

# Identificação e isolamento de compostos bioativos da secreção de *Rhinella mirandaribeiroi* (Bufonidae)

Daniella Emidio Torres

Orientador: Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.



Brasília, abril de 2021

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”*

(Martin Luther King)

# *Agradecimentos*

Agradeço primeiramente à Deus. Aos meus pais Graziela e João Bosco, ao meu irmão Filipe, por terem me dado muito apoio, carinho, incentivo, compreensão e paciência. Desde sempre foram muito exigentes e me deram todo o suporte que eu precisasse para a minha educação, além do total apoio na escolha do meu caminho profissional. Muitas vezes curiosos quanto ao mundo da ciência, chegando a fazer algumas visitas ao laboratório. Agradeço também aos meus familiares, que tanto amam essa área e inclusive possuo colegas de classe na família. Aos meus amigos, que tanto me escutaram lamentar, chorar, me apoiaram, animaram e comemoraram junto comigo.

Ao professor Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior, pela orientação desde a graduação até hoje, e pretendo ter para sempre essa base de apoio. Agradeço pela confiança, em acreditar no meu potencial, pelos conselhos, por todo o conhecimento passado, por estar presente e atuante em todo o projeto, pela amizade e por sempre estar positivo quanto aos resultados do projeto e com isso me encorajar a continuar. À professora Dr. Élide Geralda Campos do Departamento de Biologia Celular – IB, que cedeu o acesso, espaço, equipamentos e materiais de seu laboratório, além de seu tempo, conhecimento e confiança, para que eu realizasse ensaio antioxidante. À professora Dr. Sandra Fernandes Arruda do Departamento de Nutrição – FS, que pôs à disposição seu grupo para a realização de um ensaio antioxidante, além de explicar todo o resultado e processo. À UnB – Faculdade de Ceilândia que disponibilizou o uso de equipamentos laboratoriais.

À doutoranda Ana Carolina Martins Magalhães, que foi a primeira pessoa que me acolheu no laboratório quando estava na graduação, me ensinou desde os processos básicos do laboratório, até os mais avançados e específicos. E hoje, além de ser uma segunda orientadora no meu projeto, me auxiliou em várias etapas do mestrado. Ao doutorando Carlos Santana, que contribuiu com seu conhecimento em etapas importantes. A todos os meus colegas de laboratório que por todos esses anos me ajudaram, seja tirando uma dúvida, revezando equipamentos, coleta de material em campo, empréstimo de solução, trocas de

resultados e conhecimento, pelas conversas e risadas. Jéssica Oliveira, Jessica Schneider, Isadora, Gabriel, Keven, João e demais. Aos alunos de Iniciação Científica: Fernando, Ana e Yasmim que foram meus pupilos por um tempo.

À Universidade de Brasília, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, pelo suporte institucional. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro através da concessão da bolsa de estudos. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) pelo financiamento à pesquisa brasileira. Aos professores que se dispuseram a participar dessa banca.

A todos, meu eterno agradecimento nessa importante etapa da minha vida, em meio ao caos de  
uma pandemia.

## Resumo

A secreção cutânea dos anfíbios apresenta um mecanismo de defesa inata, sendo constituída por inúmeros compostos bioativos de várias classes moleculares e o papel dessa defesa passiva é, principalmente, contra microrganismos, predadores e injúrias bioquímicas. A secreção cutânea da família Bufonidae é rica em compostos de baixa massa molecular como aminas biogênicas, esteroides e alcaloides, mas também podem ser encontrados peptídeos e proteínas, e muitos possuem importantes funções farmacológicas. O Brasil é o território com a maior diversidade de anfíbios do mundo, uma dessas espécies é a *Rhinella mirandaribeiroi* (Cururuzinho), um anuro da família Bufonidae, ainda é pouco explorada como alvo de estudos bioquímicos. Portanto, este trabalho teve como objetivo analisar a secreção cutânea de *Rhinella mirandaribeiroi*, para a identificação e caracterização de compostos bioativos. Primeiramente foram analisadas as atividades bioativas do extrato aquoso da secreção bruta, onde se obteve resultado de parcial inibição no crescimento de células bacterianas de *Escherichia coli* (39%) e células fúngicas de *Candida albicans* (41%);  $IC_{50}$  igual a 3,2, 4,6 e 5,6 mg/mL para as linhagens B16F10, HeLa e MCF-7, respectivamente; parcial atividade fosfolipásica e antioxidante. Posteriormente a secreção foi fracionada por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) e obteve-se 24 frações. Foram realizados os ensaios antibacteriano e antifúngico para todas as frações. Considerando uma inibição de crescimento aproximadamente maior que 95%, obtivemos 4 frações que inibiram o crescimento de células bacterianas e 11 frações que inibiram células fúngicas. Foram purificados e caracterizados 3 compostos de principal interesse. O composto chamado de Fração RRM-22.6 observamos se tratar de uma fosfolipase do tipo  $A_2$  que possui aproximadamente 14 KDa e inibiu parcialmente células fúngicas de *C. albicans* em 61%. A Fração RRM-12.5 sugerimos ser um esteroide bufadienolídeo de 415  $m/z$ , possivelmente uma bufotalina ou 19-oxo-desacetylcinobufagina, que inibiu parcialmente o crescimento de células bacterianas (*E. coli* e *S. aureus*), inibiu em 80% o crescimento de células fúngicas (*C. albicans*), além de ter atividade antioxidante. A Fração RRM-5.1 sugerimos se tratar de uma amina biogênica, especificamente uma indolquilamina de 203  $m/z$ , a dehidrobufotenina, que teve alta

atividade antioxidante nos ensaios de redução do ferricianeto, FRAP e MTT; por citometria de fluxo, manteve as células de MCF-7 viáveis e teve ação protetora para as células contra a atividade apoptótica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; teve atividade de inibição de crescimento em quase 100% contra células bacterianas de *Staphylococcus aureus* e 80% contra *Escherichia coli*.

**Palavras-chave:** anfíbio; anuro; secreção cutânea; *Rhinella mirandaribeiroi*; amina biogênica; dehidrofufotenina; fosfolipase A<sub>2</sub>; bufadienolídeo; bufotalinina; 19-oxo-desacetylcinobufagina; antimicrobiano; antibacteriano; antifúngico; antioxidante.

## *Abstract*

The skin secretion of amphibians presents an innate defense mechanism, consisting in a numerous bioactive compound of various molecular classes and the role of this passive defense is mainly against microorganisms, predators and biochemical injuries. The skin secretion of the Bufonidae family is rich in low molecular weight compounds such as biogenic amines, steroids, and alkaloids, but peptides and proteins can also be found, and they have important pharmacological functions. Brazil is the territory with the greatest diversity of amphibians in the world and one of these species is *Rhinella mirandaribeiroi* (Cururuzinho), an anuran of the family Bufonidae that is still poorly explored as a target for biochemical studies. Therefore, this work aimed to analyze the skin secretion of *Rhinella mirandaribeiroi*, for the identification and characterization of bioactive compounds. Firstly, the bioactivities of the aqueous extract of the skin secretion were analyzed, where we obtained results of partial inhibition in the growth of *Escherichia coli* bacterial cells (39%) and *Candida albicans* fungal cells (41%); IC<sub>50</sub> equal to 3.2, 4.6 and 5.6 mg/mL for B16F10, HeLa and MCF-7, respectively; partial phospholipase and antioxidant activity. Subsequently, the secretion was fractionated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and eluted 24 fractions. Antibacterial and antifungal assays were performed for all fractions. Considering a growth inhibition approximately greater than 95%, we obtained 4 fractions that inhibited the growth of bacterial cells and 11 fractions that inhibited fungal cells. Three compounds of main interest were purified and characterized. The compound called Fraction RRM-22.6 was identified as a phospholipase A<sub>2</sub> that has approximately 14 KDa and partially inhibited *C. albicans* fungal cells by 61%. Fraction RRM-12.5 we suggested to be a bufadienolide steroid at 415 *m/z*, possibly a bufotalinin or 19-oxo-desacetylcinobufagin, which partially inhibited the growth of bacterial cells (*E. coli* and *S. aureus*), inhibited the growth of fungal cells (*C. albicans*) by 80%, and also had antioxidant activity. The fraction RRM-5.1 we suggested to consist of a biogenic amine, specifically an indolalkylamine of 203 *m/z*, the dehydrobufotenin, which had high antioxidant activity in ferricyanate reduction, FRAP and MTT assays; by flow cytometry, it kept MCF-7 cells viability and had protective ability to cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

apoptotic activity; it had almost 100% growth inhibition activity against *Staphylococcus aureus* bacterial cells and 80% against *Escherichia coli*.

**Keywords:** amphibian; anuran; skin secretion; *Rhinella mirandaribeiroi*; biogenic amine; dehydrophufotenin; phospholipase A2; bufadienolide; bufotalinin; 19-oxo-desacetylcinobufagin; antimicrobial; antibacterial; antifungal; antioxidant.



# Índice

ABREVIACÕES.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	19
INTRODUÇÃO.....	21
1. Anfíbios como fonte de compostos bioativos.....	22
2. Secreção cutânea de sapos Bufonidae.....	23
3. Bufadienólídeos.....	24
4. Aminas Biogênicas.....	26
5. Peptídeos antimicrobianos (PAMs).....	28
6. PAMs com atividade anticarcinogênica.....	28
7. Inibidores de protease.....	30
8. Fosfolipase.....	32
9. Espécies reativas ao oxigênio.....	34
10. Antioxidantes.....	34
11. <i>Rhinella mirandaribeiroi</i> . ....	40
JUSTIFICATIVA.....	42
OBJETIVOS.....	43
MATERIAIS E METODOS.....	44
1. Coleta e extração da secreção cutânea.....	45

<b>2. Purificação dos compostos.....</b>	<b>45</b>
<b>2.1. Fracionamento Cromatográfico RP-HPLC.....</b>	<b>45</b>
<b>2.2. Fracionamento Recromatográfico RP-HPLC.....</b>	<b>45</b>
<b>2.3. Absorbância UV.....</b>	<b>46</b>
<b>3. Ensaio biológicos .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1. Avaliação da atividade antibacteriana.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2. Avaliação da atividade antifúngica.....</b>	<b>47</b>
<b>3.3. Cultivo de células animais e ensaio de viabilidade celular.....</b>	<b>48</b>
<b>3.4. Citometria de fluxo – Ensaio apoptótico.....</b>	<b>50</b>
<b>4. Caracterização da Inibição Enzimática.....</b>	<b>51</b>
<b>4.1. Tripsina.....</b>	<b>51</b>
<b>4.2. Quimotripsina.....</b>	<b>52</b>
<b>5. Atividade fosfolipásica.....</b>	<b>53</b>
<b>6. Ensaio Antioxidantes.....</b>	<b>53</b>
<b>6.1. Ensaio de redução de Ferricianeto de potássio em Ferrocianeto de potássio.....</b>	<b>53</b>
<b>6.2. Método de degradação da 2-DR pelo radical OH.....</b>	<b>54</b>
<b>6.3. Poder Antioxidante de Redução do Ferro - FRAP.....</b>	<b>56</b>
<b>6.4. Ensaio MTT antioxidante.....</b>	<b>57</b>
<b>7. Caracterização da estrutura primária por espectrometria de massa.....</b>	<b>58</b>
 <b>RESULTADOS.....</b>	 <b>60</b>
<b>1. Atividades da secreção bruta.....</b>	<b>61</b>
<b>1.1. Atividade antibacteriana e antifúngica.....</b>	<b>61</b>
<b>1.2. Atividade de viabilidade celular.....</b>	<b>62</b>
<b>1.3. Atividade inibidora de serino protease.....</b>	<b>62</b>
<b>1.4. Atividade fosfolipásica.....</b>	<b>63</b>
<b>1.5. Ensaio de redução de Ferricianeto de potássio em Ferrocianeto de potássio.....</b>	<b>64</b>
<b>2. Fracionamento da secreção bruta e atividade das frações.....</b>	<b>65</b>
<b>2.1. Atividade antibacteriana e antifúngica.....</b>	<b>65</b>

2.2. Atividade fosfolipásica.....	69
2.3. Ensaio de redução de Ferricianeto de potássio em Ferrocianeto de potássio.....	70
<b>3. Frações de interesse.....</b>	<b>70</b>
<b>3.1. Fração 22.....</b>	<b>70</b>
3.1.1. Purificação.....	70
3.1.2. Atividade fosfolipásica.....	72
<b>3.2. Fração 12.....</b>	<b>72</b>
3.2.1. Purificação.....	72
3.2.2. Ensaio antioxidantes.....	75
3.2.2.1. FRAP.....	75
3.2.2.2. Ensaio de degradação à desoxirribose.....	76
<b>3.3. Fração 5.....</b>	<b>77</b>
3.3.1. Purificação.....	77
3.3.2. Atividade antibacteriana e antifúngica.....	80
3.3.3. Atividade antioxidante.....	81
3.3.3.1. FRAP.....	81
3.3.3.2. Proteção oxidativa à desoxirribose.....	82
3.3.3.3. Redução do MTT.....	84
3.3.3.4. Citometria de fluxo - Ensaio antiapoptótico.....	85
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>Secreção bruta.....</b>	<b>89</b>
<b>Frações de interesse.....</b>	<b>92</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>99</b>
<b>Perspectivas futuras.....</b>	<b>102</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>103</b>

## *Abreviações*

**°C** – Grau celsius

**μL** – Microlitro

**μm** – Micrometro

**2-DR** – Desoxirribose

**AA** – Ácido ascórbico

**ATCC** – *American type culture collection*

**B16-F10** – Melanoma murino

**BAPNA** – Substrato Nα-Benzoyl-D,L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride

**BHA** – Butylated hydroxyanisole

**BHI** – Meio *Brain Heart Infusion*

**BHT** – Butylated hydroxytoluene

**CFS** – Ciências Fisiológicas

**cm** – Centímetro

**Ctrl** – Controle

**Da** – Dalton

**DHB** – Matriz ácido dehidrobenzóico

**DMSO** – Solvente dimetilsulfóxido

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético

**ERO** – Espécies reativas de oxigênio

**FR5** – Fração 5

**FRAP** – Poder Antioxidante de Redução do Ferro

**GPNA** – Substrato N-Glutaryl-L-phenylalanine p-nitroanilide

**GSH** – Tripeptídeo glutationa

**HeLa** – Carcinoma uterino humano

**IBAMA** – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

**IC<sub>50</sub>** – 50% concentração necessária para inibição de 50% da população

**IUCN** – União Internacional para a Conservação da Natureza

**kDa** – Quilodalton

**Kpi** – Tampão fosfato de potássio

**LMWA** – Antioxidantes de baixo peso molecular

**MALDI-TOF** – Espectrometria de massa por ionização e desorção a laser assistida por matriz por tempo de voo

**MCF-7** – Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano

**MDA** – Malondialdeído

**mg** – Miligrama

**MH** – Meio Mueller Hinton

**MIC** – Concentração mínima inibitória

**mL** – Mililitro

**mm** – Milímetro

**mM** – Milimolar

**MTT** – 3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-biphenyltetrazolium)bromide

**m/z** – Relação entre massa e carga

**mV** – Milivolt

**nm** – Nanômetro

**PAM** – Peptídeo antimicrobiano

**PBS** – Tampão fosfato-salino

**PI** – Iodeto de Propídeo

**PLA<sub>2</sub>** – Fosfolipase A<sub>2</sub>

**RM** – *Rhinella mirandaribeiroi*

**RP-HPLC** – Cromatografia líquida de alta-performance de fase reversa

**rpm** – Rotações por minuto

**RPMI** – Meio Roswell Park Memorial Institute

**SA** – Matriz ácido sinapínico

**SISBIO** – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

**TBA** – Ácido tiobarbitúrico

**TBARS** – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TBHQ** – tert-Butylhydroquinone

**TFA** – Ácido trifluoracético

**UnB** – Universidade de Brasília

**UV** – Ultravioleta

**λ<sub>máx</sub>** – Lambda máxima

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Representações de estruturas químicas de alguns bufadienólídeos, encontrados em secreção de bufonídeos. As estruturas foram retiradas do PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). .....24
- Figura 2.** Representações de estruturas químicas de indolalquilaminas, derivadas de triptofano, encontradas em secreção de bufonídeos. As estruturas foram retiradas do PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). .....26
- Figura 3.** Sítio de ação das fosfolipases sobre os glicerofosfolipídeos. A molécula de fosfolípídeo consiste em glicerol-3-fosfato. R1 e R2 representam cadeias hidrocarbônicas de ácidos graxos, que são apolares. Retirado de <http://know.net/cienterravida/biologia/fosfolipase>. .....31
- Figura 4.** Espécimes de *Rhinella mirandaribeiroi*. Fotografados por Mauro Texeira Junior e Danusy Lopes Santos. Disponível em <http://www.amphibiaweb.org>. .....40
- Figura 5.** Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com  $Fe^{3+}$ . Imagem retirada de Rufino et al. (2006). .....56
- Figura 6.** Redução do MTT por agentes redutores ou enzimáticos, tendo como produto formazan. Imagem retirada de Liu & Nair (2010). .....57
- Figura 7.** Porcentagem do crescimento celular para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, incubadas em diferentes concentrações do extrato aquoso de *Rhinella mirandaribeiroi*, após 24 horas. Como controle positivo foi utilizado a suspensão de cada microrganismo em meio de crescimento, e controle negativo foi utilizado formaldeído. Leitura à 620nm. .....60
- Figura 8.** Ensaio antiproliferativo, testando a secreção bruta de *Rhinella mirandaribeiroi* em diferentes concentrações como inibidor de viabilidade de células neoplásicas das linhagens B16F10, HeLa e MCF7. Na tabela se encontram os  $IC_{50}$  para cada linhagem (mg/mL). .....61
- Figura 9.** Ensaio de inibição de serino protease Tripsina (A) e Quimotripsina (B) após incubação com secreção cutânea bruta de *Rhinella mirandaribeiroi* (10 mg/mL). .....62
- Figura 10.** Ensaio de atividade fosfolipásica presente na secreção cutânea de *Rhinella mirandaribeiroi* (5

mg/mL). Como substrato foi utilizado fosfatidilcolina (3 mM), Controle positivo é a secreção bruta de *Bothrops moojeni* (2 mg/mL) e controle negativo é a emulsão de fosfatidilcolina sem incubação de enzima. Leitura à 405 nm após 2h e 24h. ....62

**Figura 11.** Ensaio de atividade ferricianeto da secreção bruta de *Rhinella mirandaribeiroi*. Controle positivo utilizado foi ascorbato e como controle negativo peróxido de hidrogênio.....63

**Figura 12.** Perfil cromatográfico (RP-HPLC) da secreção cutânea de *Rhinella mirandaribeiroi*, em coluna analítica C<sub>18</sub> de fase reversa (Vydac 218TP54, 250mm x 4,5mm, 5µm), com eluição de 24 frações em fluxo de 1 mL/min, 60% da fase B em 60 minutos. O monitoramento das frações foi à 216 nm. ....64

**Figura 13.** Ensaio antibacteriano contra *Escherichia coli* das frações de *Rhinella mirandaribeiroi*. Incubação de 24h em meio Mueller Hinton, onde o controle positivo é MH + *E. coli* e o controle negativo é formaldeído 0,4%. Leitura à 620 nm. Destaque para as frações 1, 5 e 11 que apresentaram maior inibição. ....65

**Figura 14.** Ensaio antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* das frações de *Rhinella mirandaribeiroi*. Incubação de 24h em meio Mueller Hinton, onde o controle positivo é MH + *S. aureus* e o controle negativo é formaldeído 0,4%. Leitura à 620nm. Destaque para as frações 1, 5, 10 e 11 com maior atividade de inibição. ....66

**Figura 15.** Ensaio antifúngico contra *Candida albicans* das frações de *Rhinella mirandaribeiroi*. Incubação de 24h em meio BHI, onde o controle positivo é BHI + *C. albicans* e o controle negativo é formaldeído 0,4%. Leitura à 620nm. Destaque para as frações 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 17 e 23 com atividade de inibição aproximadamente <10%. ....66

**Figura 16.** Screening da atividade fosfolipásica utilizando 5 corridas das frações de *Rhinella mirandaribeiroi*. A leitura do ensaio fosfolipásico foi realizada em 405 nm, sendo a atividade enzimática avaliada após 24 h. Como controle positivo foi utilizado a secreção de *Bothrops moojeni* (2 mg/mL) e controle negativo é a emulsão sem incubação de enzima. ....68

**Figura 17.** Screening da atividade redutora de ferricianeto (0,1%) para as frações de *Rhinella mirandaribeiroi*, incubação por 12h. Como controle negativo foi utilizado peróxido de hidrogênio e positivo ascorbato (10 mg/mL).....69

**Figura 18.** Recromatografia da Fração 22 realizada em RP-HPLC em coluna analítica C<sub>18</sub> de fase reversa (Vydac 218TP54) em que 6 picos eluíram (RRM-22.1, RRM-22.2, RRM-22.3, RRM-22.4, RRM-22.5, RRM-22.6). A



separação cromatográfica foi monitorada em 216 nm. ....70

**Figura 19.** Espectrograma de massa em modo linear positivo (2000 – 20000 m/z) da subfração RRM-22.6 de *Rhinella mirandaribeiroi*. Observamos os componentes de 14598, 14332 e 7312 m/z. Foi utilizada a matriz ácido sinapínico. ....70

**Figura 20.** Atividade da fosfolipase depois da purificação por recromatografia da Fração 22, a subfração RRM-22.6 (0,3 mg/mL), utilizando como substrato fosfatidilcolina 3 mM. Foi feita a leitura à 405 nm, após incubação da secreção por 2h. Como controle positivo foi utilizado a secreção de *Pithecopus hypochondrialis* (5 mg/mL) e controle negativo é a emulsão de fosfatidilcolina. A secreção de *B. moojeni* estava em 2 mg/mL e *R. mirandaribeiroi* em 5mg/mL .....71

**Figura 21.** Recromatografia da Fração 12. Realizada em RP-HPLC em coluna analítica C<sub>18</sub> de fase reversa (Vydac 218TP54) em que 5 picos eluíram (RRM-12.1, RRM-12.2, RRM-12.3, RRM-12.4, RRM-12.5). A separação cromatográfica foi monitorada em 216 nm. ....72

**Figura 22.** Espectrograma de massa da Fração RRM-12.5 de *Rhinella mirandaribeiroi*, modo refletido positivo, onde se observa um componente de massa em 415 m/z. E o espectrograma da matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico com o componente 379.08 m/z [M<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>. ....73

**Figura 23.** Perfil do espectro de absorção UV da Fração 12.  $\lambda_{\text{máx}}$ : 297nm e  $\lambda_{\text{mín}}$ : 247nm .....73

**Figura 24.** Absorbância mensurada à 593nm da concentração de sulfato ferroso, utilizando a equação da reta da curva padrão. Foi mensurado em 2 tempos, inicial em 0 minutos e final após 4 minutos. O ensaio foi feito com duas concentrações com a Fração RRM-12.5. ....74

**Figura 25.** Ensaio de degradação a desoxirribose, pela incubação da Fração RRM-12.5, com a reação do ascorbato e Fe(III) em 7 tempos, onde ao final há liberação de malondialdeído (MDA) que reage com ácido tiobarbitúrico (TBA). No controle não há a incubação do ascorbato. Leitura à 532nm. ....75

**Figura 26.** Proteção antioxidativa pelo ensaio de degradação à desoxirribose, após 60 min de incubação, utilizando a Fração RRM-12.5 da secreção de *Rhinella mirandaribeiroi* com a reação do ascorbato e Fe(III) onde ao final há liberação de malondialdeído (MDA) que reage com ácido tiobarbitúrico (TBA). No controle positivo não há a incubação do ascorbato, o controle negativo tem ascorbato. Leitura à 532nm. ....76

**Figura 27.** Recromatografia da Fração 5. Realizada em RP-HPLC em coluna analítica C<sub>18</sub> de fase reversa (Vydac 218TP54) em que 3 picos eluíram (RRM-5.1, RRM-5.2, RRM-5.3). A separação cromatográfica foi

monitorada em 216 nm. ....	77
<b>Figura 28.</b> Perfil do espectro de absorção UV da Fração 5.1, identificada pela curva de cor vermelha, e do controle Triptofano (0,049 mM), identificado pela cor azul. ....	77
<b>Figura 29.</b> Espectrometria de massa da Fração 5.1 <b>[A]</b> a massa de 203 m/z da fração <b>[B]</b> os componentes 189.98 [M+H] <sup>+</sup> e 211.98 [M+Na] da matriz utilizada (HCCA). ....	78
<b>Figura 30.</b> Espectrometria do fragmento de massa 203 m/z encontrada na Fração 5.1. Pode-se notar componentes encontrados em derivados triptamínicos, sendo o mais comum o de 160 m/z. ....	79
<b>Figura 31.</b> Porcentagem de inibição do crescimento celular para <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Candida albicans</i> , incubadas em diferentes concentrações da Fração 5.1 da secreção bruta de <i>Rhinella mirandaribeiroi</i> , após 24 horas. Leitura à 620nm. Os dados estão representados em porcentagem a partir das médias de experimentos realizados em triplicata ± SD (desvio padrão). ....	80
<b>Figura 32.</b> Absorbância mensurada à 593nm da concentração de sulfato ferroso, utilizando a equação da reta da curva padrão. Foi mensurado em 2 tempos, inicial em 0 minutos e final após 4 minutos. O ensaio foi feito com duas concentrações com a Fração RRM-5.1. Na concentração de 10 mg/mL os dois pontos de tempo estão sobrepostos, pois a [Fe(II)] estourou o limite de absorção da leitora instantaneamente. ....	81
<b>Figura 33.</b> Ensaio de degradação a desoxirribose, pela incubação da Fração 5.1, com a reação do ascorbato e Fe(III) em 7 tempos, onde ao final há liberação de malondialdeído (MDA) que reage com ácido tiobarbitúrico (TBA). No controle não há a incubação do ascorbato. Leitura à 532nm. ....	82
<b>Figura 34.</b> Proteção oxidativa pelo ensaio de degradação à desoxirribose, após 60 min de incubação, utilizando a Fração RRM-5.1 da secreção de <i>Rhinella mirandaribeiroi</i> com a reação do ascorbato e Fe(III) onde ao final há liberação de malondialdeído (MDA) que reage com ácido tiobarbitúrico (TBA). No controle positivo não há a incubação do ascorbato. Leitura à 532nm. ....	82
<b>Figura 35.</b> Atividade antioxidante pelo ensaio de redução do MTT, utilizando como controle o ácido ascórbico (0,22 mM) e a Fração RRM-5.1 que foi diluída de forma seriada de 14,5 a 0,007 mM. ....	83
<b>Figura 36.</b> Poços da placa do ensaio antioxidante pela redução do MTT. <b>[A]</b> <i>Rhinella mirandaribeiroi</i> (11 mg/mL); <b>[B]</b> Controle negativo (MTT+DMSO, 1:1); <b>[C]</b> Ácido ascórbico fracionado (14 mM – 0,007 mM); <b>[D]</b> Fração RRM-5.1 fracionada (14,5 mM – 0,007 mM). ....	84

**Figura 37.** Citometria de fluxo, em tratamento com a linhagem celular MCF-7, as amostras da Fração RRM-5.1 (14,8 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 μM). **[A]** incubação da RRM-5.1 sem a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> **[B]** incubação da RRM-5.1 com a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> **[C]** controle de apoptose pela incubação somente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como agentes de marcação foi utilizado Anexina V e Iodeto de Propídeo. Em ambos tratamentos com a RRM-5.1, a porcentagem de células viáveis >90%.....85

**Figura 38.** Citometria de fluxo, em tratamento com a linhagem celular MCF-7, as amostras de ácido ascórbico (0,1 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 μM). **[A]** incubação da AA sem a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> **[B]** incubação da AA com a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> **[C]** controle de apoptose pela incubação somente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como agentes de marcação foi utilizado Anexina V e Iodeto de Propídeo. Em ambos tratamentos com o AA, a porcentagem de células viáveis <90%. .....85

**Figura 39.** Citometria de fluxo em tratamento com a linhagem celular MCF-7. Como agentes de marcação e controle foi utilizado AnexinaV em associação com Iodeto de propídeo (91% de viabilidade) e AnexinaV (99% de viabilidade). .....86

**Figura 40.** Gráfico referente ao ensaio de citometria de fluxo, feito em 7 tratamentos diferentes com a linhagem MCF-7, para as seguintes amostras: Fração RRM-5.1 em 14,8 mM, ácido ascórbico (AA) em 0,1 mM, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em 0,1 μM e os marcadores Anexina e Iodeto de propídeo. Houve uma redução da atividade apoptótica em 100% utilizando a RRM-5.1 como um antioxidante à atividade oxidativa do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....86

## *Lista de Tabelas*

**Tabela 1.** Exemplos de diferentes tipos de antioxidantes baseado no mecanismo de ação. Adaptado de Heş et al., 2019.....34

**Tabela 2.** Grupos peptídicos que possuem atividade antimicrobiana e/ou antioxidante, descritos em ordem nos artigos de Yang et al. (2009), Liu et al. (2010), Guo et al. (2014), Wang et al. (2017), Barbosa et al. (2018), Plácido et al. (2020). .....37

**Tabela 3.** Sistema de avaliação de inibição de tripsina sobre BAPNA. Como amostra foi utilizado a secreção cutânea de *Rhinella mirandaribeiroi* (10mg/mL) em cada poço. ....51

**Tabela 4.** Sistema de avaliação de inibição de quimotripsina sobre GPNA. Como amostra foi utilizado a secreção cutânea de *Rhinella mirandaribeiroi* (10mg/mL).....51

<b>Tabela 5.</b> Micro tubos numerados de 1 a 5 e tempo de incubação dos reagentes. Sendo os tubos de tratamento realizados em duplicata e controles em triplicata. ....	54
<b>Tabela 6.</b> Os reagentes preparados nos tubos T1 à T5 em ordem e volumes para o ensaio de degradação da 2-DR. ....	55
<b>Tabela 7.</b> Análise das frações sobre a inibição de crescimento celular microbiano onde o “X” marca positivo para a atividade em mais de 50% ou menos de 50%, e “XX” para indicar um valor extremo, seja total inibição de crescimento (>90%) ou nenhuma inibição (>10%). As frações que apresentaram inibição de crescimento para os 3 microrganismos em mais de 90% foram as frações 1, 5 e 11. E as frações que apresentaram inibição de crescimento para os 3 microrganismos menor que 50% foram as frações 4, 7 e 18 .....	67
<b>Tabela 8.</b> Resumo dos resultados obtidos no ensaio FRAP após 4 minutos. ....	74
<b>Tabela 9.</b> Resumo dos resultados obtidos no ensaio FRAP após 4 minutos. ....	81

# *Introdução*

---

## 1. Anfíbios como fonte de compostos bioativos

---

Há milênios, animais venenosos e peçonhentos fazem parte do folclore e da medicina tradicional de diversas civilizações ao redor do mundo. Compostos de origem naturais representam uma extraordinária ferramenta para a geração de inovações farmacológicas (Rejandra *et al.*, 2004), visto que grande parte dos medicamentos encontrados no mercado é derivado direto ou indiretamente de vegetais, microrganismos, organismos marinhos e terrestres (Chin, 2006; Newman & Cragg, 2020).

Estima-se que mais de 100.000 compostos bioativos ocorram nas secreções cutâneas de anfíbios, fazendo dessa uma riquíssima fonte de compostos biotecnologicamente interessante, pois apresentam diversas propriedades como analgésica, antibiótica, antiviral, cicatrizante, antidiabética, anticancerígena, além do potencial de tratar doenças cardiovasculares (Xu & Lai, 2013).

A classe *Amphibia* compreende cerca de 8232 espécies (AmphibiaWeb, 2020) das quais a maior parte pertence a ordem *Anura*, contendo 7261 espécies. No Brasil são reconhecidas 1137 espécies de anfíbios colocando o Brasil em destaque como o país com a maior diversidade do mundo (Herpetologia Brasileira, 2019).

Dois tipos principais de glândulas são observados nos anfíbios: as glândulas mucosas e as granulosas (serosa ou venenosa). As glândulas mucosas são responsáveis pela manutenção da umidade e lubrificação da pele, além de permitirem a respiração cutânea, reprodução, adesão ao substrato e termorregulação. Já a glândula granulosa contém um grande número de compostos com atividade neurotóxica, vasoconstritora, alucinógena, anestésica, hipotensiva, antimicrobiana, cardiotoxica, miotóxica, citotóxica e anticarcinogênica (Gebhard *et al.*, 2004; Nascimento *et al.*, 2003; Toledo & Jared, 1995; Barra & Simmaco, 1995).

---

## 2. Secreção cutânea de sapos Bufonidae

---

A secreção de bufonídeos, especialmente os gêneros *Rhinella* e *Bufo*, é rica em compostos de baixa massa molecular, dentre eles se destacam as aminas biogênicas, as quais podem ter atividades simpaticomiméticas, alucinógenas e inflamatórias, e os bufadienolídeos, esteroides que apresentam atividade cardiotoxica, aumentando a força de contração do coração (Habermehl, 1981) pela inibição da enzima  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  nos cardiomiócitos (Flier, *et al.*, 1980).

Sciani *et al.* (2013) relatou os efeitos deletérios da secreção cutânea bruta de anuros (*Rhaebo guttatus*, *Rhinella margaritifera* e *Phyllomedusa hypocondrialis*) no tratamento do câncer de mama (linhagens MDA-MB-231 e MCF-7), que incluem parada do ciclo celular, redução na proliferação celular e indução de apoptose. Schmeda-Hirschmann *et al.* (2014) revelaram um pronunciado efeito antiproliferativo do veneno bruto de *Rhinella schneideri* sobre linhagens celulares de fibroblastos de pulmão (MRC-5), células epiteliais gástricas humanas (AGS), câncer de pulmão (SK-MES-1), carcinoma da bexiga (J82) e células de leucemia promielocítica (HL-60). Os extratos aquosos da pele e glândulas parótidas de *Bufo gargarizans* inibem a proliferação de linhagens celulares de carcinoma de fígado (HepG2 e Bel-7402), induzindo apoptose por meio da interrupção do potencial de membrana mitocondrial (Qi *et al.*, 2010). Ferreira *et al.* (2013) mostrou que o veneno de *Rhinella marina* apresenta atividade citotóxica contra a leucemia (HL-60), carcinoma de cólon (HCT-116), carcinoma de ovário (OVCAR-8) e glioblastoma (SF295).

---

### 3. Bufadienólídeos

---

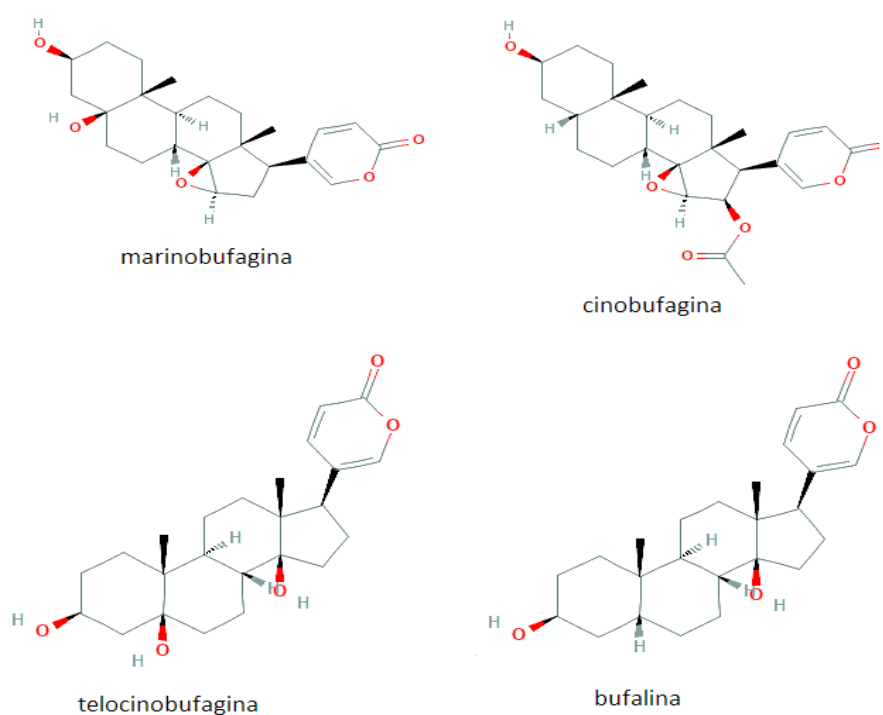
Os bufadienólídeos são um grupo importante de esteroides cardiotônicos poli-hidroxi C-24 e seus glicosídeos, caracterizados por uma  $\alpha$ -pirona no C-17. Encontra-se na posição C-3 uma hidroxila, mas se esterificada é chamado bufotoxina (Krenn & Kopp, 1998) que estão presentes em vários anuros da família Bufonidae, exceto espécies de *Melanophryniscus* (Mebs *et al.*, 2005, 2007). Possuem grande significância para o animal atuando em sua fisiologia (homeostase e estresse osmótico) e defesa (combate a microrganismos). O estudo dos bufadienólídeos em animais começou pela descoberta de inúmeros desses compostos no Ch'an Su, pertencente à medicina tradicional chinesa. Pode ter efeitos tóxicos, mas na dosagem correta funcionam como fármacos. Eles auxiliam em doenças cardíacas, tumores, como analgésico, anti-inflamatório, cardiotônico, anestésico, diurético, bactericida e para prurido. Ch'an Su tem origem da secreção seca das glândulas auriculares e cutânea do sapo *B. bufo gargarizans* e *B. melanostictus*, seu efeito gera um aumento da força de contração do músculo cardíaco, pois interagem com a principal proteína transportadora das células eucariotas, a bomba de sódio e potássio (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase), que são proteínas enzimáticas de membrana e funcionam como um transportador eletrônico de íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> entre os meios intra- e extracelulares, mantendo o potencial de membrana. Com a interação de bufadienólídeos, há um aumento na concentração de íons sódio intracelular, causando também aumento de íons cálcio, causando aumento da força de contração do miocárdio (Cheng *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2015; Cruz & Matsuda, 1993).

Bufalina, cinobufagina, telocinobufagina e marinobufagina (Figura 1) são os mais comuns encontrados na secreção de bufonídeos do gênero *Bufo* e *Rhinella*. Na última década, estudos apontam o potencial anticarcinogênico dos bufadienólídeos, especialmente marinobufagina, telocinobufagina, bufalina e cinobufagina que mostraram uma ação biológica notável em linhagens de células tumorais humanas (Sousa *et al.* 2017). O veneno bruto e seus principais bufadienólídeos da espécie *Bufo bufo gargarizans cantor* apresentaram um efeito indutor de apoptose relevante de cinobufagina em células de leucemia humana U937 e HL-60, carcinoma humano hepatocelular Bel-7402 e HepG2 (Qi *et al.*, 2011). Foi descrito o potencial



antiproliferativo de bufadienólídeos isolados como a marinobufagina, bufalina, telocinobufagina, hellebrigenina e cinobufagina, que têm se mostrado eficientes no combate ao câncer de adenocarcinoma de cólon, câncer de mama e leucemia (Cunha-Filho *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2005; Ogasawara *et al.*, 2001; Nogawa *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1992).

Embora bufadienólídeos sejam toxinas conhecidas que podem funcionar como um mecanismo de defesa contra predadores, as propriedades antimicrobianas desses compostos ainda não foram investigadas profundamente. Poucos estudos relatam atividade antibacteriana e antifúngica de bufadienólídeos. Cunha Filho *et al.* (2005) demonstrou que a telocinobufagina e a marinobufagina, isoladas das secreções de pele do sapo brasileiro *Rhinella (Bufo) rubescens*, apresentaram efeitos inibitórios contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Barnhart *et al.* (2017) demonstrou o efeito inibitório de crescimento antifúngico dos bufadienólídeos arenobufagina, gamabufotalina e telocinobufagina contra o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*. Um trabalho inédito foi o de Shibao *et al.* (2015) onde foi demonstrada pela primeira vez a atividade inibidora de quimotripsina do bufadienólídeo telecinobufagina, isolado de *Rhinella schneideri*.



**Figura 1.** Representações de estruturas químicas de alguns bufadienólídeos, encontrados em secreção de bufonídeos. As estruturas foram retiradas do PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

---

#### 4. Aminas Biogênicas

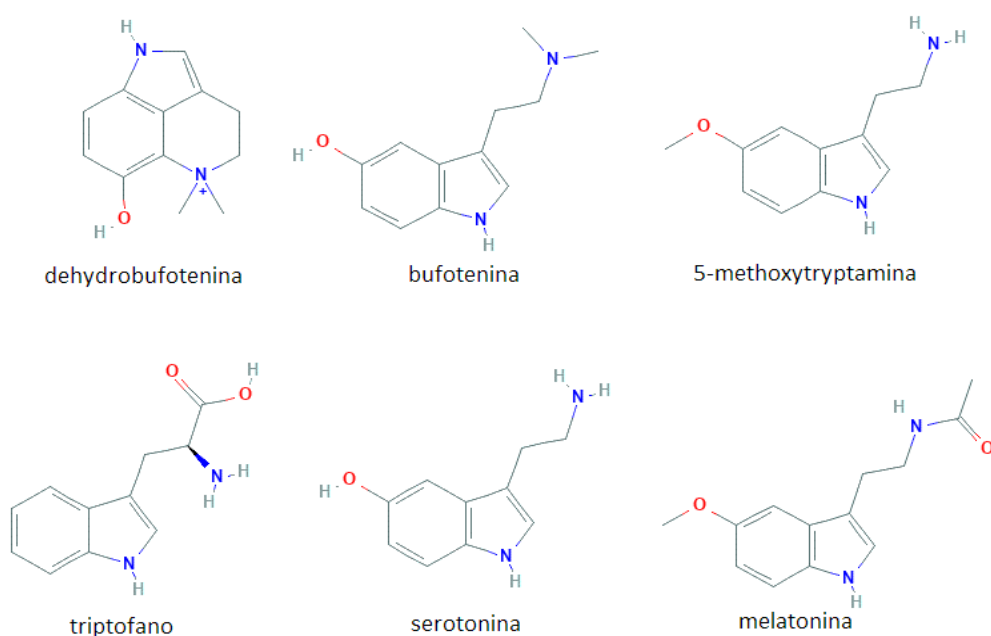
---

As aminas biogênicas são compostos básicos nitrogenados formados normalmente pela substituição de um, dois ou três átomos de hidrogênio da amônia por grupos alquila e/ou arila (Shalaby, 1996). São moléculas de baixa massa e sua formação é essencialmente resultado da descarboxilação enzimática de aminoácidos livres, que geralmente são derivados triptamínicos e feniletílamínicos, da transaminação de aldeídos e cetonas (Ladero *et al.*, 2010). Estão classificadas nos seguintes grupos: as indolalquilaminas (serotonina e seus N-metilados); as imidazolalquilaminas (histamina, seus derivados n-metilados, n-acetilados e formas ciclizadas de n-metilhistaminas); as monohidroxifenilalquilaminas (L-tirosina, candicina e leptodactilina); e as catecolaminas (epinefrina, norepinefrina, dopamina e epinina) (Schwartz *et al.*, 2007; Erspamer, 1994). São componentes endógenos indispensáveis às células vivas, fundamentais para a proliferação e a diferenciação celular, regulação das funções do núcleo, síntese de proteínas, desenvolvimento cerebral, regulação e manutenção do sistema nervoso (Santos, 1996; Cardozo *et al.*, 2013).

Aminas indólicas representam os compostos bioativos mais comuns em pele de anfíbios, presentes particularmente em *Bufo*, onde são produzidos e estocados em grande quantidade, ao contrário dos vegetais e da maioria dos tecidos de outros animais. São moléculas derivadas da descarboxilação do triptofano (ex. serotonina), derivados n-metilados (ex. bufotenina), O-metilbufotenina, cíclicos (ex. dehidrobufotenina) e sulfoconjugados (ex. bufotionina) (Schwartz *et al.*, 2007). Estes compostos atuam como vasoconstritores, convulsivos, alucinógenos e agentes colinérgicos (Toledo & Jared, 1995; Habermehl, 1981). No geral, esses compostos possuem ação estimulante da musculatura lisa e são capazes de irritar as mucosas (Sebben *et al.*, 1993; Toledo & Jared, 1989).

Recentemente, indolalquilaminas provenientes da secreção de bufonídeos são consideradas potenciais compostos terapêuticos no desenvolvimento de agentes para o tratamento de distúrbios neurológicos, como esquizofrenia, depressão, ansiedade, distúrbios obsessivo-compulsivos e dor crônica, devido à sua seletividade do receptor 5-HT<sub>2A</sub> no sistema nervoso central. Em baixas concentrações são

essenciais para diversas funções fisiológicas, enquanto altas concentrações podem causar alguns efeitos deletérios. Sendo a concentração desses compostos no veneno do sapo alta, quando um predador tem contato acaba tendo reações tóxicas, como espasmos e vômitos (Qi, *et al.*, 2018). Exemplos de indolalquilaminas encontradas em veneno de bufonídeos são: bufotenina, bufotenidina, dehidrobufotenina, bufoteonina, mexamina (5-methoxytryptamina), sendo que esta última possui poder antioxidante similar ao da melatonina e ambas são derivados triptamínicos (Figura 2) (Zulfiker *et al.*, 2016; Ujváry, 2014; Shen *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2007; Sementsoy, 1939).



**Figura 2.** Representações de estruturas químicas de indolalquilaminas, derivadas de triptofano, encontradas em secreção de bufonídeos. As estruturas foram retiradas do PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

---

## 5. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

---

Anfíbios geralmente habitam áreas úmidas, o que propicia a propagação de bactérias e fungos e, por essa razão, é imprescindível para o animal a produção de compostos antimicrobianos (Izadpanah & Gallo, 2005). Com o aumento de bactérias resistentes aos antibióticos comerciais, os inúmeros peptídeos/compostos antimicrobianos isolados da secreção cutânea de anuros apresentam um grande potencial farmacológico.

Acredita-se que as características físico-químicas comuns aos peptídeos antimicrobianos sejam essenciais para a sua ação na inibição do crescimento de bactérias, fungos e protozoários. A interação entre os PAMs e as membranas biológicas é fundamental para a sua ação. Os PAMs formadores de poros, por exemplo, poderiam vir a ser um novo tipo de antibiótico, porque a sua atividade antimicrobiana é induzida pela interação com a membrana da célula e, portanto, a resistência à droga seria dificilmente desenvolvida (Magalhães *et al.*, 2008; Brand *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2005; Shai, 2002; Giangaspero *et al.*, 2001; Shai, 1999; Wieprecht *et al.*, 1997). Os PAMs de anuros possuem algumas características em comum: apresentam de 10 a 50 resíduos de aminoácidos, sendo em maior parte hidrofóbicos; usualmente exibem carga líquida positiva, conformação em  $\alpha$ -hélice anfipática, momento hidrofóbico alto, uma ampla face apolar em contraste com uma pequena face polar (Nascimento *et al.*, 2003; Hancock & Chapple, 1999). Rash *et al.* (2010) levantam a suspeita de que os escassos peptídeos do veneno dos bufonídeos sejam produtos de degradação de proteínas, envolvidas principalmente no processo de manutenção celular das próprias glândulas de veneno. Concluem, portanto, que esses componentes não devem contribuir para a toxicidade do seu veneno.

## 6. PAMs com atividade anticarcinogênica

O câncer afeta tecidos e tipos celulares distintos, caracterizado por crescimento celular anormal e desordenado. Os tumores apresentam comportamentos específicos, como o potencial replicativo ilimitado e autossuficiência em relação aos sinais de crescimento. Células neoplásicas também são capazes de escapar

da morte celular programada, promover angiogênese e evadir do sistema imunológico. Estas características são também os principais alvos para o desenvolvimento de novas drogas antitumorais (Libério *et al.*, 2013). O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum entre mulheres com faixa etária maior que 35 anos e uma das causas mais frequentes de morte neste grupo. Diversos fatores estão relacionados ao aumento do risco de desenvolver a doença, tais como: idade, fatores endócrinos, história reprodutiva, fatores comportamentais/ambientais e fatores genéticos/hereditários (INCA, 2018).

A descoberta de novas moléculas com atividade antitumoral continua sendo de grande importância na pesquisa do câncer. Muitos peptídeos antimicrobianos apresentam atividade anticarcinogênica. Um número diversificado de organismos produz PAMs, no entanto, a maior fonte destes peptídeos é a partir da secreção cutânea de anuros (Gomes *et al.*, 2007; Doyle *et al.*, 2003). O uso dessas moléculas é vantajoso porque elas são mais seletivas para a membrana de células cancerosas carregadas negativamente, mostram boa penetração nos tecidos devido ao seu pequeno tamanho, agem rapidamente, não estimulam a resistência celular, mostram sinergismo com drogas clássicas, tem um amplo espectro de atividade, são capazes de destruir tumores primários e prevenir a metástase (Bhutia & Maiti, 2008; Hoskin & Ramamoorthy, 2008; Mader & Hoskin, 2006; Shadidi & Sioud, 2003).

Acredita-se que os fosfolipídios carregados negativamente das membranas das células cancerígenas devem desempenhar um papel importante na atração dos PAMs, como na sua atividade lítica em células bacterianas (Hoskin & Ramamoorthy, 2008). As principais estratégias anticancerígenas que os PAMs utilizam são: interação com receptores de membrana, ação em genes, boa penetração, inibição de adesão celular, inibição da angiogênese, maior especificidade, sinergismo com quimioterápicos, inibição de proteases e quinases, indução de apoptose, indução de necrose e imunoestimulação (Libério *et al.*, 2013). Esses peptídeos possuem uma alta especificidade para células tumorais, atuam independentemente do estado proliferativo das células e são ativos contra células de câncer resistentes a múltiplas drogas, por não atuarem via receptores (Bhutia & Maiti, 2008; Papo & Shai, 2005).

---

## 7. Inibidores de protease

---

Proteases são enzimas que participam de diversos processos biológicos, tais como coagulação sanguínea, digestão, cicatrização, defesa do hospedeiro, liberação de peptídeos biologicamente ativos, cascata do complemento, apoptose e processamento de proteínas após sua síntese. Porém, também são consideradas importantes fatores no desenvolvimento de inúmeras doenças humanas e, por isso, devem ser cuidadosamente controladas (Tillotson *et al.*, 1998; Perkins & Smith, 1993; Gunther *et al.*, 1989; Jackson & Nemerson, 1980). De acordo com o comitê de nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, as proteases, também chamadas de peptidases, são classificadas em dois grupos principais dependendo do sítio de ação dessas enzimas na proteína: as exopeptidases e as endopeptidases ou proteinases. São também classificadas, de acordo com o tipo do grupo funcional presente no sítio catalítico da enzima, em outros grupos importantes que são: serina, cisteína, treonina, aspártico, glutâmico, asparagina, metaloprotease ou do tipo catalítico desconhecido (Rawlings *et al.*, 2014).

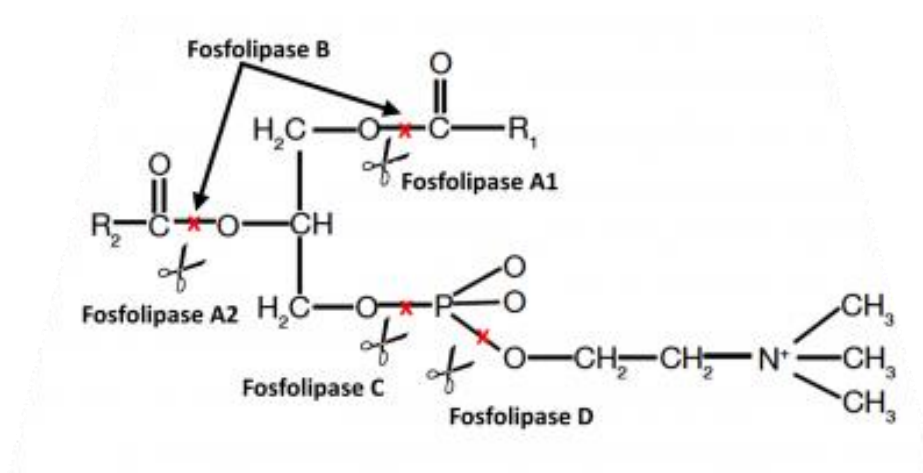
Atualmente, existem duas hipóteses para o papel biológico dos peptídeos inibidores de protease em peles de anfíbios. Uma é que várias enzimas estão envolvidas no processamento de precursores de peptídeos ou degradação de peptídeos na pele e, os inibidores de protease modulam a atividade desses compostos para evitar a degradação prematura ou a liberação de peptídeos cutâneos (Mignogna *et al.*, 1996). A outra hipótese é que os peptídeos são anti-infecciosos, desempenhando um papel semelhante aos PAMs, porque inibem proteases extracelulares produzidas por bactérias invasoras (Conlon *et al.*, 2000).

Os peptídeos inibidores de protease são categorizados amplamente com base estrutural ou na protease inibida. Por protease inibida eles são classificados em cistatinas, serpinas e inibidores teciduais de metaloproteases (Song *et al.*, 2008; Bode & Huber, 1992). Os peptídeos inibidores de serino protease podem ser classificados pela presença de um domínio conservado, nas classes Kunitz, Kasal e Bowman-Birk. Muitos peptídeos inibidores de protease menores que 10 kDa foram encontrados em anfíbios. Estes incluem peptídeos bifuncionais, com funções inibidoras de protease e antimicrobianas. Em *Rhinella schneideri*, o

bufadienolídeo telocinobufagina realiza a atividade inibidora de protease. Além da atividade bactericida e parasiticida, esta é capaz de inibir a ação da quimiotripsina na concentração de 1 mg/mL (Shibao *et al.*, 2015).

## 8. Fosfolipase

As fosfolipases são uma superfamília de enzimas que atuam em membranas celulares realizando a clivagem de fosfolipídios em ácidos graxos e lisofosfolipídios. Todos os quatro grupos éster de um fosfolípido são suscetíveis à hidrólise, existindo diferentes tipos da enzima dependendo da posição de clivagem, além da sua função, regulação, sequência de aminoácidos, localização tecidual, estrutura e papel dos íons divalentes (Dennis, 1994). Estes grupos são: a fosfolipase A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C e D (Figura 3). Há diversas classificações das fosfolipases A<sub>2</sub> que variam de acordo com sua massa molecular, localização no organismo, estrutura primária e secundária, atividade catalítica e sua função. Baseado na classificação mais aceita, descrita por Schaloske & Dennis (2006), as fosfolipases do tipo A<sub>2</sub> estão organizadas em cinco grupos. As fosfolipases secretadas apresentam massa molecular variando entre 13 a 18 kDa e são enzimas que dependem de Ca<sup>2+</sup> para a catálise. Este grupo é subdividido em 17 subgrupos denominados IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIII, XIV.



**Figura 3.** Sítio de ação das fosfolipases sobre os glicerofosfolipídeos. A molécula de fosfolípido consiste em glicerol-3-fosfato. R1 e R2 representam cadeias hidrocarbônicas de ácidos graxos, que são apolares. Retirado de <http://knoow.net/ciencterravida/biologia/fosfolipase>.

As fosfolipases do tipo A<sub>2</sub> (*Phospholipases A<sub>2</sub>* - PLA<sub>2</sub>) têm um importante papel em várias funções celulares, incluindo manutenção dos fosfolipídios celulares; estão relacionadas com a liberação de ácido araquidônico (um precursor de lipídios bioativos), que gera prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos,



que podem estar envolvidos em diversas funções biológicas, tais como: regulação da resposta imune, inflamação e percepção de dor. Também podem liberar lisolecitinas a partir de lecitina, onde os produtos estão envolvidos na resposta de dor e causam hemólise de eritrócitos. PLA<sub>2</sub> podem ser encontradas em plantas, bactérias, fungos, répteis, abelhas, em diversos tipos celulares, tecidos, órgãos de mamíferos e em peçonhas (De Maria, *et al.*, 2007; Schaloske & Dennis, 2006; Kini, 2005; Tsuboi, *et al.*, 2002; Dennis, 2000). Estão envolvidas em efeitos farmacológicos e fisiopatológicos dos organismos vivos e em intoxicação sendo, portanto, de grande interesse médico-científico (Nevalainen, *et al.*, 2004; Soares, *et al.*, 2004; Dennis, 1994; Verheij, *et al.*, 1981; Van Den Bosch, 1980).

As peçonhas animais são ricas fontes de PLA<sub>2</sub> e essas enzimas possuem uma grande variedade de efeitos farmacológicos e/ou tóxicos como mionecrótico, anticoagulante, inibição de agregação plaquetária, neurotóxico, cardiotóxico, hipotensor e indutor de edema, onde foram encontradas agindo como um princípio ativo na peçonha de serpentes, aranhas, escorpiões, abelhas, vespas, moluscos e peixes (Santos-Filho, *et al.*, 2008 Soares, *et al.*, 2004; Harris, *et al.*, 2000; Singh, *et al.*, 2000; Gutiérrez & Lomonte, 1997). Na presença de cálcio alguns tipos de fosfolipases A<sub>2</sub> se mostraram capazes de causar danos a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas devido a sua atividade catalítica, atuando diretamente sobre os fosfolipídeos de membrana (Hurley, 2014). Além disso, outro fator importante que afeta o potencial desta enzima contra bactérias, é a presença da parede celular de alguns desses microrganismos. Desta forma, a suscetibilidade de bactérias Gram-positivas à PLA<sub>2</sub> varia muito entre espécies, por influência de outros fatores, tais como fatores de crescimento e do estado de degradação da parede celular.

Além de peçonhas, a PLA<sub>2</sub> em venenos também é alvo de estudos, porém, ainda são poucos. Alguns dos estudos que mostram a presença da PLA<sub>2</sub> em anfíbios são os de Baek *et al.* (2000), Lai *et al.* (2000), Conceição *et al.* (2007), Guo *et al.* (2012), Pinheiro (2016); Shibao *et al.* (2018) que mostrou a presença de PLA<sub>2</sub> na *Rhinella schneideri* e, mais recentemente Souza *et al.* (2019) e Fusco *et al.* (2020) que caracterizaram PLA<sub>2</sub> de *Pithecopus azureus* e *Argenteohyla siemersi*, respectivamente.

---

## 9. Espécies reativas ao oxigênio

---

O oxigênio é uma molécula fundamental para os organismos aeróbios, utilizada tanto na produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria de eucariotos, como na membrana celular de muitas bactérias e em inúmeras vias metabólicas fundamentais. Ao mesmo tempo, seu consumo é capaz de gerar substâncias tóxicas intra- e extracelulares. Essas substâncias tóxicas são geradas durante o transporte de elétrons, reações enzimáticas, reações de auto-oxidação, pelo grupo heme de proteínas, sendo comumente chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o oxigênio *singlet* ( $O_2$ ), o radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $\cdot OH$ ). Algumas dessas EROs são radicais livres, outras são agentes oxidantes não radicalares (como o peróxido de hidrogênio). Além disto, algumas destas moléculas reagem rapidamente apenas com algumas substâncias ou moléculas, como é o caso do peróxido de hidrogênio e do radical hidroxil (Halliwell *et al.*, 2007). Os EROs podem peroxidar lipídios, desnaturar proteínas e danificar ácidos nucleicos, levando a graves danos celulares, teciduais e consequências ao metabolismo (Hansen *et al.*, 2006). Estas moléculas podem desempenhar a ação de sinalização celular além de outros mecanismos sendo, alguns exemplos: controle da ventilação respiratória, apoptose, diferenciação e desenvolvimento celular, aderência de leucócitos às células endoteliais e ativação da resposta imunológica específica contra patógenos (Droge, 2002). Alterações relacionadas ao ataque de EROs podem ser causadas por sua excessiva formação e/ou ineficiência em sua interceptação pelas defesas antioxidantes, gerando o chamado estresse oxidativo.

## 10. Antioxidantes

As defesas celulares naturais são comumente chamadas de antioxidantes e podem ser produzidas endogenamente ou adquiridas pela dieta. Estão organizadas em diferentes níveis de proteção sendo as principais formas de atuação: evitar a formação de ERO, neutralizar e reparar danos ocasionados por elas. Os antioxidantes primários formam espécies inativas e o radical inerte procedente do antioxidante

estabilizado por ressonância, não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas. O grupo dos removedores de oxigênio são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio, conseqüentemente tornando-os indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação. Os íons catalisadores da oxidação lipídica, são principalmente os íons metálicos de cobre e ferro, e ocorre devido a presença de um par de elétrons não compartilhado na estrutura molecular destes compostos (Tabela 1). Assim, o termo antioxidante pode ser considerado como qualquer substância que atrase, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo (Halliwell *et al.*, 2007). Entre as principais defesas antioxidantes não-enzimáticas da célula estão as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (tocoferol), carotenóides, flavonóides, pigmentos biliares, urato e o tripeptídeo glutathione (GSH), todos sendo captadores de radicais (Reischl *et al.*, 2007).

**Tabela 1.** Exemplos de diferentes tipos de antioxidantes baseado no mecanismo de ação. Adaptado de Heş *et al.*, 2019.

Tipos de antioxidantes	Exemplos	Função
Primários: Remoção ou inativação de Radicais Livres	<b>Antioxidantes sintéticos:</b> BHA (Butylated hydroxyanisole) BHT (Butylated hydroxytoluene) TBHQ (tert-Butylhydroquinone)	Bloqueia os radicais doando um átomo de hidrogênio
	<b>Antioxidantes naturais:</b> Tocoferóis Aminas aromáticas Fenólicos	
Removedores de oxigênio	Ácido ascórbico Ácido eritórbico Sulfitos, bissulfitos Palmitato de ascorbil Aminoácidos	Sequestradores de Peróxidos e agentes redutores

Agentes quelantes/sequestrantes	Ácido Cítrico EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) Fosfato	Quelação de Íons metálicos para formas de complexos estáveis, para reduzir a atividade de oxidação catalítica
------------------------------------	--	---

Continuação da Tabela 1.

Antioxidantes podem ser utilizados puros ou em combinação com outros compostos, sendo possível o efeito sinérgico ou antagonístico (Howard, 2000). O sistema de defesa antioxidante pode ser classificado ainda em dois grupos principais: o grupo de enzimas e o grupo de antioxidantes de baixo peso molecular (*Low molecular weight antioxidants* - LMWA). Nesta classe inclui-se um vasto número de compostos, sintetizados *in vivo* ou obtidos exogenamente, que previnem danos oxidativos por interações diretas ou indiretas. Os LMWA possuem várias vantagens em comparação ao sistema de defesa do grupo de enzimas, como maior capacidade de penetração, um espectro mais amplo de atividade e a capacidade de ser regenerado pela célula (Guaratini *et al.*, 2007).

A pele de anfíbios desempenha um papel importante na captação de oxigênio na água e no ar. Quando a concentração de oxigênio é maior, a pele é quem consome mais do oxigênio absorvido, ao invés de atender os requisitos de outros tecidos. Além disso, a perda de água do corpo pode aumentar a suscetibilidade aos danos oxidativos. De qualquer forma, a pele de anfíbios está destinada a ser a linha de frente na batalha contra os radicais (França *et al.*, 2007; Vitalis, 1990; Pinder *et al.*, 1986). Devido aos habitats, ambientes especiais e sua frágil pele, os anfíbios sofrem lesões por espécies reativas de oxigênio (EROs) de natureza biológica e não biológicas ao ficarem expostos a infecções, feridas e radiação UV (Yin *et al.*, 2014; Zocche *et al.*, 2014). Para confrontar o estresse oxidativo, a pele dos anfíbios desenvolveu um eficiente sistema de defesa antioxidante com dois grupos principais. O primeiro grupo são enzimas antioxidantes, como peroxidase, catalase e superóxido dismutase. O segundo grupo compreende antioxidantes de baixo peso molecular, como glutathione, dinucleótido de nicotinamida e adenina, carnosina, caroteno, polifenóis, ácido úrico e ácido lipóico, que eliminam EROs doando elétrons (Feidantsis *et al.*, 2013; Halliwell, 2006; Kohen,

2000; Kohen, 1999; Chevion & Berry, 1997; Kohen *et al.*, 1996; Shindo *et al.*, 1993; Schallreuter & Wood, 1989).

No estudo utilizando o veneno de *Rana pleuraden* feito por Yang *et al.* (2009), foram encontrados dentre 11 grupos de antioxidantes peptídicos 7 grupos que exercem atividades antioxidante e antimicrobiana, enquanto outros 4 têm apenas atividade antioxidante. Liu *et al.* (2010) identificou um peptídeo chamado antioxidin-RL do anuro *Odorrana lívida* com atividade antioxidante. De acordo com Guo *et al.* (2014), na análise das espécies de anfíbios asiáticos *Hylarana taipehensis*, *Amolops lifanensis* e *Amolops granulatus*, foi mostrado que os peptídeos antioxidantes taipehensin-1TP1 e taipehensin-2TP1 não apresentam atividade antimicrobiana, enquanto outros 6 peptídeos antioxidantes temporin-TP1, brevinin-1TP1, brevinin-1TP2, brevinin-1TP3, brevinin-1LF1 e palustrin-2GN1, mostraram atividades antimicrobianas. Wang *et al.* (2017) identificaram 50 novos peptídeos com capacidade antioxidante e/ou antimicrobiana de quatro espécies de anfíbios: *Amolops daiyunensis*, *Pelophylax hubeiensis*, *Hylarana maosuoensis* e *Nanorana pleskei*. Esses peptídeos foram classificados em 21 famílias. Entre os peptídeos que são antioxidantes, destaque: temporin-MS1 e nigroain-K-SN1, que possuem atividade antibacteriana e antifúngica; ranacyclin-HB1, pleskein-2 e nigroain-B-MS1, que possuem atividade contra bactéria Gram-positiva; nigroain-D-SN1, que possui baixa atividade hemolítica; daiyunin-1, que não possui atividade hemolítica; e os peptídeos maosonensis-1MS1, odorranaopin-MS2, nigroain-C-MS1, que apresentam apenas atividade antioxidante. No estudo de Barbosa *et al.* (2018) foi identificado o peptídeo antioxidin-I, que também possui atividade antioxidante e está presente na secreção cutânea de 4 anuros tropicais (*Phyllomedusa nattereri*, *Phyllomedusa tarsius*, *Phyllomedusa distincta* e *Pithecopus rohdei*). O trabalho recente feito por Plácido *et al.* (2020) apresenta o peptídeo antioxidante salamandrina-I na secreção de *Salamandra salamandra*, mas esse peptídeo não mostrou atividade antibacteriana (Tabela 2). Kolodziejczyk-Czepas *et al.* (2016) realizou o primeiro trabalho analisando a atividade antioxidante de um bufadienolídeo da planta *Kalanchoe daigremontiana*. Baldo (2016) em sua tese estudou a secreção de *Rhinella schneideri* com compostos de baixa massa molecular, e umas das

atividades constatadas foi a de proteção antioxidativa contra a produção de EROs em mitocôndrias utilizando 100 µg/mL, mas não foram capazes de determinar por qual mecanismo antioxidativo.

**Tabela 2.** Grupos peptídicos que possuem atividade antimicrobiana e/ou antioxidante, descritos em ordem nos artigos de Yang *et al.* (2009), Liu *et al.* (2010), Guo *et al.* (2014), Wang *et al.* (2017), Barbosa *et al.* (2018), Plácido *et al.* (2020).

Espécie	Família de peptídeos	Antimicrobiano	Antioxidante
<i>Rana pleuraden</i>	Pleurain-A1	X	X
	Pleurain-D1	X	X
	Pleurain-E1	X	X
	Pleurain-G1	X	X
	Pleurain-J1	X	X
	Pleurain-K1		X
	Pleurain-M1	X	X
	Pleurain-N1		X
	Pleurain-P1		X
	Pleurain-R1	X	X
	Antioxidin-RP1		X
<i>Odorrana lívida</i>	Antioxidin-RL		X
<i>Hylarana taipehensis, Amolops lifanensis e Amolops granulosus</i>	Taipehensin-1TP1		X
	Taipehensin-2TP1		X
	Temporin-TP1	X	X
	Brevinin-1TP1	X	X

	Brevinin-1TP2	X	X
	Brevinin-1TP3	X	X
	Brevinin-1LF1	X	X
	Palustrin-2GN1	X	X
<i>Amolops daiyunensis, Pelophylax hubeiensis, Hylarana maosuoensis e Nanorana pleskei</i>	Maosonensis-1MS1		X
	Odorranaopin-MS2		X
	Nigroain-C-MS1		X
	Temporin-MS1		
	Nigroain-K-SN1	X	X
	Ranacyclin-HB1	X	X
	Pleskein-2	X	X
	Nigroain-B-MS1	X	X
<i>Phyllomedusa nattereri, Phyllomedusa tarsi, Phyllomedusa distincta e Pithecopus rohdei</i>	Antioxidin-I		X
<i>Salamandra salamandra</i>	Salamandrina-I		X

Continuação da Tabela 3.

---

## 11. *Rhinella mirandaribeiroi*

---

A espécie de anuro *Rhinella mirandaribeiroi*, nome popular Cururuzinho (Figura 4), pertence à família Bufonidae, conhecida popularmente como sapos-cururus (Gallardo, 1965). No Brasil, a família Bufonidae é representada por oito gêneros e o gênero *Rhinella* contém 40 espécies (Sousa *et al.*, 2017). A reprodução da espécie *Rhinella mirandaribeiroi* ocorre em lagoas permanentes ou temporárias, em áreas abertas após fortes chuvas de verão. Já foi encontrada vocalizando em barragens, solo úmido, areia fina e áreas alteradas, nos meses de janeiro, fevereiro, setembro e outubro, durante a estação seca abriga-se em cupinzeiros. É endêmica do bioma Cerrado, ocorrendo nos estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Tocantins, em enclaves do Cerrado nos estados do Amazonas, Pará e Rondônia e no Parque Nacional Noel Kempf, na Bolívia. O status de conservação da espécie não foi avaliado pela IUCN (2021) (*International Union for Conservation of Nature's Red List of Threatened Species*) até o momento.

Os machos adultos de *Rhinella mirandaribeiroi* possuem um tamanho de 4,09 a 7,14 cm e fêmeas de 4,91 a 7,3 cm. Esta espécie é caracterizada por possuir glândula parótida pouco evidente, uma linha longitudinal no dorso de cor esbranquiçada, cabeça alongada com focinho e narinas proeminentes, pele extremamente granulosa e cristas craniais bem desenvolvidas e queratinizadas (Narvaes & Rodrigues, 2009). Os trabalhos com esta espécie são de relatos da herpetofauna e relacionados a taxonomia e ecologia, não há artigos sobre a caracterização bioquímica do veneno até o momento.





**Figura 4.** Espécimes de *Rhinella mirandaribeiroi*. Fotografados por Mauro Texeira Junior e Danusy Lopes Santos. Disponível em <http://www.amphibiaweb.org>.

# Justificativa

É de conhecimento geral científico toxinológico sobre a secreção cutânea dos anfíbios ser uma rica fonte natural de peptídeos com atividades anticarcinogênica e antimicrobiana (Nascimento *et al.*, 2003; Barra & Simmaco, 1995). Atualmente, o número de compostos bioativos não-peptídicos isolados da secreção cutânea de anfíbios, com atividades semelhantes aos peptídicos vem crescendo rapidamente, principalmente compostos de baixa massa molecular. Contendo essa grande diversidade de anuros no nosso país, o estudo desse tipo de composto e desses animais se faz muito importante. Como, por exemplo, compostos aminogênicos e esteroidais, que podem possuir atividade antioxidante que é muito pouco explorada em anfíbios. Sendo encontrado artigos recentes relatando apenas a atividade antioxidante peptídica e um único trabalho de bufadienolideo, porém de planta (Plácido *et al.*, 2020; Barbosa *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017; Kolodziejczyk-Czepas *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2010). Em relação a fosfolipase em secreção cutânea de animais como anfíbios sendo alvo de estudos, também é pouco explorada. Podemos citar os recentes estudos de Shibao *et al.* (2018) que mostrou a presença de PLA<sub>2</sub> na *Rhinella schneideri*; Souza *et al.* (2019) e Fusco *et al.* (2020) que caracterizaram PLA<sub>2</sub> de *Pithecopus azureus* e *Argenteohyla siemersi*, respectivamente. A desregulação de fosfolipases contribui para diversas doenças humanas e, portanto, foram identificadas como alvos terapêuticos para a prevenção e tratamento. O estudo e caracterização da composição da secreção cutânea de anfíbios são de extrema relevância, podendo ajudar a esclarecer questões taxonômicas, identificar drogas terapêuticas em potencial, antimicrobianos, antitumorais e antioxidantes, além de auxiliar no entendimento da biologia dos anfíbios.

# Objetivos

## Objetivo geral

Isolar, identificar e caracterizar compostos bioativos da secreção cutânea de *Rhinella mirandaribeiroi*.

## Objetivos específicos

- Analisar atividades biológicas da secreção cutânea de *Rhinella mirandaribeiroi*.
- Determinar o IC<sub>50</sub> da secreção cutânea de *Rhinella mirandaribeiroi* para as linhagens: B16F10, HeLa e MCF-7.
- Fracionar a secreção cutânea de *Rhinella mirandaribeiroi* utilizando cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC).
- Identificar as frações que apresentarem atividade antibacteriana, antifúngica, degradação de fosfolipídios ou antioxidante.
- Determinar o MIC das frações citolíticas para as cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Candida albicans* (ATCC 10231).
- Determinar por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF a massa molecular dos compostos bioativos.

***Materiais e***

***Métodos***

---

## 1. Coleta e extração da secreção cutânea

---

Adultos de *Rhinella mirandaribeiroi* foram coletados no município de Monte Alegre de Goiás – GO, com autorização do ICMBio (Licença SIS/BIO n°64675-2). A secreção foi extraída no local de coleta por meio de eletroestimulação, 50 mV por 6 segundos (Grant, 2002). A pele foi lavada com água deionizada e a secreção armazenada a -20 °C. Os animais utilizados foram mantidos sob observação por 30 min e devolvidos ao seu local de origem. A técnica empregada para a extração da secreção não resulta na morte, danos físicos ou mudanças comportamentais de nenhum indivíduo utilizado neste estudo. No laboratório de Toxinologia – UnB a secreção foi liofilizada (L101 – Liobras Brasil) e armazenada a -20 °C até o uso.

---

## 2. Purificação dos compostos

---

### 2.1. Fracionamento Cromatográfico RP-HPLC

Alíquotas de 20 mg da secreção bruta de *Rhinella mirandaribeiroi* liofilizada foram solubilizadas com 1 mL de 0,12% (v/v) de ácido trifluoracético - TFA/água, homogeneizadas e centrifugadas por 13 min a 13000 rpm. Do sobrenadante obtido, 100 µL foi injetado em uma coluna analítica C<sub>18</sub> de fase reversa (Vydac 218TP54, 250mm x 4,5mm, 5µm).

A cromatografia foi realizada em gradiente linear da solução A (0,12% de TFA em água) a 60% da solução B (0,12% de TFA em acetonitrila) por 60 min, a um fluxo de 1mL/min e detecção a 216 nm. As frações foram coletadas manualmente, secas sob vácuo em *speed vac* (Thermo Scientific SPD121P SpeedVac) e armazenadas a -20°C.

### 2.2. Fracionamento Recromatográfico RP-HPLC

Foram concentradas dez frações secas provenientes do primeiro passo cromatográfico em um tubo para a recromatografia da Fração 22 e Fração 12, e apenas 1 fração seca do primeiro passo cromatográfico

foi utilizado para a recromatografia da Fração 5. Estas amostras foram solubilizadas em 200 µL de 0,12% (v/v) de ácido trifluoracético - TFA/água. Foram injetadas alíquotas de 100 µL em uma coluna analítica C<sub>18</sub> de fase reversa (Vydac 218TP54, 250mm x 4,5mm, 5µm), a mesma coluna utilizada no fracionamento da secreção bruta.

Para a recromatografia da Fração 22, foi realizado gradiente da solução A (0,12% de TFA em água) até 38% da solução B (0,12% de TFA em acetonitrila) de 0 a 15 min, tornando isocrático a 38% da solução B até 40 min, a um fluxo de 1mL/min e detecção a 216nm. As frações foram coletadas manualmente, secas sob vácuo em *speed vac* e armazenadas a -20°C.

Para a recromatografia da Fração 5 foi realizado gradiente da solução A (0,12% de TFA em água) até 8% da solução B (0,12% de TFA em acetonitrila) de 0 a 5 min, 15% de 5 a 10 min e 20% de 10 a 20 min, a um fluxo de 1mL/min e detecção a 216nm. As frações foram coletadas manualmente, secadas sob vácuo em *speed vac* e armazenadas a -20°C.

Para a recromatografia da Fração 12 foi realizado gradiente da solução A (0,12% de TFA em água) a 20% da solução B (0,12% de TFA em acetonitrila) de 0 a 15 min, 30% de 15 a 20 min, tornando isocrático em 30% até 45 min, a um fluxo de 1mL/min e detecção a 216nm. As frações foram coletadas manualmente, secadas sob vácuo em *speed vac* e armazenadas a -20°C.

### **2.3. Absorbância UV**

Foi analisado o espectro de absorção UV (200 a 400 nm) das frações 5 e 12. Para a Fração 5 (0,01 mg/mL) a absorbância foi mensurada no espectrofotômetro UV-Visível (Shimadzu UV 1800, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e foi utilizado como referencial o espectro de triptofano (0,049 mM), ambas as amostras foram solubilizadas em água deionizada. O espectro de absorbância UV-Vis da Fração 12 foi analisado na própria corrida analítica cromatográfica realizada no HPLC.

---

### 3. Ensaio biológicos

---

#### 3.1. Avaliação da atividade antibacteriana

Para identificação da atividade antibacteriana da secreção bruta, frações cromatográficas e Fração 5 em diluição seriada, foi realizado um ensaio antimicrobiano, seguindo protocolo padronizado do Laboratório de Toxinologia-CFS, utilizando linhagens de bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli* - ATCC 25922), de bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* - ATCC 25923). O ensaio antibacteriano foi feito em placa multi-poços de fundo chato de 96 poços (Nunc F96, Denmark) para avaliar a inibição do crescimento das bactérias. O meio de cultura utilizado foi Mueller Hinton (MH). O controle de inibição do crescimento foi feito com formaldeído 0,4% com a suspensão de bactéria.

As bactérias foram cultivadas em 7 mL do meio MH estéril, sob agitação por 24 h a 37°C, chegando à densidade óptica igual a 1 em 625 nm. O inóculo é preparado com uma diluição inicial de 1:100 (inóculo A), e a diluição final é preparada com o inóculo A, diluído 1:20, para cada linhagem. As amostras e a secreção bruta (20 mg/mL) são suspensas em água deionizada estéril. Em cada poço foi pipetado 50 µL de amostra e 50 µL do inóculo preparado anteriormente. Foi realizado também um ensaio com a Fração 5 e o extrato aquoso da secreção bruta, em diluição seriada de suas concentrações. Para os controles foi pipetado 50 µL de MH e 50 µL do inóculo bacteriano a ser testado, para o controle de crescimento positivo; 50 µL de formaldeído e 50 µL do inóculo bacteriano, para o controle de crescimento negativo. O ensaio foi feito em triplicata e, a placa foi incubada por 24 horas à 37°C em estufa. A avaliação do crescimento foi feita por densidade óptica em leitora de placas (Multiskan FC Thermo Scientific, USA) à 620nm.

#### 3.2. Avaliação da atividade antifúngica

Para identificação da atividade antimicrobiana da secreção bruta, frações cromatográficas e Fração 5 em diluição seriada, foi realizado um ensaio antimicrobiano, seguindo protocolo padronizado do laboratório de Toxinologia-CFS, utilizando a linhagem de levedura (*Candida albicans*- ATCC 10231). Para o ensaio

antifúngico com *Candida albicans*, foi utilizado como meio o BHI (*Brain Heart Infusion*) com preparo segundo fabricante, para o ensaio com o extrato aquoso da secreção bruta (20 mg/mL), *screening* das frações e diluição seriada da Fração 5. O controle de inibição do crescimento foi feito com formaldeído 0,4%.

A levedura foi cultivada em 7 mL de meio BHI, sob agitação por 24 h a 37°C, alcançando a densidade óptica igual a 1 em 625 nm. O inóculo é preparado com uma diluição inicial de 1:100 (inóculo A), e a diluição final é preparada com o inóculo A, diluído 1:20. As amostras são suspensas em água deionizada estéril. Em cada poço foi pipetado 50 µL de amostra e 50 µL do inóculo preparado anteriormente. Para a Fração 5 e extrato aquoso da secreção bruta, foi feito em diluição seriada de suas concentrações. Para os controles foi pipetado 50 µL de BHI com 50 µL do inóculo, para controles de crescimento positivo; 50 µL de formaldeído e 50 µL do inóculo, para controles de crescimento negativo. Os ensaios foram feitos em triplicata e as placas incubadas por 24 horas à 37°C em estufa. A avaliação do crescimento foi feita por densidade óptica em leitora de placas (Multiskan FC Thermo Scientific, USA) à 620nm.

### **3.3. Cultivo de células animais e ensaio de viabilidade celular**

Para a identificação da atividade citotóxica da secreção bruta de *Rhinella mirandaribeiroi* foi seguido o protocolo padronizado do laboratório de Toxinologia-CFS. As linhagens celulares empregadas foram a de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7), carcinoma uterino humano (HeLa) e melanoma murino (B16-F10), que foram obtidas do banco de células *American Type Culture Collection* (ATCC – Coleção Americana de Cultivos Típicos) e foram cultivadas de acordo com o protocolo do mesmo. No fluxo laminar, já limpo e esterilizado pelo UV, a linhagem celular congelada em solvente de Dimetilsulfóxido (DMSO), foi descongelada rapidamente diluindo 1 mL da célula congelada em 9 mL de meio de cultura a uma temperatura de 37°C – 1% de antibiótico, 10% de SFB, 0,01 mg/mL de insulina e o restante do volume com o meio de cultura EMEM (Eagle's Meio Essencial Mínimo) - e imediatamente centrifugada por 5 min a 2000 rpm. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 1 mL do meio de cultura. As células, então, foram incubadas em 5 mL de meio em garrafas de 25cm<sup>3</sup>, a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> em uma estufa por 24 h. No



dia seguinte, foi analisada a morfologia das células incubadas por meio de um microscópio de luz invertido. As células que não fixaram na parede da garrafa ou que estavam mortas, foram descartadas juntamente com o meio antigo, para então ser colocado um meio de cultura novo e retornar a garrafa para a estufa.

No terceiro dia, foi verificado novamente a morfologia, crescimento das células e possível contaminação da garrafa, para então prosseguir e montar uma nova garrafa a partir daquela. O meio antigo foi descartado, e 3 mL de tripsina foi pipetado na garrafa, por aproximadamente 3 min ficou incubado na estufa, para que as células fixadas se soltassem da garrafa. Após 3 min, a garrafa foi analisada no microscópio de luz invertido para confirmar se as células haviam se soltado. Foi, então, adicionado 3 mL de meio de cultura para neutralizar a tripsina e centrifugado por 5 min a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuscitado em 1 mL de meio. Na nova garrafa, foram despejados 5 mL de meio de cultura e incubados 200 µL da ressuspensão celular (proporção 1:5).

No dia seguinte, a garrafa com as células a serem utilizadas foi novamente trocado o meio antigo, porém, antes de voltar para a garrafa, 100 µL de célula foi pipetado com 50 µL de azul de Tripán em um tubo. Dessa solução, 10 µL foram pipetados no quadrante da câmara de Neubauer. Foi realizada a contagem de células utilizando o microscópio, para ter uma estimativa da quantidade a ser usada no ensaio. A fórmula utilizada para a quantificação foi:

$$\frac{\text{Número de células contadas}}{4} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

Em uma barquinha, foi adicionada a quantidade de células devida, com o meio de cultura. Foi utilizado 200 µL de volume final para cada poço, usando  $8 \cdot 10^3$  de células como a quantidade de células padrão, e o ensaio foi realizado em triplica para cada concentração da secreção. A placa de 96 poços ficou incubada na estufa por 24 h.

No dia seguinte, o meio que estava na placa foi descartado (as células se fixam no fundo dos poços da placa) e as amostras ressuscitadas foram incubadas com as células por 24 h na estufa. Após as 24 h, foi preparada a solução do MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2,5 biphenyl tetrazolium bromide) para a determinação

da viabilidade celular (Mosmann, 1983). Foi diluído 150 µL de MTT em 15 mL de meio. Para o preparo da solução de MTT, foi utilizado a equação abaixo:

$$\text{Solução de MTT: (15 } \mu\text{L de MTT x n}^\circ \text{ de poços) + (135 } \mu\text{L de meio x n}^\circ \text{ de poços)}$$

O meio de cultura antigo da placa foi descartado e, então pipetado 150 µL nos poços do novo meio com MTT, onde ficou incubado na estufa por 3 h. Após tempo de incubação, o meio de cultura foi descartado, e se adicionou 100 µL de DMSO, homogeneizando cada poço. A leitura da placa foi feita a 595 nm em um espectrofotômetro de placas (Multiskan MCC/349, ThermoFisher Scientific).

### **3.4. Citometria de fluxo - Ensaio apoptótico**

A citometria de fluxo é uma técnica quantitativa de análise celular que possibilita a medida simultânea de múltiplas características físicas, químicas e biológicas de células em suspensão, orientadas num fluxo laminar e interceptadas uma a uma por um feixe de luz (Riley, 2005). Este ensaio consiste na ligação eficiente da proteína anexina V aos resíduos do fosfolipídio fosfatidilserina. Na célula viável, estes resíduos se encontram na face interna da membrana plasmática. Entretanto, quando o processo de apoptose é iniciado, estes resíduos são rapidamente translocados para a face externa da membrana, permitindo a ligação da proteína anexina V. O Iodeto de Propídeo (PI), corante com afinidade por DNA, é usado para distinguir células viáveis de não-viáveis, uma vez que células viáveis com membrana intacta são impermeáveis ao corante, enquanto que membranas de células mortas ou danificadas são permeáveis. Além disso, o PI é usado em conjunto com a anexina V para permitir a identificação de células em estágio inicial e final de apoptose (Van Engeland *et. al.*, 1996).

Esse ensaio teve como objetivo observar se a Fração 5 seria tóxica à célula. As células da linhagem MCF-7, foram cultivadas de acordo com o protocolo do ATCC, como visto no tópico anterior. Foram plaqueadas em placa de 24 poços (30 x 10<sup>3</sup> células por poço) e estabeleceram-se por 24 h. Depois dessas 24 h, as amostras – Fração 5 (3 mg/mL) e ácido ascórbico (0,1 mM) – foram adicionadas ao meio celular por 15 min, posteriormente foi acrescentado o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 µM) e foram incubadas por mais 24 h. No terceiro dia, as

células foram recuperadas com tripsina, lavadas com PBS e ressuspensas no tampão de ligação de Anexina V. Foi acrescentado Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI) de acordo com o protocolo de Peres & Curi (2005) e levado ao citometro (MUSE - *Guava Muse cell analyser da Lumine*), onde foi seguido o protocolo do fabricante para apoptose e morte celular. Foram realizados sete tipos de tratamentos com a MCF-7, incluindo os controles: Fração 5, Fração 5 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após 15 min, Ácido ascórbico, Ácido ascórbico + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após 15 min, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Anexina V + PI e Anexina V.

---

## 4. Caracterização da Inibição Enzimática

---

### 4.1. Tripsina

A análise de inibição da tripsina foi realizada segundo o método de Oliva *et al.* (1996), com modificações. O substrato DL-BAPNA (Sigma-Aldrich) foi utilizado em concentração final de 2 mM. A quantidade de BAPNA calculada foi diluída primeiramente em 1 mL de DMSO e o volume final necessário foi completado com a adição de tampão Tris-HCl (50mM) + CaCl<sub>2</sub> (20 mM), pH 8,2. Para o preparo da enzima, uma quantidade mínima de tripsina foi dissolvida em 1 mL de HCl 1 mM, que foi diluída consecutivamente até atingir a concentração final de 0,064 mg/mL, medida no espectrofotômetro do modelo Shimadzu 1800 UV (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) a 280 nm. A secreção bruta de *Rhinella mirandaribeiroi* (10 mg) foi ressuspensa em 1mL do tampão Tris-HCl (50 mM) + CaCl<sub>2</sub> (20 mM), pH 8,2 e o ensaio usou como sistema o descrito na Tabela 3, em temperatura ambiente.

**Tabela 4.** Sistema de avaliação de inibição de tripsina sobre BAPNA. Como amostra foi utilizado a secreção cutânea de *Rhinella mirandaribeiroi* (10 mg/mL) em cada poço.

	Tampão	Amostra	Tripsina		Substrato		Ácido Acético
<b>Amostra</b>		40 µL	40 µL				
<b>100% de atividade enzimática</b>	40 µL		40 µL	15 min	200 µL	30 min	30 µL
<b>0% de hidrólise</b>	80 µL						

#### 4.2. Quimotripsina

A análise de inibição da quimotripsina foi realizada segundo o método de De Freitas *et al.* (1999) com modificações. O substrato GPNA (Sigma-Aldrich) foi utilizado na concentração final de 2 mM. As quantidades calculadas foram diluídas em 500 µL de DMSO e o volume final necessário completado com a adição de tampão Tris-HCl (50 mM) + CaCl<sub>2</sub> (20 mM), pH 7,6. Para o preparo da enzima, uma quantidade mínima de quimotripsina foi dissolvida em 1 mL de HCl 1 mM, que foi diluída em tampão Tris-HCl até atingir a concentração final de 0,63 mg/ml, medida em espectrofotômetro do modelo Shimadzu 1800 UV (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) a 280 nm. A secreção bruta 10 mg/mL foi ressuspendidos em 1 mL do tampão Tris-HCl (50 mM) + CaCl<sub>2</sub> (20 mM), pH 7,6 e o ensaio usou como sistema o descrito na Tabela 4, em temperatura ambiente.

**Tabela 5.** Sistema de avaliação de inibição de quimotripsina sobre GPNA. Como amostra foi utilizado a secreção cutânea de *Rhinella mirandaribeiroi* (10 mg/mL).

	Tampão	Amostra	Quimotripsina		Substrato		Ácido Acético
<b>Amostra</b>		40 µL	40 µL				
<b>100% de atividade enzimática</b>	40 µL		40 µL	15 min	200 µL	30 min	30 µL
<b>0% de hidrólise</b>	80 µL						

---

## Atividade fosfolipásica

---

Para a identificação da atividade fosfolipásica da secreção bruta e frações cromatográficas, foram feitas triplicatas, baseadas no método descrito por Marinetti (1965). Para o ensaio foi utilizado como substrato fosfatidilcolina na concentração de 3 mM diluído em tampão Tris-HCL (100 mM, pH 8,0). Foram utilizadas 5 corridas cromatográficas de cada fração, ressuspendidas em 10 µL de Tris-HCl mais 10 µL cloreto de cálcio (10 mM, pH 8,0), deixando reagir por 30 min. A secreção bruta de *R. mirandaribeiroi* (5 mg) foi ressuspendida em 500 µL de Tris-HCl mais 500 µL de cloreto de cálcio, homogeneizada e centrifugada por 10 min a 13000 rpm, utilizando o sobrenadante no ensaio. Para controle positivo foi utilizado secreção da jararaca *Bothrops moojeni* (2 mg) e *Pithecopus hypochondrialis* (5 mg), para o controle negativo a emulsão com os tampões. Em cada poço, foi adicionado 150 µL da emulsão de fosfatidilcolina mais 20 µL das amostras. A atividade fosfolipásica foi monitorada por espectrofotômetro. A leitura do ensaio fosfolipásico foi realizada em 405 nm (Multiskan MCC/349, ThermoFisher Scientific), após 2 h e 24 h de incubação.

---

## 6. Ensaio Antioxidantes

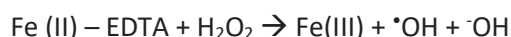
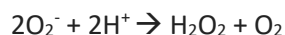
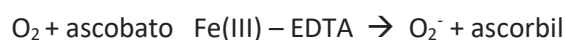
---

### 6.1. Ensaio de redução de Ferricianeto de potássio em Ferrocianeto de potássio

O ferricianeto (0,1%) foi incubado com a secreção (10 mg/mL) ou frações cromatográficas na proporção de 1:1 por 12 h. O ensaio consiste na redução  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  em  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  na presença de um agente redutor, que altera a cor do ensaio de azul para verde. Para o controle negativo foram incubados 100 µL de ferricianeto de potássio (0,1%) + 100 µL peróxido de hidrogênio, para os controles positivos foram incubados 100 µL de ferricianeto de potássio (0,1%) + 100 µL água deionizada e 100 µL ácido ascórbico (10 mg/mL). O ensaio foi realizado em placa de 96 poços e lido a 407 nm em leitora de placas (Multiskan FC, Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA).

## 6.2. Método de degradação da 2-DR pelo radical OH

A medida do dano oxidativo a 2-desoxirribose (2-DR) foi realizada através do ensaio espectrofotométrico proposto Gutteridge & Halliwell (1988) com modificações (Genaromattos *et al.*, 2009). Onde cria-se um sistema reacional *in vitro*, para formação de radicais livres que ocasiona o dano à pentose do DNA. Isso irá avaliar se as amostras são capazes de proteger a 2-DR do dano oxidativo ocasionado pelo radical hidroxil. Neste ensaio,  $\bullet\text{OH}$  é gerado pela reação do cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) e EDTA na presença de ascorbato, que reage para formar Ferro(II)-EDTA juntamente com ascorbato oxidado. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  reage com Ferro(II)-EDTA para formar Ferro(III)-EDTA e  $\bullet\text{OH}$  através da reação de Fenton. O radical formado pode então reagir com 2-desoxirribose degradando-o, formando malonaldeído (MDA). Sob aquecimento com ácido tiobarbitúrico (TBARS) em pH baixo, apresentam coloração rosada, sendo monitorado por espectrofotometria na região do visível (532 nm). Substâncias que tenham propriedades antioxidantes podem competir com a 2-desoxirribose pelo radical, produzindo uma diminuição na intensidade da coloração (Alves *et al.*, 2010). Então, a ação dos antioxidantes presentes na amostra retarda a formação do MDA reduzindo a intensidade da coloração do meio reacional. Assim, uma baixa absorbância indica uma elevada atividade antioxidante. A degradação oxidativa da desoxirribose é catalisada por Fe(III)-EDTA mais ascorbato (oxi-redução), conhecida como reação de Fenton, está ilustrada abaixo:



A reação padrão de volume final 1200  $\mu\text{L}$ , foi preparada com os seguintes reagentes: Água deionizada, Tampão Kpi 100 mM a um pH de 7,2, Desoxirribose 50 mM, EDTA 500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{FeCl}_3$  500  $\mu\text{M}$ , Ácido ascórbico 1 mM, TBA 1% e Ácido fosfórico 4% (v/v). Foi utilizado a concentração das amostras da Fração 5

em 10 mg/mL e Fração 12 em 1 mg/mL, feito em 5 tempos de incubação e em duplicata. A reação foi realizada em micro tubos estéreis, diferentes para cada tempo de incubação, adicionando os reagentes em uma ordem, volume e tempo específicos para cada um (Tabela 5). Para parar a reação de cada tempo, foi adicionado o TBA, ácido fosfórico e incubação final à 100°C, por 15 min. Nos tubos de tratamento B (branco), onde não é observado dano oxidativo, o ascorbato que é usado para iniciar a reação de formação dos radicais livres, é incluído no final da reação, são pipetados até o 5° reagente, e não há adição da amostra analisada, apenas os 160 µL de água pura (Tabela 6). Após incubação dos tempos indicados para cada tubo B, é pipetado do 6° ao 8° reagente sem pausa, para não haver tempo de reação com o ascorbato. A curva padrão de incubação do ascorbato, onde é observado a formação do complexo TBA-MDA (dano oxidativo), é o mesmo realizado na tabela 6, sem a amostra analisada, ou seja, é utilizado 160 µL de água deionizada, porém, diferentemente dos tubos B, há a espera de incubação dos reagentes para a observação do dano oxidativo. Em uma leitora de absorvância, foi colocada as reações em cubetas transparentes e foi feita a leitura de cada uma, à 532nm.

**Tabela 6.** Micro tubos numerados de 1 a 5 e tempo de incubação dos reagentes. Sendo os tubos de tratamento realizados em duplicata e controles em triplicata.

<b>Tempo de incubação (minutos)</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>45</b>	<b>60</b>
Controle Branco	T1 B	T2 B	T3 B	T4 B	T5 B
Controle de Dano oxidativo	T1 Z	T2 Z	T3 Z	T4 Z	T5 Z
Tratamento das amostras	T1	T2	T3	T4	T5

**Tabela 7.** Os reagentes preparados nos tubos T1 à T5 em ordem e volumes para o ensaio de degradação da 2-DR.

<b>Reagente</b>	<b>Concentração na reação (no tubo)</b>	<b>Volume por tubo</b>
1º Água Deionizada + amostra (250 µL)	-	145 µL água + 15 µL amostra (volume final 160 µL)
2º Tampão Kpi 100 mM pH 7,2	20 mM	80 µL
3º Desoxirribose 50 mM	5 mM	40 µL
4º EDTA 500 µM	50 µM	40 µL
5º FeCl <sub>3</sub> 500 µM	50 µM	40 µL
<b>PAUSA DE 30 MINUTOS</b>		
6º Ácido ascórbico 1 mM	0,1 mM	40 µL
<b>Tempo de incubação para cada tratamento</b>		
<b>Reagentes para parar a reação</b>		
7º TBA 1%		400 µL
8º Ácido fosfórico 4%		400 µL
<b>INCUBAÇÃO POR 15min À 100°C</b>		
<b>LEITURA À 532nm</b>		

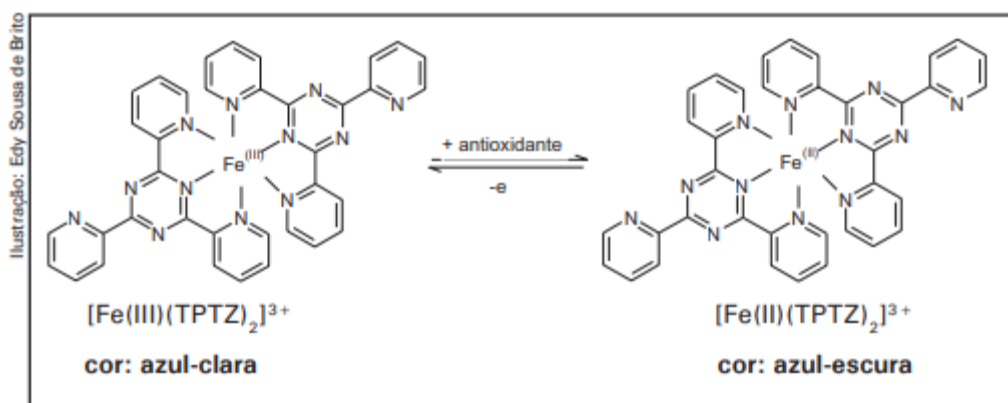
### 6.3. Poder Antioxidante de Redução do Ferro - FRAP

Em pH baixo, quando um complexo férrico-tripiridiltriazina (FeIII-TPTZ) é reduzido à forma ferrosa Fe(II) (Figura 5), desenvolve-se uma cor azul intensa com uma absorção máxima a 593nm. Então o desenvolvimento da cor, depende da presença de um redutor (antioxidante).

Seguindo o método de Benzie & Strain (1996), a solução FRAP foi feita a partir da combinação de: Tampão acetato (0,3 M/L), solução de TPTZ (10 mM/L) em HCl (40 mM/L) e solução aquosa de cloreto férrico



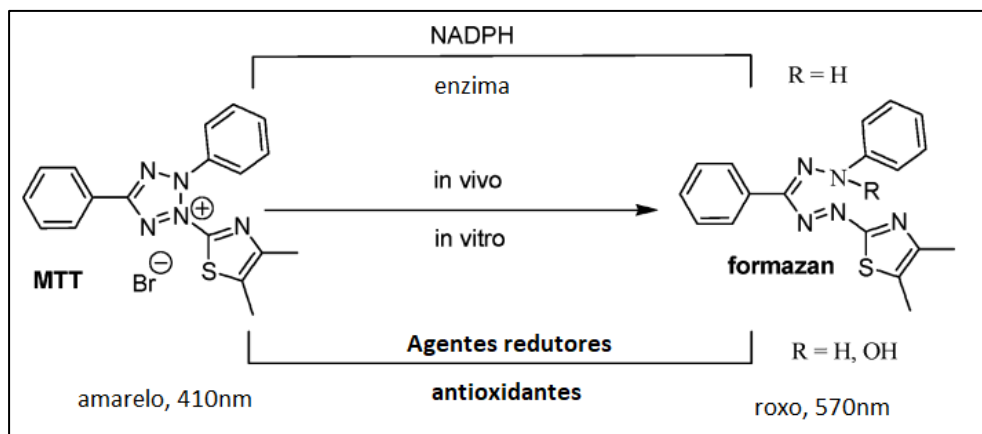
(20 mM/L). Foram preparadas soluções aquosas de  $\text{FeSO}_4$ , na faixa de concentração entre 0 – 2000  $\mu\text{M/L}$ , para construção da curva de calibração ( $y=0,0006x - 0,0088$ ,  $r^2 = 0,9984$ ) lendo as absorbâncias no tempo 0 (inicial) e 4 min (final). Material liofilizado da Fração 5 (2 mg) e 12 (0,6 mg), foram solubilizados em 200  $\mu\text{L}$  de água deionizada. Foi feita uma diluição de 100x da solução anterior. Foram pipetados para a reação: 900  $\mu\text{L}$  reagente FRAP, 90  $\mu\text{L}$  água deionizada e 30  $\mu\text{L}$  das amostras inicial e diluída. A absorbância foi monitorada por 4 min a 593 nm em espectrofotômetro (Shimadzu-TCC 240<sup>a</sup>, Kyoto, Japan). Foi calculado a absorbância delta (abs final – inicial), para a quantificação da capacidade redutora de  $\text{FeSO}_4$ .



**Figura 5.** Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com  $\text{Fe}^3$ . Imagem retirada de Rufino *et al.* (2006).

#### 6.4. Ensaio MTT antioxidante

Este é um ensaio de antioxidação feito em um período curto e com poucos reagentes. O [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT), um sal de coloração amarela e solúvel em água, sofre uma redução pela ação de enzimas, mas no caso deste ensaio é reduzido por ação de um agente antioxidante, tendo como produto da reação a molécula de formazan (Figura 6), sal de coloração arroxeada e insolúvel em água, detectável à 570 nm.



**Figura 6.** Redução do MTT por agentes redutores ou enzimáticos, tendo como produto formazan. Imagem retirada de Liu & Nair (2010).

O método foi realizado segundo proposta de Liu & Nair (2010), com modificações para alcançar a concentração de reagente desejada. Foi utilizado como amostra as secreções de *R. mirandaribeiroi* (11 mg/mL), como controle o ácido ascórbico (0,11 mg/mL) e a Fração 5 (2,94 mg) de *R. mirandaribeiroi* diluída em diferentes concentrações, todos liofilizados. As amostras foram ressuspensas em 200  $\mu$ L de MTT (1 mg/mL), vortexadas por 1 min e incubadas por 3 h à 37°C, com ausência de luz. Após incubação, foi adicionado 200  $\mu$ L de Dimetilsulfóxido (DMSO) na solução, para dissolução de possíveis cristais, vortexado por 1 min e incubado novamente à 37°C por 24 h. Após incubação foi observado a coloração das amostras para verificar se a solução estava translúcida. Caso observasse o meio com grânulos, foi pipetado na proporção de 1:4 (100  $\mu$ L) de DMSO, para dissolução total dos cristais. Foi pipetado 200  $\mu$ L das amostras em placa multi poços de fundo chato de 96 poços (Nunc F96, Denmark) e a leitura foi realizada à 570 nm em leitora de microplaca (Multiskan® FC, Thermo Scientific, EUA).

---

## 7. Caracterização da estrutura primária por espectrometria de massa

---

As frações 5 e 12 com atividade de interesse foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF modelo AUTOFLEX II (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) em modo refletido ou linear positivo, utilizando calibração externa. Para componentes de baixa massa molecular, utilizou-se as matrizes

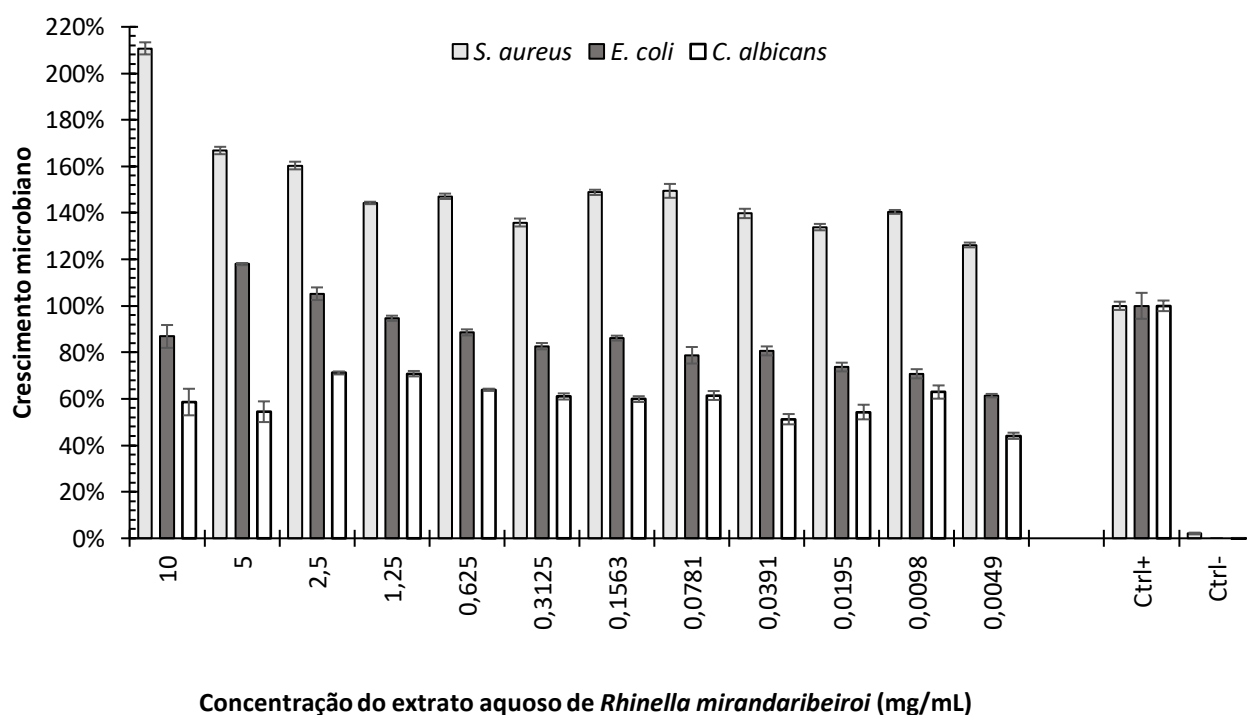
ácido dehidrobenzóico (DHB, 20 µg/µL) e ácido α-ciaminico (HCCA, 20 µg/µL), os espectrogramas adquiridos de 50 a 2000 *m/z*. A Fração 22 também foi analisada no espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF, em modo linear positivo, utilizando calibração externa. Para isso, foi utilizada a matriz ácido sinapínico (SA, 20 µg/µL) e os espectrogramas foram adquiridos de 1000 a 20000 *m/z*. Para todas as análises, as frações e matrizes foram ressuspendidas em acetonitrila 50% em TFA 0,1%, sendo que 1 µL de cada fração cromatográfica foi aplicado sob 1 µL de matriz em placa de aço inoxidável.

# *Resultados*

## 1. Atividades da secreção bruta

### 1.1. Atividade antibacteriana e antifúngica

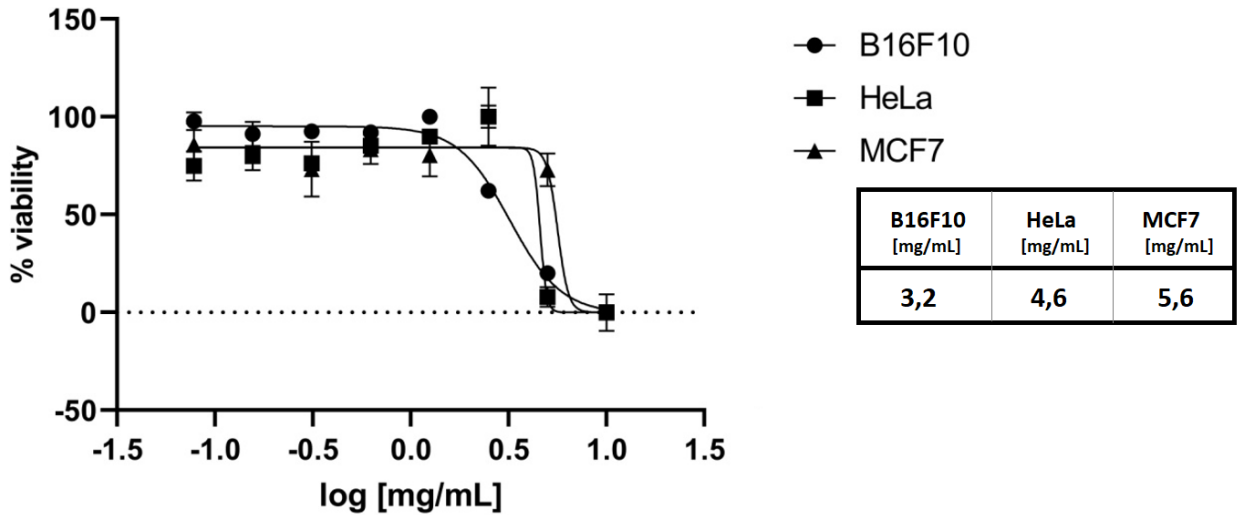
A secreção bruta mostrou-se ineficiente na inibição do crescimento da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, havendo até mesmo um crescimento maior que o controle. Inibiu parcialmente a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, tendo 39% de inibição na menor concentração (0,0049 mg/mL). A secreção bruta inibiu em 56% o crescimento de células fúngicas de *Candida albicans* na menor concentração, enquanto na maior concentração da secreção (10 mg/mL) inibiu em 41%, mostrando então ser mais eficiente contra células fúngicas a células bacterianas e mais eficiente em bactérias Gram-negativas (Figura 7). Não foi possível determinar os MICs para a secreção bruta nesse trabalho. Os dados estão representados em porcentagem a partir das médias de experimentos realizados em triplicata  $\pm$  SD (desvio padrão).



**Figura 7.** Porcentagem do crescimento celular para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, incubadas em diferentes concentrações do extrato aquoso de *Rhinella mirandaribeiroi*, após 24 horas. Como controle positivo foi utilizado a suspensão de cada microrganismo em meio de crescimento, e controle negativo foi utilizado formaldeído. Leitura à 620nm.

### 1.2. Atividade de viabilidade celular

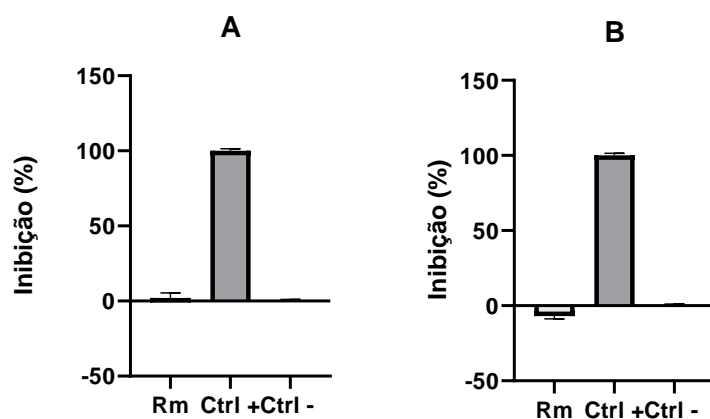
Para a atividade antiproliferativa utilizando a secreção cutânea de *R. mirandaribeiroi* contra as linhagens B16F10, HeLa e MCF-7 foram obtidos IC<sub>50</sub> equivalentes a 3,2 mg/mL, 4,6 mg/mL e 5,6 mg/mL, respectivamente (Figura 8). Os dados estão representados em porcentagem a partir das médias de experimentos realizados em triplicata ± SD (desvio padrão).



**Figura 8.** Ensaio antiproliferativo, testando a secreção bruta de *Rhinella mirandaribeiroi* em diferentes concentrações como inibidor de viabilidade de células neoplásicas das linhagens B16F10, HeLa e MCF7. Na tabela se encontram os IC<sub>50</sub> para cada linhagem (mg/mL).

### 1.3. Atividade inibidora de serino protease

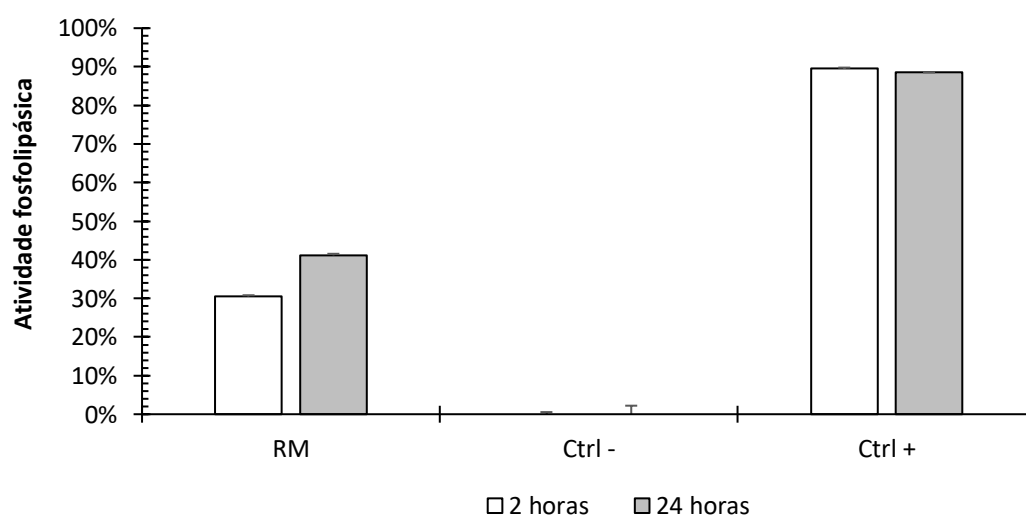
A secreção cutânea de *Rhinella mirandaribeiroi* (10 mg/mL) não apresentou atividade inibitória de serino proteases (tripsina e quimotripsina) (Figura 9). Os dados estão representados em porcentagem a partir das médias de experimentos realizados em triplicata ± SD (desvio padrão).



**Figura 9.** Ensaio de inibição de serino protease Tripsina (A) e Quimotripsina (B) após incubação com secreção cutânea bruta de *Rhinella mirandaribeiroi* (10 mg/mL).

#### 1.4. Atividade fosfolipásica

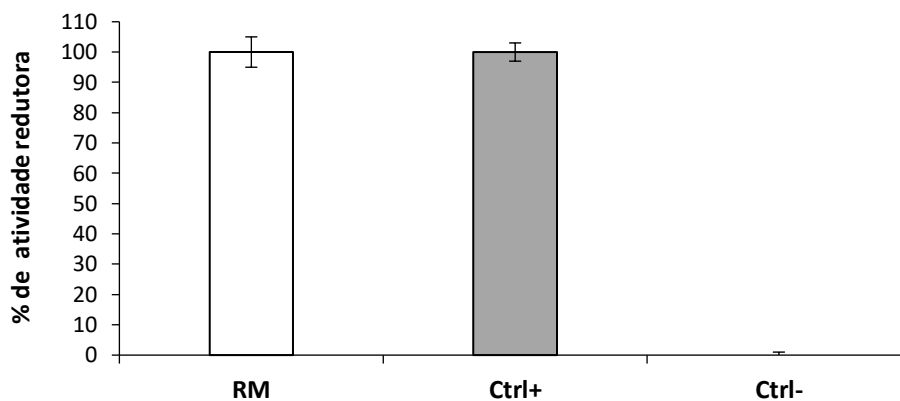
Houve atividade da enzima fosfolipase utilizando o extrato aquoso da secreção cutânea bruta de *Rhinella mirandaribeiroi* (5 mg/mL), observada pelo consumo de fosfatidilcolina após 2 h (30% de consumo) e 24 h sendo o mais acentuado com 41% de consumo (Figura 10). Como controle positivo foi utilizado a secreção de *Bothrops moojeni* (2 mg/mL) e controle negativo é a emulsão de fosfatidilcolina. Os dados estão representados em porcentagem a partir das médias de experimentos realizados em triplicata  $\pm$  SD (desvio padrão).



**Figura 10.** Ensaio de atividade fosfolipásica presente na secreção cutânea de *Rhinella mirandaribeiroi* (5 mg/mL). Como substrato foi utilizado fosfatidilcolina (3 mM), Controle positivo é a secreção bruta de *Bothrops moojeni* (2 mg/mL) e controle negativo é a emulsão de fosfatidilcolina sem incubação de enzima. Leitura à 405 nm após 2 h e 24 h.

### 1.5. Ensaio de redução de Ferricianeto de potássio em Ferrocianeto de potássio

Ferricianeto (0,1%) foi incubado com a secreção bruta de *Rhinella mirandaribeiroi* (10 mg/mL) e foi observado a redução do  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  em  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  em 100%, em relação ao controle positivo, que foi utilizado ascorbato (1 mg/mL) como agente redutor (Figura 11). Os dados estão representados em porcentagem a partir das médias de experimentos realizados em triplicata  $\pm$  SD (desvio padrão).

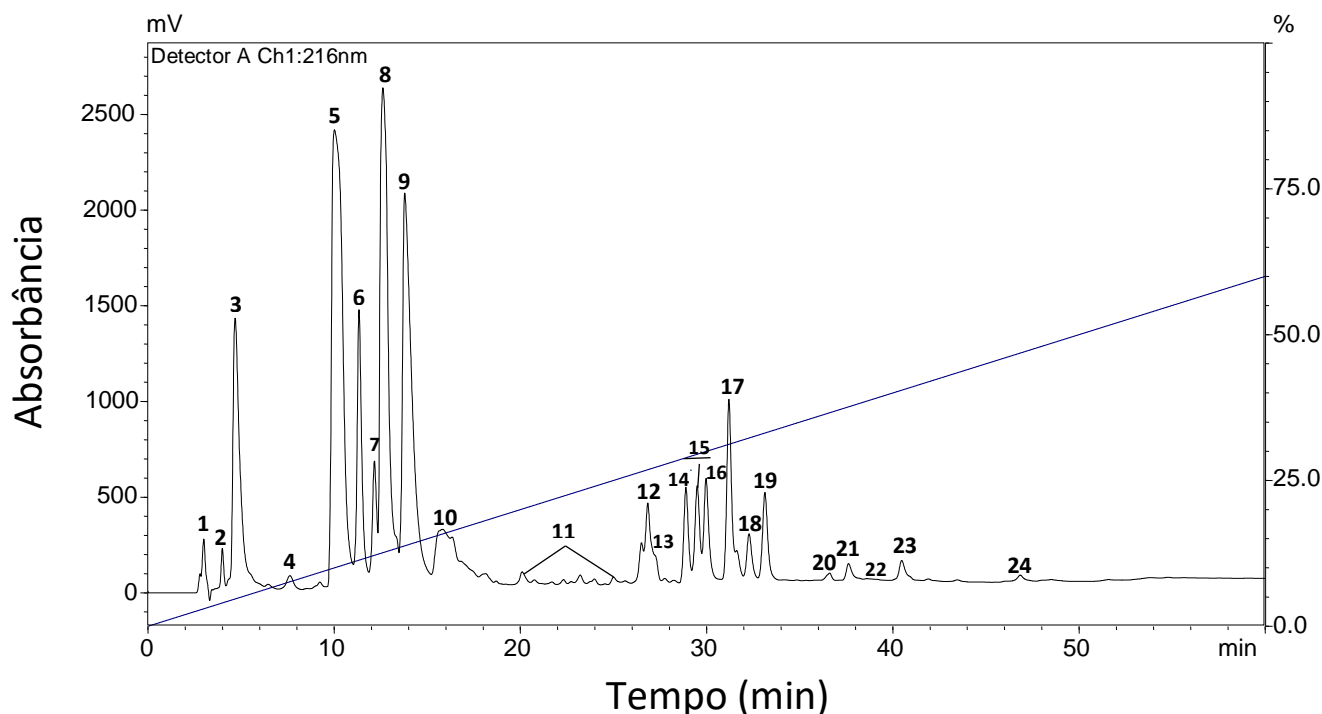


**Figura 11.** Ensaio de atividade ferricianeto da secreção bruta de *Rhinella mirandaribeiroi*. Controle positivo utilizado foi ascorbato e como controle negativo peróxido de hidrogênio.



## 2. Fracionamento da secreção bruta e Atividade das frações

Alíquotas de 100  $\mu$ L da secreção bruta de *Rhinella mirandaribeiroi* (20 mg/mL) foram inicialmente fracionadas em coluna analítica C<sub>18</sub> de fase reversa (Vydac 218TP54, 250mm x 4,5mm, 5 $\mu$ m) por RP-HPLC a um fluxo de 1 mL/min, apresentando um perfil cromatográfico com a coleta de 24 frações (Figura 12).

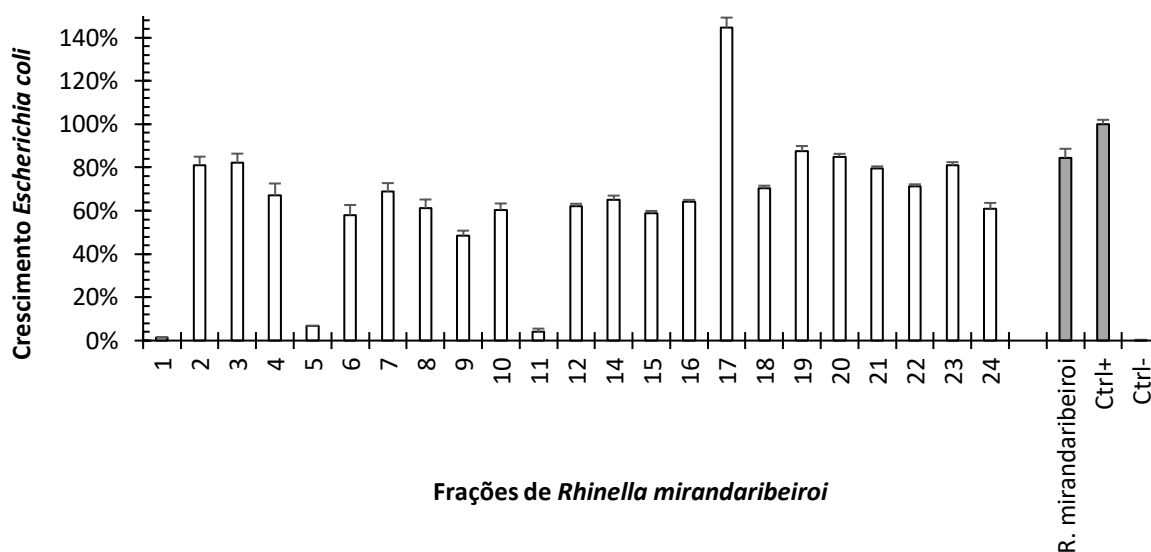


**Figura 12.** Perfil cromatográfico (RP-HPLC) da secreção cutânea de *Rhinella mirandaribeiroi*, em coluna analítica C<sub>18</sub> de fase reversa (Vydac 218TP54, 250mm x 4,5mm, 5 $\mu$ m), com eluição de 24 frações em fluxo de 1 mL/min, 60% da fase B em 60 minutos. O monitoramento das frações foi à 216 nm.

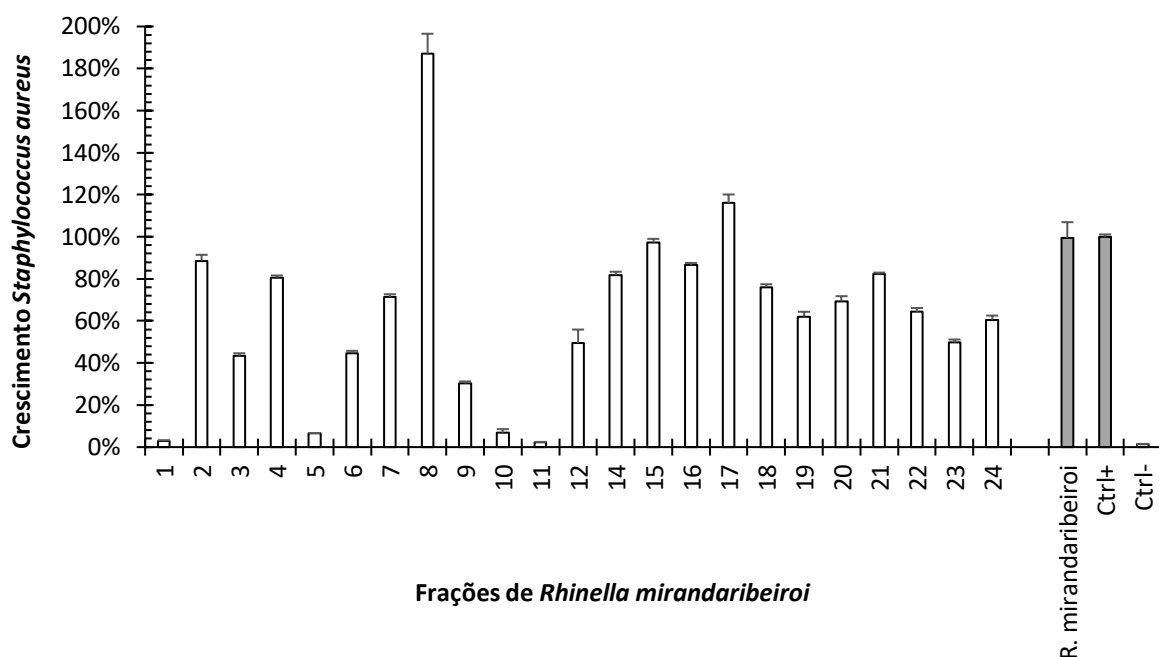
### 2.1. Atividade antibacteriana e antifúngica

Para o *screening* de atividades antibacterianas e antifúngica, frações referentes a 15 corridas cromatográficas foram acumuladas e avaliadas contra bactérias Gram-negativa (*Escherichia coli* - ATCC 25922), Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* - ATCC 25923) e linhagem de levedura (*Candida albicans* - ATCC 10231). Se observa os valores de 98%, 93% e 97% de inibição de crescimento contra *Escherichia coli* nas frações 1, 5 e 11, respectivamente (Figura 13). Para *Staphylococcus aureus* foi observado inibição em mais de 50% nas frações: 1, 3, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 23; destacando-se as frações 1, 5, 10 e 11 com inibição de

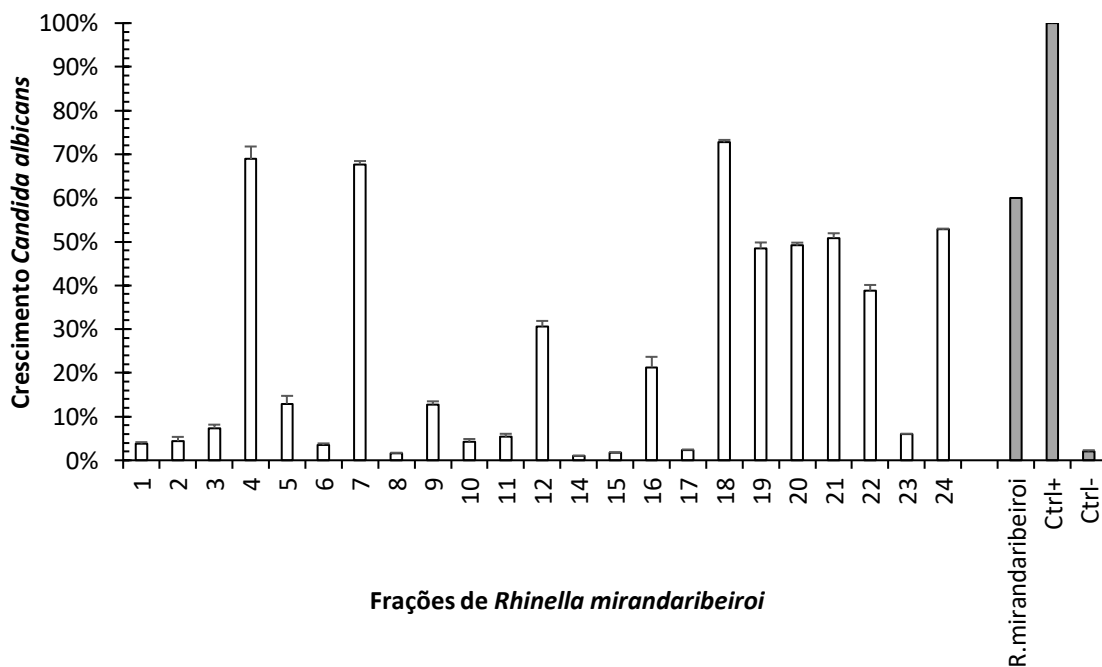
97%, 94%, 93% e 98%, respectivamente (Figura 14). Para *Candida albicans* ocorreram no total 20 frações com atividade inibitória maior que 50%, sendo as atividades mais acentuadas de 99% na Fração 14; 98% nas frações 8, 15 e 17; 96% nas frações 1, 2, 6, 10 e 11; 94% nas frações 3 e 23; 87% nas frações 5 e 9 (Figura 15). As frações que apresentaram atividade de aproximadamente >90% para os 3 microrganismos foram as frações 1, 5 e 11. Os dados estão representados em porcentagem a partir das médias de experimentos realizados em triplicata  $\pm$  SD (desvio padrão). O resultado das frações que obtiveram atividade de inibição contra os microrganismos está resumido na Tabela 7.



**Figura 13.** Ensaio antibacteriano contra *Escherichia coli* das frações de *Rhinella mirandaribeiroi*. Incubação de 24 h em meio Mueller Hinton, onde o controle positivo é MH + *E. coli* e o controle negativo é formaldeído 0,4%. Leitura à 620 nm. Destaque para as frações 1, 5 e 11 que apresentaram maior inibição.



**Figura 14.** Ensaio antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* das frações de *Rhinella mirandaribeiroi*. Incubação de 24 h em meio Mueller Hinton, onde o controle positivo é MH + *S. aureus* e o controle negativo é formaldeído 0,4%. Leitura à 620nm. Destaque para as frações 1, 5, 10 e 11 com maior atividade de inibição.



**Figura 15.** Ensaio antifúngico contra *Candida albicans* das frações de *Rhinella mirandaribeiroi*. Incubação de 24 h em meio BHI, onde o controle positivo é BHI + *C. albicans* e o controle negativo é formaldeído 0,4%. Leitura à 620nm. Destaque para as frações 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 17 e 23 com atividade de inibição de aproximadamente >90%.

**Tabela 8.** Análise das frações sobre a inibição de crescimento celular microbiano onde o “X” marca positivo para a atividade em mais de 50% ou menos de 50%, e “XX” para indicar um valor extremo, seja total inibição de crescimento (>90%) ou nenhuma inibição (<10%). As frações que apresentaram inibição de crescimento para os 3 microrganismos em mais de 90% foram as frações 1, 5 e 11. E as frações que apresentaram inibição de crescimento para os 3 microrganismos menor que 50% foram as frações 4, 7 e 18

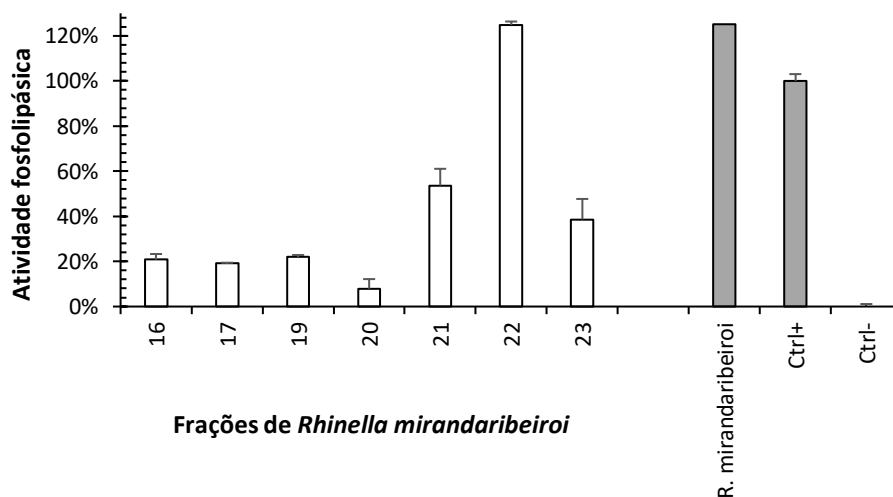
Fração	Inibição <i>E.coli</i> ≥50%	Inibição <i>S. aureus</i> ≥50%	Inibição <i>C. albicans</i> ≥50%	Inibição <i>E.coli</i> <50%	Inibição <i>S.aureus</i> <50%	Inibição <i>C.albicans</i> <50%
1	XX	XX	XX			
2			XX	X	XX	
3		X	XX	X		
4				X	X	X
5	XX	XX	XX			
6		X	XX	X		
7				X	X	X
8			XX	XX	X	
9	X	X	XX			
10		XX	XX	X		
11	XX	XX	XX			
12		X	X	X		
14			XX	X	X	
15			XX	X	XX	
16			X	X	XX	
17			XX	XX	XX	
18				X	X	X
19			X	XX	X	
20			X	X	X	
21			X	X	X	

22		X	X	X
23	X	XX	X	
24		X	X	X

Continuação da Tabela 9.

## 2.2. Atividade fosfolipásica

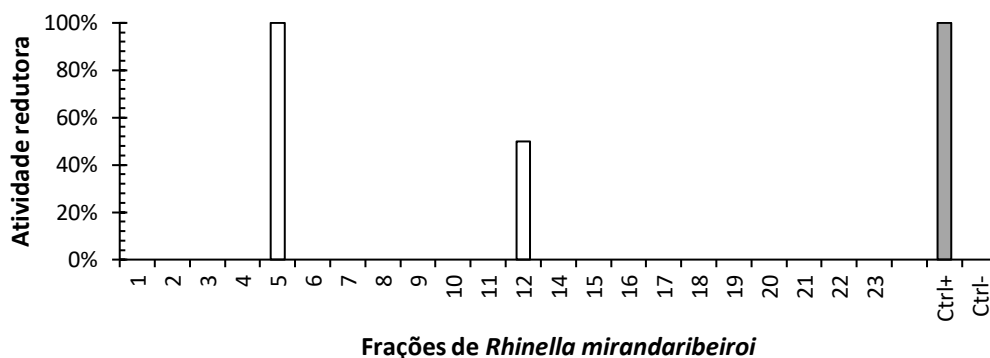
Para encontrar a fração contendo fosfolipase, foi feito um ensaio de atividade fosfolipásica com as frações mais hidrofóbicas da corrida cromatográfica, pela alta afinidade da molécula com lipídios (lipofílica) e possuir uma porção hidrofóbica na molécula (Santos-Filho, 2009). Os dados indicaram a presença de fosfolipase nas frações 21, 22 e 23, com resultado equivalente a 54%, 125% e 39%, respectivamente (Figura 16), onde se observa a taxa da Fração 22 e do extrato aquoso da secreção bruta de *R. mirandaribeiroi* (5 mg/mL), maior que o próprio controle positivo (secreção de *B. moojeni* – 2mg/mL). Os dados estão representados em porcentagem a partir das médias de experimentos realizados em triplicata  $\pm$  SD (desvio padrão).



**Figura 16.** Screening da atividade fosfolipásica utilizando 5 corridas das frações de *Rhinella mirandaribeiroi*. A leitura do ensaio fosfolipásico foi realizada em 405 nm, sendo a atividade enzimática avaliada após 24 h. Como controle positivo foi utilizado a secreção de *Bothrops moojeni* (2 mg/mL) e controle negativo é a emulsão sem incubação de enzima.

### 2.3. Ensaio de redução de Ferricianeto de potássio em Ferrocianeto de potássio

No ensaio de redução  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  em  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ , de todas as frações analisadas, apenas as frações 5 e 12 apresentaram atividade redutora, sendo a Fração 5 se igualando ao ascorbato com 100% de atividade. Já a Fração 12 apresentou 50% de atividade (Figura 17).



**Figura 17.** Screening da atividade redutora de ferricianeto (0,1%) para as frações de *Rhinella mirandaribeiroi*, incubação por 12h. Como controle negativo foi utilizado peróxido de hidrogênio e positivo ascorbato (10 mg/mL).

---

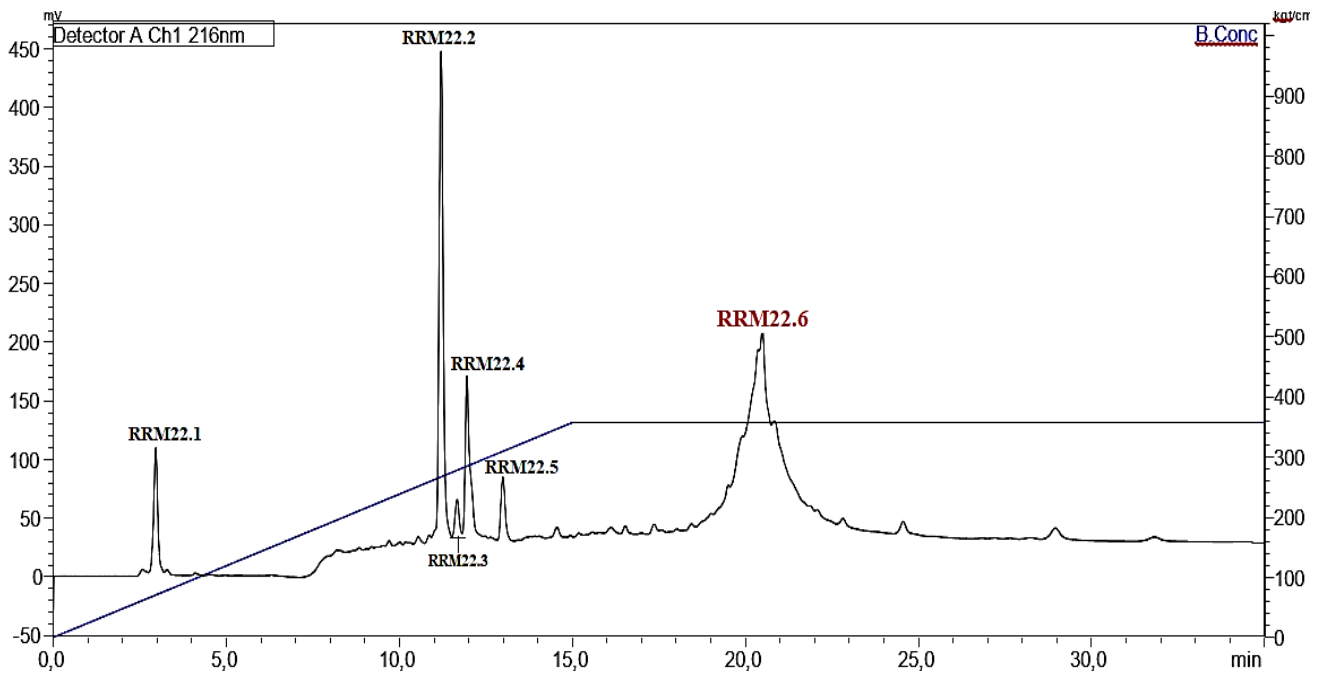
## 3. Frações de interesse

---

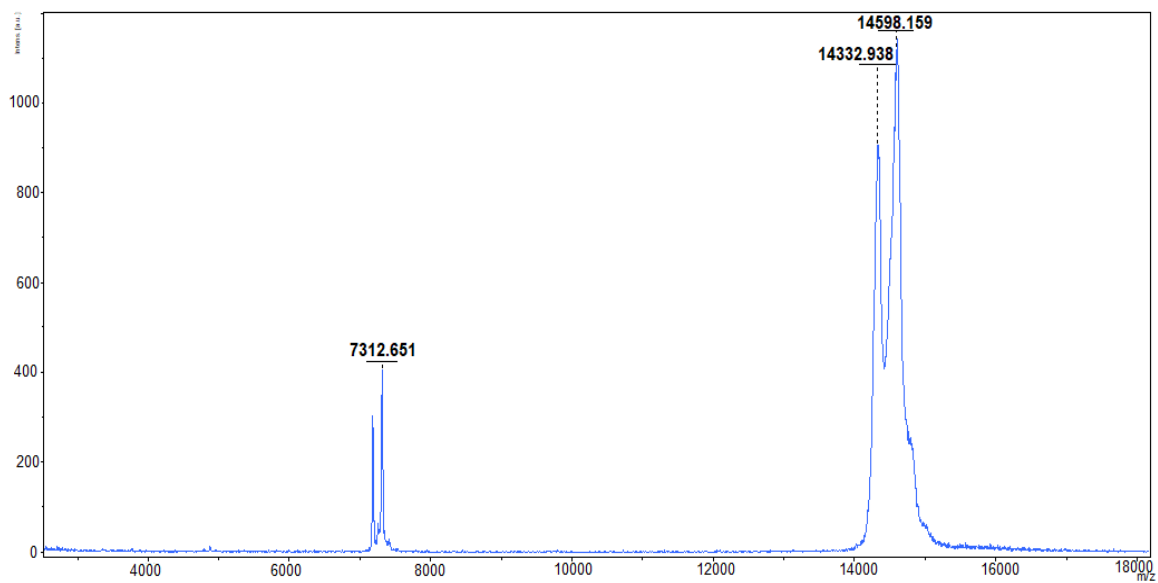
### 3.1. Fração 22

#### 3.1.1. Purificação

Na recromatografia da Fração 22 obtivemos 6 subfrações distintas: RRM-22.1, RRM-22.2, RRM-22.3, RRM-22.4, RRM-22.5, RRM-22.6 (Figura 18). Estas subfrações foram submetidas à espectrometria de massa para averiguar onde se encontra o componente compatível com a fosfolipase, além de averiguar sua pureza. Então, foi encontrado na subfração RRM-22.6 componentes de massa de 14 KDa (Figura 19).



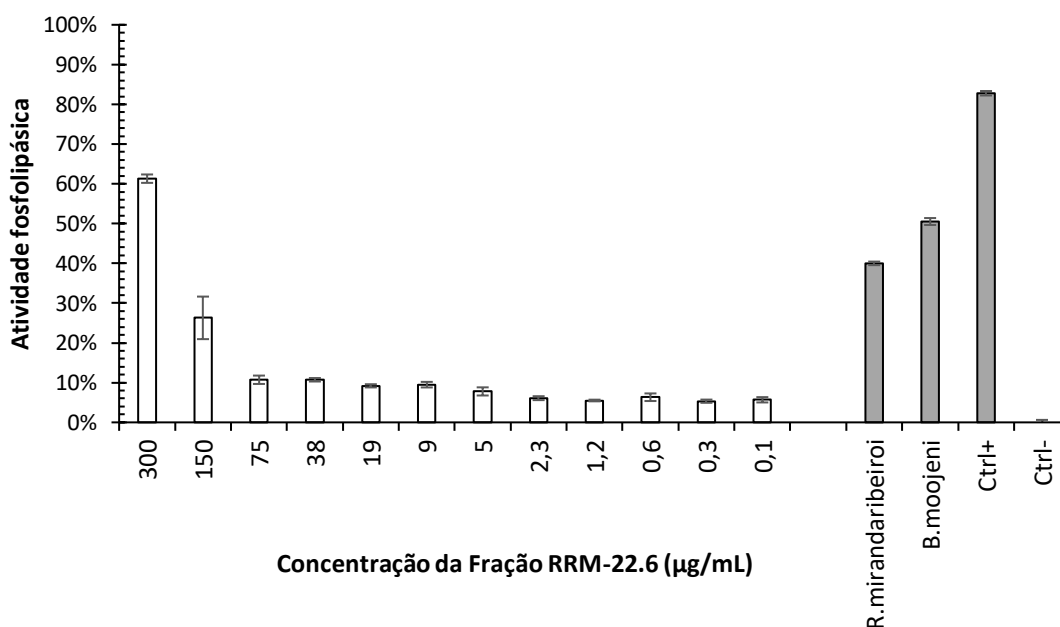
**Figura 18.** Recromatografia da Fração 22 realizada em RP-HPLC em coluna analítica C<sub>18</sub> de fase reversa (Vydac 218TP54) em que 6 picos eluíram (RRM-22.1, RRM-22.2, RRM-22.3, RRM-22.4, RRM-22.5, RRM-22.6). A separação cromatográfica foi monitorada em 216 nm.



**Figura 19.** Espectrograma de massa em modo linear positivo (2000 – 20000  $m/z$ ) da subfração RRM-22.6 de *Rhinella mirandaribeiroi*. Observamos os componentes de 14598, 14332  $m/z$ . Foi utilizada a matriz ácido sinapínico.

### 3.1.2. Atividade fosfolipásica

A enzima foi encontrada na subfração RRM-22.6. Foi feito um ensaio para a atividade, com a diluição seriada da subfração RRM-22.6. A maior atividade enzimática após 2 h foi na maior concentração testada (300 µg/mL – 61%), obtendo um resultado mais eficiente que na secreção bruta de *B. moojeni* (2 mg/mL – 51%), e então a atividade decai de acordo com a diminuição da concentração da fração (Figura 20). Como controle positivo foi utilizado a secreção de *Pithecopus hypochondrialis* (5 mg/mL) e controle negativo é a emulsão de fosfatidilcolina. Os dados estão representados em porcentagem a partir das médias de experimentos realizados em triplicata ± SD (desvio padrão).



**Figura 20.** Atividade da fosfolipase depois da purificação por recromatografia da Fração 22, a subfração RRM-22.6 (0,3 mg/mL), utilizando como substrato fosfatidilcolina 3 mM. Foi feita a leitura à 405 nm, após incubação da secreção por 2h. Como controle positivo foi utilizado a secreção de *Pithecopus hypochondrialis* (5 mg/mL) e controle negativo é a emulsão de fosfatidilcolina. A secreção de *B. moojeni* estava em 2 mg/mL e *R. mirandaribeiroi* em 5 mg/mL

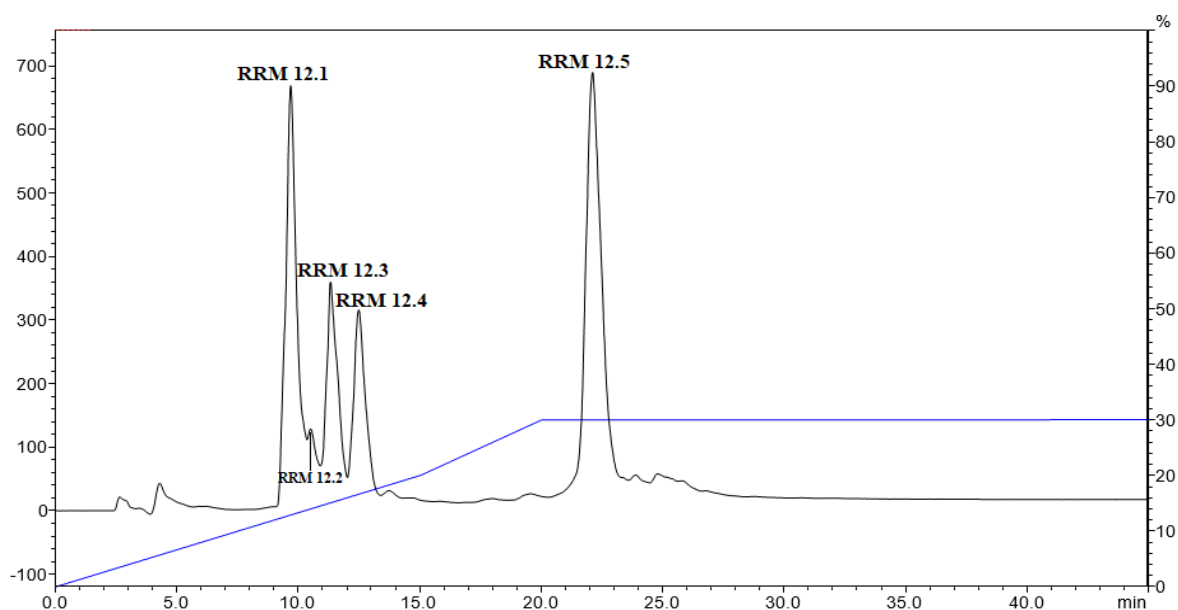
## 3.2. Fração 12

### 3.2.1. Purificação

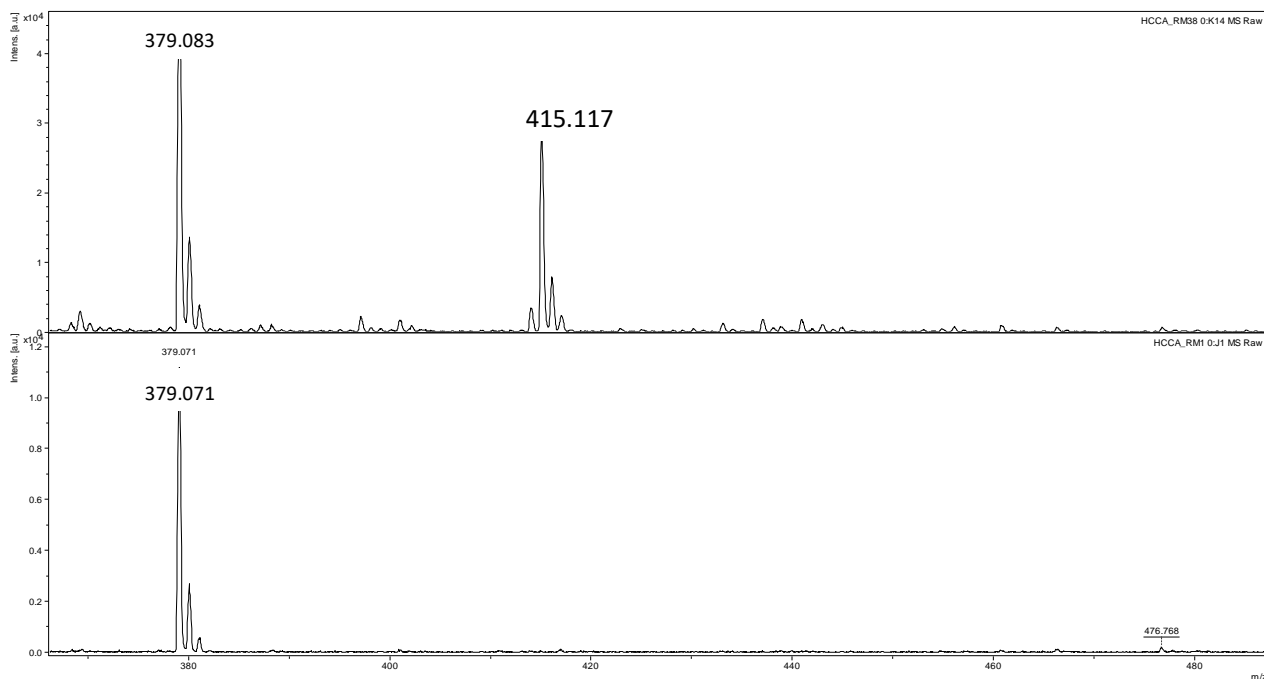
Foi realizada uma recromatografia da Fração 12, para sua purificação, onde teve a eluição de 5 subfrações (RRM-12.1, RRM-12.2, RRM-12.3, RRM-12.4, RRM-12.5) e o composto de interesse se encontra



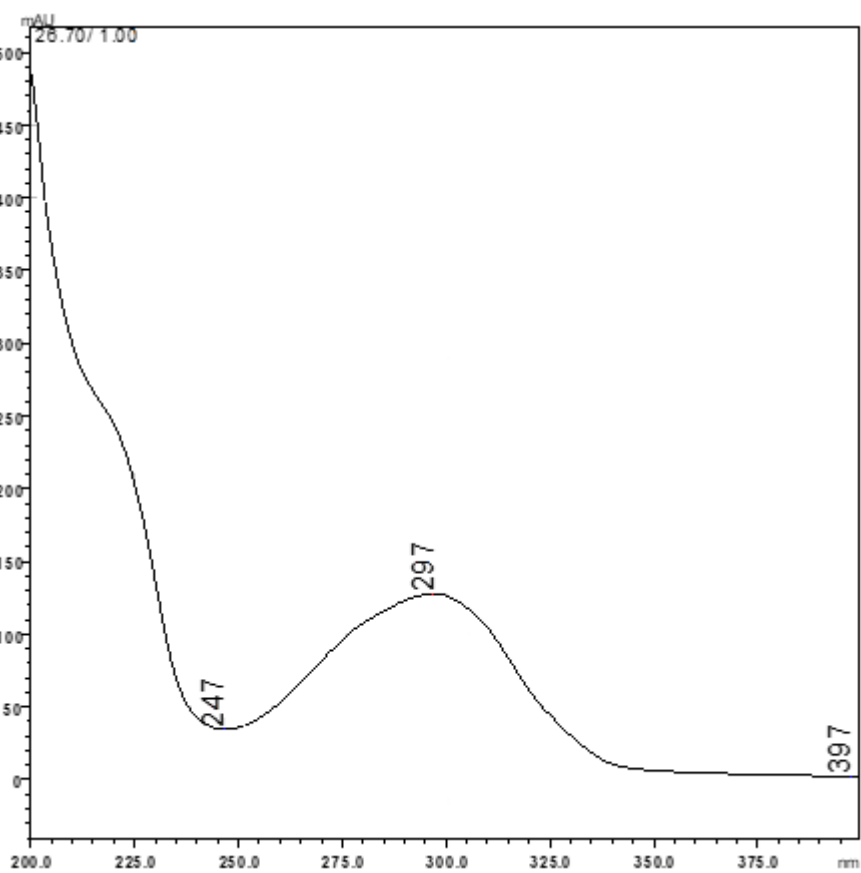
na subfração RRM-12.5 (Figura 21). A subfração RRM-12.5 foi submetida à uma espectrometria de massa, para possível identificação e pureza, observando um componente de massa de 415  $m/z$  (Figura 22). Também foi analisado o espectro de absorção UV (200 a 400 nm) da Fração 12, pela leitura do pico da separação cromatográfica no aparelho de HPLC, e observamos  $\lambda_{\text{máx}}$ : 297 nm e  $\lambda_{\text{mín}}$ : 247 nm (Figura 23). Depois das análises de cromatografia, componente de massa e absorção UV (Kerkhoff *et al.*, 2016), que resultaram em características de bufadienolídeos, nos leva a suspeitar que seja, possivelmente, uma bufotalina ou 19-oxo-desacetylcinobufagina (He *et al.*, 2019; Córdova *et al.*, 2016; Ye & Guo, 2005).



**Figura 21.** Recromatografia da Fração 12. Realizada em RP-HPLC em coluna analítica  $C_{18}$  de fase reversa (Vydac 218TP54) em que 5 picos eluíram (RRM-12.1, RRM-12.2, RRM-12.3, RRM-12.4, RRM-12.5). A separação cromatográfica foi monitorada em 216 nm.



**Figura 22.** Espectrograma de massa da Fração RRM-12.5 de *Rhinella mirandaribeiroi*, modo refletido positivo, onde se observa um componente de massa em 415  $m/z$ . E o espectrograma da matriz ácido aciano-4-hidroxicinâmico com o componente 379.08  $[M_2+H]^+$ .



**Figura 23.** Perfil do espectro de absorção UV da Fração 12.  $\lambda_{m\acute{a}x}$ : 297nm e  $\lambda_{m\acute{i}n}$ : 247nm

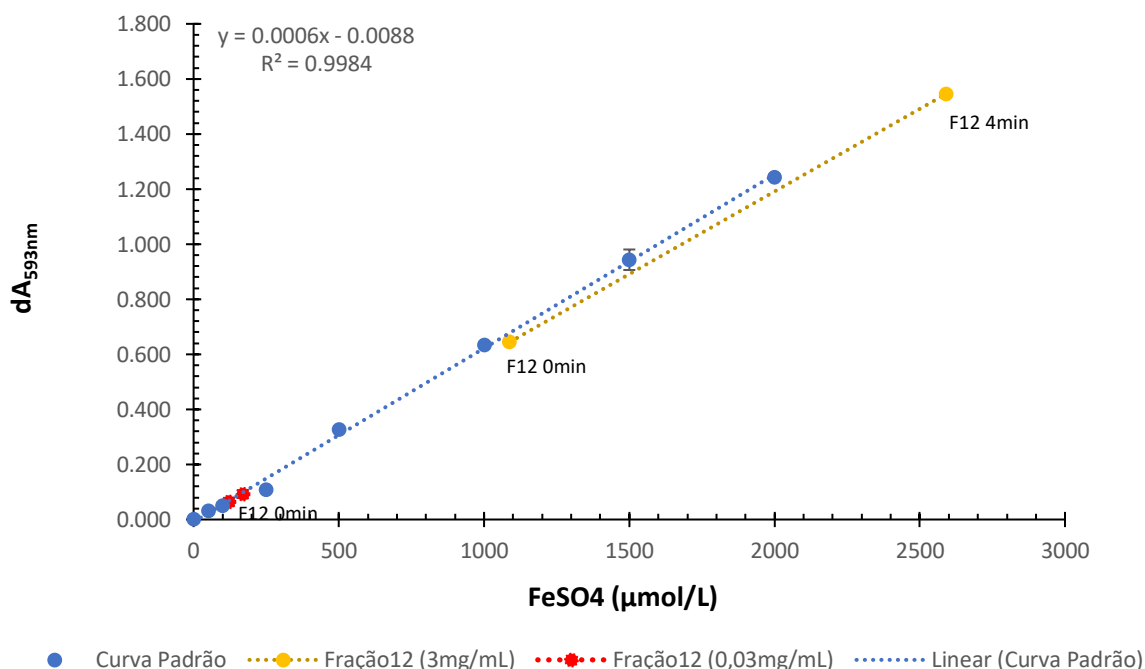
### 3.2.2. Ensaios antioxidantes

#### 3.2.2.1. FRAP

A atividade antioxidante da Fração RRM-12.5 foi analisada pelo ensaio FRAP, observado na Tabela 8 e Figura 24. Na Fração RRM-12.5 (3 mg/mL) sem diluição, foi observado concentração de ferroso (FeII) formado na solução de 1,516  $\mu\text{M}/\text{mL}$  e 0,505  $\mu\text{M}/\text{mg}$ , isso quer dizer que a amostra possui uma capacidade redutora por mL equivalente a 1,5  $\mu\text{mol}$  de  $\text{FeSO}_4$ . Após a diluição (0,03 mg/mL) tivemos um resultado de 0,0619  $\mu\text{M}/\text{mL}$  e 0,02 $\mu\text{M}/\text{mg}$  de Fe(II) na solução. Os dados estão representados em porcentagem a partir das médias de experimentos realizados em triplicata  $\pm$  SD (desvio padrão).

**Tabela 10.** Resumo dos resultados obtidos no ensaio FRAP após 4 minutos.

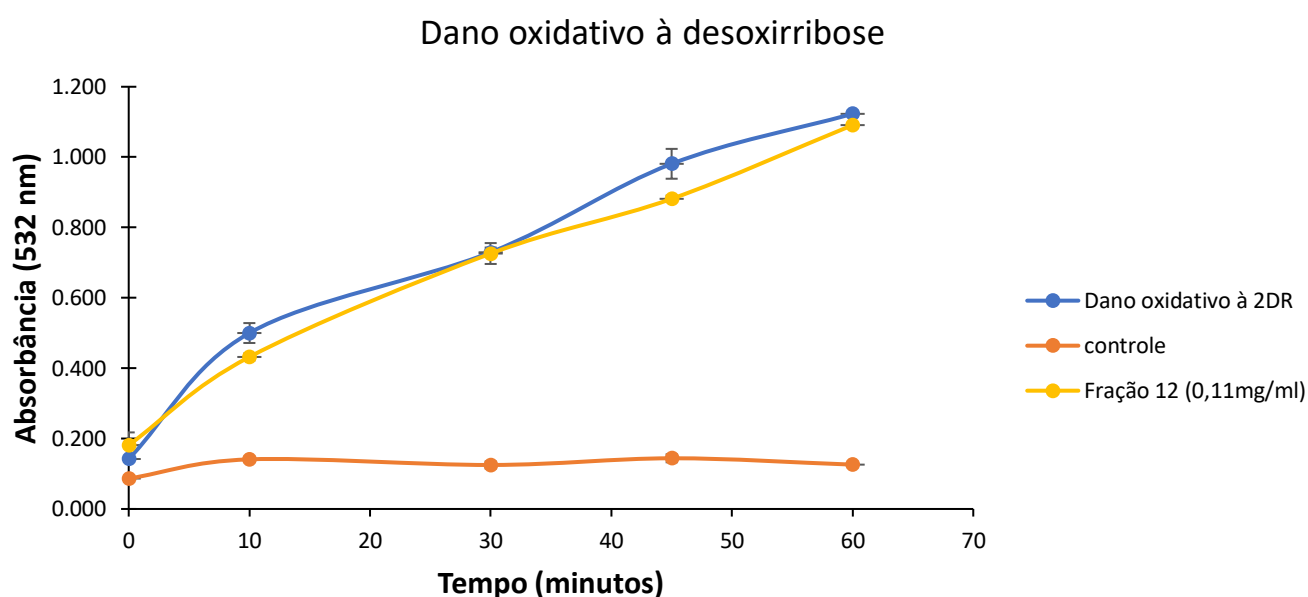
Amostra	Concentração (mg/mL)	[FeSO <sub>4</sub> ] ( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ )	[FeSO <sub>4</sub> ] ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ )
Fração 12.5	3	1,516	0,505
Fração 12.5	0,03	0,0619	0,02



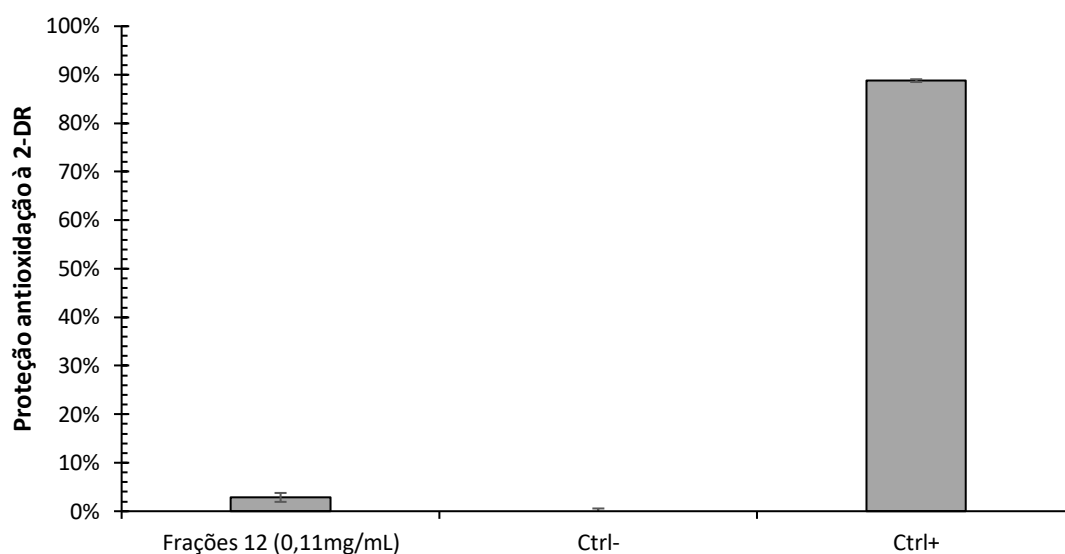
**Figura 24.** Absorvância mensurada à 593nm da concentração de sulfato ferroso, utilizando a equação da reta da curva padrão. Foi mensurado em 2 tempos, inicial em 0 minutos e final após 4 minutos. O ensaio foi feito com duas concentrações com a Fração RRM-12.5.

### 3.2.2.2. Ensaio de degradação à desoxirribose

O resultado esperado para o ensaio seria uma baixa absorbância pela incubação da amostra com o preparado, indicando atividade antioxidante. Mas não foi observado tal atividade antioxidante da Fração RRM-12.5 nesse ensaio. Numa concentração de 0,11 mg/mL obtivemos apenas 3% de proteção à degradação (Figura 25 e 26). Os dados estão representados em porcentagem a partir das médias de experimentos realizados em triplicata  $\pm$  SD (desvio padrão).



**Figura 25.** Ensaio de degradação a desoxirribose, pela incubação da Fração RRM-12.5, com a reação do ascorbato e Fe(III) em 7 tempos, onde ao final há liberação de malondialdeído (MDA) que reage com ácido tiobarbitúrico (TBA). No controle não há a incubação do ascorbato. Leitura à 532nm.

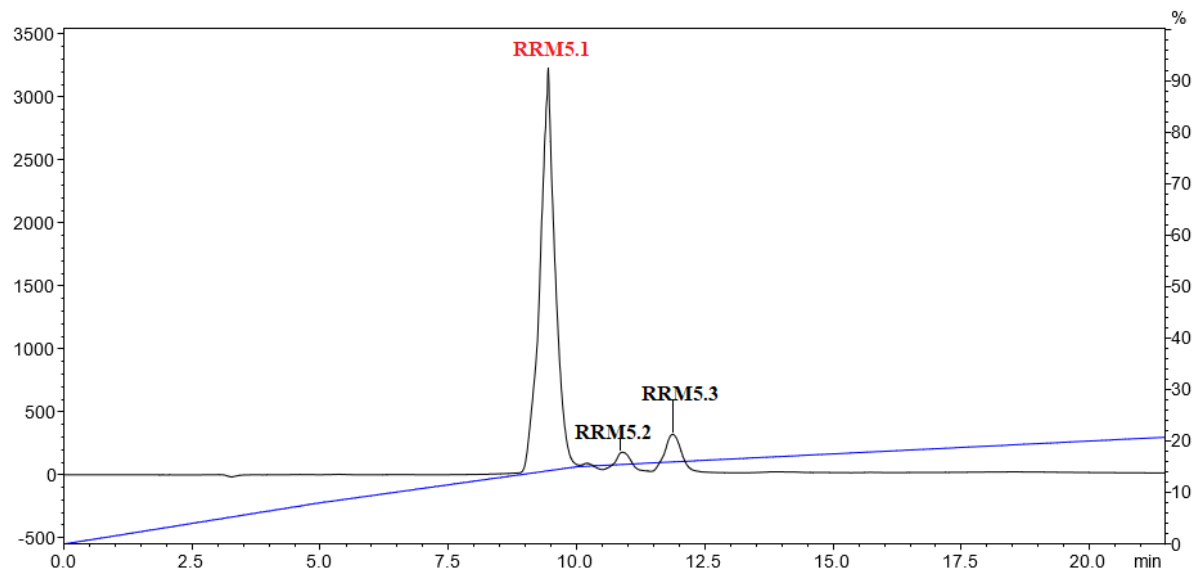


**Figura 26.** Proteção antioxidativa pelo ensaio de degradação à desoxirribose, após 60 min de incubação, utilizando a Fração RRM-12.5 da secreção de *Rhinella mirandaribeiroi* com a reação do ascorbato e Fe(III) onde ao final há liberação de malondialdeído (MDA) que reage com ácido tiobarbitúrico (TBA). No controle positivo não há a incubação do ascorbato, o controle negativo tem ascorbato. Leitura à 532nm.

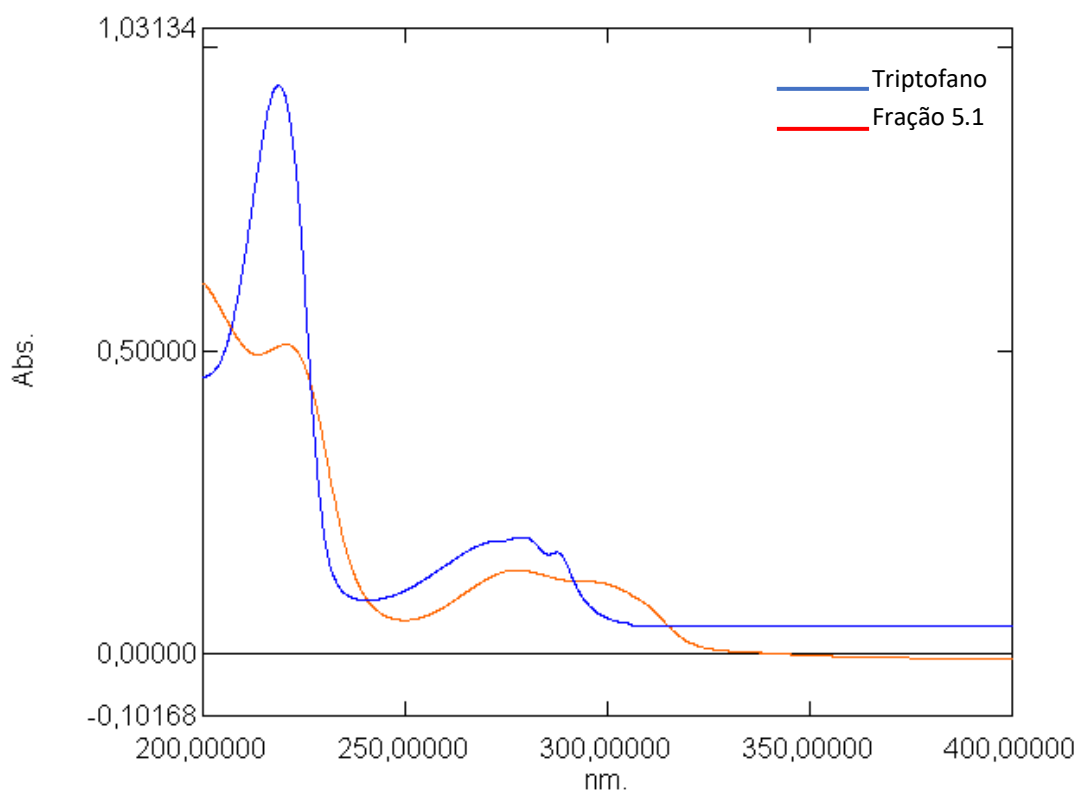
### 3.3. Fração 5

#### 3.3.1. Purificação

Para purificação do componente com atividades de interesse desse trabalho, foi realizado a recromatografia da Fração 5. Foi obtido na eluição, 3 subfrações, onde o componente de interesse se encontra na subfração RRM-5.1 em destaque (Figura 27). Posteriormente foi analisado o espectro de absorção UV (200 a 400 nm) da Fração 5 em relação ao do triptofano (Figura 28) em que os compostos obtiveram 1 pico equivalentes em 282 nm, mas em intensidade de absorbância diferente. Foi observado na Fração 5  $\lambda_{\text{máx}}$ : 222; 282 e 300nm  $\lambda_{\text{mín}}$ : 250 e 325nm. Para o triptofano  $\lambda_{\text{máx}}$ : 219; 282 e 288nm  $\lambda_{\text{mín}}$ : 240 e 302nm.



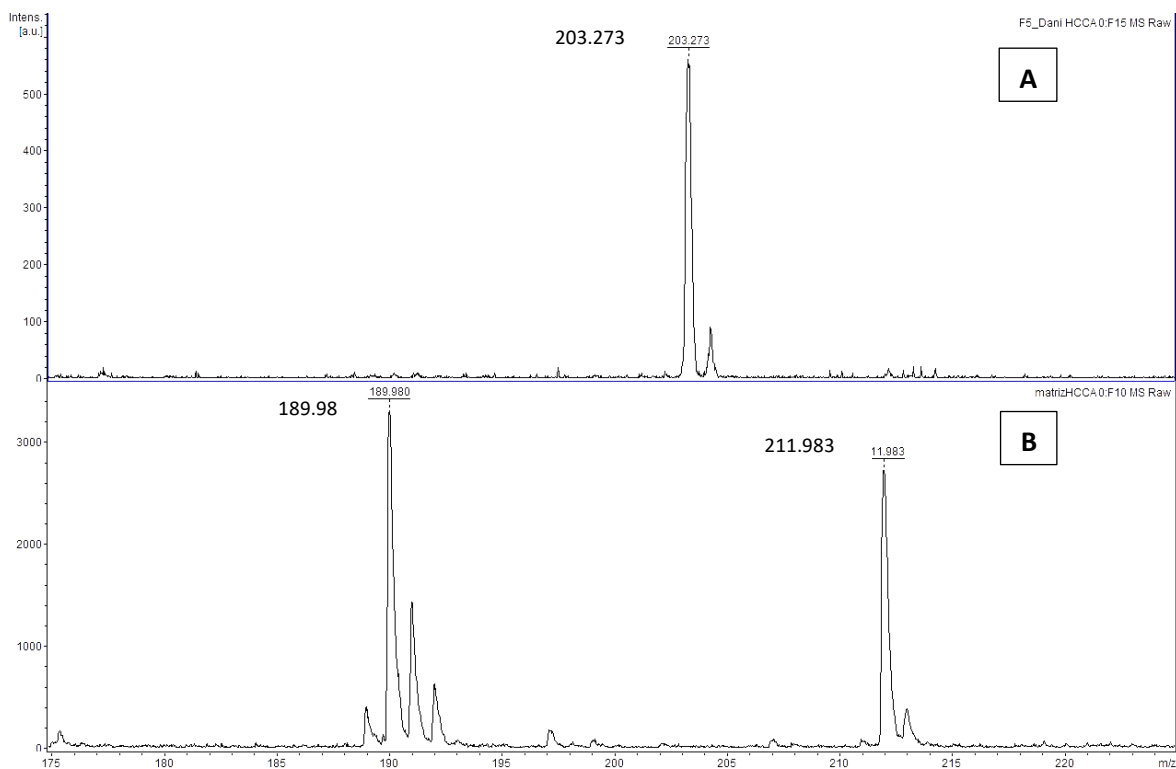
**Figura 27.** Recromatografia da Fração 5. Realizada em RP-HPLC em coluna analítica C18 de fase reversa (Vydac 218TP54) em que 3 picos eluíram (RRM-5.1, RRM-5.2, RRM-5.3). A separação cromatográfica foi monitorada em 216 nm.



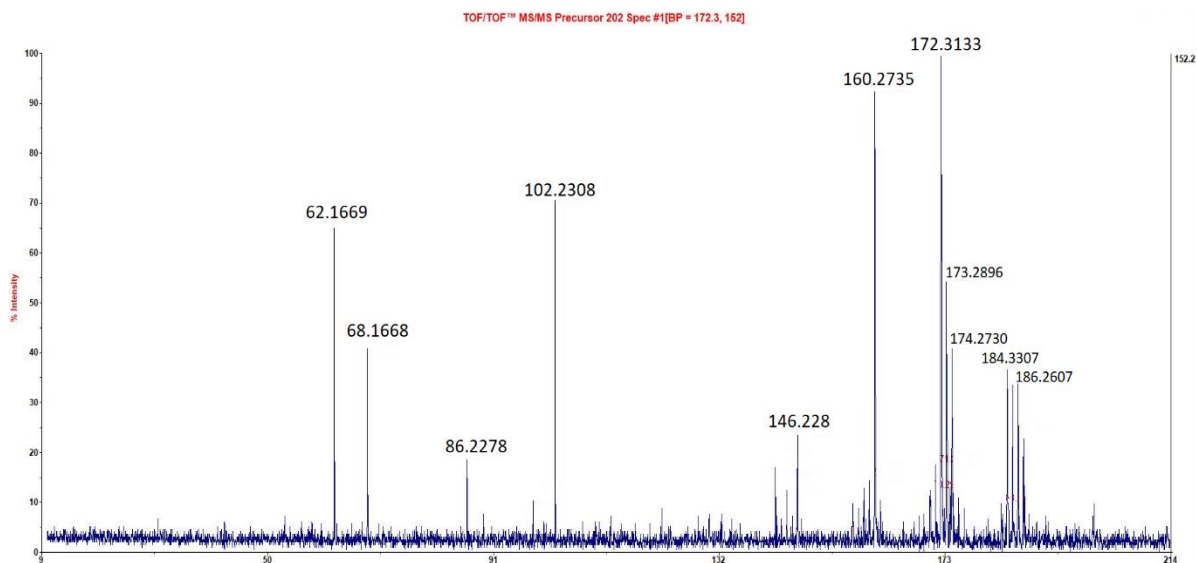
**Figura 28.** Perfil do espectro de absorção UV da Fração 5.1, identificada pela curva de cor vermelha, e do controle Triptofano (0,049 mM), identificado pela cor azul.

A Fração RRM-5.1 foi submetida à espectrometria de massa, para possível identificação e pureza, sendo observado componente de massa de 203  $m/z$  (Figura 29) e na fragmentação MS/MS do íon

encontramos os valores aproximados de 62, 68, 86, 102, 146, 160, 172, 173, 174, 184 e 186  $m/z$  (Figura 30). O fragmento de 160  $m/z$  indica fortemente a presença de um grupamento indólico, característico das indolalquilamina, derivados do triptofano, após a perda de uma alquilamina (Ren *et al.*, 2018). Sugerimos então que a Fração 5.1 seja a Dehidrobufotenina (Sinhorin *et al.*, 2020).



**Figura 29.** Espectrometria de massa da Fração RRM-5.1 [A] a massa de 203  $m/z$  da fração [B] os componentes 189.98  $[M+H]^+$  e 211.98  $[M+Na]$  da matriz utilizada (HCCA).



**Figura 30.** Espectrometria do fragmento de massa 203  $m/z$  encontrada na Fração RRM-5.1. Pode-se notar componentes encontrados em derivados triptamínicos, sendo o mais comum o de 160  $m/z$ .

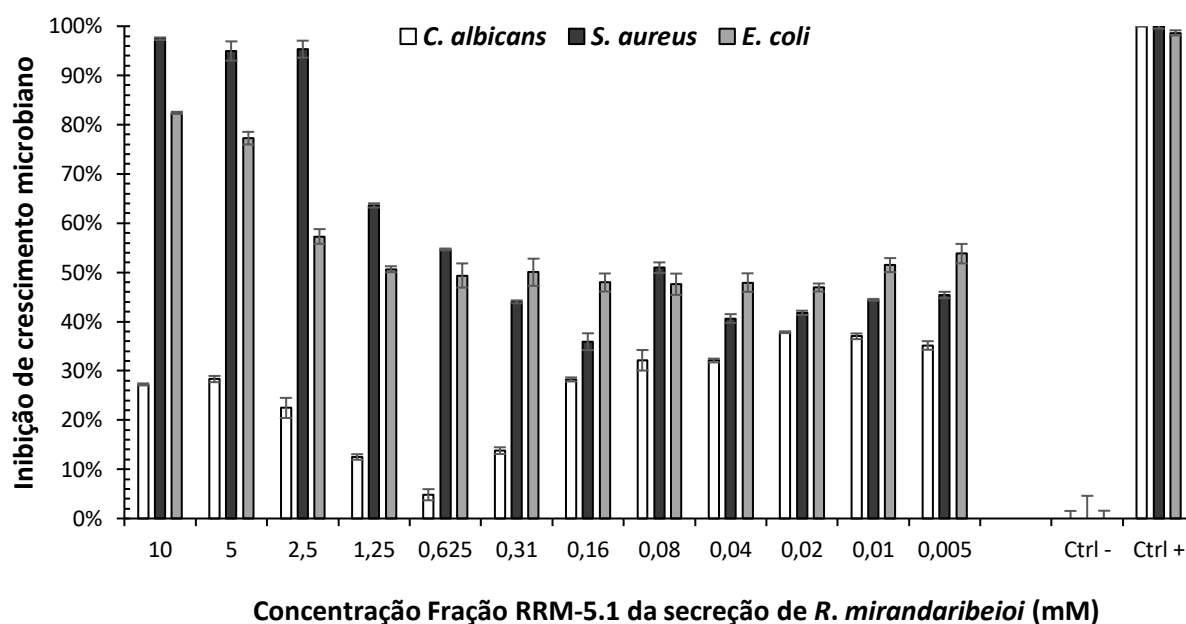
### 3.3.2. Atividade antibacteriana e antifúngica

Para o ensaio antimicrobiano utilizando a diluição seriada da Fração RRM-5.1, houve inibição do crescimento celular da bactéria *S. aureus* em quase 100% nas concentrações 2,5, 5 e 10 mM, sendo o MIC (*minimum inhibitory concentration*) de 10 mM por ter inibição do crescimento em 97%. Então começa um decaimento de acordo com as menores concentrações, sendo observado valores aproximados de 50% de inibição nas concentrações de 0,005 a 0,31 mM (Figura 31).

Para o crescimento celular da bactéria *E. coli*, houve inibição em aproximadamente 80% nas concentrações 5 e 10 mM. Os valores de inibição diminuem aos valores da concentração da Fração RRM-5.1 (0,005 a 2,5 mM), permanecendo com valores de inibição de aproximadamente 50% (Figura 31).

Para as células fúngicas de *C. albicans* a inibição foi parcial, onde o maior valor de inibição de 35% foi na menor concentração de 0,005 mM. A inibição ocorreu de forma gradual, porém invertida, com pico maior de inibição começando na menor concentração e decaindo de acordo com o aumento da concentração até 0,625 mM, onde começa a aumentar a inibição novamente em 2,5, 5 e 10 mM em aproximadamente 30% (Figura 31).





**Figura 31.** Porcentagem de inibição do crescimento celular para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, incubadas em diferentes concentrações da Fração RRM-5.1 da secreção bruta de *Rhinella mirandaribeioi*, após 24 horas. Leitura à 620nm. Os dados estão representados em porcentagem a partir das médias de experimentos realizados em triplicata  $\pm$  SD (desvio padrão).

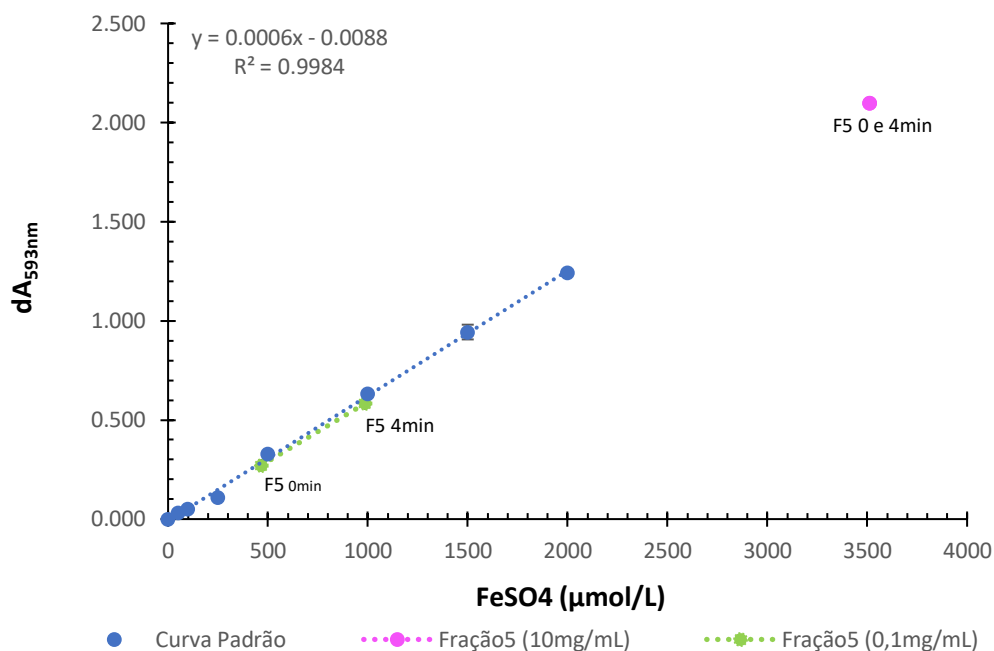
### 3.3.3. Atividade antioxidante

#### 3.3.3.1. FRAP

Foi observado atividade antioxidante da Fração RRM-5.1 pelo ensaio FRAP, observado na Tabela 9 e Figura 32. A Fração RRM-5.1 (10 mg/mL) reduziu à Fe(II) instantaneamente (abs inicial igual a abs final) e após a diluição, a Fração RRM-5.1 (0,1 mg/mL) continuou mostrando poder de redução. Para o tratamento com a Fração RRM-5.1 em 10 mg/mL a concentração de ferroso na solução final foi de 62,8  $\mu\text{M}/\text{mL}$  e 6,28  $\mu\text{M}/\text{mg}$ , ou seja, a amostra possui uma capacidade redutora por mL equivalente a 62,8  $\mu\text{mol}$  de  $\text{FeSO}_4$ . No tratamento da Fração RRM-5.1 em 0,1 mg/mL a concentração foi de 0,532  $\mu\text{M}/\text{mL}$  e 0,053  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de ferroso. Os dados estão representados em porcentagem a partir das médias de experimentos realizados em triplicata  $\pm$  SD (desvio padrão).

**Tabela 11.** Resumo dos resultados obtidos no ensaio FRAP após 4 minutos.

Amostra	Concentração (mg/mL)	[FeSO <sub>4</sub> ] (μmol/mL)	[FeSO <sub>4</sub> ] (μmol/mg)
Fração 5.1	10	62,8	6,28
Fração 5.1	0,1	0,532	0,053

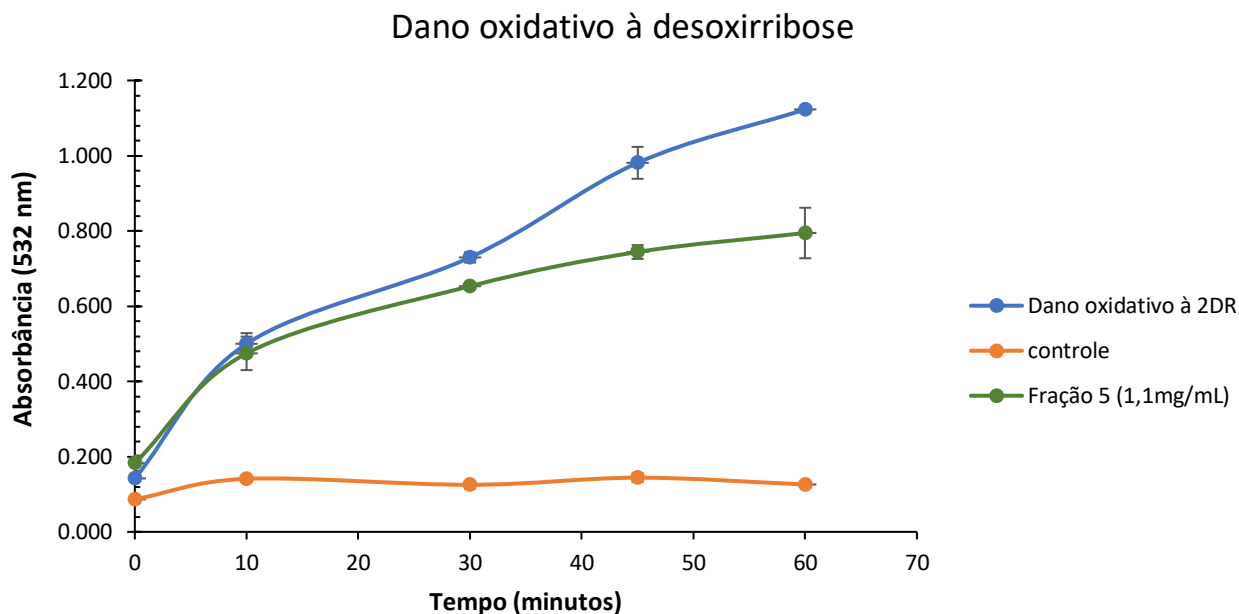


**Figura 32.** Absorbância mensurada à 593nm da concentração de sulfato ferroso, utilizando a equação da reta da curva padrão. Foi mensurado em 2 tempos, inicial em 0 minutos e final após 4 minutos. O ensaio foi feito com duas concentrações com a Fração RRM-5.1. Na concentração de 10 mg/mL os dois pontos de tempo estão sobrepostos, pois a [Fe(II)] estourou o limite de absorção da leitora instantaneamente.

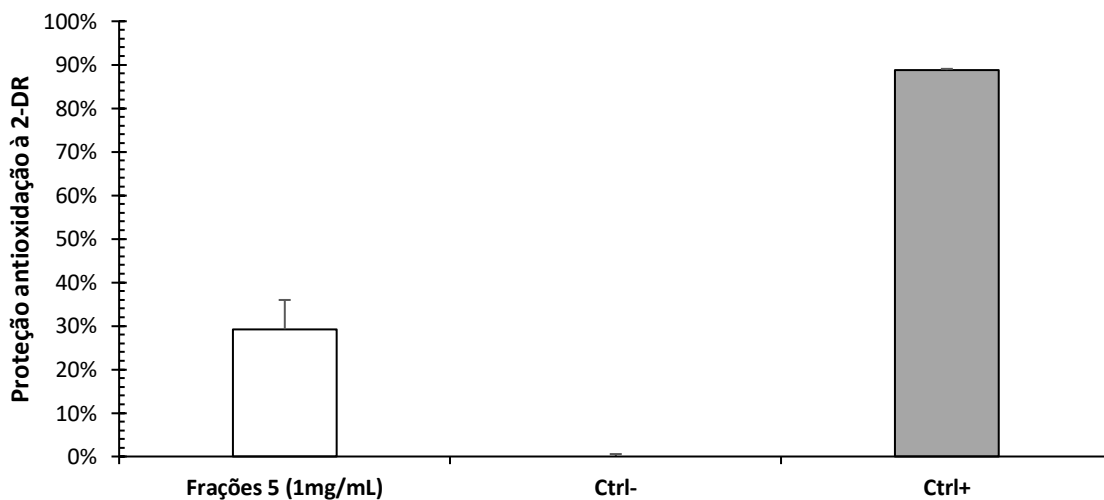
### 3.3.3.2. Proteção oxidativa à desoxirribose

Foi observado uma fraca ação antioxidante da Fração RRM-5.1, onde quase se chegou a um platô da atividade. Utilizando uma concentração final de 1,1 mg/mL, ocorreu 29% de proteção à degradação após 60 minutos, em relação ao controle Z identificado pela linha azul (0% de proteção à degradação) (Figura 33 e 34). Quanto mais baixa é a absorvância, indica uma elevada atividade antioxidante. Os dados estão

representados em porcentagem a partir das médias de experimentos realizados em triplicata  $\pm$  SD (desvio padrão).



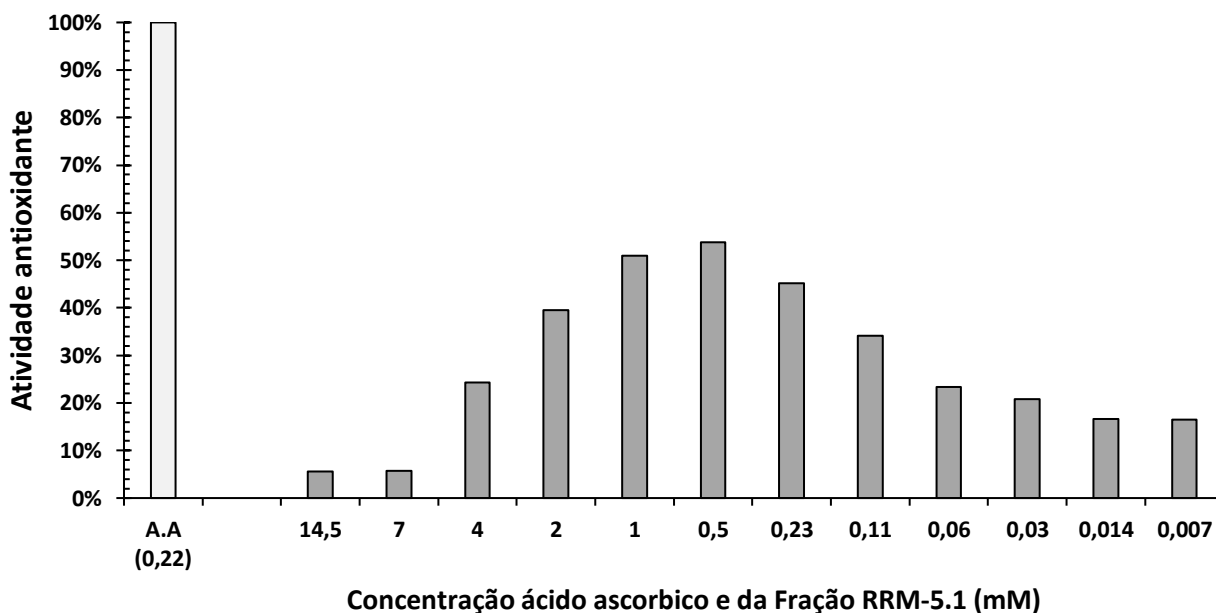
**Figura 33.** Ensaio de degradação a desoxirribose, pela incubação da Fração 5.1, com a reação do ascorbato e Fe(III) em 7 tempos, onde ao final há liberação de malondialdeído (MDA) que reage com ácido tiobarbitúrico (TBA). No controle não há a incubação do ascorbato. Leitura à 532nm.



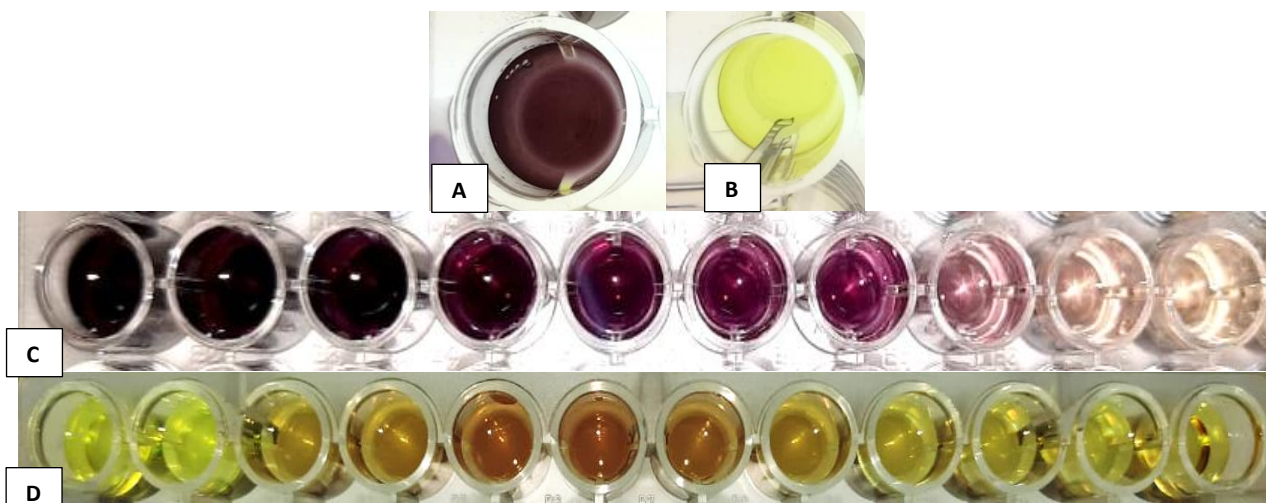
**Figura 34.** Proteção oxidativa pelo ensaio de degradação à desoxirribose, após 60 min de incubação, utilizando a Fração RRM-5.1 da secreção de *Rhinella mirandaribeiroi* com a reação do ascorbato e Fe(III) onde ao final há liberação de malondialdeído (MDA) que reage com ácido tiobarbitúrico (TBA). No controle positivo não há a incubação do ascorbato. Leitura à 532nm.

### 3.3.3.3. Redução do MTT

No ensaio de redução do MTT, é observado a ação antioxidante em todas as amostras. Na Fração RRM-5.1, foi feito o ensaio pela diluição seriada de sua concentração a partir de 14,5 mM. A maior atividade antioxidante das amostras da Fração RRM-5.1 foi na concentração de 0,5 mM (54%), sendo que na maior concentração testada (14,5 mM) houve 6% de atividade. A partir da concentração de 0,23 mM até a última concentração testada de 0,007 mM, acontece um decaimento da atividade antioxidante paralelamente ao decaimento da concentração da Fração RRM-5.1, mas que não chegou a 0% (Figura 35). Esse ensaio é colorimétrico, de forma que os resultados podem ser visualizados na Figura 36. É notável o tratamento com ácido ascórbico a intensidade da cor roxa, enquanto a Fração RRM-5.1 têm uma coloração marrom.



**Figura 35.** Atividade antioxidante pelo ensaio de redução do MTT, utilizando como controle o ácido ascórbico (0,22 mM) e a Fração RRM-5.1 que foi diluída de forma seriada de 14,5 a 0,007 mM.

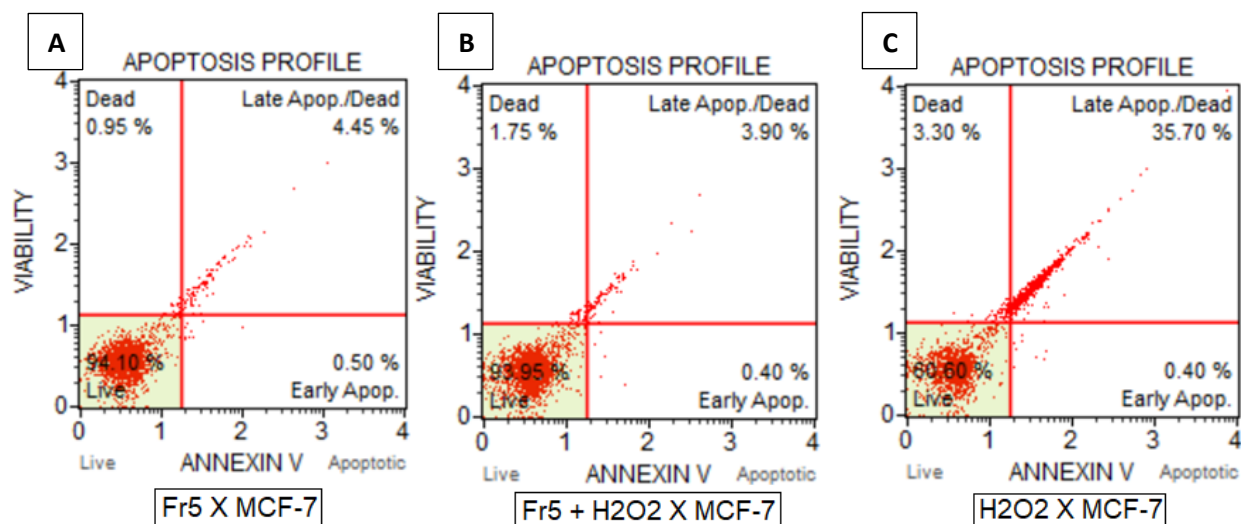


**Figura 36.** Poços da placa do ensaio antioxidante pela redução do MTT. **[A]** *Rhinella mirandaribeiroi* (11 mg/mL); **[B]** Controle negativo (MTT+DMSO, 1:1); **[C]** Ácido ascórbico fracionado (14 mM – 0,007 mM); **[D]** Fração RRM-5.1 fracionada (14,5 mM – 0,007 mM).

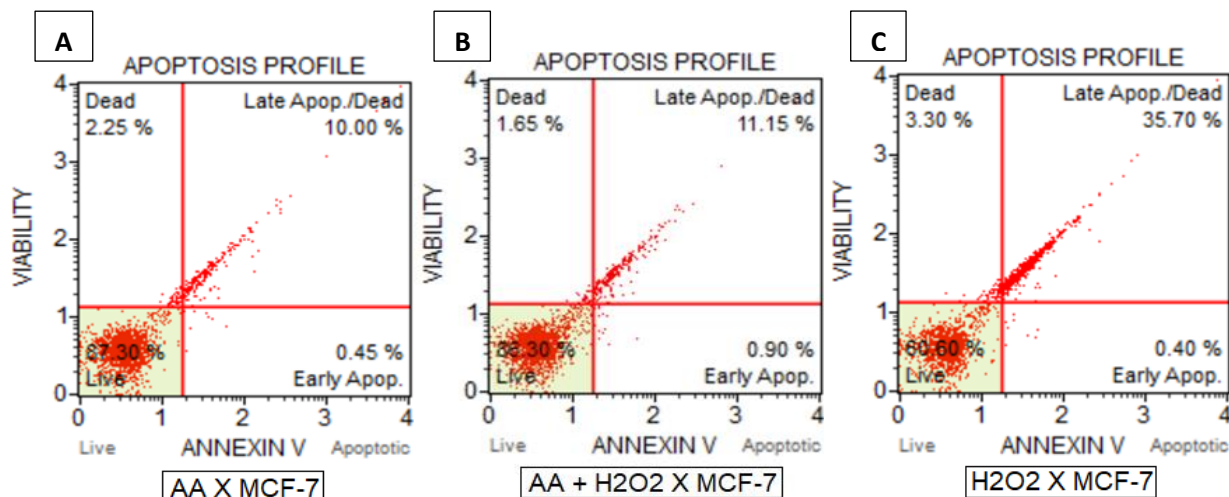
#### 3.3.3.4. Citometria de fluxo - Ensaio antiapoptótico

Neste ensaio é possível determinar a proporção de células vivas (anexina V-/PI-); células em estágio inicial de apoptose (anexina V+/PI-); células em estágio tardio de apoptose ou em necrose (colapso da membrana plasmática) (anexina V+/PI+) (Figura 40). Os compostos ascórbicos (AA) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foram usados em uma concentração subletal. Como podemos observar nas Figuras 37, 38 e 39, ignorando as células viáveis, a maior parte das células está em apoptose tardia. Os resultados de proteção com AA (0,1 mM) e Fração RRM-5.1 (FR5.1) em 14,8 mM, são similares (Figura 40), mas podemos sugerir que o AA é efetivo na proteção das células em concentrações 10 vezes menor que a fração RRM-5.1. No entanto, a fração RRM-5.1 não se mostrou tóxica para as células (vide controle somente com fração RRM-5.1 – Figura 37), diferente do AA que não pode ser usado em concentrações maiores porque matariam as células. Então, não houve dano celular, mesmo em exposição à fração RRM-5.1 e, além disso, RRM-5.1 ainda ofereceu proteção celular, pois a viabilidade se manteve mesmo após exposição ao  $H_2O_2$  (0,1  $\mu$ M) (aproximadamente 94% para ambos os tratamentos – Figura 37). Ocorrendo então uma redução da atividade apoptótica em 100%, utilizando a RRM-5.1 como proteção a oxidação proveniente do  $H_2O_2$ . O mesmo se observou para o AA, porém em menor porcentagem que a RRM-5.1, além do que sua concentração se torna tóxica (Figura

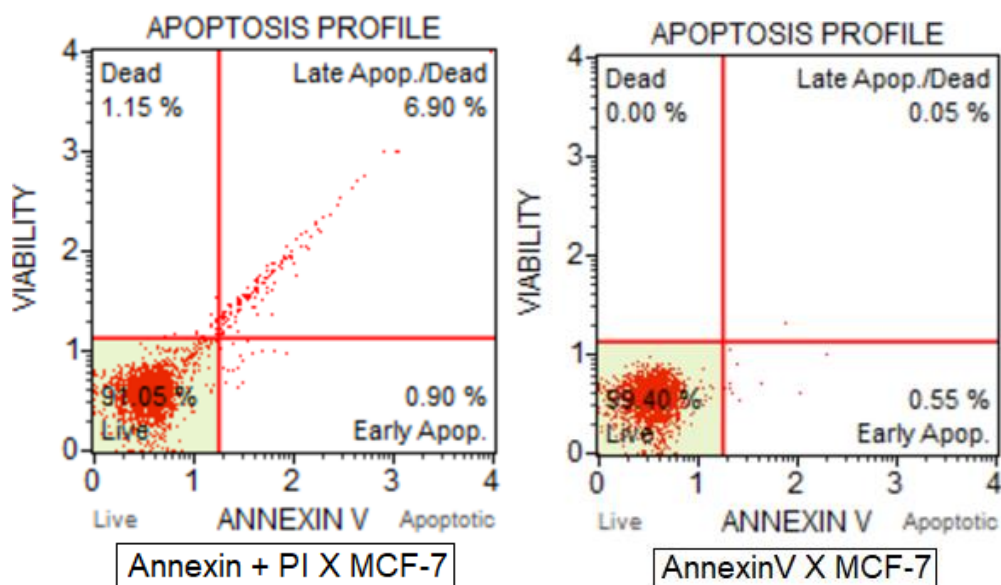
38). Como esperado, o controle com anexina + PI, a porcentagem com células viáveis diminui, pois o PI se liga às células não-viáveis que a anexina não se liga, por isso não aparecem células mortas no tratamento somente com anexina (Figura 39).



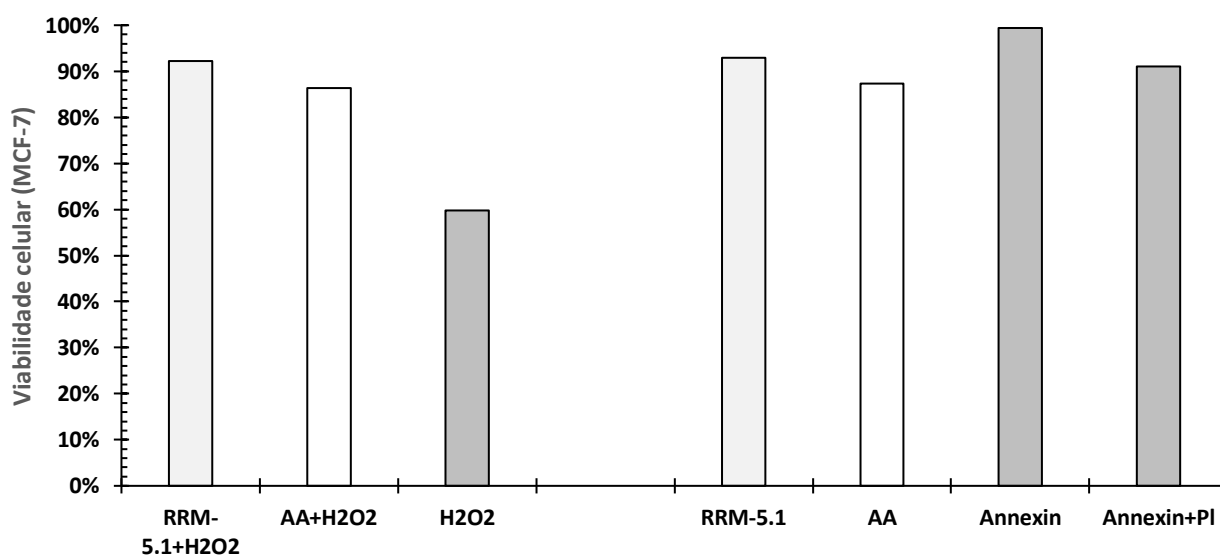
**Figura 37.** Citometria de fluxo, em tratamento com a linhagem celular MCF-7, as amostras da Fração RRM-5.1 (14,8 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 μM). **[A]** incubação da RRM-5.1 sem a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> **[B]** incubação da RRM-5.1 com a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> **[C]** controle de apoptose pela incubação somente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como agentes de marcação foi utilizado Anexina V e Iodeto de Propídeo. Em ambos tratamentos com a RRM-5.1, a porcentagem de células viáveis >90%.



**Figura 38.** Citometria de fluxo, em tratamento com a linhagem celular MCF-7, as amostras de ácido ascórbico (0,1 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 μM). **[A]** incubação da AA sem a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> **[B]** incubação da AA com a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> **[C]** controle de apoptose pela incubação somente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como agentes de marcação foi utilizado Anexina V e Iodeto de Propídeo. Em ambos tratamentos com o AA, a porcentagem de células viáveis <90%.



**Figura 39.** Citometria de fluxo em tratamento com a linhagem celular MCF-7. Como agentes de marcação e controle foi utilizado AnexinaV em associação com Iodeto de propídeo (91% de viabilidade) e AnexinaV (99% de viabilidade).



**Figura 40.** Gráfico referente ao ensaio de citometria de fluxo, feito em 7 tratamentos diferentes com a linhagem MCF-7, para as seguintes amostras: Fração RRM-5.1 em 14,8 mM, ácido ascórbico (AA) em 0,1 mM, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em 0,1  $\mu$ M e os marcadores Anexina e Iodeto de propídeo. Houve uma redução da atividade apoptótica em 100% utilizando a RRM-5.1 como um antioxidante à atividade oxidativa do  $H_2O_2$ .

# *Discussão*



---

## Secreção bruta

---

Devido à sua complexidade e diversidade, as secreções cutâneas de anuros representam uma fonte abundante de compostos bioativos. A secreção do anuro *Rhinella mirandaribeiroi*, alvo do presente trabalho, nunca havia sido estudada anteriormente. Qualitativamente, se mostrou interessante, por apresentar compostos não-peptídicos com atividades biológicas como antimicrobiano e antioxidante.

A secreção bruta apresentou atividade antiproliferativa para as linhagens B16F10, HeLa e MCF-7, apresentando um IC<sub>50</sub> de 3,2.10<sup>3</sup> µg/mL, 4,6.10<sup>3</sup> µg/mL, 5,6.10<sup>3</sup> µg/mL, respectivamente (Figura 8). Sciani *et al.* (2013) trabalhou com secreção bruta de *Rhinella jimi*, *R. crucifer*, *R. marina*, *R. schneideri*, *R. guttatus*, *R. major* e *R. margaritifera*, obtendo atividade inibitória contra as linhagens de adenocarcinoma mamário (MCF-7 e MDA) de câncer de mama com IC<sub>50</sub> variando de 40 à 50 µg/mL. De acordo com o *American National Cancer Institute* (NCI-EUA), extratos com valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 30 µg/mL são considerados promissores para estudos de purificação adicionais (Suffness & Pezzuto, 1990), que é uma quantidade muito inferior ao IC<sub>50</sub> calculado para a secreção bruta desse estudo (Figura 8). Não é interessante concentrações altas pelos possíveis efeitos secundários num sistema in vivo, como também não é interessante concentrações muito baixas, pois a faixa entre a dose ideal e letal é curta.

Ferreira *et al.* (2013) testaram frações cromatográficas da secreção de *Rhinella marina*, *Rhaebo guttatus* e observaram inibição das linhagens de leucemia (HL-60), colon (HCT-116), glioblastoma (SF-295) e ovário (OVCAR-8), com IC<sub>50</sub> de *R. marina* variando de 0,01 à 0,23 µg/mL, e da *R. guttatus* variando de 2,9 à 6,6 µg/mL. Cunha *et al.* (2010) também obtiveram inibição da viabilidade celular com frações isoladas de *R. schneideri* para as linhagens MDA-MB435 (melanoma), HCT-8 (colon), HL60 (leucemia) e SF295 (glioblastoma), com uma variação de IC<sub>50</sub> entre 0,0007 à 3,52 µM. Watabe *et al.* (1996) verificou a indução de apoptose em células de leucemia (U937) pela bufalina. Em 2015, foi reportado que a bufotionina apresenta atividade antiproliferativa sobre células de carcinoma hepatocelular humano da linhagem SMMC-7721, prolongando a fase G2/M e reduzindo a fase G0/G1 (Xie *et al.*, 2012).

Huachansu ou Cinobufacini, é uma forma injetável Ch'an Su, extrato solúvel em água estéril da pele seca de *Bufo bufo gargarizans*, usado para tratar pacientes com variados tipos de câncer em clínicas oncológicas na China e é fabricado pela Anhui Jinchan Biochemistry Company Ltd., em Huaibei, China [Chinese State Food and Drug Administration, SFDA (ISO9002)]. Encontra-se nesse extrato esteroides cardiotônicos como bufalina, resibufogenina, cinobufagina, cinobufotalina, marinobufagina e bufotalina, onde os três primeiros são os mais ativos quanto à atividade antitumoral. Contêm principalmente alcalóides indólicos como bufotenina, bufotenidina, cinobufotenina e, em maior quantidade, serotonina (Cheng *et al.*, 2019; Newman *et al.*, 2008). Zhu & Liu (2006) apontam estudos *in vitro* que demonstraram que Huachansu exerce atividade antitumoral em várias linhas celulares tumorais, especialmente carcinoma hepatocelular, câncer de pulmão e, recentemente, câncer gástrico. Também é capaz de inibir a proliferação celular e induzir apoptose. Estudos *in vivo* demonstraram sua capacidade de inibir a angiogênese do câncer (Baldo *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2013). Uma revisão feita por Gao *et al.* (2011), apresenta bufadienolídeos com atividade anticâncer, de origem vegetal e animal, abrangendo os anos de 1998 até 2010, constituindo no total 46 bufadienolídeos de bufonídeos com esta atividade. No trabalho de Zhang *et al.* (2013), foi mostrado que a arenobufagina, um dos componentes mais abundantes no veneno de bufonídeo, induz apoptose via mitocondrial, em células de carcinoma hepatocelular (HCC), com IC<sub>50</sub> de 20,24 à 7,46 nM, sendo a mais potente contra essa linhagem dentre os bufadienolídeos. No trabalho de Cruz *et al.* (1993), foi demonstrado que a arenobufagina bloqueia a bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> nos miócitos.

A atividade de inibição para os microrganismos testados foi menor que 60% (Figura 7). Utilizando 0,0049 mg/mL do extrato aquoso da secreção, foi observado atividade de inibição parcial no crescimento de células bacterianas de *Escherichia coli* (39%) e células fúngicas de *Candida albicans* (56%). Porém não houve inibição para o crescimento de células bacterianas de *Staphylococcus aureus*. Nas frações obtidas pelo fracionamento da secreção, a atividade foi mais acentuada, e isso pode acontecer visto que a secreção bruta é um complexo de compostos, que muitas vezes podem interagir entre si e cada um pode exercer uma atividade diferente, seja causando toxicidade ou não. Zhou *et al.* (2015) descreve a afinidade entre

bufadienólídeos com a albumina, ambos presentes na secreção de Bufonídeos.

Não foi constatada atividade inibitória da tripsina ou quimotripsina (Figura 9) com a secreção bruta do espécime deste trabalho (*Rhinella mirandaribeiroi*). Mas há um trabalho com a *Rhinella schneideri*, em que a telocinobufagina, que apresenta atividade bactericida e parasiticida, também mostrou atividade inibidora de protease, inibindo a ação da quimotripsina na concentração de 1 mg/mL (Shibao *et al.*, 2015). Foi observada atividade fosfolipásica utilizando o extrato aquoso da secreção bruta, resultando em um consumo de 41% da fosfatidilcolina (3 mM) após 24 h em relação ao controle positivo, onde foi utilizada a secreção de *Bothrops moojeni* (2 mg/mL) (Figura 10). Foi observado 100% de atividade antioxidante pelo ensaio de redução de ferricianeto de potássio (0,1%) em relação ao controle positivo (ascorbato – 1 mg/mL), utilizando 10 mg/mL da secreção bruta de *R. mirandaribeiroi* (Figura 11). Kyriachenko *et al.* (2020) mostraram atividade antioxidante da secreção bruta de seis anfíbios (*Bombina bombina*, *Bombina variegata*, *Bufo viridis*, *Rana temporaria*, *Pelophylax ridibundus* e *Pelobates fuscus*) por meio de ensaios de eliminação de radicais livres DPPH, óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e poder redutor.

Na análise do perfil cromatográfico da secreção do anuro *Rhinella mirandaribeiroi*, foram eluídas em torno de 24 frações em coluna C<sub>18</sub> (Figura 12). De forma interessante, as frações cromatográfica, ao contrário da secreção bruta, apresentaram atividade contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (Figuras 13, 14 e 15). Como apresentado na Tabela 7, vemos 20 frações distintas com atividade em mais de 50% de ação antimicrobiana. Sendo as frações 1, 5 e 11 com maior atividade (98%, 93% e 96%, respectivamente) de inibição do crescimento de *Escherichia coli* (Figura 13). As frações 1, 5, 10 e 11 com maior atividade (97%, 94%, 93% e 98%) de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* (Figura 14). Já no ensaio de inibição de crescimento de *Candida albicans* (Figura 15), constatamos atividade aproximadamente maior que 90% em 13 frações (1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 17 e 23), sendo de 99% na Fração 14. Há estudos com alcalóides de anfíbios, samandarona e samandarina, que inibem o crescimento de microrganismos. Como também para as aminas biogênicas, espinacaemina e bufotenina, isoladas de

*Leptodactylus pentadactylus* e *Bufo*, que inibem crescimento de bactérias Gram-negativas e positivas, além de fungos (Preusser, 1975; Habermehl & Preusser, 1970; Habermehl & Preusser, 1969).

---

### Frações de interesse

---

Destacamos a Fração 22, pois, foi possível constatar a atividade fosfolipásica da sua subfração RRM-22.6 (Figuras 20). A subfração RRM-22.6 possui razão massa carga ( $m/z$ ) de 14 kDa (Figura 19), compatível com o tamanho monomérico de PLA<sub>2</sub> de peçonhas encontradas em abelhas, vespas, serpentes, aranhas e escorpiões (Spolaore *et al.*, 2019; Saikia & Mukherjee, 2017; Estrada-Gomez *et al.*, 2015; Costa & Palma, 1999). A Fração obteve atividade biológica inibitória de crescimento contra células de *E. coli* em 29%, *S. aureus* em 36% e sendo mais efetiva contra *C. albicans* em 61% (Figuras 13 a 15). Não se sabe ainda qual seria a função desta enzima na secreção dos anfíbio, se teria o mesmo papel da PLA<sub>2</sub> de peçonhas que tem como alvo as presas (neurotoxicidade, mionecrose, cardiotoxicidade, hemólise, alteração na coagulação, hipotensão, edema) (Spolaore *et al.*, 2019) ou não, visto que a PLA<sub>2</sub> do anuro foi isolada da glândula parotoide da *Rhinella*, que é uma glândula com a função principalmente de defesa contra predadores. Em um recente estudo realizado por Shibao *et al.* (2018) foi encontrado PLA<sub>2</sub> na secreção do sapo cururu *Rhinella schneideri*, similar a da cascavel *Crotalus durissus terrificus*. O grupo sugere que essa enzima tenha função de proteção no veneno do sapo.

Destacamos a Fração RRM-12.5, que inibiu parcialmente células bacterianas, próximo a 50% (Figuras 13 e 14) e mais de 80% células fúngicas (Figura 15), além de possuir certa atividade antioxidante (Figuras 17, 24 e Tabela 8). Sugerimos que a Fração RRM-12.5 faça parte da família dos bufadienolídeos, um esteroide, uma vez que apresenta caráter hidrofóbico pelo perfil cromatográfico (Figura 12), e pelo espectro de absorção UV (200 a 400nm), onde observamos  $\lambda_{\text{máx}}$ : 297nm e  $\lambda_{\text{mín}}$ : 247nm (Figura 23), que são

características encontradas nos esteroides em *Bufos*, como vemos no trabalho de Barnhart *et al.* (2017), em que mostram a absorvância UV dos bufadienólídeos arenobufagina (417 *m/z* e 297 nm), gamabufotalina (403 *m/z* e 301 nm) e telocinobufagina (403 *m/z* e 300 nm). Além disso, na fragmentação deste composto foi observado um íon de baixa massa de 415 *m/z* (Figura 22), e por isso sugerimos que se trate de uma bufotalinina ou 19-oxo-desacetylcinobufagina, por ambas apresentarem um íon de 415 *m/z* quando fragmentadas e absorção do cromóforo metanol a 295 nm (He *et al.*, 2019; Suárez *et al.*, 2018; Córdova *et al.*, 2016; Kerkhoff *et al.*, 2016; Córdova *et al.*, 2016; Ye & Guo, 2005; Nogawa *et al.* 2001). Cunha *et al.* (2005) mostrou que os bufadienólídeos telecinobufagina e marinobufagina, isolado da secreção de *Bufo rubescens*, inibem o crescimento de *E. coli* (64 e 16 µg/mL, respectivamente) e *S. aureus* (128 µg/mL). Foi constatado também que estes compostos lisam células de fungos (Preusser *et al.*, 1975). No entanto, o mecanismo de ação antimicrobiana destes compostos ainda é desconhecido. Taniguchi & Kubo (1993) sugeriram que um bufadienolideo da planta *Bersama abyssinica* apresenta atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*. Kamano *et al.* (1988) descreveram inibição de Rhinovirus por 14β-hidroxi bufadienolideo do sapo *Bufo japonicus formosus*. Na tese de doutorado de Freitas (2003), foi descrita a inibição de *S. aureus* e *E. coli* da hellebrigenina, telecinobufagina e bufalina, isoladas da pele de *Rhinella schneideri*.

Destacamos, sobretudo, a Fração RRM-5.1 que nos *screenings* de atividade inibiu em mais de 90% crescimento de células bacterianas (Figuras 13 e 14) e em 80% o crescimento de células fúngicas (Figura 15). Para investigar a inibição de viabilidade celular animal, ao se constatar a atividade da RRM-5.1 e do AA como redutores do MTT (Figura 36), que é o mesmo reagente utilizado para analisar viabilidade celular, no qual é pela observação da absorvância do MTT que se constata se as células estariam viáveis. Inferimos que não seria possível analisar a atividade de viabilidade pelo ensaio de MTT, pois mudaria de cor pela redução do MTT, independente da viabilidade das células. Então foi realizado ensaio de citometria de fluxo para avaliação da inibição da viabilidade de MCF-7 pela RRM-5.1. Observamos que a Fração RRM-5.1 (3 mg/mL) não foi

tóxica às células, tendo inclusive uma ação de proteção por antioxidação, pois a viabilidade se manteve mesmo com a adição do peróxido de hidrogênio (0,1  $\mu\text{M}$ ) (Figura 37 e 40), um ROS tóxico associado ao dano celular que pode ativar tanto vias extrínsecas como intrínsecas de apoptose (Paravicini & Touyz, 2008). Nos estudos de Lee *et al.* (2003) e Benson *et al.* (2015) foram realizados testes parecidos, mas utilizando extratos de plantas. Ambos incubaram suas amostras, que possuíam atividade antioxidante, com células de fibroblasto, e então foi adicionado  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Os dois estudos apontaram proteção de compostos antioxidantes contra a apoptose induzida por  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Sugerimos que a Fração RRM-5.1 seja uma indolquilamina, visto seu caráter hidrofílico no perfil cromatográfico (Figura 12) e o seu espectro de absorção UV na faixa de 200 a 400 nm, onde observamos  $\lambda_{\text{máx}}$ : 222; 282 e 300 nm e  $\lambda_{\text{mín}}$ : 250 e 325 nm (Figura 28), transparecendo um perfil característico de indolquilaminas. Como Ferreira (1971) apresentou, o cromóforo para essas absorbâncias seria um grupamento Indol, que é o mais frequente encontrado, geralmente com  $\lambda_{\text{máx}}$ : 225 e 280-292nm. Um exemplo é a Bufotenina com  $\lambda_{\text{máx}}$ : 223,277 e 300 nm. E Ghosal *et al.* (1969) que indicou  $\lambda_{\text{máx}}$ : 218-220 nm e 285 nm, da dehidrobufotenina. Também observamos um íon de baixa massa de 203  $m/z$  (Figura 29) e, através do perfil de fragmentação, o fragmento de massa de 160  $m/z$  (Figuras 30), característico de indolquilaminas após a perda de uma alquilamina (Ren *et al.*, 2018). Sugerimos ainda ser uma dehidrobufotenina, pois, no estudo de Maciel *et al.* (2003), onde analisaram a secreção de 7 espécies de bufonídeos do gênero *Rhinella*, sendo observada entre as indolquilaminas identificadas uma dehidrobufotenina, onde constataram por espectrometria a massa de 188 e 202,9  $m/z$ . Zhang *et al.* (2018) analisaram compostos hidrofílicos oriundos da secreção de anuros, uma delas a dehidrobufotenina com 203  $m/z$  e fragmentos de 188, 174, 162 e 160  $m/z$ . Os fragmentos de 184 e 186  $m/z$  podem indicar a perda de um grupo  $\text{CH}_3$ , que posteriormente se dissocia ao 173 e 160  $m/z$  (Monção-Filho *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2021; Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2021). Em recente trabalho de Banfi *et al.* (2021) com compostos isolados da secreção de *Rhinella marina*, foi mostrada a propriedade físico-química da dehidrobufotenina observaram que esse composto possui atividade antimálica e ausência de citotoxicidade para células de fibroblastos

pulmonares. Mailho-Fontana *et al.* (2020) mostraram em seu trabalho a distribuição da dehidrobufotenina na glândula parotoide de *Rhinella marina*, onde revelaram ser a de maior abundância dentre os compostos e são armazenados por toda a extensão interna das glândulas desta macroglândula.

Tanto a secreção cutânea bruta, quanto as frações 5 e 12, apresentaram atividade antioxidante (Figuras 11 e 17). Foi observado pelo *screening* de redução  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  em  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ , onde de todas as frações analisadas, apenas as frações 5 e 12 apresentaram atividade redutora, sendo a atividade da Fração 5 se igualando ao ácido ascórbico com 100% de atividade. Já a Fração 12 apresentou 50% de atividade (Figura 17). Também constatamos a atividade redutora das frações RRM-5.1 e RRM-12.5 pelo ensaio FRAP pois, obtivemos absorvâncias de 0,655 para a Fração 5.1 em 0,1 mg/mL e 2,1 (número incerto por ter estourado o máximo da leitora) na concentração de 10 mg/mL. O mesmo se observa para a Fração 12 em 3 mg/mL que teve absorvância de 1,5 após os 4 minutos (Figura 24). Um outro valor observado é o da quantificação de sulfato ferroso por grama de amostra. Nós obtivemos 6,28  $\mu\text{M}/\text{mg}$  na Fração 5.1 (10 mg/mL) e 0,50  $\mu\text{M}/\text{mg}$  na Fração 12 (3 mg/mL) (Tabela 8 e 9). Portanto as amostras possuem uma capacidade redutora por mg equivalente a, respectivamente, 6,28 e 0,5  $\mu\text{mol}$  de  $\text{FeSO}_4$ . No trabalho de Benzie *et al.* (1996), onde é feito FRAP com os antioxidantes presentes no plasma sanguíneo em [100  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ] (bilirrubina, ácido ascórbico, ácido úrico, vitamina E e albumina), a maior absorvância de todos esses compostos testados, após 4 minutos de incubação, foi de aproximadamente 0,450 pela bilirrubina. No artigo de Heś (2019), há uma tabela de valores mostrando os resultados do ensaio FRAP realizado por eles, e observamos que um desses valores, utilizando como amostra extrato da folha de *Aloe vera* em metanol, obtiveram absorvância de 0,6 a 0,8. Apesar das propriedades antioxidantes de bufadienolideos serem consideradas fracas, pela hidrofobicidade e pouco grupo hidroxil, esses compostos podem ser glicosilados e modificados por vários substitutos, servindo de base para o desenvolvimento de derivados, aprimorando suas habilidades antioxidantes e toxicidade reduzida (Kolodziejczyk-Czepas & Stochmal, 2017).

Já no ensaio de degradação à 2-DR, a curva da Fração RRM-5.1 ficou um pouco abaixo da curva controle que indica degradação, sendo os pontos finais de absorbância (532 nm) após 60 min de incubação da Fração RRM-5.1 igual a 0,790, 29% de proteção antioxidativa numa concentração de 1,1 mg/mL (5,4 mM) e a controle de dano 1,100 (0% de proteção) (Figura 33 e 34). No artigo de Kim *et al.* (2001) foi feito um ensaio de peroxidação lipídica causado por radiação-X e mensurado pela concentração de MDA final. O grupo obteve atividade de 44%, utilizando como antioxidante a melatonina ( $10^{-5}$ M). O grupo ainda mostra que a melatonina protegeu células de fibroblastos epiteliais contra a radiação-X.

Substâncias que apresentem ação pró-oxidante podem reduzir o  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$  e, assim, permitem a reação de Fenton, a qual culminará na produção do radical hidroxil  $\bullet OH$  e, conseqüentemente, degradação da 2-deoxirribose. Se a Fração RRM-5.1 tem poder de reduzir o Fe-III em Fe-II nos ensaios anteriormente citados (FRAP e redução do ferricianeto), o composto pode agir de forma parecida ao ascorbato nessa reação da 2-DR, como um pró-oxidante ao mesmo tempo que age como antioxidante, e por isso a atividade foi mais baixa que os ensaios simples de redução (Liebler & Reed, 1997). *In vivo* os metais encontram-se indisponíveis, complexados nas proteínas. No entanto, em situações patológicas em que a quantidade de ferro e/ou cobre livre se encontra elevada, a atividade pró-oxidante pode ser relevante (Herbert *et al.*, 1999; Halliwell, 1996).

No ensaio de redução do MTT – diferente do controle utilizado com o ácido ascórbico, que quanto maior a concentração, maior a absorbância – a Fração RRM-5.1 possui um perfil de histograma simétrico, onde, quanto maior a concentração, menor é a absorbância, até chegar na concentração 0,5 mM, que foi o ponto máximo, resultando na atividade antioxidante em 54%. Após esse ponto, quanto menor a concentração, menor foi a absorbância (Figura 35), perfil que pode ser observado na placa de múltiplos poços, utilizada no ensaio (Figura 36). A razão pela atividade antioxidante da Fração RRM-5.1 isolada ser menor que a secreção bruta, poderia ser efeito de sinergismo entre compostos atenuantes da ação antioxidante.

Azouzi *et al.* (2017) e Sarikaya & Gulcin (2013), demonstraram o papel antioxidante da serotonina, uma indolquilamina. Azouzi *et al.* (2017) mostrou que a serotonina é o antioxidante mais potente contra a



peroxidação lipídica. Um composto bem conhecido, que possui como uma de suas atividades a ação antioxidante, atuando direta ou indiretamente, sintetizando outros antioxidantes como a glutathione peroxidase, e que protege o organismo do estresse oxidativo a nível molecular, celular e tecidual, agindo na recuperação de células epiteliais expostas a radiação ultravioleta, é a melatonina. É uma substância endógena, sintetizada a partir do triptofano, pertencente ao grupo das indolaminas, faz parte do grupo LMWA e, provavelmente seu mecanismo de ação inclui inibição da peroxidação lipídica, sequestro de radicais livres e desidrogenação do grupamento -NH (Guaratini *et al.*, 2007; Slominski *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2002). Então sugerimos que uma das formas de ação antioxidante da Fração RRM-5.1 pode ser análogo ao da melatonina e serotonina, por serem compostos similares estruturalmente, possuindo o triptofano como mesmo precursor. No presente trabalho, foi utilizado ensaios que se baseiam no mecanismo redutor do antioxidante, e considerando que a dehidrobufotenina possua 2 moléculas de hidrogênio disponíveis para doação (PubChem, 2021), essa pode ser a forma pela qual sua atividade ocorra, por desidrogenação do grupamento -NH ou -OH (Figura 2).

Um dos fatores determinantes para a atividade antioxidante de substâncias naturais é a sua solubilidade. Por exemplo, substâncias polares (hidrofílicas) são mais efetivas em grandes quantidades de óleo porque podem se acumular na interface ar-óleo ou dentro de micelas reversas, onde as reações de oxidação lipídica ocorrem com maior frequência devido à alta concentração de oxigênio. Em contraste, antioxidantes não polares (hidrofóbicas) são mais efetivos em emulsões porque são retidos nas gotículas de óleo e/ou acumulados na interface óleo-água, onde ocorre a interação entre os hidroperóxidos das gotículas e substâncias pró-oxidantes. Essa tendência de antioxidantes lipofílicos terem melhor eficiência em grande concentração de água, enquanto antioxidantes polares são mais efetivos em óleo, tem sido denominada como "paradoxo antioxidante" (Alves *et. al*, 2010).

Comparados com outros vertebrados, os anfíbios enfrentam mais lesões de origem não-biológica por causa da pele frágil e lesão por ERO pode ser uma das mais inevitáveis. É essencial que os radicais nas peles

de anfíbios possam ser eliminados rapidamente. Existem estudos feitos sobre a atividade antioxidante de compostos da pele de anfíbios, porém, a maior parte desses trabalhos é sobre peptídeos. Como apresentado resumidamente na Tabela 2 da introdução, vemos o trabalho feito por Yang *et al.* (2009), em que analisaram a secreção de *Rana pleuraden* e foram encontrados antioxidantes peptídicos, alguns podendo exercer também atividade antimicrobiana. Liu *et al.* (2010) analisou a secreção do anuro *Odorrana livida*, identificando a antioxidin-RL, com atividade antioxidante. Eles sugerem, pelo teste de ressonância magnética nuclear, que a Cys10 é responsável pela função rápida de eliminação de radicais e as tirosinas participam da ligação da antioxidina-RL aos radicais. De acordo com os ensaios de Guo *et al.* (2014) utilizando as espécies de anfíbios asiáticos *Hylarana taipehensis*, *Amolops lifanensis* e *Amolops granulatus*, demonstraram que peptídeos antioxidantes e peptídeos antimicrobianos possuem precursores semelhantes, indicando uma estreita relação evolutiva. É sugerido pelo grupo que a presença dos resíduos de aminoácidos prolina, metionina, cisteína, tirosina ou triptofano podem contribuir para a função antioxidante nos peptídeos. Wang *et al.* (2017) identificaram 50 novos peptídeos com capacidade antioxidante e/ou antimicrobiana de quatro espécies de anfíbios: *Amolops daiyunensis*, *Pelophylax hubeiensis*, *Hylarana maosuoensis* e *Nanorana pleskei*. No estudo de Barbosa *et al.* (2018) foi identificado o peptídeo antioxidante antioxidin-I que está presente na secreção cutânea de 4 anuros tropicais (*Phyllomedusa nattereri*, *Phyllomedusa tarsius*, *Phyllomedusa distincta* e *Pithecopus rohdei*). O trabalho mais recente, feito por Plácido *et al.* (2020), apresenta uma salamandrina-I, o primeiro peptídeo com potencial antioxidante encontrado na ordem de *Urodela*, gênero *Salamandra*, especificamente a *Salamandra salamandra*. Esse peptídeo apresentou baixa toxicidade utilizando modelos *in silico*, *in vitro*, *in vivo* e não mostrou atividade antibacteriana. Kolodziejczyk-Czepas *et al.* (2016), fez o primeiro trabalho analisando a atividade antioxidante de um bufadienolídeo da planta *Kalanchoe daigremontiana*, tendo uma atividade antioxidante de EC<sub>50</sub> 21,80 µg/mL no ensaio com o radical DPPH e não apresentou citotoxicidade plaquetária.

E assim, como todos esses trabalhos citados, pudemos detectar atividade antioxidante, bem como inibição de crescimento microbiano, utilizando somente a Fração RRM-5.1, em diferentes concentrações

(Figura 31). A Fração RRM-5.1 foi mais eficiente na inibição de *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva) sucedendo o valor de 97% de inibição na concentração de 10 mM e 95% nas concentrações de 5 e 2,5 mM. Na menor concentração testada (0,005mM) a inibição foi de 45%. Para a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, a Fração RRM-5.1 inibiu em 82% na maior concentração (10mM) e 54% na menor (0,005mM). Para células fúngicas de *Candida albicans*, diferente dos outros organismos, o maior valor de inibição (35%) ocorreu na menor concentração testada (0,005mM), não sendo esse um valor eficiente para inibição.

# *Conclusão*

---

### Secreção cutânea de *Rhinella mirandaribeiroi*

---

- Com 4,9 µg/mL, há atividade de inibição parcial no crescimento de células bacterianas de *Escherichia coli* (39%)
- Com 4,9 µg/mL, há atividade de inibição de células fúngicas de *Candida albicans* (56%).
- Não foi observada inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* nas condições testadas.
- $IC_{50}$  das linhagens de células neoplásicas igual a: 3,2 mg/mL em melanoma murino B16F10, 4,6 mg/mL em adenocarcinoma de cérvix HeLa e 5,6 mg/mL em adenocarcinoma mamário MCF-7.
- Não houve inibição das serino proteases tripsina e quimotripsina nas condições testadas.
- Com 5 mg/mL, há atividade fosfolipásica (41%).
- Com 10 mg/mL, há 100% de atividade antioxidante no ensaio de redução do ferricianeto de potássio.
- Eluição de 24 frações cromatográficas utilizando o método deste estudo.
- Considerando uma inibição de aproximadamente  $\geq 90\%$ , obtivemos 4 frações que inibiram células bacterianas e 13 frações que inibiram células fúngicas.
- Sua subfração RRM-22.6 é uma fosfolipase  $A_2$  de aproximadamente 14 KDa.

---

### Fração 12

---

- Sugerimos que a subfração RRM-12.5 é um esteroide bufadienolídeo de massa 415  $m/z$ . Possivelmente uma bufotalinina ou 19-oxo-desacetylcinobufagina.
- Inibiu parcialmente o crescimento de células bacterianas *E. coli* (38%).
- Inibiu parcialmente o crescimento de células bacterianas *S. aureus* (50%).
- Inibiu o crescimento de células fúngicas *C. albicans* (80%).

- Atividade antioxidante de 50% no ensaio de redução do ferricianeto e no ensaio FRAP foi detectado a formação do complexo reduzido Fe(II)-TPTZ na solução, utilizando 0,1 mg/mL (0,22 mM) da fração.

---

### Fração 5

---

- Sugerimos que a subfração RRM-5.1 é uma amina biogênica, indolquilamina, especificamente uma dehidrobufotenina de 203 *m/z*;
- Há inibição do crescimento celular da bactéria *S. aureus* em 97% em 10 mM;
- Há inibição do crescimento celular da *E. coli* em 82% em 10 mM;
- Há inibição parcial de células fúngicas (*C. albicans*) onde, o maior valor de inibição de 35% foi na menor concentração testada de 5  $\mu$ M;
- Tem alta performance redutora antioxidante no ensaio FRAP, onde foi detectado a formação instantânea do complexo reduzido Fe(II)-TPTZ na solução;
- Atividade antioxidante de 100% no ensaio de redução do ferricianeto;
- Ação antioxidante no ensaio de degradação a desoxirribose, no qual ocorreu 29% de proteção à degradação;
- Há atividade antioxidante parcial de 54% no ensaio de redução do MTT com 0,5 mM;
- Manteve a integridade das células de MCF-7, permanecendo viáveis;
- Teve ação protetora às células de MCF-7 contra a atividade oxidativa apoptótica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## *Perspectivas futuras*

- Ensaio de inibição de proteases com outras serino proteases e pelo *screening* das frações cromatográficas;
- Ensaio de viabilidade celular com as frações cromatográficas;
- Explorar a atividade antifúngica em mais detalhes, principalmente nas frações 8, 14, 15 e 17 que inibiram o crescimento de *Candida albicans* em quase 100%;
- Explorar atividade antimicrobiana das frações 1 e 11 que inibiram o crescimento dos 3 microrganismos testados em mais de 90%;
- Ensaio antiviral e antiparasitário com as frações cromatográficas;
- Realizar outros ensaios antioxidantes que explorem outros mecanismos de ação antioxidativa;
- Sequenciamento do C-terminal da Fração 22.6 para identificação;
- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear da Fração 5.1 e Fração 12.5 para a análise estrutural.

# *Bibliografia*



AKIZAWA, T.; MUKAI, T.; MATSUKAWA, M.; YOSHIOKA, M.; MORRIS, J.F.; BUTLER, V.P. Structures of novel bufadienolides in the eggs of a toad, *Bufo marinus*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 42, 754–756. **1994**

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. Quím. Nova, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, **2010**. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>.

AMPHIBIAWEB <<https://amphibiaweb.org>> University of California, Berkeley, CA, USA. Accessed 14 Oct **2020**.

AUSTIN, D. J.; KRISTINSSON, K. G.; ANDERSON, R. M. The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences. Proceedings of the National Academy of Sciences, [s.l.], v.96, n.3, p.1152-1156. **1999**. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.3.1152>.

AZOUZI, S. et al. Antioxidant and Membrane Binding Properties of Serotonin Protect Lipids from Oxidation. Biophysical Journal, [s.l.], Elsevier BV, v. 112, n. 9, p.1863-1873, **2017**.

BAEK, H. J. et al. Ligand binding inhibitors of A1 adenosine receptor from *Rana rugosa* are phospholipase A2s. Wiley. European Journal of Biochemistry, [s.l.], v.267, n.5, p.1340-1346. **2000**. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01102.x>.

BALDO, E. C. F. et al. Toad Poison and Drug Discovery. Springer Netherlands. Toxins And Drug Discovery, p.1-22, **2015**.

BALDO, E. C. F. Estudo das atividades antineoplásicas, citotóxicas e genotóxicas de toxinas isoladas do veneno de *Rhinella schneideri*. 2016. 142 f. Tese (Doutorado) - Curso de Toxicologia, Ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, **2016**.

BANFI, F. F. et al. Dehydrobufotenin extracted from the Amazonian toad *Rhinella marina* (Anura: Bufonidae) as a prototype molecule for the development of antiplasmodial drugs. Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases, Brasil, p. 1-16, FapUNIFESP (SciELO). **2021**. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2020-0073>.

BARNHART, K.; FORMAN, M. E.; UMILE, T. P.; KUENEMAN, J.; MCKENZIE, V.; SALINAS, I.; MINBIOLE, K. P. C.; WOODHAMS, D. C. Identification of Bufadienolides from the Boreal Toad, *Anaxyrus boreas*, Active Against a Fungal Pathogen. Microbial Ecology, [S.L.], v. 74, n. 4, p. 990-1000. Springer Science and Business Media LLC. **2017**. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-017-0997-8>

BARBOSA, E. A. *et al.* Structure and function of a novel antioxidant peptide from the skin of tropical frogs. Elsevier BV. Free Radical Biology and Medicine, [s.l.], v.115, p.68-79. **2018**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.001>.

BARRA, D.; SIMMACO, M. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. Trends Biotechnol. 13:205–209. **1995**

BARRET, A. J. *et al.* in Proteinase inhibitors (Barrett, A. J. & Salvesen, G., eds). Elsevier, Amsterdam pp. 515-569. Commun. 27, 157. 593 - 626. **1986**.

BENSON, K.F.; NEWMAN, R.A.; JENSEN, G.S. Antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic, and skin regenerative properties of an *Aloe vera*-based extract of *Nerium oleander* leaves (NAE-8®). Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology, 239. **2015**. doi:10.2147/CCID.S79871.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. Analytical Biochemistry, [s. L.], v. 239, n. 0292, p.70-76, 23 jan. **1996**.

BHUTIA, S. K. & MAITI, T. K. Targeting tumors with peptides from natural sources. Trends Biotechnol. v. 26, p. 210–217, **2008**.

BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. Eur. J. Biochem. 204, 433. **1992**.

BRAND, G. D. *et al.* Jr. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). Biochem Biophys Res Commun. v. 347, p. 739-46, **2006**.

CARDOZO, M.; LIMA, K. S. C.; FRANÇA, T. C. C.; LIMA, A. L. S. Biogenic Amines: a public health problem. Revista Virtual de Química, [s.l.]. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). v. 5, n. 2, p. 149-168, **2013**. <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20130018>.

CHENG, Cs.; WANG, J.; CHEN, J. *et al.* New therapeutic aspects of steroidal cardiac glycosides: the anticancer properties of Huachansu and its main active constituent Bufalin. Cancer Cell Int 19, 92. **2019**. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0806-1>

CHEVION, S.; Berry, E. M.; KITROSSKY, N.; KOHEN, R. Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry. Free Radical Biol. Med. 22, 411. **1997**.

CHO, J. H.; SUNG, B. H.; KIM, S. C. Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. Biochim. Biophys. Acta, 1788, 1564. **2009**.

CLARKE, B.T. The natural history of the amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biological Reviews*, v.72: 365-379. **1997**.

CONCEIÇÃO, K. *et al.* Major biological effects induced by the skin secretion of the tree frog *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Toxicon*. 49. 1054-1062, **2007**.

CONLON, J. M.; KIM, J. B. A protease inhibitor of the Kunitz family from skin secretions of the tomato frog, *Dyscophus guineti* (Microhylidae). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 961. **2000**.

CÓRDOVA, W. H. P.; LEITÃO, S. G.; CUNHA-FILHO, G.; BOSCH, R. A.; ALONSO, I. P.; PEREDA-MIRANDA, R.; GERVOU, R.; TOUZA, N. A.; QUINTAS, L. E. M.; NOËL, F. Bufadienolides from parotoid gland secretions of Cuban toad *Peltophryne fustiger* (Bufonidae): inhibition of human kidney  $Na^+ / K^+ -ATPase$  activity. *Toxicon*, [S.L.], v. 110, p. 27-34. Elsevier BV. **2016**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.11.015>.

COSTA, H. & PALMA, M. S. Agelotoxin: a phospholipase A2 from the venom of the neotropical social wasp *cassununga* (*Agelaia pallipes pallipes*) (*Hymenoptera-Vespidae*). *Toxicon*, Rio Claro, p. 1367-1379. **1999**.

COSTA-NETO, E. M. Animal-based medicines: biological prospecting and the sustainable use of zootherapeutic resources. *Ann. Braz. Acad. Sci.* 77, 33. **2005**.

CRUZ, J.S.; MATSUDA, H. Arenbufagin, a compound in toad venom, blocks  $(Na^+)-K^+$  pump current in cardiac myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 239:223–226. **1993**.

CUNHA-FILHO, G.A.; RESCK, I.S.; CAVALCANTI, B.C.; PESSOA, C.O.; MORAES, M.O.; FERREIRA, J.R.; *et al.* Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. *Toxicon*, v. 56 p. 339 – 48. **2010**.

CUNHA-FILHO, G.A.; SCHWARTZ, C.A.; RESCK, I.S.; MURTA, M.M.; LEMOS, S.S.; CASCTRO, M.S.; *et al.* Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the *Bufo rubescens*. *Toxicon*, 45: 777-782. **2005**.

DAI, L.P.; GAO, H.M.; WANG, Z.M.; WANG, W.H. Isolation and structure identification of chemical constituents from the skin of *Bufo bufo gargarizans*. *Yao Xue Xue Bao.* 42, 858–861. **2007**. PMID: 17944235

DALY, J. W. *et al.* Biologically active substances from amphibians: preliminary studies on anurans from twenty-one genera of Thailand. *Toxicon*, 44, 805. **2004**.

DALY, J.W.; MYERS, C.W.; WHITTAKER, N. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs, Dendrobatidae, with a general survey of toxic noxious substances in the Amphibia. *Toxicon*, v.25, n.10: 1023-1095. **1987**.

DENNIS E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 269 13057–13060. **1994.**

DOYLE, J. *et al.* NNOS inhibition, antimicrobial and anticancer activity of the amphibian skin peptide, citropin 1.1 and synthetic modifications. The solution structure of a modified citropin 1.1. *European Journal Of Biochemistry*, [s.l.], v. 270, n. 6, p.1141-1153, mar. Wiley. **2003.**

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, v.82, p. 47-95. **2002.**

ERSPAMER, V. Bioactive secretions of the amphibian integument. In: HEATHOLE, H.; BARTHALMUS, G. T (Eds). *Amphibian biology: the integument*, vol I, NortonChipping, NSW; Surrey Beatty and Sons. p. 178-350. **1994.**

ERSPAMER, V. Biogenic amines and active polypeptides of the amphibian skin. *Annual Review of Pharmacology*, v.11: 327-350, **1971.**

ESTRADA-GOMEZ, S.; MUÑOZ, L.; LANCHERO, P.; LATORRE, C. Partial Characterization of Venom from the Colombian Spider *Phoneutria boliviensis* (Aranae: *ctenidae*). *Toxins*, [S.L.], v. 7, n. 8, p. 2872-2887, 31 jul.. MDPI AG. **2015.** <http://dx.doi.org/10.3390/toxins7082872>.

FARADAY, C.J.; CRAIK, C.S. Mechanisms of macromolecular protease inhibitors. *Chembiochem.* 11:2341–2346. **2010.**

FEIDANTISIS, K.; ANESTIS, A.; MICHAELIDIS, B. Seasonal variations of anti-/apoptotic and antioxidant proteins in the heart and gastrocnemius muscle of the water frog *Pelophylax ridibundus*. *Cryobiology*, 67, 175. **2013.**

FERREIRA, M. A. Contribuição para o conhecimento dos alcalóides indólicos de *Burkea africana hook.* 423 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, **1971.**

FERREIRA, P.M.P. *et al.* Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* venom extracts from Southern Amazon. *Toxicon* v. 72, p. 43-51. **2013.**

FLIER, J; EDWARDS, M.; DALY, J.; MYERS, C. Widespread occurrence in frogs and toads of skin compounds interacting with the ouabain site of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *Science American Association for the Advancement of Science (AAAS)*. [S.L.], v. 208, n. 4443, p. 503-505. **1980.** <http://dx.doi.org/10.1126/science.6245447>.

FORSSTRÖM, T.; TUOMINE, J.; KÄRKKAINEN, J. Determination of potentially hallucinogenic N-

dimethylted indoleamines in human urine by HPLC/ESI-MSMS. Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation, v.61: 547-556. **2001**.

FRANÇA, M. B.; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. Oxidative stress and its effects during dehydration. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 146:621–631; **2007**.

FREITAS, C. I. A. Estudos sobre a atividade antimicrobiana de substâncias extraídas e purificadas de secreções da pele de anfíbios. 156 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, **2003**.

FROST, D. R. Amphibian species of the world: an online reference. Version 5.4. Electronic database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> American Museum of Natural History, New York, USA. **2010**.

FUSCO, Luciano S.; CAJADE, Rodrigo; PIÑEIRO, Jose M.; TORRES, Ana M.; SILVA, Igor R. F. da; HYSLOP, Stephen; LEIVA, Laura C.; PIMENTA, Daniel C.; BUSTILLO, Soledad. Biochemical characterization and cytotoxic effect of the skin secretion from the red-spotted Argentina frog *Argenteohyla siemersi* (Anura: *Hylidae*). J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis, Botucatu, v. 26, e20190078. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2019-0078>. **2020**.

GALLARDO, J. M. The species *Bufo granulosus Spix* (Salientia: Bufonidae) and its geographic variation. Bulletin of the Museum of Comparative Zoology. Cambridge, Massachusetts 134: 107–138. **1965**.

GAO, H.; POPESCU, R.; KOPP, B.; WANG, Z. Bufadienolides and their antitumor activity. Nat. Prod. Rep. 28, 953-969. **2011**

GENARO-MATTOS, T. C.; DALVI, L. T.; OLIVEIRA, R. G.; GINANI, J. S.; HERMES-LIMA, M. Reevaluation of the 2-deoxyribose assay for determination of free radical formation. Biochimica et Biophysica Acta, 1790: 1636-1642, **2009**.

GHOSAL, S.; DUTTA, S. K.; SANYAL, A. K.; BHATTACHARYA, S. K. Arundo donax. Phytochemical and pharmacological evaluation. Journal Of Medicinal Chemistry, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 480-483. American Chemical Society (ACS). **1969**. <http://dx.doi.org/10.1021/jm00303a032>.

GIANGASPERO, A.; SANDRI, L.; TOSSI, A. Amphipathic  $\alpha$ -helical peptides. A systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. Eur. J. Biochem. v. 268, p. 5589–5600, **2001**.

GOMES, A. *et al.* Bioactive molecules from amphibian skin: Their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. Indian Journal Of Experimental Biology, India, v. 45, n.

7, p.579-593. **2007.**

GRANT, B. W.; TUCKER, A. D.; LOVICH, J. E.; MILLS, A. M. & DIXON, P. M. "Transcutaneous Amphibian Stimulator (TAS): a device for the collection of amphibian skin secretions." Arch. Environ. Contam. Toxicol, 32, p. 383-388. **2002**

GUARATINI, Thais; MEDEIROS, Marisa H. G.; COLEPICOLO, Pio. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. FapUNIFESP (SciELO). Química Nova, [s.l.], v. 30, n. 1, p. 206-213. **2007.** <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000100033>.

GUNTHER, L. A. M.; LEVIN, M. F. E. G.; SCANU, A. M.; PLOW, E. F. A potential basis for the thrombotic risks associated with lipoprotein(a). Nature, London, v. 339, n. 6222, p. 301-303, **1989.**

GUO, C. *et al.* Identification of multiple peptides with antioxidant and antimicrobial activities from skin and its secretions of *Hylarana taipehensis*, *Amolops lifanensis*, and *Amolops granulosis*. Biochimie, 105, 192–201. **2014.**

GUO, W.; AO, M.; LI, W.; WANG, J., & YU, L. "Major biological activities of the skin secretion of the Chinese giant salamander, *Andrias davidianus*." *Zeitschrift für Naturforschung C*, 67(1-2), p. 86-92, **2012.**

GUTTERIDGE, J. M. & HALLIWELL, B. The deoxyribose assay: an assay both for 'free' hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production. The Biochemical journal. Aug 1; 253:932-933, **1988.**

HABERMEHL, G. & PREUSSER, H. J. Antimikrobielle Aktivität von Amphibien-Hautdrüsensekreten II. Substanzen aus *Leptodactylus pentadactylus*. Z. Naturforsch, v 25b, p. 1451-2. **1970.**

HABERMEHL, G. & PREUSSER, H. J. Hemmung des Wachstums von Pilzen und Bakterien durch das Hautdrüsensekret von *Salamandra maculosa*. Z. Naturforsch., v 24B, p. 1599-601, **1969.**

HABERMEHL, G. Venomous animals and their toxins. New York: Springer Verlag, **1981.**  
doi:10.1007/978-3-642-88605-8

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312–322. **2006.**

HALLIWELL, B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? Trends Biochem. Sci., 24, 255-259. **1999**

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. Free Radical in Biology and Medicine. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 704p. **2007.**

HANCOCK, R.E.W. & CHAPPLE, D.S. Peptide Antibiotics. Antimicrob. Agents and Chemother. Washington. v. 43, p. 1317-1323, **1999.**

HANSEN, J. M.; GO, Y. M.; JONES, D. P. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46, 215. **2006**.

HARTLEY, B. S. Proteolytic enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, Palo Alto, v. 29, p. 45-72, **1960**.

HAYES, R.A.; CROSSLAND, M.R.; HAGMAN, M.; CAPON, R.J.; SHINE, R. Ontogenetic variation in the chemical defenses of cane toads (*Bufo marinus*): toxin profiles and effects on predators. *Journal of Chemical Ecology* 35, 391–9. **2009**.

HE, R.; MA, H.; ZHOU, J.; ZHU, Z.; LV, X.; LI, Q.; WANG, H.; YAN, Y.; LUO, N.; DI, L. High Resolution Mass Profile of Bufadienolides and Peptides Combing with Anti-Tumor Cell Screening and Multivariate Analysis for the Quality Evaluation of Bufonis Venenum. *Molecules*, [S.L.], v. 24, n. 10, p. 1943. MDPI AG. **2019**. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24101943>.

HERBERT, V.; SHAW, S.; JAYATILLEKE, E. Vitamin C-driven free radical generation from iron. *J. Nutr.*; 126, 1213-1220. **1996**.

HERPETOLOGIA BRASILEIRA: Uma publicação da Sociedade Brasileira de Herpetologia. Brasil: Sociedade Brasileira de Herpetologia, v. 8, n. 1, abr. Quadrimestral. Disponível em: <[www.sbherpetologia.org.br](http://www.sbherpetologia.org.br)>. **2019**.

Heś, M.; DZIEDZIC, K.; GÓRCKA, D.; JęDRUSEK-GOLIŃSKA, A.; GUJSKA, E. *Aloe vera* (L.) Webb.: natural sources of antioxidants a review. Springer Science and Business Media LLC. *Plant Foods For Human Nutrition*, [S.L.], v. 74, n. 3, p. 255-265, **2019**. <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-019-00747-5>.

HOSKIN, D.W. & RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1778, p. 357–375, **2008**.

HOWARD, J. A. Handbook of Antioxidants. Bond Dissociation Energies, Rate Constants, Activation Energies and Enthalpies of Reactions. American Chemical Society (ACS). 2nd Edition By E. T. Denisov and T. G. Denisova (Institute of Problems in Chemical Physics, Russia). CRC Press: boca raton. 1999. xxii + 290 pp. \$99.00. isbn 0-8493-9004-4.. *Journal Of The American Chemical Society*, [S.L.], v. 122, n. 49, p. 12412-12412, **2000**. <http://dx.doi.org/10.1021/ja004759m>.

HUTCHINSON, D.A.; MORI, A.; SAVITZKY, A.H.; BURGHARDT, G.M.; WU, X.; MEINWALD, J.; SCHROEDER, F.C. Dietary sequestration of defensive steroids in nuchal glands of the Asian snake *Rhabdophis tigrinus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104, 2265. **2007**.

IZADPANA, A. & GALLO, R.L. Antimicrobial peptides. J. American Acad. Dermatol. St. Louis. v. 52, p. 381-390, **2005**.

JACKSON, C. M.; NEMERSON, Y. Blood Coagulation. Annual Review of Biochemistry, Palo Alto, v. 49, p. 765-811, **1980**.

JAYAPRAKASHA, G.K.; SINGH, R.P.; SAKARIAH, K.K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinefera*) extracts on peroxidation models *in Vitro*. Food Chem 73: 2852290. **2001**.

KAMANO, Y.; SATOH, N.; NAKAYOSHI, H.; PETTIT, G.R.; SMITH, C.R. Rhinovirus inhibition by bufadienolides. Chem. Pharm. Bull., v. 36, p. 326-32. **1988**.

KERKHOFF, J.; NORONHA, J. C.; BONFILIO, R.; SINHORIN, A. P.; RODRIGUES, D. J.; CHAVES, M. H.; VIEIRA, G. M. Quantification of bufadienolides in the poisons of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* by HPLC-UV. Toxicon, [S.L.], v. 119, p. 311-318, Elsevier BV. **2016**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.07.003>.

KIM, B. *et al.* Melatonin reduces X-ray irradiation-induced oxidative damages in cultured human skin fibroblasts. Elsevier BV. Journal Of Dermatological Science, [s.l.], v. 26, n. 3, p. 194-200, **2001**. [http://dx.doi.org/10.1016/s0923-1811\(01\)00088-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0923-1811(01)00088-3)

KIM, H. S.; PARK, C. B.; KIM, M. S.; KIM, S. C. cDNA cloning and characterization of buforin I, an antimicrobial peptide: a cleavage product of histone H2A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 229, 381. **1996**.

KOHEN, R. & GATI, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. Toxicology 148, 149–157. **2000**.

KOHEN, R.; CHEVION, S.; SCHWARTZ, R.; BERRY, E. M. Evaluation of the total low molecular weight antioxidant activity of plasma in health and diseases: a new approach. Cell. Pharmacol. 3, 355–359. **1996**.

KOKEN, R. Skin antioxidants: Their role in aging and in oxidative stress — New approaches for their evaluation. Biomed. Pharmacother. 53, 181. **1999**.

KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, J., *et al.* Antioxidant efficacy of Kalanchoe daigremontiana bufadienolide-rich fraction in blood plasma *in vitro*. Pharmaceutical Biology, [s.l.]. Informa UK Limited, v.54, n.12, p.3182-3188. **2016**.

KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, J.; STOCHMAL, A. Bufadienolides of Kalanchoe species: an overview of chemical structure, biological activity and prospects for pharmacological use. Phytochemistry Reviews. **2017**. doi:10.1007/s11101-017-9525-1



KRENN, L.; KOPP, B. Bufadienolides from animal and plantsources. *Phytochemistry* 48:1–29. **1998**.

KYRIACHENKO, Y.S. *et al.* Comparison of in vitro antioxidant properties of skin gland secretions from six amphibians living on the territory of Ukraine. In: Перспективні Матеріали та інноваційні технології: Біотехнологія, прикладна хімія та екологія, 90, Київ. Thesis. Київ: Київський Національний Університет Технологій Та Дизайну, 2020. p. 38. **2020**

LABBE, J. P.; REBEGROTTE, P.; TURPINE, M. Demonstrating extra-cellular leucine aminopeptidase (ER 3.4.1.1) of *Aspergillus oryzae* (IP 410): leucine aminopeptidase 2 fraction. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, v. 278, n. 2699, **1974**.

LADERO, V.; CALLES-ENRÍQUEZ, M.; FERNÁNDEZ, M.; ALVEZ, M. A. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition and Food Science*. 6, 145-156. **2010**. doi:10.2174/157340110791233256

LAI, R.; ZHAO, Y.; YANG, D. M.; ZHA, H. G.; LEE, W. H. & ZHANG, Y." Comparative study of the biological activities of the skin secretions from six common Chinese amphibians." *Zoological Research*, 23(2), p. 113-119, **2000**.

LEE, S. E.; HWANG, H. J.; HA, J.S.; JEONG, H.S.; Kim, J. H. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sciences*, 73(2), 167–179. **2003**. doi:10.1016/s0024-3205(03)00259-5

LEE, S.S. *et al.* Digitalis-like compounds of toad bile: sulfation and reduction of bufadienolides decrease potency of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Inhibition. *Heterocycles* 2, 669–686. **1994**.

LEITE, J.R.S.A. *et al.* Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides, USA*. v. 26 (4), p. 565-573, **2005**.

LI, B.J. *et al.* Bufadienolides with cytotoxic activity from the skins of *Bufo bufo gargarizans*. *Fitoterapia* 105, 7-15. **2015**.

LI, M. *et al.* Arenobufagin, a bufadienolide compound from toad venom, inhibits VEGF-mediated angiogenesis through suppression of VEGFR-2 signaling pathway. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1251 – 1260. **2012**

LICHTSHEIN, D.; GATI, I.; HAVER, E.; KATZ, U. Digitalis-like compounds in the toad *Bufo viridis*: tissue and plasma levels and significance in osmotic stress. *Life Sciences* 51, 119–128. **1992**.

LICHTSHEIN, D.; KACHALSKY, S.; DEUTSCH, J. Identification of an ouabain-like compound in toad skin and plasma as a bufodienolide derivative. *Life Sciences* 38, 1261–1270. **1986**.

LIEBLER, D.C.; REED, D.J. Free-radical defense and repair mechanisms. In: Wallace, K.B. (Ed.). *Free radical Toxicology*. Taylor & Francis, 141-173. **1997**

LIU, C., *et al.* Frog skins keep redox homeostasis by antioxidant peptides with rapid radical scavenging ability. *Free Radical Biology and Medicine*, Elsevier BV, v. 48, n.9, p.1173-1181. **2010**.

LIU, Y. & NAIR, M. G. An Efficient and Economical MTT Assay for Determining the Antioxidant Activity of Plant Natural Product Extracts and Pure Compounds. American Chemical Society (ACS). *Journal Of Natural Products*, [s.l.], v.73, n.7, p.1193-1195, **2010**. <http://dx.doi.org/10.1021/np1000945>.

MACIEL, N. M. *et al.* Composition of indolealkylamines of *Bufo rubescens* cutaneous secretions compared to six others Brazilian bufonids with phylogenetic implications. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 134(4), 641–649. **2003**. doi:10.1016/s1096-4959(03)00022-8

MAGALHÃES, B.S. *et al.* Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. *Biochem Biophys Res Commun*. v. 26; 377(4), p. 1057-61, **2008**.

MAILHO-FONTANA, P. L.; PORCARI, A. M.; EBERLIN, M. N.; JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M.; PIMENTA, D. C.; SCIANI, J. M. Distribution of major toxins in *Rhinella marina* parotoid macroglands using Desorption-Electrospray-Ionization mass spectrometry imaging (DESI-MSI). *Toxicon: X*, [S.L.], v. 6, p. 100033. Elsevier BV. **2020**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxcx.2020.100033>.

MARINETTI, G.V. The action of phospholipase A on lipoproteins. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Lipids And Lipid Metabolism*, Elsevier BV. v. 98, n. 3, p.554-565. **1965**.

MATSUKAWA, M. *et al.* Isolation and characterization of novel endogenous digitalis-like factors in the ovary of the giant toad, *Bufo marinus*. *Journal of Natural Products* 61, 1476–81. **1998**.

MEBS, D.; POGODA, W.; MANEYRO, R.; KWET, A. Studies on the poisonous skin secretion of individual red bellied toads, *Melanophryniscus montevidensis* (Anura, Bufonidae), from Uruguay. *Toxicon*, 46(6), 641–650. **2005**. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.07.004

MEBS, D.; WAGNER, M. G.; POGODA, W.; MANEYRO, R.; KWET, A.; KAUERT, G.). Lack of bufadienolides in the skin secretion of red bellied toads, *Melanophryniscus* spp. (Anura, Bufonidae), from Uruguay. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 144(4), 398–402. **2007**. doi: 10.1016/j.cbpc.2006.11.009

MIGNOGNA, G.; PASCARELLA, S.; WECHSELBERGER, C.; HINTERLEITNER, C.; MOLLAY, C.; AMICONI, G.; BARRA, D.; KREIL, G. BSTI, a trypsin inhibitor from skin secretions of *Bombina bombina* related to protease inhibitors of nematodes. *Protein Sci*. 5, 357. **1996**.

MOSMANN, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation

and cytotoxicity assays". *Journal Of Immunological Methods* 65 (1–2): 55–63. **1983**.

NARVAES., P. & RODRIGUES, M. T. Taxonomic Revision of *Rhinella Granulosa* Species Group (Amphibia, Anura, Bufonidae), with a Description of a New Species. *Arquivos de Zoologia* 40(1): 1–73. **2009**.

NASCIMENTO, A. C. C.; FONTES, W.; SEBEN, A.; CASTRO, M. S. "Antimicrobial peptides from anurans skin secretions". *Protein and Peptide Letters*.10:227– 238. **2003**.

NEWMAN, D. J. & CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal Of Natural Products*, [S.L.], v. 83, n. 3, p. 770-803. American Chemical Society (ACS). **2020**. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

NEWMAN, R.A.; YANG, P.; PAWLUS, A.D.; BLOCK, K.I. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Mol. Interv.* 8, 36-49. **2008**.

NOGAWA, T. *et al.* Isolation and structure of five new cancer cell growth inhibitory bufadienolides from the Chinese traditional drug Ch'an Su. *Journal of Natural Products*, v. 64, p. 1148-1152, **2001**.

OGASAWARA, M.; MATSUBARA, T.; SUZUKI, H. Screening of natural compounds for inhibitory activity on colon cancer cell migration. *Biol Pharm Bull*; v. 24; p. 720 – 723. **2001**.

PAPO, N. & SHAI, Y. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell. Mol. Life Sci.* v. 62, p. 784–790, **2005**.

PARAVICINI, T.M. & TOUYZ, R.M. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension: Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*, 31(Supplement 2), S170–S180. **2008**. doi:10.2337/dc08-s247.

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

PERES, C. M. & CURI, R. Como cultivar células. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 283. **2005**.

PERKINS, S. J.; SMITH, K. F. Identity of the putative serine-proteinase fold in proteins of the complement system with nine relevant crystal structures. *Biochemical Journal*, London, v. 295, n. 1, p. 109-114, **1993**.

PINDER, A. W.; BURGGREN, W. W. Ventilation and partitioning of oxygen uptake in the frog *Rana pipiens*: effects of hypoxia and activity. *J. Exp. Biol.* 126:453–468; **1986**.

PINHEIRO, A. C. "Caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase tipo A2 isolada da secreção cutânea do anuro *Pithecopus azureus* (*PHYLLOMEDUSA AZUREA*). Mestrado. Universidade de Brasília. **2016**

PLÁCIDO, A. *et al.* The Antioxidant Peptide Salamandrin-I: First Bioactive Peptide Identified from Skin Secretion of Salamandra Genus (*Salamandra salamandra*). *Biomolecules*, 10(4), 512. **2020**.

PREUSSER, H.-J. *et al.* Antimicrobial activity of alkaloids from amphibian venoms and effects on the ultrastructure of yeast cells. *Toxicon*, v. 13, n. 4, p.285-288, ago. Elsevier BV. **1975**.

PUBCHEM [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 205042, Dehydrobufotenine; **2021**. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dehydrobufotenine>

PUKALA, T.L.; BOWIE, J.H.; MASELLI, V.M.; MUSGRAVE, I.F.; TYLER, M.J. Hostdefence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. *Nat. Prod. Rep.* v. 23, p. 368-393, **2006**.

QI, F. *et al.* Antitumor activity of extracts and compounds from the skin of the toad *Bufo bufo gargarizans Cantor*. *International Immunopharmacology* v. 11, p. 342 - 349. **2011**.

QI, F. *et al.* Cinobufacini, an aqueous extract from *Bufo bufo gargarizans Cantor*, induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway in human hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Ethnopharmacology* v. 128, p. 654 - 661. **2010**.

QI, J.; ZULFIKER, A.; LI, C.; GOOD, D.; WEI, M. The Development of Toad Toxins as Potential Therapeutic Agents. *Toxins*, 10(8), 336. **2018**. doi:10.3390/toxins10080336

RASH, L. D.; MORALES, R. A.V.; VINK, S.; ALEWOOD, P. F. De novo sequencing of peptides from the parotid secretion of the cane toad, *Bufo marinus* (*Rhinella marina*). Elsevier BV. *Toxicon*, [s.l.], v. 57, n. 2, p. 208-216, **2011**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.11.012>.

RAWLINGS, N. D., WALLER, M., BARRETT, A. J., & BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D503–D509. **2014**. doi:10.1093/nar/gkt953

RAWLINGS, N. D.; BARRET, A. J. Evolutionary families of peptidases. *The Biochemical Journal*, Auckland, v. 290, n. 1, p. 205-218, **1993**.

REISCHL, E; DAFRE, AL; FRANCO, JL; WILHELM FILHO, D. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, v.146, p. 22-53, **2007**.

REJANDRA, W.; ARMUGAM, A.; JEYASSEELAN, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. *Toxicon*, 44, 1. **2004**.

REN, W., *et al.* "Multi-component identification and target cell-based screening of potential bioactive compounds in toad venom by UPLC coupled with high-resolution LTQ-Orbitrap MS and high-sensitivity Qtrap MS." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, [s.l.], Springer Science and Business Media LLC, v. 410, n. 18, p.4419-4435. **2018**.

RILEY, R. S. & IDOWU, M. *Principles and Applications of Flow Cytometry*. Richmond: Virginia Commonwealth University, p. 13. **2005**.

RUFINO, M.S.M. *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). Fortaleza: Embrapa. 4 p. **2006**

SAIKIA, D & MUKHERJEE, A. K. Anticoagulant and Membrane Damaging Properties of Snake Venom Phospholipase A2 Enzymes. *Snake Venoms*, [S.L.], p. 87-104, Springer Netherlands. **2017**. [http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-6410-1\\_18](http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-6410-1_18).

SANTOS, M. H. S. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29(2-3), 213–231. **1996**. doi:10.1016/0168-1605(95)00032-1

SANTOS, N.F.C. Quantificação da ação antioxidante do Piridoxal Isonicotinoil Hidrazona (PIH) contra o estresse oxidativo induzido por ions ferro. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, **1998**.

SANTOS-FILHO, N. A. Caracterização Funcional e Estrutural de uma Fosfolipase A2 Ácida Tóxica Isolada da Peçonha de *Bothrops moojeni*. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Toxicologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, **2009**.

SAPORITO, R. A. *et al.* Formacines ants: An arthropod source for the pumiliotoxin alkaloids os dendrobatid poison frogs. *Proc. Natl. Am. Soc.*, 101, 8045. **2004**.

SAPORITO, R. A. *et al.* Spatial and temporal patterns of alkaloid variation in the poison frog *Oophaga pumilio* in Costa Rica and Panama over 30 years. *Proc. Natl. Am. Soc. USA*, 104, 8885. **2007**.

SARIKAYA, S.; GULCIN, I. Radical Scavenging and Antioxidant Capacity of Serotonin. *Current Bioactive Compounds*, [s.l.], Bentham Science Publishers Ltd, v.9, n. 2, p.143-152. **2013**.

SCHALLREUTER, K. U.; WOOD, J. M. Free radical reduction in the human epidermis. *Free Radical Biol. Med.* 6, 519. **1989**.

SCHALOSKE, R. H. & Dennis, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta* 1761: 1246–1259. **2006**.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; QUISPE, C.; THEODULOZ, C.; DE SOUSA, Jr. P.T.; PARIZOTTO, C. Antiproliferative activity and new argininy l bufadienolide esters from the “cururú” toad *Rhinella (Bufo) schneideri*. *Journal of Ethnopharmacology* v. 155; p. 1076 - 1085. **2014**.

SCHWARTZ, C. A.; CASTRO, M. S.; JÚNIOR, O. R. P.; MACIEL, N. M.; SCHWARTZ, E. N. F.; SEBEN, A. Princípios bioativos da pele de anfíbios: paronama atual e perspectivas. In: NASCIMENTO, L. B.; OLIVEIRA, M. E (Eds). *Herpetologia no Brasil II*. 1ed. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia, v. 1, p. 146-168. **2007**.

SCIANI, J. M. *et al.* Cytotoxic and antiproliferative effects of crude amphibian skin secretions on breast tumor cells. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, V. 3; p. 10 –18. **2013**.

SEBEN, A.; SCHWARTZ, C. A.; CRUZ, J. S. A defesa química dos anfíbios. *Ciência Hoje*, v.15, n.87: 25-33. **1993**

SEMENTSOV, A. Poisons of toads. *Farm. Zh. (Kharkov)*. 12, 19–22. **1939**.

SHADIDI, M. & SIOUD, M. Selective targeting of cancer cells using synthetic peptides. *Drug Res. Updates*. v. 6, p. 363–371, **2003**.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipids bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane- lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta*. v. 1462, p. 55–70, **1999**.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*. v. 66, p. 236–248, **2002**.

SHALABY, A. R. *Significance of biogenic amines to food safety and human health*. *Food Research International*, 29(7), 675–690. **1996**. doi:10.1016/s0963-9969(96)00066-x

SHEN, H.W.; JIANG, X.L.; WINTER, J.C.; YU, A.M. Psychedelic 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine: Metabolism, pharmacokinetics, drug interactions, and pharmacological actions. *Curr. Drug Metab.* 11, 659–666. **2010**. doi: 10.2174/138920010794233495.

SHIBAO, P.Y.T.; ANJOLETTE, F.A.P.; LOPES, N.P.; ARANTES, E.C. First serine protease inhibitor isolated from *Rhinella schneideri* poison. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 21,

30. **2015.**

SHIBAO, P.Y.T.; COLOGNA, C.T., MORANDI-FILHO, R. *et al.* Deep sequencing analysis of toad *Rhinella schneideri* skin glands and partial biochemical characterization of its cutaneous secretion. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis, 24: 36, **2018**.

SHINDO, Y.; WITT, E.; PACKER, L. J. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. Invest. Dermatol. 100, 260. **1993**.

SINGH, R.P.; MURTHY, K.N.C.; JAYAPRAKASHA, G.K. Studies on the Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punicagranatum*) Peel and Seed Extracts Using *in Vitro* Models. J Agric Food Chem 50: 81286. 12. **2002**.

SINHORIN, A. P.; KERKHOFF, J.; DALL'OGGIO, E. L.; RODRIGUES, D. J.; VASCONCELOS, L. G.; SINHORIN, V. D. G. Chemical profile of the parotoid gland secretion of the Amazonian toad (*Rhinella margaritifera*). Toxicon, [S.L.], v. 182, p. 30-33. Elsevier BV. **2020**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.04.106>.

SLOMINSKI, A. *et al.* On the Role of Melatonin in Skin Physiology and Pathology. Springer Science and Business Media LLC. Endocrine, [S.L.], v.27, n.2, p.137-148, **2005**. <http://dx.doi.org/10.1385/endo:27:2:137>.

SONG, G. *et al.* A novel amphibian skin Bowman-Birk-like trypsin inhibitor. Biochem. Biophys. Res. Commun., 372, 191. **2008**.

SOUSA, L.Q. *et al.* Bufadienolides from Amphibians: A Promising Source of Anticancer Prototypes for Radical Innovation, Apoptosis Triggering and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Inhibition. *Toxicon*, 127: 63–76. **2017**.

SOUZA, B. B. P.; CCARDOZO Fh, J. L.; MURAD, A. M.; PRATES, M. V.; COURA, M. M. A.; BRAND, G. D.; BARBOSA, E. A.; BLOCH, C. Identification and characterization of phospholipases A2 from the skin secretion of *Pithecopus azureus* anuran. *Toxicon*. **2019**.

SPOLAORE, B.; FERNÁNDEZ, J.; LOMONTE, B.; MASSIMINO, M. L. & TONELLO, F. Enzymatic labelling of snake venom phospholipase A2 toxins. *Toxicon*. **2019**. doi:10.1016/j.toxicon.2019.09.019

SUÁREZ, F. S.; RAMIREZ, A.; LÓPEZ-MARURE, R.; & GUTIÉRREZ, R. M. P. In Vitro Cytotoxic Potential and Apoptotic Activity of Bufadienolide-rich Fraction from Leaves of *Kalanchoe mortagei* against Human HeLa Cancer Cells. International Journal of Ayurvedic Medicine, 9(1). **2018**.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. Method. Plant Biochem. 6, 71–133. **1990**.

TAN, D. X. *et al.* Chemical and Physical Properties and Potential Mechanisms: melatonin as a broad-

spectrum antioxidant and free radical scavenger. Bentham Science Publishers Ltd. Current Topics In Medicinal Chemistry, [s.l.], v.2, n.2, p.181-197, **2002**. <http://dx.doi.org/10.2174/1568026023394443>.

TANIGUCHI, M. & KUBO, I. Ethnobotanical drug discovery based on medicine men's trials in the African savanna: screening of eats African plants for antimicrobial activity II. J. Nat. Prod., v. 56, n. 9, p. 1539, **1993**.

TILLOTSON, R. D.; WÖSTEN, H. A. B.; RICHTER, M.; WILLEY, J. M. A surface-active protein involved in aerial hyphae formation in the filamentous fungus *Schizophyllum commune* restores the capacity of a bald mutant of the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor* to erect aerial structures. Molecular Microbiology, Oxford, v. 30, n. 3, p. 595-602, **1998**.

TOLEDO, R.C. & JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. Comparative Biochemistry and Physiological A., v.111, n.1: 1-29.**1995**.

TURK, V. & BODE, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. FEBS Lett. 285,213-219. **1991**.

UJVÁRY, I. Psychoactive natural products: Overview of recent developments. Annali dell'Istituto Superiore Sanita. 50, 12–27. **2014**.

VAN ENGELAND, M.; RAMAEKERS, F. C.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. Cytometry, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 131-139. Wiley. **1996**. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0320\(19960601\)24:23.0.co;2-m](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(19960601)24:23.0.co;2-m).

VITALIS, T. Z. Pulmonary and cutaneous oxygen uptake and oxygen consumption of isolated skin in the frog, *Rana pipiens*. Respir. Physiol. 81:391–399; **1990**.

WANG, X.; REN, S.; GUO, C.; ZHANG, W.; ZHANG, X.; ZHANG, B.; LI, S.; REN, J.; HU, Y.; Wang, H. Identification and functional analyses of novel antioxidant peptides and antimicrobial peptides from skin secretions of four East Asian frog species. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 49(6), 550–559. **2017**.

WATSON, R. R. Substrate specificities of aminopeptidases: a specific method for microbial differentiation. Methods in Microbiology, v. 9, p. 1-14, **1976**.

WIEPRECHT, T.; DATHE, M.; KRAUSE, E.; BEYERMANN, M.; MALOY, W. L.; MACDONALD, D. L.; BIENERT, M. Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. FEBS Lett. v. 3, n. 417 (1), p. 135-140, **1997**.

WILSON, K.; BAYDOUN, A. R.; OHLENDIECK, K.; PADDOCK, S. W.; REPLEY, R.; BURNS, R.; WALKER, J. M.; AITKEN, A.; WALKER, J.; HOFMANN, A.; SLATER, R.; FYFFE, J. Principles and Techniques of Biochemistry and



Molecular Biology, 7ed. p.581- 590, **2010**.

WU, P.L.; HSU, Y.L.; WU, T.S.; BASTOW, K. F.; LEE, K.H. Kalanchosides A-C, new cytotoxic bufadienolides from the aerial parts of *Kalanchoe gracilis*. *Org. Lett.*, *8*, 5207. **2006**.

XIE, R. *et al.* Bufothionine, a possible effective component in cinobufocini injection for hepatocellular carcinoma. *Journal Of Ethnopharmacology*, v. 141, n. 2, p.692-700, Elsevier BV. **2012**.

XIE, X. *et al.* Efficacy and safety of Huachansu combined with chemotherapy in advanced gastric cancer: A meta-analysis. *Medical Hypotheses*, v. 81, n. 2, p.243-250, Elsevier BV. **2013**.

XU, X. & LAI, R. The Chemistry and Biological Activities of Peptides from Amphibian Skin Secretions. *Chemical Reviews*, *115* (4), 1760-1846. **2015**.

XU, D.; WANG, J.; CHEN, W; YANG, X.; ZHOU, J.; MA, H.; DI, L.; DUAN, J. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory actions of indolealkylamines from toad venom in mice using lipidomics and molecular docking. *Journal Of Ethnopharmacology*, [S.L.], v. 269, p. 113677. Elsevier BV. **2021**.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2020.113677>.

YANG, H.; WANG, X.; LIU, X.; WU, J.; LIU, C.; GONG, W.; ZHAO, Z.; HONG, J.; LIN, D.; WANG, Y.; LAI, R. Antioxidant peptidomics reveals novel skin antioxidant system. *Mol. Cell. Proteomics*, *8*, 571. **2009**.

YE, M.; GUO, D. Analysis of bufadienolides in the Chinese drug Ch'an Su by highperformance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*; v.19; p. 1881 – 1892. **2005**.

YIN, X.; JIANG, S.; YU, J.; ZHU, G.; WU, H.; MAO, C. Effects of spirotetramat on the acute toxicity, oxidative stress, and lipid peroxidation in Chinese toad (*Bufo bufo gargarizans*) tadpoles. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, *37*, 1229. **2014**.

ZHANG, D. *et al.* Arenobufagin, a natural bufadienolide from toad venom, induces apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway. *Carcinogenesis*, v. 34, n. 6, p. 1331-1342, **2013**.

ZHANG, L.S.; NAKAYA, K.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y. Induction by bufalin of differentiation of human leukemia cells HL60, U937, and ML1 toward macrophage/monocytelike cells and its potent synergistic effect on the differentiation of human leukemia cells in combination with other inducers. *Cancer Res*; v. 52; p. 4634 - 4641. **1992**.

ZHANG, Y.; YUAN, B.; TAKAGI, N.; WANG, H.; ZHOU, Y.; SI, N.; YANG, J.; WEI, X.; ZHAO, H.; BIAN, B. Comparative Analysis of Hydrophilic Ingredients in Toad Skin and Toad Venom Using the UHPLC-HR-MS/MS and UPLC-QqQ-MS/MS Methods Together with the Anti-Inflammatory Evaluation of Indolealkylamines. *Molecules*, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 86, MDPI AG. **2018**.

ZHENG, H. *et al.* A computational approach for peptidomic analysis in taxonomic study of amphibian species. *IEE Transactions on Nanobioscience*. 4:241–247. **2005**

ZHOU, J.; LU, G.; WANG, H.; ZHANG, J.; DUAN, J.; MA, H. *et al.* Molecular Structure-Affinity Relationship of Bufadienolides and Human Serum Albumin In Vitro and Molecular Docking Analysis. **2015**.

ZHU, X. Y., & LIU, L. M. Research progress on the antitumor mechanism of Cinobufacini injection and its active ingredient. *Tumor J World*, 5, 272–5. **2006**.

ZOCHE, J. J. *et al.* Heavy-metal content and oxidative damage in *Hypsiboas faber*: the impact of coal-mining pollutants on amphibians. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 69. **2014**.

ZULFIKER, M.; HASANAT, A.; MARIOTTINI, G.L.; QI, J.; GRICE, I.D.; WEI, M.Q. Indolealkylamines from toad vertebrates and sea invertebrates-their identification and potential activities on the central nervous system *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 16, 197–207. **2016**. doi:10.2174/1871524915666150724100245.