



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Farmácia
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Ciências Fisiológicas

**Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos
inéditos isolados da secreção cutânea da rã
*Leptodactylus labyrinthicus***

JOYCE SILVA DOS SANTOS

Brasília - DF

2019

JOYCE SILVA DOS SANTOS

**Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos
inéditos isolados da secreção cutânea da rã
*Leptodactylus labyrinthicus***

Projeto apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

Brasília - DF

2019

JOYCE SILVA DOS SANTOS

**Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos
inéditos isolados da secreção cutânea da rã
*Leptodactylus labyrinthicus***

Banca Examinadora

Profa. Dra. Mariana S. Castro
Presidente

Prof. Dr. Marcos Rodrigo Alborghetti
Examinador

Universidade de Brasília

Sumário

Agradecimentos	1
Resumo	3
Lista de figuras.....	5
Lista de tabelas.....	7
Lista de siglas e abreviaturas	8
1. Introdução	9
1.1. Contexto.....	9
1.2. Anfíbios.....	10
1.3. Peptídeos antimicrobianos de anuros.....	12
1.4. <i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	17
2. Objetivo geral.....	21
3. Materiais e métodos	22
3.1. Obtenção da secreção cutânea	22
3.2. Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea de <i>L. labyrinthicus</i>	22
3.3. Avaliação da atividade antimicrobiana (ensaio de varredura).....	22
3.4. Análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF	23
3.5. Determinação da estrutura primária dos peptídeos de <i>L. labyrinthicus</i> e análises de similaridade.....	24
4. Resultados e discussão.....	25
5. Considerações finais e perspectivas futuras.....	40
6. Referências bibliográficas.....	41

“Everything will make sense in the end”

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, sem dúvidas, a Deus por guiar meus passos e decisões de acordo com Sua vontade.

Agradeço à minha família por sempre acreditar em mim e no meu sucesso como pessoa e profissional, principalmente ao meu padrasto, Aguinaldo, por desde pequena me motivar a estudar e colocar os estudos em primeiro lugar, e à minha mãe, Valéria, que me alfabetizou em casa, e esteve comigo enquanto estive doente durante a infância, sempre me motivando a ler, estudar e aprender mesmo com tantas adversidades, além de estar comigo em todos os momentos difíceis da minha vida, como mãe e melhor amiga.

Agradeço a cada professor que passou pela minha formação, que me ensinou um pouco e participou da construção de quem sou hoje. Sobretudo ao corpo docente do curso de Farmácia da UnB, onde cada professor me marcou de forma única com sua maneira de agir e ensinar.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra Mariana S. Castro, pela sabedoria, paciência e amizade com que me guiou nesta trajetória.

Agradeço, de todo meu coração, a Lucas Jeferson, que esteve comigo durante a construção desse trabalho, me ajudando infinitamente em todos os âmbitos, me fazendo rir, me aconselhando, me dando forças e despertando em mim o desejo de ser melhor e crescer a cada dia.

Agradeço aos meus amigos e colegas da graduação, que me marcaram de forma indizível, aos grupos de estudos, às discussões sobre temas diversos, aos trabalhos em grupo. Especialmente aos meus amigos, Camila Pereira, Nara Kanzaki, Camila

Guimaraes e Maria Luiza, por estarem comigo nos melhores e piores momentos e ajudarem a diminuir o fardo do dia-a-dia na UnB.

Agradeço a Keven Wender, pela amizade construída durante esse ano, pela imensa ajuda com tantas amostras e com o ensaio antibacteriano.

Agradeço de forma especial a Francisco Danilo, o menino com a pior caligrafia do mundo que dentre 70 colegas se tornou meu melhor amigo, me deu seu ombro para chorar em diversos momentos difíceis, além de sempre me fazer rir, me ajudar (e me fazer passar raiva às vezes).

Agradeço à vida, por me fazer aprender com os fins de ciclos que precisamos passar por dores para sermos mais fortes.

Aos meus colegas de sala.

À secretaria do curso, direção e coordenação, pela cooperação.

À UnB, ao CNPq, à CAPES e à FAPDF pelo auxílio financeiro para a execução desse projeto.

Enfim, a todos os que contribuíram para a realização desse trabalho e para me tornar quem sou hoje.

RESUMO

Atualmente, as doenças infecciosas estão entre as principais causas de mortalidade no mundo devido à resistência dos microrganismos aos antibióticos disponíveis no mercado. Os anfíbios dispõem de características especiais em relação a outros grupos de animais, por possuírem em sua pele glândulas responsáveis tanto pela respiração, regulação de temperatura e osmorregulação quanto pela liberação de compostos bioativos, com propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antiparasitárias que servem para a proteção da integridade do animal. A secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus* já foi analisada, resultando na descoberta de peptídeos antimicrobianos (PAMs) como a pentadactilina, a falaxina e a leptoglicina. Neste trabalho, a partir de ensaios de varredura das frações advindas de cromatografias por RP-HPLC, foram identificadas sete frações ativas para as bactérias patogênicas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Posteriormente, análises por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF possibilitaram a identificação dos PAMs previamente descritos para essa espécie, além de outros componentes que representam possíveis fragmentos dos PAMs já caracterizados, bem como peptídeos inéditos. Foram identificadas duas frações ativas: LLF5 e LLF-9. A partir da recromatografia da fração LLF-9 foi isolado e caracterizado um peptídeo inédito presente nessa secreção. Tal peptídeo, com massa molecular de 2.601,42 Da, foi submetido ao sequenciamento químico por degradação de Edman, resultando em uma sequência não-ambígua composta por 25 resíduos de aminoácidos e tendo uma provável amidação na porção C-terminal: $^1\text{GLWDDLKAAAKKVVSSLASAAMEKL}^{25}\text{-NH}_2$. Esse novo PAM exibiu 96% de identidade com o peptídeo promotor de comportamento agressivo em machos (*aggression-stimulating peptide*, LASP) isolado da secreção cutânea da rã *L. fallax*. Estudos comportamentais devem ser conduzidos com o intuito de se determinar se o

peptídeo de 2,6 kDa de *L. labyrinthicus* também é capaz de promover comportamento agressivo nos machos dessa espécie.

Palavras-chave: Anuros, *Leptodactylus labyrinthicus*, secreção cutânea, peptídeos antimicrobianos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistema tegumentar de anfíbios.....	12
Figura 2: Passos termodinâmicos envolvidos com a interação de PAMs com as membranas biológicas.....	14
Figura 3: Modelos de mecanismos de ação propostos para a permeabilização de membranas celulares por PAMs.....	16
Figura 4: Exemplar adulto de <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> (rã-pimenta).....	17
Figura 5: Perfil cromatográfico típico do fracionamento cromatográfico da secreção cutânea de <i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	25
Figura 6: Atividade inibitória das frações cromatográficas obtidas com o fracionamento cromatográfico da secreção bruta de <i>L. labyrinthicus</i> sobre a bactéria Gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	26
Figura 7: Atividade inibitória das frações cromatográficas obtidas com o fracionamento cromatográfico da secreção bruta de <i>L. labyrinthicus</i> sobre a bactéria Gram-negativa <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922).....	27
Figura 8: Perfil cromatográfico típico do fracionamento cromatográfico da secreção cutânea de <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> em coluna C ₈ contendo a marcação das frações que apresentaram atividade antimicrobiana.....	29
Figura 9: Espectro de massas da fração LLF-2 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).....	31
Figura 10: Espectro de massas da fração LLF-3 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).....	32
Figura 11: Espectro de massas da fração LLF-4 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).....	33

Figura 12: Espectro de massas da fração LLF-5 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).....	34
Figura 13: Espectro de massas da fração LLF-6 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).....	35
Figura 14: Espectro de massas da fração LLF-7 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).....	36
Figura 15: Espectro de massas da fração LLF-8 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).....	37
Figura 16: Espectro de massas da fração LLF-9 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).....	38
Figura 17: Alinhamento das sequências do peptídeo de 2,6 kDa de <i>L. labyrinthicus</i> (LLF-9) com a do peptídeo LASP de <i>L. fallax</i>	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea da rã *Leptodactylus labyrinthicus*.....19

Tabela 2: Identificação das frações cromatográficas que exibiram 100% de inibição sobre o crescimento das bactérias nas condições empregadas.....29

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC – Organização americana sem fins lucrativos que disponibiliza microrganismos de referência padrão, do inglês *American Type Culture Collection*

TR – Tempo de retenção

Da – Dalton

HCCA – Ácido -ciano-4-hidroxicinâmico, em inglês *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*

CLAE / HPLC– Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*

MIC – Concentração inibitória mínima

RP-HPLC: Cromatografia líquida de fase reversa, do inglês *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*

MALDI-TOF – Ionização e desorção a laser assistida por matriz – Tempo de Voo, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*

PAM – Peptídeo antimicrobiano

TFA – Ácido trifluoroacético, do inglês *trifluoroacetic acid*

1. Introdução

1.1. Contexto

A resistência bacteriana aos antibióticos é um dos mais sérios problemas de saúde pública mundial. O uso descontrolado e indiscriminado de antibióticos está associado ao aparecimento de microrganismos resistentes que, por meio de seleção natural, apresentam mecanismos que alteram sua sensibilidade ao fármaco, tornando-os menos suscetíveis às drogas convencionais e suas respectivas doses de ataque, sendo necessário escaloná-los cada vez mais (SPELLBERG; GILBERT, 2014).

A ampla utilização de agentes antimicrobianos desde os anos cinquenta levou ao desenvolvimento de novos fármacos, o que resultou na expansão acelerada da resistência bacteriana a tais compostos. Em vários casos, foram necessários apenas três anos após o início do uso clínico do medicamento até a detecção da primeira bactéria resistente. Esse contexto evidencia a acentuada flexibilidade das bactérias em lidar com condições desfavoráveis (ROBERTS, 2018).

A infecção por *Staphylococcus aureus* é a principal causa de diversas doenças, como doenças da pele, de tecidos moles, respiratórias, ósseas, articulares e endovasculares, sendo também uma bactéria bastante presente no cotidiano. Já a bactéria *Escherichia coli* é uma bactéria coliforme, aeróbica facultativa, em forma de bastonete, que geralmente está presente no intestino inferior de organismos endotérmicos, sendo também o principal patógeno do trato urinário, representando 75 a 90% dos isolados bacterianos de infecção urinária não complexa (HASHIM; ALKHAFI, 2019).

Agentes antimicrobianos de amplo espectro como tetraciclina, aminoglicosídeos, macrólidos e β -lactâmicos, que já foram utilizados para diversos fins na medicina humana e veterinária, muitas vezes sem um diagnóstico definido, são os mais afetados pelo cenário de resistência. No caso de antibióticos como glicopeptídeos, que possuem

um espectro mais restrito, estima-se que sejam necessários aproximadamente 15 anos para o advento de mecanismos de resistência. Já que esses são utilizados em quantidades mais baixas e em situações específicas, onde geralmente já se detém de um diagnóstico que implica na especificidade do tratamento (ROBERTS, 2018).

Nesse contexto, produtos provenientes de fontes naturais como plantas, animais e fungos, que possuem atividade farmacológica ou biológica, têm sido amplamente explorados (PATRIDGE et al., 2016).

1.2. Anfíbios

Os anfíbios representam um grupo de animais vertebrados, agrupados na classe Amphibia. A característica mais marcante dos membros dessa classe é o seu ciclo de vida, já que esses animais podem ocupar tanto o ambiente terrestre quanto o aquático. A classe Amphibia possui mais de 8.000 espécies descritas na literatura, sendo essas divididas em 3 ordens: Gymnophiona (cecílias), Caudata (salamandras) e Anura (sapos, rãs e pererecas). A ordem dos anuros representa a mais abundante em espécies dentre os grupos apresentados, com 7.148 espécies descritas (FROST, 2019).

Os animais necessitam de mecanismos que possibilitem sua sobrevivência a determinadas condições, de forma a protegê-los de predadores naturais ou peculiaridades do ambiente. Os anfíbios não possuem garras, presas ou ferrões para se protegerem, sendo que o grande foco evolutivo desses animais reside no seu tegumento, que desempenha diversas funções, como respiração, osmorregulação, termorregulação e secreção de substâncias protetoras (KÖNIG; BININDA-EMONDS; SHAW, 2015).

No tegumento dos anfíbios estão presentes dois tipos de glândulas acinares: mucosas e granulosas (figura 1). As glândulas mucosas produzem mucinas e mucopolissacarídeos, substâncias fortemente glicosiladas, que evitam a perda de água, formando uma superfície tegumentar pegajosa, responsável pela umidificação e

lubrificação da pele, além de auxiliarem também na proteção, respiração e termorregulação dos animais (DEMORI et al., 2019). Já as glândulas granulosas são responsáveis pela produção de uma variedade de proteínas e peptídeos, como imunoglobulinas, lisozimas, neuropeptídeos, além de toxinas que são úteis para a proteção do anfíbio contra predadores (RODRÍGUEZ et al., 2016; DEMORI et al., 2019).

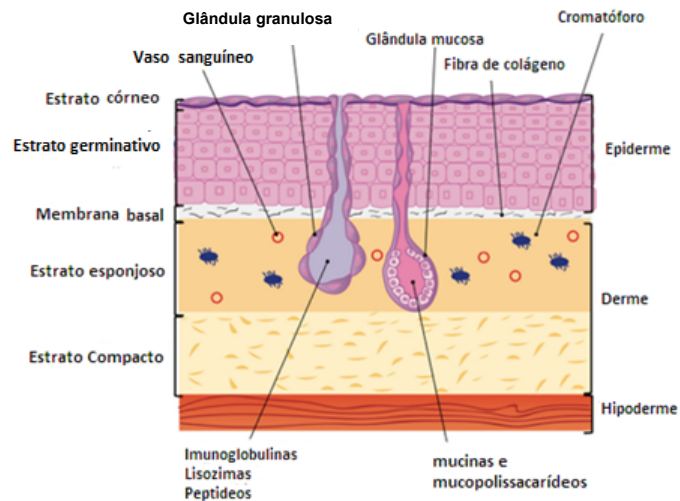
Na região exterior da glândula, há uma camada de células mioepiteliais que apresentam adrenorreceptores. Qualquer estresse ao qual o animal seja exposto, induz a liberação de epinefrina (adrenalina) ou norepinefrina (noradrenalina) que, a partir da ligação a tais receptores, desencadeiam a contração das células mioepiteliais, comprimindo a glândula granulosa, causando a liberação do conteúdo na superfície da pele, representando assim, a principal linha de defesa do animal (CONLON et al., 2014; DEMORI et al., 2019).

A epiderme dos anfíbios é composta por duas camadas, sendo uma delas o estrato córneo, formada por uma camada de células pouco queratinizadas, seguido por uma camada basal regenerativa denominada o estrato germinativo. Fibras de colágeno separaram a porção considerada epiderme da derme, que é formada pelo estrato esponjoso e estrato compacto. No estrato esponjoso, estão presentes glândulas mucosas e granulosas, além de cromóforos e vasos sanguíneos em abundância. Já o estrato compacto é mais interno, formado por tecido conjuntivo denso não modelado, repleto de fibras colágenas (figura 1).

Geralmente, as glândulas mucosas apresentam o modo de secreção merócrino, ou seja, por meio de exocitose, sem perda de conteúdo celular, sendo liberado de forma contínua e espontânea. Já as glândulas granulosas podem liberar seu conteúdo na superfície da pele por um mecanismo holócrino, que envolve a ruptura da membrana

plasmática e a extrusão dos grânulos secretores através de um ducto que se abre para a superfície.

Figura 1: Sistema tegumentar de anfíbios.



Fonte: Adaptado de DEMORI (2019).

As glândulas serosas de anuros também produzem um rico arsenal de peptídeos codificados por genes que se mostram envolvidos na defesa da pele nua contra microrganismos nocivos e para auxiliar no reparo de feridas (TEIXEIRA, 2014).

1.3. Peptídeos antimicrobianos de anuros

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas que têm despertado bastante interesse a nível científico, por servirem tanto como barreiras de defesa constitutivas quanto induzidas na proteção contra praticamente todas as fontes de infecção, atuando como potentes imunomoduladores, além de estarem dispostos em larga escala na natureza (BECHINGER; GORR, 2017).

Os peptídeos antimicrobianos da secreção cutânea dos anuros são caracterizados por terem de 10 a 46 resíduos de aminoácidos. Esses compostos possuem baixa massa molecular e são anfipáticos, ou seja, apresentam características hidrofílicas e hidrofóbicas

concomitantemente. De modo geral, apresentam resíduos como a arginina, lisina e histidina, que possuem cadeias laterais básicas carregadas positivamente em pH neutro ou próximo à neutralidade. Além disso, estão presentes em sua composição pelo menos 50% de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, formando uma estrutura secundária do tipo α -hélice anfipática quando em contato com a membrana fosfolipídica, ocasionando a formação de poros que podem interferir principalmente no balanço osmótico e ocasionar a liberação do conteúdo citosólico. Não obstante, podem também atuar em alvos intracelulares (RAHNAMAEIAN, 2011; LADRAM; NICOLAS, 2016).

A membrana plasmática das bactérias é composta de fosfolipídios carregados negativamente, como o fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) ou fosfatidilserina (PS), que possuem grande afinidade pelos PAMs catiônicos, enquanto a membrana plasmática de células de mamíferos apresenta fosfolipídios zwitteriônicos, que apresentam menores interações com os PAMs, resultando em uma toxicidade seletiva, muito mais proeminente em bactérias que em humanos (RAMAMOORTHY, 2009).

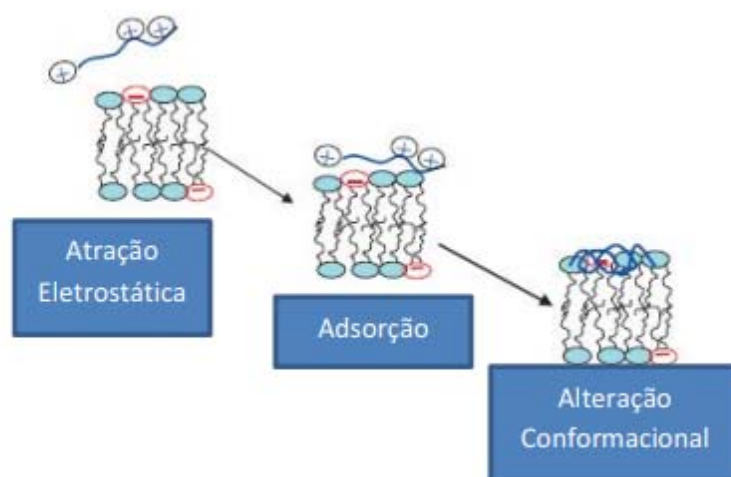
No caso de bactérias Gram-negativas, há também uma pequena camada de peptidoglicano e, além da membrana citoplasmática, apresentam outra membrana, mais externa, que se mantém pelo equilíbrio entre os íons de magnésio e cálcio que se ligam ao grupo fosfato do açúcar carregado negativamente, necessários para manter a estabilidade da molécula de polissacarídeo. Os PAMs induzem o deslocamento do metal, o que desestabiliza a membrana externa e facilita a entrada de moléculas adicionais a partir do exterior (BECHINGER; GORR, 2017).

ZANIN e colaboradores (2014) demonstram que anuros de diferentes famílias, gêneros e espécies produzem peptídeos diversos, pertencentes a diferentes famílias de PAMs e com atividade biológica variada. A divergência entre as espécies é tão

proeminente que ainda não foram encontradas duas espécies que produzam o mesmo arsenal de peptídeos antimicrobianos (ZANIN, 2014).

Considerando que, aparentemente, as sequências específicas de PAMs não se mantêm conservadas, sugere-se que haja participação da termodinâmica na especificidade e no mecanismo de ação do PAM, nas fases de atração eletrostática, adsorção à membrana e alteração conformacional, já que a completa estruturação do peptídeo se deve à aplicação de determinada quantidade de energia (figura 2) (GIANGASPERO; SANDRI; TOSSI, 2001).

Figura 2: Passos termodinâmicos envolvidos com a interação de PAMs com as membranas biológicas.

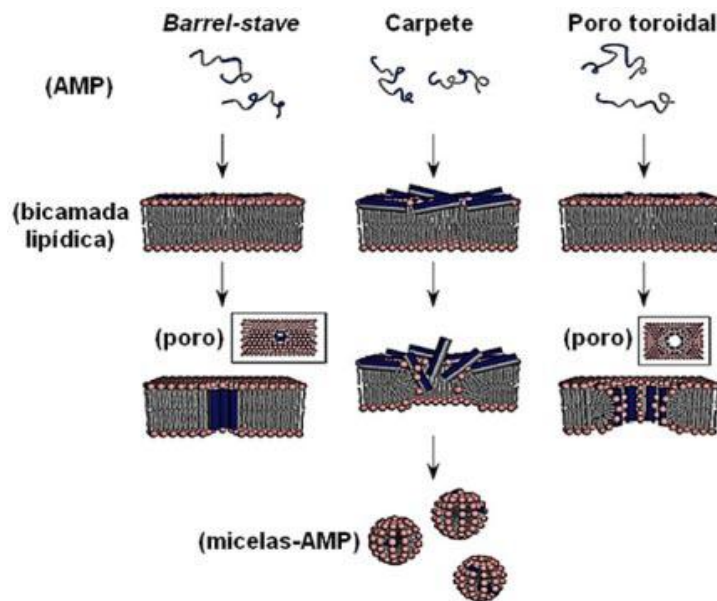


Adaptado de GIANGASPERO; SANDRI; TOSSI (2001).

Os peptídeos antimicrobianos podem adotar diversas estruturas, como α -hélice, folha β , estrutura mista ou estendida e, a depender do seu enovelamento, podem ocasionar de diferentes maneiras, a desestabilização da membrana fosfolipídica. Vários modelos já foram descritos para explicar os mecanismos de ação dos PAMs sobre a membrana de microrganismos (figura 3):

- Modelo *barrel-stave*, que descreve a aglomeração de estruturas peptídicas no mesmo local, interagindo com a membrana lipídica e formando um canal transmembrana.
- Modelo *poro toroidal*, proposto para alguns grupos de peptídeos e que se assemelha ao modelo *barrel-stave*, diferenciando-se pela intercalação dos peptídeos com os fosfolipídios para formar o poro. (BROGDEN, 2005; ZASLOFF, 2002; SENGUPTA et al., 2008).
- Modelo *carpet-like*, em que os peptídeos interagem paralelamente com a bicamada fosfolipídica, formando uma estrutura que se assemelha a um “tapete de moléculas”. Em seguida, os peptídeos se reorientam, encaminhando os resíduos de aminoácidos de natureza hidrofóbica para o interior da membrana, formando micelas contendo os PAMs (SHAI E OREN, 2001).
- Modelo Shai-Matsuzaki-Huang, que combina interações superficiais e a formação de poros toroidais. Podendo ser considerado uma mescla dos dois mecanismos descritos anteriormente. O peptídeo interage com a superfície da membrana como ocorre no mecanismo de “carpete” e desloca as moléculas de fosfolipídeos, levando tanto a uma desorganização da estrutura da membrana quanto à formação de poros (SHAI, 2002; HUANG, 2006).

Figura 3: Modelos de mecanismos de ação propostos para a permeabilização de membranas celulares por PAMs.



Adaptado de TOKE (2005).

Na secreção desses animais já foram encontrados diversos compostos com atividade biológica (cardiotóxicos, miotóxicos, neurotóxicos, colinomiméticos, simpatomiméticos, vasoconstrictores locais, hemolíticos, alucinógenos, antinociceptivos, ou inibidores de crescimento bacteriano), entre eles: amins biogênicas, esteroides, alcaloides, bufadienolídeos, peptídeos e proteínas (ERSPAMER, 1971; CLARKE, 1997). É imenso o número de PAMs que já foram isolados a partir da pele de anuros. Uma busca no UniProt Knowledgebase pelo termo “amphibian antimicrobial peptide” resultou em 2.861 sequências advindas de anfíbios (UNIPROT CONSORTIUM, 2019).

Os peptídeos antimicrobianos possuem um grande potencial terapêutico devido a sua capacidade lítica. Eles têm demonstrado habilidade de eliminar um grande espectro de microrganismos, incluindo as bactérias multirresistentes a drogas convencionais, exibindo atividade contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e

Gram-negativas, além da baixa probabilidade de induzir resistência devido à sua interação com a membrana plasmática dos microrganismos (NIZET, 2006).

1.4. *Leptodactylus labyrinthicus*

O anuro da espécie *Leptodactylus labyrinthicus* (SPIX, 1824) (figura 4) pertence à família Leptodactylidae que possui, segundo FROST (2019), 219 espécies já descritas.

É uma rã de fácil visualização e coleta por apresentar grande porte e se adaptar bem em diversos locais, o que favorece o estudo científico da espécie. Essa rã é vulgarmente denominada rã-pimenta por conter histamina em abundância em sua secreção, o que causa intensa irritabilidade na pele, nariz e, principalmente, nos olhos (ERSPAMER, 1971). Pode ser encontrada no Brasil, em biomas como o Cerrado e a Caatinga e em outros países da América Latina, como Venezuela, Paraguai, Bolívia e norte da Argentina (FROST, 2019).

Figura 4: Exemplar adulto de *Leptodactylus labyrinthicus* (rã-pimenta).



Fonte: Adaptado de Biofaces nature, foto por Kennedy Borges.

Vários peptídeos já foram isolados das secreções cutâneas de diferentes espécies do gênero *Leptodactylus* como, por exemplo as ocelatinas, primeiramente isoladas da espécie *Leptodactylus latrans* (anteriormente nomeada como *Leptodactylus ocellatus*), sendo esse um grupo de compostos bastante estudado, em que vários deles apresentam atividade antimicrobiana (NASCIMENTO et al., 2004). Além disso, outros PAMs, como a leptoglicina, um peptídeo rico em glicina e leucina isolado da pele da espécie *L. pentadactylus*, mostrou-se capaz de inibir o crescimento das bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Citrobacter freundii* com concentrações inibitórias mínimas (CIMs) iguais a 8, 50 e 75 μM , respectivamente; não exibindo, entretanto, atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Enterococcus faecalis*), leveduras (*Candida albicans* e *Candida tropicalis*) e fungos dermatófitos (*Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum*) (SOUSA et al, 2009). Outros PAMs isolados de anuros do gênero *Leptodactylus* também revelaram-se capazes de reduzir a viabilidade de células cancerígenas, como as células de melanoma murino B16F10, como demonstrado para o PAM pentadactilina (também denominado ocelatina P1) (LIBÉRIO et al., 2011).

A tabela 1 relaciona os peptídeos antimicrobianos já isolados e caracterizados da espécie alvo do presente estudo, *Leptodactylus labyrinthicus*.

Tabela 1. Peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea da rã *Leptodactylus labyrinthicus*.

Nome	Estrutura Primária	Massa Molecular	Referências Bibliográficas
Pentadactilina / Ocellatin-P1	GLLDTLKGAAKNVVGLASKVMEKL-NH ₂	2.540,5 Da	CRUZ et al., 2015; ROLLINS-SMITH et al., 2005

Exibe atividade antiproliferativa e citotóxica sobre células cancerígenas de melanoma murino B16F10; atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Preoteus mirabilis*) e Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* Group B) e leveduras (*Candida albicans*).

G16OCP1	GLLDTLKGAAKNVVGLASKVMEKL-NH ₂	2.510,5 Da	PRÍAS MÁRQUEZ, 2012
---------	--	------------	------------------------

Atividade antiproliferativa e citotóxica sobre células cancerígenas de melanoma murino B16F10; atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*).

Falaxina/ Ocelatina F-1	GVVDILKGAAKDIAGHLASKVMNKL- NH ₂	2.546,5 Da	ROLLINS-SMITH et al., 2005; LIBÉRIO, 2008; GUSMÃO et al., 2017
----------------------------	--	------------	--

Atividade antiproliferativa e citotóxica sobre células cancerígenas de melanoma murino B16F10; atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*); sobre as bactérias Gram-positivas *B. subtilis* e *S.aureus* e sobre a levedura *Candida albicans*.

Leptoglicina	GLLGLLGPLLGGGGGGGGLL-NH ₂	1.761 Da	SOUSA et al., 2009
--------------	--------------------------------------	----------	--------------------

Atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Citrobacter freundii*); ausência de atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Enterococcus faecalis*), leveduras (*Candida albicans* e *Candida tropicalis*) e fungos dermatófitos (*Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum*).

Ocelatina LB-1	GVVDI LKGAAKDIAGHLASKVM-NH ₂	2.191,2 Da	GUSMÃO et al., 2017
Atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-negativas (<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> e <i>Escherichia coli</i>) e sobre as leveduras <i>Candida albicans</i> e <i>Candida lusitaniae</i> .			
Ocelatina LB-2	GVVDI LKGAAKDIAGHLASKVMN-NH ₂	2.305,8 Da	GUSMÃO et al., 2017
Atividade antimicrobiana sobre a bactéria Gram-negativa <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .			

Adaptado de CHAGAS (2014).

2. Objetivo geral

Prospecção de peptídeos antimicrobianos para aplicações terapêuticas por meio da identificação, purificação e caracterização de peptídeos inéditos da secreção do anuro *Leptodactylus labyrinthicus*.

3. Materiais e métodos

3.1. Obtenção da secreção cutânea

Os anfíbios foram coletados por meio de identificação visual e acústica, no município de Monte Alegre de Goiás (licença SISBIO nº51541-2). Em seguida, foram submetidos a estímulo elétrico moderado, o que induziu a liberação da secreção cutânea do anfíbio. A pele do animal foi lavada com água Milli-Q e a secreção liberada recolhida em um béquer, congelada, liofilizada e armazenada a -20°C.

3.2. Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea de *L. labyrinthicus*

Alíquotas liofilizadas de 15 mg da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* foram ressuspensas em 300 µl de TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q (solvente A), centrifugadas a 8.000 x g durante 10 min, filtradas em filtros Millex GV 0,22 µm e introduzidas por injeção manual em coluna de fase reversa C₈ (Vydac 208TP C₈ HPLC column, ID 10 x L 250 mm, 5 µm) com fluxo de 2,5 mL/min. A eluição foi realizada com gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila (solvente B) com detecção ao ultravioleta em 216 nm. O programa empregado na eluição foi: 100% de solvente A durante 5 min; de 0 a 50% de solvente B em 50 min; de 50 a 100% de solvente B em 5 min e 100% de solvente B durante 5 min. As amostras cromatográficas eluídas foram coletadas manualmente, congeladas e secas em sistema concentrador a vácuo (Speed-Vac Savant) e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

3.3. Avaliação da atividade antimicrobiana (ensaio de varredura)

Meio de cultura Mueller-Hinton foi preparado de acordo com as informações do fabricante: 4,2 mg do pó foi ressuspensado em 200 mL de água Milli-Q. A solução foi homogeneizada sob agitação constante, seu pH foi ajustado para 7,2 com adição de NaOH. O meio de cultura juntamente com os materiais necessários para a realização do ensaio antimicrobiano foram autoclavados na temperatura de esterilização de 121°C

durante 30 min. Em seguida, as bactérias (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922) obtidas do estoque de células do Banco de Culturas do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília foram cultivadas em 7 mL de meio Mueller-Hinton previamente preparado e deixadas sob agitação, a 37°C, durante 24h. Após esse período, quando a densidade óptica no comprimento de onda de 625 nm atingiu valor na faixa de 0,08-0,1 no espectrofotômetro (UV-M61, BEL), cada suspensão bacteriana inicial foi diluída duas vezes: na primeira diluição, foi realizada uma diluição 1:10 em 1 mL (900 µL de meio de cultura + 100 µL do inóculo). Já a segunda diluição foi realizada numa proporção 1:20 (950 µL de meio de cultura + 50 µL do inóculo).

As frações obtidas com o fracionamento cromatográfico de uma alíquota de 15 mg da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* foram solubilizadas em 2 mL de água Milli-Q estéril e 50 µL de cada fração foi incubadas juntamente com 50 µL de suspensão bacteriana, em placas de microtitulação estéreis (96 poços, fundo chato).

Como controle representativo da ausência de proliferação, as bactérias foram incubadas com formaldeído 0,8% (v/v). Já como controle representativo da proliferação máxima, foi feita a incubação da suspensão bacteriana com água Milli-Q.

Após 24 horas de incubação a 37°C, as placas foram analisadas a 620 nm, em leitora de microplacas (Multiskan[®]FC, Thermo Scientific, USA), no método de turbidimetria, a fim de se verificar quais frações cromatográficas apresentam atividade inibitória sobre o crescimento microbiano.

3.4. Análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF

As frações cromatográficas que apresentaram atividade antimicrobiana no ensaio de varredura foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF modelo Autoflex II (Bruker, Rheinstten, Alemanha). As frações foram ressuspensas em TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q e 1 µL de cada fração cromatográfica foi aplicado em placa

de aço inoxidável juntamente com 1 µL de matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA 20 µg/µL) ressuspensa em TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila 50% (v/v). As análises foram feitas utilizando-se o modo refletor de íons positivos. O equipamento foi previamente calibrado utilizando-se o padrão *Peptide Calibration Standard II* (Bruker, Alemanha), sendo analisada a faixa de m/z de 800 a 4000.

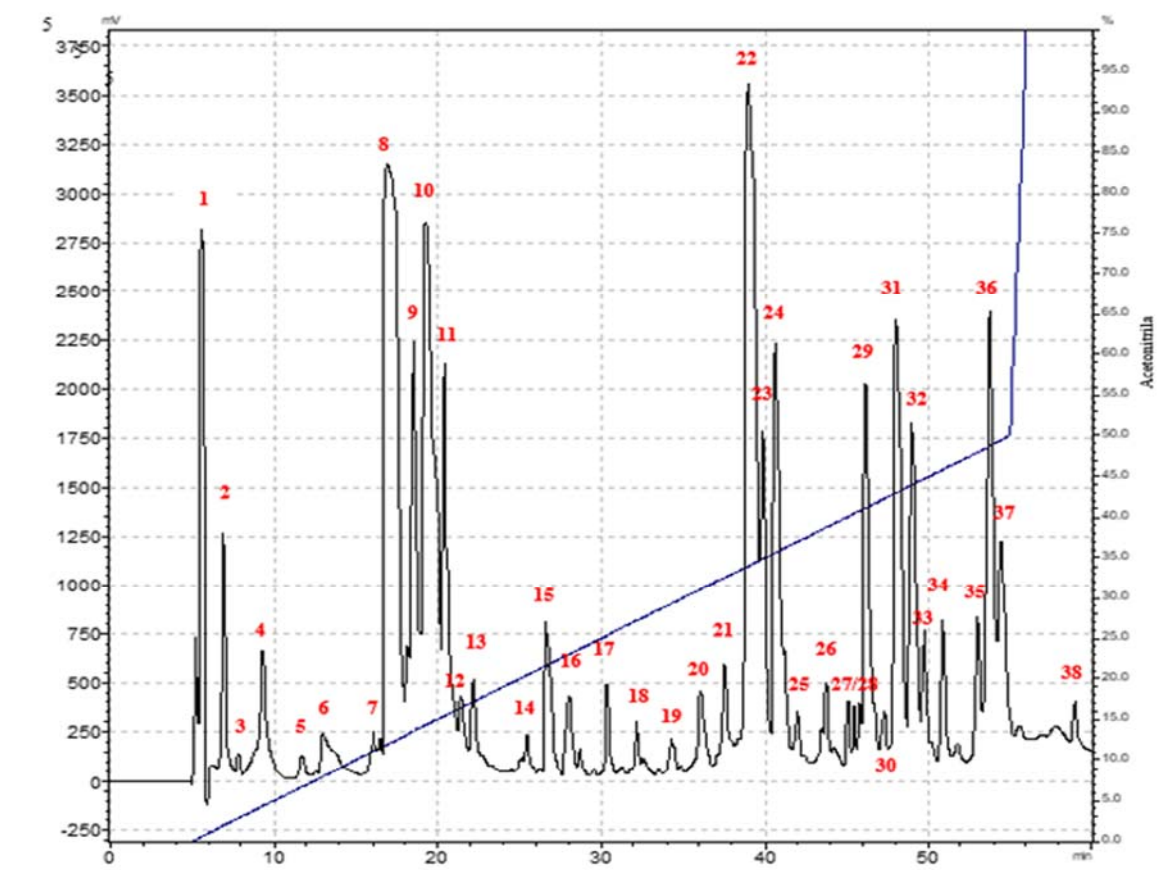
3.5. Determinação da estrutura primária dos peptídeos de *L. labyrinthicus* e análises de similaridade

A estrutura primária do peptídeo antimicrobiano isolado da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* foi determinada por degradação de Edman, em seqüenciador automático PPSQ-31A/33A (Shimadzu, Japão), de acordo com as orientações do fabricante. O programa BLASTp (disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi empregado para buscas de similaridade entre o peptídeo de 2,6 kDa de *L. labyrinthicus* e outros peptídeos antimicrobianos já descritos na literatura e para o alinhamento de duas seqüências foi empregado *EMBOSS Needle Pairwise Sequence Alignment* (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).

4. Resultados e discussão

A etapa inicial do trabalho envolveu o fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna C₈ da secreção cutânea bruta de *L. labyrinthicus*. Foram realizadas 20 corridas cromatográficas nas condições descritas no item 3.2 produzindo um perfil cromatográfico reprodutível com a eluição de 38 frações cromatográficas (Figura 5).

Figura 5: Perfil cromatográfico típico do fracionamento cromatográfico da secreção cutânea de *Leptodactylus labyrinthicus* em coluna C₈. (Vydac 208TP C8 HPLC Column, ID 10 x L 250 mm, 5 µm) em sistema HPLC com fluxo de 2,5 mL/min e detecção ao ultravioleta em 216 nm. As frações cromatográficas eluídas e coletadas manualmente estão indicadas em vermelho.



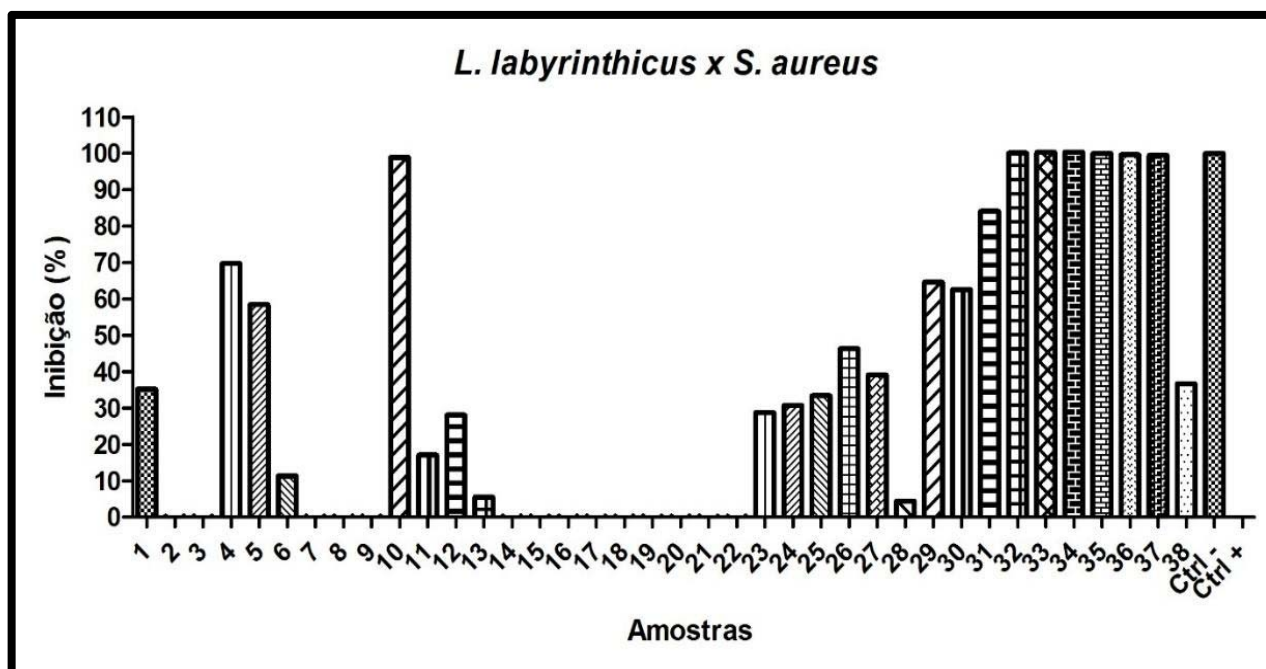
Fonte: Elaborada pelo autor.

De posse das frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da secreção bruta de *L. labyrinthicus* foi realizado um ensaio de varredura para detecção de suas atividades antimicrobianas contra as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e

Escherichia coli ATCC 25922. A inibição do crescimento bacteriano foi avaliada em ensaio de microdiluição com detecção por espectrofotometria a 620 nm.

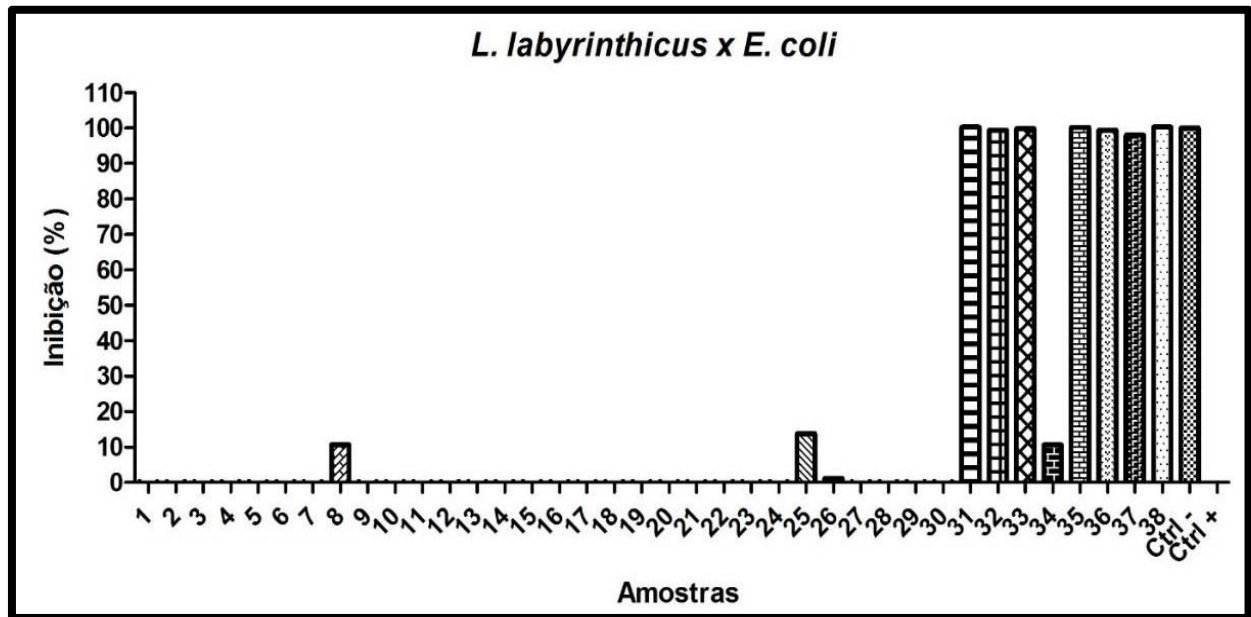
A incubação das frações com a bactéria Gram-positiva *S. aureus* evidenciou 7 frações ativas, as quais promoveram 100% de inibição do crescimento dessa bactéria após um período de 24 h; outras 4 frações exibiram inibição de, pelo menos, 50% no mesmo período de tempo (figura 6). Também foi constatada inibição de 100% promovida por 7 frações após a incubação das mesmas frações com a bactéria Gram-negativa *E. coli* (figura 7), sendo que 6 dessas frações também foram capazes de inibir na mesma proporção a bactéria *S. aureus*: frações 31, 32, 33, 35, 36 e 37. A fração 10 mostrou-se fortemente ativa apenas contra *S. aureus*, enquanto que a fração 38 foi mais ativa sobre a bactéria *E. coli*

Figura 6: Atividade inibitória das frações cromatográficas obtidas com o fracionamento cromatográfico da secreção bruta de *L. labyrinthicus* sobre a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 7: Atividade inibitória das frações cromatográficas obtidas com o fracionamento cromatográfico da secreção bruta de *L. labyrinthicus* sobre a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922).



Fonte: Elaborada pelo autor.

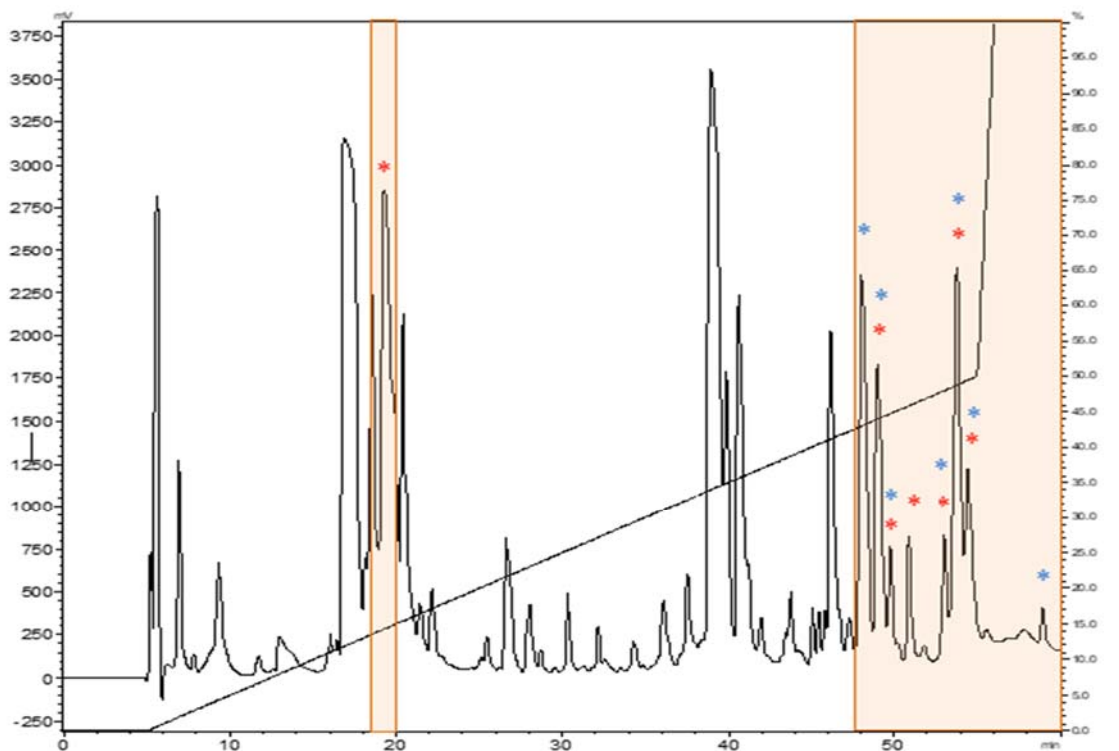
Analisando-se os resultados dos ensaios de varredura contra *E. coli* e *S. aureus* é possível observar que um número bem maior de frações mostraram-se mais ativas contra *S. aureus* quando comparado a *E. coli*. Tal ocorrência pode ser justificada pelo fato de que, no caso de bactérias Gram-negativas, além da membrana plasmática, há também uma pequena camada de lipopolissacarídeo, que representa uma camada a mais a ser ultrapassada pelo PAM (BECHINGER; GORR, 2017). O peptídeo atravessa a membrana por um mecanismo de troca de carga em que os peptídeos catiônicos competem com Ca^{2+} e Mg^{2+} ligados ao lipopolissacarídeo (ZASLOFF, 2002).

CRUZ et al. (2015) demonstraram que o fracionamento da secreção cutânea da espécie *Physalaemus nattereri*, pertencente à mesma família de *Leptodactylus labyrinthicus* – a família Leptodactylidae – apresenta um perfil cromatográfico semelhante, onde frações ativas, predominantemente de caráter hidrofóbico, apresentaram atividade antibacteriana contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

A maioria dos compostos ativos nesse estudo apresentaram características hidrofóbicas, por eluírem em concentrações maiores de acetonitrila, de acordo com o observado por ROLLINS-SMITH et al. (2005) que citam que não existem sequências específicas de aminoácidos dos PAMs presentes na pele de sapos associadas à atividade biológica, mas essas geralmente apresentam estruturas predominantemente hidrofóbicas, anfipáticas e catiônicas. Os estudos de JENSSEN et al. (2006) corroboram essa informação, afirmando que essas propriedades dos PAMs são cruciais para o efeito de permeação e lise da membrana de bactérias.

As frações cromatográficas obtidas foram denominadas LLF e aquelas que promoveram 100% de inibição, para pelo menos uma das bactérias usadas no ensaio de varredura, foram submetidas à análise por espectrometria de massas. As frações LLF-3, -4, -6, -7 e -8 foram ativas para as duas bactérias testadas. Já as frações LLF-1 e -5 promoveram inibição apenas em *S. aureus*, enquanto as frações LLF-2 e -9 se mostraram ativas apenas contra *E. coli* (tabela 2). Algumas frações cromatográficas promoveram inibição parcial, algumas vezes superiores a 50%, porém, optou-se neste momento por avançar nos estudos apenas com as frações que induziram inibição total do crescimento microbiano. A figura 8 indica graficamente as frações que promoveram 100% de inibição do crescimento bacteriano nas condições empregadas.

Figura 8: Perfil cromatográfico típico do fracionamento cromatográfico da secreção cutânea de *Leptodactylus labyrinthicus* em coluna C₈ contendo a marcação das frações que apresentaram atividade antimicrobiana. As frações contidas nos intervalos em salmão promoveram 100% de inibição no crescimento das bactérias nas condições empregadas. Os asteriscos vermelhos representam as frações com 100% de inibição sobre a bactéria *S. aureus* e os asteriscos azuis representam as frações que apresentaram 100 % de atividade inibitória sobre a bactéria *E. coli*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 2: Identificação das frações cromatográficas que exibiram 100% de inibição sobre o crescimento das bactérias nas condições empregadas.

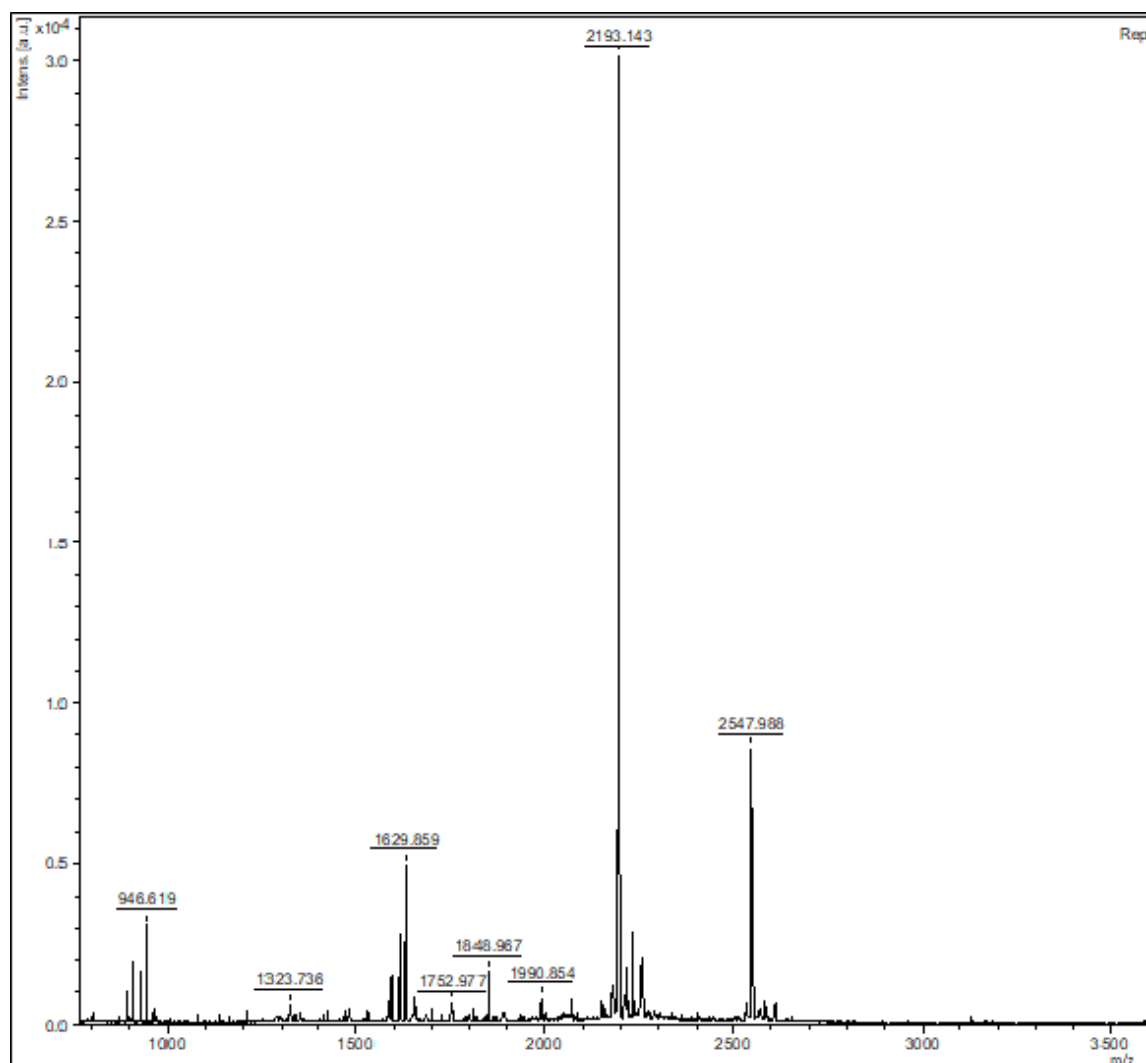
Ordem de eluição das frações cromatográficas	Tempo de Retenção (min)	Denominação
10	19.29	LLF-1
31	48.14	LLF-2
32	48.88	LLF-3
33	49.76	LLF-4
34	50,92	LLF-5
35	53.02	LLF-6
36	53.75	LLF- 7
37	54.45	LLF-8
38	58.95	LLF- 9

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como dito anteriormente, as frações cromatográficas que promoveram 100% de inibição para pelo menos uma das bactérias foram submetidas à análise por espectrometria de massas no modo de íons positivos com emprego de refletor. Dentre elas, apenas a fração LLF-1 não sofreu ionização nas condições experimentais utilizadas.

A fração LLF-2 apresentou um componente predominante com massa molecular protonada igual a 2.193,14 Da (figura 9). Tal componente provavelmente corresponde à ocelatina LB1 descrita por Gusmão et al. (2017). Também é possível observar a presença de outro componente com massa molecular protonada igual a 2.547,99 Da, com correspondência à falaxina, um PAM presente nas secreções cutâneas de *L. fallax* (Rollins-Smith et al., 2005) e de *L. labyrinthicus* (Libério et al., 2008), assim como componentes minoritários que provavelmente são contaminantes ou adutos com íons sódio e potássio.

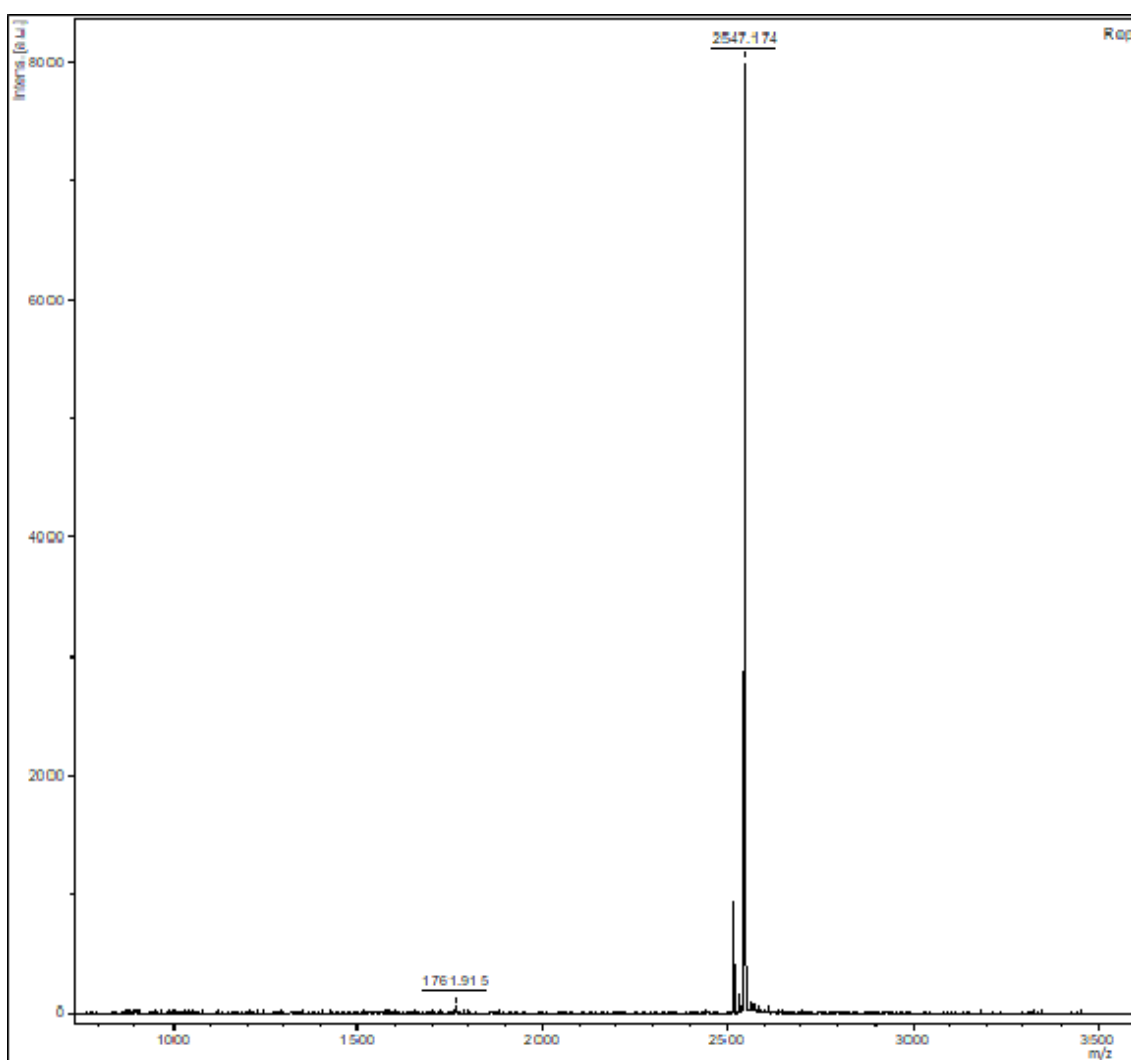
Figura 9: Espectro de massas da fração LLF-2 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).



Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise dos espectros obtidos para a fração LLF-3 (figura 10) permite observar um componente majoritário com massa molecular protonada igual a 2.547,17 Da, que pode ser associada novamente à presença do PAM falaxina. Além desse PAM, observa-se um outro componente com massa molecular protonada igual a 1.761,92 Da, que pode ser relacionada com o peptídeo leptoglicina, descrito por Souza et al. em 2009.

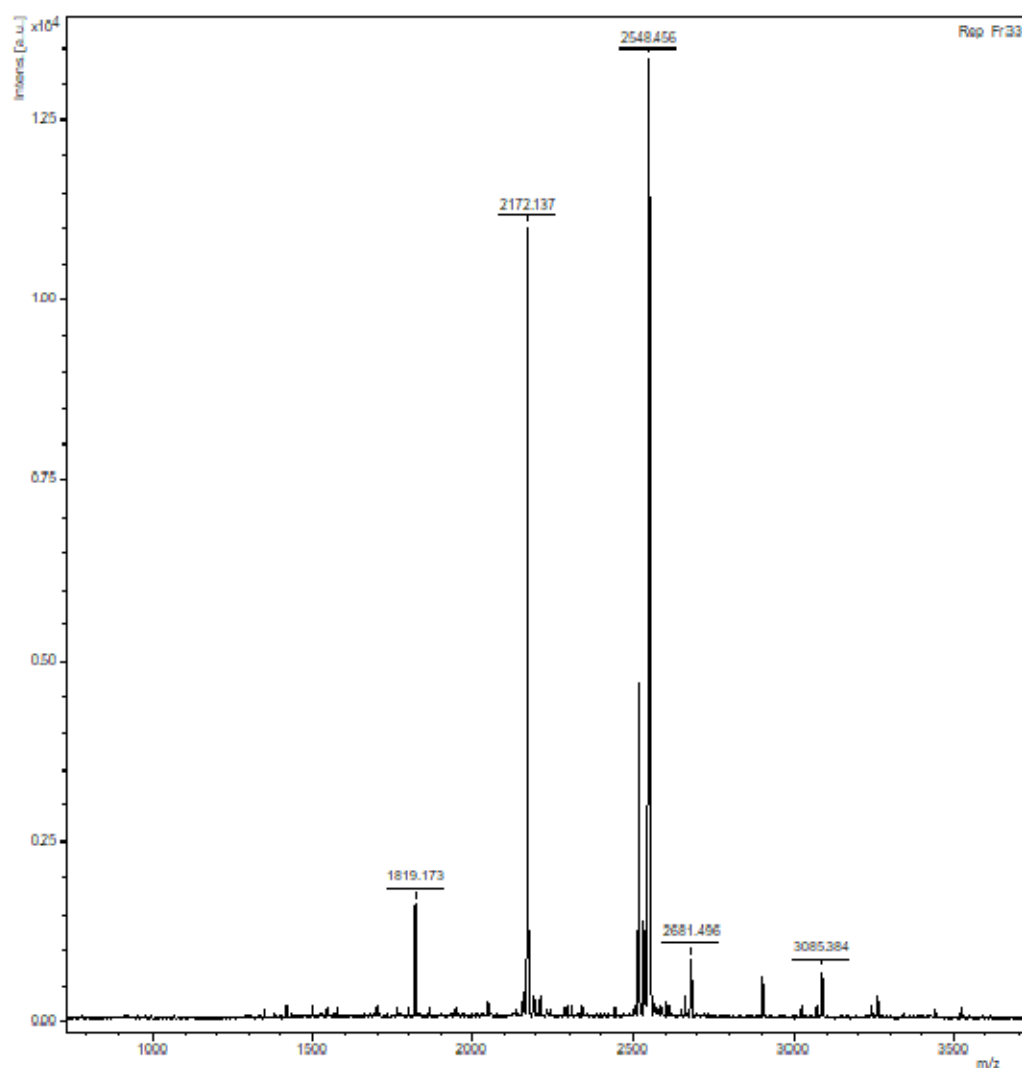
Figura 10: Espectro de massas da fração LLF-3 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).



Fonte: Elaborada pelo autor.

No caso da fração LLF-4 (figura 11), observa-se um componente majoritário com massa molecular protonada igual a 2.548,46 Da, que representa a falaxina em sua forma protonada. Além disso, observa-se um outro componente com massa molecular protonada igual a 1.819,17 Da que pode representar a leptoglicina protonada adicionada de um íon ferro (55,84 g/mol). Já o componente de massa molecular protonada igual a 2.172,14 Da pode indicar um fragmento do PAM pentadactilina protonado que sofreu clivagem proteolítica, removendo-se os três últimos aminoácidos (ELK) de sua estrutura primária. A pentadactilina é um PAM descrito por King et al. (2005) na secreção de *L. pentadactylus* e por Libério (2008) na secreção de *L. labyrinthicus*.

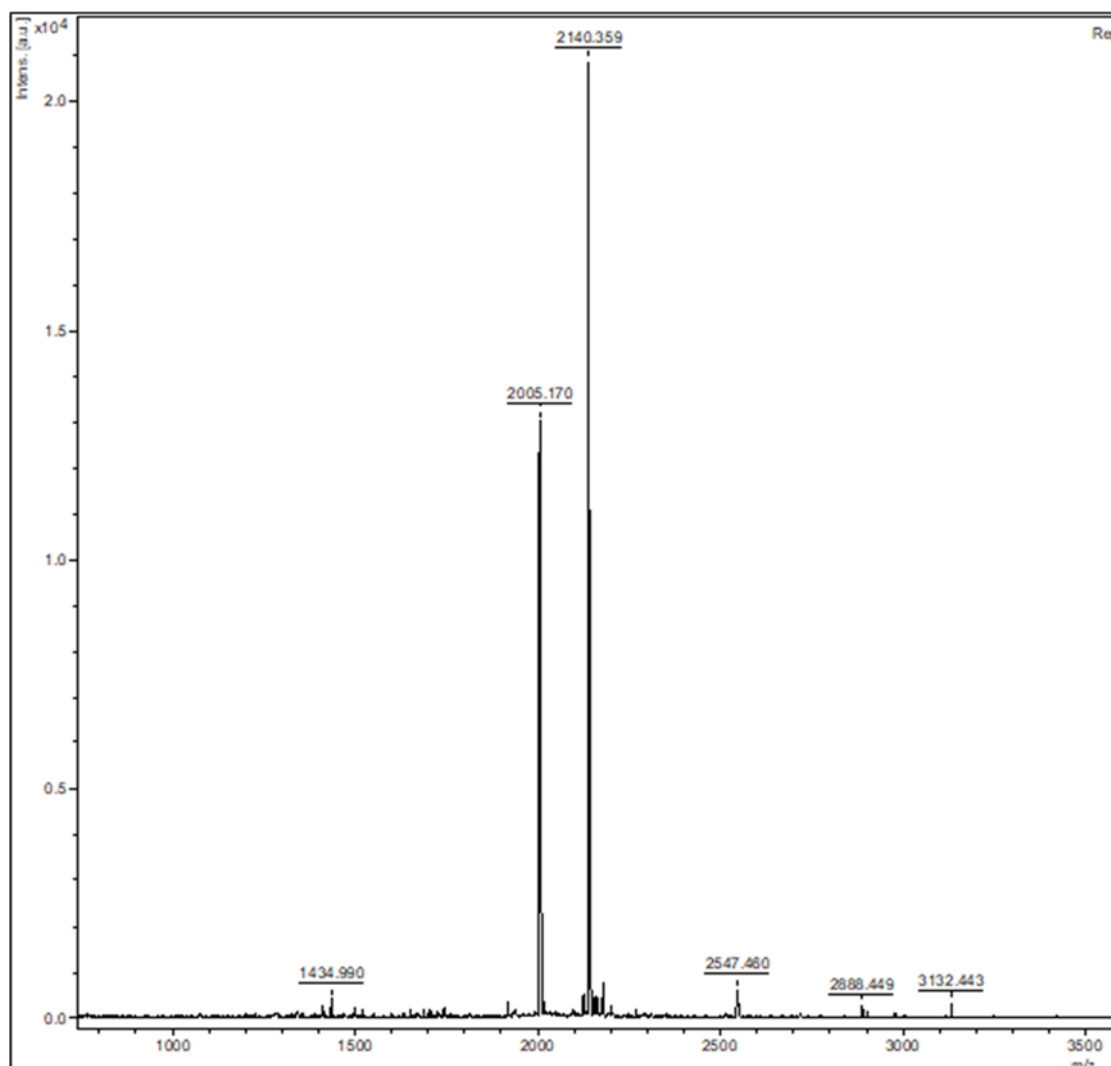
Figura 11: Espectro de massas da fração LLF-4 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na fração LLF-5 (figura 12) podem ser observados componentes majoritários com massas moleculares protonadas iguais a 2.140,36 Da e 2.005,17 Da. Até o momento, não foram descritos na literatura peptídeos isolados de anuros do gênero *Leptodactylus* com tais massas moleculares, indicando poder se tratar de novos PAMs dessa espécie. Como nessa fração co-existem os dois peptídeos, faz-se necessária realizar a sua recromatografia em uma coluna de maior poder de resolução de forma a isolar os peptídeos e avaliar suas propriedades estruturais e biológicas.

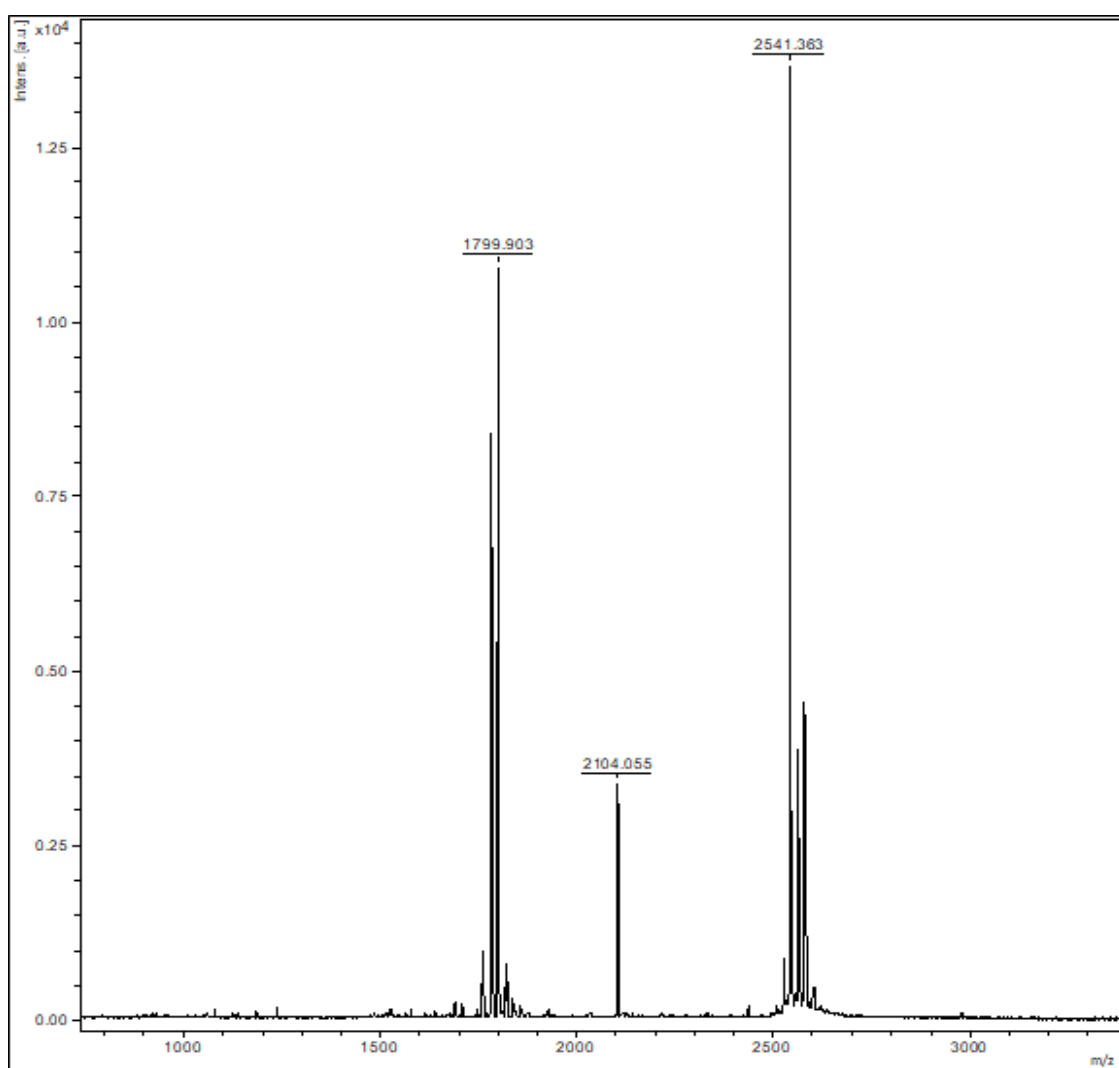
Figura 12: Espectro de massas da fração LLF-5 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Por meio da análise dos espectros de massas gerados para essa fração (figura 13), pode ser observado um componente majoritário com massa molecular protonada igual a 2.541,36 Da que deve corresponder ao PAM pentadactilina. O componente de massa molecular protonada igual a 1.799,90 Da pode representar um aduto de potássio (adição da massa molecular de 38,9 g/mol) da leptoglicina. Existe um terceiro componente minoritário com com massa molecular protonada igual a 2.104,06 Da que pode corresponder a um novo peptídeo biologicamente ativo presente nessa secreção.

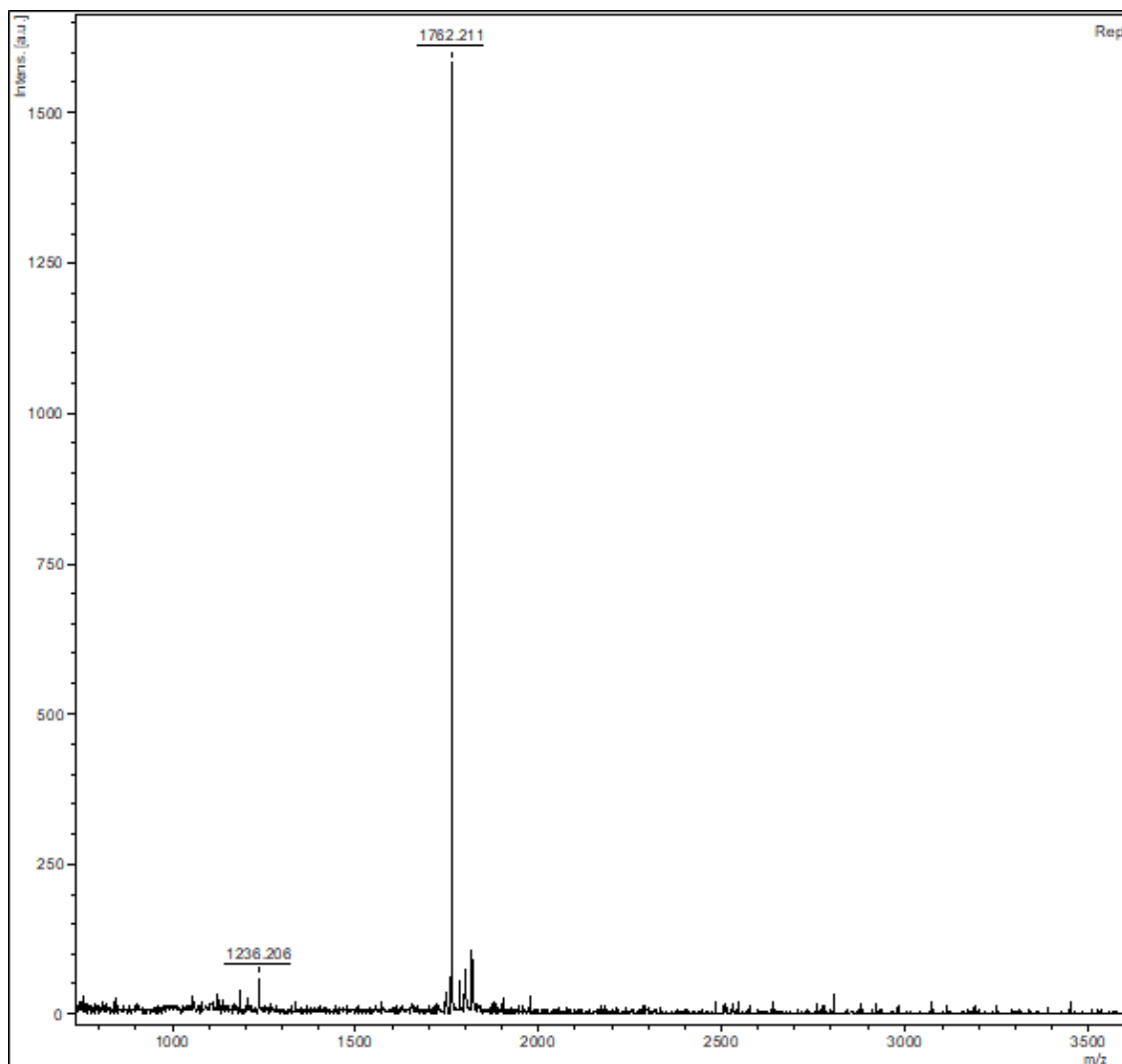
Figura 13: Espectro de massas da fração LLF-6 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).



Fonte: Elaborada pelo autor.

A fração LLF-7 exibiu um componente majoritário com massa molecular protonada igual a 1.762,21 Da , podendo ser associada à leptoglicina (figura 14).

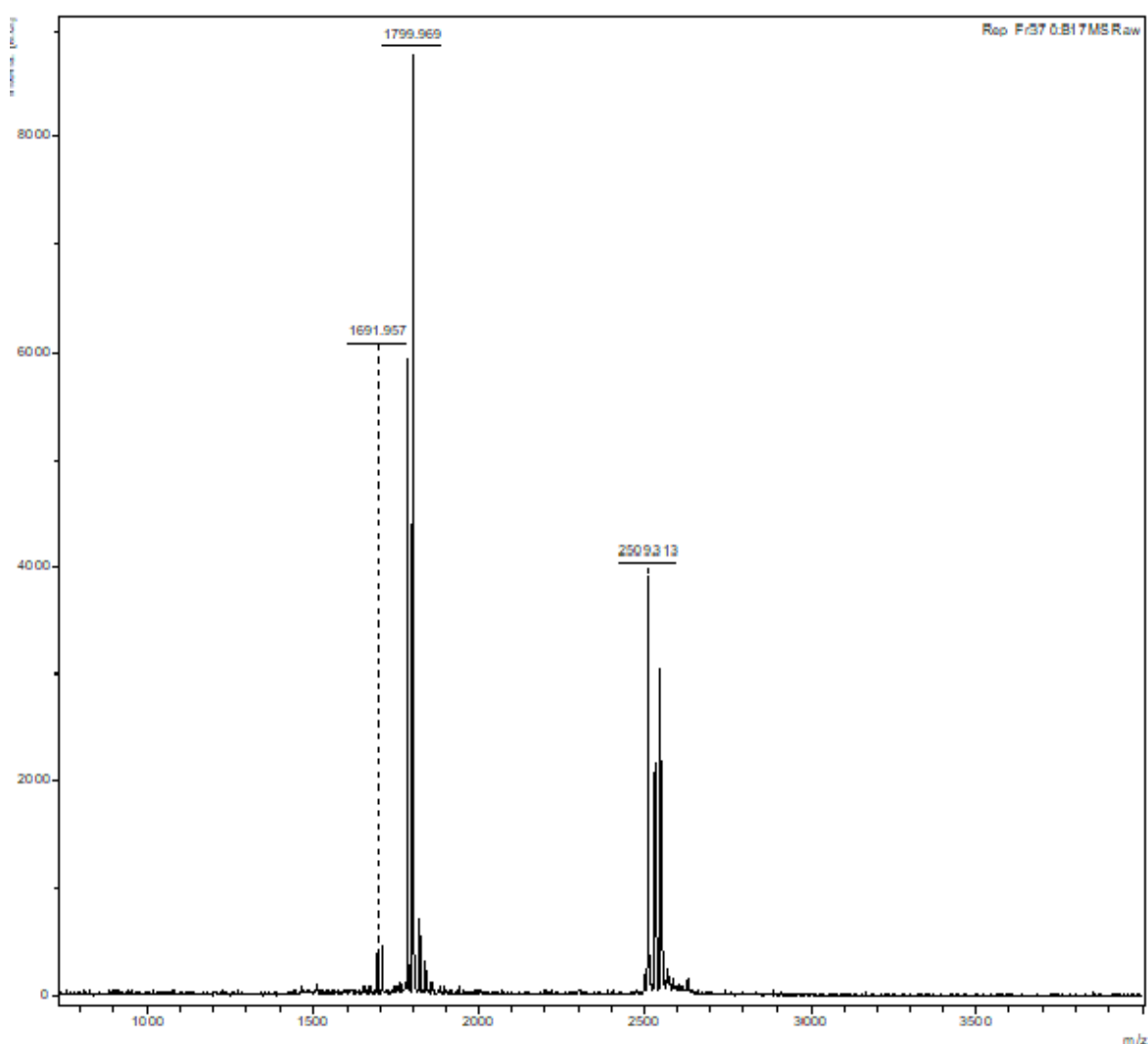
Figura 14: Espectro de massas da fração LLF-7 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na fração LLF-8 foi observada um componente majoritário com massa molecular protonada igual a 1.799,97 Da que pode representar um aduto de potássio (adição da massa molecular de 38,9 g/mol) da leptoglicina (figura 15). Os demais componentes observados não apresentam massas moleculares com correspondência com os PAMs já descritos para a espécie *L. labyrinthicus*, porém não se pode afirmar que esses componentes estejam relacionados com a atividade antimicrobiana da fração.

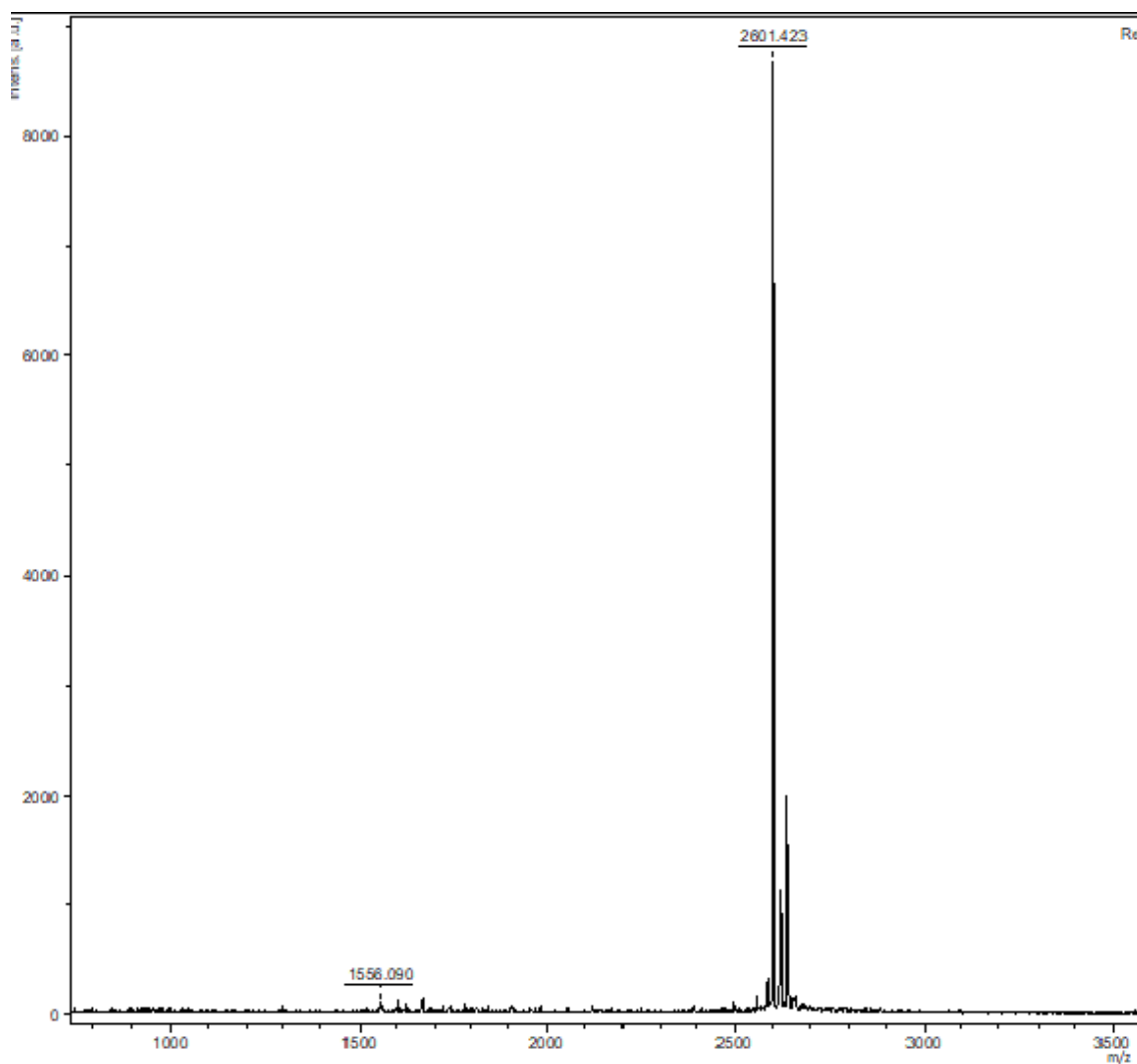
Figura 15: Espectro de massas da fração LLF-8 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Por meio da análise dos espectros de massas gerados para essa fração (figura 16), pode ser observado um componente majoritário com massa molecular protonada igual a 2.601,42 Da e, até o momento, não foram identificados componentes na secreção desse anuro com atividade antimicrobiana com massa maior que 2.547,46 Da (falaxina) indicando uma possível nova molécula com atividade antimicrobiana nessa secreção.

Figura 16: Espectro de massas da fração LLF-9 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Como o peptídeo de massa molecular protonada igual a 2.601,42 Da pode se tratar de um PAM inédito presente na secreção cutânea da rã *L. labyrinthicus*, esse peptídeo foi submetido ao sequenciamento químico por degradação de Edman, resultando em uma

5. Considerações finais e perspectivas futuras

Neste trabalho, foi possível a identificação de vários peptídeos com atividade antimicrobiana já descritos na literatura resultantes do fracionamento da secreção cutânea da rã *Leptodactylus labyrinthicus* empregando-se coluna de fase reversa C₈, tendo sido identificados os PAMs pentadactilina, falaxina, ocelatina LB1 e leptoglicina.

Foram identificadas duas frações ativas com componentes de massa molecular que não possuem equivalência com os PAMs já descritos para essa espécie: a fração LLF-5, com tempo de retenção de 50,92 min, ativa contra *S. aureus* e a fração LLF-9, ativa contra *E. coli* com tempo de retenção de 58,95 min, que resultou na identificação de um peptídeo com elevada identidade com o LASP previamente isolado da pele rã *L. fallax*, um peptídeo importante nas interações macho-macho apresentadas durante a fase de reprodução da espécie, sugerindo um papel semelhante em *L. labyrinthicus*.

Estudos adicionais devem ser conduzidos no sentido de purificar os dois componentes presentes na fração LLF-5 de modo a ser possível avançar na sua caracterização química e biológica, assim como, na caracterização biológica, incluindo-se ensaios comportamentais, com o peptídeo de 2,6 kDa de *L. labyrinthicus*.

6. Referências bibliográficas

BECHINGER, B.; GORR, S. Antimicrobial peptides: Mechanisms of action and resistance. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 3, p. 254-260, 2017.

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

CHAGAS, A. Purificação e avaliação da atividade anti-Candida de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*. Purificação e avaliação da atividade anti-Candida de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies. Universidade de Brasília. 2014.

CONLON, J.M.; MECHKARSKA, M.; LUKIC, M.L.; FLATT, P.R. Potential therapeutic applications of multifunctional host-defense peptides from frog skin as anti-cancer, anti-viral, immunomodulatory, and anti-diabetic agents. **Peptides**, v. 57, p. 67-77, 2014.

CRUZ, A. et al. Cytotoxic activity and antiproliferative effects of crude skin secretion from *Physalaemus nattereri* (Anura: Leptodactylidae) on in vitro melanoma cells. **Toxins**, v. 7, n. 10, p. 3989–4005, 2015.

DEMORI, I. et al. Peptides for skin protection and healing in amphibians. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. E347, 2019.

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

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (21/11/29). Electronic Database accessible at:<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA. 2016. Acesso em 22/11/2019.

GIANGASPERO, A.; SANDRI, L.; TOSSI, A. Amphipathic alpha antimicrobial peptides. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 5589–5600, 2001.

GUSMÃO, K. A. G. et al. Ocellatin peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus labyrinthicus* (Leptodactylidae): Characterization, antimicrobial activities and membrane interactions. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 1–14, 2017.

HASHIM, M. H.; ALKHAFAJI, M. H. Antibiotics resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. **Al-Nisour Journal for Medical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 65–71, 2019.

HUANG, H. W. Free energies of molecular bound states in lipid bilayers: lethal concentrations of antimicrobial peptides. **Biophysical Journal**, v. 96, n. 8, p. 3263–3272, 2009.

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

KING, J. D.; ROLLINS-SMITH, L. A.; NIELSEN, P. F.; JOHN, A.; CONLON, J. M. Characterization of a peptide from skin secretions of male specimens of the frog, *Leptodactylus fallax* that stimulates aggression in male frogs. **Peptides**, v. 26, p 597-601, 2005.

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

LADRAM, A.; NICOLAS, P. Antimicrobial peptides from frog skin: Biodiversity and therapeutic promises. **Frontiers in Bioscience, Landmark Edition**, v. 21, p. 1341–1371, 2016.

LIBÉRIO, M. S. Caracterização química e biológica da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus*: Peptídeos antimicrobianos e anticarcinogênicos, fosfolipases e peptidases. **Universidade de Brasília**, 2008.

LIBÉRIO, M. S. et al. Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. **Amino Acids**, v. 40, n. 1, p. 51–59, 2011.

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

PATRIDGE, E. et al. natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 204–207, 2016.

PRÍAS MÁRQUEZ, C. Purificação e caracterização de um análogo da Ocelatina - P1 isolado da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus*. p. **Universidade de Brasília**, 2012.

RAHNAMAEIAN, M. Antimicrobial peptides Modes of mechanism, modulation of defense responses. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 9, p. 1325–1332, 2011.

RAMAMOORTHY, A. Beyond NMR spectra of antimicrobial peptides: Dynamical images at atomic resolution and functional insights. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 35, n. 4, p. 201–207, 2009.

ROBERTS, M. C. Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. **October**, 2018.

RODRÍGUEZ, C. et al. Toxins and pharmacologically active compounds from species of the family Bufonidae (Amphibia, Anura). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 235-254, 2016.

ROLLINS-SMITH, L. A. et al. An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura:Leptodactylidae). **Regulatory Peptides**, v. 124, n. 1–3, p. 173–178, 2005.

SENGUPTA, D.; LEONTIADOU, H.; MARK, A. E.; MARRINK, S.-J. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, n. 10, p. 2308-2317. 2008.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial. **Biopolymers**, v. 66, n.4, p. 236–248, 2002.

SHAI, Y.; OREN, Z. From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. **Peptides**. v. 22, n. 10, p. 1629-1641. 2001.

SOUSA, J. C. et al. Leptoglycin : A new Glycine/Leucine-rich antimicrobial peptide isolated from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus pentadactylus* (Leptodactylidae). **Toxicon**, v. 54, p. 23–32, 2009.

SPELLBERG, B.; GILBERT, D. N. The future of antibiotics and resistance: A tribute to a career of leadership by John Bartlett. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59 p. 71–75, 2014.

SPELLBERG, B.; POWERS, J. H.; BRASS, E. P.; MILLER, L. G.; EDWARDS, J. E. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 9, p. 1279-1286. 2004.

TEIXEIRA, S. Morfologia do tegumento de anfíbios anuros da mata atlântica e sua aplicação em estudos comportamentais. **Universidade de Viçosa**, 2014.

TOKE, O. Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. **Biopolymers**, v. 80, n. 6, p. 717–735, 2005.

ZANIN, L. P. M. Novos peptídeos sintéticos e estudo da interação com membranas modelo: Efeito de modificações no N- terminal na atividade lítica e antimicrobiana. **Universidade Estadual Paulista Júlio de Mequista Filho**, 2014.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms: My perspective. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1117, p. 3–6, 2002.