

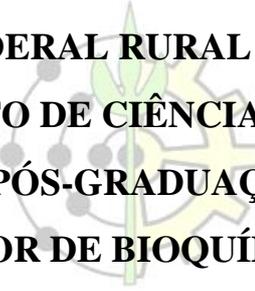
UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
SETOR DE BIOQUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Estudo Preliminar da Secreção Cutânea em *Aparasphenodon* Miranda-Ribeiro, 1920 (Anura, Lophyohylinae): Composição Bioquímica e Potencial Tóxico

Francine França Monken

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
SETOR DE BIOQUÍMICA

ESTUDO PRELIMINAR DA SECREÇÃO CUTÂNEA EM
APARASPHEMIRANDA-MIRANDA-RIBEIRO, 1920 (ANURA,
LOPHYOHYLINAE): COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E POTENCIAL
TÓXICO

FRANCINE FRANÇA MONKEN

Sob orientação do professor

Douglas Siqueira de Almeida Chaves

e Co-orientação do professor

Cristiano Jorge Riger

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Bioquímica

Seropédica - RJ

Setembro de 2016

540

M745e Monken, Francine França, 1989-

T Estudo preliminar da secreção cutânea em *Aparasphenodon* Miranda-Ribeiro, 1920 (Anura, Lophyohylinae): composição bioquímica e potencial tóxico / Francine França Monken - 2016.

74 f.: il.

Orientador: Douglas Siqueira de Almeida Chaves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Química.

Bibliografia: f. 47-58.

1. Química - Teses. 2. Bioquímica - Teses. 3. Toxinas - Teses. 4. Anfíbio - Teses. 5. Compostos bioativos - Teses. 6. Proteínas - Teses. I. Chaves, Douglas Siqueira de Almeida, 1981-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Química. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FRANCINE FRANÇA MONKEN

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências,
no Curso de Pós-Graduação em Química, área de Concentração em Química Biológica.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 30/09/2016.



Douglas Siqueira de Almeida Chaves. Dr. UFRRJ.
(orientador)



Cristiane Martins Cardoso de Salles. Dra. UFRRJ.



Daniela Barros de Oliveira. Dra. UENF.

RESUMO

MONKEN, Francine França. **Estudo preliminar da secreção cutânea em *Aparasphenodon* (Lophiohylinae, Anura): composição bioquímica e potencial tóxico.** Dissertação (Mestrado em Química, Bioquímica). Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

O presente estudo buscou determinar a composição química das secreções brutas expelidas por duas espécies de *Aparasphenodon*, a partir do isolamento, purificação e identificação estrutural destes compostos. Para tal, indivíduos de *A. brunoi* (n=5) e *A. arapapa* (n=3) foram coletados na Ilha da Marambaia, Mangaratiba (RJ) e no município de Ilhéus (BA), respectivamente. As secreções foram obtidas por estímulo elétrico suave e mostraram-se translúcidas e pouco viscosas, com rendimento aproximado de 4 mg de amostra/indivíduo. Para cada espécie, foi realizada cromatografia em camada delgada; o reagente revelador ninidrina indicou presença de grupos amínicos após aparecimento da cor violeta. As amostras foram então submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência analítica, sendo detectados dois picos majoritários com mesmo tempo de retenção (0,88 e 1,44 min) em ambas as análises, indicando assim a presença de compostos semelhantes nas duas espécies. Da mesma forma, a purificação das amostras realizada por cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa apresentou o mesmo número de frações para ambas as espécies. A determinação estrutural foi determinada por LC-MS/MS apenas para *A. brunoi* e revelou alta incidência de colágeno e outras proteínas não caracterizadas. Os ensaios biológicos foram realizados nas concentrações de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para ambas as espécies. O ensaio de viabilidade celular não apresentou redução da sobrevivência das leveduras, assim como a dosagem de peroxidação lipídica não mostrou reação com malonaldeído, em todos os casos testados. Por outro lado, o ensaio de dano mitocondrial revelou toxicidade na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, reduzindo de forma discreta a viabilidade celular, em ambas as amostras. Concluímos então que as duas espécies possuem proteínas como seu principal componente e, a nível celular, não são nocivas em 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, mas podem promover danos quando em 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Além disso, como os perfis revelados para ambos os extratos, tanto nos ensaios químicos como nos biológicos, foram muito próximos, a existência de um padrão na composição química das secreções cutâneas em anfíbios de um mesmo gênero pode ser reforçada, ainda que as espécies se encontrem em condições ambientais distintas.

Palavras-chave: *Aparasphenodon*, secreção cutânea, proteínas e atividade biológica.

ABSTRACT

MONKEN, Francine França. **Preliminary study of skin secretion in *Aparasphenodon* (Lophiohylinae, Anura): biochemical composition and toxic potential.** Dissertação (Mestrado em Química, Bioquímica). Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

This study aimed to determine the chemical composition of raw secretions expelled by two species of *Aparasphenodon* genus from compounds isolation, purification and structural identification. For this, individuals of *A. brunoi* (n=5) e *A. arapapa* (n=3) were collected in Ilha da Marambaia, municipality of Mangaratiba (RJ), and in municipality of Ilhéus (BA), respectively. The secretions were obtained by smooth electric stimulus and were translucent and little viscous, with approximated yield of 4 mg of sample/individual. For each species, was realized chromatography of thin layer, the revelator reagent ninhydrin indicated presence of amine groups after violet color appearing. Samples that were submitted with the same retention time (0.88 and 1.44 min) in both analysis, indicating presence of similar compounds in both species. In same way, samples purification realized by semi preparative liquid chromatography of high efficiency presented the same fractions number for both species. The structural determination was made by LC-MS/MS only for *A. brunoi* and revealed high collagen incidence and other uncharacterized proteins. Biological assays were realized in concentrations of $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for both species. The assay of cellular viability did not present survival reduction of yeast, such as dosing of lipid peroxidation that did not show reaction with malonaldehyde in all tested cases. In other hand, the assay of mitochondrial damage revealed toxicity in concentration of $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, reducing for discrete form the cellular viability in both samples. We conclude that both species have proteins as the main compound and, in a cellular level, are not harmful in $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, but can promote damage in $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Besides that, as revealed profiles to both extracts, both chemical and biological assays were very close, the existence of a pattern in chemical composition of cutaneous secretions in amphibians of the same genus can be reinforced, even that species be in distinct environmental conditions.

Keywords: *Aparasphenodon*, skin secretion, proteins, biological activity.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
1. A classe Amphibia	1
2. O gênero <i>Aparasphenodon</i>	2
3. Mecanismos de defesa em Anura	4
4. Toxinas em anuros: um remédio chamado veneno	7
4.1. Vacina-do-sapo ou <i>Kambô</i>	8
4.2. <i>Chan su</i> ou <i>Venenum bufonis</i>	9
5. Composição bioquímica e toxicologia	10
5.1. Aminas biogênicas	12
5.2. Esteroides	13
5.3. Alcaloides	15
5.4. Peptídeos bioativos	16
5.4.1. Neuropeptídeos (NPs)	17
5.4.2. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)	17
6. Identificação estrutural dos derivados proteicos	19
II. OBJETIVOS	21
III. MATERIAIS E MÉTODOS	21
1. Obtenção e classificação das espécies	21
2. Obtenção das secreções cutâneas	22
3. Teste de solubilidade das secreções brutas	22
4. Prospecção química das secreções brutas	23
4.1. Investigação qualitativa das substâncias presentes nas secreções brutas	23
4.2. Isolamento das frações de substâncias presentes nas secreções	24
4.3. Purificação das frações isoladas	24
4.4. Identificação das estruturas proteicas nas frações isoladas	24
5. Análise in vivo e in vitro do potencial tóxico das secreções brutas	24
5.1. Pré e pós tratamentos	24
5.2. Viabilidade celular e dano mitocondrial	25
5.3. Peroxidação lipídica	26
IV. RESULTADOS	27
1. Obtenção das secreções cutâneas	27
2. Teste de solubilidade	28
3. Prospecção química das secreções brutas	28
3.1. Caracterização qualitativa da composição química dos extratos	28

3.2. Isolamento e purificação das substâncias presentes nas secreções	29
3.3. Identificação das estruturas proteicas nas frações isoladas	30
4. Análise in vivo e in vitro do potencial tóxico	31
4.1. Viabilidade celular	31
4.2. Dano mitocondrial	32
4.3. Peroxidação lipídica	32
V. DISCUSSÃO	33
1. Avaliação Química	33
2. Avaliação Biológica	38
CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Indicações, contraindicações e efeitos colaterais da vacina-do-sapo	9
Tabela 2: Principais aminas biogênicas isoladas de anfíbios	12
Tabela 3: Relação dos principais alcaloides isolados de anuros	16
Tabela 4: Principais grupos de NPs isolados de anfíbios	17
Tabela 5: Principais grupos de PAMs isolados de anfíbios	18
Tabela 6: Propriedades físico-químicas dos solventes testados	23
Tabela 7: Grupos químicos investigados por cromatografia em camada delgada	23
Tabela 8: Mistura reacional empregada no método TBARS	26
Tabela 9: Rendimento individual das secreções obtidas e relação com o CRC dos espécimes coletados.	27
Tabela 10: Relação dos grupos químicos usualmente encontrados nas secreções cutâneas de anfíbios detectados através de análise em CCDA	28
Tabela 11: Rendimento e tempo de retenção (T_R) das frações isoladas	30
Tabela 12: Relação do número de proteínas obtidas em cada fração de secreção isolada	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos de anfíbios	2
Figura 2: Espécies de <i>Aparasphenodon</i>	2
Figura 3: Comportamento fragmótico	3
Figura 4: Crânio de <i>A. brunoi</i> com espinhos ósseos	4
Figura 5: Mecanismos de defesa	5
Figura 6: Esquema do tegumento de anfíbio	6
Figura 7: Esquema da glândula de veneno	7
Figura 8: A vacina-do-sapo	8
Figura 9: O <i>Chan su</i>	9
Figura 10: Intoxicação por sapo-comum	10
Figura 11: Distribuição das classes químicas entre as diferentes famílias de anuros	11
Figura 12: Transmissão Sináptica Lenta ou Indireta	13
Figura 13: Estrutura química do ciclopentanofenantreno.	14
Figura 14: Estruturas químicas dos esteroides cardiotônicos	14
Figura 15: Mecanismos de ação dos PAMs	18
Figura 16: Proposta do mecanismo de ação dos PAMs atuando como citolisinas	19
Figura 17: Aplicação de estímulo elétrico	22
Figura 18: Secreção cutânea obtida logo após estímulo elétrico em meio aquoso	28
Figura 19: Cromatogramas das amostras (a) <i>A. arapapa</i> e (b) <i>A. brunoi</i>	29
Figura 20: Porcentagem de incidência de alguns grupos de proteínas específicos	31
Figura 21: Medida da viabilidade celular	31
Figura 22: Medida do dano mitocondrial	32
Figura 23: Dosagem da peroxidação lipídica	33
Figura 24: Reação de Liebermann-Burchard na detecção de esteroides	34
Figura 25: Reação da vanilina sulfúrica na detecção de esteroides	35
Figura 26: Reação da ninidrina na detecção de compostos amínicos	36
Figura 27: Formação de base de Schiff	37
Figura 28: Cascata MAPK induzida pela alta concentração citosólica de Ca^{+2} livre	40
Figura 29: Intoxicação da mitocôndria pelo aumento da concentração de Ca^{+2}	41
Figura 30: Curva de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i>	42
Figura 31: Esquema de estresse oxidativo provocado pela formação de EROs	44

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I: Lista das proteínas identificadas por LC-MS/MS

I. INTRODUÇÃO

1. A classe Amphibia

Anfíbios são vertebrados tetrápodes não amnióticos e ectotérmicos que compartilham vários caracteres derivados de um ancestral comum como, por exemplo, pele altamente permeável, dependência de respiração cutânea, dentes pedicelados, bem como várias outras características (VITT & CALDWELL, 2014; DUELLMAN & TRUEB, 1994). Seu nome deriva do grego e significa 'ambas vidas' ou 'vida dupla' (*amphi* = ambos/duplo e *bios* = vida), caracterizados pela alternância entre os ambientes terrestre e aquático ao longo de seu desenvolvimento (DUELLMAN & TRUEB, 1994). Esta variação pode ocorrer de duas formas: algumas espécies passam somente a fase larval em ambiente aquático e quando na fase adulta mudam definitivamente para o ambiente terrestre; enquanto outras passam toda a vida dependentes dos corpos d'água, vivendo em pequenas poças ou pântanos (DUELLMAN & TRUEB, 1994; POUGH et al., 2008).

Os anfíbios ancestrais se desenvolveram no final do período Devoniano (360 milhões de anos) a partir dos peixes Sarcopterygii que possuíam barbatanas multi-articuladas e pulmões primitivos (DUELLMAN & TRUEB, 1994). No período equivalente ao final do Carbonífero e início do Triássico (286-250 milhões de anos) um evento de extinção em massa dizimou muitas linhagens de anfíbios. Neste mesmo período, os répteis sofreram intensa radiação e se tornaram os maiores predadores da época, fato que reduziu ainda mais a diversidade de anfíbios existentes (POUGH et al., 2008). Os grupos que sobreviveram passaram por uma extensiva radiação adaptativa ao longo dos milhares de anos, desenvolvendo uma série de atributos morfológicos, fisiológicos, comportamentais e ecológicos, que moldaram seus diversos estilos de vida atuais (DODD, 2010).

A classe Amphibia moderna, também conhecida como Lissamphibia, foi descrita por Linnaeus (1758) e, até o momento, conta com mais de 7500 espécies, dispostas em três ordens (**Figura 1**) (POUGH et al., 2008; FROST, 2016). A ordem Gymnophiona contém as chamadas cecílias ou 'cobras-cegas' e é a menos diversa, contando com pouco mais de 200 espécies encontradas nas regiões tropicais. A ordem Caudata é constituída de salamandras e tritões, possui cerca de 700 espécies e é encontrada quase que somente nas zonas temperadas da América do Norte e Eurásia. A ordem Anura compreende os sapos e contém mais de 6600 espécies, agrupadas em 56 famílias, que podem ser encontradas em todos os continentes, com exceção da Antártida devido ao clima extremamente frio e seco (VITT & CALDWELL, 2014; FROST, 2016).



Figura 1: Exemplos de anfíbios: (A) Gymnophiona, *Siphonops annulatus* (Foto: Santiago R. Ron); (B) Caudata, *Neurergus kaiseri* (Foto: Twan Leenders); (C) Anura, *Anaxyrus americanus* (Foto: Simon P. Barrette).

2. O gênero *Aparasphenodon*

O gênero *Aparasphenodon* pertence à subfamília Lophyohylinae (Anura, Hylidae), que reúne 75 espécies das conhecidas ‘pererecas-de-capacete’ (do inglês: *casque-headed treefrogs*), assim denominadas devido a presença de crânio co-ossificado (DUELLMAN et al., 2016). Foi descrito por Alípio Miranda-Ribeiro (1920), a partir do primeiro exemplar de *Aparasphenodon brunoi* encontrado no Rio de Janeiro. Desde então, outras quatro espécies foram descritas, *A. venezolanus* (MERTENS, 1950), *A. bokermanni* (POMBAL, 1993), *A. arapapa* (PIMENTA et al., 2009) e *A. pomba* (ASSIS et al., 2013).

Todas as espécies de *Aparasphenodon* são encontradas na Mata Atlântica; com exceção de *A. venezolanus*, endêmica da Floresta Amazônica (Brasil, Colômbia e Venezuela) (MERTENS, 1950; NECKEL-OLIVEIRA & GORDO, 2004). *A. brunoi* e *A. arapapa* (**Figura 2**) são frequentemente localizadas em áreas de restinga que, por ser uma região muito próxima ao ambiente marinho, expõe os animais que ali vivem a intensa luminosidade, salinidade e temperaturas elevadas. Sendo assim, estas espécies normalmente são encontradas no interior do tanque das bromélias ou em suas axilas, pequenos reservatórios de água que servem como refúgio contra o ambiente hostil (VILELA et al., 2011; LANTYER-SILVA et al., 2014).



Figura 2: Espécies de *Aparasphenodon* (A) *A. arapapa* (Foto: Amanda Lantyer-Silva) e (B) *A. brunoi* (Foto: Iuri R. Dias).

Associado ao hábito bromelícola pode ser observado o comportamento fragmótico, no qual o corpo é acomodado no tanque das bromélias e juntos, crânio e maxilar, funcionam como uma 'tampa' (**Figura 3**) (NAVAS et al., 2002; MOLLO-NETO & TEIXEIRA JR., 2012). Espécies do gênero *Aparasphenodon* possuem características que contribuem para a eficácia desse comportamento, como o maxilar mais largo e focinho estreito, além do crânio co-ossificado. Este último consiste numa estrutura extremamente rígida formada pelo preenchimento da região entre o crânio e a porção inferior da derme com tecido ósseo (TRUEB, 1970; JARED et al., 1999; GRUBER et al., 2012).



Figura 3: Comportamento fragmótico (*A. brunoi*) (Fotos: Leonardo Merçon).

A fragmose é fundamental na retenção de água, reduzindo em mais de 90% sua evaporação pela transpiração e, com isso, as bromélias passam também a servir como local de reprodução, deposição de ovos e desenvolvimento dos girinos (ANDRADE & ABE, 1997; BERTOLUCI, 2007). Este comportamento pode atuar ainda como um mecanismo de defesa na proteção contra o ataque de predadores, isto porque, além de já estarem resguardados, sua visualização é dificultada pela coloração críptica presente no topo da cabeça (única região visível), que simula uma folha seca, confundindo o possível predador (JARED et al., 2005).

Além da fragmose, espécies de *Aparasphenodon* possuem como mecanismo de defesa a liberação de toxinas através de glândulas de veneno localizadas na cabeça e ao longo do dorso (TOLEDO & JARED, 1995). A toxina destes animais é conhecida por provocar dor intensa e expressiva irritação quando em contato com as mucosas ocular e nasal. No primeiro caso, inicialmente é provocada ardência e lacrimejamento que, em poucos minutos, pode evoluir para cegueira temporária (aproximadamente 3h). No segundo caso, o processo se inicia como uma coceira seguida de incessantes espirros, podendo culminar numa hemorragia nasal (LYNCH & RAMÍREZ, 2000).

Recentemente, JARED et al. (2015) verificaram uma significativa concentração das glândulas de veneno associadas a espinhos ósseos localizados na cabeça de indivíduos de *A. brunoi* (**Figura 4**). Esta característica, associada a uma habilidade incomum de movimentar a cabeça lateral e verticalmente, facilita o contato dos espinhos com o predador e permite a inoculação de sua toxina, o que faz destes animais os primeiros exemplares de anuros peçonhentos (JARED et al., 2015). No entanto, a composição química presente no veneno das espécies de *Aparasphenodon* permanece desconhecida.

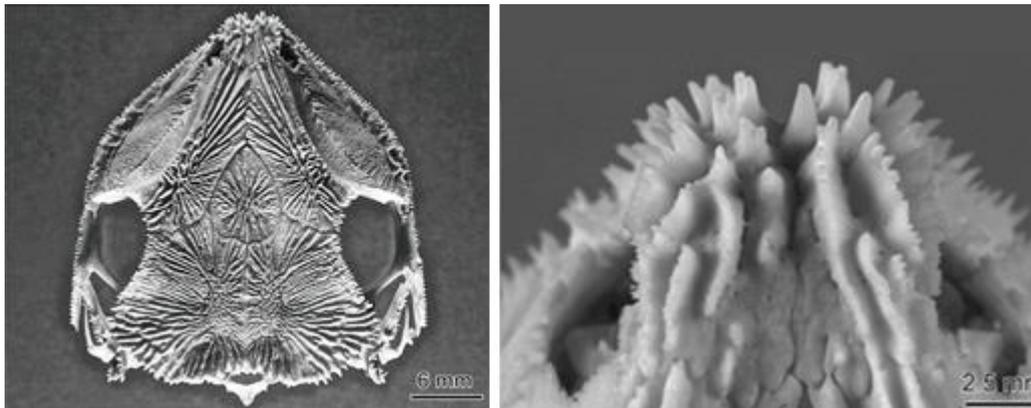


Figura 4: Crânio de *A. brunoi* com espinhos ósseos (JARED et al., 2015).

3. Mecanismos de defesa em Anura

A origem dos diversos mecanismos de defesa nos anfíbios anuros é pouco conhecida, principalmente em virtude da vasta distribuição geográfica de suas espécies e consequente exposição a diferentes pressões seletivas proveniente da variação dos seus nichos ecológicos (CLARKE, 1997; TOLEDO et al., 2011). Visto isso, inúmeras estratégias de defesa foram estabelecidas, atuando muitas vezes de forma concomitante, o que pode aumentar consideravelmente a probabilidade de sobrevivência. Tais mecanismos podem ser divididos em dois tipos: aqueles que não dependem da presença do predador (primário), e.g. coloração críptica (camuflagem) ou aposemática (cores vivas); e aqueles que dependem da presença do predador (secundário), e.g. tanatose e defesa química com liberação de secreções através da pele (**Figura 5**) (TOLEDO et al. 2007; BERNARDE, 2012).

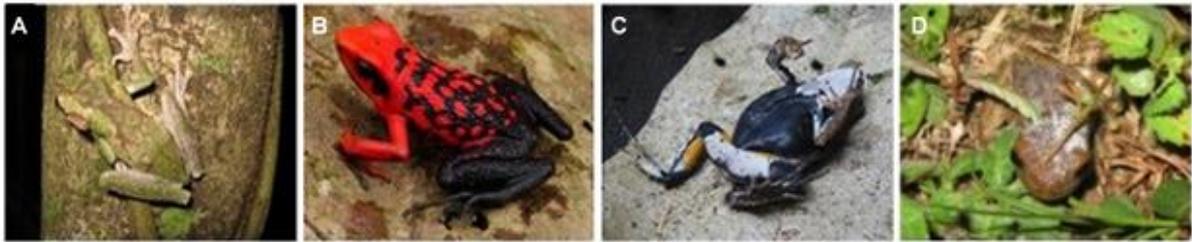


Figura 5: Mecanismos de defesa: (A) Coloração críptica *Osteocephalus buckleyi* (Hylidae); (B) Coloração aposemática *Ameerega silverstonei* (Dendrobatidae); (C) Tanatose *Edalorhina perezii* (Leptodactylidae); (D) Secreção cutânea *Trachycephalus typhonius* (Hylidae); (Fotos: herpetofauna.com.br).

As secreções cutâneas dos anuros os protegem de ataques predatórios, parasitários e microbianos; além disso, são peças chave em algumas relações ecológicas (BERNARDE & SANTOS, 2011). Estas secreções possuem propriedades variadas, podendo ser do tipo adesivas, que atuam ‘colando’ a boca do predador, como aquelas dos indivíduos do gênero *Notaden* (Anura, Limnodynastidae) (GRAHAM et al., 2006); odoríferas, que atuam espantando o potencial predador pelo mau cheiro exalado ou pela impalatabilidade, como *Ranoidea alboguttata* (Pelodryadidae) (SMITH et al., 2004); ou tóxicas, que atuam pelo envenenamento do predador, como as espécies da família Dendrobatidae (SUMMERS, 2003). Praticamente todos os anuros possuem secreção cutânea tóxica e os sintomas de envenenamento variam bastante com a espécie, podendo ir desde indução de vômito até a morte do predador. Tais secreções exigem alta eficiência toxicológica e, portanto, alto gasto energético, dessa forma são utilizadas somente como último recurso contra a predação, ou seja, quando nenhum outro método foi eficiente e o animal já se encontra a ponto de ser ingerido (DUELLMAN & TRUEB, 1994; DUTERTRE et al., 2014; ARBUCKLE, 2015; TOLEDO et al., 2011; LUTZ, 2013).

Assim como em todos os vertebrados, o tecido epitelial dos anuros é composto por epiderme seguida de derme e a separação entre as camadas é dada por uma lâmina basal constituída de fibras colágenas (**Figura 6**). Na porção superior da derme encontra-se o estrato esponjoso que inclui, entre outras estruturas, cromatócitos, glândulas mucosas, menores e mais numerosas, e granulares, maiores e menos numerosas. Os cromatócitos possuem a função de conferir cor da pele e são bastante numerosos, as glândulas mucosas produzem o muco, substância responsável pela manutenção da umidade da pele, pela característica escorregadia e também pela função antimicrobiana (DUELLMAN & TRUEB, 1994; POUGH et al., 2008).

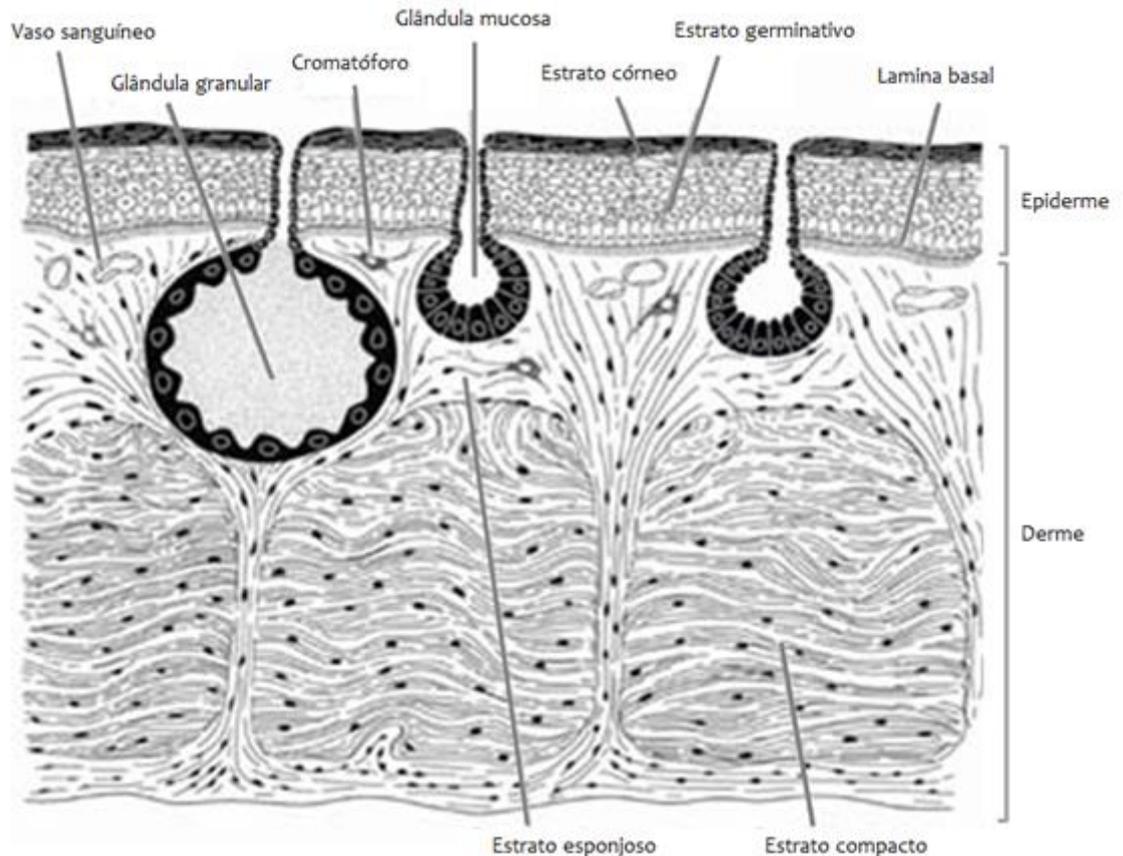


Figura 6: Esquema do tegumento de anfíbio (adaptado de DUELLMAN & TRUEB, 1994).

As glândulas granulosas, também chamadas glândulas de veneno, são responsáveis pela síntese das substâncias que compõem as toxinas. Estão localizadas imediatamente abaixo da epiderme e apresentam arquitetura alveolar, sendo constituídas de aglomerados celulares (sincícios) especializados na atividade de secreção (**Figura 7**). Tais sincícios são circundados por células mioepiteliais inervadas que auxiliam na expulsão das secreções quando em condições de estresse ou compressão mecânica. Nestas ocasiões, o exsudato passa por um ducto formado por queratinócitos modificados que liga o lúmen da glândula à superfície externa do tecido. A quantidade de glândulas venenosas e sua distribuição ao longo do corpo variam de acordo com a espécie (DUELLMAN & TRUEB, 1994; TOLEDO & JARED, 1995; SCHWARTZ et al., 2007).

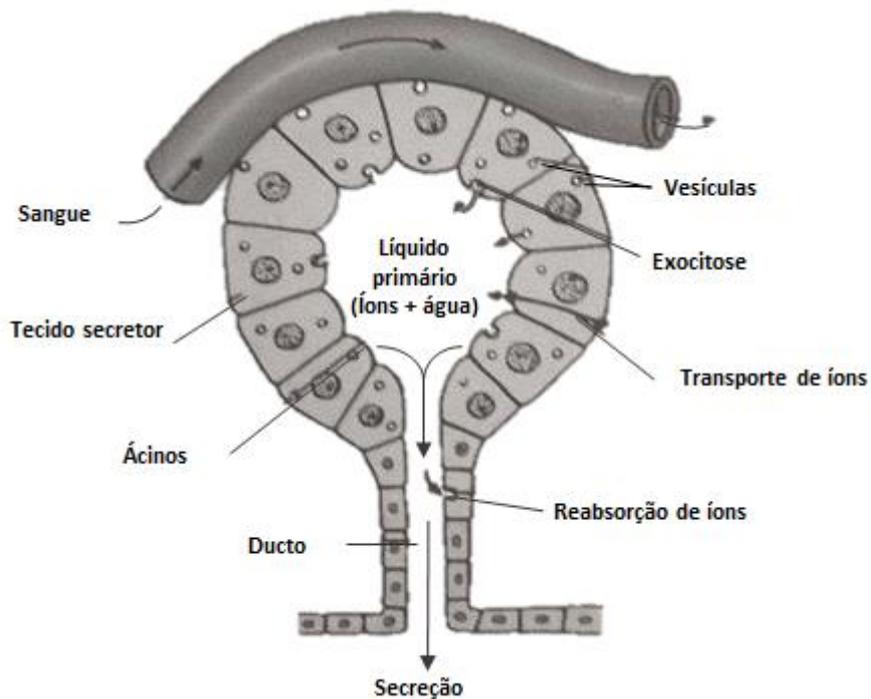


Figura 7: Esquema da glândula de veneno (adaptado de RANDALL et al., 2000).

4. Toxinas em anuros: um remédio chamado veneno

O uso de produtos naturais como paliativos ou curativos para uma variedade de doenças remete à antiguidade (ALVES & ROSA, 2014). A tradicional medicina chinesa há milhares de anos faz uso do *Ch'an su* ou *Venenum bufonis*, extraído de *Bufo sp.* (Bufonidae) para fins curativos (BICK et al., 2002; YUN et al., 2009). Na América do Sul, vários povos indígenas fazem uso da popular vacina-do-sapo ou *kambô*, extraída da espécie *Phyllomedusa bicolor* (Phyllomedusidae), com finalidade revigorante e estimulante (KARALLIEDDE, 1995; LIMA et al., 2010; BERNARDE & SANTOS, 2011).

No entanto, da mesma forma que as substâncias produzidas por plantas e animais são capazes de atuar em nosso organismo de forma benéfica, podem também causar efeitos não desejados (efeitos colaterais) ou tóxicos (KAWANO et al., 2006). Sendo assim, é preciso eliminar a ideia de que 'o que é natural não faz mal' pois, como já dizia o médico e filósofo Paracelsus no século XVI, "Todas as substâncias são venenos, não existe nada que não seja veneno. Somente a dose correta diferencia o veneno do remédio." (BORZELLECA, 2000).

4.1. Vacina-do-sapo ou *Kambô*

A vacina-do-sapo é utilizada pelos povos indígenas do grupo linguístico *Pano*, sobretudo pelos *Katukina*, *Kaxinawá*, *Mayoruna* e *Marubo*, habitantes do sudoeste amazônico, região de fronteira entre o Brasil e o Peru (DALY et al., 1992; DE LIMA & LABATE, 2007). É proveniente da secreção cutânea do anuro *Phyllomedusa bicolor* (Anura, Phyllomedusidae) e sua aplicação é feita através da deposição do veneno sobre pequenos pontos de queimaduras feitos no braço (homens) ou perna (mulheres) do indivíduo (**Figura 8**) (BERNARDE & SANTOS, 2011).

A finalidade da utilização do *Kambô* é medicinal e espiritual, variando entre as tribos. É comumente utilizado para afastar o *Panema*, termo indígena que define as energias obscuras, algo como a depressão; também é utilizado no '*hunting magic*' ('caçada mágica'), pois aumenta o vigor, a velocidade e a resistência dos índios, além de os deixar invisíveis à presa (DALY et al., 1992). Além disso, a vacina-do-sapo é utilizada no combate a várias outras enfermidades por índios, seringueiros, terapeutas holísticos, líderes Ayahuasca e médicos (**Tabela 1**) (BERNARDE & SANTOS, 2011).

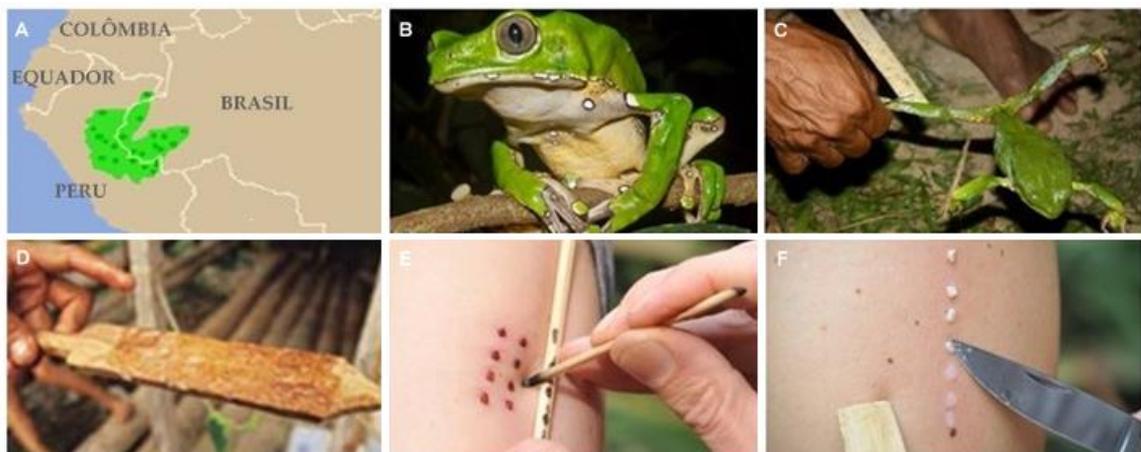


Figura 8: A vacina-do-sapo: (A) em verde, a distribuição dos povos Pano no sudoeste amazônico; (B) *Phyllomedusa bicolor* (Anura, Phyllomedusidae); (C) extração da secreção; (D) secreção coletada e seca; (E) produção dos pontos de queimadura com um pequeno pedaço de cipó-titica; (F) aplicação da secreção sobre os ferimentos (Fotos: institutoayahuasca.com.br).

No entanto, pode-se dizer que o ritual da vacina-do-sapo é um processo de envenenamento voluntário; isto porque, ao contrário dos benefícios que são verificados somente após o mínimo de três aplicações, os vários efeitos colaterais podem ser observados quase que instantaneamente (cerca de 30 s) e se repetem em todas as aplicações, sendo

mais intensos durante a primeira hora e cessando por completo no período de 24h (**Tabela 1**) (DALY et al., 1992; DEN BRAVE et al., 2014).

Tabela 1: Indicações, contraindicações e efeitos colaterais da vacina-do-sapo (LABATE & LIMA, 2014).

Indicações	Contraindicações	Efeitos colaterais
Panema	Grávidas e lactantes	Esquentamento do rosto
Malária e picada de cobra	Vítimas de AVC e aneurisma	Fraqueza e tontura
Anti-inflamatório	Cardíacos, hipotensos e hipertensos	Vômito, diarreia e sudorese
Antibacteriano	Epiléticos, detentores de transtornos cognitivos e grave condição mental	Aumento da frequência cardíaca
Analgésico	Ferimentos e cirurgia recentes	Inchaço dos lábios com aumento da pressão local, formigamento, desconforto e calor
Antitérmico	Quimioterapia e radioterapia	

4.2. Chan su ou *Venenum bufonis*

A Tradicional Medicina Chinesa possui mais de 1500 espécies animais registradas com algum uso medicinal (ALVES, 2012). Dentre as várias terapias destaca-se o *Chan su* (*Venenum bufonis*), que consiste num preparado (*toad cake*) obtido a partir da secreção branca proveniente das glândulas paratoides dos bufonídeos, principalmente de *Bufo gargarizans* e *Duttaphrynus melanostictus* (**Figura 9**) (HONG & YEUNG, 1992).

Devido às suas propriedades cardiotônicas, anestésicas e antibióticas, o *Chan su* representa um importante agente terapêutico, podendo ser prescrito no tratamento de edemas, amigdalite, sinusite e palpitação (HYUN et al., 2007). Porém, apesar do efeito terapêutico, a administração incorreta pode levar a séria intoxicação, provocando desde distúrbios gastrointestinais, arritmia cardíaca e convulsões; até o coma e morte (BICK et al., 2002; GOWDA et al., 2003).



Figura 9: O Chan su: (A) *Bufo gargarizans* (Bufonidae) (Foto: Frank Teigler); (B) secreção expelida por *Bufo sp.* (Bufonidae) (SONNE et al., 2008); (C) processado (*toad cake*) (Foto: diytrade.com).

Além das intoxicações por *Venenum bufonis*, espécies da família Bufonidae são conhecidas por provocarem acidentes domésticos. A **Figura 10A** mostra o caso envolvendo uma cadela que, após tentar ingerir um sapo comum, apresentou rigidez de membros, prostração e midríase (LOPES et al., 2014). Já na **Figura 10B**, uma pessoa teve a secreção do sapo comum projetada em seus olhos, provocando além de dor e ardência, edema conjuntivo e midríase (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2008). Apesar da agressividade e imediatismo dos sintomas, felizmente a maioria dos casos de intoxicação por acidente não são fatais, podendo ser revertidas com medicação (LOPES et al., 2014).

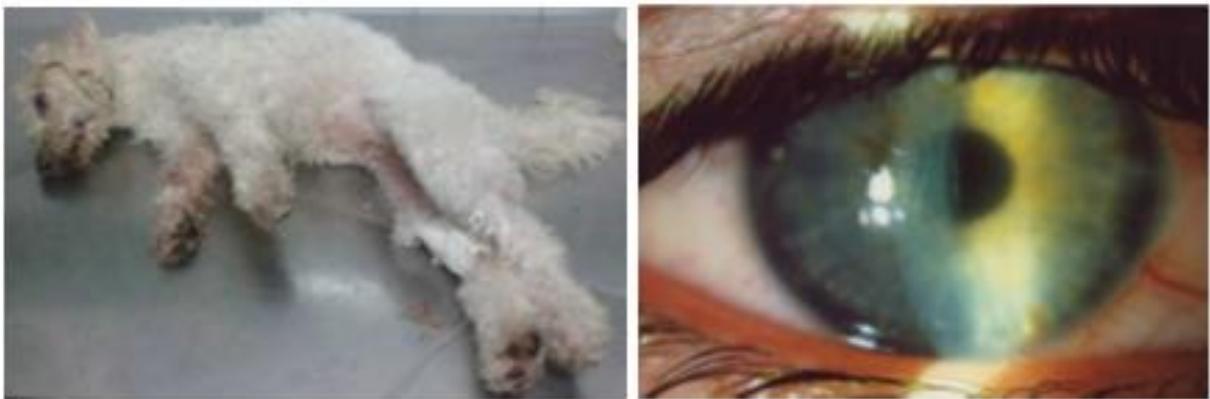


Figura 10: Intoxicação por sapo-comum: (A) Cadela com rigidez de membros e prostração após intoxicação (LOPES et al., 2014); (B) Edema córneo após 1h do contato com o veneno (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2008).

5. Composição bioquímica e toxicologia

A natureza das substâncias tóxicas presentes nas secreções de anuros ainda não é muito conhecida, isto porque muitas famílias permanecem sem investigação (DALY, 2004). No entanto, é possível inferir que graças à pressão seletiva que atuou sobre os anuros há milhares de anos, a composição química de suas toxinas tornou-se extremamente complexa (FRY et al., 2015). Os grupos de substâncias frequentemente encontradas nas diferentes famílias investigadas até o momento estão classificadas em quatro categorias: aminas biogênicas, alcaloides, esteroides e peptídeos/proteínas. Como pode ser visto na **Figura 11**, proteínas, peptídeos e aminas biogênicas são os grupos químicos mais distribuídos nas diferentes famílias de anuros, enquanto que os esteroides estão restritos a família Bufonidae e os alcaloides foram detectados somente nas famílias Myobatrachidae, Eleutherodactylidae, Dendrobatidae, Bufonidae e Mantellidae.

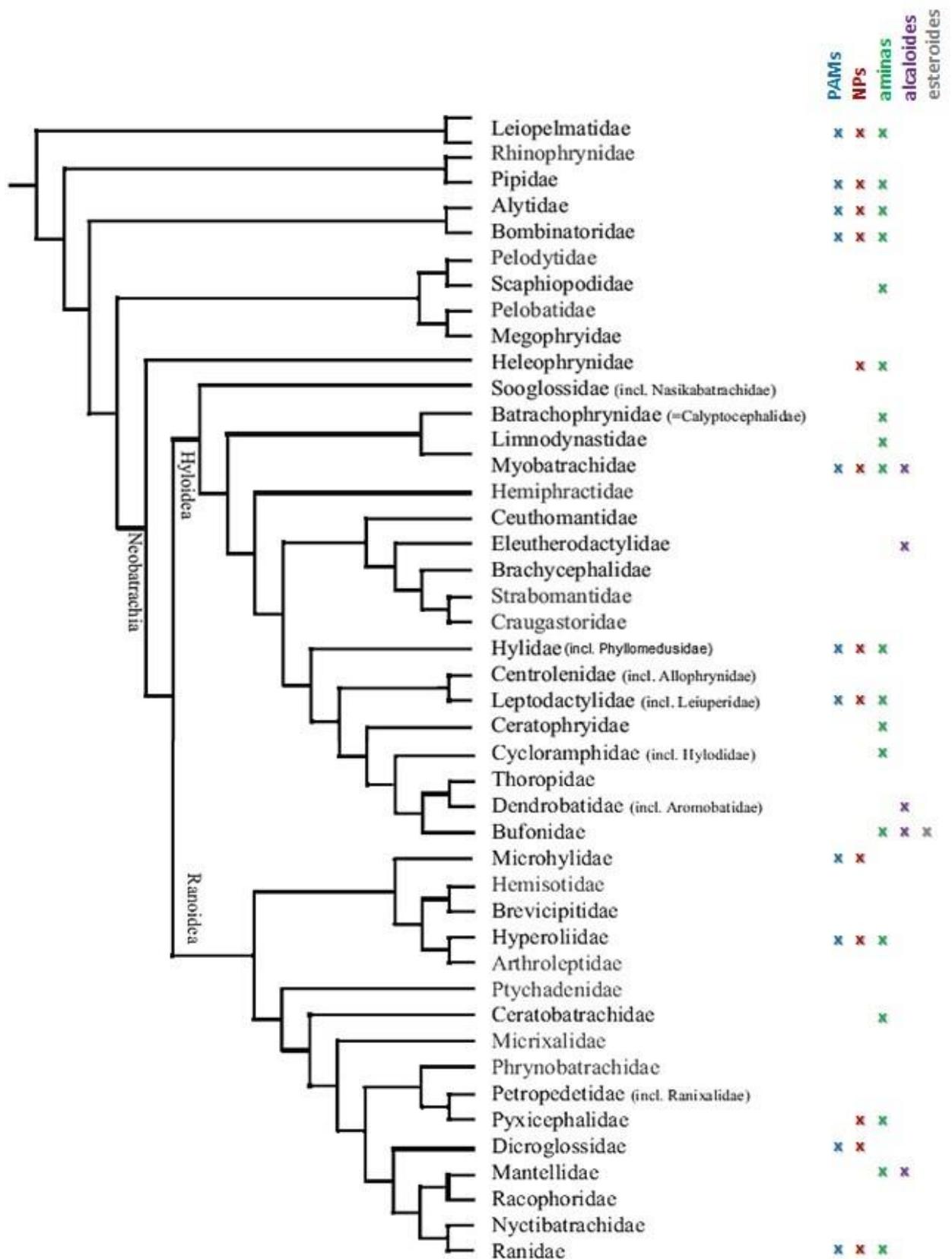
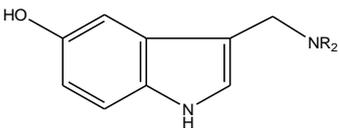
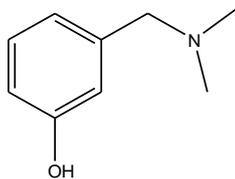
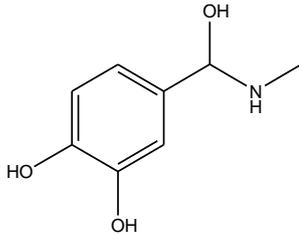
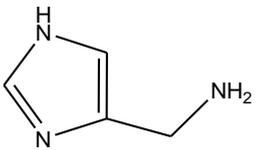


Figura 11: Distribuição das classes químicas entre as diferentes famílias de anuros. PAMs: peptídeos antimicrobianos (azul); NPs: neuropeptídeos (vermelho); aminas biogênicas (verde); alcaloides (roxo); esteroides (cinza); (adaptado de KÖNIG et al., 2015).

5.1. Aminas biogênicas

Aminas biogênicas são bases orgânicas formadas por uma monoamina e um radical aromático, sintetizadas endogenamente através da descarboxilação enzimática dos aminoácidos conjugados histidina, tirosina e triptofano (SCHWARTZ et al., 2007). Estão divididas em quatro grandes grupos de acordo com sua característica estrutural, consequência de seus precursores biossintéticos, são eles: indolalquilaminas, imidazolalquilaminas, monohidroxi-fenilalquilaminas e catecolaminas (**Tabela 2**) (SIMÕES et al., 2010).

Tabela 2: Principais aminas biogênicas isoladas de anfíbios (SCHWARTZ et al., 2007).

Aminoácido precursor	Grupos de aminas biogênicas	Estruturas químicas	Aminas biogênicas
Triptofano	Indolalquilaminas		Serotonina Bufotenina Bufotenidina
Tirosina	Monohidroxi-fenilalquilaminas		Leptodactilina
Tirosina	Catecolaminas		Epinefrina
Histidina	Imidazolalquilaminas		Histamina

Tomando como base sua função biológica estas moléculas são definidas como neurotransmissores do sistema nervoso central e autônomo dos vertebrados (SCHWARTZ et al., 2007). Atuam sobre receptores metabotrópicos (ligados à proteína G), modificando a condutância dos canais iônicos das células (abertura dos canais), através da ativação das

moléculas de sinalização presentes no citosol. Este trânsito de íons modifica a polarização da membrana e permite a passagem do impulso nervoso, caracterizando a Transmissão Sináptica Lenta ou Indireta (**Figura 12**) (RANDALL et al., 2000; PURVES et al., 2001; VOET & VOET, 2011).

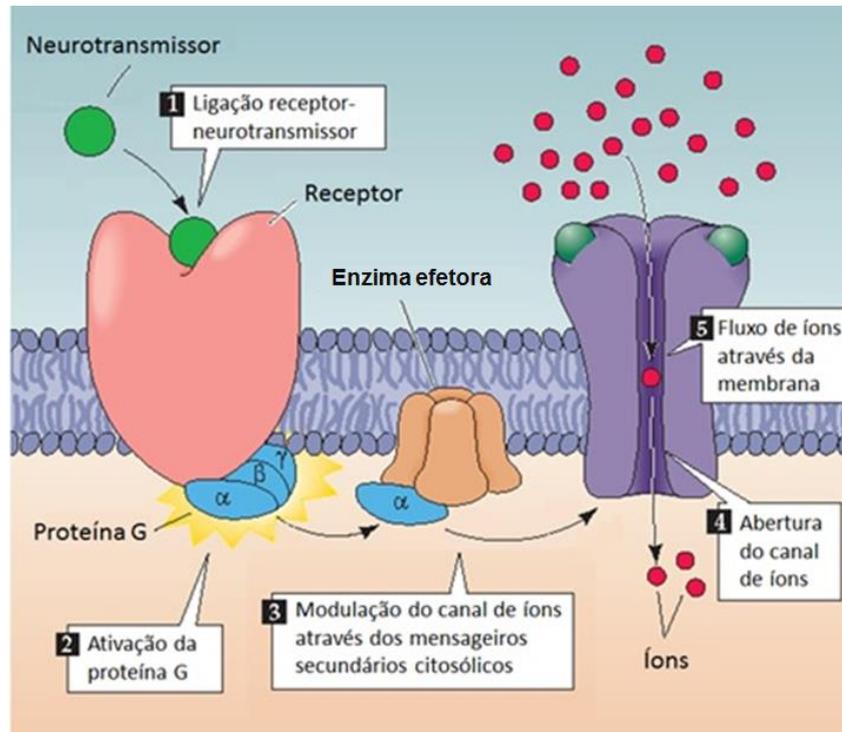


Figura 12: Transmissão Sináptica Lenta ou Indireta (adaptado de PURVES et al., 2001).

Porém, a disfunção na abertura dos canais iônicos pode provocar uma diferença abrupta na concentração de íons na superfície celular, aumentando significativamente a concentração de glutamato (NT responsável pela regulação iônica); o que produz alterações na percepção e cognição (PURVES et al., 2001). Dessa forma, algumas aminas biogênicas são consideradas neurotoxinas ou potentes enteógenos, isto porque apresentam atividade psicotrópica marcante, podendo estar associadas a desordens mentais temporárias e doenças como esquizofrenia (COSTA et al., 2005).

5.2. Esteroides

Esteroides são lipídios complexos sintetizados a partir do colesterol, molécula precursora de vários hormônios, vitaminas, alcaloides e esteroides cardíacos (TOLEDO & JARED, 1995). São formados por um núcleo derivado do fenantreno (A, B e C) ligado a um ciclo pentano (D) (**Figura 13**). Estes anéis encontram-se fundidos, o que impossibilita a rotação das ligações C-C, produzindo uma estrutura relativamente rígida e planar (NELSON

& COX, 2004). A estereoquímica das junções entre os anéis segue o padrão: A/B cis, B/C trans e C/D cis; e responde parcialmente pela função biológica destas moléculas (KRENN & KOPP, 1998).

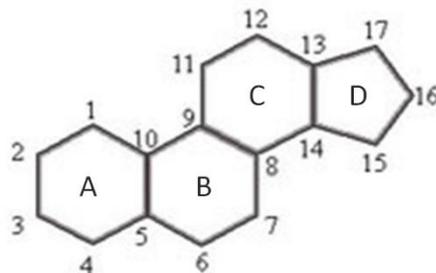


Figura 13: Estrutura química do ciclopentanofenantreno.

Os esteroides cardíacos ou cardiotônicos são caracterizados estruturalmente pela presença de um grupo hidroxila ligado ao C-3 do ciclopentanofenantreno e de um anel lactônico ligado ao C-17 (DVELA et al., 2007; WANG et al., 2011). A lactona é fundamental na atividade biológica exercida por estas moléculas e pode ser pentacíclica (cardenolídeos) ou hexacíclica (bufadienolídeos) (**Figura 14**) (WAGNER & BLADT, 1996).

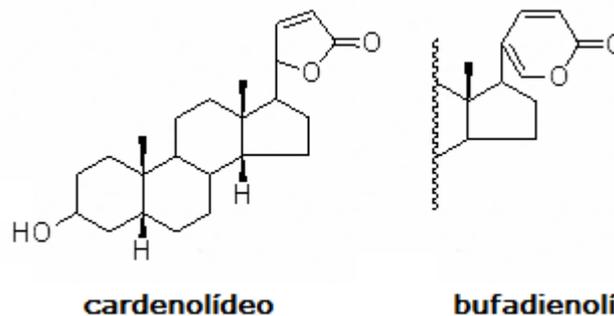


Figura 14: Estruturas químicas dos esteroides cardiotônicos.

Os bufadienolídeos são potentes toxinas encontradas exclusivamente na família Bufonidae (FLIER et al., 1980; KÖNIG et al, 2015). Exercem sua atividade sobre células vasculares do tecido muscular liso ou sobre o tecido cardíaco diretamente. Atuam de forma semelhante aos hormônios, produzindo resposta celular mesmo em pequenas concentrações (nanomolar) e ativando cascatas de sinalização intracelular (SCHONER & SCHEINER-BOBIS, 2008).

A principal característica biológica destas moléculas é a inibição da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$, enzima localizada na superfície da membrana celular (VOET & VOET, 2011). A inibição da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ provoca um aumento da concentração de Na^+ citosólico que, por sua vez, ativa

o trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$; aumentando também a concentração de Ca^{+2} intracelular. Essa quebra da homeostasia, além de provocar a despolarização da membrana, induz a vasoconstrição e arritmia cardíaca (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

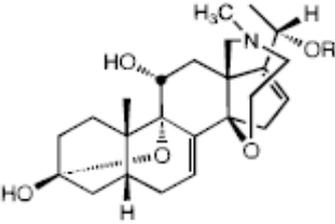
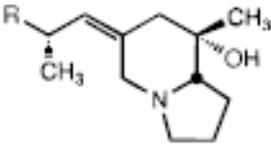
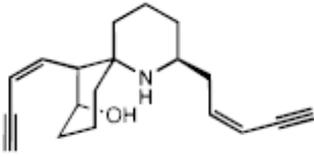
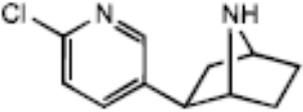
5.3. Alcaloides

Alcaloides são bases orgânicas nitrogenadas de baixo peso molecular (100 – 900 Da) e opticamente ativas (SIMÕES et al., 2010). Podem ser diferenciados das aminas através da posição do grupo azoto, que nos alcaloides estão incorporados ao anel enquanto nas aminas estão ligados a um radical alquílico (SCEKE et al., 2016). Podem ser classificados de acordo com a natureza química da estrutura contendo o grupamento azoto, quanto à sua atividade biológica ou quanto à sua origem (DEWICK, 2002).

Os principais alcaloides encontrados em anuros até o momento estão classificados segundo sua estrutura e incluem as batracotoxinas, responsáveis pela toxicidade do veneno animal mais letal do mundo extraído do *golden frog Phylllobates terribilis* (Dendrobatidae) (MYERS et al., 1978); a epibatidina, molécula de alto interesse farmacêutico, com poder anestésico 200 vezes maior que a morfina, obtida a partir de *Epipedobates tricolor* (Dendrobatidae) (BRADLEY, 1993); a histrionicotoxina, alcaloide de baixa toxicidade sistêmica em mamíferos; e as pumiliotoxinas (SIMÕES et al., 2010).

Todos os alcaloides isolados de anuros atuam como depressores ou estimulantes do sistema nervoso central, através da alteração do potencial de ação da membrana por meio da ativação/bloqueio dos canais iônicos dependentes de voltagem (NETO & CAETANO, 2005). Esta perturbação pode produzir atividade anestésica, analgésica e psicoestimulante; no entanto, muitas vezes produzem efeitos colaterais altamente tóxicos, como convulsão, parada respiratória, paralisia motora e até a morte.

Tabela 3: Relação dos principais alcaloides isolados de anuros: estruturas químicas e mecanismos de ação (SCHWARTZ et al., 2007).

Alcaloides	Estruturas químicas	Mecanismo de ação
Batracotoxinas		Abertura dos canais de sódio voltagem-dependentes (WANG & WANG, 2003)
Pumiliotoxinas		Alteração dos canais de cálcio; Bloqueio dos canais de sódio- potássio voltagem-dependentes (DALY et al., 2002)
Histrionicotoxinas		Ativação dos receptores nicotínicos (VOET & VOET, 2011)
Epibatidina		Ativação dos receptores nicotínicos (BADIO et al., 1997)

5.4. Peptídeos bioativos

A secreção cutânea dos anuros é conhecida como uma rica fonte de peptídeos farmacologicamente ativos, provavelmente adquiridos pela diversidade de agressores com os quais estes animais mantiveram contato ao longo da evolução (MOR & NICOLAS, 1994; BECHINGER E LOHNER, 2006). Acredita-se que todos são derivados de um ancestral em comum, que após várias modificações adaptativas adquiriu grande variação estrutural, permitindo o surgimento de diferentes tipos de peptídeos classificados segundo a sua atividade, como os peptídeos antimicrobianos que, como o próprio nome diz, atua sobre patógenos; e os peptídeos neuroativos, que atuam sobre o predador (AMICHE et al., 1999; VANHOYE et al., 2003).

5.4.1. Neuropeptídeos (NPs)

Neuropeptídeos são moléculas relativamente pequenas, que possuem função de sinalização neuronal, ou seja, são neurotransmissores do sistema nervoso central (**Tabela 4**) (FRICKER, 2012). Sua função biológica abrange uma ampla gama de processos fisiológicos e cognitivos como regulação do peso corporal e reprodução, aprendizagem e memória, ansiedade, dor e depressão (FRICKER, 2012; PURVES et al., 2001). Devido a esta capacidade de atuação sobre uma variedade de células e tecidos os NP são denominados 'pleiotrópicos' (BURBACH, 2011).

Tabela 4: Principais grupos de NPs isolados de anfíbios (SCHWARTZ et al., 2007).

Famílias	Estrutura	Efeitos fisiológicos	Gênero
Bombesinas	QKKPPRPPQWAVGHFM	Inibição do apetite	Bombina
Bradicininas	RPPGFSPFRIAPAS	Vasodilatação	Rana
Ceruleínas	GLGSVLGKALKIGANLL	Antinonicepção (sedação)	Litoria
Dermorfina	YAFGYPS	Analgésico, alucinógeno	Phyllomedusa
Taquicininas	QADPNKFYGLM	Vasoconstrição	Physalaemus

Os neuropeptídeos representam o maior e mais diversificado grupo de neurotransmissores. Seu mecanismo de ação é análogo aos peptídeos hormonais e interagem preferencialmente com os receptores de membrana acoplados à proteína G, ativando a cascata de sinalização citosólica que culmina em resposta celular (PURVES et al., 2001). Apesar dos NPs em geral produzirem resposta celular mais lenta do que os neurotransmissores não peptídicos, sua potência de transmissão é comparativamente muito maior e, além disso, o efeito produzido é prolongado, podendo durar dias, meses ou até anos (GUYTON & HALL, 2006).

5.4.2. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Os parâmetros que definem os peptídeos do tipo antimicrobianos são: poucos resíduos de aminoácidos (10 a 50), carga total positiva (anfipáticos) e estrutura helicoidal (PRATES et al., 2004). São encontrados em praticamente todas as famílias de anuros e estão divididos em dois principais grupos com base nas suas estruturas: peptídeos lineares e anfipáticos formadores de hélices (e.g. magaininas e dermaseptinas), peptídeos formadores de ligações dissulfeto na porção C-terminal (e.g. brevininas, gaegurinas e esculentinas) e peptídeos muito pequenos (10 resíduos de aminoácidos), as chamadas temporinas (**Tabela 5**) (SCHWARTZ et al., 2007).

Tabela 5: Principais grupos de PAMs isolados de anfíbios (SCHWARTZ et al., 2007).

Nome	Sequencia	Espécie
Magainina-1	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS	<i>Xenopus laevis</i>
Dermaseptina-B1	AMWKDVLKKIGTVALHAGKAALGAVADTISQ	<i>Phyllomedusa bicolor</i>
Brevinina-1	FLPVLAGIAAKVVPALFCKITKKC	<i>Pelophylax porosus</i>
Gaegurina-1	SLFSLIKAGAKFLGKNLLKQGACYAACKASKQC	<i>Glandirana rugosa</i>
Temporina-A	FLPLIGRVLSGIL	<i>Rana temporaria</i>

Os peptídeos antimicrobianos apresentam toxicidade seletiva, isto é, são capazes de diferenciar as células patogênicas (procarióticas) das células do hospedeiro (eucarióticas) e apresentam baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência por parte dos patógenos, isto porque o alvo dos PAMs são os fosfolípidios, componentes conservados da membrana (MATSUZAKI, 1999). Produzem resposta instantânea, pois o sítio de ação é preferencialmente a superfície celular, onde podem atuar através de diversos mecanismos (*barrel-stave*, *carpet-like* e *detergent-like*), provocando perturbações na bicamada lipídica da membrana celular ocasionando a sua ruptura (**Figura 15**) (SHAI,2002; ZASLOFF, 2002; BRODGEN, 2005).

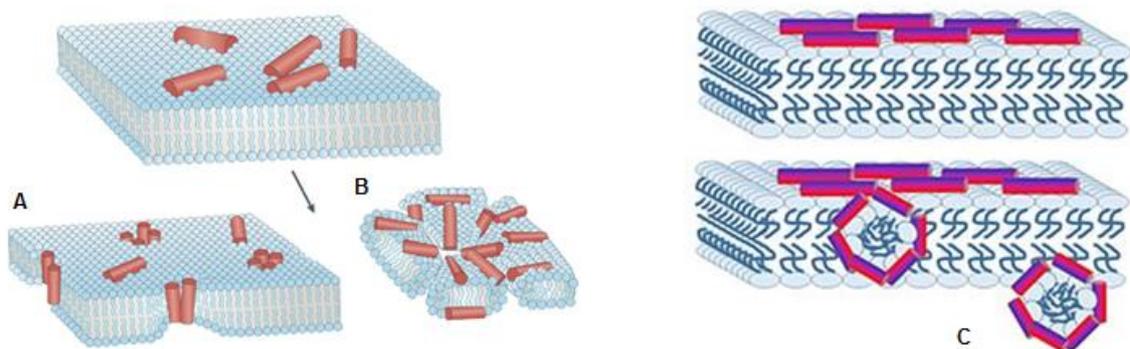


Figura 15: Mecanismos de ação dos PAMs. (A) *barrel-stave*: formação de poros a partir da inserção perpendicular dos peptídeos na bicamada lipídica; (B) *carpet-like*: adsorção de peptídeos paralelamente a superfície celular com tensionamento da membrana; (C) *detergent-like*: formação de micela peptídica com adsorção dos fosfolípidios de membrana (MELO et al., 2009).

Muitos fatores devem ser considerados na interação entre peptídeos e membranas, tais como a relação peptídeo/lipídio, a fluidez da membrana, temperatura e pH (BECHINGER E LOHNER, 2006). Além disso, a composição de aminoácidos, sua localização na sequência peptídica e modificações pós-traducionais influenciam diretamente a potência e seletividade destas moléculas; podendo alterar também a sua citotoxicidade (KRUGLIAK et al., 2000).

Além disso, recentemente KÖNIG et al. (2015) sugeriram que os PAMs fossem renomeados para citolisinas, pois alguns estudos relatam a ação destas moléculas na ruptura da membrana celular, auxiliando certos neuropeptídeos a atuarem no interior da célula (**Figura 16**).

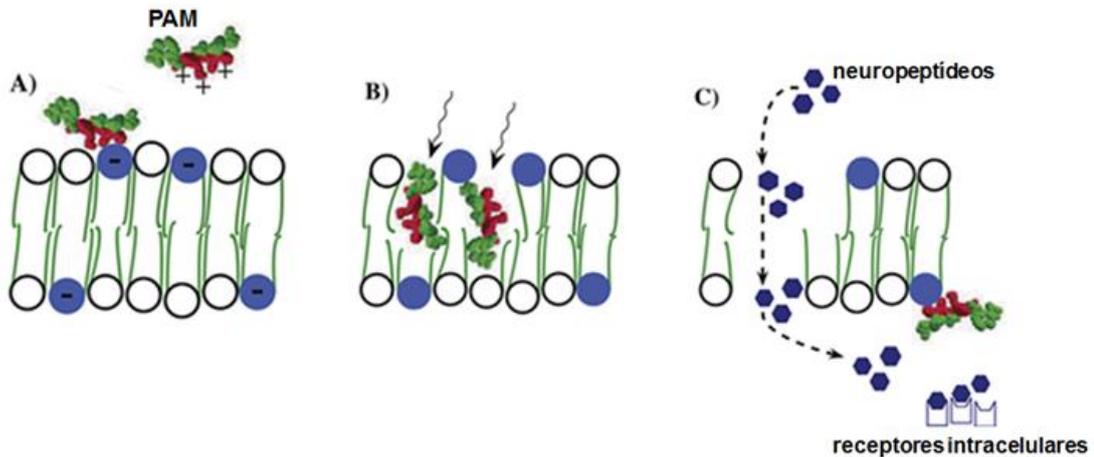


Figura 16: Proposta do mecanismo de ação dos PAMs atuando como citolisinas no favorecimento dos neuropeptídeos (KÖNIG et al., 2015).

6. Identificação estrutural dos derivados proteicos

A estrutura primária das proteínas fornece informações a respeito da estrutura terciária que, por sua vez, é determinante da sua função biológica. Além disso, através da sequência de aminoácidos é possível rastrear a história biológica da proteína como, por exemplo, seu surgimento e evolução (VOET & VOET, 2011). Esta sequência é altamente variável, no entanto, a maioria das proteínas apresenta uma região conservada responsável pela atividade biológica. Proteínas que compartilham uma mesma região conservada, ou seja, um ancestral em comum, são chamadas homólogos; que, numa mesma espécie são denominados parálogos e, em espécies diferentes, ortólogos (SANTOS FILHO & ALENCASTRO, 2003). Este último grupo pode apresentar mesma função biológica, devido à região conservada; no entanto, sua estrutura primária não necessariamente será semelhante nas espécies em questão, graças a variabilidade da região não conservada (NELSON & COX, 2004).

A composição proteica das secreções cutâneas dos anfíbios é usualmente determinada através das técnicas de espectrometria de massas (EM), que consistem em determinar a relação existente entre a massa e a carga (m/z) de espécies previamente ionizadas (WILSON & WALKER, 2010). A EM utiliza o analito em sua forma gasosa e, como derivados proteicos são extremamente termosensíveis, o desenvolvimento de técnicas

alternativas (ionização por eletrospray - ESI e ionização assistida por laser - MALDI) foi fundamental para o surgimento e extensivo progresso da proteômica (NELSON & COX, 2004).

A determinação estrutural de proteínas através das técnicas de EM apresenta importantes vantagens como extrema sensibilidade, onde uma minúscula quantidade de amostra é suficiente para a efetuação da análise (CANTÚ et al., 2008; NELSON & COX, 2004). Além disso, fornece uma riqueza de informações acerca do analito, incluindo a sequência dos resíduos de aminoácidos e informações pós-traducionais como glicosilação, amidação e fosforilação (MAGALHÃES et al., 2008; WILSON & WALKER, 2010). Geralmente, o processo de identificação das proteínas é realizado em seis etapas, sendo as duas primeiras determinantes para o sucesso da análise (CANTÚ et al., 2008).

- I. Extração e purificação do conteúdo proteico através de precipitação das proteínas, eletroforese em gel de poliacrilamida ou ultrafiltração.
- II. Hidrólise das proteínas através de digestão enzimática promovida pela tripsina, enzima altamente específica para os resíduos arginina e lisina. O processo que passa pela hidrólise é denominado *bottom-up*.
- III. Isolamento dos peptídeos obtidos pela digestão através de cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa e/ou em fase reversa acoplada ao espectrômetro de massas.
- IV. Injeção dos peptídeos isolados no ionizador a vácuo que, por técnica de elétron-spray (ESI) promove a pulverização da amostra através de nebulizadores que evaporam o solvente e carregam as gotículas de analito, e as inserem em um campo elétrico intenso. Em seguida, a relação m/z dos íons moleculares é determinada na forma de espectros, que nesta etapa são denominados EM-1. Os peptídeos resultantes da digestão enzimática detectados por EM são chamados íons precursores.
- V. Fragmentação dos íons precursores através da colisão em alta energia com moléculas de gás inerte (hélio, argônio ou nitrogênio). Geralmente, nesta etapa, é utilizado mais de um fragmentador acoplado, esta técnica é denominada EM/EM ou EM *tandem*. Os peptídeos resultantes da fragmentação detectados por EM/EM são chamados íons-produto e o espectro obtido nesta etapa é denominado MS-2.

- VI. As sequências dos íons-produto obtidos na fragmentação são analisadas através de softwares associados a bancos de dados específicos para proteínas. A interpretação dos dados é feita através de uma correlação entre as massas reais obtidas e massas teóricas padrão registradas nos bancos de dados. A identificação do fragmento/proteína é dada através da porcentagem de homologia obtida nesta correlação. Os softwares frequentemente utilizados são MASCOT e SEQUEST, e os bancos de dados que podem ser utilizados nas buscas por homólogos em anfíbios são: Xenbase 4.0 (<http://www.xenbase.org/>), *Database of Anuran Defense Peptides* (DADP) (<http://split4.pmfst.hr/dadp/>), *The Antimicrobial Peptide Database* (APD) (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) e UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>).

II. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo consistiu em investigar as secreções cutâneas provenientes das espécies *Aparasphenodon brunoi* e *Aparasphenodon arapapa*, do ponto de vista químico, identificando as classes de moléculas presentes em cada exsudato e buscando determinar a estrutura química daquelas encontradas. Em paralelo, análises do ponto de vista biológico foram realizadas a fim de determinar o perfil citotóxico das secreções, incluindo o rastreamento da resposta intracelular produzida, utilizando como modelo biológico a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Obtenção e classificação das espécies

A coleta dos indivíduos de ambas as espécies foi realizada através do método de busca ativa (HEYER et al., 1994) e o sexo dos animais não foi considerado. Os espécimes adultos de *A. brunoi* (n = 5) foram coletados na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, RJ (23°03'10" S, 43°58'21" W); enquanto os espécimes de *A. arapapa* (n = 3) foram coletados no município de Ilhéus, BA (14°53'43" S, 39°01'41" W).

2. Obtenção das secreções cutâneas

Após captura os espécimes foram individualmente lavados em água corrente para remoção dos resíduos de terra e folhas e, em seguida, submetidos a estímulo elétrico suave, utilizando fonte de alimentação (6 V e 6.3 A), em ciclos alternados de 3 s de estímulo e 3 s de descanso cada, para a obtenção das secreções (**Figura 17**) (GRANT & LAND, 2002). Após a excreção, cada indivíduo foi lavado com água destilada e sua respectiva secreção coletada e imediatamente armazenada à -20 °C, sendo liofilizadas posteriormente. As amostras secas foram armazenadas em dessecador para evitar acúmulo de água até o processamento das análises.



Figura 17: Aplicação de estímulo elétrico (Foto: *A. brunoi*).

Ao término dos procedimentos de coleta e extração, os animais foram sacrificados por imersão em solução do anestésico metano sulfonato de tricaina (MS-222), em conformidade com as normas reguladoras de procedimentos relativos à eutanásia em animais, previstas na

resolução N° 714 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Em seguida foram fixados em formol 4% e conservados em etanol 70% na Coleção do Laboratório de Herpetologia do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (ICBS/UFRRJ).

3. Teste de solubilidade das secreções brutas

Para testar a solubilidade das amostras foram utilizados diferentes solventes com escala crescente de polaridade (**Tabela 6**). O teste foi realizado utilizando 1 mg de secreção bruta para cada 1 mL de solvente, seguido de exposição ao banho de ultrassom por 360 s, com aquecimento de 30 °C.

Tabela 6: Propriedades físico-químicas dos solventes testados. Solventes: ^a apolares, ^b apróticos polares e ^c próticos polares.

Solvente	Fórmula estrutural	Momento dipolo	Constante dielétrica
Clorofórmio ^a	CHCl ₃	1.04 D	4.81
Diclorometano ^b	CH ₂ -Cl ₂	1.60 D	9.10
Acetato de etila ^b	CH ₃ -C(=O)-O-CH ₂ -CH ₃	1.78 D	6.08
Acetona ^b	CH ₃ -C(=O)-CH ₃	2.88 D	21.00
Acetonitrila ^b	CH ₃ -C≡N	3.92 D	37.50
Etanol ^c	CH ₃ -CH ₂ -OH	1,69 D	30.00
Metanol ^c	CH ₃ -OH	1.70 D	33.00
Água ^c	H ₂ O	1.85 D	80.00

4. Prospecção química das secreções brutas

4.1. Investigação qualitativa das substâncias presentes nas secreções brutas

Esta análise foi realizada com o intuito de caracterizar qualitativamente as possíveis classes de compostos presentes nas secreções. Para tal, pequenas porções de cada amostra (*A. arapapa* e *A. brunoi*) foram solubilizadas em acetonitrila-metanol (1:1) e aplicadas sobre placa de sílica gel 60_{F254} (Silicycle®). Em seguida, as placas foram colocadas em cuba cromatográfica para eluição dos componentes em sistema butanol – ácido acético – água (7:1:2), o que permite uma melhor detecção das substâncias investigadas. Após eluição, os solventes foram evaporados e os procedimentos de detecção específicos para cada grupo químico foram aplicados. Na **Tabela 7** encontram-se listados procedimentos de detecção utilizados e os grupos químicos associados.

Tabela 7: Grupos químicos investigados por cromatografia em camada delgada analítica e os respectivos métodos de detecção utilizados (JORK et al., 1990; WAGNER & BLADT, 1996).

Grupos Químicos	Métodos de Detecção
Alcaloides	Reagente de Dragendorff Radiação UV (254 e 365 nm)
Esteroides	Reagente de Liebermann – Burchard Vanilina sulfúrica
Proteínas e peptídeos	Ninidrina etanólica Anisaldeído sulfúrico

4.2. Isolamento das frações de substâncias presentes nas secreções

As análises em CLAE analítica foram realizadas na intenção de isolar as frações de componentes com propriedades físico-químicas semelhantes. Foi utilizada coluna analítica Luna® Phenomenex C18 (5 μ , 25 cm x 4,6 mm), injeção de 20 μ L de solução 5 mg.mL⁻¹ (em acetonitrila grau HPLC) das secreções de *A. arapapa* e *A. bruno*i em sistema isocrático (70% acetonitrila grau HPLC/água mili-Q a 1% em ácido acético), com fluxo de 2,0 mL.min⁻¹, absorvância em 205 nm e tempo de eluição de 10 min.

4.3. Purificação das frações isoladas

As frações foram efetivamente isoladas através de purificação por CLAE semi-preparativa em equipamento Shimadzu, coluna Luna® Phenomenex C18 (5 μ , 25 cm x 10,0 mm), para que seus componentes tivessem suas estruturas químicas determinadas. O preparo das amostras se deu da mesma forma citada anteriormente, ou seja, injeção de 20 μ L de solução 5 mg.mL⁻¹ (em acetonitrila grau HPLC) das secreções de *A. arapapa* e *A. bruno*i. Da mesma forma, a eluição foi realizada em sistema isocrático (60% acetonitrila grau HPLC/água mili-Q a 1% em ácido acético), fluxo de 3,0 mL.min⁻¹, tempo de eluição de 18 min e absorvância monitorada em 205 nm. As frações foram manualmente coletadas, liofilizadas e mantidas em dessecador.

4.4. Identificação das estruturas proteicas nas frações isoladas

Esta etapa foi realizada em colaboração com a Dra Olga Tavares Lima (UENF). As frações obtidas foram dessalinizadas utilizando pipetas Zip Tip® C18 (Millipore) e, em seguida, purificadas em UPLC nanoACQUITY (Waters), utilizando coluna trap e coluna analítica C18 nanoAcquity. Na eluição foi utilizada como fase móvel um gradiente binário constituído de A (0,1% ácido fórmico) e B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila), onde B é aumentado de 0 a 85%. A determinação da composição química das frações foi realizada em espectrômetro de massas Synapt G2-Si HDMS (Waters) em modo ESI-LC-MS/MS. Os espectros adquiridos foram processados e a pesquisa por proteínas homólogas foi realizada no banco de dados *UniProtKB*.

5. Análise *in vivo* e *in vitro* do potencial tóxico das secreções brutas

5.1. Pré e pós tratamentos

As cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas são sintéticas e possuem genótipo BY4741; *MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*. As células-mãe foram estocadas em meio de cultura YPD 2% sólido (glicose 2%, peptona 2%, extrato de levedura 1% e ágar 2%) e mantidas sob refrigeração.

Para todos os ensaios, o inoculo foi preparado a partir da adição de células de levedura frescas (ativadas a 30 °C), em meio de cultura YPD 2% líquido (glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%), previamente esterilizado em autoclave (120 °C, 1 atm, 15 min). A solução foi imediatamente levada a incubadora *shaker* refrigerada (160 rpm, 28 °C) para o desenvolvimento das células até a sua primeira fase de crescimento exponencial (entre 0,6 e 1,2 mg de peso seco de células.mL⁻¹).

Após 22 h de agitação, o crescimento das células foi determinado com base na sua concentração, medida pela leitura da densidade óptica em espectrofotômetro (570 nm) aplicada a **Equação (1)**. Um volume de inóculo equivalente a 50 mg de células foi então exposto a 1 mL das secreções de *A. arapapa* e *A. brunoi* nas concentrações 1.0 µg.mL⁻¹ e 10.0 µg.mL⁻¹ (em acetonitrila 50%), durante 1 h no *shaker* (160 rpm, 28 °C) (adaptado de BITTERMAN et al., 2003).

$$[C] = \text{Abs} * 0,52 * f \quad \text{Equação (1)}$$

Onde: C = concentração (mg.mL⁻¹)

Abs = absorvância (570 nm)

f = fator de diluição

A interpretação estatística foi realizada através de análise da variância (ANOVA) e do teste de Tukey *a posteriori* (HAYES, 2001). As análises foram aplicadas a fim de se determinar a diferença entre os tratamentos realizados e o grupo controle, para tal admitiu-se um intervalo de confiança de 95%. Foi utilizado software *GraphPad Prism*, versão 6.01.

5.2. Viabilidade celular e dano mitocondrial

Após a exposição de 1 h no *shaker*, a concentração das células foi calculada para cada amostra através da leitura da absorvância (570 nm) e o volume correspondente a 500 µg de células foi submetido a diluição seriada, seguida do plaqueamento de 100 µL das soluções diluídas em meio de cultura YPD 2% sólido para o ensaio de viabilidade celular, que avalia o grau de sobrevivência das células contra compostos potencialmente tóxicos, em outras palavras, mede a toxicidade das substâncias em questão.

A análise do dano mitocondrial também mede a toxicidade dos compostos sobre as células de levedura e, adicionalmente, diz o efeito específico sobre as mitocôndrias, fazendo uso do meio de cultura sólido YPGly 4%, no qual a glicose 2% é substituída por glicerol 4%, uma fonte de carbono não fermentável. Os experimentos foram realizados em duplicata e as placas foram armazenadas na incubadora a 30 °C por 72 h para que as unidades formadoras de colônias (UFC) desenvolvidas fossem manualmente contabilizadas (adaptado de BITTERMAN et al., 2003).

5.3. Peroxidação lipídica

A dosagem da peroxidação lipídica foi realizada para avaliar os possíveis danos provocados a porção lipídica das membranas celulares, utilizando para isso o método TBARS modificado para leveduras (STEELS et al., 1994). Neste ensaio, assim como nos anteriores, as células foram expostas a 1 mL de cada amostra durante 1 h no *shaker* (160 rpm, 28 °C). Ao término da exposição, as amostras foram centrifugadas (4000 rpm/ 5 min) e lavadas com 10 mL de água destilada gelada, por duas vezes. Uma terceira lavagem foi realizada utilizando

desta vez 5 mL de água destilada e, antes de proceder a última centrifugação, uma alíquota de 100 µL foi retirada para leitura da absorbância (570 nm), utilizada em cálculos posteriores.

Em seguida, as células foram ressuspensas em 0,5 mL de ácido tricloroacético 10% e transferidas para tubos de parede grossa contendo 1,5 g de pérolas de vidro (425-600 µm). Através de agitação vigorosa em 6 ciclos alternados entre 20 s no vórtex e 20 s no gelo, o rompimento das membranas foi promovido produzindo assim um extrato celular que foi centrifugado a 4000 rpm durante 4 min. Ao sobrenadante obtido após centrifugação foi adicionada, em duplicata, uma combinação de substâncias (**Tabela 8**), sendo a mistura reacional imediatamente levada ao aquecimento em banho maria (100 °C, 15 min).

Tabela 8: Mistura reacional empregada no método TBARS (STEELS et al., 1994).

	Branco (mL)	Réplica1 (mL)	Réplica2 (mL)
Água destilada	0,3	0,15	–
EDTA 0,1 M	0,1	0,1	0,1
Extrato (sobrenadante)	–	0,15	0,3
TBA 1% em NaOH 0,05 M	0,6	0,6	0,6
Volume total	1,0	1,0	1,0

Ao término do aquecimento as amostras foram resfriadas até temperatura ambiente e a leitura da absorbância (532 nm) foi efetuada novamente. A dosagem da peroxidação lipídica é dada em termos de pmols de aldeído malônico formado por mg de células, sendo calculada através da **Equação (2)**.

$$\frac{\text{pmols MDA}}{\text{mg células}} = \frac{A_{532} \times 11,5 \times 1000}{A_{570} \times 0,52 \times 100 \times 4,9 \times 0,15} \quad \text{Equação (2)}$$

Onde: A_{532} = média das absorbâncias em 532 nm

A_{570} = leitura da absorbância em 570 nm

IV. RESULTADOS

1. Obtenção das secreções cutâneas

O rendimento obtido nas extrações para cada indivíduo de ambas as espécies variou entre 3 e 6 mg, de acordo com o comprimento rosto-cloacal (CRC) de cada um, como pode ser visto na **Tabela 9**.

Tabela 9: Rendimento individual das secreções obtidas e relação com o CRC dos espécimes coletados.

Espécie	Indivíduo	CRC (mm)	Rendimento (mg)
<i>A. arapapa</i>	1	48,0	4,0
	2	45,5	3,7
	3	46,0	3,4
<i>A. brunoi</i>	1	58,4	4,7
	2	62,4	4,6
	3	60,2	4,5
	4	64,7	5,3
	5	65,1	5,9

Para todos os indivíduos, as secreções revelaram-se incolores, pouco viscosas e com formação de espuma após agitação em meio aquoso, tais características podem ser visualizadas na **Figura 18**.



Figura 18: Secreção cutânea obtida logo após estímulo elétrico em meio aquoso (Foto: *A. brunoi*).

2. Teste de solubilidade

As amostras de *A. arapapa* e *A. brunoi* exibiram um perfil de solubilidade semelhante, sendo ambas insolúveis nos solventes orgânicos apolares clorofórmio e diclorometano. Da mesma forma, as duas amostras foram parcialmente solúveis nos solventes próticos polares etanol, metanol e água, sendo visualizada decantação após alguns minutos. Por fim, nos solventes apróticos de polaridade média como acetona, acetato de etila e acetonitrila, a dissolução se mostrou estável com leve turbidez.

3. Prospecção química das secreções brutas

3.1. Caracterização qualitativa da composição química dos extratos

A análise qualitativa das secreções de *A. arapapa* e *A. brunoi* somente revelou a presença de compostos amínicos, como pode ser verificado na **Tabela 10**.

Tabela 10: Relação dos grupos químicos usualmente encontrados nas secreções cutâneas de anfíbios detectados através de análise em CCDA. Condições experimentais: placa de sílica gel 60_{F254}, solvente acetonitrila-metanol (1:1), eluente butanol-ácido acético-água (7:1:2); Onde (+) indica a presença do grupo químico e (-) a sua ausência.

Grupos Químicos	Reveladores	Deteção
Alcaloides	Dragendorff	-
	UV (254 e 365 nm)	-
Esteroides	Liebermann – Burchard	-
	Vanilina sulfúrica	-
Proteínas e peptídeos	Ninidrina etanólica	+
	Anisaldeído sulfúrico	+

3.2. Isolamento e purificação das substâncias presentes nas secreções

A eluição em coluna analítica de fase reversa revelou tempo de retenção total de 2 min apenas. Além disso gerou picos de baixa resolução, sendo detectados cinco frações em *A. arapapa* (**Figura 19a**) e quatro frações em *A. brunoi* (**Figura 19b**). Para ambas as espécies os dois picos de maior intensidade (1 e 2) apresentaram o mesmo tempo de retenção (0,8 e 1,4 min).

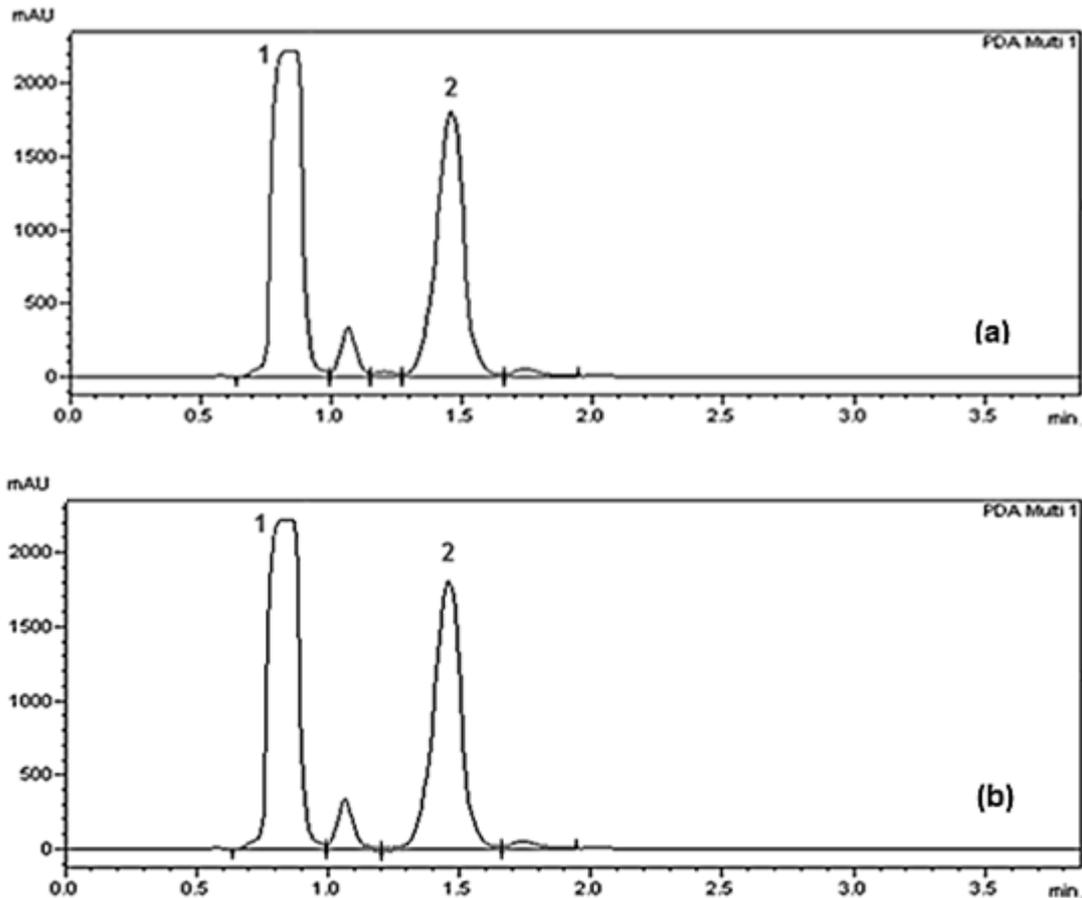


Figura 19: Cromatogramas das amostras (a) *A. arapapa* e (b) *A. brunoi*, e seus respectivos picos majoritários em (1) 0,8 min e (2) 1,4 min. Coluna C18 (5 μ , 10 x 4,0 mm), sistema de eluição isocrático (70% acetonitrila grau HPLC/água mili-Q a 1% em ácido acético), fluxo de 2,0 mL.min⁻¹ e absorbância em 205 nm.

O número de frações coletadas e o tempo de retenção dos picos isolados foram semelhantes nas duas amostras, diferindo apenas no rendimento obtido (**Tabela 11**).

Tabela 11: Rendimento e tempo de retenção (T_R) das frações isoladas. Coluna C18 (5 μ , 25 cm x 10,0 mm), sistema isocrático (60% de acetonitrila grau HPLC/água mili-Q a 1% em ácido acético), fluxo de 3,0 mL.min⁻¹ e absorbância em 205 nm.

Fração	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T_R (min)	1	2	3	4-6	7-8	9-11	12	13	14-17	18
m (mg) <i>A. arapapa</i>	1,5	2,3	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
m (mg) <i>A. brunoi</i>	3,0	3,2	2,6	1,6	<1	1,4	1,0	<1	<1	<1

3.3. Identificação das estruturas proteicas nas frações isoladas

Nesta etapa as análises foram aplicadas somente para a secreção de *A. brunoi*. A fração 1 obtida por CLAE apresentou alta concentração de moléculas, com um valor altamente discrepante das demais frações (**Tabela 12**). As frações 2, 5 e 10 não foram analisadas.

Tabela 12: Relação do número de proteínas obtidas em cada fração de secreção isolada

Fração	1	3	4	6	7	8	9
T _R (min)	1	3	4-6	9-11	12	13	14-17
Proteínas detectadas	176	2	4	1	3	1	2

A grande maioria das correlações obtidas através do cruzamento dos dados com bancos de dados somente mostraram homologia com proteínas provenientes de *Equus caballus* (cavalo) e mais de 50% destas proteínas ainda não foram totalmente caracterizadas (*uncharacterized protein*). Como pode ser verificado na **Figura 20**, uma quantidade relevante de colágeno e queratina foram identificados. Adicionalmente, foram detectadas outras proteínas, de origem e atividade biológica diversas (**ANEXO I**).

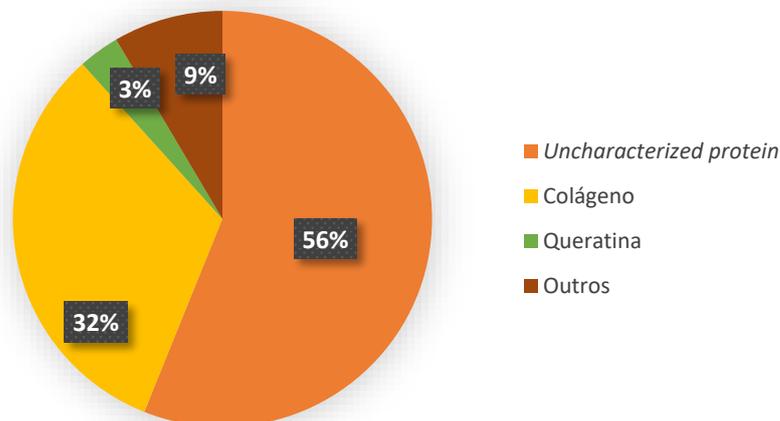


Figura 20: Porcentagem de incidência de alguns grupos de proteínas específicos

4. Análise *in vivo* e *in vitro* do potencial tóxico

4.1. Viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade celular revelaram que as amostras de *A. arapapa* e *A. brunoi*, nas concentrações de 1 µg.mL⁻¹ e 10 µg.mL⁻¹, não foram capazes de reduzir a sobrevivência

das células da levedura *S. cerevisiae* no seu estado mais sensível (1ª fase de crescimento exponencial). A análise da variância (ANOVA) não revelou diferença significativa entre os valores de unidades formadoras de colônias (UFC) obtidos ($F = 0,8250$; $p = 0,5213$).

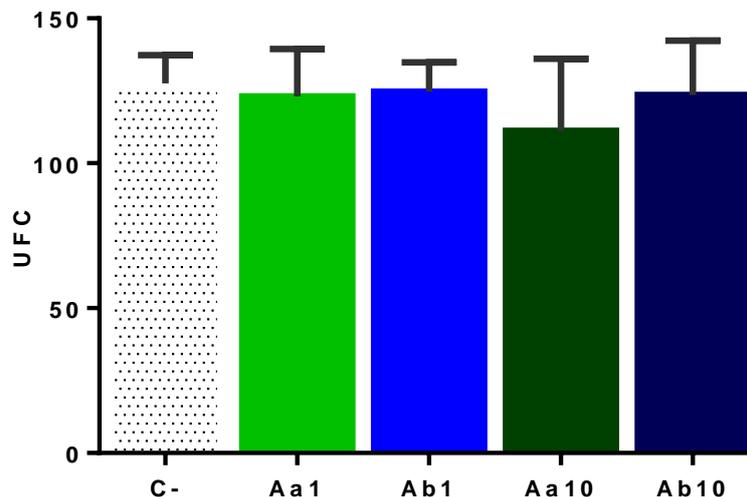


Figura 21: Medida da viabilidade celular com relação a quantidade de UFC contabilizadas em meio de cultura fermentável. C.: controle negativo (ausência de amostra); Aa: *A. arapapa* e Ab: *A. brunoi*; Aa1 e Ab1: $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Aa10 e Ab10: $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.2. Dano mitocondrial

A análise do dano mitocondrial revelou que o aumento da concentração das amostras de *A. arapapa* e *A. brunoi* provoca redução da sobrevivência celular, isso porque segundo a ANOVA ($F = 3,988$; $p = 0,0163$), houve diferença significativa nos valores de UFC encontrados para as duas espécies. Através do teste de Tukey foi possível identificar os pares de tratamentos com diferença significativa. Neste sentido, foi observado que na concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ o número de UFC detectadas não diferiu do controle negativo, enquanto que na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi verificada diferença significativa entre os valores de UFC contabilizadas no controle negativo e nas amostras das duas espécies.

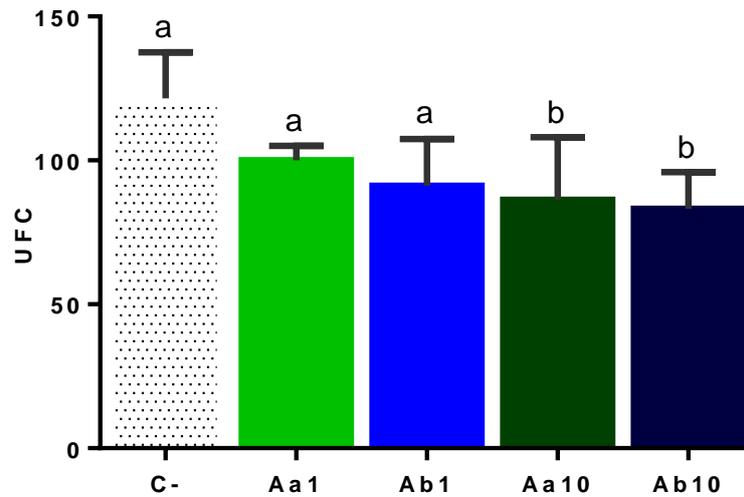


Figura 22: Medida do dano mitocondrial com relação a quantidade de unidades formadoras de colônias contabilizadas em meio de cultura não fermentável. C.: controle negativo (ausência de amostra); Aa: *A. arapapa* e Ab: *A. brunoi*; Aa1 e Ab1: $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Aa10 e Ab10: $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.3. Peroxidação lipídica

A dosagem da peroxidação lipídica não revelou danos as membranas e, tampouco efeito protetivo, uma vez que a ANOVA não revelou diferença significativa na formação de aldeído malônico ($F = 1,290$; $p = 0,3322$).

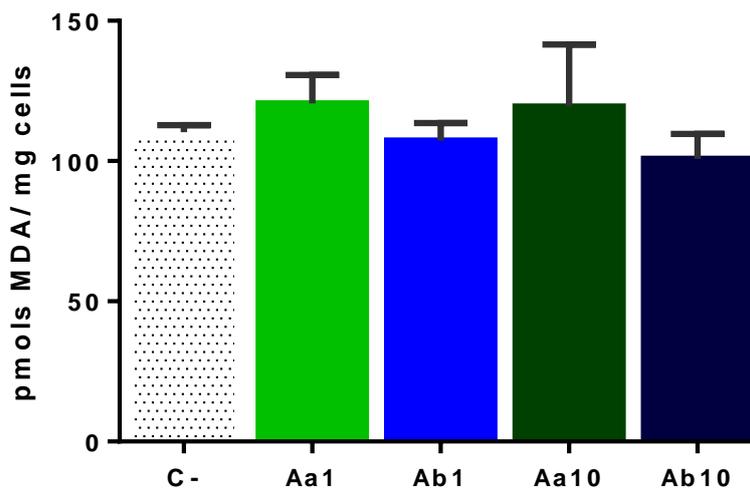


Figura 23: Dosagem da peroxidação lipídica com base no número de pmols de aldeído malônico formados por mg de células (método TBARS). C.: controle negativo (ausência de amostra); Aa: *A. arapapa* e Ab: *A. brunoi*; Aa1 e Ab1: $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Aa10 e Ab10: $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

V. DISCUSSÃO

1. Avaliação Química

As secreções cutâneas coletadas em ambas as espécies revelaram uma sutil correlação entre a quantidade (massa seca) de exsudato e tamanho do indivíduo (sendo considerado neste caso apenas o comprimento rosto-cloacal). Isto se deve ao fato das glândulas de veneno encontrarem-se distribuídas, principalmente, ao longo do dorso destes animais, portanto, quanto maior for a extensão do tecido epitelial nesta região maior será o número de glândulas ali presentes e, conseqüentemente, um maior volume de secreção será liberada (DUELLMAN e TRUEB, 1994). Visualmente as secreções apresentaram um padrão no qual a baixa viscosidade, ausência de turbidez e a formação de espuma se fizeram presentes nos indivíduos das duas espécies, consistindo nas suas principais características. Este primeiro contato com o material de estudo permitiu poucas conclusões, podendo-se inferir apenas que a formação de espuma após agitação em meio aquoso muito provavelmente está associada a presença de substâncias anfipáticas, ou seja, estruturalmente formadas por uma porção apolar ou de baixa polaridade (hidrofóbica) e outra porção polar (hidrofílica) (NELSON & COX, 2004), e.g. proteínas e peptídeos.

A solubilidade observada exclui, ou reduz a ínfima, a presença de substâncias apolares, isto porque nenhum dos solventes testados foi capaz de solubilizar as amostras (secreções). No caso das toxinas de anfíbios as substâncias apolares mais comuns são as do tipo esteroide, incluindo os esteroides alcaloídicos lipossolúveis (batracotoxinas), neste sentido foi realizada análise em cromatografia em camada delgada (CCD) aplicando o reagente de Liebermann-Burchard, como revelador químico, que tem sua detecção baseada numa reação de desidratação seguida de oxidação do núcleo fenantreno formando um composto aromático conjugado de coloração azul-esverdeada (**Figura 24**) (XIONG et al., 2007); o resultado obtido foi negativo, confirmando a ausência destes compostos. Até o momento não foram encontradas moléculas essencialmente esteroidais em nenhum indivíduo não membro da família Bufonidae, única detentora de macro glândulas de veneno do tipo paratoides – agrupamento de glândulas granulares compostas de células especializadas na diferenciação do colesterol em bufodienolídeos (SCIANI et al., 2013); da mesma forma, as batracotoxinas não foram detectadas em nenhum indivíduo não membro da família Dendrobatidae, pois tais moléculas são obtidas por via ainda não identificada, provavelmente de origem exógena, presente apenas nestes animais (DALY, 1998).

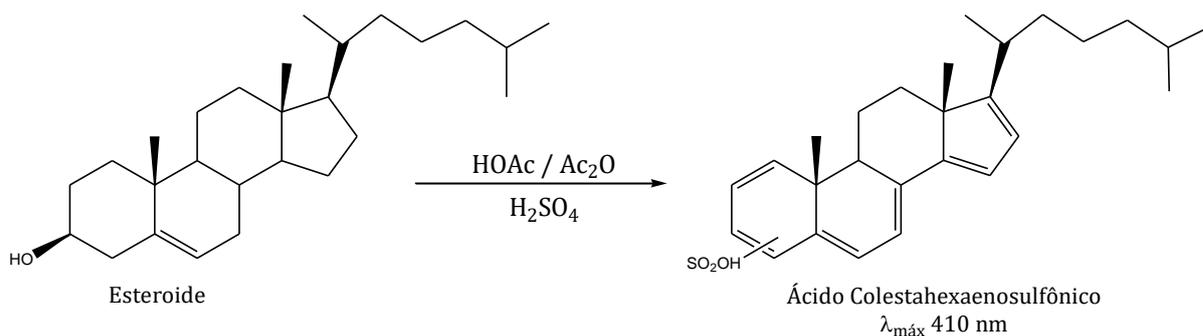


Figura 24: Reação de Liebermann-Burchard na detecção de esteroides (XIONG et al., 2007).

Para fins de confirmação foi realizado teste com vanilina sulfúrica, reagente comumente utilizado na detecção de esteroides e terpenos através de uma reação de desidratação no carbono aldeído da vanilina seguida de condensação com o analito (**Figura 25**) e, mais uma vez, a reação foi negativa. Dessa forma, uma vez que todos os integrantes da família Hylidae possuem glândulas de veneno do tipo granular, e não existem relatos de substâncias obtidas via exógena, a ausência de moléculas esteroides nas suas secreções é totalmente coerente.

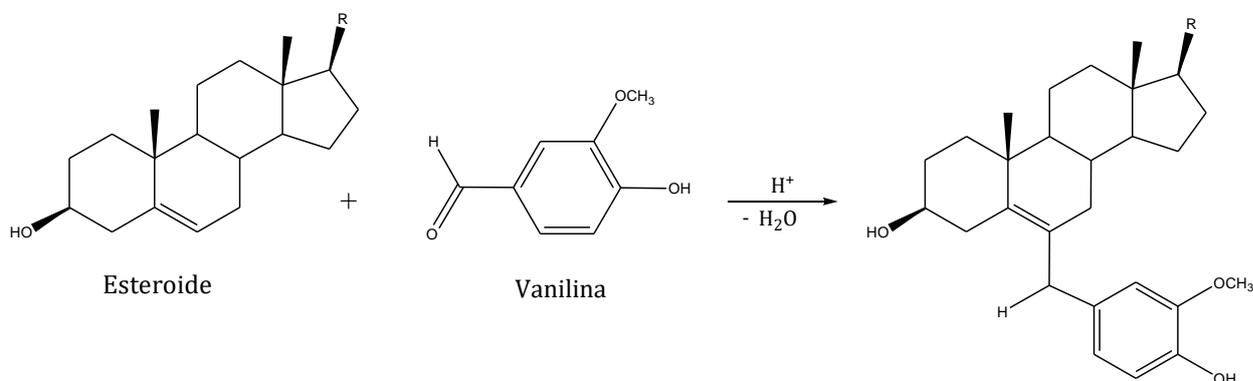


Figura 25: Reação da vanilina sulfúrica na detecção de esteroides (adaptado de JORK et al., 1990).

A análise em CCD para alcaloides, utilizando o reagente de Dragendorff – específico para compostos nitrogenados, também mostrou resultado negativo. Adicionalmente, um teste de exposição a câmara de radiação ultravioleta (254 nm e 365 nm) foi realizado a fim de confirmar o teste de Dragendorff, isto porque alcaloides em geral absorvem luz nestas regiões devido a presença de grupos cromóforos mostrando fluorescência (WAGNER & BLADT, 1996), no entanto, o resultado nesta análise também foi negativo, descartando-se de vez a presença destes compostos.

Assim como no caso dos esteroides, a ausência de alcaloides já era esperada visto que estas moléculas são provenientes de uma dieta característica observada em algumas espécies que se alimentam de formigas e ácaros específicos; estes, por sua vez, alimentam-se de plantas ricas em alcaloides. No entanto o mecanismo de absorção e acúmulo destas moléculas ao longo da cadeia alimentar permanece desconhecido (SAPORITO et al., 2007). Além destas moléculas não serem comuns na família Hylidae, de forma geral, no caso de *Aparasphenodon brunoi* é verificada uma dieta generalista rica em besouros (Coleóptera), animais nunca citados na obtenção de alcaloides (TEIXEIRA et al., 2002; MESQUITA et al., 2004).

A investigação dos compostos amínicos (aminas biogênicas, proteínas e peptídeos) foi a única a revelar resultado positivo nas análises de CCD, realizadas com os reagentes ninidrina etanólica e anisaldeído sulfúrico. A presença destes compostos foi então confirmada, com exceção das amins biogênicas, já que essas moléculas são monoaminas que apresentam os grupos conjugados catecol e indol, logo deveriam absorver luz UV e, como já foi dito, ambas as secreções brutas não mostraram absorção nesta região. No primeiro teste, a ninidrina produz complexos cromóforos, revelando coloração azul-violeta onde a intensidade da cor produzida é proporcional à concentração das espécies presentes (BERNSTEIN & VASCONCELOS, 2000). A reação ocorre por meio de uma desaminação oxidativa dos grupamentos amino livre, através da prévia redução da ninidrina, com posterior condensação da hidridantina (ninidrina reduzida) com uma segunda molécula de ninidrina produzindo um complexo conhecido como Púrpura de Rühmann (**Figura 26**) (JORK et al., 1990; DEWICK, 2002).

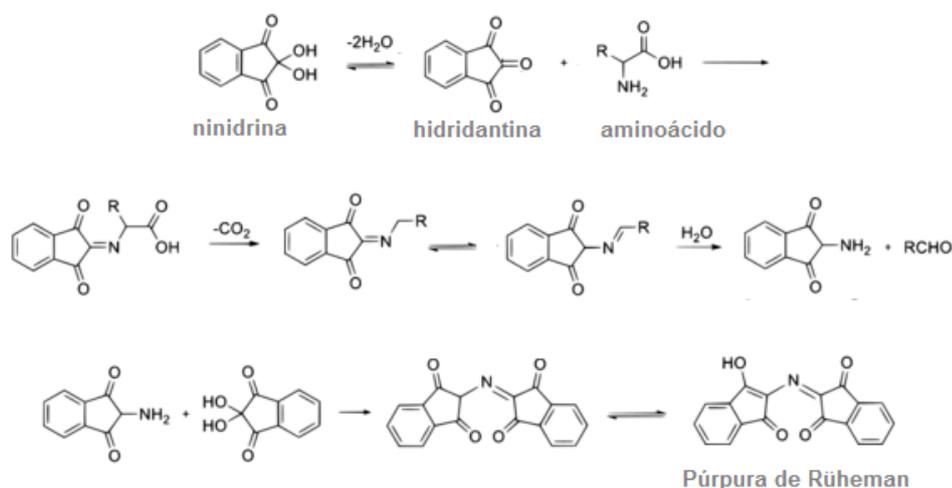


Figura 26: Reação da ninidrina na detecção de compostos amínicos (JORK et al., 1990).

Substâncias contendo aminas secundárias, como algumas aminas biogênicas (ex. epinefrina), reagem por adição nucleofílica seguida de desidratação formando uma imina azometina (base de Schiff) produzindo coloração amarela (**Figura 27**) (BERNSTEIN & VASCONCELOS, 2000; KAUPP, 2003), como tal coloração não foi verificada mais uma vez a ausência destas substâncias foi confirmada. A reação com o anisaldeído sulfúrico foi aplicada na intenção de corroborar o resultado obtido com a ninidrina pois este reagente é utilizado na detecção da ligação peptídica em ensaios de síntese proteica, porém o mecanismo de reação do anisaldeído neste caso é desconhecido (JORK et al., 1990). Em suma, os resultados obtidos nas análises qualitativas colorimétricas estão de acordo com o levantamento realizado por KÖNIG et al. (2015), onde foram relatados apenas compostos proteicos (peptídicos) em Hylidae, família na qual o gênero *Aparasphenodon* está inserido.

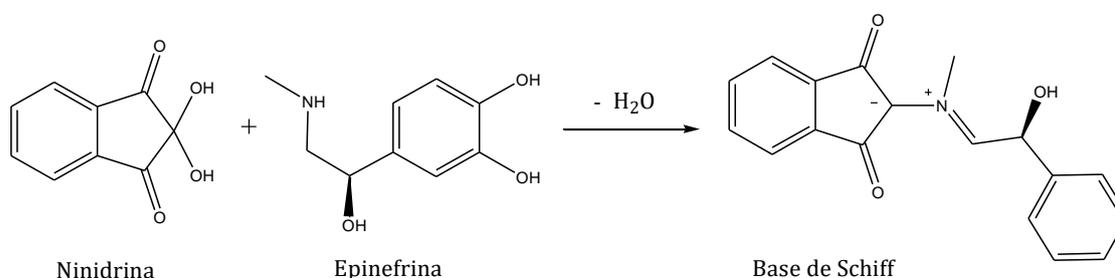


Figura 27: Formação de base de Schiff a partir da reação da ninidrina com amina secundária (adaptado de KAUPP, 2003).

As secreções brutas (Aa e Ab) foram submetidas a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna analítica de fase reversa na intenção de avaliar o número de componentes/frações predominantes na matriz através dos seus respectivos tempos de retenção definidos pela polaridade das moléculas presentes. De acordo com os cromatogramas obtidos, o tempo de retenção total foi bastante curto, sendo detectado todo o volume de amostra injetado em menos de 2 min de análise, isto porque o sistema utilizado na eluição coincidentemente contou com um dos mais eficientes solventes verificados no teste de solubilidade (acetonitrila) e, com isso, a afinidade dos compostos com a fase móvel foi significativamente maior do que a afinidade com a fase estacionária (C18), o que acabou levando a detecção de apenas 4 picos em *A. brunoi* (5 em *A. arapapa*) que mostraram baixa resolução, contendo frações ricas em compostos. Os dois picos de maior intensidade verificados em ambas as análises possuem o mesmo tempo de retenção (0,8 e 1,4 min) e, partindo desta informação, é possível concluir que tais frações de componentes estão igualmente presentes em *A. arapapa* e *A. brunoi*.

O isolamento das substâncias por CLAE em coluna semi-preparativa teve como objetivo fracionar os compostos presentes nas amostras buscando o máximo de pureza possível para posterior determinação estrutural, no entanto esta análise foi bastante prejudicada pois, apesar de terem sido obtidas cerca de 10 frações para cada amostra numa corrida de 15 min, a grande maioria dos componentes ficou acumulada nos primeiros picos, detectados entre 1 e 3 min, sendo esta concentração facilmente visualizada pela área dos picos em questão, pela massa obtida após liofilização das frações coletadas e pela subsequente análise por espectrometria de massas (LC-MS/MS). Esta última foi realizada apenas nas amostras provenientes de *A. brunoi*.

Como visto na **Figura 20**, as proteínas não-caracterizadas foram o maior grupo detectado. Estas proteínas não apresentam regiões estruturais conservadas ou não possuem função biológica conhecida (HAWKINS & KIHARA, 2007). Nas análises proteômicas, é muito comum encontrar este tipo proteína, já que a grande maioria dos genomas ainda não foram totalmente decifrados e, no caso de *Aparasphenodon*, tais informações estão reduzidas a zero. Tendo isto em vista, não se pode afirmar muita coisa acerca dos dados obtidos, sendo necessário um aprofundamento das análises por intermédio do sequenciamento *de novo*. Este tipo de análise difere da aplicada por não fazer uso de informações prévias como DNA ou sequências proteicas estabelecidas, sendo baseada exclusivamente na interpretação dos espectros de massas obtidos por LC-MS/MS, sem recorrer aos softwares ou bancos de dados (STEEN & MANN, 2004; CANTÚ et al., 2008).

Com relação ao colágeno, segunda proteína de maior incidência detectada, é possível inferir que a grande quantidade detectada está relacionada ao método de estimulação elétrica aplicado na obtenção das secreções. Isto porque, assim como a queratina (detectada em menor proporção), o colágeno é uma proteína estrutural, muito encontrada no tecido conjuntivo dos animais, o que lhes confere elasticidade e resistência mecânica (NELSON & COX, 2004). O tecido conjuntivo, por sua vez, pode ser encontrado logo abaixo do tecido epitelial que, nos anfíbios, consiste em uma camada bastante fina, por ser altamente permeável (DUELLMAN & TRUEB, 1994). Sendo assim, uma pequena injúria realizada sobre o tegumento destes animais pode facilmente atingir a camada conjuntiva, liberando colágeno e queratina para o meio extracelular.

Já as demais proteínas, agrupadas em 'outros' na **Figura 20**, apresentaram origem e funções variadas, podendo ser subdivididas em enzimas, proteínas de membrana (estruturais e receptores), proteínas ligantes e fatores de transcrição. No entanto, devido ao fato da homologia determinada pelo software ter utilizado como parâmetro *Equus caballus*, uma

espécie filogeneticamente distante dos anfíbios, é muito provável que o grau de confiabilidade das informações seja baixo e, portanto, nenhuma conclusão acerca destas proteínas pode ser realizada nesta primeira análise.

2. Avaliação Biológica

Como os resultados de composição química não foram conclusivos, a análise dos ensaios biológicos será baseada na resposta fisiológica produzida pelas secreções de *A. arapapa* e *A. brunoi*. Poucos são os relatos envolvendo intoxicação acidental por *Aparasphenodon*, mas todos convergem para um mesmo sintoma: a dor intensa. R. REBOUÇAS (comunicação pessoal) e LYNCH & RAMIREZ (2000) mencionaram intensa dor na córnea enquanto JARED et al. (2015) descreveram uma forte dor no braço que se espalhava ao longo dele com o passar do tempo. Sendo assim, o primeiro passo no entendimento da toxicidade destas secreções, assim como seu mecanismo de ação, é o conhecimento do processo de geração da dor.

A sensação de dor é uma resposta ao estímulo sobre o SNC, de origem interna ou externa, que atua sobre o receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) (RANDALL et al., 2011). O TRPV1 é um receptor excitatório ionotrópico, mais especificamente um canal de íons controlado por ligante (agonista) que, apesar de não-seletivo, apresenta alta afinidade por íons Ca^{+2} (KHATIBI et al., 2011; FEIN et al., 2011). Esta proteína funciona como mediador de neurotransmissores relacionados à resposta da dor; e, em alguns casos, por uma sensação de queimação. Também é responsável por iniciar a resposta anti-inflamatória local e pela recuperação de tecidos danificados (CATERINA et al., 2000). Proteínas TRP já foram encontradas na membrana plasmática de células neuronais e não neuronais de vários vertebrados; também foram identificadas em alguns invertebrados e microrganismos (CHANG et al., 2010).

Um homólogo aos TRPs presentes em mamíferos foi detectado em células de levedura, e um novo subtipo desta classe de proteínas foi então criado, o chamado Yvc1 (*yeast vacuolar conductance 1*) ou TRPY1 (PALMER et al., 2001). O Yvc1, ao contrário dos demais subtipos, não é expresso na membrana plasmática, apenas na membrana dos vacúolos das leveduras (SU et al., 2009).

Os vacúolos nas leveduras possuem função semelhante à do retículo endoplasmático (RE) nas células animais, visto que também atuam na homeostasia do cálcio citoplasmático em associação a mitocôndria. Este processo envolve a liberação de íons Ca^{+2} pelo RE (ou

vacúolo) em situações de baixa concentração citoplasmática enquanto a mitocôndria os absorve quando esta concentração aumenta. A importância da regulação dos níveis intracelulares de Ca^{+2} reside no fato deste ser um sinalizador muito versátil, atuando na ativação/inibição de muitos processos bioquímicos (BERRIDGE et al., 2000; NILIUS et al., 2007).

A ativação do receptor TRPV1 promove a abertura do canal iônico com consequente influxo de íons Ca^{+2} para o interior da célula, que leva ao aumento dos níveis intracelulares deste cátion. Da mesma forma, o TRPV1 pode ser ativado a partir de um agonista (especialmente compostos aromáticos), provocando a liberação de íons Ca^{+2} do vacúolo em direção ao citoplasma (NILIUS & OWSIANIK, 2011).

No caso de um estímulo fraco, com baixo acúmulo de cálcio livre no citoplasma, a mitocôndria não será atingida e o Ca^{+2} atuará apenas na ativação da transcrição gênica e proliferação celular. Esta ativação ocorre através da sua complexação com proteínas dependentes de Ca^{+2} (e.g. calmodulina e Ras) que irão se ligar a proteínas quinases (WEST et al., 2001; CULLEN & LOCKYER, 2002; YANG et al., 2010). Ocorre então a cascata de reações mitógeno-ativadoras (cascata MAPK) baseada na fosforilação de seus intermediários, que atuarão no núcleo da célula como cofatores de transcrição (**Figura 28**) (KUPZIG et al., 2005; CHEN & THORNER, 2007). Quando o estímulo é mais forte, o Ca^{+2} poderá promover a morte celular programada (apoptose).

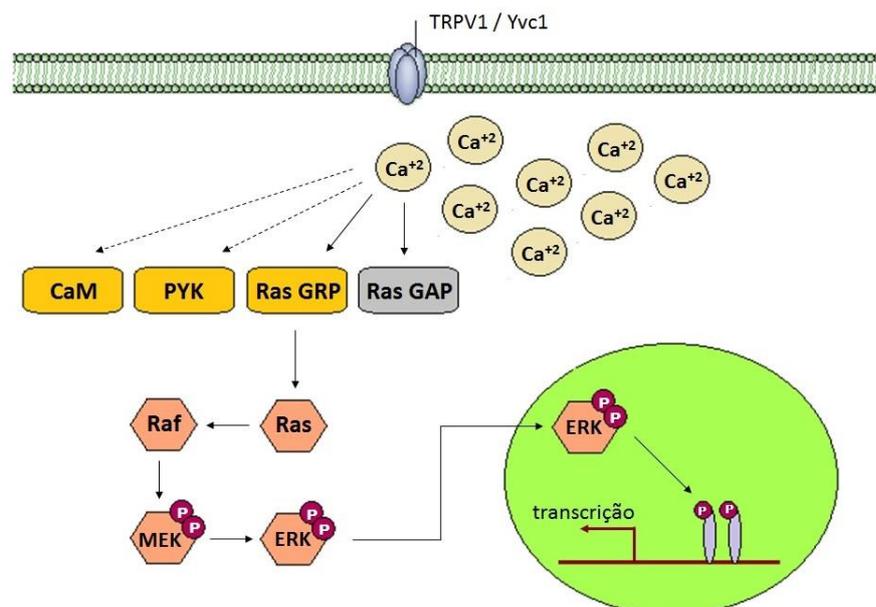


Figura 28: Cascata MAPK induzida pela alta concentração citosólica de Ca^{+2} livre (adaptado de THOMAS & HUGANIR, 2004; CHUDERLAND & SEGER, 2008)

A apoptose está relacionada à modificação da mitocôndria durante o processo de regulação dos íons Ca^{+2} estimulado pelo rápido aumento da sua concentração intracelular. Nesta situação, o desequilíbrio promove uma desregulação na ciclagem de íons na membrana externa da mitocôndria, num efeito chamado transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). A mitocôndria passa a importar íons Ca^{+2} , aumentando a concentração interna dos mesmos; que graças ao balanço osmótico leva ao inchamento da organela, seguido de rompimento da membrana com consequente liberação dos fatores pró-apoptóticos para o citoplasma. Estes fatores ativarão a via das caspases, culminando na fragmentação do DNA e morte celular (**Figura 29**) (CHOI, 1992; DONG et al., 2009; GIORGI et al., 2012).

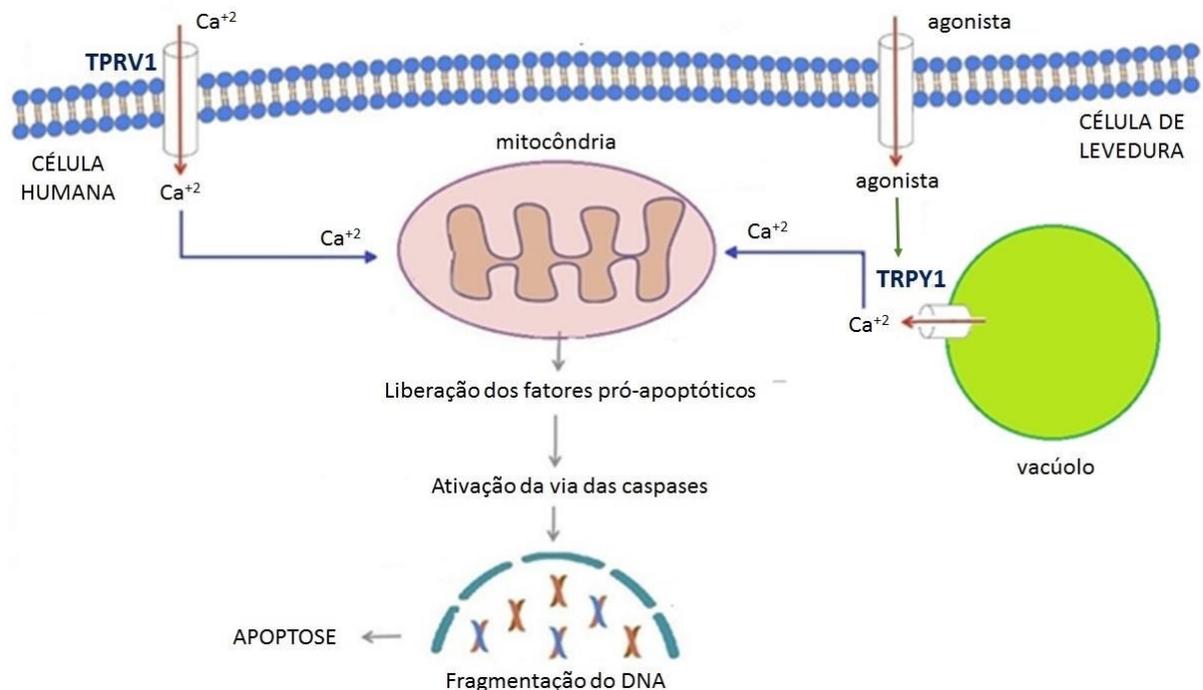


Figura 29: Intoxicação da mitocôndria pelo aumento da concentração de Ca^{+2} , em células humanas (esquerda) e células de levedura (direita) (adaptado de HAUPT et al., 2015).

No caso das leveduras, como o receptor está localizado no interior da célula, o ligante deverá atravessar a parede celular e a membrana plasmática. Esta última é composta por uma bicamada lipídica e por proteínas transmembranares, que formam os canais de substratos (NELSON & COX, 2004). O transporte através da membrana pode ser dado de várias formas, dentre elas a difusão facilitada através destes carreadores proteicos – um tipo de transporte passivo utilizado por moléculas polares de alto peso molecular (e.g. proteínas) incapazes de permear a bicamada lipídica (NELSON & COX, 2004).

Já a parede celular das leveduras é composta basicamente por polissacarídeos (ORLEAN, 2012); cerca de 2% destas moléculas é representada por derivados do ácido glicurônico (RUIZ-HERRERA, 1991; MOREIRA et al., 1998). JARED et al (2015) observaram que a secreção de *A. brunoii* apresenta atividade análoga à enzima hialuronidase, uma hidrolase capaz de romper a ligação glicosídica do ácido glicurônico (JIN et al., 2014). Sendo assim, é possível inferir que a secreção de *A. brunoii* tem capacidade de permear a parede celular sem provocar a sua desintegração. Além disso, como os testes relativos à composição química revelaram expressiva semelhança entre as espécies, pode-se concluir que o mesmo comportamento será observado em *A. arapapa*.

É importante ressaltar ainda que a ativação da morte celular programada dependerá da força do estímulo e, no caso da toxicidade por cálcio em leveduras, a intensidade da resposta também dependerá da vulnerabilidade da célula, que está relacionada ao seu estágio de crescimento e/ou às vias metabólicas atuantes. Outra consideração a ser feita com relação às leveduras é que o nível de expressão da proteína Yvc1 durante a primeira fase exponencial de crescimento é baixo (CHANG et al., 2010), portanto a resposta celular observada pode ser subestimada em comparação à força do estímulo aplicado.

O crescimento celular das leveduras é dado em 4 fases (**Figura 30**). Até alcançar a fase diáuxica (cerca de $1,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ de células/meio de cultura) as células encontram-se mais vulneráveis, pois seu metabolismo está todo voltado para a proliferação celular e muitas vias de defesa ainda não foram completamente estabelecidas. A partir da segunda fase exponencial do crescimento (cerca de $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ de células/meio de cultura), os nutrientes tornam-se escassos e a proliferação celular é mais lenta do que na primeira fase exponencial do crescimento; nesse caso, a célula então torna-se mais resistente, pois o metabolismo é respiratório e altamente oxidante obrigando a célula a sintetizar e ativar mecanismos de defesa intracelular (BUSTI et al, 2010). Do ponto de vista metabólico, durante a respiração celular, as mitocôndrias estarão responsáveis pela obtenção de energia, aumentando a fragilidade da célula. Em resumo, as células de levedura são mais frágeis nos primeiros estágios de crescimento e durante a fermentação.

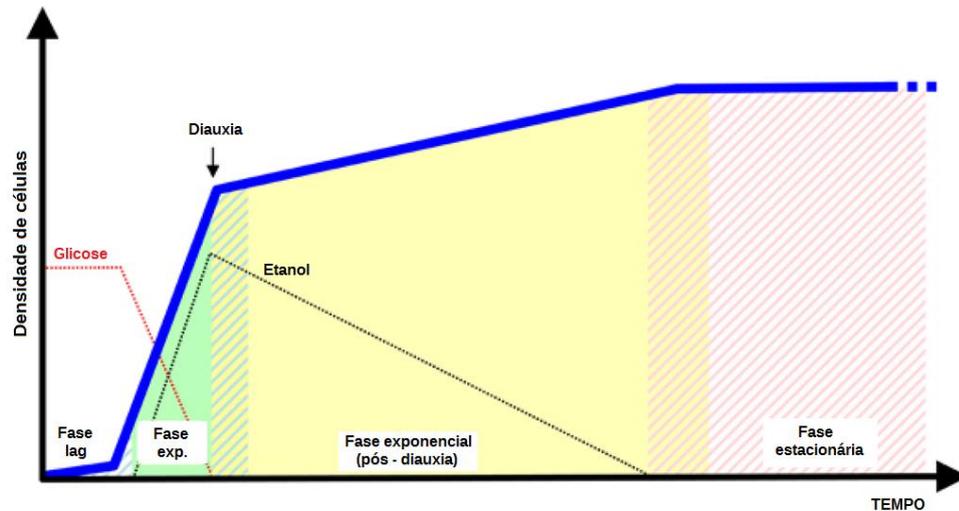


Figura 30: Curva de crescimento da levedura *S. cerevisiae* (adaptado de BUSTI et al, 2010).

Ao contrário do que era esperado, o ensaio de viabilidade celular, realizado em meio de cultura fermentável durante a primeira fase de crescimento exponencial das leveduras, não revelou redução da sobrevivência em nenhuma das duas concentrações testadas ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para ambas as espécies (**Figura 21**); ou seja, não foi tóxica. Uma possível explicação seria que, apesar da liberação de cálcio (proveniente do vacúolo) estar ocorrendo, não é suficiente para promover danos às mitocôndrias das leveduras. Logo, neste caso, o fluxo de cálcio para o citoplasma estaria provocando apenas a ativação das proteínas desencadeadoras de proliferação celular. Com isso, a resposta intracelular teria induzido, ao invés de morte celular, a replicação das células, garantindo assim o saldo positivo na contagem de UFCs e a manutenção da viabilidade celular.

Já no caso dos ensaios de danos mitocondriais o inverso foi observado, porém apenas na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das secreções brutas de *A. arapapa* e *A. brunoi* (**Figura 22**). Neste ensaio, as células foram inoculadas em meio de cultura não fermentável e a ativação das mitocôndrias foi fundamental para sua sobrevivência, com isso, a sensibilidade aos processos indutores de disfunção mitocondrial foi aumentada. Portanto, ainda que os estímulos tenham sido os mesmos aplicados anteriormente, o efeito tóxico foi amplificado devido à vulnerabilidade celular. Dessa forma, a concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi suficiente para provocar redução na sobrevivência das células, traduzida no saldo negativo obtido na contagem de UFCs em meio com glicerol. É relevante notar que, nos ensaios *in vivo* realizados por JARED et al. (2015) para a medição de nocicepção em ratos, foram testadas concentrações entre $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1mg.mL^{-1} e todas promoveram atividade, portanto, o resultado encontrado neste estudo está em concordância com aqueles descritos na literatura.

Em uma nova perspectiva, o desequilíbrio iônico na mitocôndria provocado pela TPM pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), aumentando o estresse oxidativo que, além de provocar a debilitação da membrana plasmática através da peroxidação dos lipídios, também pode levar à morte celular por apoptose através da perda de seletividade iônica e liberação do conteúdo das organelas, e formação de produtos citotóxicos como o malonaldeído (MDA), um aldeído extremamente reativo (**Figura 31**) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; PILZ et al. 2000; MURPHY, 2009).

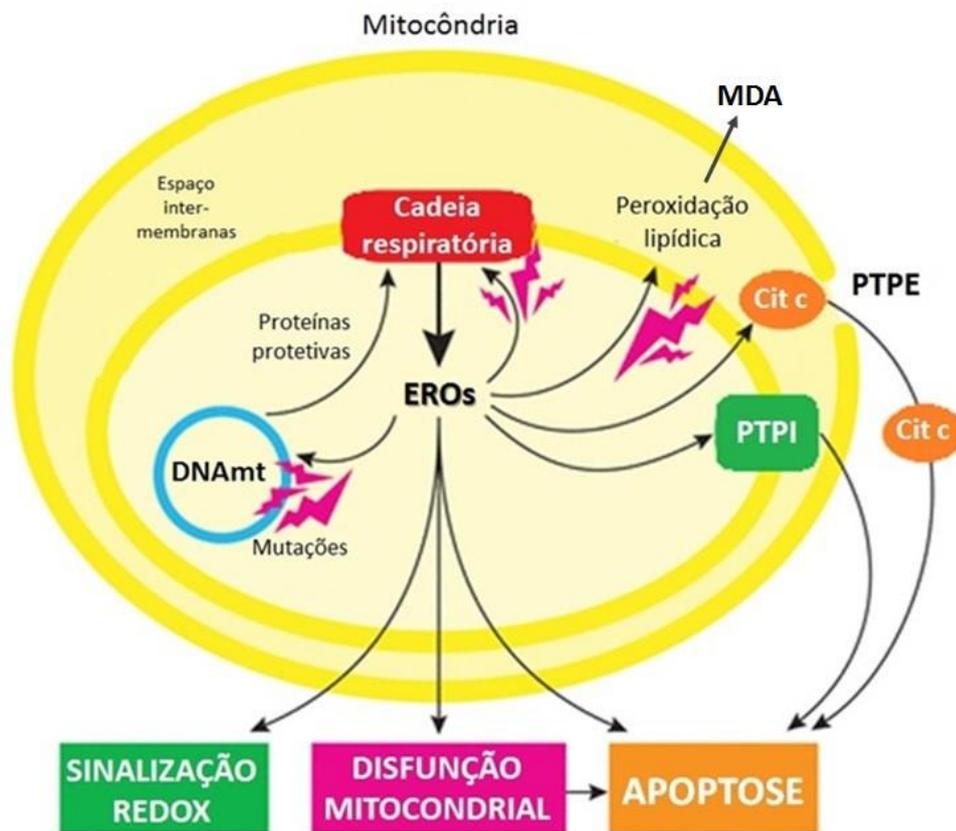


Figura 31: Esquema de estresse oxidativo provocado pela formação de EROs (adaptado de MURPHY, 2009).

O método TBARS aplicado neste estudo visa justamente determinar a quantidade de MDA formado durante o possível estresse oxidativo. No entanto, nenhuma das concentrações testadas ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) mostrou reação positiva em ambas as espécies (**Figura 23**). Considerando que o estresse oxidativo é um desequilíbrio bioquímico onde a produção de EROs excede a capacidade protetiva da célula (BARBOSA et al., 2010), é possível que, neste caso, as defesas naturais da organela tenham sido suficientes para sobrepor o efeito tóxico. Logo, assim como na viabilidade celular, o estímulo aplicado não foi suficiente para provocar danos celulares.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluimos que as secreções cutâneas liberadas pelas espécies *A. brunoi* e *A. arapapa* apresentam conteúdo proteico e, no caso de *A. brunoi*, a maioria das proteínas presentes não possuem correlação com os padrões depositados nos bancos de dados, indicando que ainda há muito trabalho a ser feito com relação a toxina de tais espécies. Pretendemos neste sentido dar continuidade as análises estruturais para que as devidas conclusões a respeito da função molecular e biológica destes componentes seja esclarecida. Além de possibilitar uma análise comparativa entre as espécies em questão, fornecendo assim um panorama filogenético mais detalhado.

Concluimos também que as secreções das espécies *A. brunoi* e *A. arapapa* apresentam perfil toxico semelhante, comportando-se de forma similar em todos os ensaios realizados. Não foram verificadas grandes perturbações a nível bioquímico/celular, indicando que a principal atuação das toxinas é de fato sistêmica. Porém, como o ensaio de dano as mitocôndrias revelaram perda de viabilidade celular na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, novos testes deverão realizados a fim de corroborar o caminho da resposta intracelular proposta neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, R. R. N. Relationships between fauna and people and the role of ethnozoology in animal conservation. *Ethnobiology and Conservation*, v. 1, n. 2, p. 1-69, 2012.
- ALVES, R. R. N. & ROSA, I. L. *Animals in traditional folk medicine*. Springer, 2014.
- AMICHE, M.; SEON, A. A.; PIERRE, T. N.; NICOLAS, P. The dermaseptin precursors: a protein family with a common preproregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS letters*, v. 456, n. 3, p. 352-356, 1999.
- ANDRADE, D. V. & ABE, A. S. Evaporative water loss and oxygen uptake in two casque-headed tree frogs, *Aparasphenodon brunoi* and *Corythomantis greeningi* (anura, hylidae). *Comparative biochemistry and physiology part a: physiology*, v. 118, n. 3, p. 685-689, 1997.
- ARBUCKLE, K. *Evolutionary Context of Venom in Animals*. 2015.
- ASSIS, C. L. DE, D. J. SANTANA, F. A. DA SILVA, F. M. QUINTELA, AND R. N. FEIO. A new and possibly critically endangered species of casque-headed tree frog *Aparasphenodon* Miranda-Ribeiro, 1920 (anura, hylidae) from southeastern Brazil. *Zootaxa*, v. 3716, p. 583–591, 2013.
- BADIO, B.; GARRAFFO, H. M.; PLUMMER, C. V.; PADGETT, W. L.; DALY, J. W. Synthesis and nicotinic activity of epiboxidine: an isoxazole analogue of epibatidine. *European journal of pharmacology*, v. 321, n. 2, p. 189-194, 1997.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BECHINGER, B. & LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1758, n. 9, p. 1529-1539, 2006.
- BERNARDE, P. S. *Anfíbios e répteis - introdução ao estudo da herpetofauna brasileira*. Anolis books, Curitiba, 2012.
- BERNARDE, P. S. & SANTOS, R. A. Utilização medicinal da secreção (“vacina-do-sapo”) do anfíbio kambô (*Phyllomedusa bicolor*) (anura: hylidae) por população não-indígena em espigão do oeste, Rondônia, Brasil. *Biotemas*, v. 22, n. 3, p. 213-220, 2011.
- BERNSTEIN, A. & VASCONCELOS, A. M. H. *Cursos práticos em bioquímica*. Rio de Janeiro: 10° ed., ed. da ufrj, 2000.

- BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 1, n. 1, p. 11-21, 2000.
- BERTOLUCI, J. et al. Species composition and similarities among anuran assemblages of forest sites in southeastern Brazil. *Scientia Agricola*, v. 64, n. 4, p. 364-374, 2007.
- BICK, R. J.; POINDEXTER, B. J.; SWENEY, R. R.; DASGUPTA, A. Effects of *chan su*, a traditional chinese medicine, on the calcium transients of isolated cardiomyocytes: cardiotoxicity due to more than na, k-atpase blocking. *Life Sciences*, v. 72, n. 6, p. 699-709, 2002.
- BITTERMAN, K. J.; MEDVEDIK, O.; SINCLAIR, D. A. Longevity Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Linking Metabolism, Genome Stability, and Heterochromatin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, n. 3, p. 376-399, 2003.
- BORZELLECA, J. F. Paracelsus: herald of modern toxicology. *Toxicological Sciences*, v. 53, n. 1, p. 2-4, 2000.
- BRADLEY, D. Frog venom cocktail yields a one-handed painkiller. *Science*, v. 261, p. 1117, 1993.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005.
- BURBACH, J. P. H. What are neuropeptides?. *Neuropeptides: Methods and protocols*, p. 1-36, 2011.
- BUSTI, S.; COCCETTI, P.; AALBERGHINA, L. & VANONI, M. Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sensors*, v. 10, n. 6, p. 6195-6240, 2010.
- CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Química Nova*, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.
- CATERINA, M. J.; LEFFLER, A.; MALMBERG, A. B.; MARTIN, W. J.; TRAFTON, J.; PETERSEN-ZEITZ, K. R.; KOLTZENBURG, M.; BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, v. 288, p. 306-313, 2000.
- CHANG, Y.; SCHLENSTEDT, G.; FLOCKERZI, V.; BECK, A. Properties of the intracellular transient receptor potential (TRP) channel in yeast, Yvc1. *FEBS Letters*, v. 584, n. 10, p. 2028-2032, 2010.

- CHEN, R. E. & THORNER, J. Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 1773, n. 8, p. 1311-1340, 2007.
- CHOI, D. W. Excitotoxic cell death. *Journal of neurobiology*, v. 23, n. 9, p. 1261-1276, 1992.
- CHUDERLAND, D. & SEGER, R. Calcium regulates ERK signaling by modulating its protein-protein interactions. *Communicative & Integrative Biology*, v. 1, n. 1, p. 4-5, 2008.
- CLARKE, B. T. the natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biological reviews of the Cambridge philosophical society*, v. 72, n. 03, p. 365-379, 1997.
- COSTA, T. O. G. Purificação e determinação estrutural de substâncias bioativas em três espécies de *Osteocephalus* (amphibia:anura:hylidae). Tese de doutorado, 2005.
- CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. *Natural products from plants*. CRC Press, 2016.
- CULLEN, P. J. & LOCKYER, P. J. Integration of calcium and Ras signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 3, n. 5, p. 339-348, 2002.
- DALY, J. W. et al. Frog secretions and hunting magic in the upper Amazon: identification of a peptide that interacts with an adenosine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 89, n. 22, p. 10960-10963, 1992.
- DALY, J. W.; KANEKO, T.; WILHAM, J.; GARRAFFO, H. M.; SPANDE, T. F.; ESPINOSA, A.; DONNELLY, M. A. Bioactive alkaloids of frog skin: combinatorial bioprospecting reveals that pumiliotoxins have an arthropod source. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 22, p. 13996-14001, 2002.
- DALY, J. W. Thirty years of discovering arthropod alkaloids in amphibian skin. *Journal of natural products*, v. 61, n. 1, p. 162-172, 1998.
- DE LIMA, M. E. et al. Toxinology in Brazil: A big challenge for a rich biodiversity. *Toxicon*, v. 56, n. 7, p. 1084-1091, 2010.
- DE LIMA, E. C. & LABATE, B. C. "Remédio da Ciência" e "Remédio da Alma": os usos da secreção do kambô (*Phyllomedusa bicolor*) nas cidades. *Campos*, v. 8, n. 1, p. 71-90, 2007.
- DEN BRAVE, P. S.; BRUINS, E.; BRONKHORST, M. W. G. A. *Phyllomedusa bicolor* skin secretion and the Kambô ritual. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 20, n. 1, p. 1, 2014.

- DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons, 2002.
- DODD, C. K. Amphibian ecology and conservation: a handbook of techniques. Oxford University Press, 2010.
- DONG, X.; WANG, Y.; QIN, Z. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 30, n. 4, p. 379-387, 2009.
- DUELLMAN, W. E. & TRUEB, L. *Biology of Amphibians*. 1994.
- DUELLMAN, W. E.; MARION, A. B.; HEDGES, S. B. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (amphibia: anura: arboranae). *Zootaxa*, v. 4104, p. 1-109, 2016.
- DUTERTRE, S. et al. Evolution of separate predation-and defence-evoked venoms in carnivorous cone snails. *Nature communications*, v. 5, 2014.
- DVELA, M.; ROSEN, H.; FELDMANN, T.; NESHER, M.; LICHTSTEIN, D. Diverse biological responses to different cardiotonic steroids. *Pathophysiology*, v. 14, n. 3, p. 159-166, 2007.
- FEIN, A.; PETROV, P.; FRANCISCHI, J. N. & FERREIRA, S. H. Nociceptores: as células que sentem dor. *Dor Online*, p. 1-106, 2011. Disponível em: <http://www.dol.inf.br/nociceptores>. Acessado em: setembro de 2016.
- FERREIRA, A.L.A. & MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Associação Médica Brasileira*, vol. 43, n.1, p. 61-68, 1997.
- FLIER, J.; EDWARDS, M.W.; DALY, J.W.; MYERS, C.W. Widespread occurrence in frogs and toads of skin compounds interacting with the ouabain site of Na⁺, K⁺- ATPase. *Science*, v. 208, p. 503–505, 1980.
- FRICKER, L. D. Neuropeptides and other bioactive peptides: from discovery to function. In: *Colloquium Series on Neuropeptides*. Morgan & Claypool Life Sciences, p. 1-122, 2012.
- FROST, D. R. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 6.0 (acessado em agosto, 2016). Disponível em <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- FRY, B.G.; KOLUDAROV, I.; JACKSON, T.N.; HOLFORD, M.; TERRAT, Y.; CASEWELL, N. R.; SUNAGAR, K. Seeing the woods for the trees: understanding venom evolution as a guide for biodiscovery. In *Venoms to drugs: venom as a source for the development of human therapeutics*. Royal society of chemistry, 2015.

GIORGI, C.; BALDASSARI, F.; BONONI, A.; BONORA, M.; DE MARCHI, E.; MARCHI, S.; MISSIROLI, S.; PATERGNANI, S.; RIMESSI, A.; SUSKI, J. M.; WIECKOWSKI, M. R.; PINTON, P. Mitochondrial Ca²⁺ and apoptosis. *Cell Calcium*, v. 52, n. 1, p. 36-43, 2012.

GOWDA, R. M.; COHEN, R. A.; KHAN, I. A. Toad venom poisoning: resemblance to digoxin toxicity and therapeutic implications. *Heart*, v. 89, n. 4, 2003.

GRAHAM, L. D. et al. An adhesive secreted by Australian frogs of the genus *Notaden*. In: *Biological adhesives*. Springer Berlin Heidelberg, p. 207-223, 2006.

GRANT, J. B. & LAND, B. Transcutaneous Amphibian Stimulator (TAS): a device for the collection of amphibian skin secretions. *Herpetological Review*, v. 33, n. 1, p. 38-40, 2002.

GRUBER, S.; HADDAD, C.; KASAHARA, S. Karyotype analysis of seven species of the tribe Lophiohylini (hylinae, hylidae, anura), with conventional and molecular cytogenetic techniques. *Comparative cytogenetics*, v. 6, n. 4, p. 409, 2012.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; GUYTON, A. C. *Tratado de fisiologia médica*. Elsevier Brasil, 2006.

HAUPT, S.; RAGHU, D.; HAUPT, Y. p53 calls upon CIA (Calcium Induced Apoptosis) to counter stress. *Frontiers in Oncology*, v. 5, p. 57, 2015.

HAYES, A. W. *Principles and methods of toxicology*. Taylor & Francis Routledge, 2001.

HEYER, W.R.; DONNELLY, M.A.; MCDIARMID, R.W.; HAYEK, L. A. C.; FOSTER, M. S. *measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians*. Smithsonian Institution Press, 1994.

HONG, Z.; CHAN, K.; YEUNG, H. W. Simultaneous determination of bufadienolides in traditional Chinese medicine preparations, Liu-Shen-Wan by liquid chromatography. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 44, p. 1023-1026, 1992

HYUN, D. W. et al. Toad Venom Poisoning Resembling Digitalis Intoxication and Hyperkalemia: A Case Report. *Korean Circulation Journal*, v. 37, n. 6, p. 283-286, 2007.

JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M.; KATCHBURIAN, E.; TOLEDO, R. C.; FREYMÜLLER, E. Some aspects of the natural history of the casque-headed tree frog *Corythomantis greeningi* boulenger (hylidae). *Annales des sciences naturelles-zoologie et biologie animale*, vol. 20, n. 3, p. 105-115, 1999.

JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M.; NAVAS, C. A.; KATCHBURIAN, E.; FREYMÜLLER, E.; TAMBOURGI, D. V.; RODRIGUES, M. T. Head co-ossification, phragmosis and defence in the

casque-headed tree frog *Corythomantis greeningi*. Journal of zoology, v. 265, n. 1, p. 1-8, 2005.

JARED, C.; MAILHO-FONTANA, P. L.; ANTONIAZZI, M. M.; MENDES, V. A.; BARBARO, K. C.; RODRIGUES, M. T.; BRODIE, E. D. Venomous frogs use heads as weapons. Current Biology, v. 25, n. 16, p. 2166-2170, 2015.

JIN, P.; KANG, Z; ZHANG, N.; DU, G.; CHEN, J. High-yield novel leech hyaluronidase to expedite the preparation of specific hyaluronan oligomers. Scientific Reports, v. 4471, n. 4, p. 1-8, 2014.

JORK, H. et al. Thin-layer chromatography. reagents and detection methods. Volume 1a: vch, weinheim, 1990.

JUNQUEIRA, L. C & CARNEIRO, J. Histologia básica. 11^o ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.

KARALLIEDDE, L. Animal toxins. British Journal of Anaesthesia, v. 74, n. 3, p. 319-327, 1995.

KAUPP G. Solid-state molecular syntheses: complete reactions without auxiliaries based on the new solid-state mechanism. Crystengcomm, v. 5, n. 23, p. 117-133, 2003.

KAWANO, D. F. et al. Acidentes com os medicamentos: como minimizá-los. Rev Bras Ciênc Farm, v. 42, n. 4, 2006.

KHATIBI, N. H.; JADHAV, V.; CHARLES, S.; CHIU, J.; BUCHHOLZ, J.; TANG, J.; & ZHANG, J. H. Capsaicin pre-treatment provides neurovascular protection against neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. In Intracerebral Hemorrhage Research. Springer Vienna, p. 225-230, 2011.

KÖNIG, E.; BININDA-EMONDS, O. R. P; SHAW, C. The diversity and evolution of anuran skin peptides. Peptides, v. 63, p. 96-117, 2015.

KRENN, L. & KOPP, B. Bufadienolides from animal and plant sources. Phytochemistry, v. 48, p. 1-29, 1998.

KRUGLIAK, M. et al. Antimalarial activities of dermaseptin S4 derivatives. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 44, n. 9, p. 2442-2451, 2000.

KUPZIG, S.; WALKER, S. A.; CULLEN, P. J. The frequencies of calcium oscillations are optimized for efficient calcium-mediated activation of Ras and the ERK/MAPK cascade. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 102, n. 21, p. 7577-7582, 2005.

- LABATE, B. C. & DE LIMA, E. C. Medical Drug or Shamanic Power Plant: The Uses of Kambô in Brazil. *Revista do núcleo de antropologia urbana da USP*, n. 15, 2014.
- LANTYER-SILVA, A. S. F.; SOLE, M.; ZINA, J. Reproductive biology of a bromeligenous frog endemic to the Atlantic Forest: *Aparasphenodon arapapa* Pimenta, Napoli and Haddad, 2009 (Anura: Hylidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 86, n. 2, p. 867-880, 2014.
- LOPES, R. R. F. B.; QUESSADA, A. M.; BORGES, T. B. Intoxicação por toxina de sapo em um cão - relato de caso. *Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer*, v.10, n.19, p. 1234-1240, 2014.
- LÓPEZ-LÓPEZ, J. M.; SANABRIA, M. R.; DE PRADA, S. J. Ocular toxicity caused by toad venom. *Cornea*, v. 27, n. 2, p. 236-237, 2008.
- LUTZ, B. Venomous toads and frogs. *venomous animals and their venoms*, v. 2, p. 423-473. In *Venomous animals and their venoms: venomous vertebrates*. Elsevier, 2013.
- LYNCH, J. D.; RAMÍREZ, M. A. V. Lista preliminar de especies de anuros del Departamento del Guainía, Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, v. 24, n. 93, p. 579-589, 2000.
- MAGALHÃES, B. S.; MELO, J. A.; LEITE, J. R. S.; SILVA, L. P.; PRATES, M. V.; VINECKY, F.; BEMQUERER, M. P. Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 377, n. 4, p. 1057-1061, 2008.
- MATSUZAKI, K. Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1462, n. 1, p. 1-10, 1999.
- MELO, M. N.; FERRE, R.; CASTANHO, M. A. R. B. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, n. 3, p. 245-250, 2009.
- MERTENS, R. Ein neuer laubfrosch aus venezuela. *Senckenbergiana biológica*, v. 31, p. 1-10, 1950.
- MESQUITA et al. Ecology of the casque-headed frog *Aparasphenodon brunoi* (Anura, Hylidae), 2004.
- MOLLO-NETO, A. & TEIXEIRA JR, M. Checklist of the genus *Aparasphenodon* Miranda-Ribeiro, 1920 (Anura: Hylidae): distribution map, and new record from São Paulo state, Brazil. *Check list*, v. 8, n. 6, p. 1303-1307, 2012.

- MOR, A. & NICOLAS, P. The NH₂-terminal alpha-helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 3. p. 1934-1939, 1994.
- MOREIRA, A. S.; SOUZA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. Determinação da composição de biopolímero por cromatografia em camada delgada: metodologia. *Current Agricultural Science and Technology*, v. 4, n. 3, p. 222-224, 1998.
- MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, v. 417, n. 1, p. 1-13, 2009.
- MYERS, C. W.; DALY, J. W.; MALKIN, B. A dangerously toxic new frog (*Phyllobates*) used by Embera Indians of western Colombia, with discussion of blowgun fabrication and dart poisoning. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 161, p. 1-28, 1978.
- NAVAS, C. A.; JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M. Water economy in the *casque-headed tree-frog Corythomantis greeningi* (Hylidae): role of behaviour, skin, and skull skin co-ossification. *Journal of Zoology*, v. 257, n. 4, p. 525-532, 2002.
- NECKEL-OLIVEIRA, S. & GORDO, M. Anfíbios, Lagartos e Serpentes do Parque Nacional do Jaú. In: Borges, S.H.; Iwanaga, S.; Durigan, C.C. & Pinheiro, M.R. (Eds.). *Janelas para a Biodiversidade no Parque Nacional do Jaú: Uma estratégia para o estudo na biodiversidade da Amazônia*. Manaus, Fundação Vitória Amazônica. p. 161-173, 2004.
- NELSON, D. L. & COX, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*. Sarvier, 2004.
- NETO, P. A. S. P & CAETANO, L. C. *Plantas medicinais: do popular ao científico*. UFAL, 2005.
- NILIUS, B.; OWSIANIK, G.; VOETS, T.; PETERS, J. A. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiological Reviews*, v. 87, n. 1, p. 165-217, 2007.
- NILIUS, B. & OWSIANIK, G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology*, v. 12, n. 3, p. 1-11, 2011.
- ORLEAN, P. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics*, v. 192, n. 3, p. 775-818, 2012.
- PALMER, C. P.; ZHOU, X. L.; LIN, J.; LOUKIN, S. H.; KUNG, C.; SAIMI, Y. A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca²⁺-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 14, p. 7801-7805, 2001.

- PILZ, J.; MEINEKE, I.; GLEITER, C. H. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2, 4- dinitrophenylhydrazine derivative. *Journal of Chromatography B*, v. 742, p. 315-325, 2000.
- PIMENTA, B. V. S; NAPOLI, M. F.; HADDAD, C. F. B. A new species of casque-headed tree frog, genus *Aparasphenodon* Miranda-Ribeiro (Amphibia: Anura: Hylidae), from the Atlantic rainforest of southern Bahia, Brazil. *Zootaxa*, v. 2123, n. 1, p. 46-54, 2009
- POMBAL, J. P. JR. New species of *Aparasphenodon* (Anura: Hylidae) from southeastern Brazil. *Copeia*, p. 1088-1091, 1993.
- POUGH, F. H.; HEISER, J. B.; JANIS, C. M. *A vida dos vertebrados-4ª.edição* editora: atheneu, 2008.
- PRATES, M. V. et al. The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran *Hyla punctata*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 13, p. 13018-13026, 2004.
- PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L. C.; LAMANTIA, A. S.; MCNAMARA, J. O.; WILLIAMS, S. M. *Neuroscience*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2001.
- RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. *Fisiologia Animal (ECKERT)*. Rio de Janeiro. Guanabara & Koogan. 4ª edição, 2000.
- REBOUÇAS, R. *Comunicação pessoal*, 2014.
- RUIZ-HERRERA, J. *Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly*. CRC press, 1991.
- SANTOS FILHO, O. A. & ALENCASTRO, R. B. Modelagem de proteínas por homologia. *Química Nova*, v. 26, n. 2, p. 253-259, 2003.
- SAPORITO, R. A. et al. Oribatid mites as a major dietary source for alkaloids in poison frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 21, p. 8885-8890, 2007.
- SCIANI, J. M. et al. Differences and similarities among parotoid macrogland secretions in South American toads: a preliminary biochemical delineation. *The Scientific World Journal*, v. 2013, 2013.
- SCHONER, W. & SCHEINER-BOBIS, G. Role of endogenous cardiotonic steroids in sodium homeostasis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 23, n. 9, p. 2723-2729, 2008.
- SCHWARTZ, C. A.; CASTRO, M. S.; JÚNIOR, O. P.; MACIEL, N. M.; SCHWARTZ, E. N. F.; SEBEN, A. *Princípios bioativos da pele de anfíbios: panorama atual e perspectivas*.

Herpetologia no Brasil II. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia, p. 146-168, 2007.

SEIBERT, E. A.; LILLYWHITE, H. B.; WASSERBURG, R. J. Cranial coossification in frogs: relationship to rate of evaporative water loss. *Physiol*, v. 47, p. 261-265, 2001.

SIMÕES, M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. E.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6^{ed}. Porto Alegre/Florianópolis: editora da UFRGS/editora da UFSC, 2010.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Peptide Science*, v. 66, n. 4, p. 236-248, 2002.

SMITH, B. P.; WILLIAMS, C. R.; TYLER, M. J.; WILLIAMS, B. D. A survey of frog odorous secretions, their possible functions and phylogenetic significance. *Applied Herpetology*, v. 2, n. 1, p. 47-82, 2004.

SONNE, L.; ROZZA, D. B.; WOLFFENBUTTEL, A. N. Intoxicação por veneno de sapo em um canino. *Ciência Rural*, vol. 38, p. 1787-1789, 2008.

STEELS, E. L.; LEARMONTH, R.P.; WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology*, v. 140, n. 3, p. 569-576, 1994.

STINNER, J. N. & SHOEMAKER, V. H. Cutaneous gas exchange and low evaporative water loss in the frogs *Phyllomedusa sauvagei* and *Chiromantis xerampelina*. *J. Comp. Physiol*, v. 157B, p. 423-427, 1987.

SU, Z.; ZHOU, X.; LOUKIN, S. H.; HAYNES, W. J.; SAIMI, Y.; KUNG, C. The use of yeast to understand TRP-channel mechanosensitivity. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, v. 458, n. 5, p. 861-867, 2009.

SUMMERS, K. Convergent evolution of bright coloration and toxicity in frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 22, p. 12533-12534, 2003.

TEIXEIRA, R. L.; SCHNEIDER, J. A. P.; ALMEIDA, G. I. The occurrence of amphibians in bromeliads from a southeastern Brazilian resting habitat, with special reference to *Aparasphenodon bruno* (Anura, Hylidae). *Brazilian Journal of Biology*, v. 62, n. 2, p. 263-268, 2002.

TOLEDO, R. C. D & JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology part a: Physiology*, v. 111, n. 1, p. 1-29, 1995.

- TOLEDO, L. F.; RIBEIRO, R. S.; HADDAD, C. F. B. Anurans as prey: an exploratory analysis and size relationships between predators and their prey. *Journal of Zoology*, v. 271, n. 2, p. 170-177, 2007.
- TOLEDO, L. F.; SAZIMA, I; HADDAD, C.F.B. Behavioural defences of anurans: an overview. *Ethology ecology & evolution*, v. 23, n. 1, p. 1-25, 2011.
- TRUEB, L. Evolutionary relationships of casque-headed tree frogs with co-ossified skulls (family Hylidae), 1970.
- THOMAS, G. M. & HUGANIR, R. L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 5, n. 3, p. 173-183, 2004.
- VANHOYE, D.; BRUSTON, F.; NICOLAS, P.; AMICHE, M. Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *European Journal of Biochemistry*, v. 270, n. 9, p. 2068-2081, 2003.
- VILELA, V. M. F. N.; BRASSALOTI, R. A.; BERTOLUCI, J. Anurofauna da Floresta de Restinga do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Sudeste do Brasil: Composição de Espécies e Uso de Sítios Reprodutivos. *Biot Neot*, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2011.
- VITT, L. J. & CALDWELL, J. P. *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*. Academic Press, 2014.
- VOET, D. & VOET, J. G. *Biochemistry*, 4^o Ed. NewYork: John Wiley& Sons Inc, 2011.
- WAGNER, H. & BLADT, S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer Science & Business Media, 1996.
- WANG, D. L.; QI, F. H.; TANG, W.; WANG, F. S. Chemical constituents and bioactivities of the skin of *Bufo bufo gargarizans* cantor. *Chemistry & Biodiversity*, v. 8, n. 4, p. 559-567, 2011.
- WANG, S. & WANG, G. K. Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. *Cellular signalling*, v. 15, n. 2, p. 151-159, 2003.
- WEST, A. E.; CHEN, W. G.; DALVA, M. B.; DOLMETSCH, R. E.; KORNHAUSER, J. M.; SHAYWITZ, A. J.; GREENBERG, M. E. Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 20, p. 11024-11031, 2001.
- WILSON, K. & WALKER, J. *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. Cambridge University Press, 2010.

XIONG, Q.; WILSON, W. K.; PANG, J. The Liebermann–Burchard reaction: sulfonation, desaturation, and rearrangement of cholesterol in acid. *Lipids*, v. 42, p. 87–96, 2007.

YANG, H.; WANG, Z.; CAPÓ-APONTE, J. E.; ZHANG, F; PAN, Z.; and REINACH, P. S. Epidermal growth factor receptor transactivation by the cannabinoid receptor (CB1) and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) induces differential responses in corneal epithelial cells. *Experimental Eye Research*, v. 91, n. 3, p. 462-471, 2010.

YUN, H. R. et al. Apoptosis induction of human lung carcinoma cells by *Chan su* (*Venenum bufonis*) through activation of caspases. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, v. 2, n. 3, p. 210-217, 2009.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 84, n. 15, p. 5449-5453, 1987.

ANEXO I

Fração	Gene	Código*	Descrição
1	ASH2L	F7BMV3	Uncharacterized protein
1	TCHH	F6ZVG5	Uncharacterized protein (fragment)
1	IFI27	F6R3J6	Uncharacterized protein (fragment)
1	IL4I1	F6S098	Uncharacterized protein
1	ZBTB22	F6VMA0	Uncharacterized protein
1	RPP25	F6YSF0	Uncharacterized protein
1	CDSN	F6V6E7	Uncharacterized protein
1	NOVA2	F6XZJ1	Uncharacterized protein (fragment)
1	EP300	I1TPS6	EP300 (fragment)
1	MYOZ1	F6YGN8	Uncharacterized protein
1	C1QC	F7DBT2	Uncharacterized protein
1	DLX1	F6QWX6	Uncharacterized protein
1	NHLH1	F6SC92	Uncharacterized protein (GN=NHLH2)
1	EMID1	F7CJ57	Uncharacterized protein (fragment)
1	EMID1	F7C8C9	Uncharacterized protein (fragment)
1	NUP153	F7DUR1	Uncharacterized protein
1	CAPNS1	F6RLT8	Uncharacterized protein
1	ARID3A	H9GZW8	Uncharacterized protein (fragment)
1	CCKBR	F6S229	Uncharacterized protein
1	AGA	F7CP15	Uncharacterized protein (fragment)
1	HGNC:9982	H9H001	Uncharacterized protein
1	LOC100061764	F7A559	Uncharacterized protein
1	LOC100061764	F7AN17	Uncharacterized protein
1	LOC100061764	F7AAI4	Uncharacterized protein (fragment)
1	LOC100061764	F7BP93	Uncharacterized protein (fragment)
1	KRT3	F6VE52	Uncharacterized protein
1	NR3C1	F6WPN5	Uncharacterized protein
1	BCL9	F6S3W0	Uncharacterized protein
1	LOC100063215	F6SHJ8	Uncharacterized protein
1	IL12RB1	F6WKK0	Uncharacterized protein (fragment)
1	isg12(a)	Q6IEC7	Putative ISG12(A) protein
1	ENAH	F6U1I2	Uncharacterized protein (fragment)
1	ENAH	F6U2I2	Uncharacterized protein (fragment)
1	IFI27L2	F7A684	Uncharacterized protein (fragment)
1	ANKRD33	F6TQT3	Uncharacterized protein
1	MN1	F7AZZ0	Uncharacterized protein
1	ECHDC1	L7MRR7	Enoyl-CoA hydratase domain-containing 1-like protein (fragment)
1	AMOT	F6TAL1	Uncharacterized protein
1	ARMCX4	F6U4A1	Uncharacterized protein (fragment)
1	PAX8	F6YRP4	Uncharacterized protein (fragment)
1	NES	F6YXF3	Uncharacterized protein (fragment)

*o código da proteína faz referência ao banco de dados UniProtKB

Fração	Gene	Código*	Descrição
1	KRT1	F7B7X0	Uncharacterized protein
1	GLG1	F6XBM5	Uncharacterized protein
1	GLG1	F6Z3Z4	Uncharacterized protein
1	NACC1	F7C9J0	Uncharacterized protein
1	WNK1	F7C2Q9	Uncharacterized protein (fragment)
1	WNK1	F7C849	Uncharacterized protein
1	WNK1	F7BX86	Uncharacterized protein
1	WNK1	F7BY14	Uncharacterized protein
1	VCAN	F7DY34	Uncharacterized protein
1	KIAA2018	F6SCM9	Uncharacterized protein (GN=USF3)
1	TCF3	F6UKX5	Uncharacterized protein
1	KRT5	F6W7V0	Uncharacterized protein
1	PPP1R10	F6SVD1	Uncharacterized protein
1	KRT79	F6XWG3	Uncharacterized protein
1	ZBTB9	F6VL45	Uncharacterized protein
1	FAM124A	F7CP34	Uncharacterized protein (fragment)
1	NYAP1	F6SMM5	Uncharacterized protein
1	RAVER1	F6S2B4	Uncharacterized protein
1	WDR33	F6U7P5	Uncharacterized protein
1	NUP214	F6WEK8	Uncharacterized protein
1	SIGLEC1	F7CN95	Uncharacterized protein (fragment)
1	SIGLEC1	F7CNW4	Uncharacterized protein (fragment)
1	SIGLEC1	F7D4R2	Uncharacterized protein (fragment)
1	CLOCK	F7DDS7	Uncharacterized protein (fragment)
1	PLXNB3	F6U7Q8	Uncharacterized protein (fragment)
1	PLXNB3	F6VYW6	Uncharacterized protein (fragment)
1	ZNF236	F6ZKN7	Uncharacterized protein (fragment)
1	PCDHGC5	F6YLZ2	Uncharacterized protein
1	PCDHGC5	F6YMC2	Uncharacterized protein
1	PCDHGC5	F6YGP3	Uncharacterized protein
1	GLT1D1	F6Q2T7	Uncharacterized protein (fragment)
1	RPRD2	F7A0X0	Uncharacterized protein
1	ATG2A	F7D5H8	Uncharacterized protein (fragment)
1	KIAA1522	F6VTH4	Uncharacterized protein
1	HTRA1	F7B812	Uncharacterized protein (fragment)
1	GSDMD	F7CWF2	Uncharacterized protein
1	PRRC2A	F6VNR4	Uncharacterized protein
1	EVX1	F6ZR52	Uncharacterized protein
1	SYNRG	F6QXZ0	Uncharacterized protein (fragment)
1	SYNRG	F6QYE7	Uncharacterized protein (fragment)
1	SIPA1	F6Q309	Uncharacterized protein
1	TRIP12	F7DNJ4	Uncharacterized protein
1	TRIP12	F7E092	Uncharacterized protein
1	TRIP12	F7D7S2	Uncharacterized protein

*o código da proteína faz referência ao banco de dados UniProtKB

Fração	Gene	Código*	Descrição
1	DOT1L	F6ZL97	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-79 specific (fragment)
1	HCFC1	F6TVL2	Uncharacterized protein
1	UBQLN1	F7BRQ1	Uncharacterized protein
1	NCOA5	F6TDW3	Uncharacterized protein
1	KRT75	F6S8W6	Uncharacterized protein
1	TNRC6B	F6RUY8	Uncharacterized protein
1	MLLT6	F6RYU1	Uncharacterized protein (fragment)
1	ATRX	L7MS78	Transcriptional regulator ATRX-like protein (fragment)
1	SLC35A2	F7C7T4	Uncharacterized protein
1	WDR48	F6ZZI8	Uncharacterized protein
1	LENG8	F7AWJ4	Uncharacterized protein
1	RIN2	F6VFF1	Uncharacterized protein
1	SLC22A18	F6S1P3	Uncharacterized protein
1	MAML2	F7C2A0	Uncharacterized protein (fragment)
1	BPIFB3	F6R0D5	Uncharacterized protein (fragment)
1	WNK2	F7DZB5	Uncharacterized protein (fragment)
1	ZNRF3	F7AJR0	Uncharacterized protein
1	VOPP1	F6TYK7	Uncharacterized protein
1	RASIP1	F6UC01	Uncharacterized protein
1	LOC100072007	F6X2F7	Olfactory receptor
1	CHD3	F7CN25	Uncharacterized protein
1	TSPAN17	F6YZU3	Tetraspanin (fragment)
1	N4BP2	F6Z1E8	Uncharacterized protein
1	PHF14	F6TPH1	Uncharacterized protein
1	—	F6V6S5	Uncharacterized protein (fragment)
1	—	K9KDU7	Glucocorticoid receptor-like protein (fragment)
1	—	F7CTE3	Uncharacterized protein (fragment)
1	—	K9KCC1	Golgi apparatus protein 1-like protein (fragment)
1	—	F6U135	Uncharacterized protein
1	—	F6RWF6	Uncharacterized protein (fragment)
1	—	Q7JJ50	Type II collagen (fragment)
1	COL1A1	F6VUP8	Uncharacterized protein
1	COL1A1	F7D939	Uncharacterized protein
1	COL1A1	F7D9C7	Uncharacterized protein
1	COL1A1	F7A3F7	Uncharacterized protein
1	COL1A1	F6RVX8	Uncharacterized protein
1	COL1A1	F6SSG3	Uncharacterized protein
1	COL1A2	F6RTJ6	Uncharacterized protein
1	COL1A2	F6RUA6	Uncharacterized protein
1	COL1A2	F6RTH9	Uncharacterized protein
1	COL1A2	F6RTP3	Uncharacterized protein
1	COL1A2	F6RTI8	Uncharacterized protein
1	COL1A2	F6RTN7	Uncharacterized protein
1	COL1A2	F6RTL6	Uncharacterized protein

*o código da proteína faz referência ao banco de dados UniProtKB

Fração	Gene	Código*	Descrição
1	COL2A1	F6Y8T1	Uncharacterized protein
1	COL2A1	Q28396	Type II collagen
1	COL2A1	F6XIM5	Uncharacterized protein
1	COL2A1	F6Y2J1	Uncharacterized protein
1	COL3A1	F6R4Y3	Uncharacterized protein
1	COL3A1	F6R528	Uncharacterized protein
1	COL4A1	F6VVM5	Uncharacterized protein
1	COL4A3	F7CED9	Uncharacterized protein
1	COL4A4	F6ZM05	Uncharacterized protein
1	COL4A4	F6ZL31	Uncharacterized protein
1	COL4A4	F7BMN3	Uncharacterized protein
1	COL4A5	F6T097	Uncharacterized protein
1	COL4A5	F7C5C2	Uncharacterized protein
1	COL4A6	F6Y6J5	Uncharacterized protein
1	COL5A1	F7AGK7	Uncharacterized protein
1	COL5A1	F6ZNE6	Uncharacterized protein
1	COL5A1	F6PLH0	Uncharacterized protein
1	COL5A1	F6Q357	Uncharacterized protein
1	COL5A1	F7BCA1	Uncharacterized protein
1	COL5A1	F6SUU9	Uncharacterized protein
1	COL5A2	F7BH47	Uncharacterized protein
1	COL5A3	F6YKP6	Uncharacterized protein
1	COL5A3	F6XL39	Uncharacterized protein
1	COL5A3	F6XKF5	Uncharacterized protein
1	COL8A1	F6UHM7	Uncharacterized protein
1	COL8A2	F6SGD1	Uncharacterized protein
1	COL9A1	F6R7M9	Uncharacterized protein
1	COL9A1	F6QR72	Uncharacterized protein
1	COL9A2	Q2MCN3	Collagen, type IX, alpha 2
1	COL9A2	Q2MCN2	Collagen, type IX, alpha 2
1	COL9A3	F6VP03	Uncharacterized protein
1	COL10A1	F6WCC9	Uncharacterized protein
1	COL11A1	F6VBF7	Uncharacterized protein
1	COL11A1	F6U661	Uncharacterized protein
1	COL11A1	F6VAW6	Uncharacterized protein
1	COL11A2	F7BRR9	Uncharacterized protein
1	COL13A1	F6ZAH8	Uncharacterized protein
1	COL13A1	F6ZA65	Uncharacterized protein
1	COL16A1	F6Z183	Uncharacterized protein
1	COL17A1	F6USS7	Uncharacterized protein
1	COL17A1	F6VPA3	Uncharacterized protein
1	COL17A1	F6US30	Uncharacterized protein
1	COL18A1	F6XNR9	Uncharacterized protein
1	COL18A1	F6XHX6	Uncharacterized protein

*o código da proteína faz referência ao banco de dados UniProtKB

Fração	Gene	Código*	Descrição
1	COL19A1	F7CQ61	Uncharacterized protein
1	COL19A1	F7CQA9	Uncharacterized protein
1	COL22A1	F7A1I5	Uncharacterized protein
3	MGC134150	Q2TBV9	MGC134150 protein
3	AKIP1	Q3SZ30	Protein kinase A-interacting protein 1
4	MICAL2	F1MF74	Protein-methionine sulfoxide oxidase MICAL2
4	MICAL2	H9GW33	Protein-methionine sulfoxide oxidase MICAL2 (fragment)
6	KRTAP9-1	F6RKX3	Uncharacterized protein
10	POLA1	E1BJF4	DNA polymerase
12	ITPKC	F1MN32	Uncharacterized protein
12	ITPKC	Q0P5N0	Inositol-trisphosphate 3-kinase C
12	CYFIP2	F1MX60	Uncharacterized protein
13	FTCD	F6RXZ6	Uncharacterized protein (fragment)
14	KRTAP9-1	F6RKX3	Uncharacterized protein
14	YEATS2	F6S573	Uncharacterized protein
14	COL11A1	F6VAW6	Uncharacterized protein
14	BRD4	F7B3U9	Uncharacterized protein

*o código da proteína faz referência ao banco de dados UniProtKB