

Estudo da Herpetofauna Brasileira

Daiane Patricia Oldiges
(Organizadora)



 **Atena**
Editora

Ano 2018

Daiane Patricia Oldiges
(Organizadora)

Estudo da Herpetofauna Brasileira

Atena Editora
2018

2018 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Geraldo Alves e Natália Sandrini

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie di Maria Ausiliatrice
Profª Drª Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

E82 Estudo da herpetofauna brasileira [recurso eletrônico] / Organizadora Daiane Patricia Oldiges. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2018.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
ISBN 978-85-85107-61-1
DOI 10.22533/at.ed.611182310

1. Anfíbios – Ecologia – Brasil. 2. Répteis – Ecologia – Brasil.
3. Zoologia. I. Oldiges, Daiane Patricia.

CDD 591.5

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo do livro e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2018

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A herpetologia trata do ramo da zoologia responsável pelo estudo de répteis e anfíbios, abordando temas como classificação, fisiologia e comportamento, entre outros. Atuando tanto como presa quanto como predador na complexa rede de interações ecológicas, os répteis e anfíbios são fundamentais para o funcionamento adequado dos ecossistemas - aquático e terrestre.

Dentro da herpetologia, o estudo ecológico de répteis e anfíbios é um campo bastante amplo, no qual são analisadas características como interações sociais, comportamento no ambiente, distribuição e conservação das espécies. Tais animais são capazes de povoar uma ampla gama de ambientes, com grande variedade de concentração de solutos, temperatura e fontes de alimentos. Por serem bastante sensíveis a alterações nos mesmos, em sua grande maioria decorrentes da intervenção humana, e dada a grande área de povoamento se tornam importantes bioindicadores ambientais.

Estudar esses organismos é fundamental para promover sua conservação, e, conseqüentemente, a manutenção do equilíbrio do ecossistema como um todo. Não devemos, no entanto, esquecer do impacto direto que a pesquisa de répteis e anfíbios exerce sobre o desenvolvimento do estudo científico. Estes animais apresentam um grande potencial biotecnológico, tendo em vista que as secreções por eles produzidas são uma inestimável fonte de novas moléculas, ou mesmo de análogos de moléculas já existentes, que podem auxiliar o desenvolvimento de novos fármacos.

A presente obra se trata de uma coletânea de textos, e apresenta em seus 6 capítulos novas informações na área de herpetologia, tendo como foco a ecologia destes animais e o potencial biotecnológico do estudo dos mesmos. Por fim, esperamos que este livro possa colaborar e instigar mais estudantes e pesquisadores na constante busca de novas tecnologias para esta interessante área de conhecimento.

Daiane Patricia Oldiges

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE <i>Dermatonotus muelleri</i> UTILIZANDO OS MÉTODOS DE ELETROFORESE (SDS-PAGE) E ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF)	
Luiz Humberto Guimarães Riquelme Junior	
Marcos Antonio Ferreira	
Breno Emanuel Farias Frihling	
Fernanda de Cássia Gonçalves Alves	
Paula Helena Santa Rita	
Newton Valério Verbisck	
Ludovico Migliolo	
CAPÍTULO 2	12
EFEITO DA FOSFOLIPASE PRESENTE NA TOXINA DE <i>Bothrops moojeni</i> FRENTE A BIOFILME DE <i>Staphylococcus aureus</i>	
Breno Emanuel Farias Frihling	
Patrícia Souza e Silva	
Guilherme Augusto Abrantes	
Odaias Pereira Almeida Filho	
Elizangela de Barros	
Paula Helena Santa Rita	
Luiz Humberto Guimarães Riquelme Junior	
Ludovico Migliolo	
CAPÍTULO 3	27
EVALUATION OF THE OXIDATIVE STRESS USING BIOMARKER MALONDIALDEHYDE IN ATRETTIC EGGS OF BRAZILIAN SNAKES FROM <i>Bothrops</i> genus.	
Poliana Garcia Corrêa	
Giuseppe Puerto	
Daniel da Conceição Rabelo	
Rosely Cabette Barbosa Alves	
Durvanei Augusto Maria	
CAPÍTULO 4	42
NOVOS REGISTROS DE OCORRÊNCIA DE <i>Trachemys dorbigni</i> (Emydidae, Testudines) NO BRASIL	
Juliana Rosa Matias Ciccheto	
Carlos Eduardo Vargas Grou	
Sabine Borges da Rocha	
CAPÍTULO 5	51
HISTÓRIA NATURAL DE <i>HEMIDACTYLUS AGRIUS</i> VANZOLINI, 1978 (SQUAMATA: GEKKONIDAE) EM UMA ÁREA DE CARNAUBAL NO MUNICÍPIO DE ACARAÚ, CE	
Francisco Ageu Ribeiro do Nascimento	
Osmalene Mayara de Souza	
Graziella Macêdo Batista	
Raíla Brena Araújo	
Francisco Robson Carvalho de Oliveira	
Maria Juliana Miranda Silva	
Robério Mires de Freitas	
Amaurício Lopes Rocha Brandão	

CAPÍTULO 6 69

EDUCAÇÃO AMBIENTAL COM OS TURISTAS DO PARNA DE UBAJARA SOBRE A HERPETOFAUNA

Raíla Brena Araújo

Graziella Macêdo Batista

Ingrid Andrade Pereira

Amaurício Lopes Rocha Brandão

SOBRE A ORGANIZADORA..... 77

ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE *Dermatonotus muelleri* UTILIZANDO OS MÉTODOS DE ELETROFORESE (SDS-PAGE) E ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF)

Luiz Humberto Guimarães Riquelme Junior

Universidade Católica Dom Bosco Campo Grande
– MS

Marcos Antonio Ferreira

Universidade Católica Dom Bosco Campo Grande
– MS

Breno Emanuel Farias Frihling

Universidade Católica Dom Bosco Campo Grande
– MS

Fernanda de Cássia Gonçalves Alves

Universidade Católica Dom Bosco Campo Grande
– MS

Paula Helena Santa Rita

Universidade Católica Dom Bosco Campo Grande
– MS

Newton Valério Verbisck

Embrapa Gado de Corte Campo Grande – MS

Ludovico Migliolo

Universidade Católica Dom Bosco Campo Grande
– MS

RESUMO: A eficácia dos antibióticos no combate a infecções nas primeiras décadas do século XX apresentou sucesso, no entanto, as bactérias adaptam-se às mudanças que ocorrem em seu ambiente de forma rápida, desenvolvendo mecanismos de resistência aos antibióticos convencionais. A biotecnologia propõe novas abordagens por meio da bioprospecção de toxinas de animais, como

anfíbios, a qual pode possibilitar a produção de novos fármacos bioinspirados nas moléculas encontradas e caracterizadas bioquimicamente. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi analisar o perfil proteico da secreção cutânea do anuro *Dermatonotus muelleri* utilizando os métodos de Eletroforese SDS-PAGE e Espectrometria de Massa com matriz ácido sinapínico. O perfil eletroforético demonstrou 16 bandas proteicas onde as majoritárias foram de 205, 30, 14 e 21 kDa. Já o perfil obtido por meio de espectrometria demonstrou quatro peptídeos, onde dois foram relacionados com os resultados observados por eletroforese. Diante dos resultados obtidos concluímos que os dois métodos, apresentou o perfil proteico da secreção cutânea do *D. muelleri*, sendo que cada método com suas características é específico para um determinado espectro de massa molecular. Para SDS-PAGE para visualizar moléculas de alto peso molecular e MALDI-ToF para a detecção das massas moleculares menores que 10 kDa. Isso, portanto não descarta nenhuma das técnicas e o uso de forma complementar aumenta a confiabilidade dos resultados.

PALAVRAS CHAVES: Bioprospecção; Proteína; Anfíbio.

ABSTRACT: The effectiveness of antibiotics to combat infections in the first decades of the

twentieth century was successful, however, bacteria adapt to the changes that occur in their environment quickly, developing mechanisms of resistance to conventional antibiotics. Biotechnology proposes new approaches through the bioprospection of animal toxins, such as amphibians, which may enable the production of new bio-inspired drugs in the molecules found and characterized biochemically. Thus, the objective of this work was to analyze the protein profile of the skin secretion of the anuran *Dermatonotus muelleri* using SDS-PAGE Electrophoresis and Mass Spectrometry with synapinic acid matrix. The electrophoretic profile showed 16 protein bands where the majority were 205, 30, 14 and 21 kDa. The profile obtained by means of spectrometry showed four peptides, where two were related to the results observed by electrophoresis. In view of the obtained results, we conclude that the two methods presented the protein profile of the skin secretion of *D. muelleri*, and each method with its characteristics are specific for a given molecular mass spectrum. For SDS- PAGE to visualize high molecular weight molecules and MALDI-ToF for the detection of molecular masses less than 10 kDa. This therefore does not rule out any of the techniques and the use of complementary form increases the reliability of the results.

KEYWORDS: Bioprospection; Protein; Amphibian.

1 | INTRODUÇÃO

A eficácia dos antibióticos no combate a infecções nas primeiras décadas do século XX teve tanto sucesso que levou a uma confiança quase que total, levando a perspectiva que as infecções seriam resolvidas (GARCIA- REY, 2010). No entanto, as bactérias, assim como os demais seres vivos, adequam-se às mudanças que ocorrem em seu ambiente e um dos resultados é a resistência a antibióticos (PEREIRA, 2015).

Isso Fleming já havia percebido ao descobrir a penicilina em 1929, descobrindo que naturalmente os microrganismos são dotados de resistência aos antibióticos (DRAGO, 2007). Essa resistência funciona via trocas de genes onde alguns microrganismos que adquiriram mutações em seu DNA, devido já ter uma sensibilidade a algum fármaco, transferirão a outros microrganismos incorporando no seu conteúdo genético genes que ajudaram a resistir aos antibióticos (BETANCOURT et al., 2003).

Associado a esse fenômeno está o uso indiscriminado de antibióticos via automedicação da população e dentro dos hospitais, muitas vezes devido a diagnósticos imprecisos ou a medicação intensiva (WANNMACHER, 2004). Isso tem intensificado a seleção de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos existentes. Segundo Behzadnia e colaboradores (2014), mundialmente cerca de 9% dos pacientes hospitalizados são afetados por bactérias que apresentam algum tipo de resistência.

Nessa perspectiva, percebe-se a necessidade de novos fármacos antimicrobianos e, a otimização dos princípios ativos das classes já existentes é de suma importância para o combate de microrganismos patogênicos, algo que a biotecnologia, com ênfase na bioquímica e microbiologia, vem propondo: novas abordagens na produção

de novas alternativas a antibióticos provenientes de produtos naturais como proteínas e/ou peptídeos isolados de toxinas animais como serpentes, escorpiões, insetos, aracnídeos e anfíbios (BRITO; CORDEIRO, 2012).

Atualmente são conhecidas 7.886 espécies de anfíbios no mundo (AMPHIBIAWEB, 2018) tendo o Brasil um lugar de destaque na biodiversidade desses animais com 1080 espécies distribuindo-se em 36 Gymnophiona, cinco Caudata e 1039 Anura (SEGALLA et al., 2016). A pele dos anfíbios desempenha funções extremamente importantes para sua sobrevivência em diversos nichos ecológicos, como a respiração, regulação hídrica, excreção, controle de temperatura, dimorfismo sexual, camuflagem, entre outros (CLARKE, 1997), sendo considerados excelentes bioindicadores ecológicos da qualidade do ambiente (STEBBINS; COHEN, 1995; SILVA, 2004). Além disso, a secreção de suas peles demonstra grande diversidade molecular que podem lisar fungos, vírus, protozoários e bactérias que entram em contato com sua pele, permitindo uma proteção química contra esses microrganismos e também predadores (SIMMACO et al., 2009).

O estudo da composição das secreções glandulares de anfíbios não é recente. Segundo Habermehl e colaboradores (1981), desde a década de 80 esses compostos vêm sendo estudados. De acordo com Clarke (1997) e Tyler e colaboradores, (1992) a diversidade de substâncias bioativas encontradas nas secreções cutâneas dos anfíbios inclui além de esteróides e alcalóides, peptídeos bioativos com propriedades antimicrobianas.

Estão presentes também as aminas biogênicas: adrenalina, noradrenalina e dopamina (JARED et al., 2009). Além da atividade antimicrobiana, do ponto de vista farmacológico, esses compostos podem também apresentar efeitos: miotóxicos, neurotóxicos, cardiotoxicos, hemotóxicos, colinomiméticos ou simpatomiméticos e vaso constritores sobre mamíferos de pequeno porte (HABERMEHL, 1981; JARED et al., 2009).

As espécies da família Microhylidae, cujo *Dermatonotus muelleri* faz parte, possuem ampla diversidade morfológica e comportamental tendo como exemplo do próprio *D. muelleri* o nicho fossório. O focinho pontiagudo e a capacidade de movimentar a cabeça para cima e para baixo permite ao animal realizar escavações, além das patas robustas e o corpo arredondado (formato “*orbe-like*”), diferente de outros microhylídeos como do gênero *Elachistocleis*, facilitam a escavação. *Dermatonotus muelleri* é a única espécie do gênero encontrada na América do Sul, tem uma reprodução explosiva, frequentemente com os machos vocalizando por cinco dias em todo o período reprodutivo. Esta espécie apresenta resistência e conseguem sobreviver em temporadas de secas e escassez de alimentos por meio da sua especialização onde os alimentos são retirados do subterrâneo (NOMURA, 2003).

Estudos feitos com anuros da família Microhylidae são escassos, principalmente com a vertente das secreções cutâneas. Como exemplo, pode ser citado a espécie *Dyscophyus guineti* (sapo tomate), onde foi encontrada em sua secreção cutânea

inibidores de peptidase serínicas tipo Kunitz, representando ser um componente da estratégia para defesa desse animal contra micro e/ou macro predadores (CONLON; KIM, 2000).

Com a resistência dos microrganismos as moléculas bioativas adquiridas da exploração bioquímica cutânea de anfíbios anuros representa alternativa para o desenvolvimento de biofármacos com atividade antimicrobiana. Diante do exposto até o momento esse trabalho teve por objetivo analisar o perfil proteico da secreção cutânea do anuro *Dermatonotus muelleri* e comparar as massas moleculares dos resultados apresentados por meio de SDS-PAGE e MALDI-ToF.

2 | METODOLOGIA

Para esse trabalho, foram utilizados três indivíduos de *Dermatonotus muelleri* (Figura 1) doados por populares e acondicionados no Biotério da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB). Os animais foram mantidos juntos em caixas organizadoras da marca Sanremo® com tamanhos de 38,5 X 37 X 56 cm. A caixa conteve como substrato areia com dimensão fina (125 a 250 μm) uma vez que essa espécie tem um nicho fossório, vegetação artificial e um recipiente de 500 ml com água *ad libitum*. A temperatura foi mantida entre 25 e 27°C e a umidade em torno de 60 a 70%. Para alimentação, foram fornecidos artrópodes da ordem Blattodea.



Figura 1. Indivíduo de *D. muelleri* doado ao Biotério/UCDB por populares.

2.1 Extração e obtenção da secreção cutânea

A obtenção da secreção cutânea dos animais foi por meio da eletroestimulação (TYLER et al., 1992) dorsal com uma bateria alcalina de 9V, ligada a dois fios de cobre onde foram tocados no dorso do animal por três vezes sendo cinco segundos cada, fazendo com que por meio da compressão corpórea, estimula-se as glândulas de

veneno, liberando a toxina juntamente com o muco fabricado pelas glândulas mucosas. Toda substância secretada pelo animal foi rapidamente lavada com água Milli-Q até que toda a secreção liberada desprendesse da pele e armazenada em um Becker de 500 mL. Após a extração, a secreção foi transferida para tubos de polietileno de 50 mL e congelados a -80°C (Ultra Freezer) para liofilização.

2.2 Quantificação proteica

Após a liofilização as amostras foram ressuspensas no volume mínimo com água Milli-Q e centrifugadas a 11000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi retirado e armazenado em tubo de polipropileno de 2mL, sendo posteriormente quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

2.3 Perfil eletroforético por SDS-PAGE

A separação das proteínas das toxinas extraídas foi realizada por meio da técnica de eletroforese em SDS-PAGE conforme o método de Laemmli (1970). O gel desnaturante foi preparado nas concentrações de 12%. Para a comparação das massas moleculares, foi utilizado o marcador padrão da PROMEGA[®] (*The Broad Range Protein Molecular Weight Markers*) o qual possui massas moleculares com 205, 116, 97, 80, 66, 55, 45, 30, 21, 14 e 6,5 kDa). A corrida foi realizada nas seguintes condições: 80v, durante aproximadamente 3h. Após o término das corridas, os géis foram corados com a solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Sigma-Aldrich).

2.4 Espectrometria de Massa

O extrato bruto liofilizado foi solubilizado em água Milli-Q, misturados em uma solução saturada de uma matriz constituída por ácido sinapínico (SA), depositado em uma placa do tipo MTP 384 *massive* e secos a temperatura ambiente. Os compostos tiveram suas massas moleculares exatas determinadas, utilizando um espectrômetro de massa do tipo MALDI ToF Smart Bean III (Bruker Daltonics). Os espectros foram calibrados externamente com insulina (5,8 kDa). Os valores de massa molecular obtidos foram plotados em planilha para comparação com os valores experimentais observados em SDS-PAGE.

3 | RESULTADO E DISCUSSÃO

A eletroestimulação leve foi eficiente para a aquisição da secreção dos três *D. muelleri*, onde após a ressuspensão foi obtido 5mL de amostra (Figura 2A), Esse método de extração possibilita que todas as glândulas do animal, mucosas e granulosas, sejam contraídas e estimuladas sem causar lesões, além promover o uso de um indivíduo facilitando a conservação desses animais, uma vez que antigamente eram-se usados

centenas de indivíduos, retirando sua pele para obter a secreção cutânea (KONIG et a., 2015). Além disso, essa extração promoveu pouco manejo do indivíduo diminuindo ainda mais o contato com a mão do manejador. O método convencional de extração, o mecânico, que são massagens feitas no animal a fim de perturba-lo para que saia a secreção, faz com que o manejador tenha muita amostra perdida aderida nas luvas, já a eletroestimulação, onde em seguida o animal é lavado com água, reduz o contato da secreção com as luvas, permitindo perder menos amostras.

Após a extração os animais foram devolvidos ao cativeiro imediatamente onde começaram a escavar e se enterrar, demonstrando nenhuma lesão ou anormalidade em seu comportamento fossório (Figura 2B).



Figura 2. (A) Eletroestimulação branda para aquisição da secreção cutânea de *D. muelleri* por meio de baterias de 9V. (B) Cativeiro semiextensivo do *D. muelleri* com substrato areia (cinco cm de profundidades), vegetação artificial e água *ad libitum*.

Na quantificação proteica pelo método de Bradford, apresentou uma curva de calibração (Figura 3) com cinco pontos e R^2 igual a 0,97. Com a extração utilizando eletroestimulação foi possível obter uma concentração proteica de $190 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

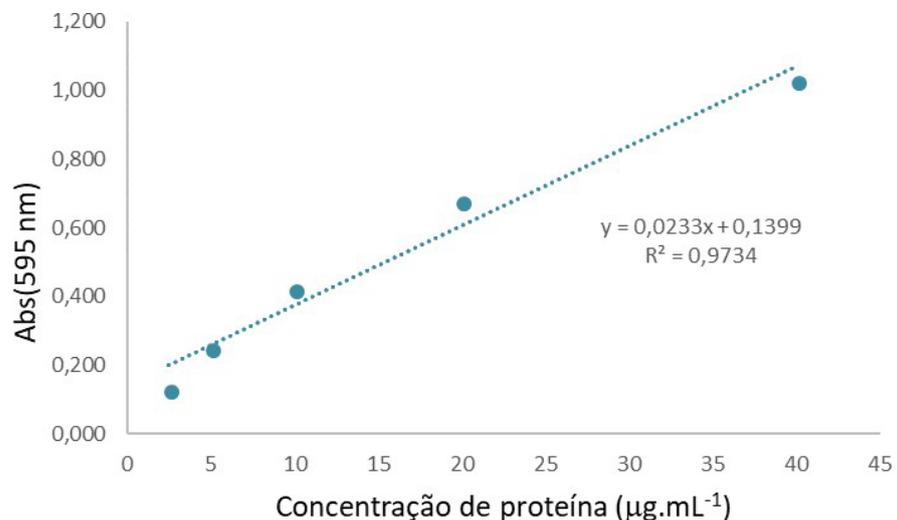


Figura 3. Curva de calibração para quantificação utilizando o método de Bradford, tendo a proteína Albumina como padrão. Os cinco pontos demonstram valores limites para o cálculo do R quadrado. A equação da reta foi utilizada para quantificar as amostras extraídas da secreção cutânea de *D. muelleri*.

Os resultados com SDS-PAGE mostraram 16 bandas proteicas (Figura 4), sendo distribuídas em três zonas de bandejamento proteico: a primeira variando de 55 a 205 kDa, a segunda de 21 a 55 kDa e a terceira abaixo de 21 kDa. As bandas proteicas majoritárias no primeiro grupo foi de 205 kDa. No segundo grupo destacaram-se uma banda de 30 kDa e outra de 50 kDa. No terceiro grupo as mais evidentes foram de 14 e 21 kDa.

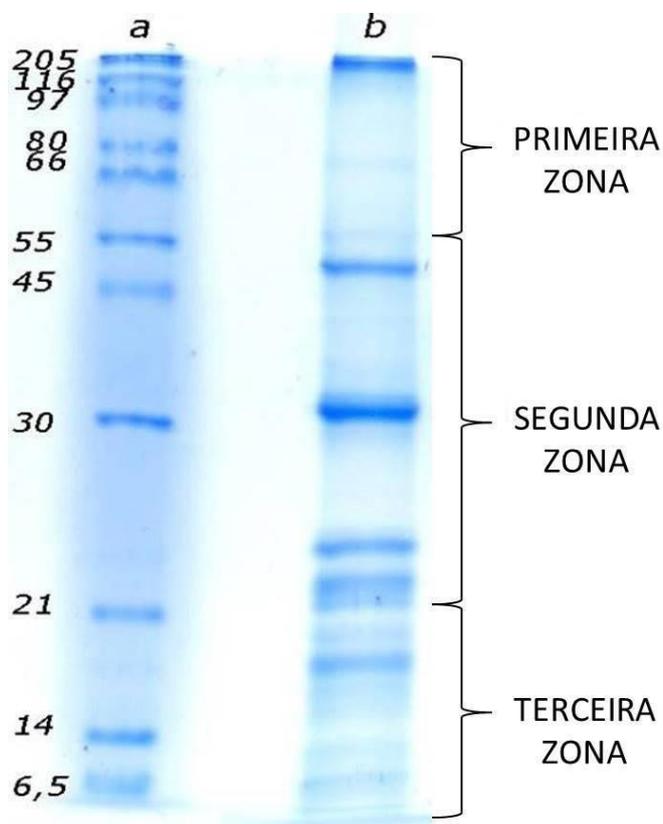


Figura 4. SDS-PAGE 12% corado por *Comanssie Brilliant Blue* e dividido em três zonas de bandejamento proteico: (A) Marcador molecular; (B) Amostra da secreção cutânea de *D. muelleri*, ambos na unidade de kDa.

Na espectrometria de massa os resultados demonstraram quatro massas moleculares de peptídeos sendo 3,13; 3,88; 5,24 e 6,97 kDa os íons que mais se destacaram devido a sua ionização realizada pela matriz ácido sinapínico. Os dois primeiros foram observados no SDS-PAGE, entretanto foi possível visualizar duas massas moleculares menores que 6,5 kDa demonstradas no SDS-PAGE sugerindo que sejam os íons identificados na espectrometria de massa que são o de 5,24 e 6,97 kDa (Figura 5).

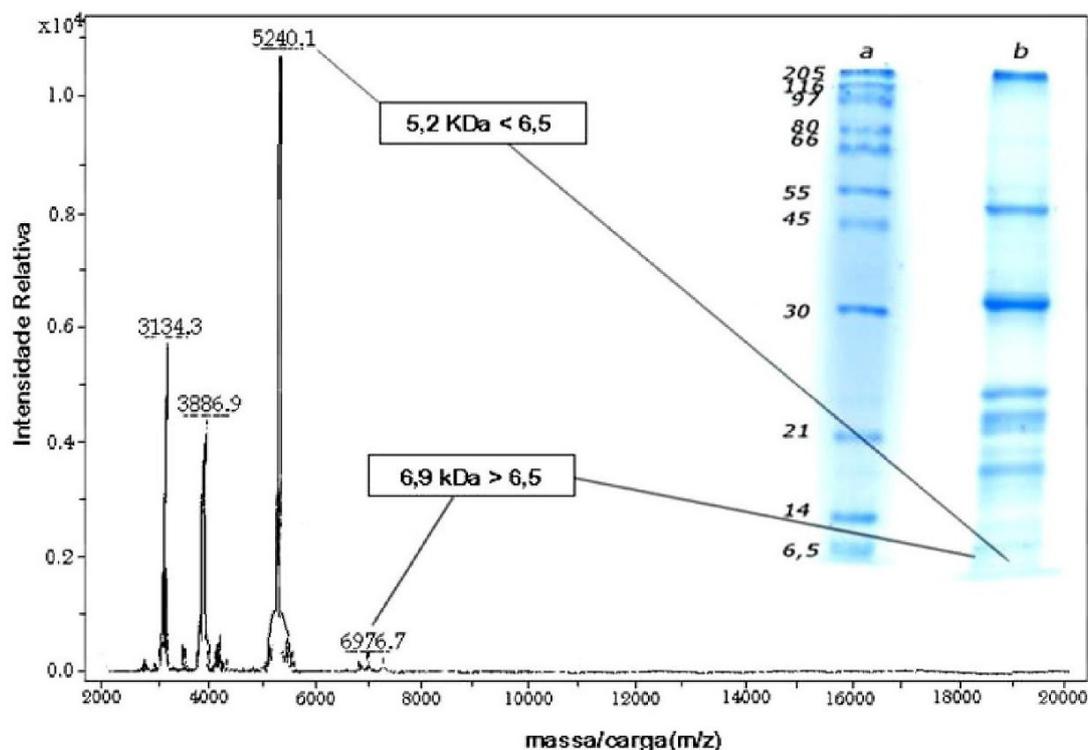


Figura 5. Massas moleculares menores que 6,5 kDa demonstradas no SDS-PAGE, comparada a dois íons identificados na espectrometria de massa da secreção de *D. muelleri*.

Estudos proteômicos com a secreção cutânea de *D. muelleri* são escassos pelo motivo de o nicho dessa espécie dificultar o seu encontro, além de haver uma ausência no banco de dados, recorrendo-se comparar suas massas proteicas com trabalhos realizados com outras classes animais como répteis e/ou com outras famílias de anuros, como Hylidae (Tabela 1).

MASSA TEÓRICA (kDa)	MASSA EXPERIMENTAL (kDa)	
	SDS-PAGE	MALDI ToF
6,1	< 6,5	5,2
6,4		
6,6	> 6,5	6,9
6,7		
8		
10		-
14	14	-
14,4	> 14	-
22	> 21	-
23	> 23	-
44	> 44	-

Tabela 1. Massas moleculares encontradas na literatura (Massa teórica) e comparada com as demonstradas em SDS-PAGE, MALDI-ToF (Massa experimental).

Sendo assim, Cavalcante (2015), demonstrou bandas proteicas da secreção cutânea de *D. muelleri* que variavam entre 110 a 160 kDa. Por meio de banco de

dados, identificou-se que a proteína *Octapeptide Repeat Protein T2* encontrada em *Ophiophagus hannah*, (cobra rei) (STUART et al., 2016) possui massa semelhante. Além disso, Cavalcante comparou as massas demonstradas com uma enzima oriunda da formiga *Harpegnathos saltador*, que codifica o nucleotídeo RHO quanine (Exchange fator 7).

Com esse perfil proteico demonstrado, foi possível comparar com compostos encontrado em anuros da família Hylidae, família de anuro onde ocorre a maior parte dos trabalhos com proteômica nessa vertente. Na terceira zona do SDS- PAGE, as massas próximas a 6,5 kDa podem representar a hylaserpina, um inibidor de tripsina e quimiotripsina com atividade antibacteriana que tem 6,1 kDa, descoberta na secreção cutânea de *Hyla simplex* (WU et al., 2011).

Proteínas chamadas de Kazal possuem massas moleculares em torno de 6,6 e 6,7 kDa e foram encontradas na espécie *Phyllomedusa sauvagii*, são inibidoras de peptidases, bactericida e induz a aglutinação dos eritrócitos (GEBHARD et al., 2004).

4 | CONCLUSÃO

A metodologia de SDS-PAGE não é um método analítico tão eficaz, porém permite estimar rapidamente a quantidade de grupo de proteínas por massa molecular, estando a carga líquida equalizada negativamente (detergente - SDS). Em uma amostra heterogênea com a facilidade de separação e visualização esta técnica permite uma visão geral das massas moleculares. Esta técnica é mais lenta na aquisição de dados, entretanto tem um custo operacional mais econômico quando se trata dos reagentes e equipamentos utilizados. Por outro lado, a espectrometria de massa fornece uma condição altamente precisa e analítica de estimar a massa molecular de proteínas e peptídeos apresentando um resultado rápido, porém com um custo operacional elevado principalmente devido ao custo do equipamento. Diante dos resultados encontrados foi possível concluir que o melhor para aquisição de dados é usar as técnicas aqui descritas em conjunto. As moléculas observadas nas duas técnicas são de extrema importância para a seleção inicial de candidatos para caracterização bioquímica, biofísica e microbiológica com potencial biotecnológico no desenvolvimento de novas ferramentas antimicrobianas.

REFERÊNCIA

AMPHIBIAWEB. **Information on amphibian biology and conservation**. Berkeley, California: Amphibia Web. Disponível em: <<http://amphibiaweb.org/>>. Acesso em: jun. 2018.

BEHZADNIA, S.; DAVOUDI, A.; REZAI, M. S.; AHANGARKANI, F.

Nosocomial infections in pediatric population and antibiotic resistance of the causative organisms in north of Iran. Iranian Red Crescent Medical Journal, Dubai, 2014.

- BETANCOURT, O.; SCARPA, C. VILLAGRÁN, K. **Estudio de resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mantitis subclínica bovina frente a cinco antibióticos em três sectores de la IX region do Chile (Nova técnica)**. FCV-LUZ, v. 13, n. 5, p. 413-417, 2003.
- BRADFORD, M. M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding**. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254, Georgia, 1976.
- BRITO, M. A. De.; CORDEIRO, B. C. **Necessidade de novos antibióticos**. In: Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 48, n. 4, p. 247- 249, 2012.
- CLARKE, B. T. **The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications**. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. v. 72, n. 3, p.365-79, 1997.
- CONLON, J. M.; KIM, J. B. **A Protease Inhibitor of the Kunitz Family from Skin Secretions of the Tomato Frog, *Dyscophus guineti* (Microhylidae)**. Biochem. Bioph. Res. Co. v. 279, n. 3, p. 961-964, 2000.
- DRAGO L. **Epidemiology and mechanisms of resistance: clinical and environmental impact**. Infez Med. v.15, p.6-12, 2007.
- GARCÍA-REY, C. **The role of the pharmaceutical industry. Why aren't new antibiotics being marketed?** In: Enferm. Infec. Microbiol. v. 28, n. 4, p. 45- 49, Elsevier doyma, Espanha, 2010.
- GEBHARD, L. G.; CARRIZO, F. U.; STERN, A. L.; BURGARDT, N. I.; FAIVOVICH, J.; LAVILLA, E.; ERMÁCORA, M. R. **A Kazal prolyl endopeptidase inhibitor isolated from the skin of *Phyllomedusa sauvagii***. Eur. J. Biochem., v. 271, p. 2117–2126, 2004.
- HABERMEHL, G. G. **Amphibia (Amphibians)**. In: Venomous Animals and Their Toxins. cap. 6, p. 112-116, New York, Springer-Verlag Berlin- Heidelberg, 1981.
- JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M. **Anfíbios: biologia e venenos**. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. de S.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD-JUNIOR, V. Animais Peçonhentos no Brasil. 2. ed. cap. 31, p. 317-328. São Paulo, Sarvier, 2009.
- KONIG, E.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; SHAW, C. **The diversity and evolution of anuran skin peptides**. In: Peptides, v. 63 p. 96 – 117, Elsevier, Alemanha, 2015.
- LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. Nature, v. 227, Cambridge, 1970.
- NOMURA, F. **Ecologia reprodutiva e comportamento de forrageio e escavação de *Dermatonotus muelleri* (Boettger, 1885) (Anura, Microhylidae)**. São José do Rio Preto, 2003.
- PEREIRA, J. M; MENEZES, C. D. A; CABRAL, R. F; MENDES, R. C. **Resistência Bacteriana e o Papel do Farmacêutico Frente Ao Uso Irrracional de Antimicrobianos**. Revisão Integrativa, Faculdade de Juazeiro do Norte, v.3, n.2, 2015.
- SEGALLA, M. V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. de A.; BERNECK, V. M.; LANGONE, J. A. **Brazilian Amphibians: List of Species**. In: Herpetologia Brasileira. v. 5, n. 2, 2016.
- SILVA, J. B. da. **Comportamento reprodutivo, vocalizações e dieta de *Bufo schneideri* Werner, 1894 (Anura, Bufonidae)**. Dissertação (mestrado Biologia). Goiânia, UFG, 2004.
- SIMMACO, M.; KREIL, G.; BARRA, D. **Bombinins, antimicrobial peptides from Bombina species**.

In: *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1788, n. 8, p. 1551-5, 2009.

STEBBINS, R. C.; COHEN, N. W. **A Natural History of Amphibians**. New Jersey, University Press, 1995.

STUART, B.; WOGAN, G.; GRISMER, L.; AULIYA, M.; INGER, R. F.; LILLEY, R.; CHAN-ARD, T.; THY, N.; NGUYEN, T. Q.; SRINIVASULU, C.; JELIĆ, D.

***Ophiophagus hannah*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3.** 2012.

Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/177540/0>>. Acesso em: 05 de novembro de 2016.

TYLER, M. J.; STONE, D. J. M.; BOWIE, J. H. **A novel method for the release and collection of dermal, glandular secretions from the skin of frogs**. *J. Pharm. Toxicol. Methods*, 28, 199-200, 1992.

WANNAMACHER, L. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida?** *Uso racional de medicamentos: temas selecionados*, v. 1, n. 4. Brasília, 2004.

WU, J.; LIU, H.; YANG, H.; YU, H.; YOU, D.; MA, Y.; YE, H.; LAI, R.

Proteomic analysis of skin defensive factors of treefrog *Hyla simplex*. In: *Journal of proteome research*, v. 10, n. 9, p. 4230-4240, 2011.

SOBRE A ORGANIZADORA

DAIANE PATRICIA OLDIGES Possui graduação em Biomedicina pela Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (2010), com habilitação em Análises Clínicas e Bioquímica. Mestre (2011) e doutora (2016) pelo programa de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com período de estágio sanduíche na Washington State University (Pullman - WA). Seu foco de pesquisa é a caracterização de proteínas com potencial uso no desenvolvimento de vacinas contra o carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*, bem como na manipulação gênica do protozoário *Babesia bovis* no intuito de utilizá-lo como plataforma vacinal.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-85107-61-1

