





Fundação Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Animal



# Avaliação das atividades biológicas da secreção axilar do bagre de água doce *Acanthodoras spinosissimus* (Doradidae) e isolamento e caracterização dos compostos citolíticos

Keven Wender Rodrigues Macedo

Orientador: Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Brasília, 2021



Dedico esse trabalho a cada pessoa que dá sentido ao X que tenho tatuado no braço.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

Leonardo da Vinci

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador e amigo, Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior pela imensa paciência e pelo apoio ao longo dos últimos anos. Obrigado por todos os conselhos e conversas, pelas puxadas de orelha e principalmente por toda a confiança. Espero ter me tornado alguém digno da aposta. Quando eu crescer, quero ser igual a você!!!

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal e aos professores e servidores do Instituto de Ciências Biológicas por serem os melhores da UnB.

Ao Professor Dr. Jansen Zuanon não apenas pelo fornecimento das secreções do *Acanthodoras*, mas por todo o suporte a um estudante desesperado que não tinha ideia do que escrever para a qualificação.

À professora Lucia Helena Rapp PyDaniel, por toda a inestimável ajuda ao longo do desenvolvimento do projeto.

À professora Mariana Castro pela disponibilização dos equipamentos do LBQP, mas principalmente pelo suporte durante esse período.

Ao Carlos José Santana, toda a ajuda e paciência desde o meu primeiro dia no laboratório até hoje. Obrigado por me ensinar desde ligar o HPLC até a buscar ser um cientista melhor.

À Ana Carolina Magalhães, por toda a ajuda com os experimentos, especialmente o MTT. Agradeço também por todas as dicas e conselhos pra não reprovar no probatório.

A todo o pessoal do laboratório, em especial aos colegas de mestrado com quem compartilhei dos dias de luta e dias de glória: Brunna, Gabriel, Jéssica Oliveira, Jéssica Schneider, Isadora, Daniela, Isabelle, Mariana, Katyelle, Priscila, João, Gislene, Jairo e Camila.

Ao Rhaul Oliveira, pelo desenvolvimento do ensaio ictiotóxico.

À minha família, em especial à minha mãe, ao meu pai e à Tia Eliane, por nunca desistirem de mim, mesmo quando eu não merecia essa confiança.

Aos meus irmãos por sempre me fornecerem motivação e o combustível necessário para sempre seguir em frente.

À Hikari Kobayashi e ao Égon Lucas por todos as conversas, almoços, jogatinas, por todos planos e sonhos compartilhados e principalmente, por todos os anos de amizade que simplesmente me definem como ser humano (sim, a culpa de eu ser assim é de vocês dois...). Eu realmente não sei o que teria sido de mim sem vocês... XD

Aos amigos Lucas Jeferson, Lucas Lima, Joyce Silva e Fernanda por todo o apoio durante os melhores e piores dias do mestrado.

À Ana Luíza Sena, por todas as caronas quando eu não tinha que sair correndo pro trabalho.

A todos os alunos, professores e servidores do Centro de Ensino Médio Urso Branco, por terem me permitido viver a profissão dos sonhos.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa e aos demais órgãos de fomento.

A todos que fazem ou que um dia já fizeram parte desta incrível caminhada chamada de vida, o meu mais sincero muito obrigado!!!

## **APOIO FINANCEIRO**

A dissertação de mestrado intitulada “Avaliação das atividades biológicas da secreção axilar do bagre de água doce *Acanthodoras spinosissimus* (Doradidae) e isolamento e caracterização dos compostos citolíticos” desenvolvida por Keven Wender Rodrigues Macedo sob a orientação da Prof. Dr. Osmino R. Pires Júnior teve o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES através do Programa de Apoio à Pós-Graduação (ProAP – Edital DPG/UnB Número 07/2019 e Edital DPG/UnB No 11/2019), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (por meio de concessão de bolsa de estudos – mestrado) e da Financiadora de Estudos e Pesquisas – FINEP, através da concessão de recursos destinados a compra dos equipamentos utilizados ao longo do desenvolvimento do projeto.

## RESUMO

Os peixes são fonte de compostos bioativos com diversas funções, como as atividades antimicrobiana e antitumoral. O *Acanthodoras spinosissimus* é um peixe da família Doradidae, chamado popularmente de bacuzinho roncador. Essa espécie libera uma secreção esbranquiçada a partir das glândulas axilares quando se sente ameaçada. Essa secreção demonstra atividade antimicrobiana e ictiotóxica indicando possuir um papel importante na defesa não apenas contra possíveis predadores como contra microrganismos. As frações nomeadas como Ac\_7 e Ac\_8 foram isoladas por HPLC e suas massas estabelecidas por espectrometria do tipo MALDI-TOF/TOF como 543 e 544 Da, respectivamente e demonstraram atividade contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (MICs das três cepas iguais a 500 µM para Ac\_7 e 250 µM para Ac\_8); atividade citotóxica contra células tumorais da linhagem MCF-7 e atividade contra micelas lipídicas, causando a lise de micelas de fosfatidilcolina, embora a mesma seja significativamente reduzida na presença de colesterol. Ambas as frações não demonstram padrão de fragmentação típico de peptídeos, além de possuírem analitos lipídicos em sua estrutura.

Palavras-chave: *Acanthodoras spinosissimus*, Secreção axilar, Atividades biológicas, Atividade antimicrobiana, Citotoxicidade.

## ABSTRACT

Fishes are source of bioactive compounds with various functions, such as antimicrobial and antitumoral activities. The *Acanthodoras spinosissimus* belongs to the Doradidae Family, popularly known as Talking Catfish. This species releases a milky-looking secretion from the axillary glands when it feels threatened. The secretion showed antimicrobial and ichthyotoxic activities which indicates an important role in the defense not only against possible predators but also against microorganisms. The fractions named as Ac\_7 and Ac\_8 were isolated by RP-HPLC and their molecular masses evaluated by MALDI-TOF/TOF spectrometry as 543 and 545 Da, respectively. These fractions demonstrated activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans* (MICs of all 3 strains = 500  $\mu$ M for Ac\_7 and 250  $\mu$ M for Ac\_8); cytotoxic against the MCF-7 tumoral lineage; and activity against phospholipid membranes, causing the lysis of phosphatidylcholine micelles, although it is significantly reduced in the presence of cholesterol. Both fractions do not show peptide fragmentation spectrum and have lipid analytes in their structure.

Keywords: *Acanthodoras spinosissimus*, Axillary Secretion, Biological Activities, Antimicrobial Compounds, Cytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Acanthodoras spinosissimus</i> .....	17
<b>Figura 2.</b> Liberação da secreção axilar bruta pelo poro axilar.....	23
<b>Figura 3.</b> Principais estruturas observadas ao longo do desenvolvimento em larvas e embriões de peixe-zebra.....	28
<b>Figura 4.</b> Ensaio antimicrobiano com a secreção axilar bruta de <i>Acanthodoras spinosissimus</i> .....	36
<b>Figura 5.</b> SDS-PAGE (15%) em condições redutoras.....	37
<b>Figura 6.</b> Atividade de protease (substrato caseína) da secreção bruta de <i>Acanthodoras spinosissimus</i> .....	38
<b>Figura 7.</b> Perfil cromatográfico em RP-HPLC da secreção bruta de <i>Acanthodoras spinosissimus</i> .....	39
<b>Figura 8.</b> Perfil de absorção de UV das frações cromatográficas Ac_7 e Ac_8.....	39
<b>Figura 9.</b> Ensaio antimicrobiano com as frações cromatográficas de <i>Acanthodoras spinosissimus</i> .....	40
<b>Figura 10.</b> Espectro de massa da fração 7 da secreção bruta de <i>Acanthodoras spinosissimus</i> .....	41
<b>Figura 11.</b> Espectro de massa da fração 8 da secreção bruta de <i>Acanthodoras spinosissimus</i> .....	42

<b>Figura 12.</b> Ensaio antimicrobianos para a determinação dos MICs da fração Ac_7.....	43
<b>Figura 13.</b> Ensaio antimicrobianos para a determinação dos MICs da fração Ac_8.....	44
<b>Figura 14.</b> Ensaio de atividade sobre emulsão de micelas lipídicas a partir fosfatidilcolina.....	46
<b>Figura 15.</b> Ensaio colorimétrico com reagente Sulfo-fosfovanilina.....	47
<b>Figura 16.</b> Ensaio de viabilidade celular por MTT da fração Ac_7 contra células da linhagem MCF-7.....	48
<b>Figura 17.</b> Ensaio de viabilidade celular por MTT da fração Ac_8 contra células da linhagem MCF-7.....	48

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Concentrações Mínimas Inibitórias (MICs) das frações Ac\_7 e Ac\_8 obtidas a partir do fracionamento da secreção bruta de *Acanthodoras spinosissimus*.....45

**Tabela 2:** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos nos ensaios citotóxicos contra MCF-7.....49

## LISTA DE ABREVIACÕES

°C: Graus Celsius

ATCC: Coleção Americana de padrões de cultivo (do inglês: American Type Culture Collection)

BHI: Brain-Heart Infusion

CLSI – Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (do inglês: Clinical and Laboratory Standards Institute)

Ctrl: controle

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTT: Ditioneitol.

FET: Toxicidade para Embriões de Peixe (do inglês Fish Embryo Toxicity)

HCCA: Ácido  $\alpha$ -Ciano-4-Hidroxicinâmico

IC<sub>50</sub>: Concentração inibitória de 50% (do inglês Inhibitory Concentration)

KDa: Quilodaltos/Kilodaltos.

mA: Mili Ampere

MALDI-TOF: Ionização e Desorção Associada a Matriz/Tempo de voo (do inglês: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry)

mg: Miligramas.

MHB: Caldo Mueller Hinton (do inglês: Mueller Hinton Broth)

MIC: Concentração Mínima Inibitória (do inglês: Minimal Inhibitory Concentration)

min. :Minutos.

mL: Mililitros.

mM: Milimolar.

MS: Espectrometria de massa (do inglês: Mass Spectrometry).

MTT: Brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-Tiazolil)-2, 5-Difenil-2H-Tetrazólio

nm: Nanômetros.

P.A.: Para Análise

PAM: Peptídeo Antimicrobiano

RP-HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (do inglês: Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography)

RPM - Rotações por minuto.

SA: Ácido Sinapínico (do inglês: Sinapinic Acid).

SDS-PAGE: Sulfato de Dodecil Sulfato de Sódio - Electroforese em Gel de Poli Acrilamida (do inglês: Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

SisBio: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SisGen: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

TFA: Ácido Trifluoracético

µg: Micrograma.

µl: Microlitro.

µM: Micromolar.

µS: Micro Siemens

UV: Ultravioleta.

V: Volts

v/v: razão volume/volume

## Sumário

1. Introdução.....	17
1.1 <i>Acanthodoras spinosissimus</i> .....	17
1.2 Toxinas de peixes.....	18
1.2.1 Envenenamento por peixes peçonhentos.....	19
1.3 Compostos antimicrobianos isolados de Peixes .....	20
1.4 Compostos antitumorais isolados de Peixes .....	21
1.5 Glândulas axilares de Siluriformes. ....	22
2. Justificativa.....	24
3. Objetivos.....	25
3.1 Objetivo geral .....	25
3.2 Objetivos específicos .....	25
4. Material e Métodos.....	26
4.1 Captura dos animais e extração da secreção cutânea.....	26
4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana da secreção bruta .....	26
4.3 Ensaio de ictiotóxico com embriões de <i>zebrafish</i> .....	27
4.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida .....	29
4.4.1 Fracionamento dos componentes proteicos por SDS-PAGE .....	29
4.4.2 Avaliação da atividade proteásica por Zimograma .....	29
4.5 Fracionamento Cromatográfico por RP-HPLC .....	30
4.5.1 Obtenção das frações cromatográficas a partir da secreção bruta.....	30
4.5.2 Espectrofotometria UV/VIS .....	30
4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana e Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) .....	31
4.6.1 Ensaios antibacterianos .....	31
4.6.2 Ensaios antifúngicos.....	32
4.7 Espectrometria de Massa das Frações Ativas – MALDI-TOF/TOF .....	33
4.8 Ensaio de atividade sobre micelas lipídicas.....	33
4.9 Determinação da presença de lipídeos nas frações de interesse pelo Método Sulfo-Fosfo-Vanilina. ....	34
4.10 Ensaio de viabilidade celular por MTT .....	34
5. Resultados.....	36
5.1 Resultados obtidos a partir da secreção bruta .....	36
5.1.1 Ensaios antimicrobianos.....	36
5.1.2 Ensaios ictiotóxicos com embriões de peixe-zebra.....	36
5.1.3 SDS-PAGE.....	37
5.1.4 Zimograma .....	37

5.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Performance em Fase Reversa (RP-HPLC) e espectrometria UV/VIS .....	38
5.2 Resultados obtidos a partir das frações cromatográficas .....	40
5.2.1 <i>Screening</i> Antimicrobiano.....	40
5.2.2 Espectrometria de Massas – MALDI-TOF/TOF .....	41
5.2.3 Determinação das Mínimas Concentrações Inibitórias (MIC) das frações com atividade antimicrobiana. ....	42
5.2.4 Atividade sobre micelas das frações de interesse .....	45
5.2.5 Caracterização lipídica por reação de Sulfo-Fosfo-Vanilina .....	46
5.2.6 Ensaio de viabilidade celular por MTT .....	47
6. Discussão .....	50
7. Conclusões.....	55
8. Perspectivas .....	57
9. Referências Bibliográficas.....	58
Anexos .....	69
Anexo I - Espectro original obtido a partir da fragmentação da Fração Ac_7 .....	69

# 1. Introdução

Os peixes são um grupo composto por mais de 32 mil espécies, representando mais da metade do número de espécies atualmente conhecidas dentre os vertebrados (Nelson *et al.*, 2016). Estes animais estão expostos a um ambiente rico em microrganismos muitas vezes patogênicos, tanto para os próprios peixes como para os seres humanos, no entanto estes se mantêm saudáveis graças a diversos mecanismos de defesa inata e específica (Ellis, 2001).

Os peixes são considerados com uma grande fonte de moléculas com potencial farmacológico e de interesse para a pesquisa acadêmica (Church & Hodgson, 2002; Halstead, 1988; Tan, 2003) uma vez que a produção de grande número de moléculas com ampla variedade de estruturas e diversidade de propriedades químicas é uma estratégia fundamental para a sobrevivência em ambientes altamente competitivos (Russel, 1971). Segundo Pomponi (1999) os peixes, sendo estes venenosos ou não, são potenciais fontes de substâncias bioativas, incluindo peptídeos, enzimas, carboidratos e ácidos graxos poli-insaturados.

## 1.1 *Acanthodoras spinosissimus*



**Figura 1.** *Acanthodoras spinosissimus*. Autoria: Clinton & Charles Robertson. Fonte: Wikimedia Commons. Disponível em <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Acanthodoras\\_spinosissimus.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Acanthodoras_spinosissimus.jpg)> acessado em 04. Abr. 2020.

Pertencente ordem Siluriformes (bagres), família Doradidae, da qual fazem parte os bagres espinhosos (Thorny Catfishes), o gênero *Acanthodoras* é composto por apenas três espécies descritas (Sabaj & Ferraris Jr 2003): *A. cataphractus* (Linnaeus, 1758), *A. depressus* (Steindachner 1881) e *A. spinosissimus* (Eigenmann & Eigenmann, 1888).

*Acanthodoras spinosissimus* (Figura 1) não é considerada como uma espécie de interesse para consumo humano. Conhecido popularmente conhecido como bacuzinho roncador, é um peixe de água doce encontrado na América do Sul, ocorrendo por toda a bacia do rio Amazonas e no rio Essequibo, localizado na Guiana (Froese & Pauly, 2019).

Apesar de ser comumente comercializado como peixe de aquário poucos estudos foram realizados com a espécie, o que resulta em uma enorme carência de informações básicas, havendo apenas dados sobre morfologia, taxonomia e sistemática.

## **1.2 Toxinas de peixes**

Segundo dados do Instituto Chico Mendes (2021), no Brasil existem 3150 peixes continentais e 1358 peixes marinhos, representando o maior grupo dentre as aproximadamente 8930 espécies de vertebrados no país, com diversos desses peixes, especialmente Rajiformes (arraias) e Siluriformes (bagres) sendo conhecidos por utilizar peçonhas como formas de defesa, além de estarem muito relacionados a acidentes com pescadores e banhistas (Halstead, 1988), com espécies de Siluriformes sendo apresentadas como causadores de 70% dos acidentes marinhos, podendo chegar a 90% dos casos em água doce (Garrone Neto *et al.*, 2005; Haddad Jr & Martins, 2006; Haddad Jr, 2008).

Apesar disso, os estudos sobre toxinas de animais aquáticos em geral ainda são muito escassos quando comparados aos dados disponíveis sobre animais terrestres. Em uma revisão de 2013 sobre a evolução das peçonhas, Casewell e colaboradores apenas fazem breves menções aos peixes e sem maiores detalhes sobre a composição e mecanismos de

ação dessas toxinas. Segundo dados fornecidos por Campos e colaboradores em 2016, os peixes representam apenas 1% dos resultados das buscas por sequencias de proteínas bioativas no banco de dados UniProtKB, sendo a vasta maioria dessas sequencias oriundas de aranhas (46%), escorpiões (34%) e serpentes (19%). Dentre esses peixes a vasta maioria é representada por peixes peçonhentos com praticamente nenhum trabalho disponível sobre as toxinas de peixes venenosos.

### **1.2.1 Envenenamento por peixes peçonhentos**

O resultado mais comum observado em acidentes causados por peixes é uma dor intensa, geralmente desproporcional ao tamanho do ferimento, sendo possível observar também atividade neuromuscular, cardiovascular, hemolítica e possível necrose cutânea oriundas do envenenamento (Halstead, 1988; Church & Hodgson, 2002; Sosa-Rosales *et al.*, 2005; Smith & Wheeler 2006; Trim & Trim 2013).

No Brasil, os principais responsáveis por acidentes são os bagres marinhos da família Ariidae, enquanto em água doce se destacam os bagres *Pseudoplatystoma corruscans*, *Pimelodus maculatus* e espécies do gênero *Pimelodella* (Haddad, 2008).

Os mecanismos fisiopatológicos por trás dos apresentados em quadros clínicos de envenenamentos causados pelo peixe Mandi (*P. maculatus*) foram avaliados de maneira experimental pela primeira vez em 2015 por Sarmiento e colaboradores. Os autores demonstram que em concentrações a partir de 30 µg, a peçonha é capaz de induzir os principais sintomas (dor intensa, inflamação e formação de edema) em camundongos (*M. musculus*) mesmo sem que ocorra a perfuração pelos ferrões, além de causar alterações na permeabilidade dos vasos sanguíneos de ratos (*Rattus norvegicus*); arritmia e redução na força de contração de maneira reversível *in situ* no coração do sapo *Lithobates catesbeianus* (Sarmiento *et al.*, 2015).

O envenenamento por indivíduos do gênero *Thalassophryne*, conhecidos na região nordeste do país como Niquim ou peixe-pedra, causa dor intensa, tontura, febre, edema e necrose. Quando avaliada em camundongos (*Mus musculus*) a peçonha de *T. maculosa* causou os mesmos sintomas e apresentou  $LD_{50} = 4.93$  mg/kg (Sosa-Rosales *et al.*, 2005). Essa espécie apresenta um componente sexual na toxicidade da peçonha, com machos causando maior resposta nociceptiva, enquanto a peçonha das fêmeas produz maior atividade proteolítica (Lopes-Ferreira *et al.*, 2016). Em 2005 foram isoladas uma família de proteínas da peçonha de *T. nattereri*, nomeadas como naterinas. Essas proteínas provocam dor aguda, formação de edemas, além de clivar o cininogênio humano e peptídeos sintéticos derivados do cininogênio, liberando a calidina (Magalhães *et al.*, 2005).

Respostas diferentes relacionadas ao sexo dos peixes, assim como à idade também são observadas em arraias como a *Potamotrygon rex*. Em 2019, Dos Santos e colaboradores demonstraram que fêmeas jovens de *P. rex* causam maior ativação da resposta nociceptiva enquanto adultos de ambos os sexos induzem a fase exsudativa do processo inflamatório, rompimentos vasculares e neutrofilia.

Embora exista uma grande variação taxonômica entre as espécies de Siluriformes, peçonhas dos bagres mantêm consistentemente os efeitos principais (citotóxico, neurotóxico, cardiovascular e hemolítico) tanto no ambiente laboratorial, a partir de extratos de tecidos diversos quanto em resposta a predadores, indicando uma convergência quanto aos alvos sistêmicos. As peçonhas dos Siluriformes tendem a ser compostas por apenas algumas poucas toxinas por espécie, e exames futuros ainda podem revelar uma grande variação na diversidade de toxinas apresentadas pelos bagres (Wright, 2017).

### **1.3 Compostos antimicrobianos isolados de Peixes**

As buscas por compostos com atividade antimicrobiana originários de peixes se iniciaram a partir da descoberta da atividade da Pardaxina, molécula que já era conhecida a mais de 10 anos (Primor & Tu, 1980) e apresentou atividade contra cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Oren & Shai, 1996) sendo considerado o primeiro Peptídeo Antimicrobiano (PAM) oriundo de peixes. Desde então diversas novos PAMs foram isolados, como as Piscidinas (Lin *et al.*, 2012) Pavoninina (Tachibana *et al.*, 1984), Moronecidina (Lauth *et al.*, 2002), Oncorhyncin III (Fernandes *et al.*, 2003), além de defensinas, catelicidinas, peptídeos derivados de histonas, hipcidinas e cecropinas, (Masso-Silva & Diamond, 2014).

A presença de peptídeos antimicrobianos na pele é geralmente associada ao muco cutâneo assim como a géis produzidos pelas glândulas proteináceas epidermais, sendo esse tipo de célula considerado como o ponto de partida para a evolução das glândulas de peçonha (Cameron & Endean, 1971).

Esses estudos, embora sejam escassos, revelam um alto potencial das toxinas isoladas de peixes. Além disso, o foco das buscas em geral se concentra nos peptídeos em detrimento de outros compostos de origem não peptídica e que apresentam atividade antimicrobiana confirmada, como no caso das saponinas, que são um grupo de moléculas que embora sejam muito comuns em plantas, também foram isoladas de organismos aquáticos como estrelas-do-mar (De Marino *et al.*, 1998), e em peixes do gênero *Pardachirus* (Tachibana *et al.*, 1984; Tachibana & Gruber, 1988) dentre as atividades reportadas estão as atividades antineoplásica (Nigrelli *et al.*, 1967; Pettit *et al.*, 1970), antifúngica (Ruggieri & Nigrelli, 1974), antiviral, anti-inflamatória e efeito ictiotóxico (Mackie *et al.*, 1977). Além disso ainda costumam possuir característica anfifílica, ação emulsificante e detergente (Schenkel *et al.*, 2001).

#### **1.4 Compostos antitumorais isolados de Peixes**

Além da atividade antimicrobiana, os peixes também se apresentam como potenciais fontes de compostos antitumorais (Hilles *et al.*, 2018). Em uma revisão sistemática apresentada em 2019, Cipolari e colaboradores citam aproximadamente 50 peptídeos bioativos oriundos de peixes descritos em trabalhos entre 1986 e 2019, em sua maioria com atividade antimicrobiana, embora também tenha sido descritas atividades vasoativa e anti-inflamatória.

O muco do bagre marinho *Tachysurus dussumier* apresentou toxicidade contra células de adenocarcinoma pulmonário humano da linhagem A549. Em 2015 Kwak e colaboradores descreveram o muco cutâneo de enguias como candidatos promissores ao tratamento do câncer ao reportar atividade antiproliferativa do muco de *Anguilla japonica* contra células K562 da leucemia humana, uma vez que esse induz a apoptose através da via mitocondrial. Em 2020 Gupta & Serajuddin reportaram a ação do extrato lipídico total da carpa *Labeo lohita* sobre células PC-3 (câncer de próstata humano) que resultou em apoptose ao aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio e causar parada no ciclo celular.

Peptídeos originalmente considerados como antimicrobianos tem ao longo dos anos demonstrado atividade antitumoral. Alguns exemplos incluem a Pardaxina, que apresentou atividade contra células de fibrosarcoma murino MN-11 (Wu *et al.*, 2012), Epinecidina-1 assim como seu derivado sintético TH2-3 causam a redução da proliferação e migração celular de células de fibrosarcoma humano da linhagem HT1080 (Chen *et al.*, 2009<sup>1</sup>, Chen *et al.*, 2009<sup>2</sup>, Lin *et al.*, 2009). Epinecidina-1 ainda atua contra células U937 (leucemia humana), induzindo a apoptose pela ativação da caspase-3, caspase-8 e caspase-9 (Chen *et al.*, 2009<sup>2</sup>).

## **1.5 Glândulas axilares de Siluriformes.**



**Figura 2.** Liberação da secreção pelo poro axilar. Foto: Jansen Zuanon

As glândulas axilares dos siluriformes foram descritas pela primeira vez por Günther (1880), que as tratava como parte do aparato inoculador dos peixes, no entanto, atualmente classificadas como crinotoxinas, um grupo que difere das peçonhas tradicionais, uma vez que sua liberação não depende de aparato inoculador como espinhas/ferrões, além da alta solubilidade na água, que permite sua fácil e rápida dispersão no ambiente (Ziegman & Alewood, 2015; Wright, 2017). As funções associadas a este tipo de secreção têm caráter especulativo e incluem a regulação de feromônios, ionoregulação. Apesar disso existem evidências empíricas para as atividades ictiotóxica (Greven *et al*, 2006) e antimicrobiana, sendo esta última apresentada por Kiehl *et al*. (2006) que avaliou a atividade da “secreção” das glândulas axilares de *Corydoras sterbai* contra *Vibrio fischeri* a partir de um ensaio de bioluminescência do tipo Microtox<sup>®</sup> test (DIN EM ISO 11348–3, 2007).

As glândulas axilares do *A. spinosissimus* são responsáveis pela liberação de uma secreção esbranquiçada (figura 2) quando o peixe sofre algum tipo de estresse, por exemplo quando retirado da água durante a captura. Essa secreção é descrita como nociva para peixes e de sabor muito amargo para o paladar humano (Sabaj 2002).

## 2. Justificativa

A associação entre o uso de antimicrobianos e o desenvolvimento de resistência por parte das bactérias é conhecida desde a introdução da penicilina, e confirmada após o isolamento de microrganismos resistentes a diversas classes farmacológicas (Gottesman *et al*, 2009). Dentre as principais causas apontadas para o atual quadro de resistência está a automedicação, prescrições erradas e interrupção do tratamento e cura aparente do paciente (Moraes *et al*, 2016). A resistência aos antibióticos se desenvolve como uma consequência natural da capacidade adaptativa bacteriana, através da pressão seletiva causada pelo uso indiscriminado dessas substâncias (Santos, 2004, Silveira *et al*, 2015).

Outra preocupação da medicina atual é o desenvolvimento do câncer, atualmente considerado como a segunda maior causa de mortes no mundo. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde um sexto das mortes ocorridas em 2018 aconteceu em decorrência de uma neoplasia e uma em cada 5 pessoas desenvolve algum tipo de câncer (World Health Organization, 2021).

Dentro desse contexto, a busca por novos tratamentos alternativos é uma constante e o potencial farmacológico das secreções/peçonhas de peixes vem se mostrando cada vez mais promissor ao longo dos anos, entretanto, ainda há poucos dados disponíveis sobre inúmeros gêneros de peixes, em especial, peixes que até então não são de interesse humano. Cipolari e colaboradores (2019) ressaltam a evidente importância de continuar os trabalhos com peçonhas e venenos provenientes de peixes de maneira a explorar seu potencial como novas drogas e ferramentas fisiológicas.

O presente trabalho também é pioneiro no estudo das propriedades das toxinas de peixes venenosos.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades biológicas da secreção axilar bruta de *Acanthodoras spinosissimus*, isolar e caracterizar os compostos citotóxicos responsáveis por essas atividades.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as atividades antimicrobiana, ictiotóxica contra embriões de *zebrafish* e proteásica da secreção axilar bruta de *A. spinosissimus*.
- Fracionar os compostos proteicos da secreção bruta por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).
- Fracionar a secreção axilar de *A. spinosissimus* por cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC).
- Avaliar a atividade antimicrobiana das frações obtidas e obter a mínima concentração inibitória de cada composto com atividade.
- Caracterizar os compostos com atividade antimicrobiana da secreção axilar de *A. spinosissimus* por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF.
- Avaliar a atividade das frações de interesse sobre micelas fosfolipídicas e a citotoxicidade contra células tumorais.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1 Captura dos animais e extração da secreção cutânea**

Indivíduos adultos de *Acanthodoras spinosissimus* foram capturados na área de Ponta do Catalão, no município de Iranduba – AM, sob a licença SisBio N° 70935-2 e acesso ao patrimônio genético protocolo SisGen N° AA02CE7. Os animais foram identificados pelo Professor Dr. Jansen Zuanon do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

O *A. spinosissimus* pode ser capturado manualmente, tanto durante mergulho livre quanto pela retirada de troncos ocos dentro d'água e busca pelos peixes nas cavidades e fendas de madeira, onde geralmente são encontrados individualmente. Após a captura, os peixes foram mantidos em baldes com água do local de captura, com o uso de aeradores portáteis à pilha para manter uma oxigenação adequada.

A coleta da secreção foi feita retirando um indivíduo da água e mantendo-o nas mãos com o ventre voltado para cima, provocando a liberação espontânea da secreção de aspecto leitoso pelos poros axilares. Com o uso de uma pisseta abastecida com água destilada, a região axilar dos peixes foi lavada e a secreção recolhida em um béquer. Quando o fluxo da secreção cessa ou diminui bastante, o que geralmente ocorre após um ou dois minutos de manipulação, o peixe é devolvido à água e a secreção transferida para tubos Falcon e imediatamente congelada a -20 °C. Nesse processo não ocorrem danos físicos aos peixes e nunca houve morte de indivíduos submetidos à retirada e coleta da secreção.

No laboratório de Toxinologia – UnB, as secreções foram liofilizadas (Liobras L101) e alíquotas de 10 mg foram alíquotadas em tubos tipo eppendorf e armazenadas a -20 °C até o uso.

### **4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana da secreção bruta**

Foi realizado um ensaio antimicrobiano inicial com 10 mg da secreção bruta em placa multi-poços de fundo chato para avaliação da inibição do crescimento das bactérias patogênicas *Escherichia coli* (ATCC 25922), e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). O meio de cultura utilizado foi Mueller Hinton. O controle de inibição do crescimento foi feito com ofloxacina 400 mg.

Para o ensaio antifúngico foi utilizado placa multi-poços para avaliação do crescimento de *Candida albicans*. Como meio de cultura foi utilizado BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado com Cloreto de Sódio e Glicose. O controle de inibição do crescimento foi feito com formaldeído 0,4%.

Os microrganismos foram cultivados em 7 mL do meio apropriado sob agitação a 37°C até a densidade óptica igual a 1 em 590 nm. Em fase logarítmica, foram diluídos no mesmo meio na seguinte proporção: 1:50 bactérias Gram-negativas e 1:100 bactérias Gram-positivas e fungos. As amostras são testadas em triplicata e ressuspensas em água deionizada estéril. A avaliação do crescimento foi feita por densidade óptica em espectrofotômetro (Multiskan FC Thermo Scientific, USA) a 595 nm.

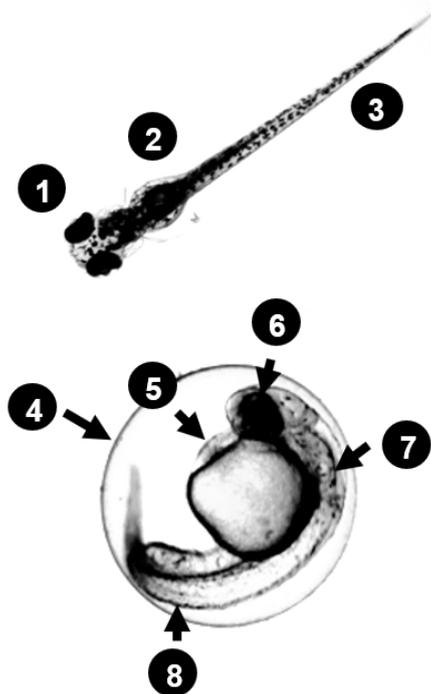
### **4.3 Ensaio de ictiotóxico com embriões de *zebrafish***

O ensaio com embriões de “*zebrafish*” (*Danio rerio*) seguiu o protocolo padrão para avaliação de toxicidade: *Fish Embryo Toxicity - FET - Test* (OECD 2013).

Os ovos foram recolhidos dos aquários de cruzamento 30 minutos após a desova, lavados e distribuídos em placas de Petri com soluções teste. A seguir os ovos foram inspecionados individualmente no estéreo microscópio (*Stereoscopic Zoom Microscope – SMZ 1500, Nikon Corporation*) sendo descartados os que apresentavam injúrias ou irregularidades na clivagem. Foram usados 25 ovos, 5 por tratamento, distribuídos em uma microplaca de 24 poços. Em cada poço foram colocados 2 mL de solução teste e um ovo.

Foram usados cinco tratamentos: controle (0 µg/mL), 0,1; 1; 10 e 100 µg/mL da toxina. As concentrações foram obtidas por diluições sucessivas de uma solução estoque da toxina (100 µg/mL) feita em acetona. Todas as soluções de teste foram feitas em água de diluição com pH de  $7,0 \pm 0,5$  e condutividade de  $700 \pm 50$  µS.

A temperatura foi mantida a  $28 \pm 2$  °C. Os embriões e larvas foram observados diariamente com a ajuda do estéreo microscópio usando uma ampliação de 70x para ovos e 40x para larvas. O teste teve a duração de 6 dias. Na fase de embrião foram avaliados os seguintes parâmetros: coagulação dos ovos, formação do otólito, pigmentação do corpo e olhos, formação dos somitos, batimento cardíaco, separação da cauda do saco vitelino e eclosão. Após a eclosão foram avaliados: edemas, deformações na coluna vertebral e mortalidade das larvas. As estruturas normais de embriões e larvas são descritas na Figura 3.



1. Vista superior dos olhos de uma larva 96 horas após a fertilização.
2. Saco vitelínico parcialmente absorvido. Este constitui a reserva energética das larvas até que comecem a procurar alimento 2 dias depois da eclosão.
3. Cauda da larva vista de cima. Tem um importante papel na natação e equilíbrio das larvas. Defeitos na cauda podem levar a dificuldades na procura de alimento.
4. Córion é a membrana acelular que protege o embrião nos estádios iniciais de desenvolvimento.
5. Coração e pericárdio, ambos podem ser vistos com facilidade a partir das 48 horas, podendo o batimento cardíaco ser monitorizado.
6. Visão lateral do olho de embrião 48 horas após a fertilização. O olho já bem desenvolvido apresenta forte pigmentação.
7. O otólito é uma estrutura similar ao ouvido dos restantes vertebrados. Tem, nos peixes, a função de manter o equilíbrio.
8. Vista lateral da cauda do embrião já bem desenvolvida e separada do saco vitelínico.

**Figura 3.** Principais estruturas observadas ao longo do desenvolvimento em larvas e embriões de peixe-zebra.

## **4.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida**

### **4.4.1 Fracionamento dos componentes proteicos por SDS-PAGE**

A separação dos componentes proteicos presentes na secreção bruta de *A. spinosissimus* foi realizada por meio de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE), sob condições redutoras (Laemmli, 1970). Uma alíquota da secreção bruta foi aquecida a 90 °C por 5 minutos em um tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, SDS 2%, DTT 0,1 M, azul de bromofenol e água deionizada) para uma concentração final de 1 µg/µL e 10 µL de amostra foram aplicados no gel. O marcador de massa molecular (Amersham Pharmacia-Biotech) utilizado foi uma mistura de proteínas de massas moleculares conhecidas: fosforilase b (97 kDa), albumina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), e lactoalbumina (14,4 kDa). A eletroforese foi realizada em gel 15% sob voltagem de 180 V e corrente de 40 mA a temperatura ambiente em tampão Tris-base 0,55 mol/L - Glicina 1,92 mol/L pH 8,3. Após a eletroforese o gel foi corado com nitrato de prata de acordo com o protocolo de Blum *et al.* (1987) modificado por Nesterenko *et al.* (1994).

### **4.4.2 Avaliação da atividade proteásica por Zimograma**

A atividade proteásica da secreção bruta foi avaliada por meio de zimograma. A caseína (0,1%) foi copolimerizada em um gel SDS-PAGE a 10%. 10 µL da amostra (1 µg/µL) foram aplicados no gel. O gel ainda recebeu um marcador de massa molecular (Amersham Pharmacia-Biotech) e tripsina comercial como controle positivo para atividade proteásica. A eletroforese foi realizada a 4 °C sob voltagem de 110 V e corrente de 40 mA. Finalizada a eletroforese, o gel foi lavado Triton X-100 2,5% (v/v) em Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, contendo NaCl 200 mM e 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 vezes por 20 minutos para a remoção do SDS. O gel foi incubado overnight 37°C com o mesmo tampão. Após a incubação, o gel foi

corado com Comassie Brilliant Blue R250 0,1 % (p/v) e descorado com uma solução de metanol: ácido acético: água 45:10:45 (v/v) até o aparecimento das bandas. O gel foi fotografado em um processo de captura de imagens utilizando o equipamento Gel Doc™ EZ System (Bio-Rad).

## **4.5 Fracionamento Cromatográfico por RP-HPLC**

### **4.5.1 Obtenção das frações cromatográficas a partir da secreção bruta**

Alíquotas de 10 mg/mL das secreções de *A. spinosissimus* foram fracionadas por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) utilizando uma coluna de fase reversa analítica C<sub>18</sub> Shim-pack VP-ODS (4,6 x 150 mm, 5 µm), e duas fases móveis (solução A: TFA 0,1% em água deionizada v/v e solução B: TFA 0,1% em acetonitrila v/v). Antes de cada corrida a coluna foi previamente equilibrada em 100% de solução A por 20 minutos. Foram injetados 200 µL de secreção em um sistema cromatográfico LC-20A (Shimadzu, Kyoto, Japão) mantendo um fluxo de 1 mL/min e detecção em 216 nm e 280 nm.

A eluição da secreção foi realizada mantendo a concentração em 100% de A por cinco minutos, e então submetida a um gradiente linear de 0 a 50% de B em 50 minutos, 50 a 100% de B em 5 minutos e então mantida a 100% de B por 10 minutos, totalizando 70 minutos de corrida cromatográfica. As frações foram coletadas manualmente, liofilizadas e armazenadas a -20 °C.

### **4.5.2 Espectrofotometria UV/VIS**

Os espectrofotogramas com os perfis de absorção de UV das frações Ac\_7 e Ac\_8 foram adquiridos a partir do perfil cromatográfico obtido na etapa de purificação. Os

registros foram obtidos pela utilização de detector fotodiodo UV/VIS (SPDM20A – Shimadzu Co, Kyoto, Japão) acoplado ao sistema HPLC, na faixa de 200-400 nm.

## **4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana e Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)**

### **4.6.1 Ensaios antibacterianos**

Dez miligramas da secreção bruta de *A. spinosissimus*, assim como as frações cromatográficas obtidas em uma corrida cromatográfica foram submetidas a ensaios antimicrobianos utilizando-se as cepas de bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922), Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) conforme protocolo estabelecido pelo NCCLS/CLSI M7-A6.

As bactérias foram cultivadas em 7 mL de meio Mueller Hinton (MHB) pH 7,2 sob agitação a 37 °C por 24 horas. A absorbância foi verificada até a densidade óptica igual a 1 em 620 nm em espectrofotômetro (UV-VIS Spectrophotometer UV-M51 Bel Photonics, Itália). Em fase logarítmica, as suspensões de bactérias foram diluídas na proporção de 1:10 e a partir dessa diluição é feita uma nova na proporção 1:20 resultando em aproximadamente  $10^5$  unidades formadoras de colônia.

O ensaio com a secreção bruta utilizou alíquotas de 10 mg, como controle positivo foram utilizados 50 µL de ofloxacina 400 mg. As frações cromatográficas foram reconstituídas em água deionizada estéril e incubadas em microplacas de fundo chato de 96 poços com 50 µL de suspensão bacteriana durante 20–24 h a 37 °C. Os controles para ausência de crescimento utilizaram 50 µL formaldeído 0.8% (v/v). Ambos os ensaios utilizaram 50 µL água deionizada estéril como controle de crescimento pleno. Todas as amostras e controles foram incubados com 50 µL das suspensões bacterianas.

Para a determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias (MIC) das frações de interesse, as bactérias foram incubadas em placas de 96 poços com as frações diluídas serialmente na proporção 1:1 a partir de uma concentração inicial de 2 mM, e incubadas a 37 °C por 24 horas.

A inibição do crescimento será determinada pela leitura da densidade óptica a 620 nm com uma leitora de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). Todas as frações, assim como os controles são plaqueadas em triplicata.

#### **4.6.2 Ensaios antifúngicos**

A secreção bruta de *A. spinosissimus* (10 mg/mL), assim como as frações cromatográficas obtidas em uma corrida foram submetidas a ensaios com a cepa de levedura *Candida albicans* (ATCC 10231), a qual foi cultivada em meio BHI (*Brain-Heart Infusion*) suplementado com cloreto de sódio e glicose. Os microrganismos foram cultivados em 7 mL de BHI sob agitação a 37°C até a densidade óptica igual a 1 em 590 nm, medida em espectrômetro (UV-VIS Spectrophotometer UV-M51 Bel Photonics, Italia). Em fase logarítmica, a suspensão de leveduras foi diluída em BHI na proporção 1:10 e a partir dessa diluição uma nova foi realizada na proporção 1:20 de meio. As amostras foram reconstituídas em água deionizada estéril e 50 µL foram incubados com 50 µL de levedura em placas de 96 poços por 24 horas a 37 °C.

Para a determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias (MIC) das frações de interesse, as bactérias serão incubadas em placas de 96 poços com as frações diluídas serialmente na proporção 1:1 a partir de uma concentração inicial de 2 mM, e incubadas a 37 °C por 24 horas.

Os ensaios utilizaram 50 µL água deionizada estéril incubados com 50 µL da suspensão de leveduras foram utilizados como controle de crescimento pleno e 50 µL de formaldeído 0.8% (v/v) como controle de ausência de crescimento. A avaliação da inibição

foi realizada por densidade ótica em espectrofotômetro (Multiskan FC Thermo Scientific, USA) a 595 nm.

#### **4.7 Espectrometria de Massa das Frações Ativas – MALDI-TOF/TOF**

As frações cromatográficas que exibirem atividade antimicrobiana e antitumoral nos ensaios realizados foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF modelo AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (AB Sciex, Framingham, MA, EUA) ou Autoflex II (Bruker, Billerica, MA, EUA). As frações foram ressuspensas em acetonitrila 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v) e 1 µL de cada fração cromatográfica foi aplicada em placa de aço inoxidável juntamente com 1 µL de matriz. As matrizes utilizadas foram ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA 20 µg/µL) e ácido sinapínico (SA 20 µg/µL), ambas ressuspensas em acetonitrila 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v).

#### **4.8 Ensaio de atividade sobre micelas lipídicas**

A atividade das frações de interesse sobre micelas foi avaliada a partir com base na atividade contra micelas de fosfatidilcolina (3 mM) e fosfatidilcolina-colesterol (concentração final de 3 mM na proporção 1:1). A emulsão de micelas foi preparada a partir do método estabelecido por Marinetti (1965) em tubos de ensaio previamente lavados com água e com clorofórmio e secos com ar comprimido em ambas as lavagens. Ambos os substratos foram dissolvidos em 1 mL de clorofórmio P.A. e as soluções foram secas com ar comprimido. Para a obtenção das emulsões os substratos foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 e agitados no ultrasonicador em banho-maria (30 °C) até que as partículas não fossem mais visíveis. 50 µL da fração Ac\_7 foram plaqueadas em diluição seriada (1:1) em placa de 96 poços de fundo chato com 150 µL das emulsões. Para o controle positivo foram utilizados 50 µL de Triton X (1%) e como controle negativo 200 µL da emulsão de micelas. A degradação das micelas foi avaliada a partir da leitura da absorbância

em 405 nm no espectrofotômetro Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) após 1 hora do início da reação.

#### **4.9 Determinação da presença de lipídeos nas frações de interesse pelo Método Sulfo-Fosfo-Vanilina.**

O ensaio foi adaptado a partir do protocolo sugerido por Anschau e colaboradores (2017). 1 mg de vanilina foi dissolvido em 1 mL de água aquecida aproximadamente a 50 °C. 5 mL de ácido fosfórico (85%) foram adicionados a solução formando a fosfo-vanilina. 20 µL das frações de interesse (0,5 mM da fração Ac\_7 e 0,25 mM da fração Ac\_8) receberam a adição de 180 µL de ácido sulfúrico (1 mg/mL) e foram incubadas em banho-maria a 100 °C por 10 minutos. Como controle positivo e negativo foram saponina comercial e ácido sulfúrico, respectivamente. As amostras foram resfriadas a temperatura ambiente (27 °C) e 500 µL de reagente fosfo-vanilina foram adicionados para o desenvolvimento da coloração por 15 minutos em banho-maria a 37 °C. As amostras foram plaqueadas em triplicata em microplacas de 96 poços de fundo chato e mantidas em uma caixa escura por 45 minutos. Por fim a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA) a 550 nm.

#### **4.10 Ensaio de viabilidade celular por MTT**

A atividade antiproliferativa das frações de interesse foi avaliada utilizando a linhagem de células tumorais, MCF-7 (ATCC® HTB-22), através do método MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio), de acordo com o protocolo de Mosmann (1983).

As células foram cultivadas utilizando meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium– DMEM com a adição de 1% de antibiótico (penicilina:estreptomicina – 1:1), 10%

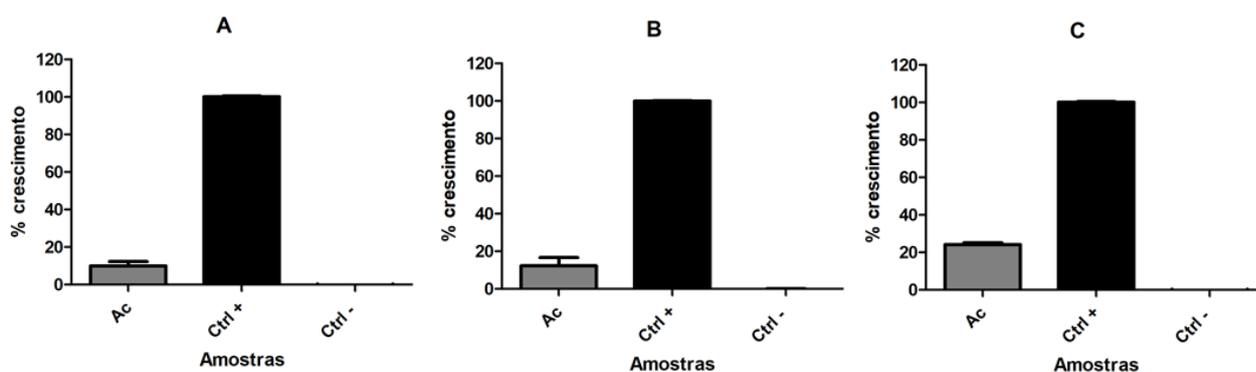
de soro fetal bovino e 0,01 mg/mL de insulina bovina. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços na proporção de  $8 \times 10^3$  células/mL e incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. As células foram tratadas com as frações cromatográficas diluídas serialmente na proporção 1:1 a partir de uma concentração inicial de 3 mM para a fração Ac\_7 e 0,9 mM da fração Ac\_8, todas em triplicata. Como controle positivo foi utilizado 1 µg/mL de doxorubicina. Após o período de incubação de 24 horas, o meio de cultura das placas foi removido e 150 µL de MTT (0,075 mg/mL) foram adicionados em cada poço. As células foram incubadas por 3 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o meio de cultura foi removido e 100 µL de DMSO (100%) foram adicionados em cada poço para dissolver o formazan formado. A quantificação do formazan foi calculada pela medida da absorbância dos poços no comprimento de onda de 495 nm em espectrofotômetro Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA).

## 5. Resultados

### 5.1 Resultados obtidos a partir da secreção bruta

#### 5.1.1 Ensaios antimicrobianos

A secreção bruta, foi avaliada quanto a sua atividade antimicrobiana contra *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923) e *C. albicans* (ATCC 10231); a secreção se mostrou eficiente contra os 3 microrganismos, apresentando inibição de aproximadamente 90% do crescimento das bactérias e 80% *C. albicans*, conforme apresentado na figura 4.



**Figura 4.** Ensaios antimicrobianos com a secreção axilar bruta de *Acanthodoras spinosissimus*. Porcentagem de crescimento de A) *Escherichia coli*, B) *Staphylococcus aureus* e C) *Candida albicans*. Os controles positivo e negativo para inibição das bactérias foram respectivamente: Ofloxacina (400 mg) e meio de cultura Mueller Hinton. Os controles positivo e negativo para inibição de *C. albicans* foram: Formaldeído (0,8%) e meio de cultura *Brain Heart Infusion*, respectivamente.

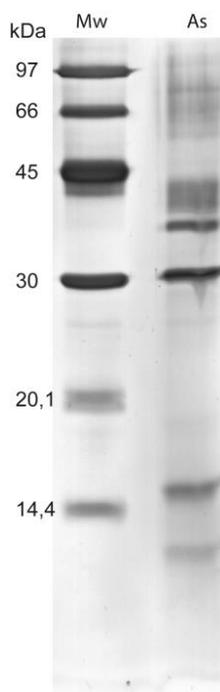
#### 5.1.2 Ensaios ictiotóxicos com embriões de peixe-zebra

Os embriões do grupo controle (0 µg/mL) e nas concentrações de 0,1 e 1 mg/L se desenvolveram normalmente como descrito por Kimmel *et al.* (1995) não sendo observada mortalidade significativa. Os organismos expostos a 10 µg/mL apresentaram um leve atraso na eclosão quando comparado com os organismos do grupo controle e mortalidade total de

20%. Todos os organismos expostos a 100 µg/mL da secreção morreram nas primeiras 24 h de exposição.

### 5.1.3 SDS-PAGE

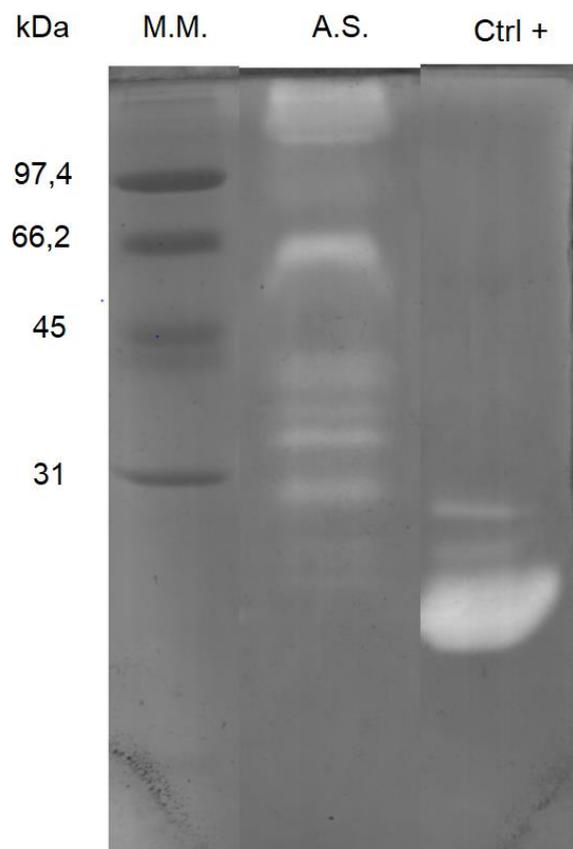
O gel de eletroforese (figura 5) demonstra a presença de compostos com massas acima de 14,4 kDa, com 3 bandas mais proeminentes, com duas entre os 45 e 30 kDa banda próxima aos 14 kDa. Também é possível notar um rastro que se forma desde o início do gel e vai até aproximadamente 40 kDa. Abaixo do marcador de 14,4 kDa ainda existe mais uma banda, indicando a presença de compostos de baixa massa na secreção.



**Figura 5.** SDS-PAGE (15%) em condições redutoras corado com nitrato de prata. Mw: Marcador molecular; As: Secreção bruta de *Acanthodoras spinosissimus*.

### 5.1.4 Zimograma

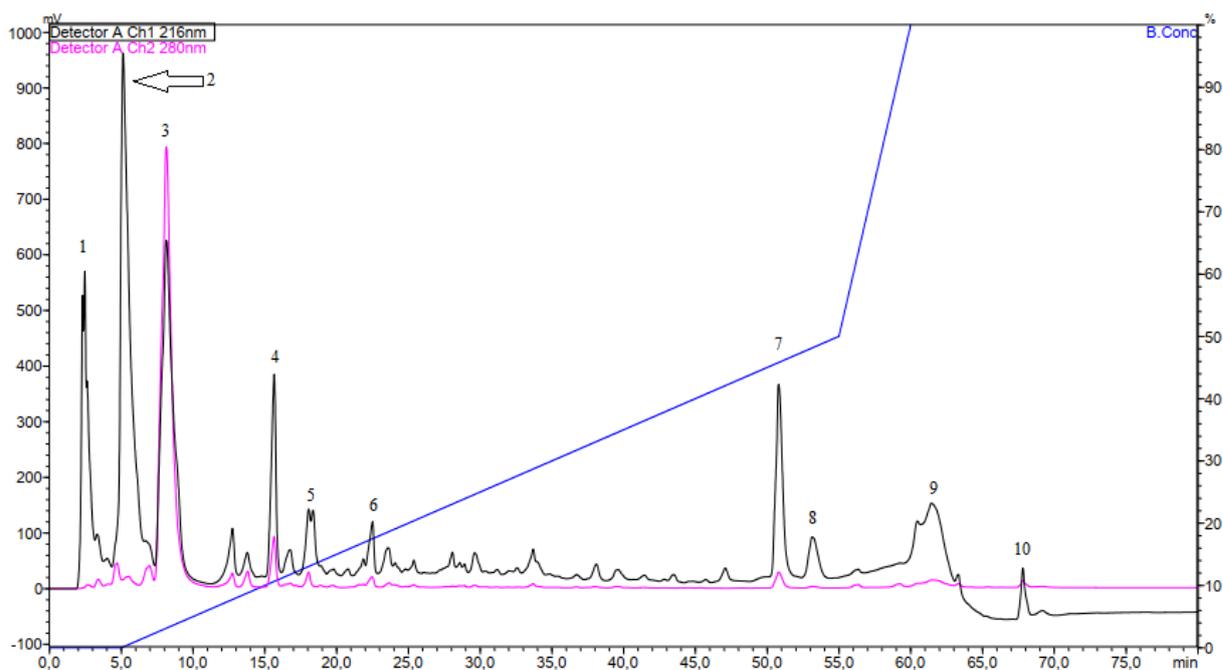
A secreção bruta apresentou atividade proteásica com bandas se formando na faixa entre os 66 e 30 kDa, indicando a presença de mais de um composto realizando essa atividade conforme apresentado na figura 6.



**Figura 6.** Atividade de protease (substrato caseína) da secreção bruta de *Acanthodoras spinosissimus* (AS). MM: marcador de massas moleculares; Ctrl +: tripsina comercial. O gel foi corado com Comassie Brilliant Blue R250 0,1 % (p/v).

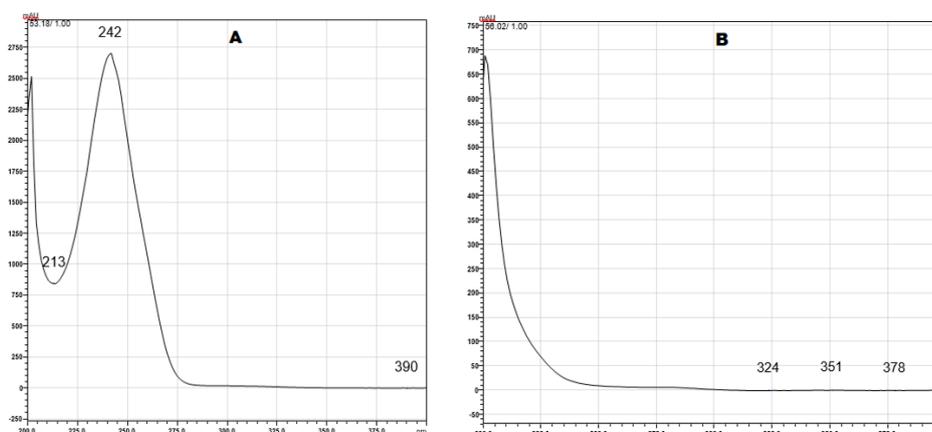
### 5.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Performance em Fase Reversa (RP-HPLC) e espectrometria UV/VIS

A purificação da secreção bruta resultou em 10 frações com absorção maior ou igual a 50 mV nomeadas como Ac\_1 a Ac\_10. O perfil cromatográfico apresentado na Figura 7 foi obtido a partir de alíquotas de 10 mg/mL da secreção bruta fracionadas em uma coluna de fase reversa analítica C<sub>18</sub> Shim-pack VP-ODS (4,6 x 150 mm, 5 µm) com fluxo de 1 mL/minuto e monitoramento em 216 e 280 nm.



**Figura 7.** Perfil cromatográfico em RP-HPLC da secreção bruta de *Acanthodoras spinosissimus* em coluna C18 (Shim-pack VP-ODS 5 µm; 4,6 x 150 mm) para um fluxo de 1,0mL/min. O monitoramento foi realizado a 216nm e 280 nm. Todas as frações coletadas manualmente. Os picos numerados representam as frações Ac\_1 a Ac\_10

Os perfis de absorção de UV das frações Ac\_7 e Ac\_8 foram analisados na faixa entre 200-400 nm (Figura 8). Os padrões diferem devido à presença de estruturas com absorção na faixa dos 240 nm na fração Ac\_7.



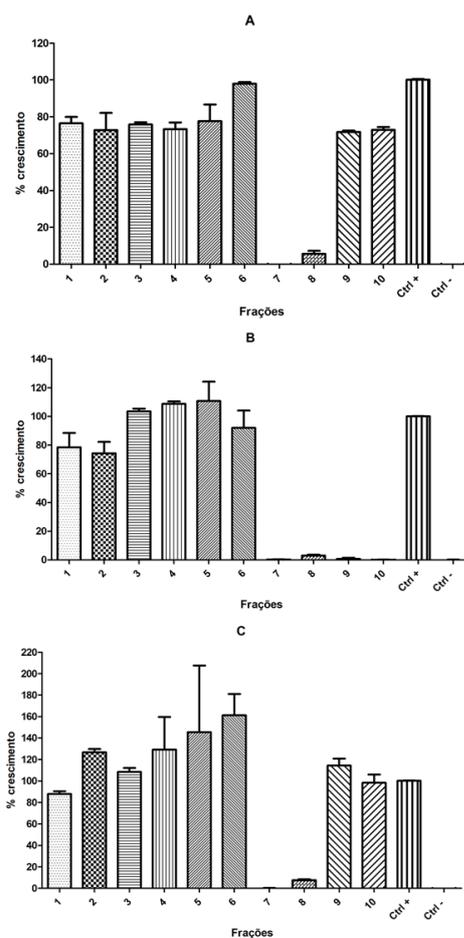
**Figura 8.** Perfil de absorção de UV das (A) fração cromatográfica 7 e (B) fração cromatográfica 8 obtidas por espectrometria do tipo UV/VIS. Os perfis foram obtidos por fotodiodo (SPDM20A) durante RP-HPLC da

secreção bruta de *Acanthodoras spinosissimus* em coluna C18 (Shim-pack VP-ODS 5µm; 4,6 x 150 mm) para um fluxo de 1,0 mL/min.

## 5.2 Resultados obtidos a partir das frações cromatográficas

### 5.2.1 Screening Antimicrobiano

As 10 frações cromatográficas obtidas, assim como a secreção bruta, foram avaliadas quanto a sua atividade antimicrobiana contra *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923) e *C. albicans* (ATCC 10231), conforme apresentado na figura 9. As frações Ac\_7 e Ac\_8 se destacaram por inibirem praticamente todo o crescimento das 3 cepas utilizadas, assim foram selecionadas para as demais avaliações.

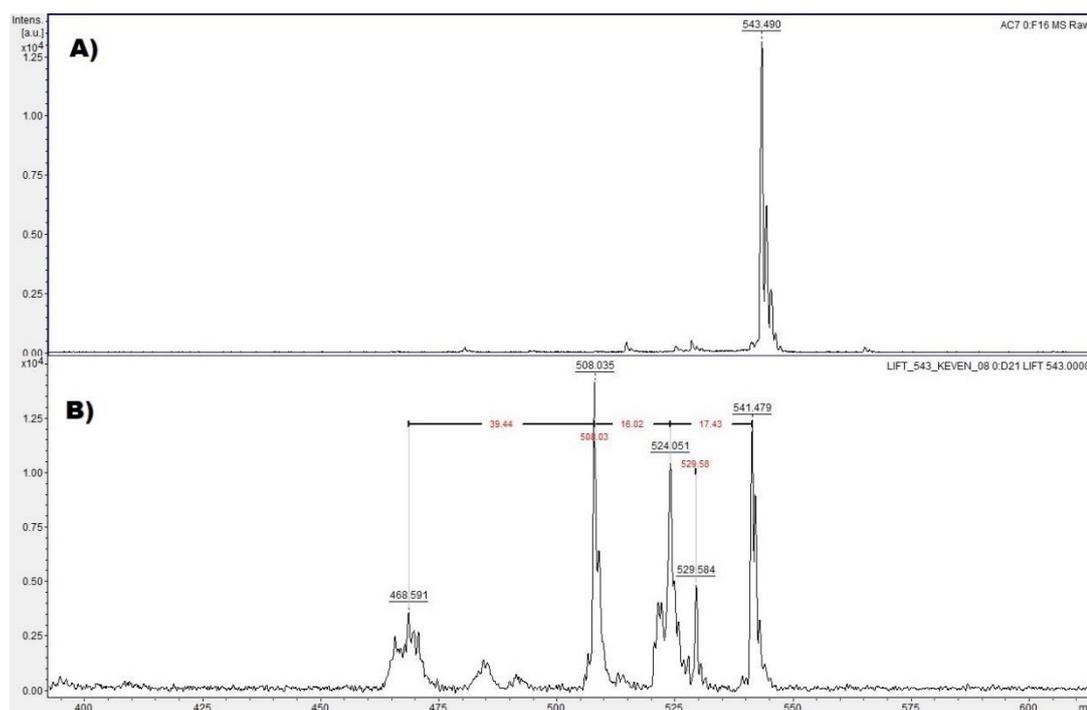


**Figura 9.** Ensaio antimicrobianos com as frações cromatográficas de *Acanthodoras spinosissimus*. Porcentagem de crescimento de A) *Escherichia coli*, B) *Staphylococcus aureus*. C) *Candida albicans* após 24

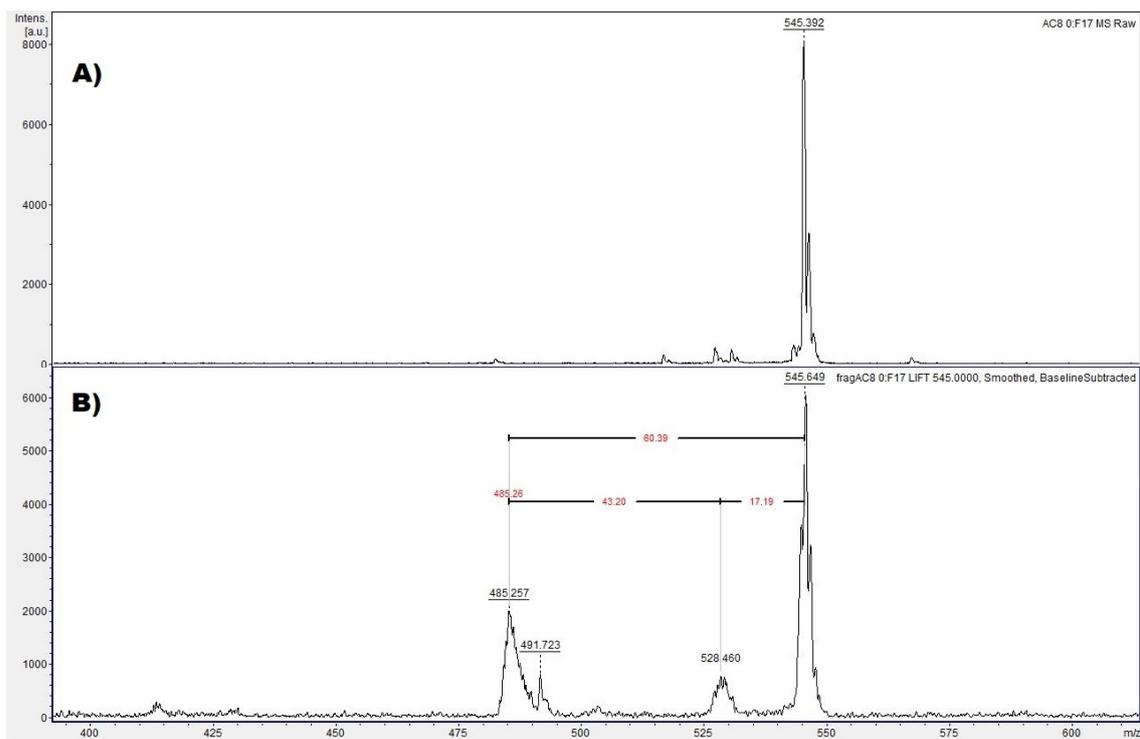
horas de incubação a 37 °C, plaqueadas em triplicata com as frações. Ctrl +: microrganismos + água deionizada. Ctrl -: microrganismos + formol 0,8%. Os resultados são expressos pela média e desvio padrão. A secreção bruta foi utilizada na concentração de 10 mg/mL.

### 5.2.2 Espectrometria de Massas – MALDI-TOF/TOF

A Fração 7 apresentou componente de massa igual a 543 Da (Figura 10). Seu padrão de fragmentação, modo LIFT (figura 10b), sugere que não seja de origem peptídica, pois não apresenta íons característicos de fragmentação de aminoácidos. A fração 8 apresentou componente de massa igual a 545 Da (Figura 11) e seu padrão de fragmentação, modo LIFT, apresenta similaridade com o padrão obtido com a fração 7, sugerindo que as frações sejam do mesmo grupo funcional.



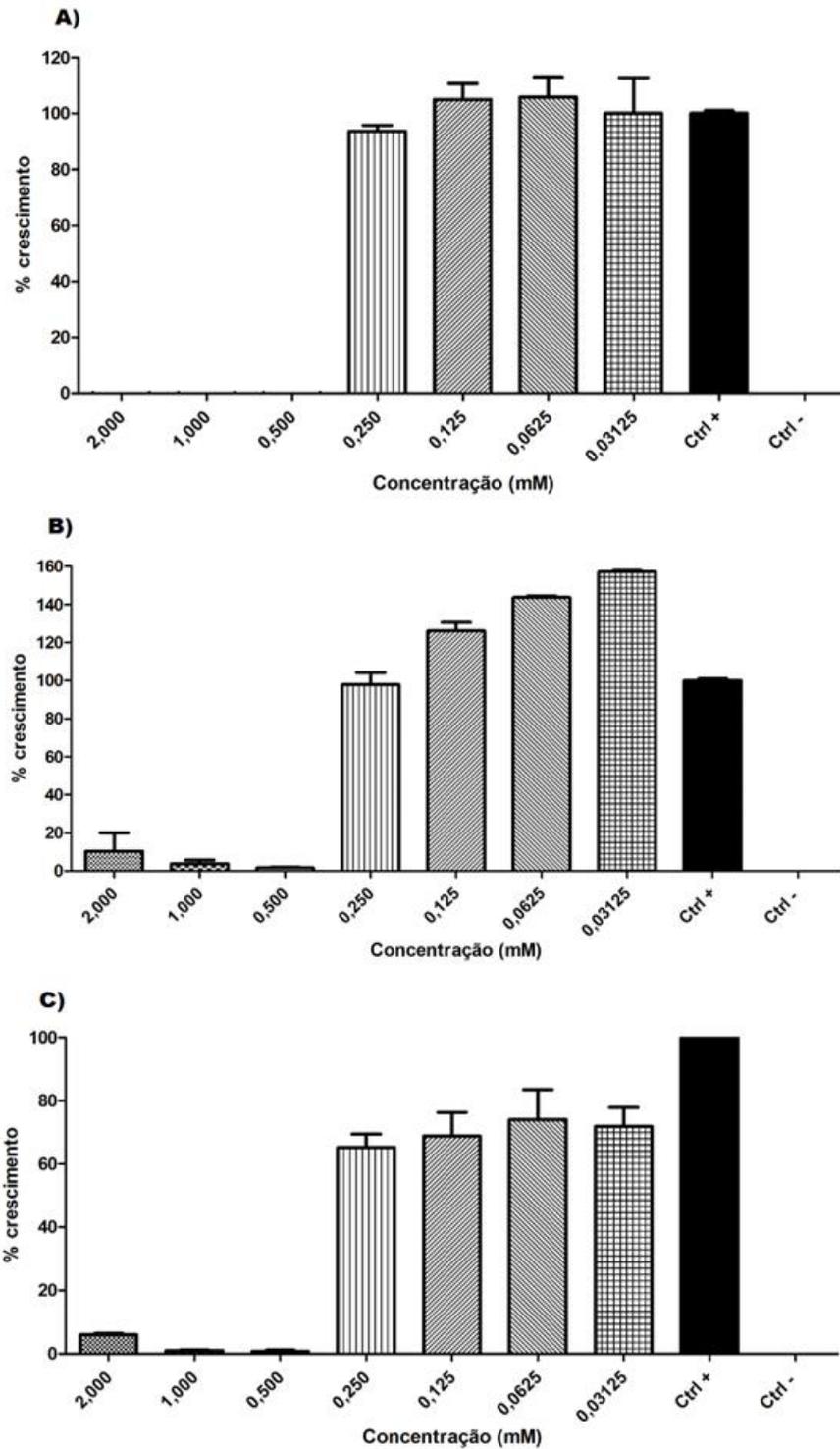
**Figura 10.** Espectro de massa da fração 7 da secreção bruta de *Acanthodoras spinosissimus* com 543,490 Da (M+H), analisadas em sistema MALDI-TOF **A)** modo refletido positivo. **B)** Padrão de fragmentação da fração 7, modo LIFT. Os espectros foram obtidos plaqueando as amostras com matriz SA (20 µg/µL).



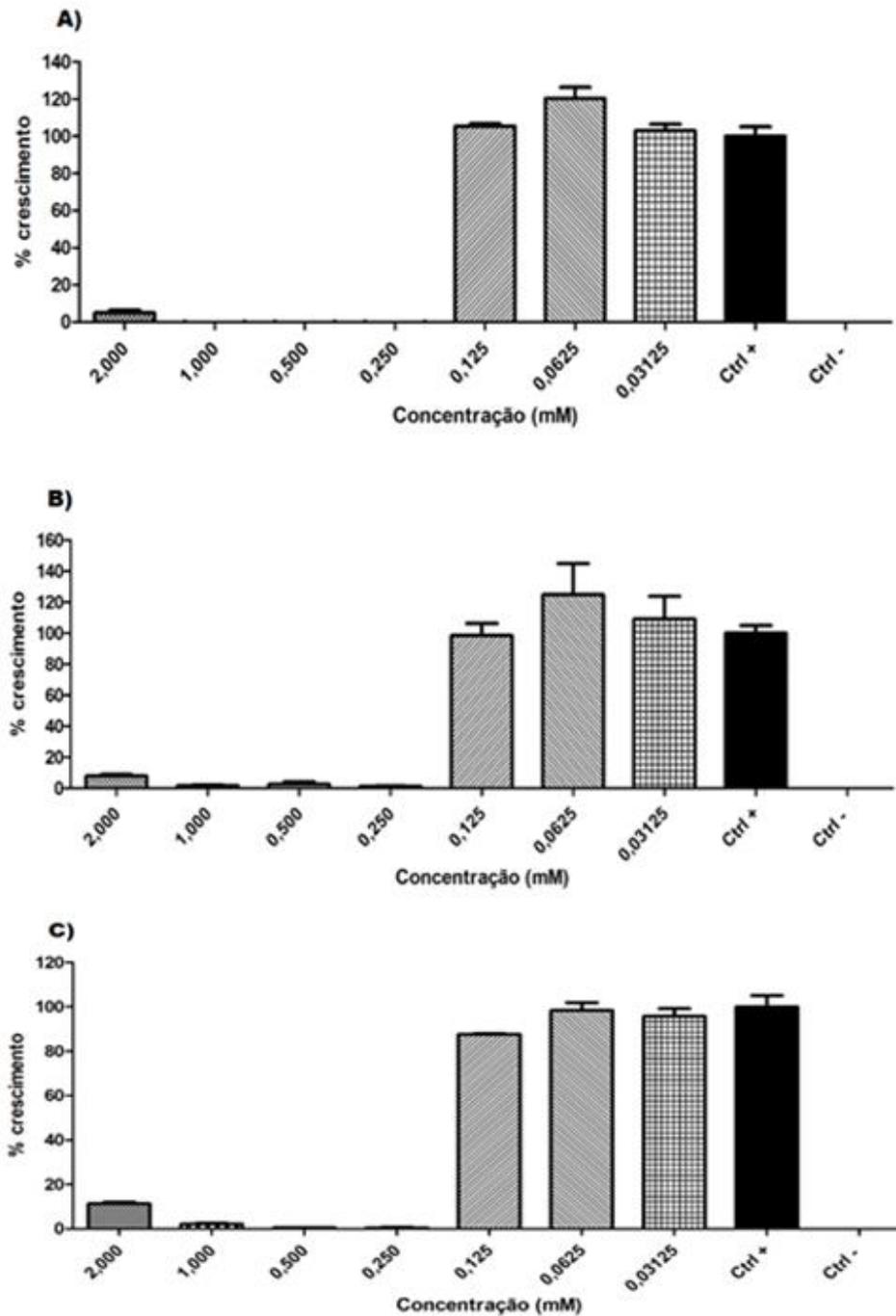
**Figura 11.** Espectro de massa da fração 8 da secreção bruta de *Acanthodoras spinosissimus* com 545,392 Da (M+H), analisadas em sistema MALDI-TOF **A)** modo refletido positivo. **B)** Padrão de fragmentação da fração 8, modo LIFT. Os espectros foram obtidos plaqueando as amostras com matriz SA (20 µg/µL).

### 5.2.3 Determinação das Mínimas Concentrações Inibitórias (MIC) das frações com atividade antimicrobiana.

As frações Ac\_7 e Ac\_8 tiveram seus MICs calculados para os três microrganismos utilizados durante o *screening* antimicrobiano. Partindo de uma concentração inicial de 2mM ambas as frações atingiram 100% de inibição em múltiplas concentrações na ordem de micromolares. O MIC de Ac\_7 foi definido com 500 µM enquanto para Ac\_8 foi de 250 µM, conforme apresentado nas figuras 12 e 13 e Tabela 1.



**Figura 12.** Ensaio antimicrobiano para a determinação dos MICs da fração Ac<sub>7</sub>. Porcentagem de crescimento de A) *Escherichia coli*, B) *Staphylococcus aureus*, C) *Candida albicans* após 20 horas de incubação a 37 °C, plaqueadas em triplicata com a fração Ac<sub>7</sub>. Controle +: microrganismos + água deionizada. Controle -: microrganismos + formol 0,8%. Os resultados são expressos pela média e desvio padrão.



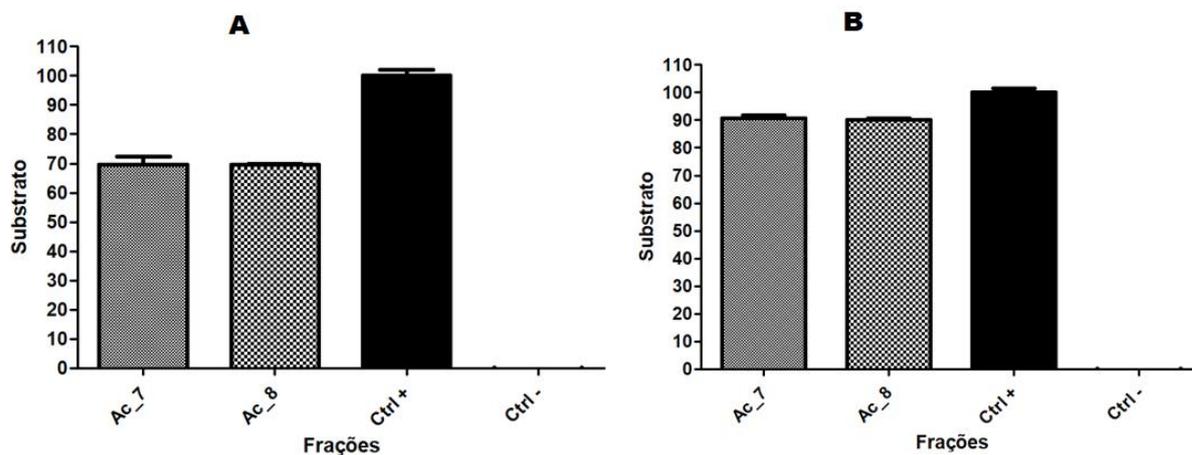
**Figura 13.** Ensaio antimicrobiano para a determinação dos MICs da fração Ac<sub>8</sub>. Porcentagem de crescimento de A) *Escherichia coli*, B) *Staphylococcus aureus*, C) *Candida albicans* após 20 horas de incubação a 37 °C, plaqueadas em triplicata com a fração Ac<sub>8</sub>. Controles +: microrganismos + água deionizada. Controles -: microrganismos + formol 0,8%. Os resultados são expressos pela média e desvio padrão.

**Tabela 1:** Concentrações Mínimas Inibitórias (MICs) das frações Ac\_7 e Ac\_8 obtidas a partir do fracionamento da secreção bruta de *Acanthodoras spinosissimus*.

	Fração Ac_7	Fração Ac_8
	( $\mu\text{M}$ )	( $\mu\text{M}$ )
<i>E. coli</i>	500	250
<i>S. aureus</i>	500	250
<i>C. albicans</i>	500	250

#### 5.2.4 Atividade sobre micelas das frações de interesse

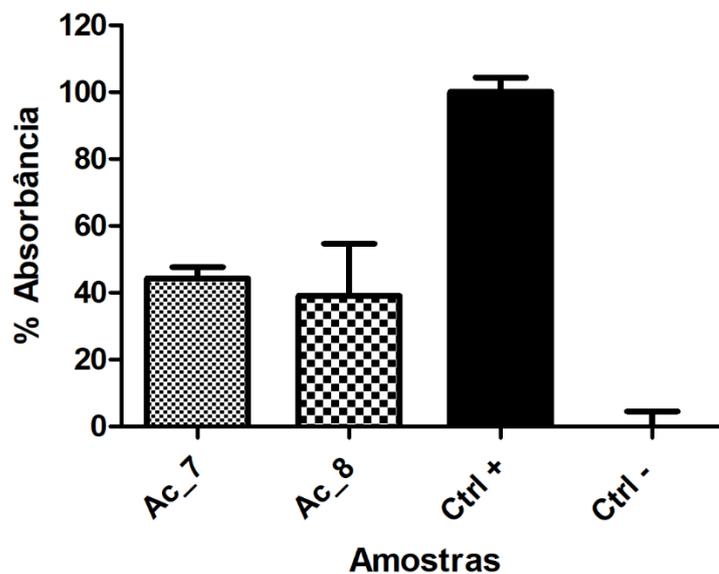
As frações Ac\_7 e Ac\_8 apresentaram atividade similar contra micelas lipídicas em um ensaio de interação com micelas formadas de fosfatidilcolina conforme apresentado na figura 14. A concentração do MIC foi escolhida como concentração inicial para avaliação e resultando em 20~30% de degradação do substrato. Essa degradação, no entanto, foi reduzida a aproximadamente 10% na presença de colesterol, sendo essa diferença considerada estatisticamente significativa (One-Way Anova seguida por Teste de múltiplas comparações de Bonferroni  $p < 0,001$ ;  $r^2 = 0,9818$ ) indicando que o colesterol interfere na interação entre as frações e a fosfatidilcolina.



**Figura 14.** Ensaios de atividade sobre micelas lipídicas a partir de emulsão de micelas plaqueadas em triplicata. O eixo Y indica a porcentagem de substrato remanescente após 1 hora de incubação com absorbância medida em 405 nm. **A)** Micelas de fosfatidilcolina. **B)** Micelas de fosfatidilcolina + colesterol (1:1). Controle +: Emulsão de micelas + Clorofórmio. Ctrl-: Emulsão de micelas. Os resultados são expressos pela porcentagem média e desvio padrão.

### 5.2.5 Caracterização lipídica por reação de Sulfo-Fosfo-Vanilina

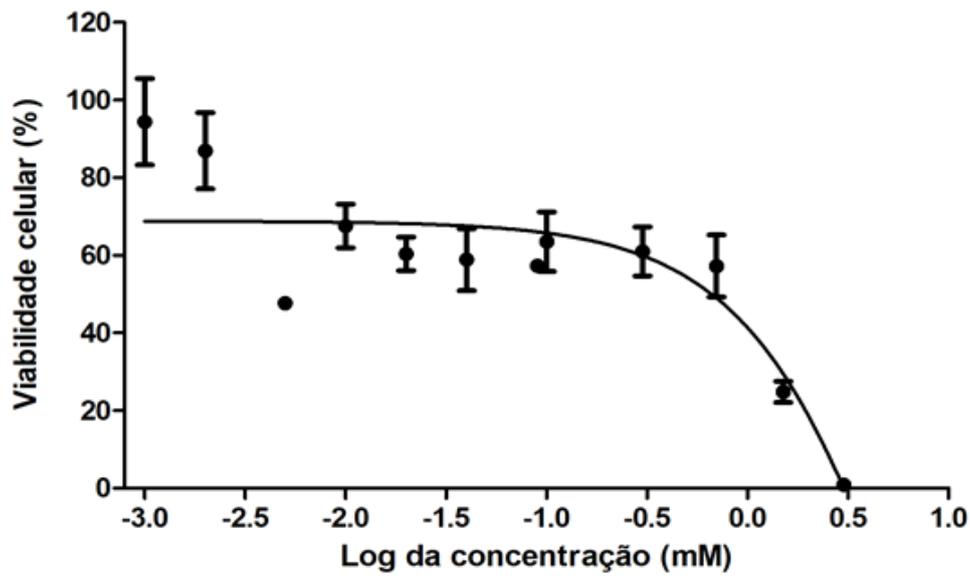
Os padrões de fragmentação das frações Ac\_7 e Ac\_8 sugerem que ambas não são peptídicas, assim foram submetidas a um ensaio de detecção de compostos lipídicos a partir da reação colorimétrica com o reagente sulfo-fosfo-vanilina (Figura 15). Este ensaio observa a presença de cadeias simples de hidrocarbonetos pela interação com a fosfo-vanilina gerando uma coloração rosa. Esses analitos ficam disponíveis no meio após a quebra da ligação de carbonos insaturados pelo ácido sulfúrico (Knight *et al.*, 1972). Embora a alteração visual não tenha sido muito evidente, ambas as frações apresentaram alterações significantes na absorbância obtida a 550 nm quando comparadas aos controles. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA seguida de teste de múltiplas comparações de Dunnett ( $p < 0,0001$ ;  $r^2 = 0,9632$ ).



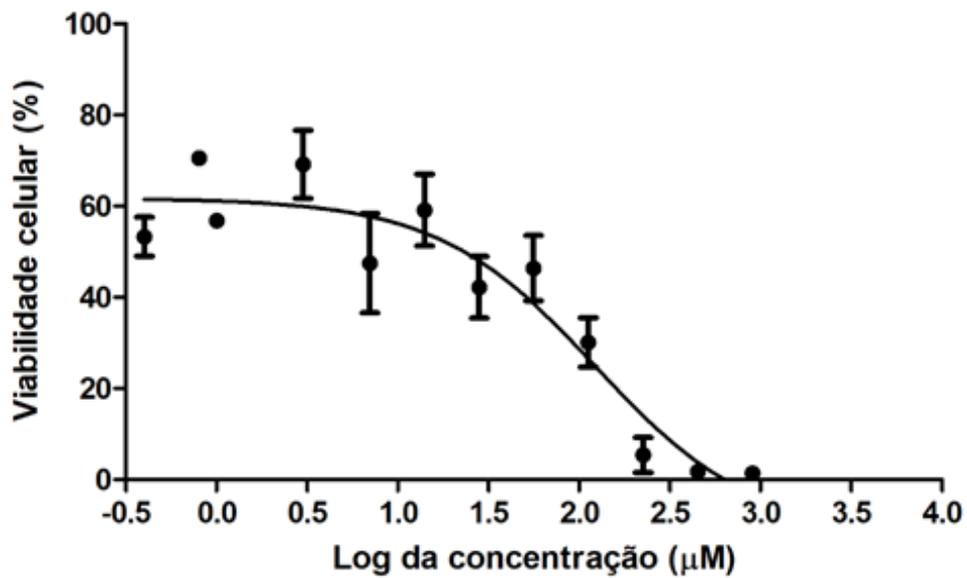
**Figura 15.** Ensaio colorimétrico com reagente Sulfo-fosfo-vanilina. A leitura foi realizada a 550 nm em espectrofotômetro Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA). Como controle positivo foi utilizada saponina comercial e negativo ácido sulfúrico. As amostras e controles foram plaqueadas em triplicata. Resultados expressos pelas médias e desvio padrão

### 5.2.6 Ensaios de viabilidade celular por MTT

As frações de interesse tiveram sua atividade contra a linhagem tumoral MCF-7 (ATCC HTB-22) avaliadas pelo método de MTT, apresentando inibição do crescimento em pelo menos 20% em quase todas as concentrações testadas conforme apresentado nas figuras 16 e 17. Os valores de  $IC_{50}$  obtidos para as frações estão na tabela 2



**Figura 16.** Ensaio de viabilidade celular por MTT da fração Ac\_7 contra células da linhagem MCF-7 após 24 horas de incubação. As amostras foram plaqueadas em triplicata. Os resultados são expressos pela porcentagem média e desvio padrão.



**Figura 17.** Ensaio de viabilidade celular por MTT da fração Ac\_8 contra células da linhagem MCF-7 após 24 horas de incubação. As amostras foram plaqueadas em triplicata. Os resultados são expressos pela porcentagem média e desvio padrão.

**Tabela 2:** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos nos ensaios citotóxicos contra MCF-7

	IC <sub>50</sub> (μM)	R <sup>2</sup>
<b>Ac_7</b>	942,53	0,7382
<b>Ac_8</b>	183,32	0,7369

## 6. Discussão

Halstead (1988) descrevia quaisquer substâncias tóxicas secretadas sem a necessidade de um aparelho inoculador como ictiocrinotoxinas, dentre as quais pode-se citar as secreções das glândulas axilares como a apresentada no presente trabalho. A liberação espontânea de toxinas por peixes em resposta ao estresse foi descrita por Kiehl (2006) e condiz com a metodologia de extração utilizada para extrair a secreção do *A. spinosissimus*.

A secreção axilar em estado bruto revelou possuir atividade tanto antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* quanto atividade ictiotóxica contra embriões de *D. rerio* no teste. Essas atividades desempenhadas por secreções de peixes se apresentam com certa regularidade como por exemplo no caso as pavoninas, uma família de esteroides aminoglicosídeos com atividade hemolítica, cuja principal função é repelir tubarões (Tachibana *et al.*, 1984). A pardaxina também apresenta atividade repelente contra tubarões (Clark & Zahurance, 1983) e hoje é considerada como o primeiro peptídeo antimicrobiano isolado de peixes devido a sua atividade contra *Escherichia coli* D21, *Acinetobacter calcoaceticus* Ac11, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* LT2, *Bacillus megaterium* Bm11, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 e *Bacillus subtilis* ATCC 6051 (Oren & Shai, 1996).

Em relação a composição das secreções axilares, mesmo dentre os estudos poucos estudos onde são mencionadas não foram encontradas caracterização de compostos presentes, mesmo entre as espécies consideradas de interesse devido a ocorrência de acidentes, sendo este um estudo pioneiro nesse sentido, assim existe uma enorme carência de informações.

O perfil revelado pelo gel de eletroforese demonstra a presença de compostos de alta massa, com ao menos duas bandas bem evidentes entre com massas entre 40 e 30 kDa, e

uma próxima dos 15 kDa, além de outra banda baixo dos 14 kDa, onde se encontram as moléculas de baixa massa como as frações Ac\_7 e Ac\_8. Essa diversidade é condizente com o perfil o perfil cromatográfico, que se mostrou bastante rico, especialmente em compostos hidrofílicos, dentre as quais se destacam as três primeiras frações. As frações 9 e 10 também chamam atenção por sua alta hidrofobicidade, uma vez que se mantem na coluna até que o gradiente de acetonitrila chegue aos 100%.

O fracionamento cromatográfico do extrato aquoso da secreção axilar (10mg/mL) resultou em 10 frações principais, dentre as quais duas foram selecionadas devido a atividade inibitória contra *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*. A fração Ac\_7 provocou inibição de aproximadamente 99,8% contra as três cepas utilizadas enquanto a fração Ac\_8 inibiu aproximadamente 94% do crescimento de *E. coli*, 96% de *S. aureus* e 92% de *C. albicans*. Esses resultados foram obtidos utilizando o material de uma única corrida cromatográfica para cada microrganismo avaliado demonstrando o alto potencial antimicrobiano da secreção.

Os espectros de absorção de UV das duas frações foram obtidos na faixa entre 200-400 nm e revelam que a fração Ac\_7 possui um pico de absorbância em 242 nm, que se não se apresenta na fração Ac\_8. A diferença nos padrões de absorção de UV observada entre ambas as frações pode ser resultado dessa diferença com um grupo funcional como um aldeído, a exemplo do benzaldeído, que apresenta um pico de absorção em 248 nm ou uma cetona aromática, como a acetofenona que apresenta com absorbância em 244 nm (Hafidi *et al.*, 2020). Embora os padrões apresentados por essas moléculas sejam semelhantes ao observado na fração Ac\_7 a ausência de absorbância em 280 nm, sugere a ausência de compostos aromáticos na estrutura da molécula.

As massas moleculares obtidas para as frações Ac\_7 e Ac\_8 foram respectivamente 543 e 545 Da e seus padrões de fragmentação não corresponde ao padrão de fragmentação

de peptídeos devido à ausência de íons característicos que se formam pela quebra dos resíduos de aminoácidos em sistema de MALDI-TOF (Séries y- e b-).

A fragmentação da fração Ac\_7 revelou um fragmento 113 Da (ANEXO), e a presença de massas de tamanho similares é comumente associada a esteroides devido à quebra de suas cadeias laterais (Wyllie *et al.*, 1977).

A fração Ac\_8 apresentou massa de 545 Da e um padrão de fragmentação similar da fração Ac\_7, sugerindo que ambas as frações podem pertencer ao mesmo grupo químico, com a diferença das massas indicada por apenas dois daltons.

As frações cromatográficas Ac\_7 e Ac\_8 foram avaliadas quanto a sua atividade inibitória contra as mesmas cepas de microrganismos avaliadas com a secreção bruta (*E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*), demonstrando MICs de 500 µM para a fração 7 e 250 µM para a fração 8. Esses resultados embora promissores, esses resultados ainda são muito altos se comparados a alguns resultados obtidos com PAMs isolados de peixes como a pleurocidina cujo MIC para *E. coli* foi de 3,5 µM (Cole *et al.*, 1997); a pardaxina (Oren & Shai, 1996) que apresenta alta atividade contra *E. coli* (cepa D21; MIC = 13 µM), *Acinetobacter calcoaceticus* (MIC = 3 µM), *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 25 µM), *Salmonella typhimurium* (40 µM), *Bacillus megaterium* (3 µM), *Micrococcus luteus* (10 µM), *B. subtilis* (5 µM). Entre peptídeos isolados de anuros, como a Raniceptina 1, foram encontrados MICs de 5 e 20 µM para as mesmas cepas de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente (Magalhaes *et al.*, 2008). Atividade contra *C. albicans* também foi reportada por Araújo e colaboradores (2018) com Raniseptina-B1 1 apresentando MIC igual a 16 µM e a Cinerascetina 01 (MIC = 10 µM), as Raniceptina 3 e 6 demonstraram MIC de 2 µM para *E. coli*, 4 e 32 µM respectivamente para *S. aureus* (Freitas, 2020). Alguns esteróides, como os bufadienolídeos telocinobufagina e marinobufagina, extraídos da secreção cutânea de *Bufo rubens*

apresentam MICs de 320  $\mu$ M para *S. aureus*, porém a marinobufagina tem maior atividade sobre *E.coli* com MIC = 40  $\mu$ M contra 160  $\mu$ M da telocinobufagina (Cunha Filho *et al.*, 2005).

As saponinas também se apresentam como potenciais antimicrobianos e antitumorais, entretanto não foram encontrados estudos com moléculas isoladas. Oyekunle e colaboradores (2006) demonstraram que o extrato de saponinas purificado da Poaceae *Sorghum bicolor* apresentou atividade contra *S. aureus* em concentrações a partir de 25 mg/mL; o extrato de saponinas de *Anabasis articulata* possui apresenta atividade contra *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *C. albicans* em com MICs variando entre 0,5 e 1 mg/mL (Maatalah *et al.*, 2012).

As frações Ac\_7 e Ac\_8 também apresentam a capacidade de lisar micelas de fosfatidilcolina, o que sugere uma possível atuação com os fosfolipídios presentes nas membranas celulares. Essa atividade também foi apresentada na presença de colesterol, embora significativamente reduzida, devido a redução na fluidez da membrana proporcionada pelas moléculas de colesterol. Em 2010, Ramamoothy e colaboradores apresentaram um estudo demonstrando que a atividade antimicrobiana da pardaxina foi significativamente reduzida na presença de colesterol devido a interferência na dinâmica entre a hélice anfipática no C terminal da pardaxina e a membrana celular.

A presença de estruturas de natureza lipídica ainda é corroborada pelo ensaio colorimétrico com Sulfo-fosfo-vanilina, que segundo Knight *et al.* (1972) é específico para lipídios poli-insaturados, o que sugerindo a presença de ao menos um grupo funcional lipídico insaturado, que pode ser responsável pela anfifilicidade apresentada pelo tempo de retenção na coluna C18 durante a etapa cromatográfica.

As frações Ac\_7 e Ac\_8 ainda apresentaram atividade citotóxica contra a linhagem MCF-7, com valores de IC<sub>50</sub> iguais a 942 e 183 µM respectivamente. Alguns poucos trabalhos demonstram atividade do muco de peixes contra células tum-oriais, caso do *Tachysurus dussumier* (família Bagridae) que possui atividade contra células A549 com valores de IC<sub>50</sub> de 5 mg/mL do muco bruto e 3 mg/mL da porção proteica parcialmente purificada (Arulvasu *et al.*, 2012). Além disso lipídios isolados de peixes também tem se revelado como bons candidatos para o tratamento de tumores, como descrito por Gupta & Serajudinn (2020) ao apresentar a atividade do extrato lipídico total da carpa *Labeo rohita* contra células PC-3 travando o ciclo celular e causando apoptose em concentrações variando entre 10 e 50 mg/mL de extrato lipídico. Compostos como as poliaminas PA<sub>366</sub> e PA<sub>389</sub> isoladas de peçonhas de aranhas da família Theraphosidae se mostraram efetivas contra a linhagem MCF-7, com a primeira apresentando atividade mesmo em concentrações variando entre 1 e 10 µM enquanto a PA<sub>389</sub> só possui atividade em concentrações acima de 1 mM (Wilson *et al.*, 2017). A poliamina PA<sub>366</sub> apresenta em sua estrutura uma cabeça aromática (2-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propanal) que possivelmente está correlacionada a sua atividade, uma vez que a presença desse grupamento é única diferença estrutural entre as duas poliaminas (Wilson *et al.*, 2017).

## 7. Conclusões

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho é possível concluir que:

1. A secreção axilar do *Acanthodoras spinosissimus* possui atividade antimicrobiana e antifúngica contra cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*.

2. A secreção axilar possui atividade ictiotóxica, influenciando o desenvolvimento embrionário de *D. rerio* de maneira dose dependente.

3. A secreção axilar de *A. spinosissimus* demonstra uma riqueza de compostos que variam muito tanto em massa molecular quanto em hidrofobicidade.

4. A secreção apresenta atividade proteásica, verificada sobre o substrato caseína.

5. A secreção possui componentes de alta massa molecular assim como compostos de baixa massa em sua composição.

6. A secreção axilar de *A. spinosissimus* possui ao menos duas frações (Ac\_7 e Ac\_8) com atividade antimicrobiana, apresentando MICs de 500 e 250  $\mu$ M contra os 3 microrganismos avaliados, sendo possivelmente as principais responsáveis pela toxicidade apresentada pela secreção bruta.

7. As frações Ac\_7 e Ac\_8 possuem massa monoisotópicas de 543 e 545 Da e não possuem padrão de fragmentação típico de peptídeos e contêm analitos lipídicos poli-insaturados em suas estruturas.

8. As frações Ac\_7 e Ac\_8 possuem atividade contra micelas fosfolipídicas, com atividade mesmo na presença de colesterol, sendo a atuação direta sobre a membrana o provável mecanismo de ação por trás da citotoxicidade apresentada.

9. As frações Ac\_7 e Ac\_8 possuem atividade citotóxica contra células tumorais da linhagem MCF-7.

## 8. Perspectivas

1. Elucidar a estrutura das frações Ac\_7 e Ac\_8 por Ressonância Nuclear Magnética.
2. Avaliar o mecanismo de citotoxicidade das frações de interesse por Citometria de Fluxo.
3. Avaliar a atividade hemolítica da secreção bruta e das frações Ac\_7 e Ac\_8.
4. Avaliar a atividade antimicrobiana das frações de interesse contra outros microrganismos e citotóxica contra outras linhagens tumorais e normais.
5. Avaliar a atividade das frações Ac\_7 e Ac\_8 contra biofilmes.
6. Avaliar as atividades antimicrobianas em ensaios clínicos por aplicação tópica sobre a pele contaminada.

## 9. Referências Bibliográficas

- ANSCHAU, A. *et al.* Validation of the sulfo-phospho-vanillin (spv) method for the determination of lipid content in oleaginous microorganisms. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 1, p. 19-27, 2017.
- ARAÚJO, Naywara Oliveira de. Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea do anuro *Boana lundii* (Burmeister, 1856). 2018.
- ARULVASU, Chinnasamy *et al.* Effect of crude and partially purified epidermal mucus proteins of marine catfish *Tachysurus dussumieri* on human cancer cell line. **JASR**, v. 1, n. 4, p. 164-9, 2012.
- BLUM, Helmut; BEIER, Hildburg; GROSS, Hans J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987.
- CAMPOS, Fabiana V. *et al.* A review on the *Scorpaena plumieri* fish venom and its bioactive compounds. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2016.
- CAMERON, Ann M.; ENDEAN, R. The axillary glands of the plotosid catfish *Cnidoglanis macrocephalus*. **Toxicon**, v. 9, n. 4, p. 345-352, 1971.
- CHEN, Jyh-Yih; LIN, Wei-Ju; LIN, Tai-Lang. A fish antimicrobial peptide, tilapia hepcidin TH2-3, shows potent antitumor activity against human fibrosarcoma cells. **Peptides**, v. 30, n. 9, p. 1636-1642, 2009.
- CHEN, Jyh-Yih *et al.* Epinecidin-1 peptide induces apoptosis which enhances antitumor effects in human leukemia U937 cells. **Peptides**, v. 30, n. 12, p. 2365-2373, 2009.

- CHURCH, Jarrod E.; HODGSON, Wayne C. The pharmacological activity of fish venoms. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1083-1093, 2002.
- CIPOLARI, Olívia C.; DE OLIVEIRA NETO, Xisto A.; CONCEIÇÃO, Katia. Fish bioactive peptides: A systematic review focused on sting and skin. **Aquaculture**, v. 515, p. 734598, 2020.
- CLARK, E.; ZAHURANCE, B. J. Shark repellent effect of the Red Sea Moses sole. **Shark Repellents from the Sea: New Perspectives**, Westview Press, Boulder, p. 135-150, 1983.
- COLE, Alexander M.; WEIS, Peddrick; DIAMOND, Gill. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 18, p. 12008-12013, 1997.
- CUNHA FILHO, Geraldino A. *et al.* Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*. **Toxicon**, v. 45, n. 6, p. 777-782, 2005.
- ISO, DIN. 11348-3 (2007) Water quality—determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)—part 3: method using freeze-dried bacteria. **International Organization for Standardization**.
- DE MARINO, Simona *et al.* Starfish saponins. 55. Isolation, structure elucidation, and biological activity of the steroid oligoglycosides from an Antarctic starfish of the family Asteroiidae. **Journal of natural products**, v. 61, n. 11, p. 1319-1327, 1998.

- ELLIS, A. E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, n. 8-9, p. 827-839, 2001.
- FERNANDES, Jorge MO *et al.* Oncorhyncin III: a potent antimicrobial peptide derived from the non-histone chromosomal protein H6 of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Biochemical Journal**, v. 373, n. 2, p. 621-628, 2003.
- FREITAS, Gabriel Gonçalves de. Identificação e caracterização de peptídeos ativos sobre bactérias patogênicas isolados da pele do anuro *Boana raniceps* (Cope, 1862). 2020.
- FROESE, Reiner; PAULY, Daniel. FishBase. World Wide Web electronic publication. 2014.<[www.fishbase.org](http://www.fishbase.org) > Acessado em 10 Mar. 2020.
- GARRONE NETO, Domingos; CORDEIRO, Ricardo Carlos; HADDAD JR, Vidal. Acidentes do trabalho em pescadores artesanais da região do Médio Rio Araguaia, Tocantins, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, p. 795-803, 2005.
- GOTTESMAN, Bat Sheva *et al.* Impact of quinolone restriction on resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from urine by culture in a community setting. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 6, p. 869-875, 2009.
- GREVEN, Hartmut; FLASBECK, Tim; PASSIA, Dieter. Axillary glands in the armoured catfish *Corydoras aeneus* (Callichthyidae, Siluriformes). **Verh. Ges. Ichthyol**, v. 6, p. 65-69, 2006.
- GÜNTHER, Albert Carl Ludwig Gotthilf. **An introduction to the study of fishes**. A. and C. Black, 1880.

- GUPTA, Pragma; SERAJUDDIN, M. Fish Lipid against Prostate Cancer (PC-3) through Apoptosis and Cell Cycle Arrest. **Nutrition and cancer**, v. 73, n. 2, p. 300-306, 2021..
- HADDAD JUNIOR, Vidal. Animais aquáticos potencialmente perigosos do Brasil: guia médico e biológico. In: **Animais aquáticos potencialmente perigosos do Brasil: guia médico e biológico**. 2008. p. 268-268.
- HADDAD JR, Vidal; MARTINS, Itamar Alves. Frequency and gravity of human envenomations caused by marine catfish (suborder siluroidei): a clinical and epidemiological study. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 838-843, 2006.
- HAFIDI, Zakaria *et al.* Micellar Catalysis Strategy of Cross-Condensation Reaction: The Effect of Polar Heads on the Catalytic Properties of Aminoalcohol-Based Surfactants. **Catalysis Letters**, v. 150, n. 5, p. 1309-1324, 2020.
- HALSTEAD, Bruce W. Poisonous and venomous marine animals of the world: invertebrates. US Government Printing Office, 1965.
- HALSTEAD, Bruce W. Poisonous and venomous marine animals of the world. 1988.
- HILLES, A. R. *et al.* Review about the importance of skin mucus from asian swamp eel (*Monopterus albus*). **MOJ Proteomics Bioinform**, v. 7, n. 5, p. 152-153, 2018.
- INSTITUTO CHICO MENDES. Fauna Brasileira, 2021. <  
<https://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira>>. Acessado em 18 Abr. 2021
- KIEHL, Ernst; RIEGER, Claudia; GREVEN, Hartmut. Axillary gland secretions contribute to the stress-induced discharge of a bactericidal substance in *Corydoras sterbai* (Callichthyidae, Siluriformes). **Verh. Ges. Ichthyol**, v. 6, p. 111-115, 2006.

- KIMMEL, Charles B. *et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.
- KNIGHT, Joseph A.; ANDERSON, Shauna; RAWLE, James M. Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids. **Clinical chemistry**, v. 18, n. 3, p. 199-202, 1972.
- KWAK, Choong-Hwan *et al.* Induction of apoptosis and antitumor activity of eel skin mucus, containing lactose-binding molecules, on human leukemic K562 cells. **Marine drugs**, v. 13, n. 6, p. 3936-3949, 2015.
- LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LAUTH, Xavier *et al.* Discovery and characterization of two isoforms of moronecidin, a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 7, p. 5030-5039, 2002.
- LIN, Wei-Ju *et al.* Epinecidin-1, an antimicrobial peptide from fish (*Epinephelus coioides*) which has an antitumor effect like lytic peptides in human fibrosarcoma cells. **Peptides**, v. 30, n. 2, p. 283-290, 2009.
- LIN, Heng-Ju *et al.* Piscidin-1, an antimicrobial peptide from fish (hybrid striped bass *Morone saxatilis* x *M. chrysops*), induces apoptotic and necrotic activity in HT1080 cells. **Zoological science**, v. 29, n. 5, p. 327-332, 2012.
- LOPES-FERREIRA, Mônica *et al.* Analysis of the intersexual variation in *Thalassophryne maculosa* fish venoms. **Toxicon**, v. 115, p. 70-80, 2016.

- MAATALAH, M. Benziane *et al.* Antimicrobial activity of the alkaloids and saponin extracts of *Anabasis articulata*. **J. Biotechnol. Pharm. Res**, v. 3, n. 3, p. 54-57, 2012.
- MACKIE, A. M.; SINGH, H. T.; OWEN, J. M. Studies on the distribution, biosynthesis and function of steroidal saponins in echinoderms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 56, n. 1, p. 9-14, 1977.
- MAGALHÃES, Beatriz S. *et al.* 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.
- MAGALHÃES, Geraldo S. *et al.* Natterins, a new class of proteins with kininogenase activity characterized from *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Biochimie**, v. 87, n. 8, p. 687-699, 2005.
- MARINETTI, G.V. The action of phospholipase A on lipoproteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 98, n. 3, p. 554-565, 1965.
- MARR, A. K.; GOODERHAM, W. J.; HANCOCK, R. E. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. **Curr. Opin. Pharmacol.** v. 6, n. 5, p.468-472. 2006.
- MASSO-SILVA, J. A.; DIAMOND, G. Antimicrobial peptides from fish. **Pharmaceutics** 7: 265–310. 2014. doi:10.3390/ph7030265.
- MATSUZAKI, K., HARADA, M., FUNAKOSHI, S., FUJII, N., MIYAJIMA, K. (1991). Physicochemical determinants for the interactions of magainins 1 and 2 with acidic lipid bilayers. **Biochim. Biophys. Acta**, 1063(1), 162-170.

- MOJSOSKA, B., JENSSEN, H. (2015). Peptides and peptidomimetics for antimicrobial drug design. **Pharmaceuticals** (Basel), 8(3), 366-415.
- MORAES, Amanda Ludogério; ARAÚJO, Nayara Gabriele Picanço; BRAGA, Tatiana de Lima. Automedicação: revisando a literatura sobre a resistência bacteriana aos antibióticos. **Revista Eletrônica Estácio Saúde**, v. 5, n. 1, p. 122-132, 2016.
- NASCIMENTO, A. C.; FONTES, W.; SEBBEN, A.; CASTRO, M. S. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. **Protein. Pept. Lett.** v. 10, n. 3, p. 227-38.2003
- NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; **Approved Standard**—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- NELSON, Joseph S.; GRANDE, Terry C.; WILSON, Mark VH. **Fishes of the World**. John Wiley & Sons, 2016.
- NESTERENKO, Michael V.; TILLEY, Michael; UPTON, Steve J. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 28, n. 3, p. 239-242, 1994.
- NIGRELLI, Ross F. *et al.* Substances of potential biomedical importance from marine organisms. In: **Federation proceedings**. 1967 (Vol. 26, No. 4, pp. 1197-1205).
- OECD Test. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. **OECD guidelines for the testing of chemicals, section**, v. 2, p. 1-22, 2013.

- OREN, Ziv; SHAI, Yechiel. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 237, n. 1, p. 303-310, 1996. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0303n.x.
- OYEKUNLE, M. A. *et al.* Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum bicolor* L. Moench. **African journal of Biotechnology**, v. 5, n. 23, 2006.
- PETTIT, George R. *et al.* Antineoplastic components of marine animals. **Nature**, v. 227, n. 5261, p. 962-963, 1970. <https://doi.org/10.1038/227962a0>
- POMPONI, Shirley A. The bioprocess–technological potential of the sea. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1-3, p. 5-13, 1999. doi:10.1016/s0079-6352(99)80092-7
- PRIMOR, Naftali; TU, Anthony T. Conformation of pardaxin, the toxin of the flatfish *Pardachirus marmoratus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure**, v. 626, n. 2, p. 299-306, 1980. doi:10.1016/0005-2795(80)90124-5.
- RAMAMOORTHY, Ayyalusamy *et al.* Cholesterol reduces pardaxin's dynamics—a barrel-stave mechanism of membrane disruption investigated by solid-state NMR. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1798, n. 2, p. 223-227, 2010.
- RUGGIERI, G. D.; NIGRELLI, R. F. Physiologically active substances from echinoderms. In: **Bioactive Compounds from the Sea**. Dekker New York, 1974. p. 183.
- RUSSELL, Findlay E. Marine toxins and venomous and poisonous marine animals. In: **Advances in marine biology**. Academic Press, 1965. p. 255-384.

- SABAJ, Mark Henry. **Taxonomy of the Neotropical thorny catfishes (Siluriformes: Doradidae) and revision of genus *Leptodoras***. University of Illinois at Urbana-Champaign, 2002.
- SABAJ, M.H. & FERRARIS JR. C.J., 2003. Doradidae (Thorny catfishes). p. 456-469. In REIS, Roberto E.; KULLANDER, Sven O.; FERRARIS, Carl J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Edipucrs, 2003.
- SANTOS, Neusa de Queiroz. La resistencia bacteriana en el contexto de la infección hospitalaria. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 13, n. spe, p. 64-70, 2004.
- SARMIENTO, Beatriz Elena *et al.* First report of the characterization of the pathophysiological mechanisms caused by the freshwater catfish *Pimelodus maculatus* (order: Siluriformes). **Toxicon**, v. 101, p. 55-62, 2015.
- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento** .3 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2001. cap.27, p.597-619.
- SILVEIRA, Gustavo Pozza *et al.* Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.
- SMITH, William Leo; WHEELER, Ward C. Venom evolution widespread in fishes: a phylogenetic road map for the bioprospecting of piscine venoms. **Journal of Heredity**, v. 97, n. 3, p. 206-217, 2006.
- SOSA-ROSALES, Josefina Ines *et al.* Important biological activities induced by *Thalassophryne maculosa* fish venom. **Toxicon**, v. 45, n. 2, p. 155-161, 2005.

- TACHIBANA, Kazuo; SAKAITANAI, Masahiro; NAKANISHI, Koji. Pavoninins: shark-repelling ichthyotoxins from the defense secretion of the Pacific sole. **Science**, v. 226, n. 4675, p. 703-705, 1984.
- TACHIBANA, Kazuo; GRUBER, Samuel H. Shark repellent lipophilic constituents in the defense secretion of the Moses sole (*Pardachirus marmoratus*). **Toxicon**, v. 26, n. 9, p. 839-853, 1988.
- TAN, Paul TJ; KHAN, Asif M.; BRUSIC, Vladimir. Bioinformatics for venom and toxin sciences. **Briefings in bioinformatics**, v. 4, n. 1, p. 53-62, 2003. doi:10.1093/bib/4.1.53
- TRIM, Steven A.; TRIM, Carol M. Venom: The sharp end of pain therapeutics. **British journal of pain**, v. 7, n. 4, p. 179-188, 2013.
- WILSON, David *et al.* The aromatic head group of spider toxin polyamines influences toxicity to cancer cells. **Toxins**, v. 9, n. 11, p. 346, 2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer, 2021. <[https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1)>. Acessado em 07 Fev. 2021.
- WRIGHT, Jeremy J. Evolutionary history of venom glands in the Siluriformes. **Evolution of venomous animals and their toxins. Toxinology. Dordrecht (the Netherlands): Springer**, p. 279-301, 2017.
- WU, Shu-Ping *et al.* Pardaxin, a fish antimicrobial peptide, exhibits antitumor activity toward murine fibrosarcoma in vitro and in vivo. **Marine drugs**, v. 10, n. 8, p. 1852-1872, 2012.

WYLLIE, S. G.; AMOS, Bernard A.; TOKES, Laszlo. Electron impact induced fragmentation of cholesterol and related C-5 unsaturated steroids. **The Journal of organic chemistry**, v. 42, n. 4, p. 725-732, 1977. *The Journal of organic chemistry*, 42(4), 725-732.

ZIEGMAN, Rebekah; ALEWOOD, Paul. Bioactive components in fish venoms. **Toxins**, v. 7, n. 5, p. 1497-1531, 2015.

# Anexos

## Anexo I - Espectro original obtido a partir da fragmentação da Fração Ac\_7

