



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



**Caracterização e avaliação das
moléculas com atividades biológicas das
frações do extrato metanólico da secreção
cutânea do anuro *Dermatonotus muelleri*
(Boettger, 1885)**

Autor: **Lucas Jeferson de Lima Costa**

Orientador: **Osmindo Rodrigues Pires Júnior**

Brasília – DF

11/11/2020



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



**Caracterização e avaliação das
moléculas com atividades biológicas das
frações do extrato metanólico da secreção
cutânea do anuro *Dermatonotus muelleri*
(Boettger, 1885)**

Apresento a dissertação de tese à banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília (UNB), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Autor: **Lucas Jeferson de Lima Costa**

Orientador: **Osmindo Rodrigues Pires Junior**

Brasília – DF

11/11/2020



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



Lucas Jeferson de Lima Costa

**Caracterização e avaliação das moléculas com
atividades biológicas das frações do extrato metanólico
da secreção cutânea do anuro *Dermatonotus muelleri*
(Boettger, 1885)**

Comissão examinadora:

Prof. Dr. Osmino R. Pires Junior

Presidente

Departamento de Ciências Fisiológicas/IB

Universidade de Brasília

Prof^a. Dr^a. Simoni Campos Dias

Membro titular

Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas

Universidade Católica de Brasília

Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta

Membro titular

Laboratório de Bioquímica e Biofísica

Instituto Butantan

Prof^a. Dr^a. Mariana S. Castro

Membro suplente

Departamento de Ciências Fisiológicas/IB

Universidade de Brasília

Essa dissertação é dedicada aos meus pais Sandra e Kelves, ao meu irmão Felipe, a minha amiga Amanda e a Joyce, esses são os quem verdadeiramente chamo de família. Gratidão a todo apoio em todas as áreas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A algo maior que nós, que rege todas as relações do universo. A Este eu chamo Deus.

Ao Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior, que decidiu me aceitar nessa jornada e me cedeu de alguma forma seu tempo, paciência, laboratório me passando todas as lições para que pudesse aprender e evoluir como pesquisador e como pessoa.

A minha família Sandra, Kelves, Felipe, Amanda e Joyce, aos quais seria impossível agradecer com palavras por tudo que representam para mim independente de qualquer coisa, tempo e lugar.

Agradeço novamente à Joyce, por se tornar um porto seguro durante o processo, por ter me ajudado a me manter firme, por me encorajar e me fazer acreditar, por se tornar uma das pessoas mais memoráveis que já cruzou o meu caminho, por ser que me ouviu e me suportou nos piores momentos, por ter me conquistado, e ter participado ativamente de todo o processo, sem ela a conclusão seria quase impossível.

À Doutoranda Ana Carolina, e ao doutorando Carlos Santana por me ensinar os primeiros passos dentro do laboratório.

Ao grupo do laboratório, destacando Jessica S, Jessica O, Isadora e Keven, que em alguns momentos me ajudaram nos trabalhos de laboratório e em outro na vida pessoal, muitas vezes sem nem mesmo saber.

À Profa. Dra. Mariana de Souza Castro que gentilmente cedeu seu laboratório e equipamentos para a realização de alguns ensaios.

À Gislene, Katieli e Isabella, por sempre serem solícitas em ajudar quando necessário.

À Jaqueline por ajudar no ensaio de MTT.

A todos que participaram de forma direta ou indireta, com qualquer tipo de apoio.

A Capes por me conceder uma bolsa de estudos, fornecendo o devido apoio financeiro.

Eu agradeço.

Apoio financeiro

O presente trabalho “Atividade citolítica das frações do extrato metanólico da secreção cutânea do anuro *Dermatonotus muelleri*” (Boettger, 1885) desenvolvido por Lucas Jeferson de Lima Costa e orientado por Osmino Rodrigues Pires Júnior, foi possível a partir do apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio do fomento de bolsa de estudo em nível de mestrado.

Resumo

A pele dos anuros é um fator muito importante na sua evolução, pois realiza diversas funções vitais para o animal. Entre outras funções, a atividade antimicrobiana exercida por compostos presentes em sua pele é uma característica muito marcante desses animais. Dentre os diversos compostos produzidos pela pele dos animais para executar suas atividades, encontra-se uma série de lipídios. Entre os lipídios com atividade antimicrobiana, tem-se os ácidos graxos livres e seus monoglicerídeos, moléculas de colesterol, ésteres de colesterol, fosfolipídios, glicerofosfolipídeos e esfingolipídios, além da atividade antimicrobiana, outros grupos de lipídeos como os ALP's (*Synthetic antitumor alkyl phospholipids*) e os ω -3 PUFA's (*polyunsaturated fatty acids*), prometem uma ação antitumoral eficaz, atuando em áreas como a sinalização, regulação de proliferação, diferenciação e morte celular. No presente trabalho o anuro *Dermatonotus muelleri* teve sua secreção cutânea avaliada. Foi encontrado um molécula de massa 945,075 m/z denominada como DM 1 com absorção máxima em UV de 214 nm e absorção em 250nm, e outra de massa 3056,69 m/z denominada DM 12, com absorção máxima em UV de 200nm. Ambas tiveram sua atividade antimicrobiana testada, apresentando inibição contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, sendo que o MIC de DM 1 foi de 12,5mM para *S.aureus* e *E.coli*, inibição de 50% para *C.albicans* na mesma concentração. Não foi possível obter o MIC de DM 12 em nenhuma das concentrações testadas. Foi verificado o sinergismo entre o antibiótico comercial Ofloxacina e DM 1, sendo observada atividade sinérgica tanto contra *S.aureus* quanto contra *E.coli* nas menores concentrações testadas mantendo a atividade em concentrações antagônicas. DM 1 foi testada contra adenocarcinoma mamário e fibroblasto murino, demonstrando mais atividade contra a célula cancerosa do que contra a célula normal. Sugerimos que DM 1 seja um componente lipídico devido as suas características apresentadas.

Abstract

The skin of the Anurans' is a very important factor in their evolution as it performs several vital functions for the animal. Among other functions, the antimicrobial activity of compounds present in their skin is a very important characteristic of these animals. Among the diversity of compounds produced by the animals' skin to perform their activities, one of them is a series of lipids. Among the lipids with antimicrobial activity, we have free fatty acids and their monoglycerides, cholesterol molecules, cholesteryl esters, phospholipids, glycerophospholipids and sphingolipids. In addition ALP's (Synthetic antitumor alkyl phospholipids) and $\omega - 3$ PUFA's (polyunsaturated fatty acids), promise an effective antitumor action, it affects areas such as signaling, proliferation regulation, differentiation and cell death. This present study, evaluated the activity of compounds present in *Dermatonotus muelleri* skin secretion. A molecule with a weight of 945,075 m / z named DM 1 was found with maximum absorption in UV of 214 nm and absorption in 250nm and another of 3056,69 named DM 12 with maximum UV absorption of 200nm. Both had their antimicrobial activity tested showing inhibition against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, the MIC of DM 1 is 12.5mM and it was not possible to obtain the MIC of DM 12 in the highest concentrations (1.1mM). The synergism between the commercial antibiotic Ofloxacin was verified and showed synergistic activity against both *S.aureus* and *E.coli* in the smallest concentrations tested, and still maintained the activity in antagonistic situations. DM 1 was tested against MCF - 7 and murine fibroblast, showing more activity against the cancer cell than against the normal cell. We suggest that DM 1 is a lipid component due to its characteristics.

Lista de Figuras

Figura 1 - Exemplar de <i>Dermatonotus muelleri</i> (foto de Michael de Aguiar Passos)	28
Figura 2 - Desenho da placa de 96 poços para realização do ensaio de <i>checkerboard</i>	42
Figura 3 - Perfil cromatográfico de <i>Dermatonotus muelleri</i> obtido em uma coluna de fase Reversa C18 (Shimadzu-CLC-ODS, 15 cm).....	44
Figura 4 –Ensaio antimicrobiano realizado com as frações cromatográficas de <i>Dermatonotus muelleri</i> contra <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	47
Figura 5 - Espectro de massa obtido em sistema de MALDI/TOF UltraflexII TOF/TOF para a fração DM1	48
Figura 6 - Espectro de massa obtido em sistema de MALDI/TOF da fragmentação em modo lift do íon UltraflexII TOF/TOF.....	47
Figura 7 - Padrão de absorção de DM 1 do perfil cromatográfico de <i>Dermatonotus muelleri</i> da secreção bruta em uma coluna de fase Reversa C18 (Shimadzu-CLC-ODS, 15 cm) com detecção em 200 a 800 nm	48
Figura 8 - Espectro de massa obtido em sistema MALDI-TOF/TOF de massa das Frações DM 12	52
Figura 9 - Ampliação do espectro de massa das Frações DM 12	53
Figura 10 - Padrão de absorção de DM 12 do perfil cromatográfico de <i>Dermatonotus muelleri</i> da secreção bruta em uma coluna de fase Reversa C18 (Shimadzu-CLC-ODS, 15 cm) com detecção entre 200 e 800 nm	54
Figura 11 - Determinação da presença de lipídios na fração de DM 1 pelo Método Sulfo-Fosfo-Vanilina.....	55

Figura 12 - Ensaio antimicrobiano realizado em formato de diluição seriada com a fração cromatográfica DM 1 contra <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	56
Figura 13 - Ensaio antimicrobiano realizado em formato de diluição seriada com a fração cromatográfica DM 12 contra <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	57
Figura 14 - Ensaio de interação com micelas.....	58
Figura 15 - Ensaio antimicrobiano realizado em formato de diluição seriada do composto antimicrobiano comercial Ofloxacina contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	59
Figura 16 - Ensaio antimicrobiano realizado em formato de diluição seriada do composto antimicrobiano comercial Ofloxacina e para DM 1 separadamente, acrescido do resultado obtido no ensaio de sinergismo de Ofloxacina com DM 1.....	60
Figura 17 - Ensaio de sinergismo de Ofloxacina com DM 1 contra <i>Staphylococcus aureus</i> considerando as menores concentrações obtidas.....	62
Figura 18 - Ensaio antimicrobiano realizadas em formato de diluição seriada do composto antimicrobiano comercial Ofloxacina e para DM 1 separadamente acrescido do resultado obtido no ensaio de sinergismo de Ofloxacina com DM 1 contra <i>Escherichia coli</i>	64
Figura 19 - Ensaio de sinergismo de Ofloxacina com DM 1 contra <i>Escherichia coli</i> considerando as menores concentrações obtidas	65

Figura 20 - Ensaio de MTT da fração DM 1 realizado contra contra MCF-7 e Fibroblasto67

Figura 21 –Ensaio de MTT com diluição seriada da fração DM 1 contra MCF-7 e Fibroblasto gerando um gráfico em log a partir da viabilidade celular68

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Candidatos correspondentes a massa monoisotópica 945 [M+H] ⁺ de acordo com o banco de dados <i>lipidmaps</i>	51
Tabela 2 - Resultados dos MIC's apresentados pelas amostras de DM 1 e DM12. (Resultados apresentados em mM)	57
Tabela 3 - Cálculo de sinergismo de acordo com o protocolo de <i>Checkerboard</i> para as maiores concentrações de DM1 com Ofloxacina, de acordo com a Figura 7...	61
Tabela 4 - Cálculo de sinergismo de acordo com o protocolo de <i>Checkerboard</i> para as menores concentrações de DM1 com Ofloxacina, de acordo com a Figura 8.	63
Tabela 5 - Cálculo de sinergismo, de acordo com o protocolo de <i>Checkerboard</i> , para as maiores concentrações de DM1 com Ofloxacina, de acordo com a Figura 9...	64
Tabela 6 - Cálculo de sinergismo de acordo com o protocolo de <i>Checkerboard</i> para as menores concentrações de DM1 com Ofloxacina, de acordo com a Figura 10.	66

Lista de siglas e abreviações

ALP - Embalagem lipídica anfipática, do inglês *Amphipathic Lipid Packing*

ATCC - Coleção americana de culturas típicas, do inglês *American Type Culture Collection*

BCL-2 - Linfoma de células B 2, do inglês *B-cell lymphoma 2*

BHI - Infusão de cérebro e coração, do inglês *Brain Heart Infusion*

BID - Domínio de interação do agonista de morte BH3, do inglês *BH3 Interacting Domain Death Agonist*

CDK - Quinase dependente de ciclina, do inglês *Cyclin-dependent kinase*

COX 2 - Cicloxigenase 2

DHB - Ácido 2,5-dihidroxibenzóico, do inglês *2,5-dihydroxybenzoic acid*

DISC - Complexo de sinalização indutor de morte, do inglês *Death-inducing signaling complex*

DM - *Dermatonotus muelleri*

DMEM - Meio Eagle modificado por Dulbecco, do inglês *Dulbecco's modified Eagle Medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético, em inglês *Ethylenediamine tetra-acetic acid*

EGFR-2 - Receptor do fator de crescimento epidermal 2, do inglês *Epidermal growth factor receptor 2*

ERK - Quinases reguladas por estímulos extracelulares, do inglês *Extracellular signal-regulated kinase*

FADD - Domínio de morte associado ao Fas, do inglês *Fas associated via death domain*

FAS/CD95 - Proteína Fas grupo de diferenciação 95, do inglês *Protein fas cluster of differentiation 95*

JNK - Quinase N-terminal de c-Jun, do inglês *c-Jun N-terminal kinase*

JNK MAPKs - Quinase N-terminal de c-Jun e proteína quinase ativada por mitogênio, do inglês *c-Jun N-terminal kinase and mitogen-activated protein kinase*

MALDI-TOF - Ionização de dessorção a laser assistida por matriz - Tempo de voo, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of flight*

MIC – Concentração inibitória mínima, do inglês *Minimal inhibitory concentration*

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MTT- Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, do inglês *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

NK cell – Células exterminadoras naturais, do inglês *Natural killer cell*

Nm – Nanômetro

P21^{CIP1}- Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A, do inglês *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A*

PAM's - Peptídeos antimicrobianos

PBS - Tampão salino fosfato, do inglês *phosphate buffered saline*

PUFA - Ácidos graxos polinsaturados, do inglês *Polyunsaturated fatty acids*

RAF-1 - Fibrossarcoma rapidamente acelerado, do inglês *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*

ROS - Espécies reativas de oxigênio, do inglês *Reactive oxygen species*

RP-HPLC - Cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa, do inglês *Reverse Phase- High Performance Liquid Chromatography*

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil- sulfato de sódio (SDS)

SPV- Sulfo-Fosfo-Vanilina, do inglês *sulfo-phospho-vanillin*

TFA - Ácido trifluoroacético, do inglês *trifluoroacetic acid*

TNF R1 - Receptor 1 do fator de necrose tumoral, do inglês *Tumor necrosis factor receptor 1*

TRAIL-R1 - Receptor 1 de ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral, do inglês *Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1*

TRAIL-R2 - Receptor 2 de ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral, do inglês *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2*

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular, do inglês *vascular endothelial growth factor*.

Sumário

1 – Introdução	19
1.1 - Lipídeos antimicrobianos	21
1.2 – Lipídeos com potencial antitumoral	23
1.3 - <i>Dermatonotus muelleri</i> (Boettger, 1885).....	28
2 - Justificativa	31
3 - Objetivos	33
3.1 - Objetivo geral	33
3.2 - Objetivos específicos	33
4 - Materiais e métodos.....	34
4.1 - Obtenção da secreção cutânea.....	34
4.2 - Fracionamento das secreções cutânea por cromatografia líquida de alta eficiência	34
4.3 - Ensaio antimicrobianos.....	35
4.3.1 - Ensaio antibacteriano.....	35
4.3.2 - Ensaio antifúngico	36
4.4 - Espectrometria de Massa	37
4.5 - Determinação da presença de lipídios nas frações de interesse (Método Sulfo- Fosfo-Vanilina) (SPV).....	37
4.6 - Concentração Inibitória Mínima (MIC)	38
4.7 - Interação com micelas.....	39
4.8 - Atividade Moduladora pelo Método de Checkerboard - "Tabuleiro de Xadrez" ..	40
4.9 - Ensaio de viabilidade celular	43
4.9.1 - Manutenção das células	43
4.9.2 - Viabilidade Celular (MTT).....	44
5 - Resultados	46

5.1 - Para o fracionamento e identificação das moléculas.....	46
5.2- Para a atividade antimicrobiana e natureza de interação das moléculas	56
5.3- Para os ensaio de sinergismo.....	59
5.4- Sinergismo para <i>S.aureus</i>	60
5.5- Sinergismo para <i>E.coli</i>.....	63
5.6- Ensaio de MTT.....	67
6 - <i>Discussão</i>	69
7 - <i>Conclusões</i>.....	85
8 - <i>Perspectivas futuras</i>.....	87
9 – <i>Referências</i>.....	88

1 – Introdução

A classe Amphibia atualmente possui descritas mais de 8.227 espécies e está dividida em três ordens: Gymnophiona (Cecílias), Caudata (salamandras) e Anura (sapos, rãs e pererecas). Do total, 7252 são classificadas como anuros, sendo essa ordem a maior representante em número da classe (Frost., 2020). O Brasil possui um total de 1.026 espécies de anuros, sendo o país com o maior número de representantes da ordem em seu território (Clarke, 1997).

Ao analisar a evolução dos anfíbios, nota-se que a conquista do ambiente terrestre exigiu desses animais diversas adaptações, dentre as quais pode-se evidenciar o desenvolvimento ósseo e muscular, que resultou em uma série de mecanismos e possibilitou a colonização de novos ambientes, suprimindo a demanda da pressão evolutiva. Outro fator muito importante na evolução dos anuros é sua pele, que auxilia na respiração (respiração cutânea), fornece proteção e defesa contra predadores e microrganismos, além de outras funções (Clarke, 1997).

Considerando o aspecto de defesa dos anuros, esses possuem uma ampla gama de compostos antimicrobianos em sua pele, sendo essa uma característica imprescindível para a proteção dos animais a agentes infecciosos. (Clarke, 1997). Vários compostos podem ser encontrados na pele dos anfíbios, grande parte com atividade biológica, e, assim sendo, a pele é considerada a primeira linha de defesa desses animais. (Izadpanah & Gallo, 2005). Todavia, ao se analisar todos os gêneros conhecidos, apenas alguns animais foram devidamente estudados e avaliados (Daly *et al.*, 2004).

O sistema tegumentar de anfíbios possui dois tipos de glândulas acinares: As glândulas mucosas e granulosas. Basicamente, as glândulas mucosas produzem

mucinas e mucopolissacarídeos, que formam um tegumento altamente viscoso e pegajoso, que serve para lubrificar e umidificar a superfície tegumentar do anfíbio. Além disso, a secreção de tais compostos auxilia na termoregulação, na respiração cutânea e na proteção dos animais. (Demori *et al.*, 2019; Toledo & Jared., 1995; Conlon *et al.*, 2004),

Já se tratando das glândulas granulosas, as mesmas possuem uma camada de células mioepiteliais recobertas por adrenoreceptores. Quando o animal é submetido a algum estresse, são liberadas moléculas de epinefrina e noradrenalina, que induzem à contração dos miócitos e a liberação do conteúdo glandular. (Collon *et al.*, 2014 Nascimento *et al.*, 2003).

As glândulas granulosas produzem compostos biologicamente ativos como: proteínas, amins biogênicas, alcaloides, esteroides, bufodienolídeos, lipídios e peptídeos, que atuam contra a predação e contra os patógenos do meio, exercendo atividade cardiotoxica, hemotóxica, miotóxica, citotóxica, neurotóxica, vasoconstritora, alucinógena, anestésica, hipotensiva e antimicrobiana. Dessa forma, pode-se afirmar a que a pele dos anuros atua fazendo parte da imunidade inata desses animais (Izadpanah & Gallo., 2005; Winokur & Hillyard., 1992).

Os grupos de anfíbios desenvolveram suas secreções de forma independente, a partir da sua interação com o meio (Izadpanah & Gallo., 2005). Com isso, os compostos produzidos variam de acordo com a necessidade, sendo a composição única e exclusiva de cada espécie. (Rollins-Smith *et al.*, 2005).

Apesar da composição diferir de espécie para espécie, as moléculas bioativas podem ser divididas em quatro categorias principais (Daly *et al.*, 1987), são elas: peptídeos (Erspamer., 1984), amins biogênicas, alcaloides (Erspamer., 1959;

Roseghini *et al.*, 1976; Erspamer., 1981, 1984; Roseghini *et al.*, 1986) e proteínas (Neuwirth *et al.*, 1979; Daly *et al.*, 1987; Toledo e Jared, 1995), sendo que, mesmo pertencendo a mesma categoria, cada uma possui um mecanismo próprio de ação. Essas são as principais moléculas responsáveis pela primeira linha de defesa dos anuros contra microrganismos e demais predadores. Algumas dessas moléculas já foram descritas, tendo sua atividade, função e estrutura devidamente elucidadas (Sebben *et al.*, 1993).

1.1 - Lipídios antimicrobianos

A primeira barreira de defesa do organismo em geral é a pele, e, entre suas funções, a mais clara é o fato de ser uma barreira física, que possui um caráter resistente e durável, protegendo o corpo dos estímulos externos e nocivos, além de ajudar a manter a homeostasia corporal, conter e proteger tecidos subjacentes, entre outras funções (Brogden *et al.*, 2012).

Dentre os diversos compostos produzidos pela pele dos animais para executar suas atividades, encontra-se uma série de lipídios, como por exemplo, os fosfolipídios, os glicolipídios, as acilceramidas, os ácidos graxos livres, as ceramidas livres e o colesterol (Brogden *et al.*, 2012). Apesar de os lipídios se apresentarem em grande quantidade na pele, é possível encontra-los em outras regiões, como por exemplo, monoésteres de cera e triglicerídeos em secreções glandulares (Brogden *et al.*, 2012).

Alguns dos lipídios encontrados na estrutura tegumentar possuem atividade antimicrobiana, que auxiliam na proteção contra agentes infecciosos (Law *et al.*, 1995; Wertz & Downing., 1990). Inicialmente, acreditava-se que lipídios com atividade antimicrobiana, de forma geral, compreendiam principalmente ácidos graxos livres e seus monoglicerídeos, porém, o avanço dos estudos demonstrou que algumas outras moléculas também eram ativas, como por exemplo: moléculas de colesterol, ésteres de

colesterol, fosfolipídios e esfingolipídios exibiram características antimicrobianas, o que despertou interesse no estudo mais aprofundado de lipídios, levando à maior exploração de suas funções (Porter *et al.*, 2015).

Um exemplo da atividade antimicrobiana propiciada por lipídios é a atividade de fosfolipídios, esfingolipídios, galacto-cerebrosídeos mistos, ácido fosfatídico, ácido dioleoilfosfatídico-éster monometílico, fosfatidiletanolamina, oleoil-palmitoil-fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, D-esfenosina, D-hidroxisfinganina, oleoil-esfingosina, N-dimetilsfingosina e estearilamina contra *S. Aureus*, testados na faixa de concentração de 200µg/mL a 12.5 µg/mL (Bibel *et al.*, 1992)

Lipídios como ácidos graxos, esfingosinas livres, di-hidroxisfingosinas e 6-hidroxisfingosinas, presentes na superfície da pele humana e de suínos, também têm demonstrado uma atividade considerável contra *S. aureus* (Burtenshaw., 1942; Wertz & Downing., 1990).

Além disso, *S. pyogenes*, *S. epidermidis* e *Micrococcus sp* têm demonstrado sensibilidade aos ácidos graxos, dentre eles, pode-se destacar o ácido sapiênico, um dos ácidos graxos que mais apresenta atividade contra microrganismos com um MIC de 30 µg/ml contra *S. aureus* (Drake *et a.*, 2008).

As espécies Gram-positivas possuem mais sensibilidade aos lipídeos antimicrobianos, pois apresentam a parede celular formada apenas por uma camada de peptideoglicano, enquanto as Gram-negativas apresentam adicionalmente, além de uma fina camada de peptideoglicano, uma camada espessa de lipopolisacarídeo, o que dificulta a entrada de componentes na célula. Porém, há espécies Gram-negativas como: *Neisseria*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Chlamydia*, *Helicobacter* e *Campylobacter* que apresentam certa sensibilidade a alguns lipídios antimicrobianos. (Thormar *et al.*, 2013;

Yoon *et al.*, 2018; Thormar *et al.*, 2010; Schlievert & Peterson., 2012; Knapp *et al.*, 1986; Bergsson., 1998; Drake *et al.*, 2008).

Além disso, o ácido graxo livre também pode inibir a atividade de enzimas associadas à membrana celular, o que leva a interrupção do crescimento bacteriano (Yoon *et al.*, 2018), podendo também interferir na produção de energia, prejudicando a captação de nutrientes e interrompendo a cadeia transportadora de elétrons (Desbois & Smith., 2010).

No caso do ácido láurico, esse parece ter uma atuação não diretamente ligada à inibição do crescimento, mas sim na transdução de sinais, inibindo o crescimento de *S. aureus* a partir da interrupção da produção de lactamase e de toxinas na fase estacionária, o que também foi demonstrando de forma semelhante na transdução de sinal de *Enterococcus faecalis*, que teve sinais inibidos pelo ácido láurico (Projan *et al.*, 1994; Ruzin & Novick., 2000).

1.2 – Lipídios com potencial antitumoral

Além da atividade antimicrobiana, também tem sido demonstrado a partir de experimentos feitos em células tumorais *in vitro* ou *in vivo*, que os lipídios e seus análogos podem se apresentar como reguladores do ciclo tumorigênico (Collins & Djuric, 1993).

Dentro da área quimioterápica, têm sido descobertos vários agentes a base de lipídios, atuando em distintas regiões da divisão celular e influenciando na sinalização, regulação de proliferação, diferenciação e morte celular, sendo ela por apoptose ou por necrose. As ceramidas de cadeia longa são pró- apoptóticas e têm se mostrado um agente importante contra a proliferação celular tumoral. (Murray *et al.*, 2015).

O uso de ácido palmítico aumentou o acúmulo de ceramida nas células, esse acúmulo parece auxiliar no combate aos tumores, sendo que esse mesmo resultado é observado ao se administrar outros agentes anticancerígenos (Merrill & Jones, 1990).

Os ácidos graxos monoinsaturados n-3 também são considerados moléculas antitumorais. Foi demonstrado que esses compostos são capazes de inibir *in vitro* tanto a proliferação quanto a migração de células de câncer de mama humano moderadamente invasivo (linhagem MDA-MB-468), isso ocorre a partir da inibição da expressão da enzima COX-2 (Cui *et al.*, 2012), que no caso do carcinoma mamário é aumentada, estando relacionada ao tamanho, grau e proliferação do câncer, além de possuir ligação com a regulação dos fatores tumorigênicos, como VEGF e receptores de quimiocinas (Murray *et al.*, 2015; Wang & Dubois., 2010).

Os primeiros análogos sintéticos de lipídios antitumorais foram a edelfosina e a ilmofosina. Esses compostos abriram as portas para vários outros análogos subsequentes, como: alquilfosfocolina, miltefosina, perifosina e erucilfosfocolina. A partir das modificações estruturais, esses análogos se mostram mais seletivos para células cancerosas em comparação ao controle, e tiveram a estabilidade metabólica melhorada (Mollinedo *et al.*, 1997; Ruitter *et al.*, 1999; Gajate *et al.*, 2004).

Na literatura, existe um grupo de lipídios denominados ALP's (*Synthetic antitumor alkyl phospholipids*), que possuem atividade antitumoral e tem sido bastante explorados. Os ALP's são captados pelas balsas lipídicas (do inglês "*Lipid Rafts*"), que são estruturas membranares que atuam como uma extensão da membrana fosfolipídica, e geralmente são formadas a partir de moléculas de colesterol, esfingolipídios, e proteínas transmembranares, que tem como principal função separar e concentrar as proteínas de membrana. (Van der Luit *et al.*, 2007)

Ao serem captados, os ALP's agem sobre vários pontos essenciais das vias metabólicas celulares. Alguns de seus mecanismos, por exemplo, são a inibição da síntese de fosfatidilcolina, a ativação de estresse no retículo endoplasmático rugoso, as interferências nas funções diretas das balsas lipídicas, e as influências na sinalização PI3K/Akt, inibindo a proliferação exacerbada, etc. (Gajate *et al.*, 2012). Os ALP's também são capazes de aumentar o recrutamento de Fas/CD95, levando a célula à apoptose. Isso ficou evidente em experimentos em células que não apresentavam Fas/CD95 e os ALP's foram ineficazes. Pode-se ainda destacar que os ALP's são capazes de recrutar FADD, procaspase-8, TRAIL-R1, TRAIL-R2 promovendo a formação de um complexo de sinalização indutor de morte (DISC) pró apoptótico, isso ocorreu com as linhagens de leucemia promielocítica, leucemia eritroblástica e Células Jurkat (Gajate & Mollinedo., 2007 Gajate *et al.*, 2009;).

Além disso, os ALP's podem afetar diretamente as fases do ciclo celular a partir a inibição dos complexos CDK p21^{Cip1}, levando a interrupção do ciclo na fase G2/M, sendo capazes também de inibir a sinalização dos sinais de proliferação ERK e PI3K/Akt, diminuindo atividade da Raf-1 quinase e conseqüentemente inibindo a proliferação (Samadder & Arthur, 1999; Elrod *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2009). Por meio desses mecanismos, demonstra-se que além de interagir com membranas celulares, os ALP's são capazes de ativar a apoptose celular (Murray *et al.*, 2015).

Os ω -3 PUFA's (*polyunsaturated fatty acids*) e seus compostos sintéticos se mostram como agentes lipídicos promissores, demonstrando tanto atividades antiproliferativas quanto pró-apoptóticas. Algumas linhagens de câncer de mama foram avaliadas e esses compostos foram capazes de prejudicar a viabilidade de células MDA-MB-468, MCF-7 e T-47D, agindo sobre a ativação da via JKN (c-Jun NH2-

terminal kinase), demonstrando também inibição do crescimento de células de pulmão *in vivo* (Inceoglu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013)

Outros PUFA's como o ácido jacarico, apresentaram atividade contra células DLD-1 (células de câncer colorretal humano) enxertadas na linhagem de camundongos nus *in vivo* (Shinohara *et al.*, 2012). Já ácido α -eleostárico aumentou a peroxidação lipídica e liberou citocromo C da mitocôndria em células MDA-MB-231 *in vitro*. Quando testados em camundongos *in vivo*, inibiram a angiogênese induzida pelo tumor (Tsuzuki & Kawakami., 2008).

Muito ácidos graxos, tanto naturais quanto análogos sintéticos, também têm se mostrado grandes candidatos para o desenvolvimento de tratamentos de câncer, por serem capazes de induzir apoptose. (Murray *et al.*, 2005). O ácido butírico e alguns ácidos graxos de cadeia curta foram capazes de induzir o fim do ciclo celular na fase G0 / G1 e G2 / M (Heerdt *et al.*, 1997).

O butirato apresentou atividade contra as linhagens tumorais de colo retal COLO 205 e HT-29, aumentando a expressão do receptor TNF-R1, conhecido por ser um receptor de sinalização de morte celular, além disso, o composto ativou BID (um gene que codifica um agonista que ativa a apoptose) aumentou a liberação de citocromo C na mitocôndria e ativou capases pro-apoptóticas. (Pablo *et al.*, 1999).

O ácido palmítico induziu a proteólise da poli-ADP ribose polimerase e a fragmentação do DNA (Pablo *et al.*, 1999). Já o ácido 13-metiltetradecanóico demonstrou atividade contra células tumorais de bexiga humana (linhagens T24, T5637, e UM-UC-3) a partir da alteração das proteínas Bcl-2, p38 e JNK MAPKs, gerando um estímulo pró-apoptótico e suprimindo PI3K / Akt, impedindo a sobrevivência e proliferação da célula (Lin *et al.*, 2012).

Além disso, o ácido 13-metiltetradecanóico demonstrou atividade contra as linhagens K-562 (leucemia mielóide), MCF-7 (carcinoma mamário), DU 145 (carcinoma de próstata), NCI-SNU-1 (carcinoma gástrico), SNU-423 (carcinoma hepatocelular pleomórfico grau III / IV), NCI-H1688 (carcinoma pulmonar), BxPC3 (adenocarcinoma), e HCT 116 (carcinoma coloretal), sendo capaz de matar 50% das células nas concentrações de 10 a 25 µg / ml in vitro. (Yang et al., 2000).

As linhagem DU 145 (carcinoma de próstata) e LCI-D35 (hepatocarcinoma) foram enxertadas em ratos nus que, ao serem tratados com 13-metiltetradecanóico, apresentaram inibição de crescimento para as duas linhagens em relação ao controle, demonstrando que o ácido foi capaz de inibir o crescimento das linhagem tumorais, tanto in vitro quanto in vivo. A ação se deu a partir da indução de apoptose e não foram apresentados grandes efeitos colaterais, sugerindo que o composto poderia ser usado como agente único ou associado a uma quimioterapia no tratamento do câncer humano (Yang et al., 2000).

Já o ácido oleico monoinsaturado foi testado contra câncer de mama e pareceu ser capaz de suprimir EGFR-2 humano (Colomer & Menendez, 2006). Os ácidos vacênico e púnico foram capazes de gerar reações intracelulares que podem ativar a proteína ROS, causando o estresse do retículo endoplasmático e enviando a célula para a apoptose (Miller et al., 2003; Grossmann et al., 2009).

Há ainda a possibilidade dos ácidos graxos ativarem apoptose de forma extrínseca, inibindo diversas vias que induzem a continuação do ciclo celular como a regulação da atividade das proteínas p53 e a produção de inibidor de CDK, impedindo o progresso da divisão celular e a proliferação. (Emenaker *et al.*, 2001; Fauser *et al.*, 2011),

A instabilidade química das moléculas bioativas e também o seu rápido metabolismo no corpo prejudica o desenvolvimento de uma droga lipídica antitumoral. Sendo assim, ainda não é possível precisar a eficácia desses lipídios no desenvolvimento de uma nova droga, porém tem-se uma perspectiva futura positiva no desenvolvimento de novas terapias (Murray *et al*, 2015)

1.3 - *Dermatonotus muelleri* (Boettger, 1885)



Figura 1 - Exemplar de *Dermatonotus muelleri* (foto de Michael de Aguiar Passos)

Demartonotus muelleri (Figura 1) pertence à família dos microhilídeos e quando comparado aos outros membros dessa família, é considerado de grande porte. Este é o único representante do gênero *Dermatonotus* na América do Sul (Nomura, 2005; Nomura & Rossa-feres, 2011).

Esta espécie tem como *habitat* natural países como Argentina, Bolívia, Brasil e Paraguai. São encontradas geralmente em florestas secas, tropicais, ou subtropicais, geralmente em locais úmidos ou inundados. Devido à perda de *habitat*, esse animal encontra-se ameaçado (Colli *et al.*, 2004; Frost *et al.*, 2014). Em razão de sua exposição a um sistema de alta imprevisibilidade, o animal reserva energia para gastá-la durante o curto e explosivo período reprodutivo (Nomura, 2005).

As secreções cutâneas de anuros se apresentam com um grande potencial farmacêutico. Ao se tratar de *Demartonotus muelleri*, a secreção bruta foi testada sua atividade antifúngica e antiparasitária *in vitro*, sendo observado que na concentração de 500µg/mL ocorreu a inibição de crescimento em 15,36%, contra o fungo *Cândida krusei*, porém não houve atividade antiparasitária (Tempone *et al.*, 2006).

Também foi realizada uma análise do perfil proteico da secreção de *Dermatonotus muelleri* por Eletroforese de proteínas SDS-PAGE e Espectrometria de Massa, a eletroforese revelou a leitura de 16 bandas, sendo mais evidentes as bandas de 205, 30, 14 e 21 kDa. Já a espectrometria de massas revelou a presença de quatro peptídeos de massas 3134,3, 3886,9, 5240,1 e 6976,7 Da sendo as duas últimas observadas também no SDS-PAGE (Frohling *et al.*, 2018).

Foram realizados testes antimicrobianos com a secreção bruta do animal, demonstrando ausência de atividade tanto para Gram-negativa (*Pseudomonas aeruginosa*), quanto para Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*). Esse resultado foi relacionado ao estado do ambiente limpo que o animal foi mantido, ou seja, não representando seu *habitat* natural, o que pode ter reduzido a produção e compostos bioativos na secreção cutânea (Fernandes *et al.*, 2014).

Em outro trabalho foram identificadas um total de 32 proteínas pelo método de SDS-PAGE. Para moléculas de baixo peso molecular, foi utilizada uma coluna C18 no método RP-HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa), revelando 12 frações diferentes, boa parte dela identificada como açúcares. Todas as 12 frações foram separadas e testadas para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Micrococcus luteus*, e não apresentaram atividade. A Em vez disso, a fração 8 favoreceu o crescimento de *S.aureus*, nela (fração 8) foi encontrada triptofano, o que pode indicar a síntese de alguns alcaloides indol, que são largamente descritos em anfíbios. Dessa forma, a secreção apresenta-se repleta de proteínas com maior peso molecular, e grande quantidade de açúcares nas massas de menor peso molecular (Cavalcante *et al*, 2017).

2 - Justificativa

Um dos maiores problemas de saúde mundial é a resistência bacteriana a antibióticos comerciais, o que prolonga o tempo de internação, aumenta o número de mortes devido a infecções não controladas e aumenta significativamente os custos do sistema de saúde, (OMS, 2018).

Já as neoplasias são consideradas a segunda maior causa de mortes ao redor do mundo. Em 2018, foram registradas aproximadamente 9,6 milhões de mortes relacionadas ao câncer. Ao decorrer do tempo, os casos continuam em ascensão, causando danos físicos, emocionais e financeiros à população, principalmente de países menos desenvolvidos, onde o suporte para os casos não é suficiente (OMS, 2020).

A resistência a drogas anticâncer pode ser causada por diversos mecanismos, como perda de receptores, aumento da síntese de bombas de efluxo e reparação aos danos no DNA. Esses fatores em conjunto apresentam-se como limitantes ao funcionamento dos medicamentos (Gottesman., 2002)

Como demonstrado, os compostos presentes nos anuros são fortes candidatos ao combate tanto à resistência antimicrobiana e ao câncer. O Brasil possui uma extensa fauna de anfíbios, mas poucas espécies foram estudadas. Pesquisas básicas relacionadas ao isolamento, caracterização química e biológica de novas moléculas da secreção cutânea de anuros têm revelado diversas substâncias com potencial biotecnológico promissor.

Devido às interessantes descobertas em relação aos lipídeos, tanto naturais quanto sintéticos, vê-se nessa classe uma alternativa contra microrganismos patogênicos (Thormar *et al.*, 2007; Raychowdhury *et al.*, 1985). Além disso, acredita-se

que os nano-portadores tais como nanopartículas, lipossomas, micelas, nanocápsulas e nanoemulsões melhoram a capacidade de drenagem de lipídios antimicrobianos, o que pode tornar possível o desenvolvimento de formulações de drogas contendo o composto lipídico e uma formulação a base de água. (Zang *et al*, 2020)

Assim, é evidente a necessidade de estudos mais completos sobre lipídeos encontrados nesse grupo de animais. No presente trabalho, acreditamos que a espécie em questão apresenta compostos lipídicos, tendo provável capacidade antifúngica, antibacteriana, hemolítica e antitumoral. Os resultados podem ser apontados como possíveis candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos, atuando como coadjuvantes em terapias.

3 - Objetivos

3.1 - Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo isolar, caracterizar e avaliar o potencial antimicrobiano e antitumoral dos compostos isolados da secreção cutânea do anuro *Dermatonotus muelleri*.

3.2 - Objetivos específicos

- Fracionar e purificar a secreção bruta de *Dermatonotus muelleri*;
- Verificar a atividade dos compostos isolados contra bactérias Gram- positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922);
 - Verificar a atividade dos compostos isolados contra *Candida albicans* (ATCC90028);
 - Verificar atividade sinérgica dos compostos com atividade antimicrobiana com o antibiótico comercial Ofloxacina;
 - Verificar a atividade sobre a viabilidade celular de adenocarcinoma mamário humano da linhagem MCF-7 (ATCC HTB-22) e fibroblasto (NIH3T3 ATCC CRL-1658);
 - Caracterizar quimicamente os compostos com ação antimicrobiana e com inibição da viabilidade celular de MCF-7 e Fibroblastos murinos.

4 - Materiais e métodos

4.1 - Obtenção da secreção cutânea

Os espécimes de *Dermatonotus muelleri* foram coletados, durante a noite, com auxílio de uma lanterna e da vocalização do animal, no município de Monte Alegre de Goiás - GO, divisa com o estado de Tocantins. A secreção cutânea foi obtida através de estímulo elétrico de intensidade de a 50 mV por 5 segundos. Logo após a captura dos animais, feito o estímulo, o corpo do animal foi lavado com água Milli-Q, e a secreção resultante da lavagem foi recolhida, em seguida congelada e o animal foi devolvido à natureza. No laboratório, a secreção coletada foi liofilizada e armazenada em tubo Falcon a -20°C, até o momento do uso posterior. As secreções foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília

4.2 – Fracionamento da secreção cutânea por cromatografia líquida de alta eficiência

Alíquotas de 60mg da secreção liofilizada de *Dermatonotus muelleri* foram ressuspensas em 1,5mL de metanol, passado em vórtex por 1 minuto, sonicadas durante 5 minutos para aumentar a solubilidade das moléculas presentes na secreção bruta e centrifugadas por 20 minutos a 4.785 g.

Por apresentarem caráter viscoso e tendência a obstruir as colunas C18, as amostras foram passadas em filtro de 0,22 µM para possibilitar a corrida sem maiores riscos. Em seguida as alíquotas foram diretamente aplicadas no HPLC.

Alíquotas de 200µL do filtrado foram homogeneizadas e aplicadas em HPLC de fase reversa (Shimadzu Co. Kioto, Japan série LC 20A), em coluna analítica C18

(Shimadzu-CLC-ODS, 15 cm) com fluxo de 1 mL/min com detecção entre 216 e 280 nm (detector UV/VIS). A coluna utilizada foi previamente equilibrada com solvente A (TFA 0,12%, v/v, em água Milli-Q) durante 20 minutos.

As frações foram eluídas aplicando-se as seguintes condições: gradiente de 0 a 60% de solvente B (TFA 0,12% em acetonitrila v/v) em 60 minutos. As frações eluídas foram coletadas manualmente, secas a vácuo e armazenadas a -20°C até a utilização.

4.3 - Ensaios antimicrobianos

4.3.1 - Ensaio antibacteriano.

Foram utilizadas cepas das bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922), e das Gram positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

As bactérias foram cultivadas ressuspendendo 200µL do estoque de bactérias em 6,8mL de meio Mueller-Hinton (preparado de acordo com a especificação do fabricante) e o pH ajustado entre 7,2 e 7,4. Feito isso, a solução de bactérias foi colocada sob agitação a 37°C por 24 horas em tubos Falcon de 15 mL. Passadas as 24h, a densidade óptica foi ajustada entre 0,08 e 0,1 a 625 nm, em espectrofotômetro UV-VIS spectrophotometer UV-M51 (Bel Engineering, Itália) A partir da obtenção dos valores de densidade desejados, os microrganismos sofreram a primeira diluição de 1:10 (900uL de meio e 100uL de solução bacteriana para 1mL), dessa diluição foi feita outra na proporção de 1:20 (950uL de meio e 50uL de solução bacteriana para 1mL) resultando em 5×10^5 células/mL.

Cada cultura foi plaqueada em uma placa diferente, alíquotas de 50 µL de cada cultura bacteriana (contendo de 2 a 5×10^5 CFUs) foram incubadas por 24h a 37°C

com 50 µL de amostra ressuspensa em água Milli-Q em placas de 96 poços de fundo chato.

Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, 50 µL formaldeído 0,8% (v/v) e água Milli-Q, ambos incubados com 50 µL das suspensões bacterianas. A inibição do crescimento foi determinada pela leitura da densidade óptica a 620 nm com uma leitora de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA).

4.3.2 - Ensaio antifúngico

O ensaio antifúngico foi adaptado do CLSI e a cepa do fungo *Candida albicans* (ATCC 90028) foram gentilmente cedidas pelo LACEN-DF e cultivadas em caldo *brain heart infusion* (BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas.

Para os testes de sensibilidade, 200 µL do fungo foram cultivados em 6,8 mL do meio BHI e foram mantidos sob agitação por 24 horas a 37°C em tubos Falcon de 15 mL e a densidade óptica foi ajustada entre 0,08 e 0,1 a 625 nm.

Tendo obtido os valores de densidade desejados, os microrganismos sofreram a primeira diluição de 1:100 (990µL de meio e 10µL de solução bacteriana para 1mL), dessa diluição foi feita outra na proporção de 1:20 (950µL de meio e 50µL de solução bacteriana para 1mL) resultando em 5×10^5 células/mL.

Uma alíquota de 50µL de cada cultura (contendo de 2 a 5×10^5 CFUs) foi incubada por 22 h a 37°C com 50µL de amostra ressuspensa em água Milli-Q em placas de 96 poços de fundo chato.

Após a incubação, as amostras foram lidas a 620 nm em uma leitora de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA).

Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, 50 µL formaldeído 0,8% (v/v) e água Milli-Q, ambos incubados com 50 µL das suspensões das leveduras.

4.4 - Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa (MS) é usada para determinar as massas moleculares de compostos químicos, isso é feito por meio da separação dos íons moleculares de acordo com sua relação massa-carga (m/z) (Cunha *et al.*, 2007).

As frações cromatográficas de interesse passaram por análise de espectrometria de massa em modo refletido positivo. Para isso, foi utilizado um espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF/TOF de modelo UltraflexII TOF/TOF™ (BRUKER, MA, EUA) ou TOF/TOF 5800 (SCIEX, MA, EUA), ambos calibrados pelo *KIT* de Calibrante Pepmix (BRUKER, MA, EUA). As frações foram ressuspensas em acetonitrila 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v) e Milli-Q 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v), 1 µL de cada fração cromatográfica foi aplicada em placa de aço inoxidável juntamente com 1 µL de matriz DHB ressuspensa em acetonitrila 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v) e Milli-Q 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v). Também foi realizada uma fragmentação das frações de interesse no padrão de fragmentação em modo lift.

4.5 - Determinação da presença de lipídios nas frações de interesse (Método Sulfo-Fosfo-Vanilina) (SPV)

O ensaio de SPV ocorre a partir da formação de cromógenos formados a partir da reação com as duplas ligações ou as hidroxilas livres dentro dos analitos lipídicos, após essa reação ocorre a formação de um cromóforo rosa após reagir a vanilina, sendo que a detecção da cor depende diretamente da formação do cromóforo. (Anschau *et al.*, 2017), a metodologia foi adaptada do trabalho de Knight *et al.* 1972.

O reagente de fosfovanilina (PV) foi preparado usando 1 mg de vanilina dissolvido em 1 mL de água Milli-q a 100° posteriormente diluídos para 5 mL com ácido fosfórico a 85%. Como padrão foi utilizada a vaselina, recebendo o mesmo tratamento das amostras. 20 µL das frações de DM 1 e DM 12 e a vaselina foram diluídos em 180 µL de ácido sulfúrico concentrado em tubos de tipo eppendorf e incubados a 100 °C por 10 min.). Em seguida, os tubos foram resfriados a temperatura entre 18 e 24 °C e adicionados 0,5 mL de reagente PV para o desenvolvimento da cor. A mistura foi incubada a 37 °C por 15 min. As amostras foram transferidas para microplacas de 96 poços de fundo chato e armazenadas por 45 minutos em uma caixa escura. Em seguida, a absorbância foi medida a 530 nm por uma leitora de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA,EUA). (Anschau et AL.,2017).

4.6 - Concentração Inibitória Mínima (MIC)

O protocolo de tratamento os microrganismos para a realização do MIC foi o mesmo descrito para os ensaios antibacterianos. As amostras DM1, DM12, Ofloxacina foram quantificadas por peso seco em balança com resolução de 0,01mg.

Foram utilizadas cepas das bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922), e das Gram positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e a cepa do fungo *Candida albicans* (ATCC 90028).

As amostras purificadas que apresentaram atividade antifúngica ou atividade antibacteriana foram empregadas na determinação da sua concentração inibitória mínima (MIC), ou seja, a menor concentração da fração onde nenhum crescimento celular é detectado por meio de leitura espectrofotométrica. Alíquotas de 50 µL em diluições seriadas de cada amostra pura, feitas a partir de uma solução-estoque de 25 µM para as frações de interesse *Dermatonotus muelleri*, foram incubadas com 50 µL

da suspensão de fungos ou bactérias. Para Ofloxacina foram realizados os mesmos procedimentos, porém a concentração inicial foi de 110mM.

Após a incubação por um período de 24 h a 37°C, as placas foram lidas a 620 nm em leitora de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.7 - Interação com micelas

Para a formação das micelas utilizou-se duas soluções. Na primeira o substrato foi fosfatidilcolina 3 mM (Sigma P5394 fosfatidilcolina ("N60%"), Sigma, St. Louis, MO) na segunda foi utilizado uma solução de fosfatidilcolina acrescida de colesterol mantida a concentração final de 3mM (Sigma P5394 fosfatidilcolina ("N60%"), Sigma, St. Louis, MO). O tampão Tris-HCL 100 mM a pH 8,0 foi utilizado para formar a emulsão de micelas.

Para facilitar a sua solubilização, utilizou-se 1 mL de clorofórmio para dissolver as duas soluções. Após a solubilização o clorofórmio foi retirado por meio de evaporação com o auxílio de um jato de ar comprimido. As soluções secas foram dissolvidas em tampão, formando uma emulsão.

25 mM das frações foram ressuspensas em Tris-HCl e sonicadas por 5 minutos para solubilização, em seguida, foram plaquedados 50 µL de emulsão de fosfatilcolina com 50 µL da fração em uma placa e 50 µL de emulsão de fosfatilcolina com colesterol mais 50 µL da fração em outra placa. Após 60 minutos, a leitura da placa foi realizada em 405 nm em uma leitora de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA).

Para o controle negativo foi utilizado 50 µl das emulsões com 50 µL de tampão para o controle positivo e 50 µl das emulsões com 50 µL de triton – x 1% em tampão Tris-HCL.

4.8 - Atividade Moduladora pelo Método de Checkerboard - "Tabuleiro de Xadrez"

A performance de sinergismo entre Ofloxacina e a DM 1 foi revelada com o auxílio do Teste de Checkerboard. Este ensaio, desenvolvido com base na técnica de microdiluição em caldo 60 estabelecida pela norma M7-A6 (2003) do CLSI.

É feita a avaliação do efeito causado pela combinação de dois agentes antimicrobianos sobre um determinado microrganismo, levando a determinação do MIC's dos dois compostos em conjunto (Bonapace *et al.*, 2000). Para realizar o cálculo da atividade sinérgica, foi utilizado o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), o qual corresponde à soma das Concentrações Inibitórias Fracionadas (CIF). Estas equivalem à razão entre a MIC das substâncias A e B combinadas pela MIC de cada substância, conforme descrito abaixo (Odds., 2003)

$$\text{CIFA} = \frac{\text{MIC da droga A com B}}{\text{MIC de A}}$$

MIC de A

$$\text{CIFB} = \frac{\text{MIC da droga B com A}}{\text{MIC de B}}$$

MIC de B

$$\text{ICIF} = \text{CIFA} + \text{CIFB}$$

Para determinação de atividade em conjunto dos compostos, o ICIF foi interpretado como indicativo de sinergismo se ≤ 0.5 , aditivo ou indiferente se > 0.5 e ≤ 1 , e antagonismo se > 1 (Bonapace *et al.*, 2000; Bonapace *et al.*, 2002; Odds, 2003).

Desta forma, definidas as MICs do antimicrobiano e da fração frente a cepa de bactérias, estes foram convertidos em concentração inibitória fracionada (CIF).

O ensaio de *checkerboard* ou 'tabuleiro de xadrez' foi descrito por White (White *et al.*, 1996) e realizado conforme adaptado por Bonapace (Bonapace *et al.*, 2002), para permitir a variação das concentrações de cada um dos antimicrobianos ao longo de eixos, resultando em concentrações diferentes dos compostos em cada poço (Figura 2). Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata. O passo-a-passo do procedimento está descrito abaixo:

1 – Preencher os poços das microplacas com 50 μ L de MH (Exceto coluna 12, 1 e linha H).

2 - Na última coluna (nº 12) adiciona-se 100 μ L da Fração a ser testada (4xMIC), transferindo-se sequencialmente 50 μ L do poço anterior para o próximo até a coluna 2.

3 - Na primeira linha (A) adicionam-se 50 μ L do antibiótico (4xMIC) para posterior realização da diluição seriada até a linha G.

4 - Distribuídos 20 μ L da suspensão de bactéria em cada poço teste.

5 - Na coluna 1, fazer em triplicata Antibiótico + bactéria

6 - Na coluna 1, fazer em triplicata de MH

7 - Na linha H, fazer em triplicata fração + bactéria.

8 - Na linha H, fazer em triplicata o controle de crescimento bacteriano (MH+Bactéria)

9 - Na linha H, fazer em triplicata o fração + MH

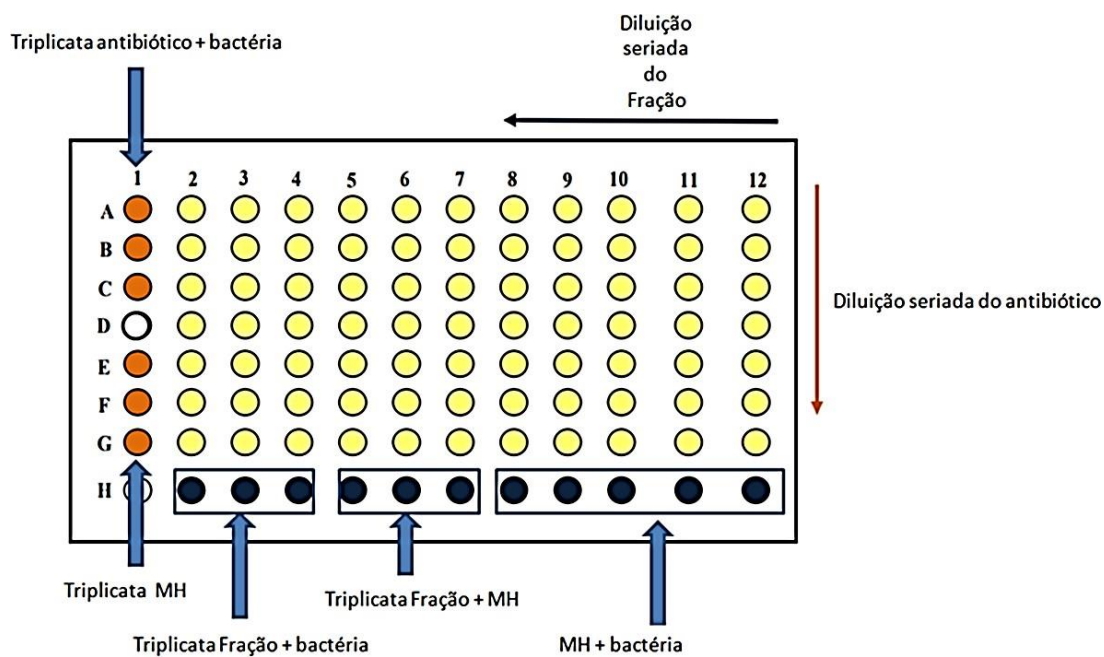


Figura 2 - Desenho da placa de 96 poços para realização do ensaio de checkerboard com a descrição dos passos a serem desenvolvidos e com a descrição dos controles.

Após a incubação por um período de 22 h a 37°C, as placas foram lidas a 620 nm em leitora de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.9 - Ensaio de viabilidade celular

4.9.1 - Manutenção das células

Em uma câmara fluxo laminar, as células de adenocarcinoma mamário humano da linhagem (MCF-7 ATCC HTB-22) e fibroblasto (NIH3T3 ATCC CRL-1658), foram cultivadas. As linhagens de células estavam sendo mantidas em nitrogênio líquido e foram descongeladas em meio DMEM. As alíquotas foram acrescidas de 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico e 0,01 mg/mL de insulina bovina (meio de cultura completo).

Após esse tratamento, as células foram centrifugadas a 750g durante 5 minutos, foi feito o descarte do meio e novamente as células foram ressuspensas em 1mL de meio completo.

Feio isso, foi adicionado 9 mL de meio completo um frasco de cultura de células de 75 cm³ e as células foram transferidas para esse frasco. Foi feita a incubação do frasco em uma estufa com 37°C e 5% de CO₂. Em um período de 48 horas o meio foi trocado até que as células atingissem um estágio de confluência. Enquanto estavam no período de incubação, a morfologia, o crescimento celular e a presença de contaminantes das células eram monitoradas em microscópio de luz invertido.

Ao atingir o estado de confluência, o meio do frasco foi descartado, adicionado 3mL de solução de tripsina 0,25% % em tampão EDTA 0,53 mM, com tempo de incubação de 3 min em estufa a 37°C e 5% de CO₂, após o período de 3 mim a tripsina foi inativada e 3mL de meio completo foi acrescido e centrifugado a 750 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e a células foram ressuspendidas novamente em meio DMEM e suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico e 0,01 mg/mL

de insulina bovina. Desse total, alíquotas de 1/10 foram feitas e recultivadas em frascos menores.

Atingindo o estado de confluência, as células foram recultivadas em menor densidade em novos frascos de cultivo.

4.9.2 – Avaliação da Viabilidade Celular (MTT)

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT estabelecido por Mosmann (1983).

As células da linhagem MCF-7 (ATCC HTB-22) e fibroblasto, foram descongeladas e acrescidas de 1mL de meio completo (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico e 0,01 mg/mL de insulina bovina).

Para determinar o número de células, foi adicionado 10 µL de suspensão de células em 60 µL de solução azul de Tripán + PBS 0,4% (p/v), dessa solução, foi retirado 10 µL e colocado em uma câmara de Neubauer para ser efetuada a contagem de células por quadrante microscópio de luz invertido. O número de células foi determinado a parti da equação 1.

Equação 1 – Fórmula para determinar o número de células as partir da contagem de células em uma câmara de Neubauer.

$$N^{\circ} \text{ de células/mL} = \frac{N^{\circ} \text{ de células contadas}}{N^{\circ} \text{ de quadrantes contados (= 4)}} \times \text{fator de diluição (= } 6 \times 10^4)$$

Em uma placa de 96 poços de fundo chato, foram plaqueados 8×10^3 células em cada poço e mantidos a 37°C e 5% de CO₂ para que as células pudessem se aderir ao fundo dos poços, essa incubação foi mantida por um período de 24 horas.

Após o período de incubação, a fração de interesse foi ressuspensa em meio de cultura completo e, após ser monitorado o crescimento celular em microscópio de luz invertido, o meio do cultivo de células foi descartado e substituído pela fração ressuspensa em meio de cultura completo. Para controle positivo foi utilizado células em meio de cultivo e para controle negativo a células foram mantidas sem meio, sendo que o controle positivo foi considerado 100% de crescimento e o negativo 0%.

A placa foi mantida em estufa a 37°C, 5% de CO₂, durante o período de 24h, passado esse tempo, o meio foi retirado e uma solução de MTT (15 µL de MTT 5 mg/mL em 135 µL de meio DMEM completo para cada poço) foi acrescentado, sendo novamente incubados por 3h a 37°C e 5% de CO₂. Após esse novo período de incubação, o MTT foi retirado e 100 µL de DMSO foi adicionado, levando a formação de formazan, que foi medido em leitora de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA) em 595 nm. Ensaios foram realizados em triplicata.

5 - Resultados

5.1 - Fracionamento e identificação das moléculas

O perfil cromatográfico da extração metanólica da secreção de *Dermatonotus muelleri* (Figura 3), resultou em 12 frações, essas foram nomeadas de DM 1 a DM 12 de acordo com a ordem de eluição. As frações foram coletadas, secas a vácuo e reservadas para os demais ensaios.

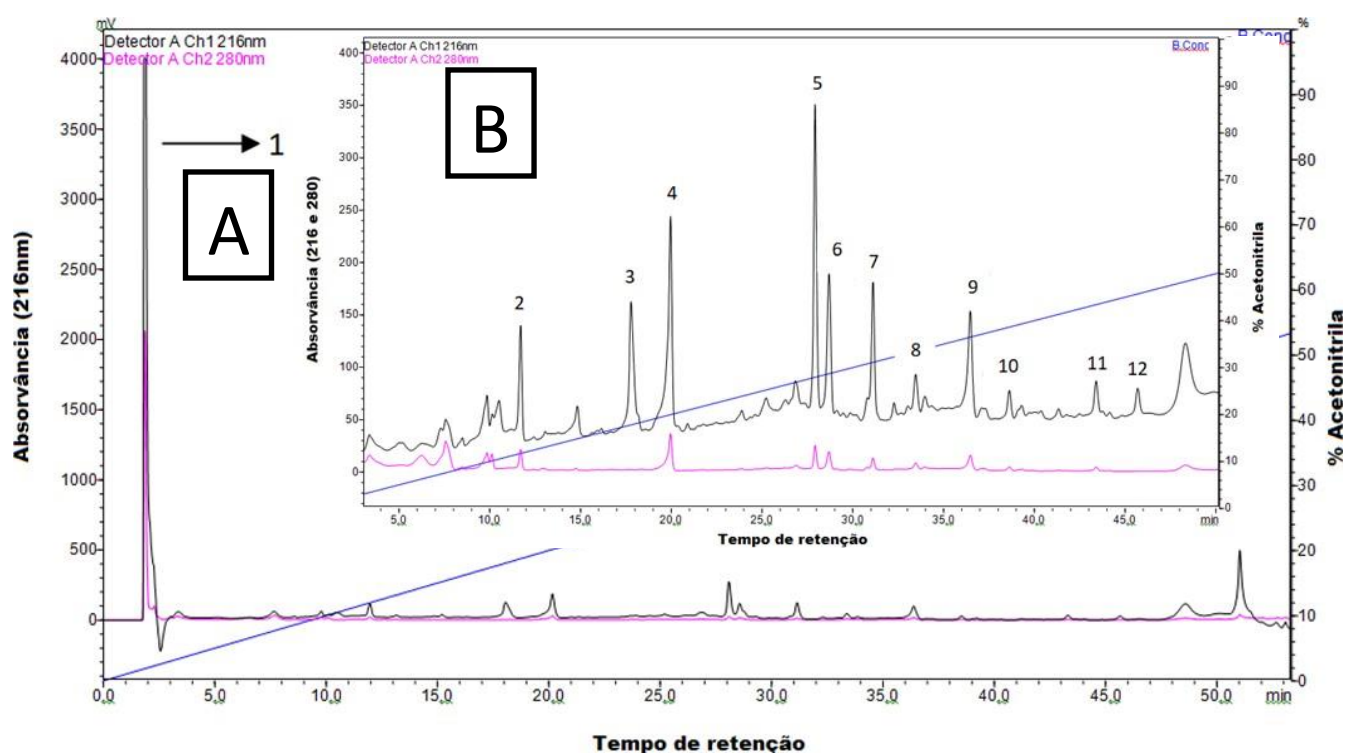


Figura 3 - (A) Perfil cromatográfico da secreção bruta de *Dermatonotus muelleri* obtido a partir de 200µL da secreção bruta em uma coluna de fase Reversa C18 (Shimadzu-CLC-ODS, 15 cm) com fluxo de 1 mL/min com detecção em 216 (azul) e 280 (rosa) nm. (B) Zoom da imagem "A" a partir dos 5 minutos de corrida.

Para o *screening* antimicrobiano foram utilizadas todas as frações coletadas da cromatografia de *Dermatonotus muelleri*. Somente as frações DM 1, DM 2 e DM12 mantiveram o crescimento de *C. albicans* abaixo de 100%, sendo que DM 1 apresentou maior atividade, apresentando uma inibição de 50% (Figura 4 A). Contra *E. coli*, todas as frações apresentaram atividade inibitória em torno de 50%, sendo que a fração DM1 foi a fração mais ativa, com inibição próxima de 100%. (Figura 4 B). Contra *S. aureus*, todas as frações apresentaram atividade inibitória, sendo que a fração DM1 novamente se mostrou em destaque com atividade próxima de 100%, e as frações DM 8, 5, 11 e 12 apresentaram atividade acima de 50%. (Figura 4 C).

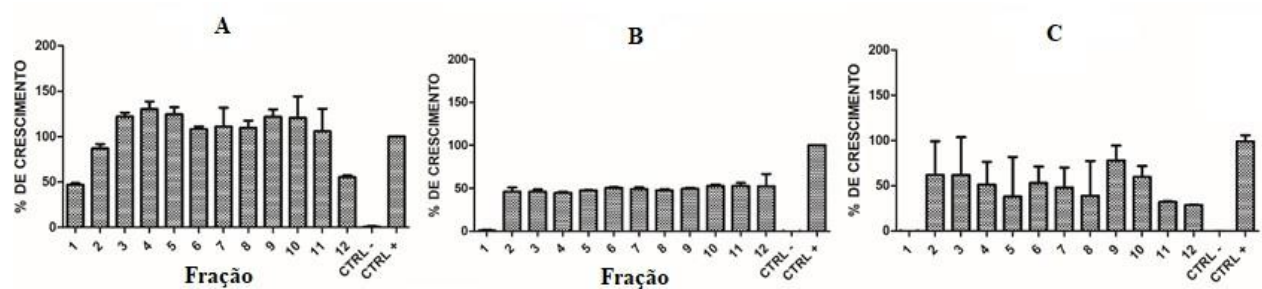


Figura 4 – Ensaio antimicrobiano realizado com as frações cromatográficas de *Dermatonotus muelleri*. A porcentagem de inibição de crescimento contra A – *Candida albicans*, B-*Escherichia coli* C – *Staphylococcus aureus* foram calculados após 24h de incubação a 37°C. Todas plaqueadas em triplicata com as frações. Ctrl + corresponde a 50% de microrganismo e 50% água Milli-Q. Ctrl – corresponde a 50% microrganismos com 50% formol 0,8%. Os resultados são expressos pela média \pm desvio padrão. Leitura a 620nm.

Para verificar o componente de massa, foi realizada a análise de massa em sistema MALDI-TOF/TOF, que mostrou que a fração DM 1 apresenta um componente isolado massa em 945,075 m/z, que representa a pureza da fração. (Figura 5).

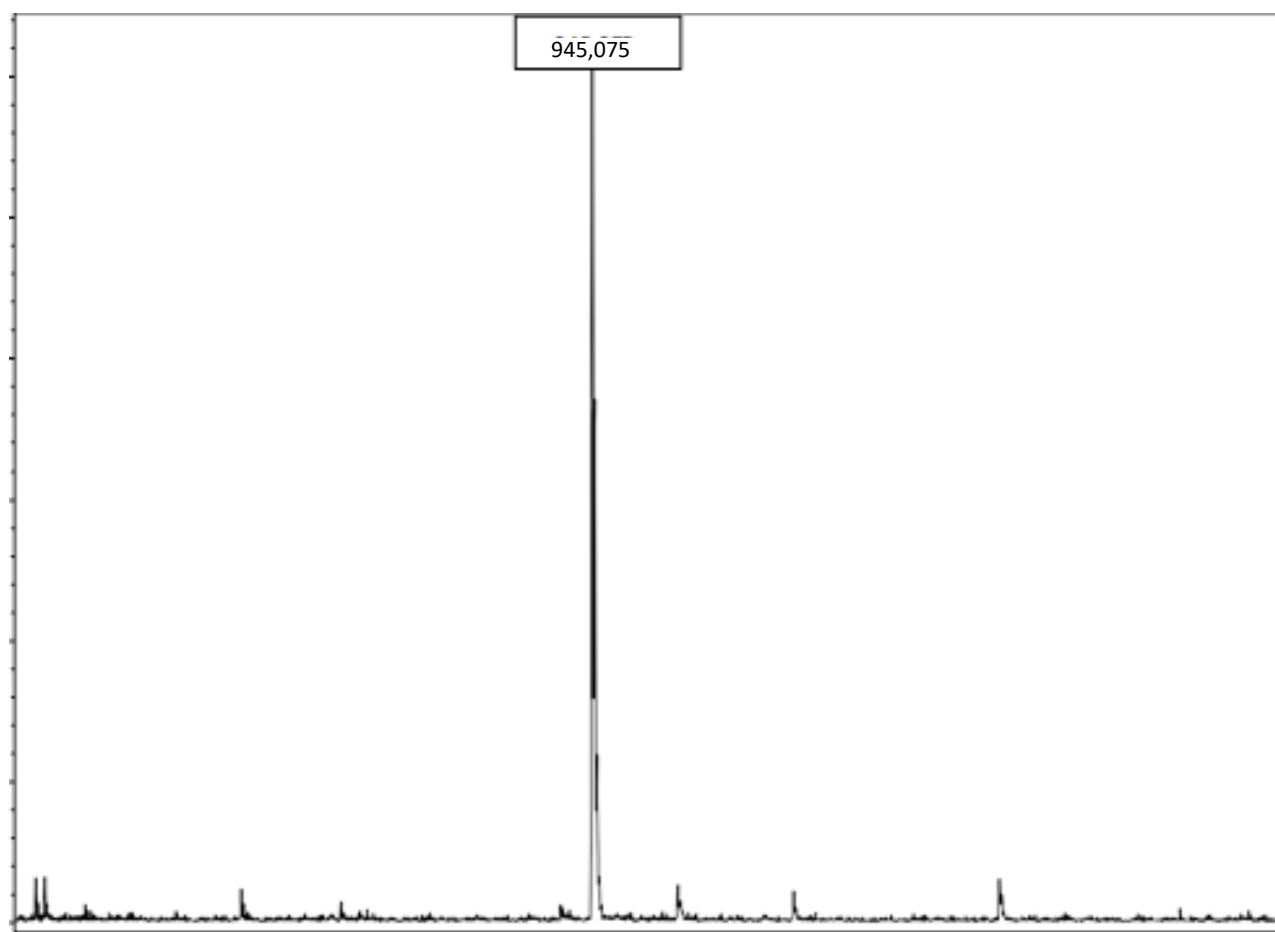


Figura 5 - Espectro de massa obtido em sistema de MALDI/TOF UltraflexII TOF/TOF para a fração DM1, modo refletido positivo. Matriz DHB.

Ao realizar a fragmentação de DM 1, o padrão de fragmentação em modo lift do íon 945,075 m/z sugere que este componente não é um peptídeo, pois não apresenta os fragmentos característicos de aminoácidos (Figura 6).

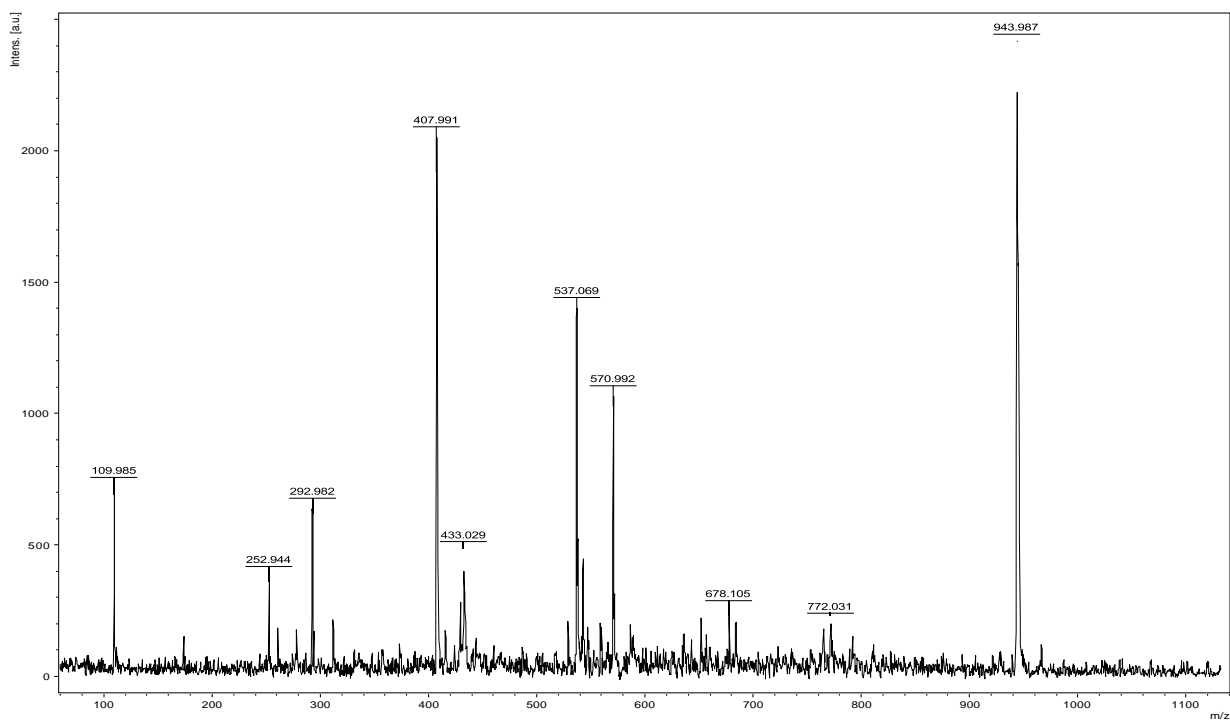


Figura 6 - Espectro de massa obtido em sistema de MALDI/TOF da fragmentação em modo lift do íon UltraflexII TOF/TOF demonstrando a ausência de fragmentos característicos de aminoácidos. No padrão de fragmentação em modo lift do íon 945,075 m/z . As massa correspondentes aos picos são 109.985, 252.944, 292.982, 407.901, 433.029, 537.069, 570.992, 678.105, 772.031, 943.987 nesta ordem de apresentação.

A cromatografia da fração DM 1 foi feita em RP-HPLC com a absorção do UV em 200-800nm para demonstrar o padrão de absorção da molécula (Figura 7), demonstrando que há absorção em UV da molécula na faixa de 214nm e 250nm, sendo que a máxima absorção é encontrada em 214nm.

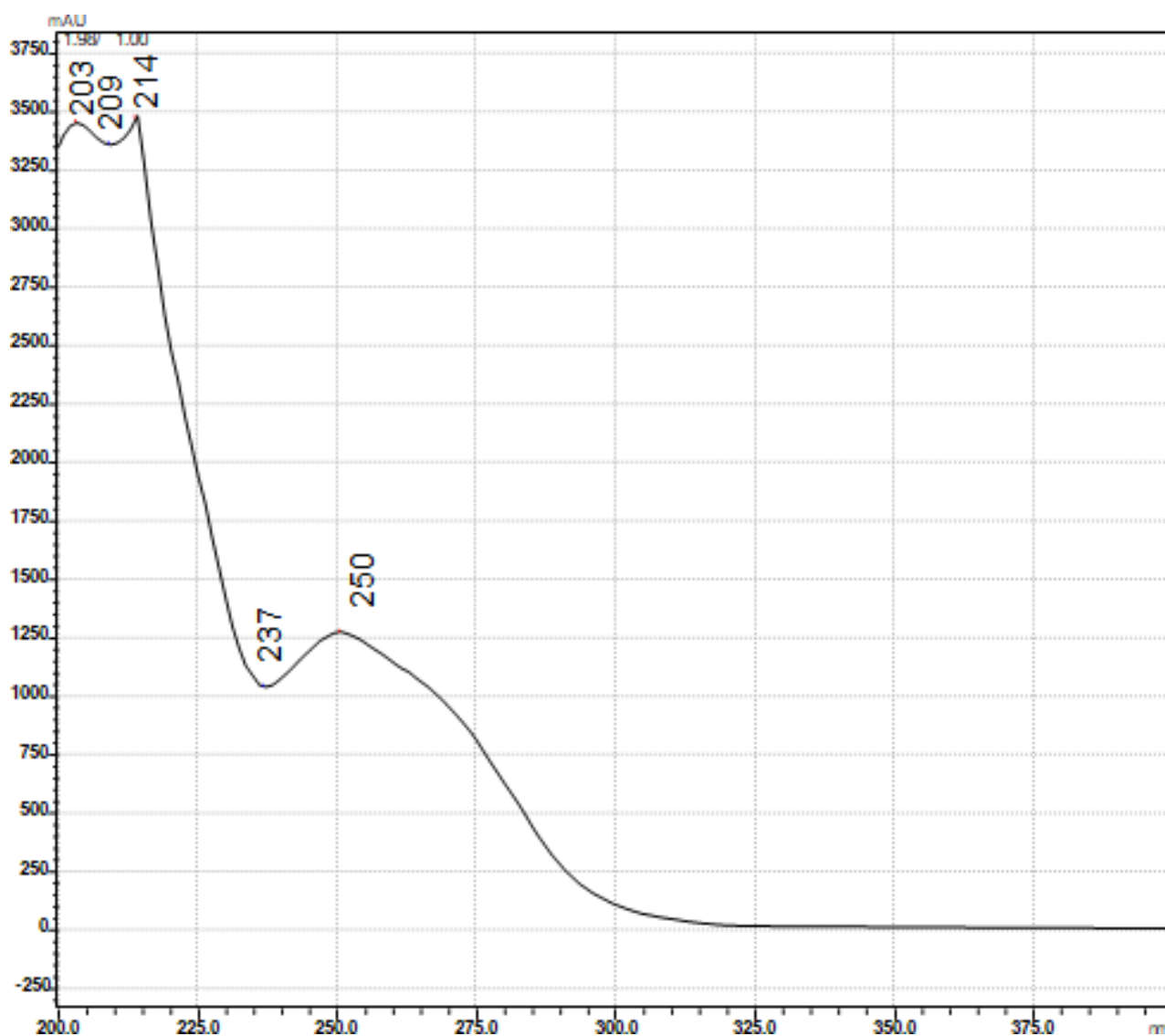


Figura 7 - Padrão de absorção de DM 1 do perfil cromatográfico de *Dermatonotus muelleri* obtido a partir de 200 μ L da secreção bruta em uma coluna de fase Reversa C18 (Shimadzu-CLC-ODS, 15 cm) com fluxo de 1 mL/min com detecção em 200 a 800 nm. Ampliação da absorção da fração de DM1.

Em buscas baseadas na massa monoisotópica de 945 [M+H]⁺ (Com erro de 1Da), no banco de dados *Lipidmaps*, *lipidomic gateway* (<https://www.lipidmaps.org/>), foram encontrados 3 candidatos (Tabela 1).

Tabela 1 - Candidatos a correspondentes a massa monoisotópica 945 [M+H]⁺ de acordo com o banco de dados *lipidmaps* (adaptado).

LM_ID	Nome Comum	Nome sistemático	Classe principal	Subclasse	Massa	Fórmula
LMGP06010495	PI (20:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	1-eicosanoil-2-(7Z,10Z,13Z,16Z docosatetraenoil) glicero-3- fosfo- (1'- mioinositol)	Glicerofosfoinositóis [GP06]	Diacilglicerofosfoinositóis [GP0601]	942.62	C ₅₁ H ₉₁ O ₁₃ P
LMSP0303060	MIPC (d18:0/16:zero)	N- (hexadecanoil) - esfingana-1-O-[D-manopiranosil-alfa1-2-mioinositol-1- fosfato]	Fosfosfingolipídios [SP03]	Fosfoinositóis de ceramida [SP0303]	943.60	C ₄₆ H ₉₀ NO ₁₆ P
LMSP0204017	1-O-cerotoyl-Cer (d18:1/18:zero)	1-O-hexacosanoil-N- (octadecanoil) esfing-4-enina	Ceramidas [SP02]	Acilceramidas [SP0204]	943.93	C ₆₂ H ₁₂₁ NO ₄

A análise de massa em sistema MALDI-TOF/TOF mostrou que a fração DM 12 apresenta componentes de massa em 3130,78, 3077,44, 3093,84, 3115,68 e 3056,69 m/z (Figura 8 e 9). De forma interessante, existe uma alternância de 22 e 16 Da de diferença entre as massas analisadas (Figura 9).

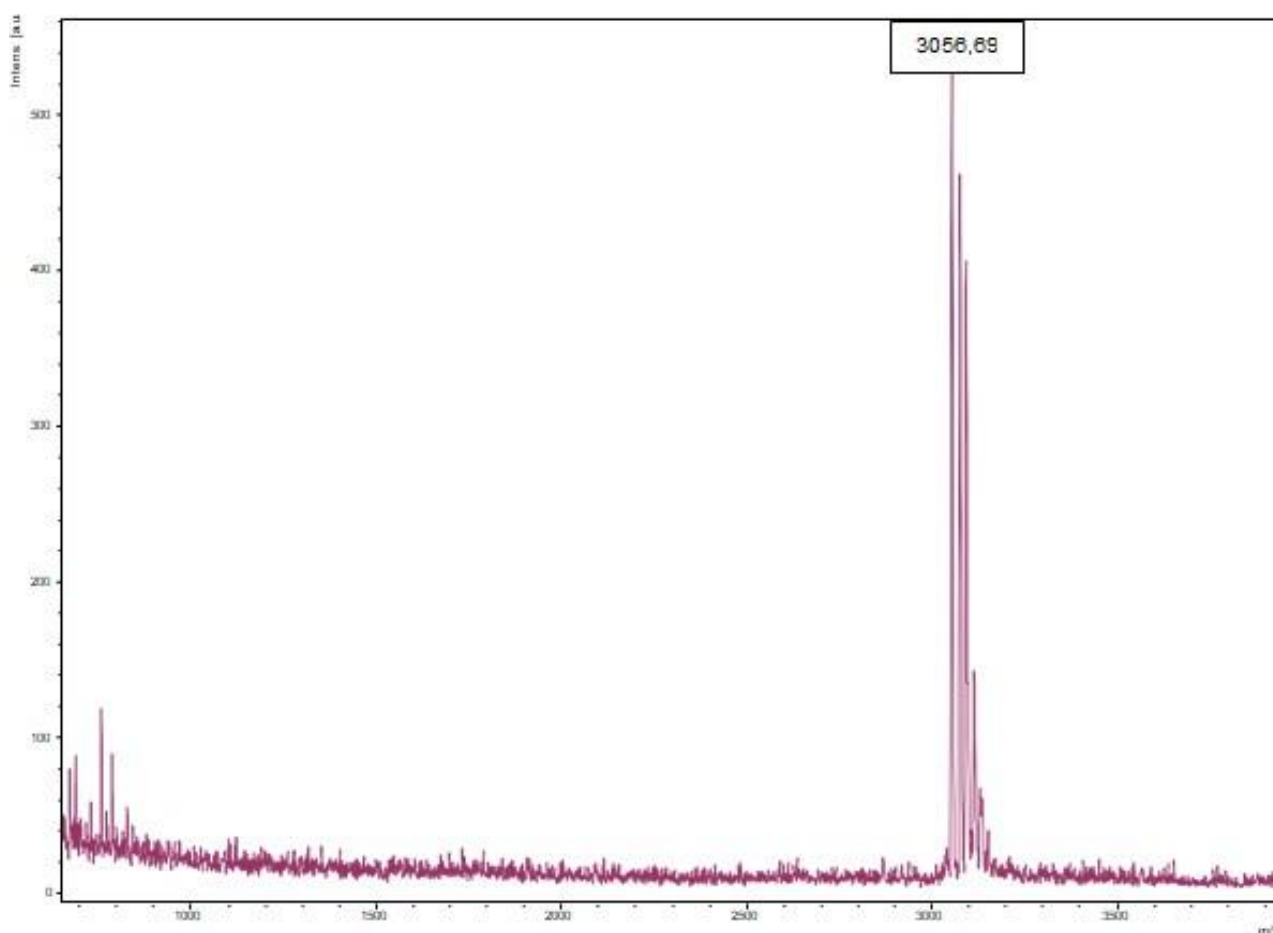


Figura 8 - Espectro de massa obtido em sistema MALDI-TOF/TOF de massa das Frações DM 12, modo refletido positivo, matriz DHB. UltraflexII TOF/TOF. Destacando-se componentes de massa 3056,69 m/z.

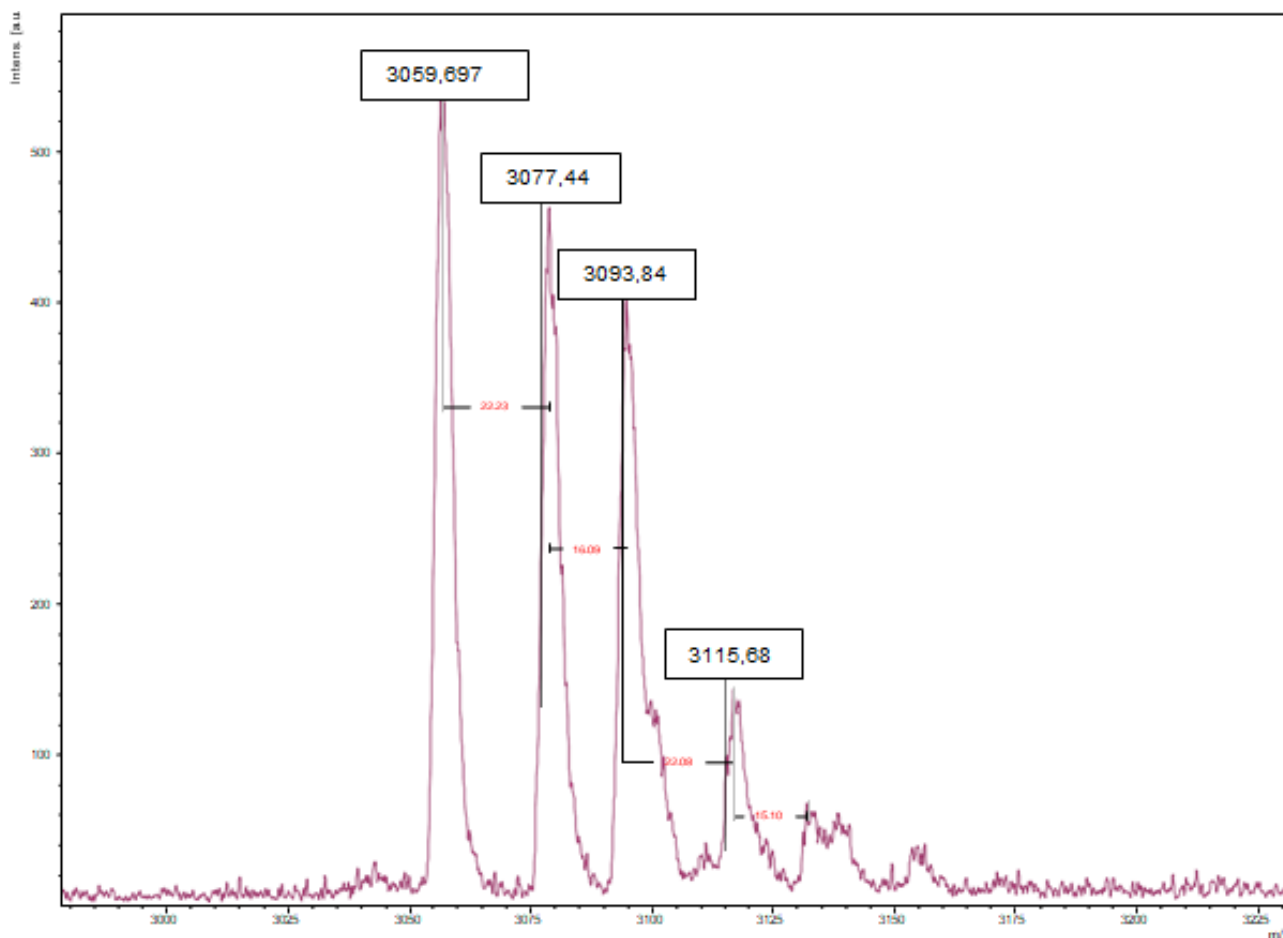


Figura 9 - Ampliação do espectro de massa das Frações DM 12, indicando alternância de 22 e 16Da de diferença entre as massas analisadas em sistema MALDI-TOF/TOF, modo refletido positivo, matriz DHB. UltraflexII TOF/TOF destacando-se os componentes de massas 3077,44, 3093,84, 3115,68 e 3056,69 m/z.

A cromatografia da fração DM 12 foi feita em RP-HPLC com UV de 200-800nm para demonstrar o padrão de absorção da molécula, demonstrando que a máxima absorção da molécula está em 200nm (Figura 10).

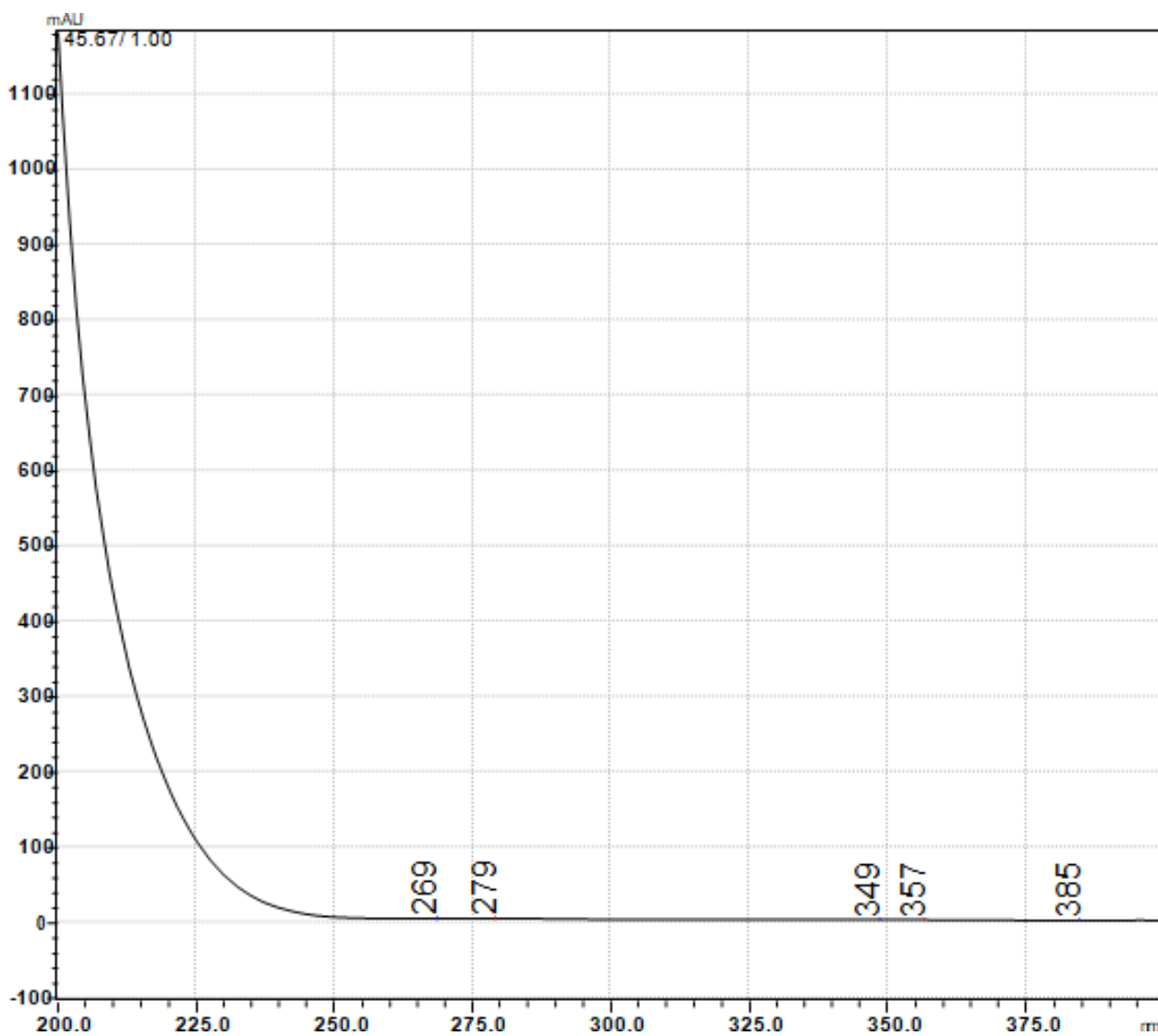


Figura 10 - Padrão de absorção de DM 12 do perfil cromatográfico de *Dermatonotus muelleri* obtido a partir de 200 μ L da secreção bruta em uma coluna de fase Reversa C18 (Shimadzu-CLC-ODS, 15 cm) com fluxo de 1 mL/min com detecção entre 200 e 800 nm. Ampliação sobre absorção da fração de DM 12.

O teste de SPV foi realizado com o intuito de verificar a natureza da molécula. Este teste é um indicador da presença de lipídios e é realizado a base de vanilina e produz uma coloração rosa avermelhada. Foi utilizado vaselina como padrão de leitura, e o resultado demonstrou que tanto DM 1 quanto DM 12 apresentaram coloração quando submetidos ao ensaio. Os resultados estão apresentados no seguinte gráfico (Figura 21).

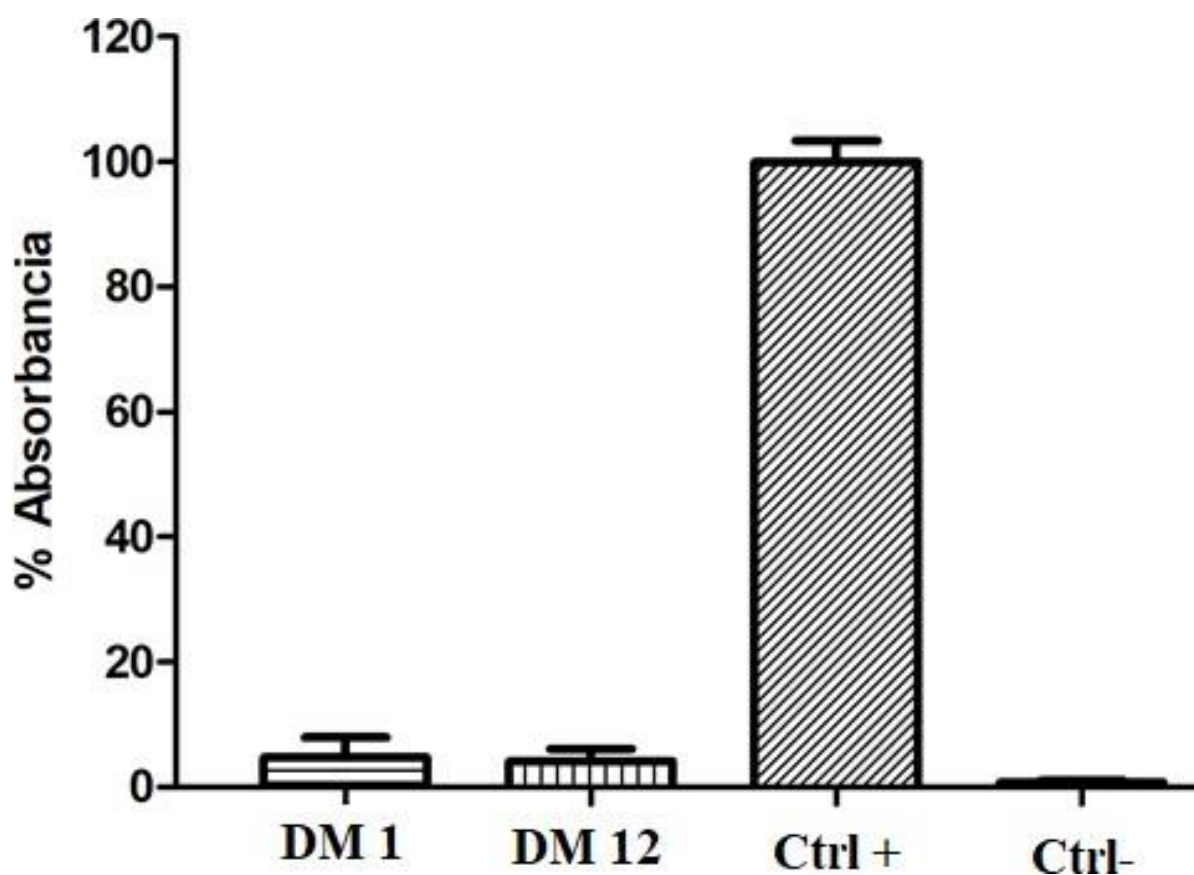


Figura 11 - Determinação da presença de lipídios na fração de DM 1 pelo Método Sulfo-Fosfo-Vanilina a partir da coloração obtida pela reação da vanilina com as duplas ligações ou a hidroxilas livres dentro dos analitos lipídicos. Ctrl + = vaselina com vanilina. Ctrl - = ácido sulfúrico com vanilina. Leitura 530nm. Os resultados são expressos pela média \pm desvio padrão. Leitura a 530nm

5.2- Atividade antimicrobiana e natureza de interação das moléculas

No passo seguinte, foram selecionadas DM 1 e DM 12 devido a suas atividades inibitórias verificadas no *screening*. Partindo disso foram determinados os MIC's para *S.aureus*, *E.coli* e *C.albicans*, resultando no gráfico apresentado abaixo (Figura 12). DM1 apresentou uma inibição máxima de 25% para *C.albicans* na concentração de 12,5 mM. (Figura 12 A) e MIC de 12,5 mM para *S. aureus* e *E.coli*, considerando o desvio padrão (Figura 12 B e C).

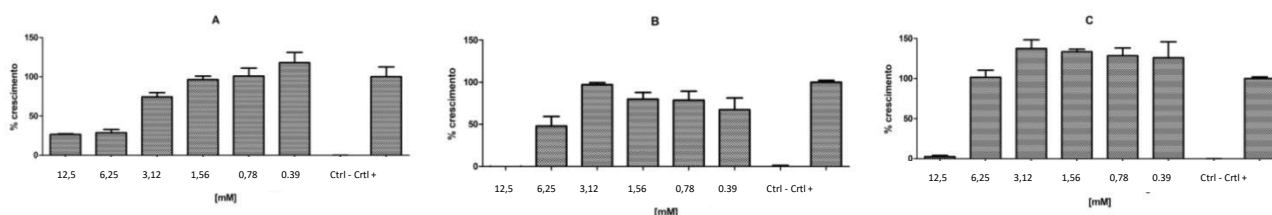


Figura 12 – Ensaio antimicrobiano realizado em formato de diluição seriada com a fração cromatográfica DM 1. A porcentagem de inibição de crescimento contra A – *Candida albicans*, B-*Escherichia coli* C – *Staphylococcus aureus* foram calculados após 24h de incubação a 37°C. Todas plaqueadas em triplicata com as frações. Ctrl + corresponde a 50% de microrganismo e 50% água Milli-Q. Ctrl – corresponde a 50% microrganismos com 50% formol 0,8%. Os resultados são expressos pela média \pm desvio padrão. Leitura a 620nm.

A fração DM 12 apresentou 50% inibição para *E.coli* na concentração de 1,1 mM, e a atividade se manteve praticamente igual para as próximas diluições, variando no máximo em 10% de inibição (Figura 13 A e B).

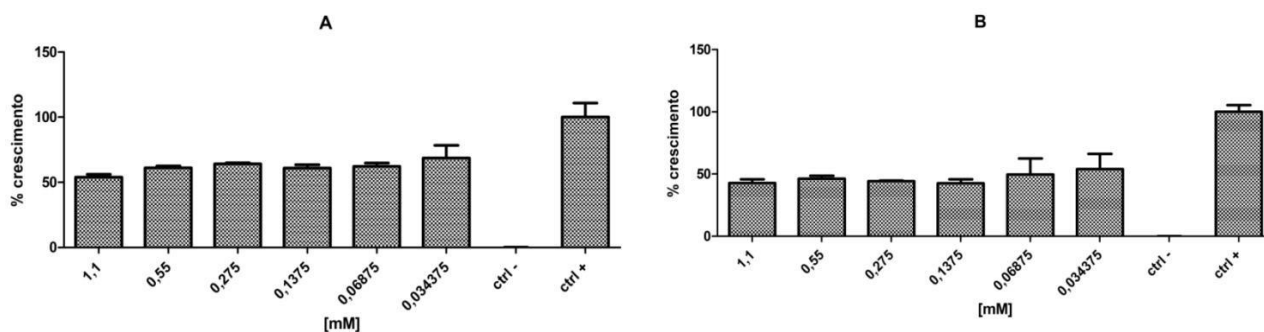


Figura 13 - Ensaio antimicrobiano realizado em formato de diluição seriada com a fração cromatográfica DM 12. As porcentagens de inibição de crescimento contra A – *Escherichia coli* B – *Staphylococcus aureus* foram calculadas após 24h de incubação a 37°C. Todas plaqueadas em triplicata com as frações. Ctrl + corresponde a 50% de microrganismo e 50% água Milli- Q. Ctrl – corresponde a 50% microrganismos com 50% formol 0,8%. Os resultados são expressos pela média \pm desvio padrão. Leitura a 620nm.

Os resultados dos MIC's estão resumidos na seguinte tabela (Tabela 2).

Tabela 2 - MIC' s apresentados pelas amostras de DM 1 considerando o desvio padrão (mM).

MIC (mM)	<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
DM 1	12,5 \rightarrow 25%*	12,5	12,5
DM 12	NR	1,1 \rightarrow 50%**	1,1 \rightarrow 50%**

* = não foi possível o cálculo do MIC, dado que houve apenas 25% de inibição na maior concentração testada de 12,5 mM.

**= não foi possível o cálculo do MIC dado que houve apenas 50% de inibição na maior concentração testada de 1,1 mM.

NR= não realizado por insuficiência de material.

Para verificar a natureza da interação da molécula de DM1, foi realizado o ensaio de interação com emulsão de micelas formadas com fosfatidilcolina (Figura 14 A) e fosfatidilcolina mais colesterol (Figura 14 B) esse ensaio revelou que DM 1 foi capaz de interagir e romper 60% das micelas formada por Fosfatidilcolina e 40% de Fosfatidilcolina com Colesterol na concentração de 12,5mM, demonstrando que DM 1 possivelmente exerce interação com membranas fosfolipídicas. Para verificar a significância entre as duas metodologias utilizadas, demonstrou-se que $R^2 = 0,98$ e $p < 0.0001$, o que demonstra que há significância dos resultados de uma metodologia para a outra

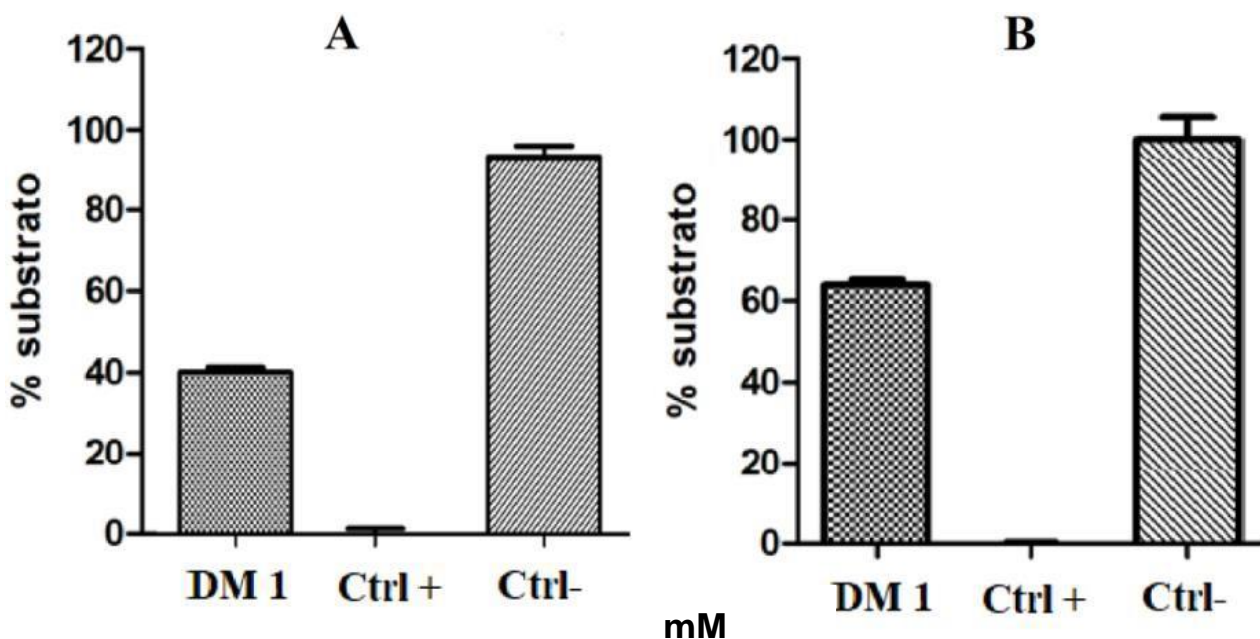


Figura 14 - Ensaio de interação com micelas formadas por fosfatidilcolina (3mM) (A) e fosfatidilcolina mais colesterol (3mM) (B) com a fração cromatográfica DM1 (12,5mM). Porcentagem de interação com 1h de incubação. Plaqueadas em triplicata com a fração. Ctrl - =50% de emulsão de micelas em tampão Tris-HCl. Ctrl += 50% de emulsão de micelas com triton - x 1%. Os resultados são expressos pela média \pm desvio padrão. Leitura a 240nm.

5.3- Ensaio de sinergismo

Para realizar o ensaio de sinergismo foi determinado o MIC do composto comercial Ofloxacina a uma concentração inicial de 55 mM contra *S.aureus* e *E.coli*, resultando em um MIC de 3,3 μ M para ambos (Figura 15).

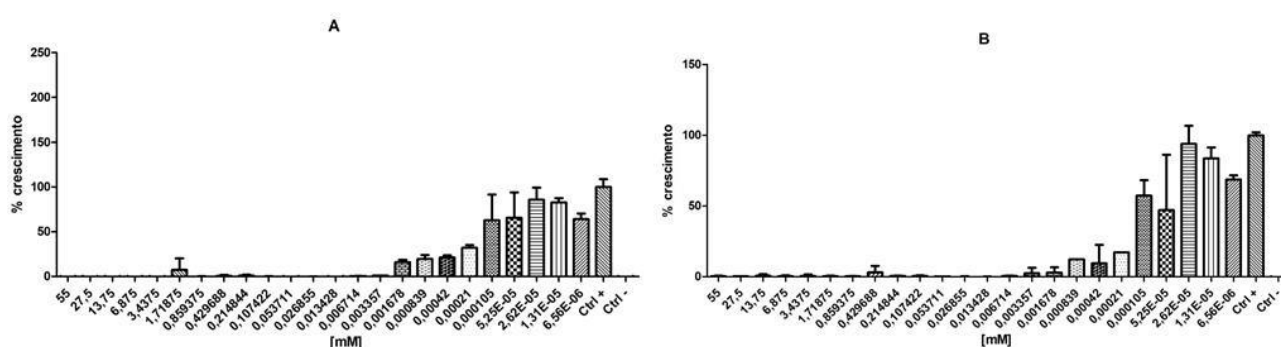


Figura 15 - Ensaio antimicrobiano realizado em formato de diluição seriada do composto antimicrobiano comercial Ofloxacina. As porcentagens de inibição de crescimento contra A – *Staphylococcus aureus* B – *Escherichia coli* foram calculados após 24h de incubação a 37°C. Todas plaqueadas em triplicata com as frações. Ctrl +/- corresponde a 50% de microrganismos e 50% água Milli-Q. Ctrl -/= corresponde a 50% microrganismos com 50% formol 0,8%. Os resultados são expressos pela média \pm desvio padrão. Leitura a 620nm.

O ensaio de sinergismo gerou vários poços com concentrações diversas. Foram escolhidas as fileiras com as maiores e menores concentrações possíveis, tanto para *S.aureus* quanto para *E.coli*.

5.4- Sinergismo para *S.aureus*

Foi gerado um gráfico com os resultados da diluição do MIC de DM1 (Figura 12 C), foi feito o mesmo para Ofloxacina (Figura 14 A) e foram selecionados os poços do ensaio de *checkerboard* (DM 1 + Ofloxacina) que mais se aproximavam dos valores das diluições de DM 1 e Ofloxacina (Figura 16), resultando na análise das maiores concentrações testadas para o ensaio de *checkerboard*. O resultado evidencia que DM 1 foi capaz de atuar em conjunto com Ofloxacina e promover inibição total, mesmo em situações em que o crescimento bacteriano já estava acima de 50% quando testado apenas com Ofloxacina.

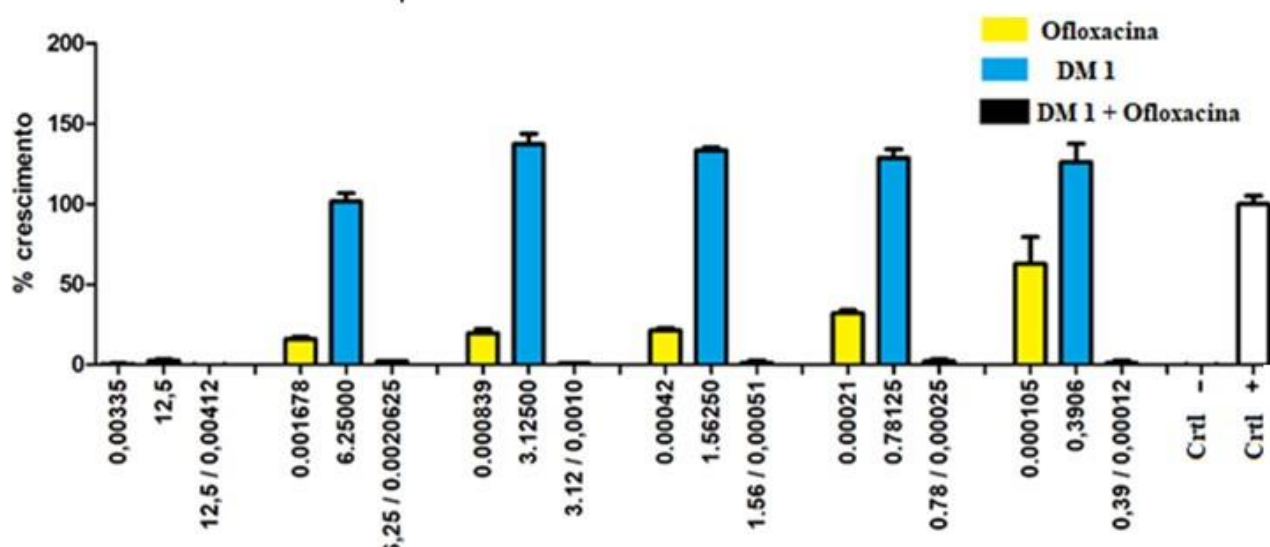


Figura 16- Ensaio antimicrobiano realizado em formato de diluição seriada do composto antimicrobiano comercial Ofloxacina e para DM 1 separadamente, acrescido do resultado obtido no ensaio de sinergismo de Ofloxacina com DM 1. A porcentagem de inibição de crescimento para o sinergismo contra *Staphylococcus aureus* foi calculada após 24h de incubação a 37°C. Todas plaqueadas em triplicata com as frações. Ctrl + corresponde a 50% de microrganismo e 50% água Milli-Q. Ctrl - corresponde a 50% microrganismos com 50% formol 0,8%. Os resultados são expressos pela média \pm desvio padrão. Leitura a 620nm.

O cálculo de sinergismo foi feito para todas as concentrações do gráfico gerado (Figura 16). Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Cálculo de sinergismo, de acordo com o protocolo de *Checkerboard*, para as maiores concentrações de DM1 com Ofloxacina, de acordo com a Figura 16.

CIF A = MIC A com MIC B/ MIC A	CIF B = MIC B com A/MIC de B	I CIF = MIC A + MIC B	Resultado
0,12uM/3,3µM = 0,036	390µM/12500 µM= 0,031	0,036 + 0,0312 = 0,0672	≤0.5 = sinergismo
0,26uM/3,3µM = 0,078	780µM/12500µM= 0,0624	0,078 + 0,0624 = 0,1404	≤0.5 = sinergismo
0,51uM/3,3µM = 0,154	1560µM/12500µM=0,1248	0,154 + 0,1248 = 0,2788	≤0.5 = sinergismo
1,03uM/3,3µM = 0,312	3130µM/12500µM=0,2504	0,312 + 0,2504 = 0,2816	≤0.5 = sinergismo
2,06uM/3,3µM = 0,624	6250µM/12500µM= 0,5	0,624 + 0,5 = 1,1240	>1 = antagonismo
4,12uM/3,3µM = 1,248	12500µM/12500µM = 1	1,248 + 1 = 2,2480	>1 = antagonismo

Todas as concentrações testadas foram capazes de melhorar a inibição contra *S.aureus*. As concentrações de 0,12/390, 0,26/780, 0,51/1560, 1,03/3130 (Ofloxacina/DM 1 em µM) apresentaram sinergismo e as concentrações 2,06/6250 e 4,12/12500 (Ofloxacina/DM 1 em µM) apresentaram antagonismo, porém mantiveram a inibição.

Outro gráfico foi gerado com as menores concentrações de DM 1 mais Ofloxacina obtidas no ensaio de *checkerboard* (Figura 17).

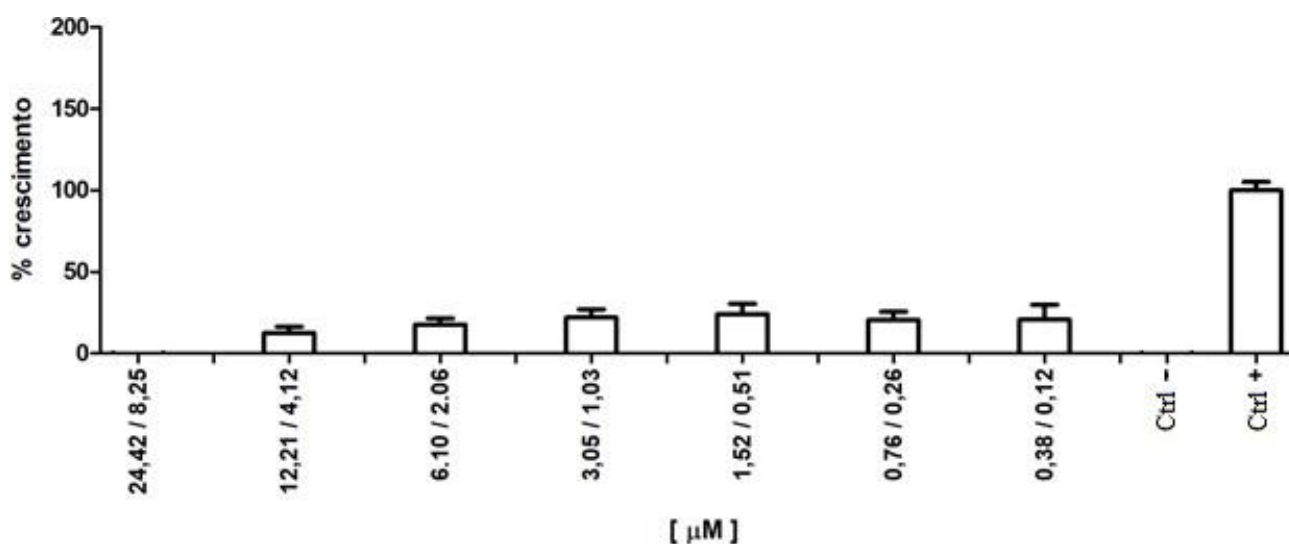


Figura 17 - Ensaio de sinergismo de Ofloxacina com DM 1 considerando as menores concentrações obtidas. A porcentagem de inibição de crescimento para o sinergismo contra *Staphylococcus aureus* foi calculada após 24h de incubação a 37°C. Todas plaqueadas em triplicata com as frações. Ctrl + corresponde a 50% de microrganismo e 50% água Milli-Q. Ctrl - corresponde a 50% microrganismos com 50% formol 0,8%. Os resultados são expressos pela média ± desvio padrão. Leitura a 620nm.

Para verificar o sinergismo entre os compostos foram feitos os cálculos do *checkerboard* (Tabela 4).

Tabela 4 - Cálculo de sinergismo, de acordo com o protocolo de *Checkerboard*, para as menores concentrações de DM1 com Ofloxacina, de acordo com a Figura 17.

CIF A = MIC A com MIC B/ MIC A	CIF B = MIC B com A/MIC de B	I CIF = MIC A + MIC B	Resultado
0,12 uM/3,3 μM = 0,036	0,38 μM /12500 μM = 0,0000304	0,036 + 0,0000304= 0,0360304	≤0.5 = sinergismo
0,26 uM/3,3 μM = 0,078	0,76 μM /12500 μM = 0,0000608	0,078 + 0,0000608= 0,780608	≤0.5 = sinergismo
0,51 uM/3,3 μM = 0,154	1,52 μM/12500 μM = 0,0001216	0,154 + 0,0001216= 0,1541216	≤0.5 = sinergismo
1,03 uM/3,3 μM = 0,312	3,05 μM /12500 μM = 0,000244	0,312 + 0,000244= 0,312244	≤0.5 = sinergismo
2,06 uM/3,3 μM = 0,624	6,10 μM /12500 μM = 0,000488	0,624 + 0,000488= 0,624488	>1 = antagonismo
4,12 uM/3,3 μM = 1,248	12,21 μM / 12500 μM= 0,0009768	1,248 + 0,0009768 = 1,2489768	>1 = antagonismo

5.5- Sinergismo para *E.coli*

Foi gerado um gráfico a partir dos MIC's de DM 1 (Figura 12 B), Ofloxacina (Figura 15 B) e os resultados do *checkerboard* (considerando os poços que mais se aproximavam dos MIC's individualmente) (Figura 18), resultando na análise das maiores concentrações testadas para o ensaio de *checkerboard*. O resultado se manteve, com algumas pequenas alterações, e evidenciou que DM 1 foi capaz de atuar em conjunto com Ofloxacina e manter a porcentagem de crescimento indicando inibição total, mesmo em situações em que o crescimento bacteriano já estava acima de 50% quando testado apenas com Ofloxacina.

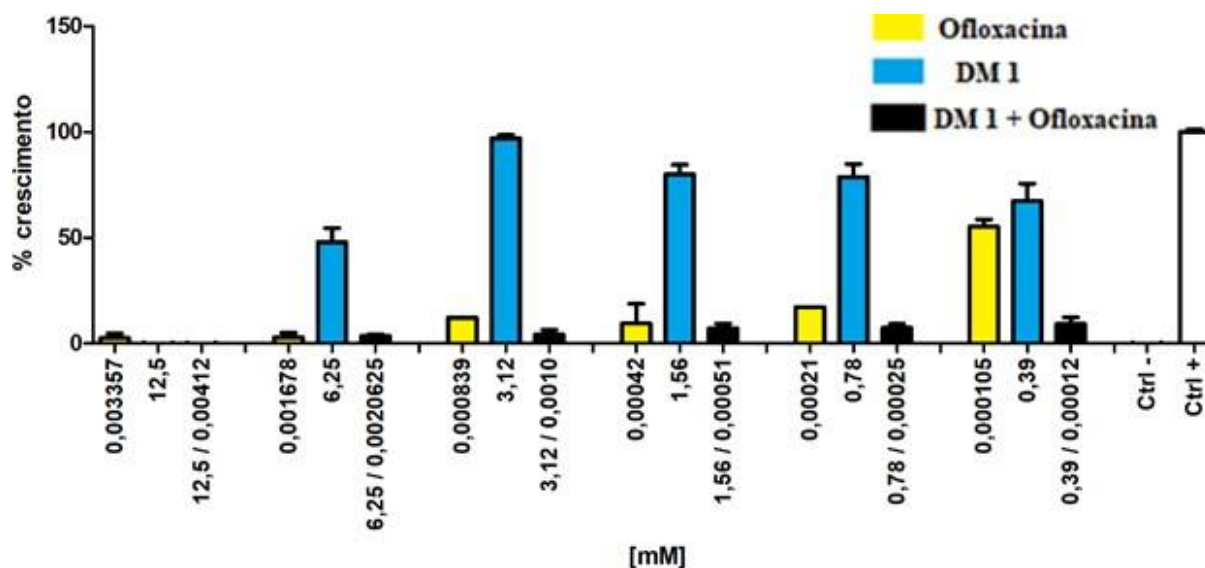


Figura 18 - Ensaio antimicrobiano realizadas em formato de diluição seriada do composto antimicrobiano comercial Ofloxacina e para DM 1 separadamente acrescido do resultado obtido no ensaio de sinergismo de Ofloxacina com DM 1. A porcentagem de inibição de crescimento para o sinergismo contra *Escherichia coli* foi calculado após 24h de incubação a 37°C. Todas plaqueadas em triplicata com as frações. Ctrl + corresponde a 50% de microrganismo e 50% água Milli-Q. Ctrl - corresponde a 50% microrganismos com 50% formol 0,8%. Os resultados são expressos pela média \pm desvio padrão. Leitura a 620nm.

O cálculo de sinergismo foi realizado para todas as concentrações do gráfico gerado (Figura 18). Os resultados foram expostos na Tabela 5.

Tabela 5 - Cálculo de sinergismo, de acordo com o protocolo de Checkerboard, para as maiores concentrações de DM1 com Ofloxacina, de acordo com a Figura 18.

CIF A = MIC A com MIC B/ MIC A	CIF B = MIC B com A/MIC de B	I CIF = MIC A + MIC B	Resultado
0,12uM/3,3 μ M = 0,036	390 μ M /12500 μ M = 0,0312	0,036 + 0,0312 = 0,0672	≤ 0.5 = sinergismo
0,26 uM/3,3 μ M = 0,078	780 μ M /12500 μ M = 0,0624	0,078 + 0,0624 = 0,1404	≤ 0.5 = sinergismo
0,51 uM/3,3 μ M = 0,154	1560 μ M /12500 μ M = 0,1248	0,154 + 0,1248 = 0,2788	≤ 0.5 = sinergismo
1,03 uM/3,3 μ M = 0,312	3130 μ M /12500 μ M = 0,2504	0,312 + 0,2504 = 0,2816	≤ 0.5 = sinergismo
2,06 uM/3,3 μ M = 0,624	6250 μ M /12500 μ M = 0,5	0,624 + 0,5 = 1,1240	> 1 = antagonismo
4,12 uM/3,3 μ M = 1,248	12500 μ M /12500 μ M = 1	1,248 + 1 = 2,2480	> 1 = antagonismo

Esse resultado mostra que de todas as concentrações analisadas obtiveram resultados positivos e, destas, as concentrações de 0,12/390, 0,26/780, 0,51/1560, 1,03/3130 (Ofloxacina/DM 1 em μM) apresentaram sinergismo, enquanto as concentrações 2,06/6250 e 4,12/12500 (Ofloxacina/DM 1 em μM) apresentaram antagonismo, porém mantiveram a inibição.

Outro gráfico foi gerado com as menores concentrações de DM1 mais Ofloxacina obtidas no ensaio de *checkerboard* (Figura 19).

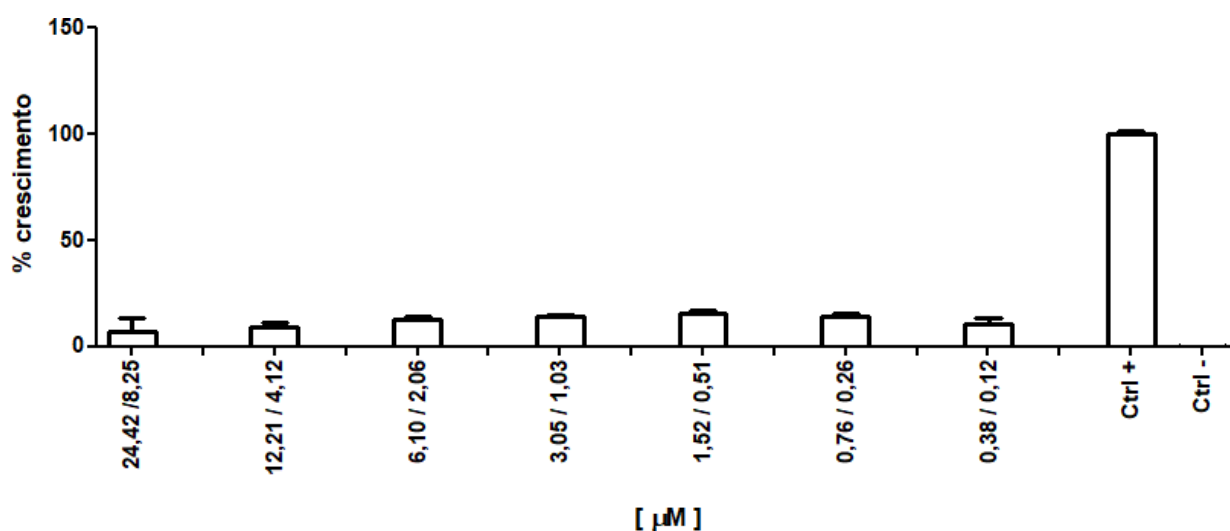


Figura 19 - Ensaio de sinergismo de Ofloxacina com DM 1 considerando as menores concentrações obtidas. A porcentagem de inibição de crescimento para o sinergismo contra *Escherichia coli* foi calculado após 24h de incubação a 37°C. Todas plaqueadas em triplicata com as frações. Ctrl + corresponde a 50% de microrganismo e 50% água Milli-Q. Ctrl - corresponde a 50% microrganismos com 50% formol 0,8%. Os resultados são expressos pela média \pm desvio padrão. Leitura a 620nm.

Para verificar o sinergismo entre os compostos foram feitos os cálculos do checkerboard (Tabela 6).

Tabela 6 - Calculo de sinergismo, de acordo com o protocolo de Checkerboard, para as menores concentrações de DM1 com Ofloxacina, de acordo com a Figura 19.

CIF A = MIC A com MIC B/ MIC A	CIF B = MIC B com A/MIC de B	I CIF = MIC A + MIC B	Resultado
0,12 uM/3,3 µM = 0,036	0,38 µM /12500 µM = 0,0000304	0,036 + 0,0000304 = 0,0360304	≤0.5 = sinergismo
0,26 uM/3,3 µM = 0,078	0,76 µM /12500 µM = 0,0000608	0,078 + 0,0000608 = 0,780608	≤0.5 = sinergismo
0,51 uM/3,3 µM = 0,154	1,52 µM/12500 µM = 0,0001216	0,154 + 0,0001216 = 0,1541216	≤0.5 = sinergismo
1,03 uM/3,3 µM = 0,312	3,05 µM /12500 µM = 0,000244	0,312 + 0,000244 = 0,312244	≤0.5 = sinergismo
2,06 uM/3,3 µM = 0,624	6,10 µM /12500 µM = 0,000488	0,624 + 0,000488 = 0,624488	>1 = antagonismo
4,12 uM/3,3 µM = 1,248	12,21 µM / 12500 µM = 0,0009768	1,248 + 0,0009768 = 1,2489768	>1 = antagonismo

5.6- Ensaio de viabilidade celular

As concentrações de 10, 100 e 1000 de DM 1 (μg) foram testadas para MCF-7 e Fibroblastos resultando no gráfico apresentado na figura 20.

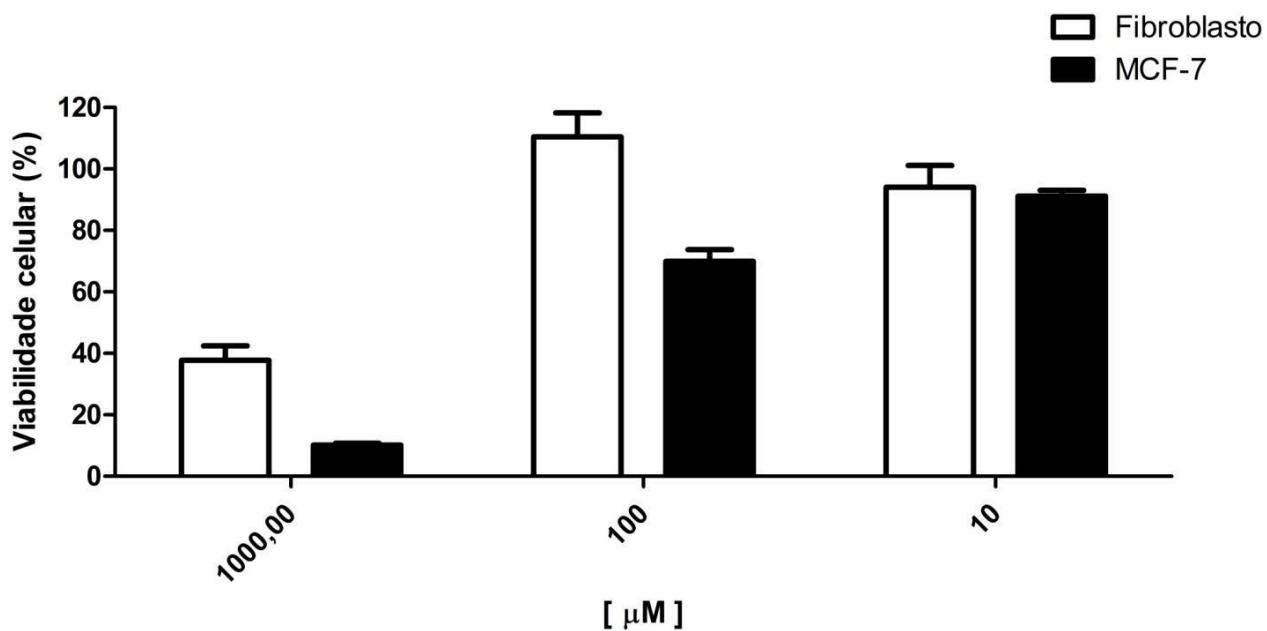


Figura 20 - Ensaio de viabilidade celular da fração DM 1 realizado contra MCF-7 e Fibroblasto de acordo com a legenda. A porcentagem da viabilidade celular foi calculada após 24h de incubação a 37°C. Os resultados são expressos pela média \pm desvio padrão. Leitura a 620nm. Controle positivo considerado como 0% de viabilidade celular e controle negativo considerado como 100% de viabilidade celular.

O segundo ensaio foi feito em formato de diluição seriada de DM 1, sendo que a concentração máxima testada foi de 1000 μM e a mínima 0,15 μM . As células foram incubadas em placa de 96 poços de fundo chato e resultaram no seguinte gráfico (Figura 21 A). A partir disso, foi calculado o IC50 tanto para MCF-7(Figura 21 B), quanto para Fibroblastos (Figura 21 C).

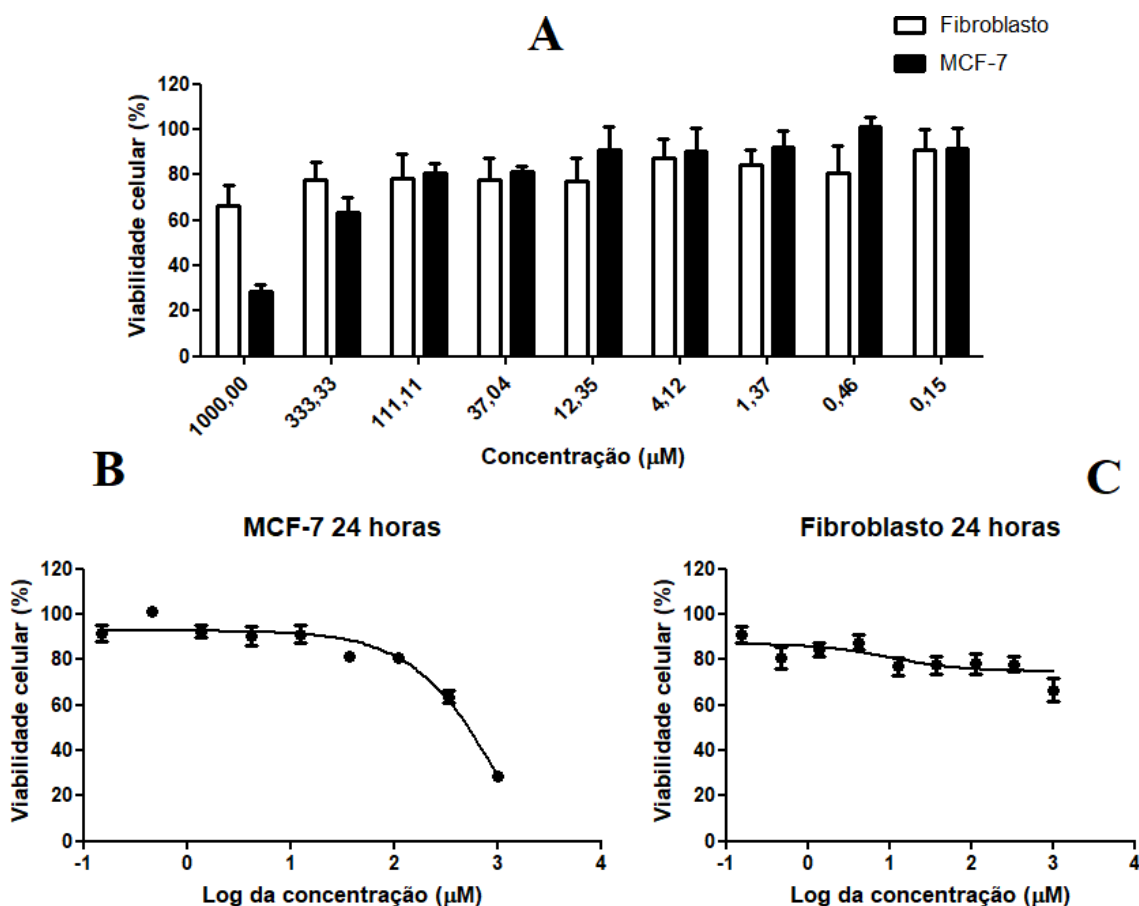


Figura 21 – (A) Ensaio de viabilidade celular com diluição seriada da fração DM 1 contra MCF-7 e Fibroblasto. A porcentagem da viabilidade celular foi calculada após 24h de incubação a 37°C (B) Gráfico em log gerado a partir da viabilidade celular de MCF-7 de acordo com (A). (C) Gráfico em log gerado a partir da viabilidade celular de Fibroblasto de acordo com (A). Os resultados são expressos pela média \pm desvio padrão. Leitura a 620nm

6 - Discussão

A secreção cutânea de *Dermatonotus muelleri* foi extraída por estímulo elétrico e posteriormente liofilizada. Essa secreção foi ressuspensa em metanol e submetida a fracionamento e purificação por RP-HPLC resultando em 12 frações cromatográficas (Figura 3).

Lehninger *et al* (2014) afirma que os lipídeos, de forma geral, são insolúveis em água e por esse motivo a extração desse compostos é favorecida ao se usar um solvente orgânico. Um dos solventes orgânicos indicados para a extração de lipídeos de membrana (a exemplo dos glicerofosfolipídeos, esfingolipídeos) é o metanol.

Lehninger *et al* (2014) ainda afirma que isso ocorre devido à característica mais polar desse solvente, que desestabiliza as ligações de hidrogênio, reduz a força das interações hidrofóbicas, e interfere nas interações eletrostáticas que os lipídios de membrana fazem com os componentes da membrana.

Essa afirmação é reforçada por Peterson & Cummings (2006) que afirma que o uso de metanol é indicado para a extração de lipídios complexos como fosfolipídios, isso se dá devido à característica mais polar desse solvente orgânico.

Alguns trabalhos demonstram na prática que o uso de metanol favorece a obtenção de lipídios, um deles é o de Ryuzaki *et al* (1975) em seu trabalho com *Rana nigromaculata*, *Bufo bufo japonicus* e *Xenopus laevis*, é relatado o uso de uma composição de clorofórmio e metanol, com o objetivo específico de extrair lipídeos da pele de anuros. Ao executar os experimentos de sílica em gel e cromatografia gás-líquido, foi capaz de isolar monoglicosilceramidas, galactosilceramida e ácidos graxos.

Outro trabalho que também utiliza um extrato metanólico é o de Fusco *et al* (2020), que relevou, a partir da análise por CG/MS, uma vasta gama de lipídios presentes na a secreção cutânea *Argenteohyla siemersi*, identificando ácidos graxos e esteroides.

Ao utilizar a técnica de RP-HPLC, Cavalcante *et al* (2017) encontrou em seu trabalho 12 frações na secreção de *Dermatonotus muelleri*, sendo que não há relatos da presença de qualquer composto lipídico. Porém, o grupo utiliza água para a extração dos compostos da secreção cutânea, diferente do presente trabalho.

De acordo com Peterson & Cummings (2006) e baseado em Christie (1982), os lipídios são classificados em simples (esses são lipídios neutros e não polares) geralmente representados por ácidos graxos livres, colesterol, ester de colesterol e glicerídeos, ou podem ser compostos (esses são lipídios polares) geralmente representados por fosfolipídios, glicolipídios e esfingolipídios. De acordo com Yoon *et al* (2018), os lipídios antimicrobianos tem características anfifílicas, assim como postula Lehninger *et al* (2014) que afirma o mesmo.

A fração DM 1, em destaque neste trabalho, foi purificada a partir da metodologia de RP-HPLC e elui logo nos primeiros minutos da corrida, podendo-se considerar, assim, que a molécula possui pouca interação com a coluna. De acordo com Bunger & Pison (1995) a técnica de RP-HPLC executa o fracionamento dos compostos a partir da polaridade da molécula, onde a fase móvel é mais polar que a fase estacionária. Assim sendo, Peterson & Cummings (2006) descreve que a adsorção do analito depende da interação com a fase estacionária. Perona & Ruiz-Gutierrez (2003) explica que a amostra é fracionada de acordo com a quantidade de ligações duplas presentes nas cadeias laterais de ácidos graxos e o comprimento total dessa cadeia lateral. E por

fim Singh & Jiang (1995) indica que as fases móveis a serem utilizadas devem ser isopropanol acetoneitrila, água, hexano e metanol.

Um trabalho que demonstra na prática o uso de RP-HPLC para separar lipídios é o de Mounts *et al* (1992) que ao faz uso de uma coluna RSIL-C18, HL, (250 X 4.6 mm, 10 μ) para fracionar fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina (fase móvel metanol, água e clorofórmio – 20:1:1 e 30:1:1 respectivamente).

Outro trabalho que demonstra a efetividade na técnica de RP-HPLC no fracionamento de lipídios é o escrito por Zhai e Reylli (2002) onde é demonstrado que é possível separar fosfolipídios, tanto em fase normal quanto em fase reversa. Em relação à fase reversa, foi utilizada uma coluna Zorbax SB-C18, (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) com fase móvel de metanol, clorofórmio, acetoneitrila e água (79,5: 9: 8: 3,5, por vol.) em modo isocrático, sendo capaz de separar fosfolipídios como 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diacil-snglicero-3-fosfoetanolamina, fosfatidilglicerol, 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina.

Além disso, Vorauer-uhl *et al* (2009) realiza o fracionamento de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3- [fosfo-rac- (1-glicerol)], monofosforil lipídio-A e colesterol, a partir do uso 95% de metanol e 5% de água como fase móvel A e o solvente B composto de 100% de isopropanol e 0,1% de TFA, com uma coluna Luna® C18 100 Å, LC Column (150 x 4.6 mm , 5 μ m)

Pode-se ainda citar Borkovcová *et al* (2009), que faz uso de uma coluna Zorbax Eclipse XDB C8, (150 x 4.6 mm, 5 μ m) com fase móvel de metanol e água (95:5) e metodologia isocrática, demonstrando ser possível identificar colesterol.

Outro que segue a mesma linha de estudo é WÖLL *et al* (2018) que utiliza uma coluna XSelect CSH C18 (4.6 mm x 150 mm, 5 µm) e fraciona vários glicerofosfolipídeos e fosfolipídios utilizando fase móvel composta de água e metanol (1:1 v/v) como solução A e metanol e etanol (3:2 v/v) como solução B.

O trabalho de Martosella (2006) ainda demonstra que a técnica de RP-HPLC é eficaz em separar proteínas, peptídeos e lipídios. Os autores chegaram a essa conclusão utilizando uma coluna Agilent macroporos C18 (4,6 x 50 mm)

Já Lee *et al* (2009), ao fazer uso de uma coluna Nova-Pak C18 (100 mm x 8 mm, 4 µm,) e fase móvel composta por metanol, água destilada e trietilamina (92: 8: 0,1 (v/v)) demonstra que é possível purificar ceramidas obtidas a partir de esfingosinas e dihidroesfingosinas pelo método de RP-HPLC.

De acordo com Hancock & Chapple (1999) e Brogden (2005), a maioria dos peptídeos antimicrobianos (PAM's) apresentam uma tendência hidrofóbica (face apolar mais abundante). Esses geralmente são eluídos na corrida cromatográfica quando aumento de acetonitrila na corrida. Logo, é interessante destacar que a fração DM 1 estudada nesse trabalho elui nos primeiros momentos da corrida, apresentando um comportamento divergente da maioria dos peptídeos antimicrobianos.

Todas as frações foram submetidas a um *screening* (Figura 4). Ao realizar o *screening*, de forma geral, todas as frações foram capazes de inibir o crescimento de *S.aureus* e *E.coli*, destacando-se as frações 1 e 12 que apresentaram atividade contra *S.aureus* e *E.coli* que foram inibidas em 100% por DM 1 e em torno de 50% para DM 12, já contra *C.albicans* ambas apresentaram inibição próxima de 50%.

Temponeet *et al* (2006) testou a secreção bruta de *Dermatonotus muelleri* e verificou que em uma concentração de 500µg/mL houve a inibição de 15,63% do crescimento de *Candida krusei*, e, no presente trabalho, demonstramos que as frações DM 1 e DM 12 também foram capazes de inibir *C.Albicans*, divergindo apenas na porcentagem de inibição.

Já Fernandes (2014) utiliza a secreção bruta de *Dermatonotus muelleri* contra *P.aeruginosa* e *S.aureus* e relata que não houve atividade nem para a bactéria Gram-negativa nem para a Gram-positiva. Tais resultados divergem dos apresentados neste trabalho, pois as frações DM 2 a 11 tiveram por volta de 50% de inibição contra *E.coli* e *S.aureus*, além disso, DM 1 foi capaz de inibir 100% do crescimento das duas bactérias, além de inibir 50% do crescimento de *C.albicans*, enquanto DM 12 manteve inibição próxima a 50% de para *C.albicans* e *E.coli*, e de 25% para *S.aureus*. Vale destacar que as metodologias aplicadas foram diferentes, além disso, é relatado que os animais não foram mantidos em condições adequadas para os objetivos do ensaio, desfavorecendo a produção de compostos antimicrobianos.

Outro trabalho com a mesma linha de estudo é Cavalcante *et al* (2017) que utiliza uma coluna ACE[®] C18 100 Å,(250 mm 4.6 mm, 5 µm) com fases móveis de água (solução A) e acetonitrila (solução B) para separar moléculas de baixo peso molecular encontrando 12 frações de *Dermatonotus mulleri*. Essas 12 frações foram testadas

contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Micrococcus luteus*, porém não apresentara atividade. Adicionalmente, *S.aureus* teve seu crescimento melhorado em 79% na presença da fração 8, que apresentava triptofano. Devido à diferença no tratamento das amostras, provavelmente o extrato obtido no trabalho é diferente do obtido neste trabalho, já que tanto DM 1 quanto DM 12 foram efetivas contra *S.aureus*.

Tanto DM 1 como DM 12 apresentaram uma atividade promissora, porém, pela dificuldade de acumulo de material da fração DM12, não foi possível a realização de todos os testes para essa fração.

O resultado da espectrometria de massa revelou que DM 1 se encontrava pura e apresentava uma carga massa de 945,075 m/z (Figura 5). Tanto nos trabalhos de Cavalcante *et al* (2017) quanto Frihling *et al* (2018) não foram encontradas massas iguais ou próximas a apresentada por DM 1, e, em tais trabalhos não foi citada a presença de lipídios nos extratos obtidos.

Para dar continuidade a identificação de DM 1, foi realizada a fragmentação em modo lift do íon 945,075 m/z (Figura 6) sendo que o padrão de fragmentação não apresentou fragmentos característicos de aminoácidos. Segundo Ladram *et al* (2016) os peptídeos antimicrobianos apresentam por volta de 8 a 46 resíduos e aminoácidos, e, ao serem fragmentados, os resíduos mais encontrados são lisina(K), arginina(R) e histidina(H). Demonstrando que de acordo com o padrão de fragmentação, DM 1 não parece pertencer à classe de peptídeos .

Além disso, foi realizado o ensaio de padrão de absorção UV (Figura 7), que demonstra que a molécula DM 1 apresenta absorção UV no comprimento de onda de 214nm e 250nm, sendo que a máxima absorção é obtida em 214nm.

De acordo com Van Kessel *et al* (1977), o método fotométrico é eficiente e os fosfolípidios não apresentam um pico específico de absorção, DM 1 apesar de apresentar a máxima absorção em 214nm, também apresenta absorção na faixa de 250nm,

Segundo Van Kessel *et al* (1977) o comprimento de onda em que se tem uma forte absorção de lípidios é na faixa de 203-214 nm, isso ocorre devido a presença de centros insaturados e grupos funcionais, como carbonil, carboxil, fosfato, amino e amônio quaternário. Em seu próprio trabalho, o autor mantém o detector UV a 206nm quando utiliza a técnica de HPLC para fracionar os fosfolípidios fosfatidiletanolamina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina fosfatidilcolina e lisofosfatidilcolina.

Essa afirmativa é reforçada, pelos trabalhos de Andrikopoulos *et al* (1986), que ao fracionar fosfolípidios como fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, esfingomiéline, fator ativador de plaquetas e lisofosfatidilcolina por meio de HPLC, mantém o detector de UV no comprimento de onda de 205nm.

Esse mesmo padrão é seguido por Lesnefsky *et al* (2000), que utiliza o comprimento de onda em a 206nm em UV para fracionar por HPLC os fosfolípidios fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina.

Porém Lee *et al* (2009), ao fracionar ceramidas e dihidroceramidas por HPLC ajusta o comprimento de onda para 340 a 455nm, demonstrando que o comprimento de onda de absorção de ceramidas diferem da maioria dos fosfolípidios.

Kirschenbaum (1975) já demonstrava que a maioria das proteínas é absorvida no comprimento de onda de 280nm, sendo descrito que a menor absorção obtida foi a 250nm e a maior foi a 750nm, Gómez-Alonso (2007) faz uso dos comprimentos de onda de 269, 280 e 300 nm em UV-vis e demonstra que as aminas biogênicas são absorvidas por volta de 278-280, isso pode ser devido a presença de anéis aromáticos em algumas estruturas. Quanto aos peptídeos, há uma variação no comprimento de onda a depender dos aminoácidos presentes nas estruturas.

A análise dos dados obtidos nesse trabalho, a eficiência da extração metanólica na extração de lipídios na metodologia de RP-HPLC para separação de lipídios, o tempo de retenção demonstrando, a pouca interação com a coluna, o resultado obtido pela espectrometria de massa de 945,075 m/z com a ausência de fragmentos de aminoácidos e a máxima absorção obtida na faixa de 214, quando comparados a dados de peptídeos, proteínas, aminas biogênicas e lipídios, sugerem que, o composto estudado nesse trabalho, DM1, seja de natureza lipídica.

Considerando a suposição de que DM1 é uma molécula lipídica, buscamos candidatos lipídicos que correspondesse à massa de 945 [M+H]⁺ (Com erro de 1Da) em bancos de dados. Ao se comparar a massa de DM 1 obtida através da análise de massa em sistema MALDI-TOF/TOF com os dados de massas dos lipídios no banco de dados *Lipidmaps*, lipidomic gateway (<https://www.lipidmaps.org/>), Foram encontrados 3 candidatos lipídicos possíveis, são eles glicerofosfoinositol de massa 942,62 m/z (C₄₆H₉₀NO₁₆P), um fosfoesfingolipídio de massa 943.60 (C₅₁H₉₁O₁₃P) e uma ceramida de massa 943.93 C₆₂H₁₂₁NO₄ (Tabela 1).

Becam *et al* (2017), demonstra que as esfingosinas, C₆-ceramide, α-C₆-ceramide, ω-C₆-ceramide, C₁₆-ceramide, α-C₁₆-ceramide e ω-C₁₆-ceramide possuem atividade

antimicrobiana contra *N. meningitidis*, *N.gonorrhoeae*, *E. coli* e *S. aureus* com MICs entre 2 e >64 µg/mL.

No trabalho de Drake *et al* (2008) se traça uma relação entre a ausência de ceramidas na pele e a dermatite atópica, devido à ausência de ceramidas levarem a colonização por *S.aureus* por conta de uma baixa nos níveis de esfingosina.

Outro trabalho que segue a mesma linha de pesquisa é o de Drake *et al* (2008) onde se afirma que ao submeter *S.aureus* a tratamento com esfinganina (um esfingolípido) foram observadas múltiplas lesões na parede celular, evaginações na membrana plasmática e perda de ribossomos no citoplasma.

O presente trabalho demonstra que DM 1 possui atividade contra *S.aureus* e *E.coli* e que os candidatos a massa de 945 [M+H] podem ser uma ceramida ou fosfoesfingolípido, que, como demonstrado por Becam *et al* (2017), Drake *et al* (2008) e possuem atividade contra os mesmos microorganismos testados no presente trabalho.

Quando realizado o mesmo processo de espectrometria de massa para DM 12 (Figura 8 e 9), observa-se que as massas correspondentes à fração DM 12 (3.130,78 / 3.077,44, 3.093,84 / 3.115,68 / 3.056,69) são próximas às encontradas por Frihling *et al* (2018) (3134.3 Da). Em seu trabalho, o autor afirma que a massa encontrada se refere a um peptídeo e no resultado do experimento de padrão de absorção em UV (Figura 10) foi verificado que a absorção máxima foi de 200nm, que segue o mesmo padrão para lipídeos (203-214). Dessa forma, não foi possível sugerir a natureza da molécula DM 12.

Foi realizado o ensaio de SPV para investigar a possível natureza lipídica do composto DM 1 e DM 12. O padrão oleico utilizado nesse trabalho foi a vaselina, que é

uma parafina líquida oleaginosa, logo, apresenta lipídios em sua composição, sendo assim considerada como controle positivo (Figura 11).

O ensaio de SPV depende diretamente da formação dos cromóforos a partir das reações químicas geradas pela vanilina e o ácido sulfúrico, sendo o resultado aqui apresentado passível a duas interpretações.

A primeira é considerar que houve leitura de cromóforo, porém a formação destes cromóforos foi baixa devido a pouca formação de analitos derivados de DM 1 e DM 12 quando comparada ao padrão de vaselina, haja vista que o controle negativo (ácido sulfúrico com vanilina) não apresenta nenhuma leitura. Caso essa seja a interpretação, poderíamos supor que DM 1 seja uma ceramida ou um fosfolípido, de acordo com os candidatos obtidos no *Lipidmaps*.

Frings *et al* (1970) e Anschau *et al* (2017) , determina uma metodologia a base de vanilina para determinar a presença de lipídios demonstrando que o composto pode ser usado como um indicador de compostos lipídicos.

Um trabalho que corrobora a hipótese é o de Ryuzaki *et al* (1975), que faz a detecção de seus glicolipídios a partir de manchas vermelhas formadas em uma placa sílica gel impregnada com borato. Foi pulverizado ácido sulfúrico na placa e então a placa foi aquecida, revelando as manchas vermelhas formadas. A coloração rosa-avermelhada depende diretamente da formação dos cromóforos.

A outra interpretação para o resultado de SPV é a de que baixa leitura significa um resultado negativo, Knight (1972) postula que os ácidos graxos não podem ser detectados por esse método porque não são capazes de formar o cromóforo, sendo assim haveria a possibilidades de DM 1 e de DM 12 serem ácidos graxos. Porém a

massa molécula de 945,075 obtida é muita alta para ser um ácido graxo livre, pois os ácidos graxos são derivados de hidrocarbonetos e de forma geral fazem parte da formação da maioria dos lipídios, sendo esperado que essas moléculas tenham baixo peso molecular.

Sendo assim, parece mais plausível que a primeira hipótese seja aceita, sugerindo assim que DM 1 seja um composto lipídico e de acordo com os candidatos do *lipidmaps* seja um fosfolipídio ou uma ceramida.

Foram realizados os MIC's de DM 1 e de DM 12 contra *S.aureus* e *E.coli* e como resultado obtivemos o MIC de 12,5mM de DM 1 para *S.aureus* e para *E.coli* (nessa mesma concentração houve apenas 25% de inibição para *C.albicans*) (Figura 12) e para DM 12 a concentração de 1,1mM foi capaz de inibir apenas 50% de *S.aureus* e *E.coli* (Figura 13). A cromatografia da fração resulta em uma quantidade de material insuficiente para realização de todos os ensaios, por esse motivo não foi possível testar o MIC de DM 12 para *C.albicans*. (Tabela 2).

Esse dado corrobora a atividade antimicrobiana encontrada para DM 1 e DM 12 no *screening* inicial, divergindo mais uma vez de Temponeet *et al* (2006) que avalia a secreção bruta obtendo 15,36% de inibição para *Candida krusei* e de Cavalcante *et al* (2017) e Fernandes (2014) que não obtiveram inibição.

Na literatura há muitas informações sobre a atividade dos lipídeos de forma geral, por exemplo, Brogdenet *et al* (2012), em seu trabalho, expõe que uma série de lipídios tem apresentado atividade biológica significativa, como esfingosina, dihidrossfingosina, fitosfingosina, ácido sapiênico e ácido láurico, que geralmente possui atividade contra Actinobactérias, Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacterias e fungos com MIC's variando de 3.3 a 2.496 μ M.

Outro trabalho que pode ser citado é o de Batista (2015) que demonstra que um glicerofosfolípideo encontrado em extratos de esponjas marinhas brasileiras, e seus análogos, apresentaram atividade contra *Shewanella putrefaciens*, *Vibrio estuarians*, *Pseudoalteromonas elyakovii*, *Polibacter irgensis* e *Pseudomonas fluorence* quando testado nas concentrações de 0.05; 0.5; 5; 10; 50 e 100 mg.L⁻¹. Porém, ainda não há dados de MIC com lipídios isolados da pele de anuros para serem comparados com os MIC da possível molécula lipídica DM 1 e com o MIC de DM 12.

Com o objetivo de verificar se a atividade da molécula de DM 1 ocorre a partir da interação com as membranas lipídicas, foi feito um ensaio de interação com micelas formadas por Fosfatidilcolina e Fosfatidilcolina com Colesterol (Figura 14), demonstrando que quando testado com o colesterol, o composto se mostrou menos ativo, isso provavelmente ocorre pelo fato de o acréscimo do colesterol estabilizar a membrana, dificultando a interação do composto, conseqüentemente diminuindo sua atividade.

Em seu trabalho Yoon *et al* (2018), postula que os lipídios antimicrobianos têm como alvo principalmente as membranas celulares bacterianas. Devido ao seu caráter anfifílico, tais lipídios interagem com a membrana das células causando uma desestabilização, o que leva a formação de poros, resultando na lise celular. O ensaio de interação com micelas sugere que DM 1 interage com a membrana lipídica formada a partir de Fosfatidilcolina e Fosfatidilcolina com Colesterol, e essa interação leva a desestabilização da membrana e conseqüentemente a lise da micela formada, o que sugere que atividade de DM 1 ocorre de acordo com o postulado por Yoon *et al* (2018).

Para analisar a interação de DM 1 com antibióticos comerciais e analisar se há ou não sinergismo na atividade entre os dois, foi selecionado o antibiótico de amplo espectro Ofloxacina. Para possibilitar o ensaio, foi calculado o MIC de ofloxacina para *S.aureus* e *E.coli*, resultando em um 3,3 mM para ambos (Figura 15). A partir do MIC gerado para DM 1 e do MIC gerado para Ofloxacina, foi realizado o ensaio de sinergismo para *S.aureus* (Figura 16 e 17) e *E.coli* (Figura 18 e 19). Quando os cálculos foram realizados, as únicas concentrações que apresentaram antagonismo foram 2,06 / 6,10 - 6250 (Ofloxacina / DM 1 - DM 1 μ M) e 4,12 / 12,21 - 12500 (Ofloxacina / DM 1 - DM 1 μ M), todas as outras apresentaram sinergismo (Tabelas 3, 4, 5 e 6).

Todas as concentrações testadas apresentaram atividade acima de 70% de inibição, com destaque para a concentração de 0,12 / 0,38 (Ofloxacina / DM 1 μ M) que foi a menor concentração testada e manteve a inibição próxima a 100%. O ensaio de sinergismo demonstra que DM 1 na concentração de apenas 0,38 μ M foi capaz de reduzir a concentração necessária para obter o MIC de Ofloxacina, tanto para *S.aureus* quanto para *E.coli*, demonstrando a capacidade de, mesmo em uma baixa concentração, otimizar a atividade do antibiótico, se tornando um composto promissor contra a resistência microbiana.

Os ensaios sinérgicos geralmente são realizados com peptídeos antimicrobianos, como foi o caso de Cirioni *et al* (2013) que demonstra que o peptídeo antimicrobiano IB-367 ao ser administrado com daptomicina e teicoplanina em ratos BALB/c tiveram sua atividade aumentada de -2 log para -4 log de inibição para a linhagem *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), por meio do aumento da citotoxicidade das células NK.

Pode-se citar também Yenugu & Narmadha (2010) que demonstrou que os peptídeos antimicrobianos sintéticos HE2 α e HE2 β 2, apresentaram atividade sinérgica quando administrados com os antibióticos comerciais Ampicilina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Doxiciclina, Rifampicina, Cloranfenicol, Canamicina, Estreptomicina, Carbenicilina e Tetraciclina. O trabalho demonstra que a combinação desses peptídeos com um antibiótico atua de forma a colaborar com o efeito do antibiótico, inibindo o crescimento bacteriano.

Outro trabalho que demonstra o sinergismo de peptídeos antimicrobianos é o desenvolvido por Pletzer *et al* (2018), que analisa atividade sinérgica dos peptídeos 1002, HHC-10, 1018 e DJK-5 contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* *in vivo* em camundongos. O peptídeo DJK-5 apresentou ação sinérgica com ciprofloxacina, gentamicina, meropenem, eritromicina e vancomicina contra *P. aeruginosa*, *E. faecium*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *S. aureus* sendo capaz de reduzir a carga bacteriana. Já o peptídeo 1018 demonstrou sinergismo com ciprofloxacina contra *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* e *E. coli*. Enquanto o peptídeo HHC-10 agiu sinérgicamente com ciprofloxacina afetando *E. cloacae*. Outro peptídeo testado foi o 1002, que em atividade conjunta a gentamicina demonstrou atividade contra *E. faecium*. Como os ensaios foram realizados *in vivo*, a dose variava de acordo com o peso do camundongo.

He *et al* (2019), associa nanopartículas de lipídios sólidos com o Carvacol, atuando como carreadores. O Carvacol apresentou um MIC de 0.250 mg/mL para *E. coli* e de 0.125 mg/mL para *S. aureus*. As nanopartículas de lipídios sólidos foram analisadas e apresentaram o menor MIC de 250 mg/mL, tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus*. Ao associar nanopartículas de lipídios sólidos ao Carvacol, o menor MIC

encontrado foi de 0.125 mg/mL para *E. Coli* de 0.100 mg/mL para *S.aureus*, apresentando sinergismo entre as formulações e diminuindo o MIC contra os microrganismos.

Outro trabalho que demonstra sinergismo de nanopartículas de lipídios sólidos é o trabalho realizado por Wang *et al* (2013) onde ele associa a Curcumina a essas nanopartículas. A Curcumina, apesar de seu potencial anticâncer, tem sua aplicação médica dificultada por ter um rápido metabolismo *in vivo*. Ao associar a Curcumina e as nanopartículas de lipídios sólidos, o IC50 para as células de câncer de pulmão (A549) foi de 4 μ M, sendo capaz de aumentar o direcionamento da curcumina diretamente para as células alvo, aumentando a eficiência de inibição da curcumina de 19,5% para 69,3%. Esse trabalhos demonstram que componentes lipídicos são capazes de exercer efeitos sinérgicos com medicamentos já descritos, indicando mais uma atividade de DM 1, de acordo com o resultado de sinergismo neste trabalho apresentado.

Em relação a lipídios anticâncer, Murray *et al* (2015) destaca que as ceramidas atuam em diversas áreas do ciclo do crescimento celular, como: sinalização, regulação de proliferação, diferenciação e morte celular. As ceramidas de cadeia longa são pró-apoptóticas e têm se mostrado um agente importante contra a proliferação celular tumoral. Além disso ALP's ou PUFA's se mostram grandes candidatos ao desenvolvimento de novas terapias ou drogas.

O ensaio de MTT foi realizado para DM 1, demonstrando que aproximadamente 70% da viabilidade celular de MCF-7 foi comprometida e apenas 35% da viabilidade de fibroblastos foi afetada na concentração de 1000 μ M, sendo que a 100 μ M ainda se manteve uma atividade de 20% de inibição de MCF-7, enquanto os fibroblastos não

apresentaram alterações na viabilidade nessa concentração. Já nas concentrações de 10 μ M nenhuma das linhagens se mostram sensíveis ao tratamento (Figura 20). Outro ensaio de mesma natureza foi realizado em forma de diluição seriada (Figura 20A), e foi gerada uma curva em log das concentrações. Apesar de DM 1 possuir atividade contra MCF-7 e uma baixa atividade contra fibroblastos (Figura 21B e C) nas concentrações testadas, são necessários mais estudos para que se possa afirmar a eficácia e segurança de DM 1 como um candidato para o tratamento anticâncer.

7 - Conclusões

De acordo com os resultados obtidos por esse trabalho podemos concluir que:

- As frações obtidas através da secreção cutânea do anuro *Dermatonotus muelleri* apresenta atividade antimicrobiana contra *S.aureus* e *E.coli*;
- DM 1 e 12 apresentam aproximadamente 50% de inibição contra *C.albicans* no *screening* inicial.
- A fração com a maior atividade antimicrobiana é a fração nomeada de DM 1 apresentando 100% de inibição para *S.aureus* e *E.coli* no *screening* inicial.
- A fração DM 1 de peso molecular de 945,075 apresenta MIC de 12,5 μM para *S.aureus* e *E.coli*;
- Devido a eficiência do metanol na extração de lipídios, o uso da técnica de HPLC com a ausência de interação da fração DM 1 com a coluna, o resultado obtido pela espectrometria de massa de 945,075 com a ausência de fragmentos de aminoácidos e a máxima absorção obtida na faixa de 214, o resultado considerado positivo de SPV, o confronto dos resultados com os padrões obtidos na literatura para esses mesmos ensaios para peptídeos e proteínas, sugerimos que DM 1 é um composto lipídico, e, de acordo com o *lipdmaps*, os possíveis candidatos são fosfolipídios ou ceramidas.
- DM 1 tem atividade inibitória contra MCF-7 e apresenta menor atividade com Fibroblastos NIH3T3 a uma concentração de 1000 μM , indicando que a substância possui maior atividade contra células tumorais do que contra células normais;

- É provável que a atividade de DM 1 se dê pela perturbação da membrana celular dos microrganismos, de acordo com o ensaio de interação de micelas.
- DM 1 apresenta sinergismo com o antibiótico comercial Ofloxacina;
- DM 1, a uma concentração mínima de 0,38 μM , diminuiu a concentração necessária de Ofloxacina de 3,3 μM para 0,12 μM de para ter atividade contra *S.aureus* e *E.coli*.

8 - Perspectivas futuras

Os resultados aqui apresentados apontam para uma nova abordagem sobre os lipídios presentes na pele dos anuros, porém, apesar de promissor, é necessário o aprofundamento sobre as atividades dos compostos presentes no anuro *Dermatonotus muelleri*, sendo sugerido:

- A realização de ensaio hemolítico para avaliar a atividade dos compostos;
- A realização de testes com outros microrganismos e outras linhagens tumorais;
- Realizar ensaio de citometria de fluxo para verificar o tipo de morte celular causada por de DM 1 (necrose ou apoptose);
- Verificar a presença de sinergismo com outros antibióticos comerciais;
- Realizar a ressonância magnética nuclear (RMN) para definir a estrutura da molécula.

9 – Referências

ANDRIKOPOULOS, K, ET AL. Platelet activating factor (PAF) is a common mediator. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 363, 1986.

ANSCHAU, A. et al. Validation of the sulfo-phospho-vanillin (SPV) method for the determination of lipid content in oleaginous microorganisms. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 34, n. 1, p. 19-27, 2017.

BATISTA, W. R. et al. Evaluating antimicrobial activity of bioactive glycerophospholipids presents in Brazilian marine sponges extracts. n. July 2015, p. 144–150, 2015.

BECAM, J. et al. Antibacterial activity of ceramide and ceramide analogs against pathogenic *Neisseria*. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

BERGSSON, G. et al. In vitro inactivation of *Chlamydia trachomatis* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n. 9, p. 2290–2294, 1998.

BIBEL, D. J.; ALY, R.; SHINEFELD, H. R. Bibel 1992.PdfThe Journal of Investigate Dermatology, 1992.

BONAPACE, Charles R. et al. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 44, n. 4, p. 363-366, 2002.

BONAPACE, Charles R. et al. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 38, n. 1, p. 43-50, 2000.

BORKOVCOVÁ, J. et al. Determination of sterols in dairy products and vegetable fats by HPLC and GC methods. *Czech Journal of Food Sciences*, v. 27, n. SPEC. ISS., p. 217–219, 2009.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 3, p. 238–250, 2005.

BROGDEN, N. K. et al. The emerging role of peptides and lipids as antimicrobial epidermal barriers and modulators of local inflammation. *Skin Pharmacology and Physiology*, v. 25, n. 4, p. 167–181, 2012.

CAVALCANTE, I. D. et al. Venomics analyses of the skin secretion of

Dermatonotus muelleri: Preliminary proteomic and metabolomic profiling. *Toxicon*, v. 130, p. 127–135, 2017.

CIRIONI, O. et al. IB-367 pre-treatment improves the in vivo efficacy of teicoplanin and daptomycin in an animal model of wounds infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 62, n. PART10, p. 1552–1558, 2013.

COLOMER, R. MENÉDEZ, A. Mediterranean diet, olive oil and cancer. *Medical oncology*, v. 8, n. 1, 2006.

CLARKE, B. T. the Natural History of Amphibian Skin Secretions, Their Normal Functioning and Potential Medical Applications. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, v. 72, n. 3, p. 365–379, 1997.

COLLINS, P. W.; DJURIC, S. W. Synthesis of Therapeutically Useful Prostaglandin and Prostacyclin Analogs. *Chemical Reviews*, v. 93, n. 4, p. 1533–1564, 1993.

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.

CUI, P. H. et al. Antiproliferative and antimigratory actions of synthetic long chain n-3 monounsaturated fatty acids in breast cancer cells that overexpress cyclooxygenase-2. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 55, n. 16, p. 7163–7172, 2012.

DALY, J. W. et al. Biologically active substances from amphibians: Preliminary studies on anurans from twenty-one genera of Thailand. *Toxicon*, v. 44, n. 8, p. 805–815, 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, p. 1023–1095, 1987.

DEMORI, I. et al. Peptides for Skin Protection and Healing in Amphibians. *Molecules*, 2019.

DESBOIS, A. P.; SMITH, V. J. Antibacterial Free Fatty Acids: Activities, Mechanisms of Action and. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, v. 44, n. 1334, p. 1629–1642, 2010.

DRAKE, D. R. et al. Thematic Review Series: Skin Lipids - Antimicrobial lipids at the skin surface. *Journal of Lipid Research*, v. 49, n. 1, p. 4–11, 2008.

ELROD, HEATH A. ET, A. The alkylphospholipid perifosine induces apoptosis of human lung cancer cells requiring inhibition of Akt and activation of the extrinsic apoptotic pathway. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 6, n. 7, p. 2029–2038, 2007.

EMENAKER, N. J. et al. Research Conference on Diet, Nutrition and Cancer Short-Chain Fatty Acids Inhibit Invasive Human Colon Cancer by Protein Expression in an In Vitro Cell Culture Model 1, 2. *Journal of nutrition*, v. 131, n. March, p. 3041S–3046S, 2001.

ERSPAMER, V. Comparative histochemistry as a springboard for the discovery of biogenic amines and active peptides in molluscan tissues and amphibian skin. *Basic and Applied Histochemistry*, v. 25, n. 1, p. 3-14, 1981.

ERSPAMER, V. Isolation of leptodactyline (m-hydroxyphenylethyltrimethylammonium) from extracts of *Leptodactylus* skin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 82, n. 2, p. 431–438, 1959.

ERSPAMER, V. Half a century of comparative research on biogenic amines and active peptides in amphibian skin and molluscan tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative*, v. 79, n. 1, p. 1–7, 1984.

FAUSER, J. K. et al. Fatty acids as potential adjunctive colorectal chemotherapeutic agents. *Cancer Biology and Therapy*, v. 11, n. 8, p. 724–731, 2011.

FERNANDES, D. G. Isolamento de peptídeos antimicrobianos de Anuros da fauna brasileira. *Biblioteca Digital USP*, p. 63, 2014.

FRINGS, C. S.; DUNN, R. T. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. *American journal of clinical pathology*, v. 53, n. 1, p. 89–91, 1970.

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 22/03/2020.

FRIHLING, B. Análise do perfil proteico da secreção cutânea de *dermatonotus muelleri* utilizando os métodos de eletroforese (sds-page) e espectrometria de massa (maldi-tof). *Estudo da Herpetofauna Brasileira*. Editora Atena. Ponta Grossa (PR) 2018.

GAJATE, C; MOLLINEDO, F. Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid raft. p. 12–12, 2007.

GAJATE, C. et al. Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, v. 200, n. 3, p. 353–365, 2004.

GAJATE, C. et al. Antitumor alkyl-lysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. *Oncogene*, v. 31, n. 21, p. 2627–2639, 2012.

GAJATE, C.; GONZALEZ-CAMACHO, F.; MOLLINEDO, F. Involvement of raft aggregates enriched in Fas/CD95 death-inducing signaling complex in the antileukemic action of edelfosine in Jurkat cells. *PLoS ONE*, v. 4, n. 4, p. 13–18, 2009.

GEURTS VAN KESSEL, W. S. M. et al. High performance liquid chromatographic separation and direct ultraviolet detection of phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, v. 486, n. 3, p. 524–530, 1977.

GROSSMANN, MICHAEL E. ET, A. Accumulation of aberrant CpG hypermethylation by *Helicobacter pylori* infection promotes development. *International*

Journal of Oncology, v. 35, p. 547–557, 2009

H. BUNGER. Quantitative_analysis_of_hydrophobic_pul.pdf. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, p. 25–31, 1995.

HANCOCK, R. E. W.; CHAPPLE, D. S. Peptide antibiotics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 43, n. 6, p. 1317–1323, 1999.

HE, J. et al. Carvacrol loaded solid lipid nanoparticles of propylene glycol monopalmitate and glyceryl monostearate: Preparation, characterization, and synergistic antimicrobial activity. Nanomaterials, v. 9, n. 8, p. 1–14, 2019.

INCEOGLU, B. et al. Soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosatrienoic acids modulate two distinct analgesic pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 105, n. 48, p. 18901–18906, 2008.

IZADPANAH, A.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. Journal of the American Academy of Dermatology, v. 52, n. 3 Pt 1, p. 381–390, 2005.

KIRSCHENBAUM, D. M. Molar absorptivity and $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ values for proteins at selected wavelengths of the ultraviolet and visible regions-XXI. Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer, v. 27, n. 1, p. 39–53, 1981.

KNAPP, H. R.; MELLY, M. A. Bactericidal effects of polyunsaturated fatty acids. Journal of Infectious Diseases, v. 154, n. 1, p. 84–94, 1986.

KNIGHT, J. A.; ANDERSON, S.; RAWLE, J. M. Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids. Clinical chemistry, v. 18, n. 3, p. 199–202, 1972.

KUMAR, A. et al. The alkylphospholipid perfosine induces apoptosis and p21-mediated cell cycle arrest in medulloblastoma. Molecular Cancer Research, v. 7, n. 11, p. 1813–1821, 2009.

LADRAM, A.; NICOLAS, P. Antimicrobial peptides from frog skin : biodiversity and therapeutic promises 3 . 1 . Intraspecies diversity of frog skin AMPs : each species of frog has a customized arsenal of peptide weapons 3 . BIODIVERSITY OF ANTIMICROBIAL. p. 1341–1371, 2016.

LAW, S. et al. Regional variation in content, composition and organization of porcine epithelial barrier lipids revealed by thin-layer chromatography and transmission electron microscopy. Archives of Oral Biology, v. 40, n. 12, p. 1085–1091, 1995.

LEE, Y. S. et al. Simultaneous HPLC analysis of ceramide and dihydroceramide in human hairs. Archives of Pharmacal Research, v. 32, n. 12, p. 1795–1801, 2009.

LEHNINGER, D. principles of biochemistry. 6th ed. New york. editora artmed. 2014.

LESNEFSKY, E. J. et al. Separation and quantitation of phospholipids and lysophospholipids by high-performance liquid chromatography. Analytical Biochemistry, v. 285, n. 2, p. 246–254, 2000.

LIN, T. et al. 13-Methyltetradecanoic acid induces mitochondrial-mediated apoptosis in human bladder cancer cells. Urologic Oncology: Seminars and Original

Investigations, v. 30, n. 3, p. 339–345, 2012.

MARTOSELLA, J. et al. High recovery HPLC separation of lipid rafts for membrane proteome analysis. *Journal of Proteome Research*, v. 5, n. 6, p. 1301–1312, 2006.

MERRILL, A. H.; JONES, D. D. An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, v. 1044, n. 1, p. 1–12, 1990.

MILLER, A. et al. Vaccenic acid (t11-18:1) is converted to c9,t11-CLA in MCF-7 and SW480 cancer cells. *Lipids*, v. 38, n. 6, p. 623–632, 2003.

MOLLINEDO, F. et al. Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET- 18-OCH₃ (edelfosine): Molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by bcl-2 and bcl-x(L). *Cancer Research*, v. 57, n. 7, p. 1320–1328, 1997.

MOUNTS, T. L.; ABIDL, S. L.; RENNICK, K. A. HPLC analysis of phospholipids by evaporative laser light-scattering detection. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 69, n. 5, p. 438–442, 1992.

MURRAY, M. et al. Anti-tumor activities of lipids and lipid analogues and their development as potential anticancer drugs. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 150, p. 109–128, 2015 *Pharmacology and Therapeutics*, v. 150, p. 109–128, 2015.

NASCIMENTO, A. C.; FONTES, W.; SEBEN, A.; CASTRO, M. S. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein. Pept. Lett.* v. 10, n. 3, p. 227-38. 2003.

NEUWIRTH, M. et al. Morphology of the granular secretory glands in skin of poison-dart frogs (*Dendrobatidae*). *Tissue and Cell*, v. 11, n. 4, p. 755–771, 1979.

NOMURA, F. *Ecologia reprodutiva e comportamento de forrageio e escavação de Dermatotonotus muelleri (Boettger, 1885) (Anura, Microhylidae)* Fausto. *Ecologia*, 1885.

NOMURA, Fausto. *Ecologia reprodutiva e comportamento de forrageio e escavação de Dermatotonotus muelleri (Boettger, 1885)(Anura, Microhylidae)*. *Biota Neotropica*, v. 5, n. 1, p. 209-210, 2005.

NOMURA, F.; ROSSA-FERES, D. C. The frog *Dermatotonotus muelleri* (Boettger 1885) (*Anura Microhylidae*) shifts its search tactics in response to two different prey distributions. *Ethology Ecology and Evolution*, v. 23, n. 4, p. 318–328, 2011.

ODDS, Frank C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, n. 1, p. 1-1, 2003.

PABLO, M. A. et al. Palmitate induces apoptosis via a direct effect on mitochondria. *Apoptosis*, v. 4, n. 2, p. 81–87, 1999.

PERONA, J. S.; RUIZ-GUTIERREZ, V. Simultaneous determination of molecular species of monoacylglycerols, diacylglycerols and triacylglycerols in human very-low-density lipoproteins by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 785, n. 1, p. 89–99, 2003.

PETERSON, B. L.; CUMMINGS, B. S. A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples. *Biomedical Chromatography*, v. 20, n. 3, p. 227–243, 2006.

PLETZER, D.; MANSOUR, S. C.; HANCOCK, R. E. W. Synergy between conventional antibiotics and anti-biofilm peptides in a murine, sub-cutaneous abscess model caused by recalcitrant ESKAPE pathogens. *PLoS Pathogens*, v. 14, n. 6, p. 1–14, 2018.

PORTER, E. Antimicrobial lipids: Emerging effector molecules of innate host defense. *World Journal of Immunology*, v. 5, n. 2, p. 51, 2015.

PROJAN, S. J. et al. Glycerol monolaurate inhibits the production of β -lactamase, toxic shock syndrome toxin-1, and other staphylococcal exoproteins by interfering with signal transduction. *Journal of Bacteriology*, v. 176, n. 14, p. 4204–4209, 1994.

RAYCHOWDHURY, M. K.; GOSWAMI, R.; CHAKRABARTI, P. Effect of unsaturated fatty acids in growth inhibition of some penicillin-resistant and sensitive bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 59, n. 2, p. 183–188, 1985.

RYUZAKI, Masashi; KOJIMA, Hisako; TAMAI, Yoichi. Study on amphibian lipids—II. Characteristic constituents of monoglycosylceramides from the skin of three frog species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, v. 52, n. 2, p. 81–84, 1975.

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.

ROSEGHINI, M. et al. Indole-, imidazole- and phenyl-alkylamines in the skin of one hundred and forty american amphibian species other than bufonids. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative*, v. 85, n. 1, p. 139–147, 1986.

ROSEGHINI, M.; ERSPAMER, V.; ENDEAN, R. Indole-, imidazole- and phenyl-alkylamines in the skin of one hundred amphibian species from Australia and Papua New Guinea. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative*, v. 54, n. 1, p. 31–43, 1976.

RUITER, G. A. et al. Alkyl-lysophospholipids activate the SAPK/JNK pathway and enhance radiation-induced apoptosis. *Cancer Research*, v. 59, n. 10, p. 2457–2463, 1999.

RUZIN, A.; NOVICK, R. P. Equivalence of lauric acid and glycerol monolaurate as inhibitors of signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, v. 182, n. 9, p. 2668–2671, 2000.

SAMADDER, P.; ARTHUR, G. Decreased sensitivity to 1-O-octadecyl-2-O-methyl-glycerophosphocholine in MCF-7 cells adapted for serum-free growth correlates with constitutive association of Raf-1 with cellular membranes. *Cancer Research*, v. 59, n. 19, p. 4808–4815, 1999.

SCHLIEVERT, P. M.; PETERSON, M. L. Glycerol monolaurate antibacterial activity in broth and biofilm cultures. *PLoS ONE*, v. 7, n. 7, 2012.

SEBBEN, Antonio; SCHWARTZ, Carlos Alberto; CRUZ, Jader dos Santos. A defesa química dos anfíbios. *Ciência Hoje*, v. 15, n. 87, p. 25-33, 1993.

SHINOHARA, N. et al. Jacaric acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, has a strong antitumor effect in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1821, n. 7, p. 980–988, 2012.

SINGH, A. K.; JIANG, Y. Quantitative chromatographic analysis of inositol phospholipids and related compounds. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 671, n. 1–2, p. 255–280, 1995.

HEERDT, G. B, ET. AL. Sodium-N-butyrate induces cytoskeletal rearrangements and formation of cornified envelopes in cultured adult human keratinocytes. *Cell Growth e Differentiation*, v. 22, n. 5, p. 361–375, 1997.

TAMAI, YOICHI, ET. AL. CHARACTERIZATION OF MONOGLYCOSYLCERAMIDES FROM THE SKIN OF RANA NIGROMACULATA (JAPANESE POND FROG). p. 294–302, 1975.

THORMAR, H.; HILMARSSON, H. The role of microbicidal lipids in host defense against pathogens and their potential as therapeutic agents. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 150, n. 1, p. 1–11, 2007.

TEMPONE, G A. et al. Amphibian Secretions for Drug Discovery Studies: A Search for New Antiparasitic and Antifungal Compounds. *Letters in Drug Design & Discovery*, v. 4, n. 1, p. 67–73, 2006.

THORMAR, H.; HILMARSSON, H. Killing of *Campylobacter* on contaminated plastic and wooden cutting boards by glycerol monocaprate (monocaprin). *Letters in Applied Microbiology*, v. 51, n. 3, p. 319–324, 2010.

THORMAR, H.; HILMARSSON, H.; BERGSSON, G. Antimicrobial lipids : Role in innate immunity and potential use in prevention and treatment of infections . *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, n. October 2014, p. 1474–1488, 2013.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, v. 111, n. 1, p. 1–29, 1995.

TSUZUKI, T.; KAWAKAMI, Y. Tumor angiogenesis suppression by α -eleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Carcinogenesis*, v. 29, n. 4, p. 797–806, 2008.

VAN DER LUIT, A. H. et al. A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 6, n. 8, p. 2337–2345, 2007.

VORAUER-UHL, K. et al. Simultaneous quantification of complex phospholipid compositions containing monophosphoryl lipid-A by RP-HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v. 32, n. 15, p. 2203–2215, 2009.

WANG, D.; DUBOIS, R. N. Eicosanoids and cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 10, n. 3, p. 181–193, 2010.

WANG, P. et al. The formulation and delivery of curcumin with solid lipid nanoparticles for the treatment of on non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo. *Materials Science and Engineering C*, v. 33, n. 8, p. 4802–4808, 2013.

WERTZ, P. W.; DOWNING, D. T. Ceramidase activity in porcine epidermis. *FEBS Letters*, v. 268, n. 1, p. 110–112, 1990.

WÖLL, S. et al. Pentaglycine lipid derivatives – rp-HPLC analytics for bioorthogonal anchor molecules in targeted, multiple-composite liposomal drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 547, n. 1–2, p. 602–610, 2018.

Winokur R. M., e S. D. Hylliard. 1992. Pelvic cutaneous musculature in toad of the genus *Bufo*. *Copeia*, 1992:760-769. GROSSMANN, MICHAEL E. ET, A. Accumulation of aberrant CpG hypermethylation by *Helicobacter pylori* infection promotes development. *International Journal of Oncology*, v. 35, p. 547–557, 2009.

YANG, Z. et al. Induction of apoptotic cell death and in vivo growth inhibition of human cancer cells by a saturated branched-chain fatty acid, 13-methyltetradecanoic acid. *Cancer Research*, v. 60, n. 3, p. 505–509, 2000.

YENUGU, S.; NARMADHA, G. The human male reproductive tract antimicrobial peptides of the HE2 family exhibit potent synergy with standard antibiotics. *Journal of Peptide Science*, v. 16, n. 7, p. 337–341, 2010.

YOON, B. K. et al. Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: Biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 4, 2018.

ZHAI, D.; REILLY, P. J. Effect of FA chain length on normal- and reversed-phase HPLC of phospholipids. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 79, n. 12, p. 1187–1190, 2002.

ZHANG, L. et al. The formulation and delivery of curcumin with solid lipid nanoparticles for the treatment of on non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo. *Materials Science and Engineering C*, v. 33, n. 8, p. 4802–4808, 2013.