. Mol. Model.**, v. 9, n. 4, p. 217-224, 2003.

NISHIKAWA, T.; HAYASHI, H.; SUZUKI, S.; KUBO, H.; OHTANI, H. Cis-Trans Isomerization of Proline Dipeptides during Liquid Chromatography: kinetic analysis of the elution profile. **Analyt. Sci.**, v. 12, n. 4, p. 561-564, 1996.

O'NEAL, K. D.; CHARI, M. V.; MCDONALD, C. H.; COOK, R. G.; YU-LEE, L.; MORRISETT, J. D.; SHEARER, W. T. Multiple cis-trans conformers of the prolactin receptor proline-rich motif (PRM) peptide detected by reverse-phase HPLC, CD and NMR spectroscopy. **Biochem. J.**, v. 315, p. 833-844, 1996.

OTVOS, L. Jr.; O, I.; ROGERS, M. E.; CONSOLVO, P. J.; CONDIE, B. A.; LOVAS, S.; BULET, P.; BLASZCZYK-THURIN, M. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. **Biochemistry**, v. 39, n. 46, p. 14150–14159, 2000.

PARK, C. B.; KIM, H. S.; KIM, S. C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 244, n. 1, p. 253–257, 1998.

PASUPULETI, M.; SCHMIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 32, n. 2, p. 143–171, 2012.

PATRZYKAT, A.; FRIEDRICH, C. L.; ZHANG, L.; MENDOZA, V.; HANCOCK, R. E. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 6, p. 605–614, 2002.

PEARL, C. A.; CERVANTES, M.; CHAN, M.; HO, U.; SHOJI, R.; THOMAS, E. O. Evidence for a mate-attracting chemosignal in the dwarf African clawed frog *Hymenochirus*. **Horm. Behav.**, v. 38, n. 1, p. 67-74, 2000.

PRASAD, R.; GHANNOUM, A. M. Lipids of Pathogenic Fungi. Florida: CRC Press, 1996.

PRATES, I.; ANTONIAZZI, M. M.; SCIANI, J. M.; PIMENTA, D. C.; TOLEDO, L. F.; HADDAD, C. F. B.; JARED, C. Skin glands, poison and mimicry in Dendrobatid and Leptodactylid amphibians. **J. Morphol.**, v. 273, n. 3, p. 279–290, 2012.

RESNICK, N. M.; MALOY, W. L.; GUY, H. R.; ZASLOFF, M. A novel endopeptidase from *Xenopus* that recognizes α -helical secondary structure. **Cell**, v. 66, n. 3, p. 541–554, 1991.

RIEDL, S.; ZWEYTICK, D.; LOHNER, K. Membrane-active host defense peptides – Challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. **Chem. Phys. Lipids**, v. 164, n.8, p. 766– 781, 2011.

ROELANTS, K.; BOSSUYT, F. Archaeobatrachian paraphyly and pangaeon diversification of crown-group frogs. **Syst. Biol.**, v. 54, n. 1, p. 111-126, 2005.

ROLAND, K. L.; ESTHER, C. R.; SPITZNAGEL, J. K. Isolation and characterization of a gene, *pmrD*, from *Salmonella typhimurium* that confers resistance to polymyxin when expressed in multiple copies. **J. Bacteriol.**, v. 176, n. 12, p. 3589–3597, 1994.

ROSEGHINI, M.; ERSPAMER, G. F.; SEVERINI C. Biogenic amines and active peptides in the skin of fifty-two African amphibian species other than bufonids. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 91, n. 2, p. 281-286, 1988.

SCIANI, J. M.; ANGELI, C. B.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; PIMENTA, D. C. Differences and similarities among parotoid macrogland secretions in South American toads: a preliminary biochemical delineation. **The Scientific World J.**, v. 2013, p. 1-9, 2013a.

SCIANI, J. M.; DE-SÁ-JÚNIOR, P. L.; FERREIRA, A. K.; PEREIRA, A.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; PIMENTA, D. C. Cytotoxic and antiproliferative effects of crude amphibian skin secretions on breast tumor cells. **Biomed. Prevent. Nutrit.**, v. 3, n. 1, p. 10-18, 2013b.

SCHOCH. R. R. Evolution of Life Cycles in Early Amphibians. **Annu. Rev. Earth Planet. Sci**, v. 37, p. 135–162, 2009.

SKARNES, R. C.; WATSON, D. W. Antimicrobial factors of normal tissues and fluids. **Bacteriol. Rev.**, v. 21, n. 4, p. 273–294, 1957.

SORAVIA, E.; MARTINI, G.; ZASLOFF, M. Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus* granular gland secretions. **FEBS Lett.**, v. 228, n. 2, p. 337–340, 1988.

STEINER, H.; HULTMARK, D.; ENGSTROM, A.; BENNICH, H.; BOMAN, H. G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, v. 292, n. 5820, p. 246–248, 1981.

STONE, T. W.; DARLINGTON, L. G. Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v.1, n. 8, p. 609-620, 2002.

SUBBALAKSHMI, C.; SITARAM, N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 160, n. 1, p. 91–96, 1998.

TEMPONE, A.; PIMENTA, D. C.; LEBRUN, I.; SARTORELLI, P.; TANIWAKI, N.; DEANDRADEJR, H.; ANTONIAZZI, M.; JARED, C. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. **Toxicon**, v. 52, n. 1, p. 13-21, 2008.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. Cutaneous adaptations to water balance in amphibians. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 105A, n. 4, p. 593-608, 1993.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.**, v. 111, n.1, p. 1-29, 1995.

TRUEB, L.; CANNATELLA, D. C. Systematics, morphology, and phylogeny of genus *Pipa* (Anura:Pipidae). **Herpetologica**, v. 42, n. 4, p. 412-449, 1986.

TRUEB, L.; PÚGENER, L. A.; MAGLIA, A. M. Ontogeny of the Bizarre: An osteological description of *Pipa pipa* (Anura: Pipidae), with an account of skeletal development in the species. **J. Morphol.**, v. 243, n. 1, p. 75–104, 2000.

TURSKI, M. P.; TURSKA, M.; ZGRAJKA, W.; KUC, D.; TURSKI, W. A. Presence of kynurenic acid in food and honeybee products. **Amino Acids**, v. 36, n. 1, p. 75-80, 2009.

TYTLER, E. M.; ANANTHARAMAIAH, G. M.; WALKER, D. E.; MISHRA, V. K.; PALGUNACHARI, M. N.; SEGREST, J. P. Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis. **Biochemistry**, v. 34, n. 13, p. 4393–4401, 1995.

WANG, Y.; LIU, H.; MCKENZIE, G.; WITTING, P. K.; STASCH, J. P.; HAHN, M.; CHANGSIRIVATHANATHAMRONG, D.; WU, B. J.; BALL, H. J.; THOMAS, S. R.; KAPOOR, V.; CELERMAJER, D. S.; MELLOR, A. L.; KEANEY, J. F. JR.; HUNT, N. H.; STOCKER, R. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. **Nat. Med.**, v. 16, n. 3, p. 279-285, 2010.

WIEPRECHT, T.; APOSTOLOV, O.; BEYERMANN, M.; SEELIG, J. Membrane Binding and Pore Formation of the Antibacterial Peptide PGLa: Thermodynamic and Mechanistic Aspects. **Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 442-452, 2000.

WOODLEY, S. K. Pheromonal communication in amphibians. **J. Comp. Physiol. A**, v. 196, n. 10, p. 713-727, 2010.

WU, H. Q.; PEREIRA, E. F.; BRUNO, J. P.; PELLICCIARI, R.; ALBUQUERQUE, E. X.; SCHWARCZ, R. The astrocyte-derived alpha7 nicotinic receptor antagonist kynurenic acid controls extracellular glutamate levels in the prefrontal cortex. **J. Mol. Neurosci.**, v.40, n. 1-2, p. 204-210, 2010.

YAMBE, H.; KITAMURA, S.; KAMIO, M.; YAMADA, M.; MATSUNAGA, S.; FUSETANI, N.; YAMAZAKI, F. L-Kynurenine, an amino acid identified as a sex pheromone in the urine of ovulated female masu salmon. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 42, p. 15370-15374, 2006.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. **Pharmacol. Rev.**, v. 55, n. 1, p. 27–55, 2003.

YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. Structural congruence among membrane-active host defense polypeptides of diverse phylogeny. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1758, n. 9, p. 1373–1386, 2006.

ZARDOYA, R.; MEYER, A. On the origin of and phylogenetic relationships among living amphibians. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, n. 13, p. 7380-7383, 2001.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, n. 15, p. 5449–5453, 1987.

ZASLOFF, M.; MARTIN, B.; CHEN, H. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, n. 3, p. 910-913, 1988.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.

ZHANG, L.; ROZEK, A.; HANCOCK, R. E. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 38, p. 35714–35722, 2001.

ZIMMERMANN, E. **Reptiles and Amphibians: Care, Behavior, Reproduction**. Stuttgart: T. F. H. Publications, 1995. p. 208-211.

ANEXOS

ANEXO A.1 – Estrutura molecular do Cloridrato de Noradrenalina

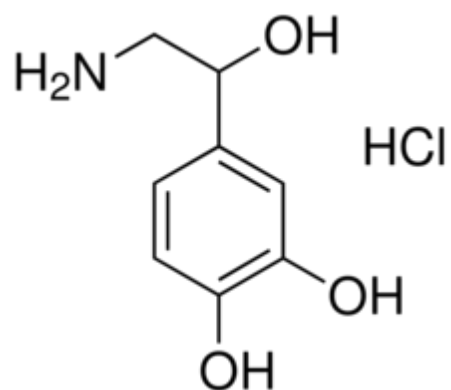


Figura 1.1 - Estrutura molecular do Cloridrato de Noradrenalina.
A molécula utilizada para a estimulação química da *P. carvalhoi* apresenta uma massa molecular de 205,64 Da.

ANEXO A.2 – LC-MS do cloridrato de noradrenalina no modo positivo

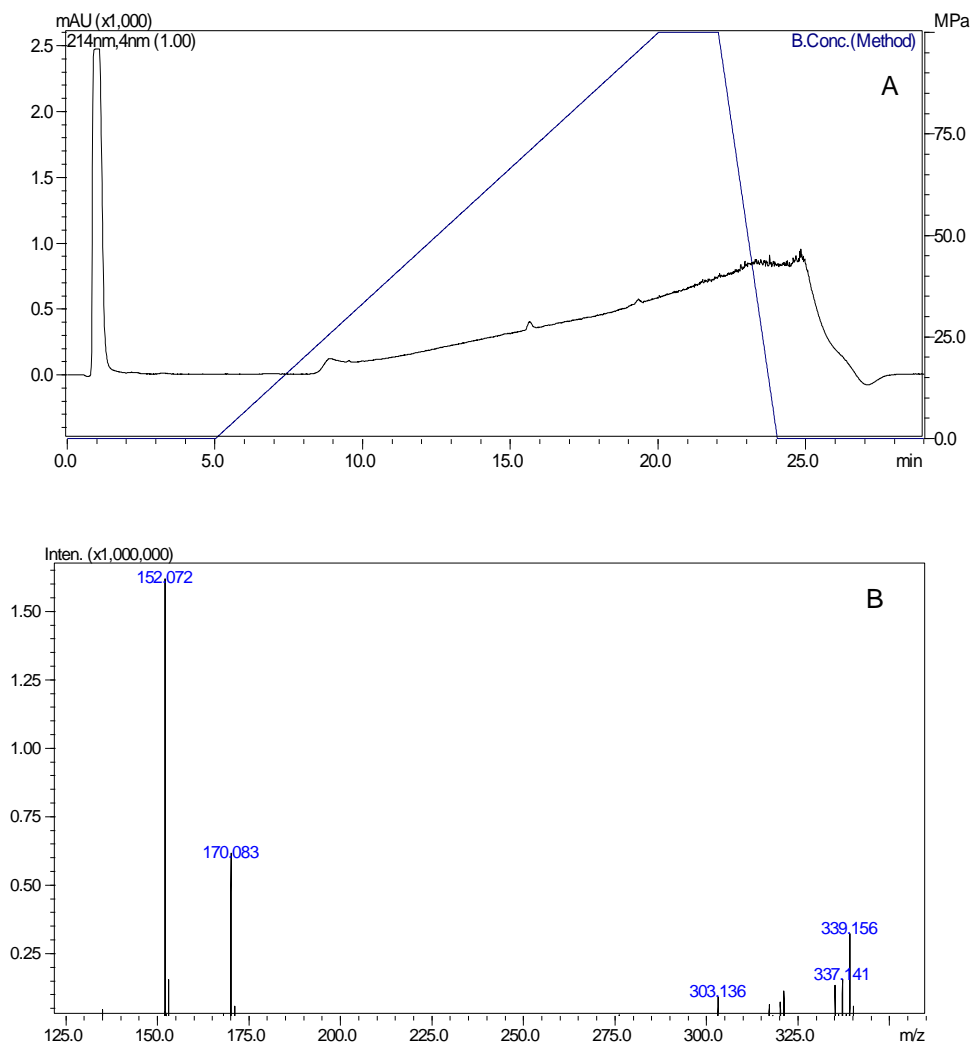


Figura 1.2 – LC-MS do cloridrato de noradrenalina no modo positivo.

(A) O material foi separado cromatograficamente em uma coluna C18 (50 x 2,1 mm), mantendo-se um fluxo constante de 0,2 mL/min, e variando a concentração do solvente B de 0 – 100%, durante 15 min. Podemos notar que no decorrer da separação cromatográfica não há a presença de qualquer pico. Quando analisamos a fração não retida (não interage com a coluna), observamos a presença de um pico majoritário. (B) Na análise por espectrometria de massas da fração não retida (0–5 min.), existe a presença de 2 íons evidentes, m/z 152,072 e m/z 170,083. O íon m/z 170,083 corresponde a noradrenalina, não estando ligada ao grupo Cloro. Durante o processo de ionização, o íon referente a noradrenalina acaba perdendo uma molécula de água (18 Da), assim formando o íon 152,072.

ANEXO A.3 - LC-MS do cloridrato de noradrenalina no modo negativo

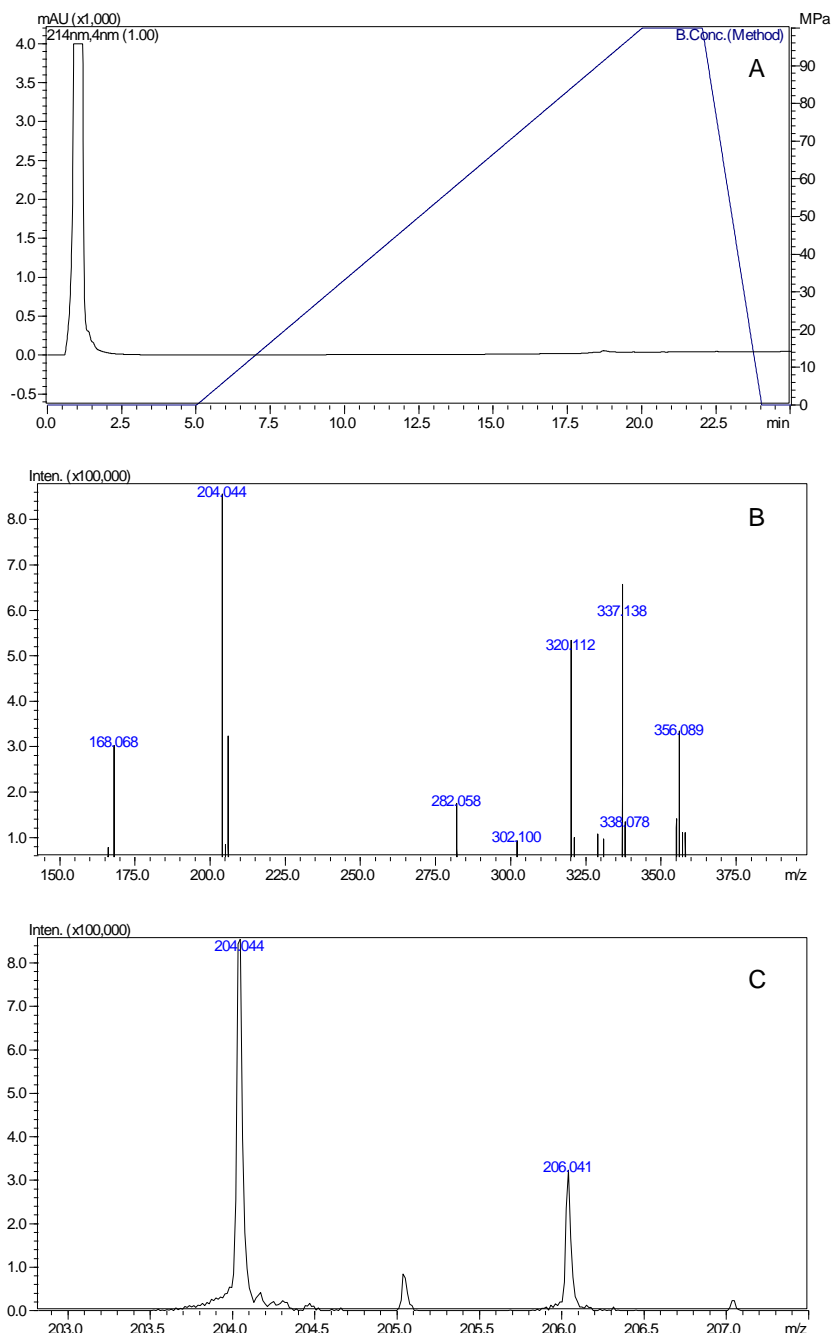


Figura 1.3 - LC-MS do cloridrato de noradrenalina no modo negativo.

(A) O material foi separado cromatograficamente em uma coluna C-18 (50 x 2,1 mm), mantendo-se um fluxo constante de 0,2 mL/min, e variando a concentração do solvente B de 0 – 100%, durante 15 min. Novamente não há a presença de picos durante a fase cromatográfica. Quando analisamos a fração não retida, observamos a presença de um pico, apresentando um sinal intenso. (B) Na análise por espectrometria de massas da fração não retida (0–5 min.), o íon majoritário é m/z 204,044, correspondente à ionização do cloridrato de noradrenalina. Também notamos a presença do íon 168,069, correspondente à ionização no modo negativo da noradrenalina. (C) Imagem ampliada do íon m/z 204,044, aonde podemos notar a distribuição dos picos isotopólogos (m/z: 205,044; m/z: 206,04; 207,04). Este tipo de padrão de distribuição refere-se ao de uma molécula contendo cloro, o que condiz com a presença do cloridrato de noradrenalina.

ANEXO B. - Abordagem alternativa para a estimulação química dos anuros.

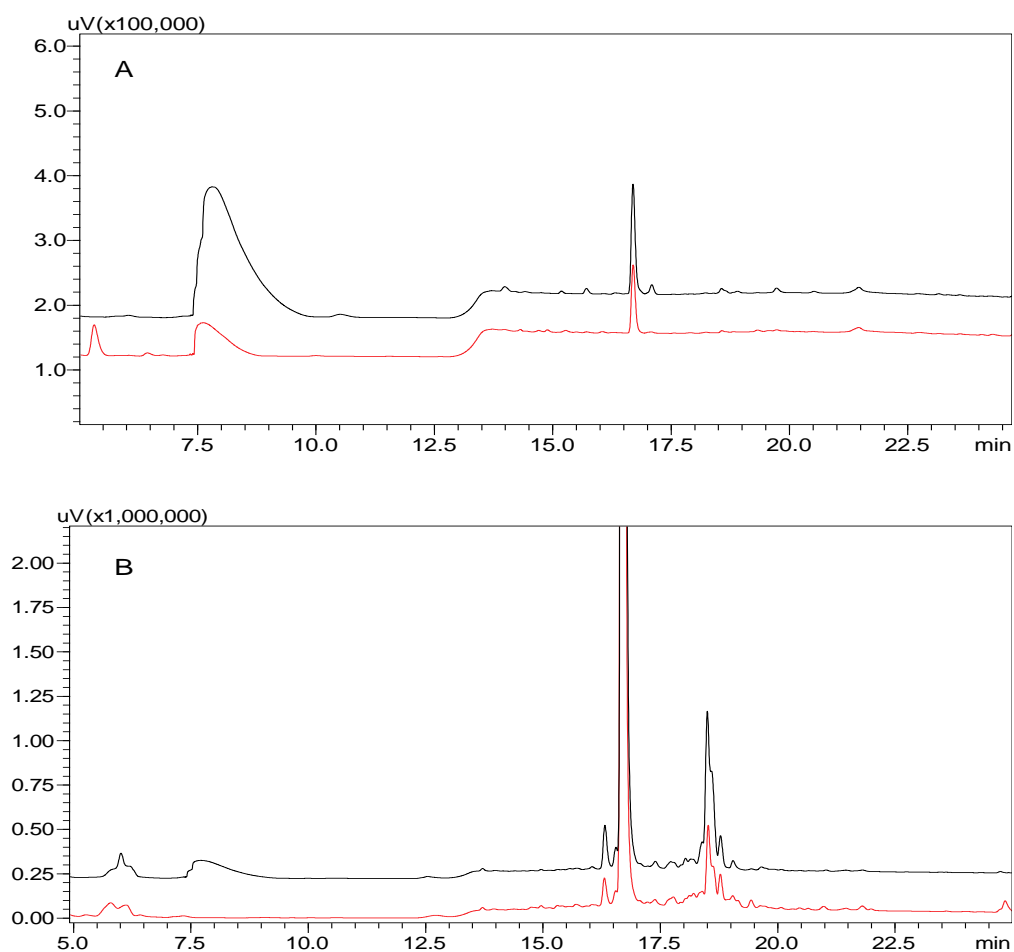


Figura 2 – Abordagem alternativa para a estimulação química dos anuros.

(A) O anuro foi imerso, durante 15 min., em uma solução contendo 25 mM acetato de amônio, pH 7,0, e cloridrato de noradrenalina. Em seguida, o animal foi removido do recipiente e o material foi preparado para a análise por RP-HPLC (coluna C18 (250 x 4,6 mm), mantendo fluxo constante de 1 mL/min e variando a concentração de B entre 0 – 100, durante 20 min). A presença do cloridrato de noradrenalina na solução foi ineficaz em causar a liberação da secreção cutânea (vermelho), pois observamos apenas a presença de um pico, sendo o seu sinal pouco intenso. Quando comparamos o cromatograma obtido por esta metodologia com outro obtido na ausência de estímulo (preto), notamos uma semelhança entre eles. Isto sugere a capacidade do animal em secretar a sua secreção a níveis basais ou ainda, que a própria manipulação do anuro é capaz de causar um pequeno estresse, resultando na baixa liberação do material. (B) Os mesmos animais foram imersos em outra solução de 25 mM acetato de amônio, pH 7,0, separadamente, e estimulados mecanicamente. Agora, verificamos que os anuros foram capazes de secretar a sua secreção cutânea (preto: animal mantido previamente na solução; vermelho: animal mantido previamente na solução contendo cloridrato de noradrenalina).

ANEXO C. – m/z presentes na secreção cutânea de *P. carvalhoi*

Tabela 1 – m/z presentes nas análises da secreção cutânea de *P. carvalhoi*.

Sem Estímulo			Estimulação Mecânica			Estimulação Química		
m/z	Intensidade relativa	carga [m + H]	m/z	Intensidade relativa	carga [m + H]	m/z	Intensidade relativa	carga [m + H]
127,1133	4,73	1	177,1127	7,24	1	152,1425	5,44	1
155,1411	11,19	3	211,1904	24	1	190,0491	9,95	1
201,5263	6,37	3	232,2017	10,72	2	194,1629	5,01	1
211,1883	19,97	1	240,2299	18,49	1	211,1902	81,75	1
232,2013	33,51	2	243,1762	15,04	2	232,2017	43,96	2
251,2426	5,53	1	271,2353	6,04	1	243,1804	13,49	2
313,2159	7,01	2	284,1911	4,85	1	251,24	13,41	1
335,2196	11,55	2	288,2653	7,63	1	253,2157	17,96	1
340,2198	7,49	1	302,1838	9,24	1	256,8504	4,5	3
341,222	15,24	1	316,2103	5,06	1	259,7075	13,22	2
348,7213	4,25	1	322,2688	4,71	1	271,2336	9,94	1
353,3379	9,3	1	328,2203	10,43	1	277,21	4,28	1
355,2257	9,21	1	343,2926	20,03	1	281,702	7,47	2
357,2339	13,59	1	344,2319	5,69	1	285,2765	4,16	1
357,7367	4,25	1	350,1869	5,88	1	287,151	6,68	2
359,2387	8,55	1	372,2468	11,21	1	289,1989	10,29	2
377,2327	32,23	1	375,24	4,15	1	293,1858	4,38	2
387,1874	10,26	1	387,1838	11,36	1	295,2109	5,06	1
388,2426	8,75	1	388,2346	11,17	1	299,1338	4,32	1
399,2353	31,78	1	391,0882	5,65	1	300,1964	11,59	2
401,2586	11,21	1	394,2119	5,94	1	302,1913	12,4	1
409,167	6,56	1	409,1753	31,44	1	316,2097	11,12	1
421,2536	21,16	1	425,1353	14,76	1	322,2683	21,24	1
423,273	8,64	1	431,2844	4,44	1	327,2356	10,18	1
425,1391	5,21	1	435,1135	7,34	1	336,2839	19,06	1
435,2446	4,46	1	438,235	6,48	1	351,2376	5,17	3
445,2871	5,85	2	451,1644	5,39	1	375,2395	5,2	1
448,2727	9,47	1	454,2023	4,74	1	387,1827	17,49	1
449,2499	20,5	1	460,2949	8,08	1	389,2455	4,2	3
453,2218	10,49	1	461,2985	10,55	1	397,2233	4,65	1
461,2936	5,23	1	463,3929	4,48	1	400,2382	7,77	1
467,2999	4,08	2	482,2615	4,64	1	401,2588	8,82	1
481,2481	8,14	1	485,3509	13,2	1	409,165	16,45	1
567,32	10,18	1	505,3214	4,9	1	415,2071	7,49	1
568,3043	9,62	1	507,3166	4,05	1	425,1347	21,15	1
573,2543	14,19	1	547,3335	5,48	1	427,2639	7,35	1
			551,3416	4,16	1	429,2673	15,91	1
			585,2908	7,37	1	431,2875	57,11	1
						436,2606	7,49	1
						441,2866	6	2
						445,2519	6,72	1
						449,1493	4,53	1
						450,2727	9,22	1
						451,1668	7,01	1
						451,2546	12,14	1
						453,1718	9,36	1
						461,2954	21,27	1
						463,394	28,65	1
						474,2507	6,16	1
						475,2958	6,23	1
						485,354	45,13	1
						487,3381	5,05	1
						491,304	4,07	1
						502,2778	4,3	1
						505,3212	7,3	1
						507,318	4,68	1
						521,3262	4,45	1
						526,359	12,48	2
						551,3428	4,26	1
						577,3874	8,84	1
						583,3712	5,11	2
						585,3683	5,66	1
						599,3863	17,96	1

Cores iguais representam m/z presentes em mais de um material analisado.

A intensidade relativa refere-se à porcentagem da intensidade do íon em relação a intensidade absoluta do pico base: sem estimulação (pico base: m/z 367,244; intensidade absoluta: 153,369); estimulação mecânica (pico base: m/z 365,138; intensidade absoluta: 640,804); estimulação química (pico base: m/z 365,134; intensidade absoluta: 547,602).

A lista foi elaborada com m/z superiores a 4% da intensidade absoluta do pico base.

ANEXO D. – m/z das moléculas presentes nos anuros mantidos em cativeiro ou recém-coletados.

Tabela 2 - m/z presentes na secreção dos animais mantidos em cativeiro ou recém-coletados.

Animal mantido em cativeiro			Animal recém coletado		
m/z	Intensidade relativa	carga [m + H]	m/z	Intensidade relativa	carga [m + H]
211,1903	16,97	1	152,1425	5,44	1
232,2024	8,26	2	190,0491	9,95	1
237,2324	32,91	1	194,1629	5,01	1
249,2319	5,76	2	211,1902	81,75	1
251,2468	35,38	1	232,2017	43,96	2
253,2185	9,34	1	243,1804	13,49	2
253,2591	5,91	1	251,24	13,41	1
259,7087	14,13	2	253,2157	17,96	1
267,242	15,86	1	256,8504	4,5	3
269,2199	5,51	1	259,7075	13,22	2
272,2579	5,09		271,2336	9,94	1
281,2418	4,65	1	277,21	4,28	1
283,2373	14,43	1	281,702	7,47	2
297,2503	17,52	1	285,2765	4,16	1
375,2477	4,61	1	287,151	6,68	2
376,3421	5,13	1	289,1989	10,29	2
399,2628	4,24	1	293,1858	4,38	2
401,2794	14,28	1	295,2109	5,06	1
403,2715	4,93	1	299,1338	4,32	1
415,292	30,23	1	300,1964	11,59	2
417,2788	7,77	1	302,1913	12,4	1
427,2913	8,95	1	316,2097	11,12	1
429,2881	9,59	1	322,2683	21,24	1
431,2891	100	1	327,2356	10,18	1
445,2787	7,94	1	336,2839	19,06	1
447,2823	4,95	1	351,2376	5,17	3
451,256	7,74	1	375,2395	5,2	1
459,3114	11,88	1	387,1827	17,49	1
461,2953	20,41	1	389,2455	4,2	3
463,3978	5,01	1	397,2233	4,65	1
473,2989	11,01		400,2382	7,77	1
475,3129	20,56	1	401,2588	8,82	1
477,294	4,07	1	409,165	16,45	1
489,3225	7,34	1	415,2071	7,49	1
491,3068	14,09	1	425,1347	21,15	1
497,4564	10,69	1	427,2639	7,35	1
503,308	4,75	1	429,2673	15,91	1
505,322	22,96	1	431,2875	57,11	1
543,5091	4,66	1	436,2606	7,49	1
			441,2866	6	2
			445,2519	6,72	1
			449,1493	4,53	1
			450,2727	9,22	1
			451,1668	7,01	1
			451,2546	12,14	1
			453,1718	9,36	1
			461,2954	21,27	1
			463,394	28,65	1
			474,2507	6,16	1
			475,2958	6,23	1
			485,354	45,13	1
			487,3381	5,05	1
			491,304	4,07	1
			502,2778	4,3	1
			505,3212	7,3	1
			507,318	4,68	1
			521,3262	4,45	1
			526,359	12,48	2
			551,3428	4,26	1
			577,3874	8,84	1
			583,3712	5,11	2
			585,3683	5,66	1
			599,3863	17,96	1

Cores iguais representam m/z presentes em mais de um material analisado.

A intensidade relativa refere-se à porcentagem da intensidade do íon em relação a intensidade absoluta do pico base: em cativoiro (pico base: m/z 431,289; intensidade absoluta: 1.018.837); recém-coletado (pico base: m/z 365,134; intensidade absoluta: 547,602).

A lista foi elaborada com m/z superiores a 4% da intensidade absoluta do pico base.

ANEXO E. – m/z das moléculas presentes na secreção cutânea de *P. carvalhoi* na ausência das frações 8 e 11.

Tabela 3 - m/z das moléculas presentes na secreção cutânea na ausência das frações 8 e 11.

Frações 1 - 7, 9 - 10 e 12 - 14			Frações 1 - 7, 9 - 10 e 12 - 14		
m/z	Intensidade relativa	carga [m + H]	m/z	Intensidade relativa	carga [m + H]
126,1	9,53	1	333,19	13,92	1
131,11	7,28	1	336,28	12,09	1
170,15	9,62	1	342,24	7,64	1
177,11	4,55	1	343,19	14,71	1
202,18	29,63	1	349,18	32,07	1
206,04	6,46	1	353,33	16,6	1
209,17	5,52	1	356,26	11,39	1
211,19	64,39	1	359,19	9,1	1
213,08	12,3	1	368,09	8,42	1
229,15	5,52	1	372,25	29,23	1
237,23	9,64	1	373,19	5,77	1
239,15	9,21	1	376,34	38,08	1
243,18	11,23	1	386,27	6,15	1
246,24	4,14	1	394,21	6,75	1
251,24	22,42	1	412,26	6,15	1
253,21	38,12	1	412,32	4,74	1
253,25	35,01	1	415,27	24,77	1
261,13	9,76	1	416,28	28,57	1
262,17	8,62	1	428,28	8,58	1
267,27	28,31	1	432,24	4,71	1
284,2	9,06	1	432,31	5,63	1
287,15	11,04	2	453,17	6,99	1
290,26	5,87	1	453,25	7,22	1
291,19	7,49	1	456,35	5,24	1
293,26	15,24	1	460,26	6,1	1
295,22	6,84	1	460,34	9,22	1
297,24	10,34	1	476,28	6,39	1
302,19	12,41	1	481,22	11,93	1
311,2	4,78	1	481,3	10,59	1
312,23	6,51	1	497,26	9,15	1
319,14	4,03	1	504,31	4,91	1
322,26	31,36	1	525,25	8,79	1
328,22	25,06	1	525,34	7,03	1
329,22	7,22	1			

A intensidade relativa refere-se à porcentagem da intensidade do íon em relação a intensidade absoluta do pico base; pico base: m/z 352,3315; intensidade absoluta: 26.713.

A lista foi elaborada com m/z superiores a 4% da intensidade absoluta do pico base.

ANEXO F – Rota de síntese dos derivados do L-Triptofano

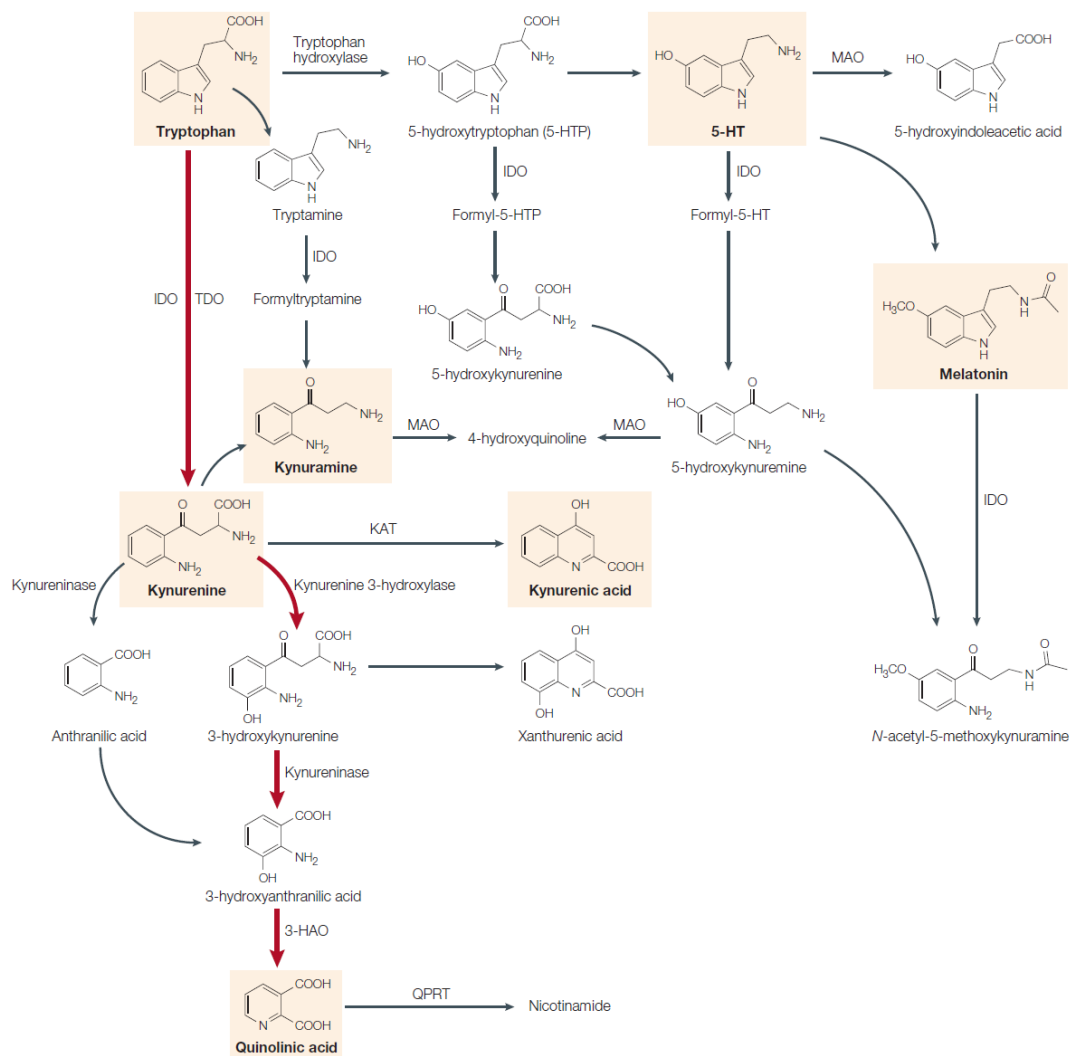


Figura 3 - Rota de síntese dos derivados do L-Triptofano.

O L-triptofano pode ser metabolizado para a rota da Kynurenine (setas vermelhas), ser convertido em 5-hydroxytryptamina (5-HT) e na melatonin, ou ainda, convertida em tryptamina e então nas kynuramines. 3-HAO: 3-hydroxyanthranilic acid oxidase; IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase; KAT, kynurenine aminotransferase; MAO, monoamine oxidase; QPRT: quinolinic-acid phosphoribosyl transferase; TODO: tryptophan 2,3-dioxygenase.

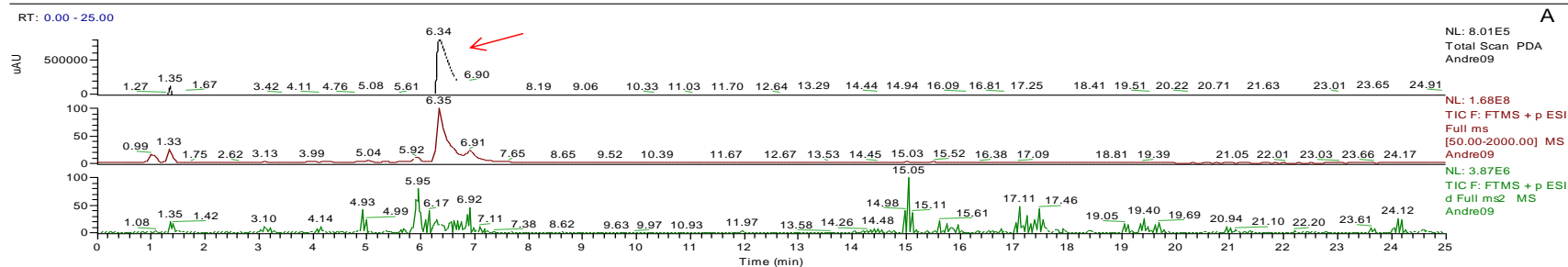
Fonte: Stone; Darlington, 2002.

ANEXO G.1 – Espectrometria de massas da fração 8.

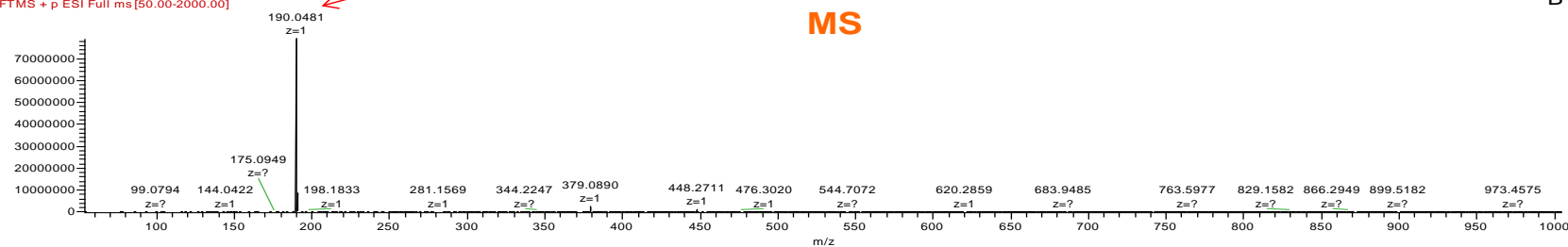
Z:\00_KONNOV...Andre09

09/08/2013 02:56:50

2013B06



Andre09 #267-276 RT: 6.28-6.41 AV: 3 NL: 7.89E7
F: FTMS + p ESI Full ms [50.00-2000.00]



Andre09 #272 RT: 6.36 AV: 1 NL: 3.89E5
T: FTMS + p ESI d Full ms2 379.09@hcd35.00 [50.00-390.00]

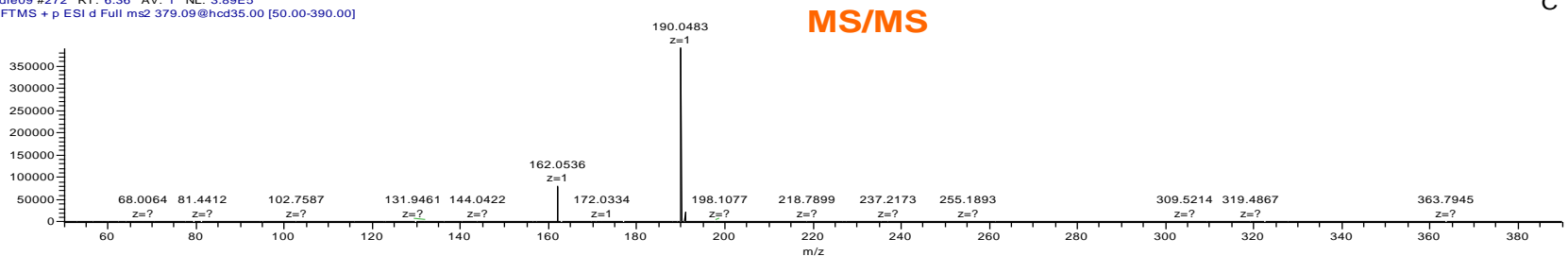


Figura 4.1 – Análise por LC-MS da fração 8.

A amostra foi analisada através da cromatografia líquida em fase reversa acoplada a um espectrômetro de massas LTQ Orbitrap, em uma coluna C-18, no modo positivo, utilizando as condições de trabalho padronizadas no laboratório do colaborador. (A) A seta em vermelho indica o instante em que a fração 8 eluiu durante a corrida cromatográfica. (B) Esta fração apresenta um íon majoritário m/z 190,048. (C) A fragmentação deste íon não gerou informações adicionais a respeito da molécula.

ANEXO G.2 – Espectro de absorção e fluorescência da fração 8.

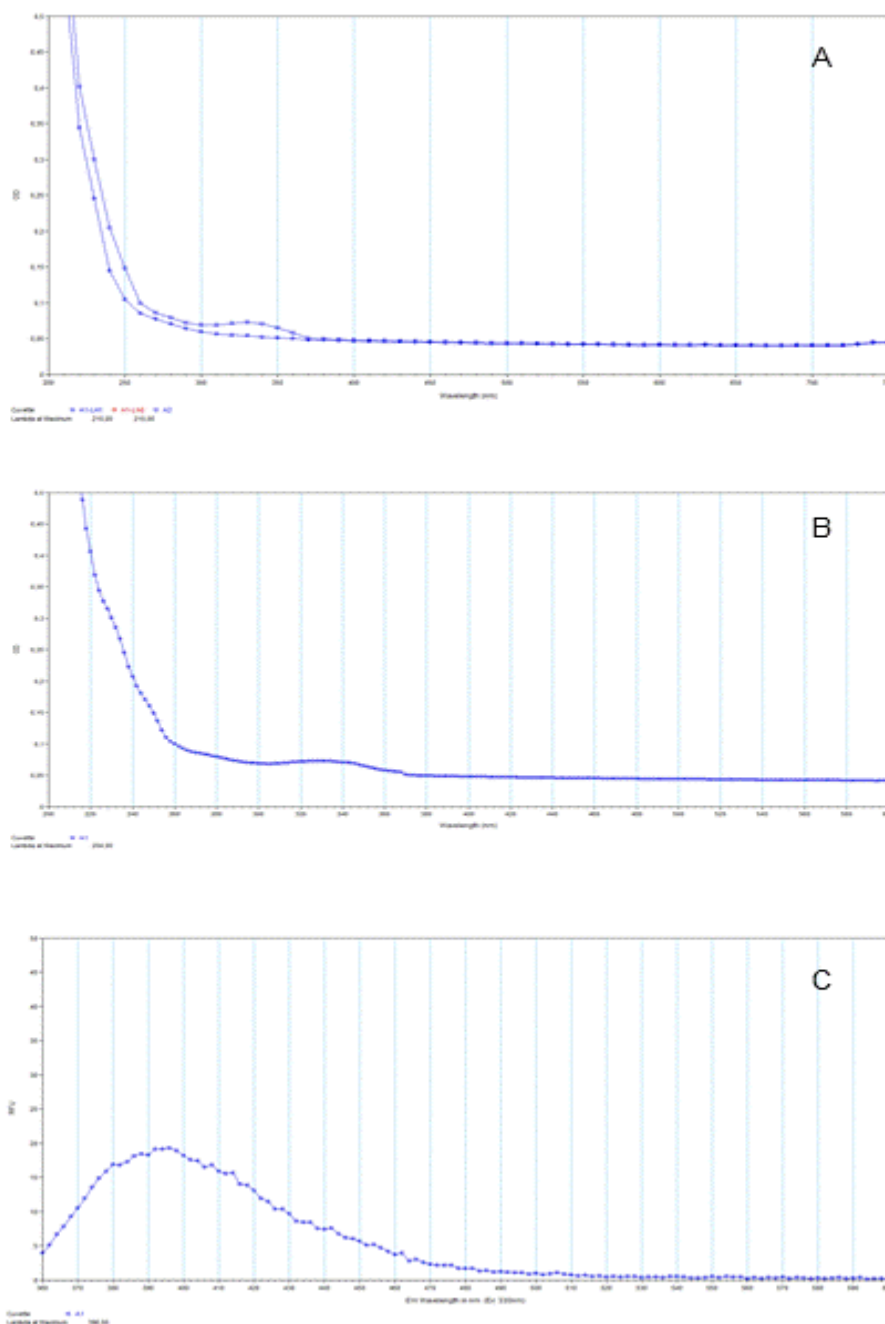


Figura 4.2 - Espectro de absorção e de fluorescência da fração 8.

(A) A fração 8 foi diluída em metanol e um espectro de absorção foi obtido variando-se o comprimento de onda (200 – 750 nm). Ao compararmos a fração 8 (quadrados) com o controle (apenas metanol) (esferas), podemos ver um aumento na absorbância entre os comprimentos de onda 230 e 360 nm. (B-C) No espectro de fluorescência, a mesma amostra diluída em metanol foi capaz de emitir uma fluorescência entre 370 e 430 nm, ocorrendo à emissão máxima de fluorescência no comprimento de onda de 395 nm.

ANEXO H. -m/z das moléculas presentes na fração 11.1 – 5 e 11.9.

Tabela 4 - m/z das moléculas presentes na fração 11.1 – 5 e 11.9.

Fração 11.1-5 e 11.9			Fração 11.1-5 e 11.9		
m/z	Intensidade relativa	carga [m + H]	m/z	Intensidade relativa	carga [m + H]
211,1873	51,48	1	375,23	15,36	1
246,237	4,93	1	378,29	8,79	1
251,2424	19,47	1	378,34	8,51	1
253,2081	49,67	1	384,25	13,99	2
259,702	20,81	2	386,27	9,85	1
260,204	8,06	2	393,19	8,94	1
279,2478	8,48	1	400,29	9,82	1
281,6977	10,06	2	403,27	4,08	1
293,2622	71,49	1	412,28	9,51	1
297,2458	8,87	1	416,24	6,29	1
305,2695	4,31	1	416,3	7,86	1
323,2006	14,23	1	421,37	41,14	1
325,2208	5,61	1	431,29	48,43	1
336,2794	100	1	448,35	8,44	1
337,307	11,23	1	448,41	10,32	1
340,2267	6,09	1	449,4	4,54	1
345,1806	6,96	1	460,31	12,11	1
347,1966	7,4	1	461,3	34,8	1
353,3457	20,03	1	463,36	13,13	1
355,2248	5,96	1	463,43	15,55	1
362,3224	13,75	1	475,27	4,6	1
367,2275	9,56	1	475,34	7,97	1
368,2543	14,44	1	505,32	31,08	1
370,2736	7,77	1	506,28	4,06	1
372,2533	11,24	1			

A intensidade relativa refere-se à porcentagem da intensidade do íon em relação a intensidade absoluta do pico base: pico base: m/z 336,279; intensidade absoluta: 982.241.

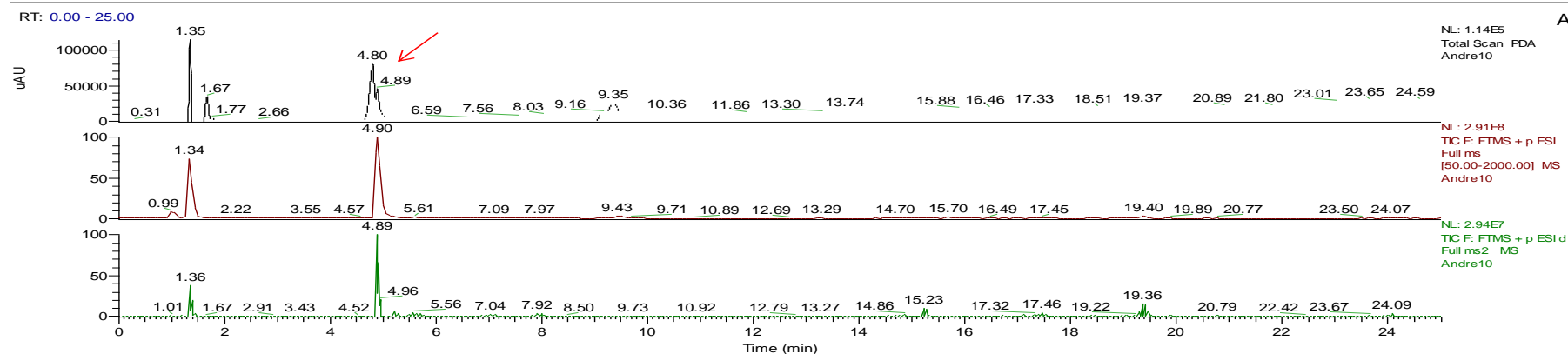
A lista foi elaborada com m/z superiores a 4% da intensidade absoluta do pico base.

ANEXO I.1 – Espectrometria de massas das frações 11.6 - 8

Z:\00_KONNO\...\Andre10

09/08/2013 03:28:29

2013B07



Andre10 #200-213 RT: 4.87-5.00 AV: 4 NL: 5.48E7
F: FTMS + p ESI Full ms [50.00-2000.00]

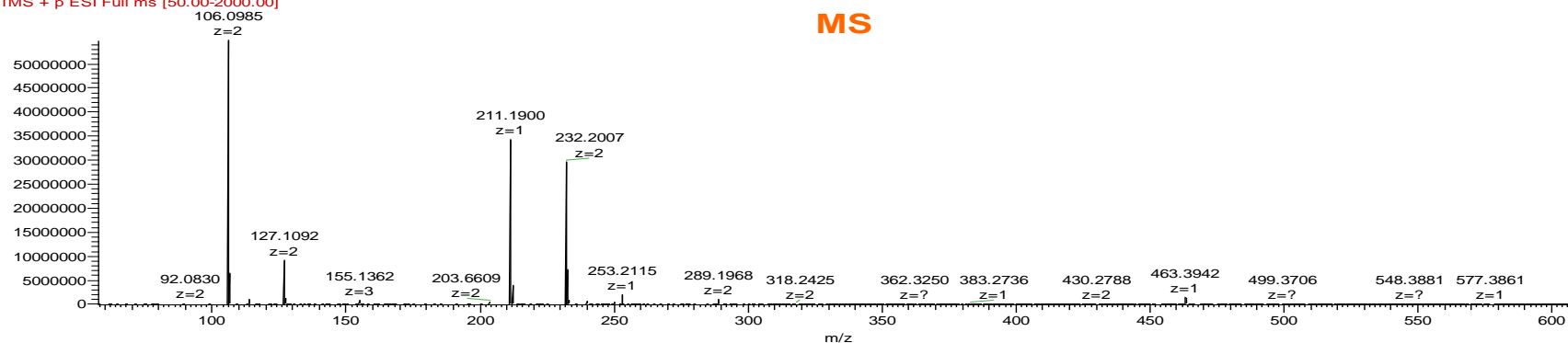


Figura 5.1 – LC-MS da fração 11.6 - 8

A amostra foi analisada através da cromatografia líquida em fase reversa acoplada a um espectrômetro de massas LTQ Orbitrap, em uma coluna C18, no modo positivo, utilizando as condições de trabalho padronizadas no laboratório do colaborador. (A) A seta em vermelho indica o tempo de retenção da amostra analisada. (B) Fragmentação dos íons presentes na fração 11.6 – 8. Podemos notar a presença de alguns íons como m/z 577,38, m/z 463,39, m/z 211,19 e outros íons que possuem carga +2 (m/z 289,19; m/z 232,20), os quais encontram-se presentes nas nossas análises de espectrometria.

ANEXO I.2 – MS/MS das frações 11.6 - 8

Z:\00_KONNO\...\Andre10

09/08/2013 03:28:29

2013B07

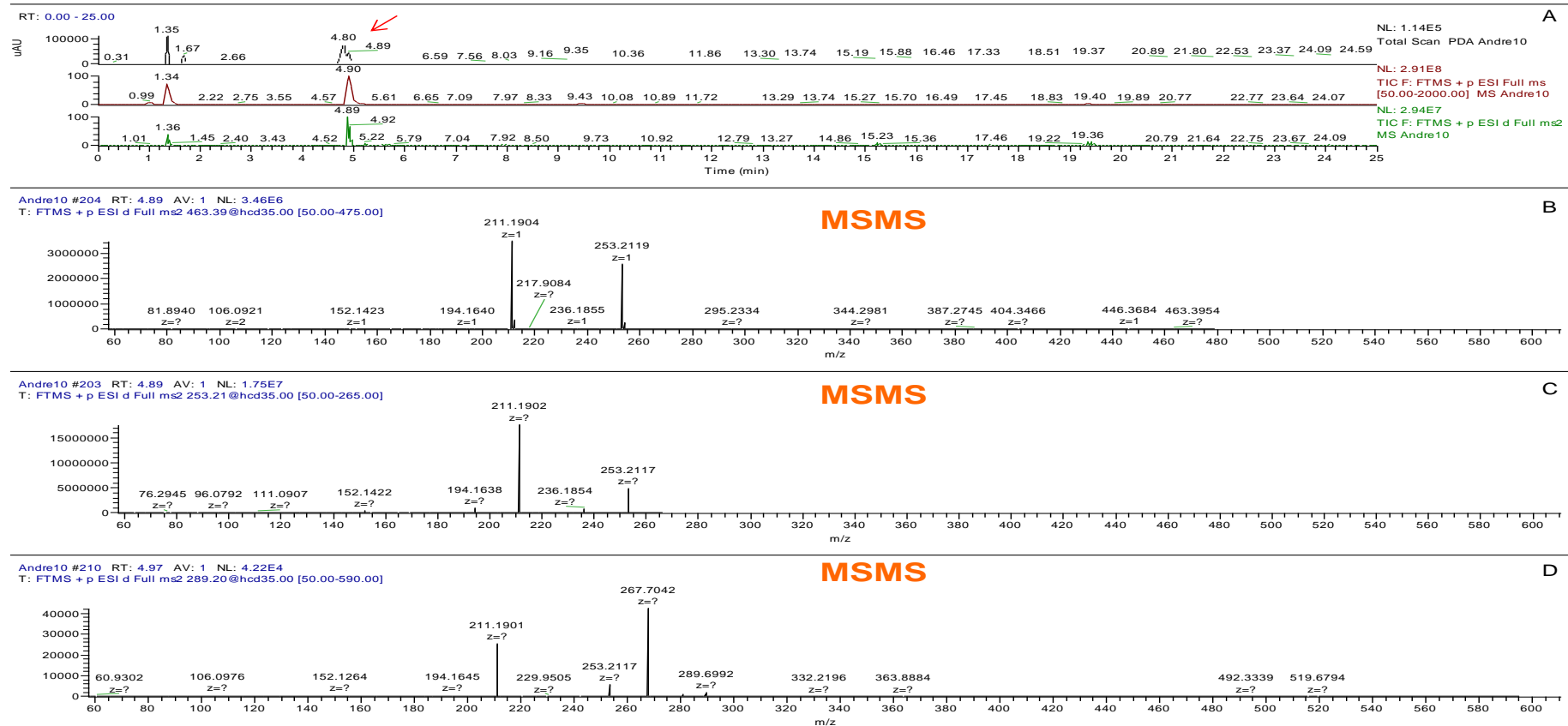


Figura 5.2 – MS/MS de alguns íons presentes na fração 11.6 – 8.

A amostra foi analisada através da cromatografia líquida em fase reversa acoplada a um espectrômetro de massas LTQ Orbitrap, em uma coluna C18, no modo positivo, utilizando as condições de trabalho padronizadas no laboratório do colaborador. (A) A seta em vermelho indica o tempo de retenção da amostra analisada. (B) O íon m/z 463,39 foi selecionado e fragmentado, gerando os íons m/z 253,21, m/z 211,19. (C) Fragmentação do íon m/z 253,21, o qual gerou os fragmentos m/z 211,19. (D) Fragmentação do íon +2 m/z 289,20, produzindo os íons m/z 267,70, m/z 253,21 e m/z 211,19. Estes resultados corroboram com os dados obtidos nas nossas análises de espectrometria de massas.

ANEXO J – Correlação entre a evolução da família Pipidae e a deriva continental.

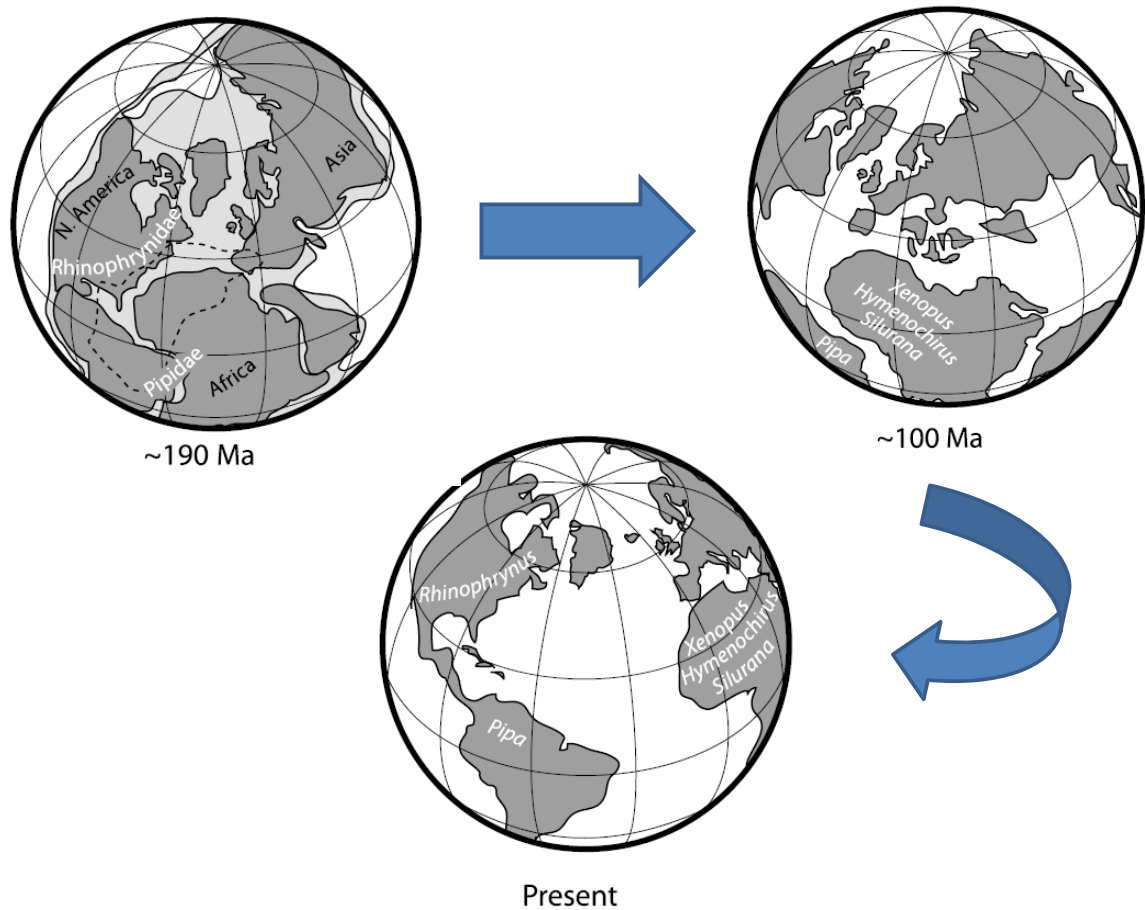


Figura 6 - Hipótese para explicar a cladogênese dos pipídios.

Talvez o aumento na divergência entre os pipídios possa ter ocorrido em função da deriva continental. Primeiramente, uma possível divergência entre a família Pipidae e o seu clado irmão Rhinophrynidae teria aumentado a aproximadamente 190 milhões de anos atrás, devido a abertura do oceano Atlântico ao norte da linha do equador. Então, há cerca de 100 milhões de anos atrás talvez tenha ocorrido o aumento na divergência entre o gênero *Pipa* em relação aos outros pipídios. Isto teria ocorrido em função da separação da América do Sul antes ligado ao continente Africano. Fonte: Bewich et al., 2012.

ANEXO K – Comparação cromatográfica entre as secreções cutâneas dos anuros da família Pipidae.

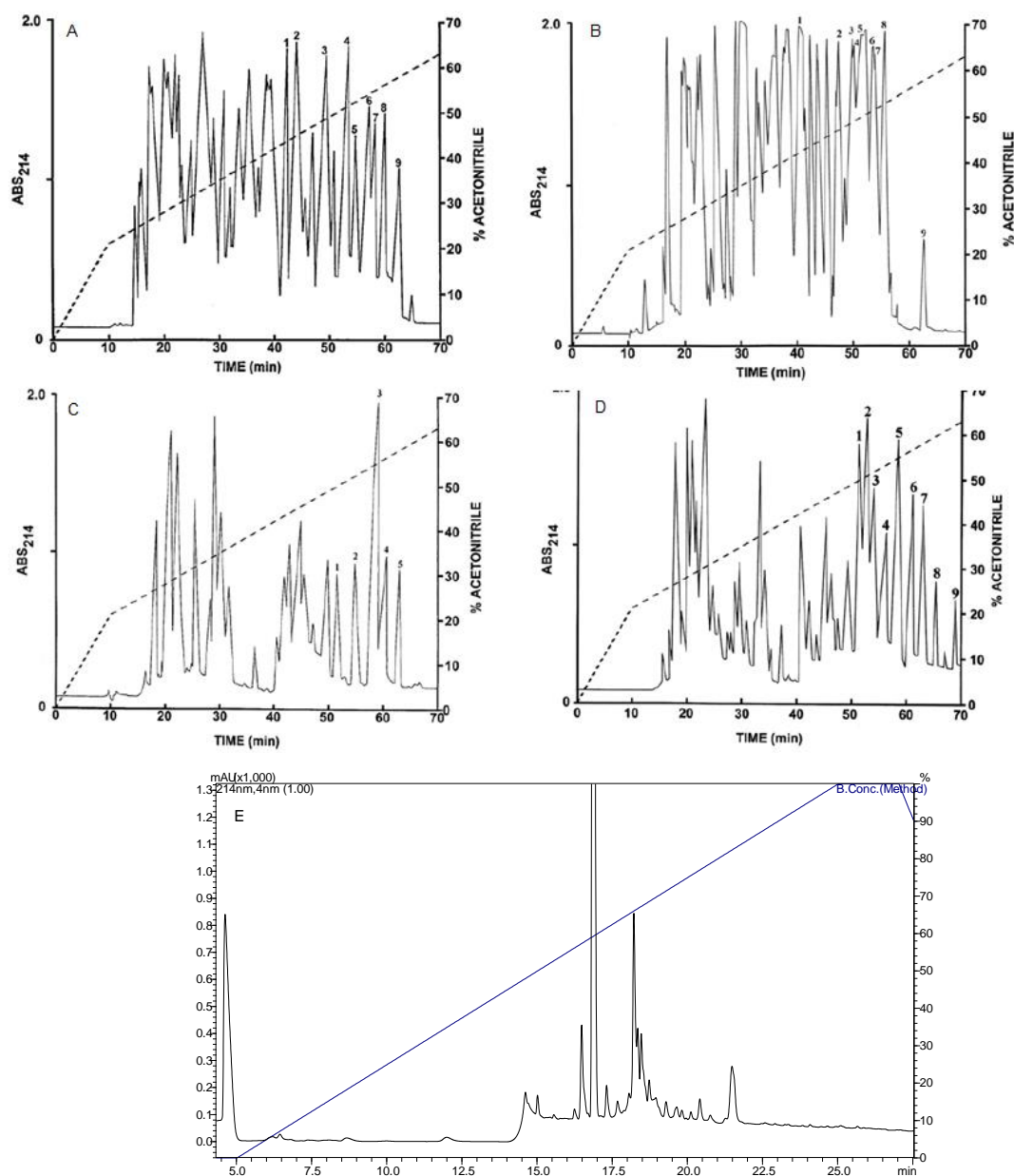


Figura 7 – Comparação cromatográfica entre as secreções cutâneas da família Pipidae. (A – D) As secreções foram inicialmente pré-purificadas em cartuchos Sep-Pak (C-18), sendo eluídas em ACN/água/TFA (70 / 29,9 / 0,1; v/v/v). Em seguida, as mesmas foram ressuspensas em 0,1% (v/v) TFA/água e analisadas em RP-HPLC utilizando uma coluna preparativa C18 (2,2cm x 25 cm) (Vydac 218TP1022), equilibrada com 0,1% (v/v) TFA/água, em um fluxo constante de 6 mL/min. A concentração do solvente B aumentou de 0 – 21%, em 10 min. A partir de 10 min, o solvente B variou de 21 – 63% durante 60 min. A absorbância foi monitorada a 214 nm. Os números indicam os picos que contém peptídeos que possuem ou não uma ação antimicrobiana. (A) *Xenopus amieti*. Fonte: Conlon et al., 2010; (B) *Silurana epítropicalis*. Fonte: Conlon et al., 2012; (C) *Hymenochirus boettgeri*. Fonte: Mechkarska et al., 2012; (D) *Pseudhymenochirus merlini*. Fonte: Conlon et al., 2013. (E) Perfil cromatográfico obtido da secreção cutânea de *P. carvalhoi*. O material foi analisado em RP – HPLC, utilizando uma coluna C18 (250 x 4,6 mm), com um fluxo constante de 1 mL/min e variando a concentração de B entre 0 – 100, durante 20 min.

ANEXO L – Certificado



FICHA CATALOGRÁFICA

Mariano, Douglas Oscar Ceolin
Análise do conteúdo da secreção cutânea do anuro *Pipa carvalhoi* a procura de possíveis moléculas com atividades biológicas relevantes / Douglas Oscar Ceolin Mariano; orientador Daniel Carvalho Pimenta – São Paulo, 2014.

102 folhas. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Toxinologia, Instituto Butantan, 2014.

1. Venenos. 2. Atividades Biológicas. 3. Anura 4. Pipidae. 5. *Xenopus laevis*. I. Orientador: Pimenta, Daniel Carvalho. II. Programa de Pós-Graduação em Toxinologia. Instituto Butantan. III. Título.

CDD 615.9