



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



**Análise das propriedades biológicas da triptofilina PHA-T2-4
isolada da secreção cutânea de *Pithecopus azureus* (Anura:
Phyllomedusidae)**

**Aluna: Ana Luíza dos Santos Sena
Orientador: Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior**

Brasília, 2021



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



Análise das propriedades biológicas de triptofilinas isoladas da secreção cutânea de *Pithecopus azureus* (Anura: Phyllomedusidae)

Aluna: Ana Luíza dos Santos Sena
Orientador: Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

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

Brasília, 2021



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



Ana Luíza dos Santos Sena

**Análise das propriedades biológicas de triptofilinas isoladas
da secreção cutânea de *Pithecopus azureus* (Anura:
Phyllomedusidae)**

Comissão Examinadora:

**Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior
Presidente
Departamento de Ciências Fisiológicas/IB
Universidade de Brasília**

**Profa. Dra. Simoni Dias Campos
Membro Titular
Universidade Católica de Brasília**

**Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau
Membro Titular
Departamento de Biologia Celular/IB
Universidade de Brasília**

Dedico esta dissertação a Deus e a todos aqueles que são importantes para mim, pela motivação diária, amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por toda a força, sustento, energia e coragem para que eu pudesse chegar até aqui. Por ter segurado as minhas mãos em todos os momentos difíceis que passei nos últimos anos, e por sempre estar presente em minha vida, me enchendo com seu amor e seu divino espírito santo. Obrigada Divino Pai Eterno!

A minha família, por absolutamente tudo.

Aos meus amigos, pela força e por me estimularem sempre a ser a melhor versão de mim.

À família Silva pelo apoio e carinho que tiveram comigo durante todo o período que morei com vocês, e por tudo que fazem por mim.

Ao meu Orientador, Professor Dr. Osmino Rodrigues P. Júnior pela paciência, incentivo, apoio e compreensão tanto na universidade quanto em questões pessoais.

A profa. Dra. Jane Lima dos Santos e sua discente Julyana Oliveira Castro da (UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais) pela parceria na realização dos testes de Viabilidade Celular (MTT) para RAW 264.7 e óxido nítrico.

A todos os meus colegas de laboratório, pela força e boa convivência.

Aos doutores Ana Carolina e Carlos, e aos doutorandos Gabriel, Isadora, Jessica Oliveira e Jessica Schneider por me ajudarem em todos os momentos que precisei.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília e ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio institucional e financeiro.

“Não há nada mais trágico neste mundo do que saber o que é certo e não o fazer.” –

Martin Luther King

RESUMO

O anuro *Pithecopus azureus* presente na América do Sul é bastante estudado quanto aos peptídeos encontrados em sua secreção cutânea, estes possuem diversas moléculas com atividades biológicas. Dentre essas moléculas estão as triptofilinas, que são peptídeos caracterizados por possuírem em sua maioria atividades miotrópicas, sendo necessário a investigação de outras atividades para este grupo de peptídeos. Neste trabalho o extrato clorofórmico da secreção bruta de *Pithecopus azureus* foi seco e ressuspensa em água, e aplicado em cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC, favorecendo o fracionamento de peptídeos hidrofóbicos. A triptofilina PHA-T2-4 isolada não apresentou atividade antimicrobiana, mas apresentou as atividades: (1) antioxidantes reduzindo em 80% $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ e possui valores de capacidade antioxidante equivalente a 8,8 μM para 15,6 μM de Trolox (TEAC); (2) inibitórias de serinoproteases e fosfolipase, na concentração de 500 μM , teve a capacidade inibitória de 37% sobre tripsina, 52% sobre quimotripsina, também inibindo a fosfolipase de *Bothrops moojeni* em 14%, e *Bothrops jararaca* em 54%, (3) inibiu 58% a produção de óxido nítrico, em 48 horas de incubação de células RAW 264.7 induzidas por LPS. De acordo com os resultados obtidos, sugere-se que a Triptofilina PHA-T2-4 faz parte do sistema de defesa de *P. azureus* em três aspectos: como inibidor de protease atuando como moduladores negativos de peptídeos secretados precocemente, como antioxidante da pele desses anuros evitando lesões não biológicas do tipo reativas ao oxigênio e em adaptações às mudanças climáticas dos habitats desses animais.

ABSTRACT

The anuran *Pithecopus azureus* present in South America is widely studied regarding the peptides found in its cutaneous secretion, they have several molecules with biological activities. Among these molecules are the tryptophyllines, which are peptides characterized by having mostly myotropic activities, requiring the investigation of other activities for this group of peptides. In this work, the chloroform extract of the crude secretion of *Pithecopus azureus* was dried and resuspended in water, and applied in high performance liquid chromatography – HPLC, favoring the fractionation of hydrophobic peptides. Tryptophyllin PHA-T2-4 isolated did not show antimicrobial activity, but presented the following activities: (1) antioxidants reducing by 80% $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ in $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ and has equivalent antioxidant capacity values at 8.8 μM to 15.6 μM Trolox (TEAC); (2) inhibitors of serine proteases and phospholipase, at a concentration of 500 μM , had an inhibitory capacity of 37% on trypsin, 52% on chymotrypsin, also inhibiting the phospholipase of *Bothrops moojeni* by 14%, and *Bothrops jararaca* by 54%, (3) inhibited the production of nitric oxide by 58% in 48 hours of incubation of LPS-induced RAW 264.7 cells. According to the results obtained, it is suggested that Tryptophyllin PHA-T2-4 is part of the defense system of *P. azureus* in three aspects: as a protease inhibitor acting as negative modulators of precociously secreted peptides, as an antioxidant in the skin of these frogs, avoiding non-biological oxygen-reactive lesions and adapting to climate change in these animals' habitats.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Pithecopus azureus	21
1.2 A pele dos anfíbios	22
1.3 Peptídeos na pele dos anfíbios	24
1.3.1 Peptídeos encontrados na secreção de Phyllomedusidae e ação	25
1.4 Peptídeos antioxidantes	26
1.5 Tryptofilinas	27
1.6 Tipos de TPHs, estrutura e estudos relacionados	28
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVO	37
3.1 Objetivo Geral	37
3.2 Objetivos Específicos	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Coleta e extração:	38
4.2 Fracionamento da secreção cutânea bruta de <i>P. azureus</i> por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC	38
4.3 Espectrometria de massa e sequenciamento <i>de novo</i>	39
4.4 Preparo da amostra:	39

4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana:	40
4.5.1 Atividade antibacteriana:	40
4.5.2 Atividade antifúngica	41
4.6 Análise da viabilidade Celular:	42
4.6.1 Células tumorais.....	42
4.6.1.1 Manutenção da cultura de células MCF-7	42
4.6.1.2 Tratamento das células com Triptofilina PHA-T2-4	44
4.6.1.3 Viabilidade Celular (MTT) para MCF-7.....	45
4.6.2 Células não tumorais.....	46
4.6.2.1 Manutenção da cultura de células RAW 264.7.....	46
4.6.2.1 Viabilidade Celular (MTT) para RAW 264.7	46
4.7 Atividade inibitória de enzimas	47
4.7.1 Tripsina	47
4.7.2 Quimotripsina	48
4.7.3 Fosfolipase	49
4.8 Ensaio antioxidantes	50
4.8.1 Avaliação da capacidade inibitória na produção de óxido nítrico em RAW 264.7	50
4.8.2 Ensaio de redução de Ferricianato de potássio em Ferrocianeto de potássio	50
4.8.3 TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity).....	51

4.9 Estatística.....	52
5. RESULTADOS.....	53
5.1 Fracionamento cromatográfico do extrato clorofórmico da secreção Bruta de <i>P. Azureus</i> e análise por espectrometria de massas.....	54
5.2 Recromatografia e análises por espectrometria de massas.....	56
5.3 Identificação da Triptofilina.....	60
5.4 Atividade antimicrobiana	61
5.5 Análise da viabilidade celular	63
5.5.1 Viabilidade Celular (MTT) para MCF-7.....	63
5.5.2 Viabilidade Celular (MTT) para RAW 264.7	64
5.6 Atividade inibitória de enzimas	65
5.6.1 Tripsina	65
5.6.2 Quimotripsina	66
5.6.3 Fosfolipase	67
5.7 Ensaio antioxidantes	69
5.7.1 Avaliação da capacidade inibitória na produção de óxido nítrico em RAW 264.7	69
5.7.2 Ensaio de redução de Ferricianato de potássio em Ferrocianeto de potássio.....	71
5.7.3 TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity).....	72
6. DISCUSSÃO	74

7. CONCLUSÕES	84
8. PERSPECTIVAS.....	85
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Exemplar de <i>Pithecopus azureus</i>	21
Figura 2. Representação do tecido epidermal e dérmico em Anuro do gênero <i>Phyllomedusa</i>	23
Tabela 2. Grupos e características das triptofilinas em anuros.....	29
Figura 3. Espectrometria de massa em sistema de MALDI-TOF, a partir do extrato clorofórmico bruto de <i>P. azureus</i>	53
Figura 4. Perfil cromatográfico em RP-HPLC do extrato clorofórmico bruto de <i>Pithecopus azureus</i>	54
Figura 6. Recromatografia da fração Fr2 de <i>Pithecopus azureus</i> em uma coluna Kinetex	56
Figura 7. Espectrometria de massa em sistema de MALDI-TOF, da fração 2.1	57
Figura 8. Recromatografia da fração Fr3 de <i>Pithecopus azureus</i>	58
Figura 9. Espectrometria de massa em sistema de MALDI-TOF, das frações: Fr3.1 (A) Fr3.2 (B); e Fr3.3 (C).....	58
Figura 10. Recromatografia da fração Fr4 de <i>Pithecopus azureus</i>	59
Figura 11. Espectrometria de massa em sistema de MALDI-TOF, das frações: Fr4.1; Fr4.2 e Fr4.3	60
Figura 12. Espectro MS/MS das triptofilinas a partir do sequenciamento de novo por fragmentação do tipo LIFT.	61

Figura 13. Avaliação do crescimento de <i>C. albicans</i> após o tratamento com Triptofilina PHA-T2-4	62
Figura 14. Avaliação do crescimento de <i>E. coli</i> após o tratamento com a Triptofilina PHA-T2-4.....	62
Figura 15. Avaliação do crescimento de <i>S. aureus</i> após o tratamento com a Triptofilina PHA-T2-4	63
Figura 16. Efeito da Triptofilina PHA-T2-4 (500µM) de <i>P. azureus</i> na viabilidade de células MCF-7.....	64
Figura 17. Efeito da Triptofilina PHA-T2-4 (500µM) de <i>P. azureus</i> na viabilidade de células RAW 264.7.....	65
Figura 18. Atividade inibitória de tripsina da PHA-T2-4 (500 µM) da secreção cutanea de <i>P. azureus</i> sobre BApNA.	66
Figura 19. Atividade inibitória de tripsina da PHA-T2-4 (500 µM) da secreção cutanea de <i>P. azureus</i> sobre GpNA.	67
Figura 20. Atividade inibitória de fosfolipase a partir da incubação da PHA-T2-4 com a peçonha de <i>B. moojeni</i>	68
Figura 21. Atividade inibitória de fosfolipase a partir da incubação da PHA-T2-4 com a peçonha de <i>B. jararaca</i>	69
Figura 22. Atividade inibitória de fosfolipase a partir da incubação da PHA-T2-4 com a peçonha de <i>Crotalus d. collineatus</i>	69
Figura 23. Avaliação da atividade inibitória da PHA-T2-4 na produção de NO por macrófagos RAW 264.7..	70

Figura 24. Atividade redutora da Triptofilina PHA-T2-4 de <i>P. azureus</i> na sobre [Fe (CN) ₆] ³⁻	71
Figura 25. Gráfico de diluição de trolox e triptofilina PHA-T2-4.....	72
Figura 26. Gráfico de regressão linear para trolox e Triptofilina PHA-T2-4.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos peptídicos, estrutura e mecanismos de ação em Phyllomedusidae.....	25
Tabela 2. Grupos e características das triptofilinas em anuros.....	29
Tabela 3. Relação das triptofilinas e trabalhos já realizados.....	31
Tabela 4. Sistema de avaliação da inibição de tripsina sobre BApNA e da quimotripsina sobre o GpNA.....	49
Tabela 5. Tabela de equivalência a ação antioxidante de trolox.....	73

ABREVIACÕES

°C – Grau celsius

µL – Microlitro

µM – Micromolar

ABTS –Ácido 2,2'-Azino-Bis (3-Etilbenzotiazolina-6-Sulfnico)

ATCC – Coleção americana de culturas tpicas, do inglês american type culture collection

BApNA – Benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida

BPPs – Peptídeos potenciadores da bradicinina

BHI – Brain Heart Infusion

CFU – Unidade formadora de colnia, do inglês colony-forming unit

Ctrl – Controle

Da – Dalton

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

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid

ESI FTMS – Espectrometria de massa de transformada de Fourier com ionização por eletropulverizao, do inglês Electrospray ionization fourier transform mass spectrometry.

FR – Fração

GpNA – N-glutaryl-L-phenylalanine p-nitroanilide

HCL – O cido clorídrico  formado pelo gás cloreto de hidrogênio (HCl)

HC50 – Concentração mínima capaz de promover 50% de hemólise

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

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

Ips – Inibidores de protease

LPS – Lipopolissacarídeo

MALDI-TOF – Ionização e dessorção a laser assistida por matriz – Tempo de Voo, do inglês matrix assisted laser desorption ionization – time of flight.

MCF-7 – Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano

mg – Miligrama

MIC – Concentração mínima inibitória, do inglês minimal inhibitory concentration. Min – Minuto

MH – Meio de cultivo Mueller Hinton

mL – Mililitro

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 Nm – Nanometro

mV – Milivolt

nm – Nanômetro

NO – Óxido Nítrico

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

PP – Persulfato De potássio

RP-HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, do inglês reversed-phase high-performance liquid chromatography.

RPM – Rotações por minuto

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RNS – Espécies reativas de nitrogênio

TPHs – Triptofilinas

TrisHCL – Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride

TFA – Ácido trifluoroacético, do inglês trifluoroacetic acid

1.INTRODUÇÃO

Os anfíbios compõem uma classe com 8.399 espécies descritas em três ordens, sendo a ordem Anura a maior delas com 7.414 espécies, que segundo a Sociedade Brasileira de Herpetologia (2021) cerca de 1100 destas espécies ocorrem no Brasil. (Frost, 2021; SHB, 2021).

Duellman e Trueb (1986) relatam que devido as pressões seletivas do ambiente os anuros desenvolveram diversas modificações fisiológicas, morfológicas e comportamentais ao longo da evolução, proporcionando maiores chances de sobreviver em habitats distintos, os principais mecanismos utilizados pelos anuros são: aposematismo, característica relacionada a cores chamativas, indicando que o animal é venenoso e extremamente perigoso para alerta aos predadores; camuflagem, caracterização do indivíduo com o meio em que vive através de sua cor; mimetismo, habilidade de mudar a cor e seu tamanho corporal para intimidar predadores; tanatose, capacidade de se fingir de morto, e liberação de secreção pelas glândulas. A secreção dos anuros é de fundamental importância para a sobrevivência dos mesmos por revestir sua pele, tendo carácter defensivo contra microorganismos patógenos, auxiliando na cicatrização e também se tornando impalatável para alguns predadores.

Uma das principais características do grupo é a presença de glândulas granulares encontradas na parte superior da cabeça, essas glândulas auxiliam na expressão, produção, acúmulo e secreção de moléculas bioativas, que é a base do sistema imune dos anuros. Os compostos expelidos na secreção são formados por substâncias biologicamente ativas que vem sendo alvo de pesquisas variadas, tendo como foco a

análise da composição molecular e atividades biológicas. Dentre as moléculas secretadas, encontram-se: aminas biogênicas, esteroides, alcaloides, peptídeos, proteínas e glicoproteínas com potencial farmacológico (ERSPAMER e MELCHIORRI, 1973; 1980; TOLEDO e JARED, 1995; MANDEL, 2008).

1.1 *Pithecopus azureus*

Pithecopus azureus pertence à ordem Anura, família Phyllomedusidae, sua distribuição geográfica é ampla, estando presente em quatro países da América do Sul: Bolívia, Paraguai, Argentina e Brasil (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo) (CARAMASCHI 2006; FROST 2008).



Figura 1. Exemplar de *Pithecopus azureus*. Foto: Daniel Velho. Extraído de: Álvares, G.F.R ,2017.

Possuem porte médio em comparação a outros indivíduos pertencentes ao grupo, o hábito dessa espécie é noturno, medem aproximadamente 3,5 centímetros, possuem coloração verde com um padrão listrado nas cores preto e alaranjado que seguem na

extensão das patas superiores, flanco até as patas anteriores. Estes animais são arborícolas e vivem próximos à água, apresentam características morfológicas propícias para saltos e fixação em estruturas rígidas de plantas, eventualmente, podem andar vagarosamente à procura de uma presa ou abrigo, como pode ser visto na figura 1 (CARAMASCHI e CRUZ 2002; DUELLMAN e TRUEB 1994).

Segundo Leite *et al.* (2005) indivíduos do gênero *Phyllomedusa* têm sido alvo de estudos, pois sua secreção cutânea vem sendo analisada e considerada como uma rica fonte de moléculas. Uma gama de peptídeos já foi analisada a partir da secreção desses anuros revelando componentes moleculares que possuem atividade biológica, com destaque nos antimicrobianos (PAMs) que abrangem o grupo das Filoseptinas, que foram os primeiros peptídeos a serem descritos na espécie de *P. azureus*, além das dermaseptinas, bradigininas, triptofilinas e peptídeos opióides (BRAND *et al.*, 2002; BRAND *et al.*, 2006; THOMPSON *et al.*, 2006; THOMPSON *et al.*, 2007).

1.2 A pele dos anfíbios

Segundo Sebben *et al.* (1993) a pele dos anfíbios é um órgão adaptado ao desenvolvimento de diversos tipos de funções fisiológicas, elas são: transporte de água e solutos, regulação da temperatura, mecanismos de defesa contra microrganismos, defesa contra predadores e regulação osmótica.

A ordem Anura apresenta dois tipos de glândulas que se originam na epiderme e crescem na derme, são elas: As glândulas multicelulares e as glândulas alveolares, que apresentam sistemas fisiológicos diferentes. O grupo representado por glândulas mucosas geralmente têm tamanho reduzido e estão localizadas por todo o corpo do

animal, sua função é secretar compostos que irão limpar a pele do animal e lubrificá-la, além de ajudar no processo de respiração cutânea. As glândulas granulares coordenam o sistema nervoso e hormonal dos anfíbios e é caracterizada por ser um fluido denso que costuma ser tóxico para os predadores. (TOLEDO e JARED, 1995; HILDEBRANDE e GOSLOW, 2006)

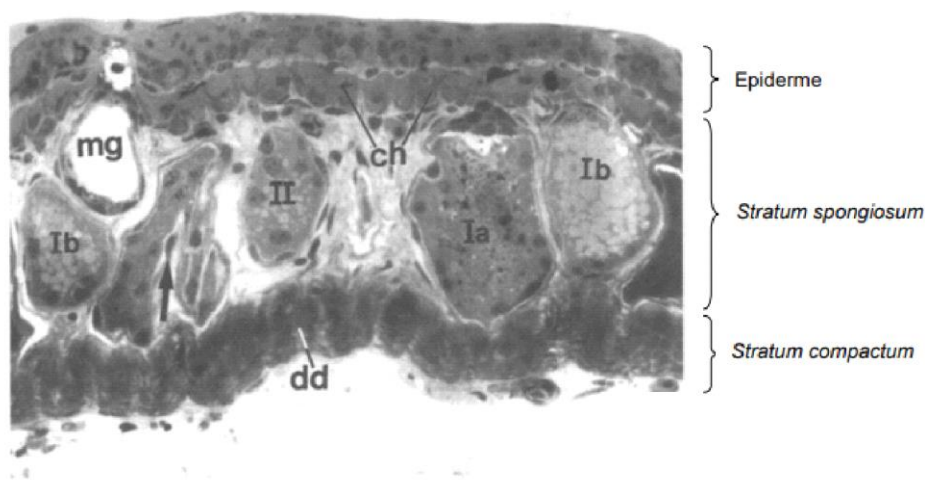


Figura 2. Representação do tecido epidermal e dérmico em Anuro do gênero *Phyllomedusa*. Ia- glândula granular tipo Ia; Ib glândula granular tipo Ib; II- glândula granular tipo II; ch unidade cromática cutânea; dd derme densa (stratum compactum); mg- glândula mucosa (x350). Adaptado de: Delfino et al., (1998).

Zasloff *et al.* (2009) relatam que os componentes secretados por anuros são diferentes em seus princípios bioativos em relação à espécie, ou seja, cada espécie secreta moléculas que se diferem umas das outras, incluindo os peptídeos que tem baixíssimas semelhanças na sequência peptídica em relação a outras espécies. Os indivíduos pertencentes ao gênero *Phyllomedusa* produzem moléculas alifáticas, aromáticas e heterocíclicas, esteroides, alcaloides, aminas biogênicas, proteínas e peptídeos. (CALDERON *et al.*, 2011).

1.3 Peptídeos na pele dos anfíbios

No século XX dois químicos iniciaram um trabalho sobre moléculas defensivas presentes nas secreções de anfíbios, estes químicos farmacológicos foram Vittorio Erspamer que trabalhou com peptídeos e aminas endógenas e John Daly com alcaloides endógenos, a realização desses estudos revelaram uma gama de estruturas moleculares com ações biológicas que resultaram em diversos estudos sobre a bioquímica destas, bem como sistemas regulatórios e produção de fármacos (GE. L *et al.*, 2014)

Atualmente com a utilização de novas tecnologias analíticas, como a clonagem molecular, proteômica e a espectrometria de massa demonstram uma maior eficiência em estudos que mostram a amplitude de moléculas presentes na secreção de anfíbios relacionando-as às novas funções que antes eram desconhecidas. Adicionalmente, a pesquisa contemporânea mantém o foco em moléculas naturais associando-as ao desenvolvimento de novas terapias e na produção de fármacos direcionados a determinadas patologias. (GE. L *et al.*, 2014)

Segundo Evaristo (2012) os anfíbios expelem em sua secreção diversos peptídeos para sua defesa ou como resposta ao meio ambiente, esses peptídeos são organizados em grupos de acordo com o tipo e características estruturais, como: Antioxidinas, filocaeruleínas, filocininas, filolitorinas, filomedusinas, filoseptinas, dermaseptinas, dermorfinas, triptofilinas e hiposinas que são exemplos de peptídeos de famílias de Peptídeos oriundos de Phyllomedusidae. Estes peptídeos têm várias funções, como: citotóxicas, microbicidas, indutoras de contração do músculo liso de artérias e intestino, ação no sistema nervoso, secreção exócrina e pituitária, antivirais, analgésicas,

liberadoras de insulina, imunomoduladoras, dentre outras funções que vem sendo amplamente estudadas com alvo em novos fármacos (CHEN *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2013)

1.3.1 Peptídeos encontrados na secreção de Phyllomedusidae e ação

De acordo com os trabalhos de Evaristo (2012), Barbosa *et al.* (2018), Magalhães (2016) e Conceição *et al.* (2007) os peptídeos em Phyllomedusidae estão separados em 7 grupos de acordo com o mecanismo de ação conforme Tabela 1, são eles:

Tabela 1. Grupos peptídicos, estrutura e mecanismos de ação em Phyllomedusidae

Função peptídica	Classe peptídica	Número de resíduos	Referência
Antimicrobianos	Dermaseptinas	24-34	Evaristo (2012)
	Filoxinas	19	
	Dermatoxinas	32	
	Filoseptinas	19-21	
	Plasticininas	23	
	Polipeptídeos de pele YY	36	
Miotrópicos	Filocininas	8-11	
	Bradicininas	8-14	
	Triptofilinas	5-13	
	Litorinas	9	
	Filolitorinas	9	
	Filomedusinas	10	
	Filocaeruleínas	9	
	Sauvaginas	40-42	
	Sauvatidas	14	
Sistema nervoso central	Deltorfinas	7-17	
	Dermorfinas	5-13	
Inibidores de protease	kazal	50-60	Magalhães (2016)
Potenciadores da bradicinina	Bpps	10	Conceição <i>et al.</i> (2007)
Atividade desconhecida	Hiposinas	11-15	Evaristo (2012)
Antioxidantes	Antioxidinas	1-22	Barbosa <i>et al.</i> , (2018)

1.4 Peptídeos antioxidantes

A pele dos anfíbios é bastante complexa em relação a diversidade de funções que executa, havendo sempre a necessidade de mantê-la íntegra tanto em ambiente aquático quanto terrestre, visto que os habitats desses animais geralmente estão diretamente relacionados às lesões não biológicas do tipo reativas ao oxigênio, deste modo, os radicais ativos que estão presentes nos mesmos podem causar uma gama de fatores como a desnaturação de proteínas e a peroxidação lipídica que acarreta em danos ao metabolismo e, conseqüentemente, às células e tecidos (XU *et al.*, 2015)

Para contrapor a elevação do estresse oxidativo nesses animais houve o desenvolvimento de um sistema representado pelo fator de defesa com caráter antioxidante bastante eficiente, dividido em dois grupos: Grupo (i): é responsável por enzimas antioxidantes como a peroxidase, catalase, glutatona e superóxido dismutase; Grupo (ii): detém compostos antioxidantes com baixo peso molecular, tal como a glutatona, nicotinamida adenina dinucleotídeo, carnosina, caroteno, polifenóis, ácido úrico e lipóico que tem como função a limpeza espécies reativas de oxigênio (ROS) quando se doa elétrons, e pequenas moléculas que podem quebrar ROS como a tirosina, triptofano, metionina ou prolina. (XU *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2010)

Segundo Barbosa *et al.* (2018) relatam que há uma coleção de peptídeos que apresentam características e atividades antioxidantes em relação aos sistemas químicos estruturais isolados da pele de rãs da Ásia; tais quais as espécies reativas e as reativas

ao oxigênio que são fundamentais na atuação de vários processos fisiológicos como nas vias celulares que levam à produção de ROS, cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, oxidases e tantas outras reações enzimáticas.

Alguns peptídeos antioxidantes foram relatados no trabalho de Xu *et al.* (2015) como: antioxidina-RL de *Odorrana lívida*, pleurainas A1/D1/E1/G1K1/M1/N1/P1 E R1 em *Rana pleuraden*, antioxidinas RP1/RP2 em *Rana pleuraden*, macrotympain-A1 em *Odorrana macrotympana*, margaratain-A1/B1/C1 em *Odorrana margaratae*, tiannanin-A1 em *Odorrana tiannanensis*, wuchuanin-E1/C1/D1/E1 em *Odorrana wuchuanensis*, hejiangin-A1/E1/F1 em *Odorrana hejiangensis*, dentre outros. Barbosa *et al.* (2018) encontraram peptídeos como a antioxidin-I em *Phyllomedusa tarsius*, *Phyllomedusa distincta* e em *Pithecopus rohdei*. Revelando que esses compostos podem ser encontrados em diversas espécies e ser bem diversificado quanto ao tamanho e sequência.

1.5 Tryptofilinas

As triptofilinas (TPHs) são peptídeos pequenos possuindo de 5 a 13 resíduos, são isolados a partir da secreção cutânea dos anfíbios, o tamanho destes peptídeos são uma das principais características dessa família. A primeira triptofilina foi isolada a partir da derme do anuro *Phyllomedusa rohdei* (MONTECUCCHI, 1984) a posteriori da pele de *Phyllomedusa sauvagei* e *Phyllomedusa bicolor* (ERSPAMER, 1994). Essas famílias de peptídeos possuem resíduos de aminoácidos, contendo entre eles, prolina e triptofano na terceira ou quarta posição e uma amidação na posição N-terminal.

Chen *et al.* (2004) descrevem os TPHs como o único grupo de peptídeos provenientes das secreções cutâneas de anfíbios com caráter defensivo descritos em uma única base química por uma reação de cor para indóis em cromatogramas de papel, sendo ativados quando testados em bioensaios de músculo liso e pressão arterial sistêmica. A maioria dos TPHs foram isolados a partir das peles e da secreção cutânea de espécies de rãs das famílias Hylidae e Phyllomedusidae.

1.6 Tipos de TPHs, estrutura e estudos relacionados

Popov (2017) aponta que os TPHs estão reunidos em três grupos distintos que estão representados por suas características na Tabela 2, são eles:

1- O grupo 1 denominado (T-1) que abrange os heptapeptídeos amidados e os octapeptídeos que contém em sua cadeia aminoácidos básicos (R, K e H) localizados na região aminoterminal. Havendo também, dois resíduos internos de Prolina e um resíduo de Triptofano localizados na quinta posição.

2- O grupo dois denominado (T-2) abrange os peptídeos de tamanhos diversificados, geralmente amidados na região C-terminal havendo resíduos de Prolina e Triptofano paralelos.

3- O grupo 3 denominado (T-3) é o que grupo representa um maior nível de conservação de suas estruturas pela presença da sequência Pro-Pro-Pro-Ile-Tyr.

Conlon *et al.* (2005) fizeram um relato da descoberta de TPHs na secreção cutânea de *Ascaphus truei* que é uma das espécies mais antigas de rãs, o que sugere que codificação das triptofilinas e seus genes já estavam presentes no princípio evolutivo

dos anfíbios e supõe-se que esses genes possam ser encontrados em algumas espécies de peixes.

Tabela 2. Grupos e características das triptofilinas em anuros, adaptado de: Popov ,2013.

Grupo	Sequência primária	Número de Resíduos	Espécie	Referência
T1	RPPSWIPK-	8	<i>Phyllomedusa azurea</i>	Popov (2013)
T1	KPPAWVPNH	9	<i>Pachymedusa dacnicolor</i>	
T2	-FPPWMNH-	7	<i>Phyllomedusa hipocondrialis azurea</i>	
T2	-FPPWL---	5	<i>Phyllomedusa hipochondialis</i>	
T2	-FPPWVL--	6	<i>Phyllomedusa centralis</i>	
T2	-QIPWFHR-	7	<i>Litoria rubella</i>	
T2	GPIPW-QR-	7	<i>Ascarphus truei</i>	
T3	QDKPFWPPPIYIM	13	<i>Phyllomedusa azurea</i>	
T3	QEKPYWPPPIYPM	13	<i>Phyllomedusa rohdei</i>	
T3	QDKPFWSPPIYPV	13	<i>Phasmahyla jandaia</i>	

Segundo Wang *et al.* (2013) no ano de 2010 seis tipos de triptofilinas e peptídeos relacionados foram descobertos na secreção cutânea de *Hyla arborea*, para este estudo

utilizou-se da técnica espectrometria de massa transformada de Fourier com ionização de nanopulverização (nano ESI-FTMS).

O primeiro achado descrito de TPHs em *Phasmahyla jandaia* foi caracterizado por sequenciamento *de novo* e por degradação de Edman (WANG *et al.*, 2013). Vários tipos de triptofilinas estão sendo encontrados em diferentes espécies. Adicionalmente, várias pesquisas têm sido realizadas em busca de novos peptídeos e sabe-se que mais de quarenta TPHs oriundos da secreção cutânea de anuros. A Tabela 3 exhibe exemplos de TPHs e seus efeitos distintos sobre células cancerosas e microorganismos, efeitos hemolíticos e contração de musculatura lisa (WANG *et al.*, 2013, 2015)

Tabela 3. Triptofilinas isoladas de anuros, características estruturais e funcionais.

Peptídeo	Organismo	Sequência	Massa (Da)	Contração de músculo liso arterial/intestino /bexiga EC50	Atividade microbicida (MIC)	Atividade citotóxica	Efeitos hemolíticos	Efeito antioxidante	Referências
Tryptophyllin-T2-3 PaT-2 (PHA-T2-3) (Tryptophyllin-2)	<i>Pithecopus azureus</i> (<i>Phyllomedusa azurea</i>)	FPPWL	658.38	*	*	1029 µM	*	100 µM ROS e RNS em células BV2	Barbosa et al., (2021)
Tryptophyllin-L	<i>Litoria rubella</i> (<i>Hyla rubella</i>)	FPWL	543.66	-	*	*	*	0,80 µM TEAC 150 µM FRAP	Tran et al., (2021)
Tryptophyllin-T1 (PHA-T1) (Tryptophyllin-5) (Tryptophyllin-HA5)	<i>Pithecopus azureus</i> (<i>Phyllomedusa azurea</i>)	RPPSWIPK	979.56	#	*	*	*	*	Thompson A.H. et al., (2007)
Tryptophyllin-1 (PdT-1)	<i>Pachymedusa dacnicolor</i>	KPPAWVP	809.2	0,006µM	*	*	*	*	Chen T. et al., (2004)
Tryptophyllin-1 (PsT-1)	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>	KPPWVVPV	919.48	93nM	*	10 µM	*	*	Wang R. et al., (2013)
Tryptophyllin-T3-1 (PHA-T3-1) (Tryptophyllin-9)	<i>Pithecopus azureus</i> (<i>Orange-legged monkey tree frog</i>) (<i>Phyllomedusa azurea</i>)	QDKPFWPPPI YIM	1613.91	*	*	*	*	*	Thompson A.H. et al., (2007)
Tryptophyllin-T3-2 (PHA-T3-2) (Tryptophyllin-10)	<i>Pithecopus azureus</i> (<i>Phyllomedusa azurea</i>)	QDKPFWPPPI YPM	1597.83	*	*	*	*	*	Thompson A.H. et al., (2007)
Tryptophyllin-T2-1 (PHA-T2-1) (Tryptophyllin-11)	<i>Pithecopus azureus</i> (<i>Phyllomedusa azurea</i>)	FPPWF	691.28	*	*	*	*	*	Thompson A.H. et al., (2007)
Tryptophyllin-T2-5 (PHA-T2-5) (Tryptophyllin-1)	<i>Pithecopus azureus</i> (<i>Orange-legged monkey tree frog</i>) (<i>Phyllomedusa azurea</i>)	LPPWIG	680.40	*	*	*	*	*	Thompson A.H. et al., (2007)
Tryptophyllin-T2-8 (PHA-T2-8) (Tryptophyllin-12)	<i>Pithecopus azureus</i> (<i>Phyllomedusa azurea</i>)	KPWERE	842.47	*	*	*	*	*	Thompson A.H. et al., (2007)

Tryptophyllin-T2-6 (PHA-T2-6) (Tryptophyllin-6)	<i>Pithecopus azureus</i> (<i>Phyllomedusa azurea</i>)	KPPWRL	810.46	*	*	*	*	*	Thompson A.H. <i>et al.</i> , (2007)
Tryptophyllin-T2-3 (PHA-T2-3) (Tryptophyllin-2)	<i>Pithecopus azureus</i> (<i>Phyllomedusa azurea</i>)	FPPWL	657.39	-	*	*	*	*	Thompson A.H. <i>et al.</i> , (2007)
Tryptophyllin-T2-2 (PHA-T2-2) (Tryptophyllin-3)	<i>Pithecopus azureus</i> (<i>Phyllomedusa azurea</i>)	FPPWE	673.38	*	*	*	*	*	Thompson A.H. <i>et al.</i> , (2007)
Tryptophyllin-T2-4 (PHA-T2-4) (Tryptophyllin-8)	<i>Pithecopus azureus</i> (<i>Phyllomedusa azurea</i>)	FPPWM	675.31	-	*	*	*	*	Thompson A.H. <i>et al.</i> , (2007)
Tryptophyllin-T3-1 (Pj-T3-1)	<i>Phasmahyla jandaia</i>	QDKPFWSPPI YPV	1555.9	*	*	*	*	*	Rates B. <i>et al.</i> , (2011)
Tryptophyllin-T3-2 (Pj-T3-2)	<i>Phasmahyla jandaia</i>	QDKPFWSPPI YPH	1594.6	*	*	*	*	*	Rates B, <i>et al.</i> , (2011)
Tryptophyllin-T3-3 (Pj-T3-3)	<i>Phasmahyla jandaia</i>	QDKPFWDPPI YPV	1583.7	*	*	*	*	*	Rates B, <i>et al.</i> , (2011)
Tryptophyllin-5.1	<i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	FPPWL	657.39	-	-	-	-	*	Silva L.P. <i>et al.</i> , (2007)
AcT-3	<i>Agalychnis callidryas</i>	#	1538,1	0,1 µM	*	+	-	*	Wang, R. <i>et al.</i> , (2015).
Tryptophyllin-L 1.3	<i>Litoria rubella</i> (<i>Hyla rubella</i>)	#	672	#	Micrococcus luteus 50pg/ml Streptococcus uperzs 100 pg/ml	*	*	*	Steinborner, S.T. <i>et al.</i> , (1996)
Tryptophyllin-L 5.1	<i>Litoria rubella</i> (<i>Hyla rubella</i>)	QIPWFHR	965	*	-	*	*	*	Steinborner, S.T. <i>et al.</i> , (1996)
Tryptophyllin-T2-7 (PHA-T2-7) (Tryptophyllin-7)	<i>Pithecopus azureus</i> (<i>Phyllomedusa azurea</i>)	FPPWVL	826.43	*	*	*	*	*	Thompson A.H. <i>et al.</i> , (2007)
Tryptophyllin-14	<i>Phyllomedusa centralis</i> (Mato Grosso leaf frog)	KPWRL	757.4	-	-	#	-	*	Silva L.P. <i>et al.</i> , (2008)
Tryptophyllin-T2-9 (PHA-T2-9) (Tryptophyllin-4)	<i>Pithecopus azureus</i> (<i>Phyllomedusa azurea</i>)	VPPIGWF	814.40	*	*	*	*	*	Thompson A. H. <i>et al.</i> , (2007)
Tryptophyllin-13	<i>Pithecopus rohdei</i> (<i>Phyllomedusa rohdei</i>)	QEKPYWPPPI	1644,8	-	*	*	*	*	Montecucchi P.C. <i>et al.</i> , (1986)
Tryptophyllin-like peptide PbT-1	<i>Phyllomedusa burmeisteri</i>	EPPPWVPV	919.52	#	#	#	#	*	Conceicao, K. <i>et al.</i> , (2009)

AcT-2	<i>Agalychnis callidryas</i> (<i>Phyllomedusa callidryas</i>)	GMRPPWF	889.25	0,005 µM e 9.3 µM	Staphylococcus aureus, (MIC = 287,88 µM) Escherichia coli (MIC = 575.76 µM), e Candida albicans (143,94 µM)	*	575,76 µM	*	Ge L., <i>et al.</i> , 2013
Tryptophyllin-2 precursor	<i>Pachymedusa dactinicolor</i>	DMSPPWH	868.36	0,004µM	*	*	*	*	Wang L. <i>et al.</i> , (2009)
Tryptophyllin peptide PHT-3 (Fragment)	<i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	PFWPPPIPM	1244.6	-	*	100 µM	-	*	Wang R. (2013)
Tryptophyllin TP02 (Fragment)	<i>Pithecopus nordestinus</i> (<i>Phyllomedusa nordestina</i>)	AFLKKSFLVFL GFISISFCDEEKI QDDDEASEREE KKEIHEE	5188.8	*	*	*	*	*	Neiva M. <i>et al.</i> , (2013)
Tryptophyllin-related peptide	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	ZEKPFYPPPI	1215,2	*	*	*	*	*	Mignogna G. <i>et al.</i> , (1992)
(-) Sem atividade (*) Não testado (#) Sem relatos (+) Atividade relatada, porém não descrita.									

O papel fisiológico do TPHs permanece pouco claro, porém de acordo com os estudos relacionados a essa família de peptídeos há atribuições funcionais às triptofilinas, como: a atuação destas sobre o metabolismo, auxiliando a indução da síntese de proteínas hepáticas e o ganho de peso corporal; agentes hipotensivos e moduladores da contração dos músculos lisos do trato gastrointestinal (CHEN *et al.*, 2004; RATES *et al.*, 2011).

2. JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, vários tipos de peptídeos distintos foram identificados nas secreções de diversos anuros, esses peptídeos estão sendo estudados, sendo os principais fatores de sucesso evolutivo desse grupo por conta das várias atividades biológicas exercidas por essa secreção, como: atividades contra fungos e bactérias, atividade antitumoral, oxidante, redutora, hemolítica, analgésica, entre outras. (MOR et al., 1991; BOMAN, 1991; BATISTA, 1999; ABDEL-WAHAB et al., 2008; HOSKIN & RAMAMOORTHY, 2008).

Com o intuito de isolar e analisar compostos presentes na secreção cutânea de *Pithecopus azureus* (Phyllomedusidae), e como demonstrado na Tabela 3, algumas triptofilinas apresentam atividade antimicrobiana e antitumoral, todavia o mesmo não foi testada para todas, assim, faz-se necessário um estudo complementar desses peptídeos.

Espera-se, portanto, que com as análises bioquímicas da fração escolhida e com a realização de testes óxido-redutores, inibidores de protease, microbicidas e citotóxicos, este trabalho possa contribuir com maiores dados científicos sobre o tema abordado que vem revelando amplo potencial biotecnológico.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é analisar a atividade biológica da triptofilina PHA-T2-4 isolado da secreção cutânea de *P. azureus*.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar o fracionamento do extrato clorofórmico da secreção bruta de *P. azureus* utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em sistema de fase reversa - HPLC;
- Identificar os componentes do extrato clorofórmico de *P. azureus* por espectrometria de massa e sequenciamento *de novo*
- Através da recromatografia em HPLC isolar a triptofilina PHA-T2-4 para a realização de testes;
- Avaliar as atividades biológicas da triptofilina em ensaios: antimicrobianos contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus* e o fungo *Candida albicans*; Citotóxicos sobre as linhagens celulares MCF-7 e RAW264.7; Atividade inibidora de serinoprotease e fosfolipase; Produção de NO sobre a linhagem celular e RAW264.7; Redução de ferricianato de potássio e a capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e extração:

Adultos de *P. azureus* foram coletados por procura ativa no município de Monte Alegre de Goiás (GO), SISGEN: A875609, onde tiveram sua secreção extraída por meio de eletroestimulação de 50 mV por 6 segundos. A secreção presente na pele foi lavada com água e posteriormente liofilizada (Speed Vac Thermo Savant SPD2010P – Thermo Scientific) e armazenada a -20 °C até o uso.

4.2 Fracionamento da secreção cutânea bruta de *P. azureus* por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC

Alíquotas de 10mg foram diluídas em 5mL de clorofórmio, homogeneizadas, centrifugadas (10 mil RPM por 10 min) e o sobrenadante retirado, seco sob vácuo e ressuspenso em fase móvel A (1mL) e aplicado (50µl) em HPLC de fase reversa (Shimadzu Co. Kioto, Japan série LC 20A), em coluna Phenomenex Gemini 5u C18 110R, 250 x 4.6 mm; fluxo de 1,0mL/min. As fases móveis utilizadas foram TFA 0.12% (v/v) em água deionizada (solução A) e TFA 0.1% (v/v) em metanol (solução B). A eluição foi feita em um gradiente de 0 a 47% de B em 5 min, seguida por uma eluição isocrática em 47% de B em 20 minutos com forno à 40°C. A detecção foi feita a 216 nm e as frações coletadas manualmente em tubos plásticos tipo eppendorf de 1,5mL.

Para a recromatografia o equivalente a 10 corridas de fração de interesse foi unida e ressuspenso em 1mL de solução A, vortexadas e aplicadas (50µl) em HPLC de fase reversa (Shimadzu Co. Kioto, Japan série LC 20A), em coluna analítica Kinetex 5u XB-C18 100A, 250 x 4.6 mm. As fases móveis utilizadas foram TFA 0.12% (v/v) em água deionizada (solução A) e TFA 0.1% (v/v) em metanol (solução B). A eluição foi feita em

um gradiente de 0 a 47% de B em 5 min, seguida por uma eluição isocrática em 47% de B em 20 minutos com forno à 40°C. A detecção foi feita a 216 nm e as frações coletadas manualmente em tubos falcon de 15 mL.

4.3 Espectrometria de massa e sequenciamento *de novo*

O extrato clorofórmico e as frações cromatográficas foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF modelo ULTRAFLEX II (Bruker, MA, EUA). As frações foram ressuspensas em acetonitrila 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v) e 1µL de cada fração cromatográfica foi aplicada em placa de aço inoxidável juntamente com 1µL de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA 20 µg/µL) ressuspensa em acetonitrila 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v). O procedimento foi realizado no modo refletido positivo, sendo a faixa m/z analisada de 400 a 3000 Da. Para o sequenciamento *de novo* foi utilizado o modo LIFT. Os espectros obtidos foram editados com o software FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics). Os espectros de massas obtidos do MALDI-TOF-TOF foram analisados utilizando o software FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics).

4.4 Preparo da amostra:

Após a purificação das frações isoladas da secreção cutânea de *P. azureus* por HPLC, a quantificação foi realizada por meio de espectrofotometria, cada peptídeo foi solubilizado em 700 µl de água deionizada e as absorvâncias lidas a 205, 215 e 225 nm, sendo a concentração dos peptídeos calculadas através da média aritmética das equações abaixo, conforme o proposto por Murphy e Kies (1960).

$$[\]_{\frac{\mu g}{mL}} = \left(\frac{Abs_{205nm}}{31} \right) 1000 \quad [\]_{\mu g/mL} = 144(Abs_{215nm} - Abs_{225nm})$$

A fração identificada como triptofilina PHA-T2-4 de *P. azureus* foi alíquotada então contendo 1mM em 1mL em tubos eppendorf de 1,5 mL e secos a vácuo. Sendo utilizado na maior parte dos ensaios na concentração de 500 μ M conforme os ensaios de Ge L. e colaboradores (2013) que utilizaram as triptofilinas em concentrações semelhantes.

4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana:

4.5.1 Atividade antibacteriana:

Para a identificação da PHA-T2-4 com atividade antimicrobiana as cepas das bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foram realizadas conforme protocolo estabelecido pelo CLSI M7 A6, sendo que a atividade antibacteriana da PHA-T2-4 foi avaliada usando-se o método de diluição em caldo.

As bactérias foram cultivadas em meio Mueller-Hinton (MHB) pH 7,2 conforme instruções do fabricante, sob agitação a 37°C durante 24 horas. Após este período, a absorbância foi medida em densidade óptica entre 0.08-0.1 o que equivale a 1×10^8 células/mL em 625nm em espectrofotômetro (UV-VIS Spectrophotometer UV-M51 Bel Photonics, Italia). Na fase logarítmica, as suspensões bacterianas foram diluídas em MHB na proporção de 1:10 que corresponde a 1×10^7 células/mL e a partir dessa diluição,

uma nova na proporção de 1:20 que corresponde a 5×10^5 células/mL que é a solução de uso.

A triptofilina PHA-T2-4 foi ressuspensa em água deionizada estéril e 50 μ L foram adicionados em diluição em série 1:1 (v/v) em concentrações entre 500 a 1,95 μ M com 50 μ L de suspensão bacteriana em microplacas de fundo plano de 96 poços por 24 horas a 37°C. Como controle de crescimento usou-se o meio Mueller-Hinton, e como controle de inibição usou-se o formaldeído 0,8%, ambos incubados com as 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).

4.5.2 Atividade antifúngica

Para a identificação da PHA-T2-4 com atividade antifúngica, a cepa do fungo *Candida albicans* (ATCC 14053) foi realizada conforme protocolo estabelecido pelo CLSI M7 A6 com modificações, sendo que a atividade antimicrobiana da PHA-T2-4 foi avaliada usando-se o método de diluição em caldo.

Os fungos foram cultivados em meio BHI pH 7,4 conforme instruções do fabricante, sob agitação a 37°C durante 24 horas. Após este período, a absorbância foi medida em densidade óptica entre 0.08-0.1 o que equivale a 1×10^6 células/mL em 530nm em espectrofotômetro (UV-VIS Spectrophotometer UV-M51 Bel Photonics, Italia). Na fase logarítmica, as suspensões fúngicas foram diluídas em BHI na proporção de 1:100 que corresponde a 1×10^4 células/mL e a partir dessa diluição, uma nova diluição na proporção de 1:20 que corresponde a 5×10^2 células/mL que é a solução de uso.

A triptofilina PHA-T2-4 foi ressuspensa em água deionizada estéril e 50 µL foram adicionados em diluição em série 1:1 (v/v) em concentrações de 500 a 1,95 µM com 50 µL de suspensão fúngica em microplacas de fundo plano de 96 poços por 24 horas a 37°C. Como controle de crescimento usou-se o meio BHI e como controle de inibição usou-se o formaldeído 0,8%, ambos incubados com as suspensões fúngicas. A inibição do crescimento foi determinada pela leitura da densidade óptica a 530nm com uma leitora de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA).

4.6 Análise da viabilidade Celular:

4.6.1 Células tumorais

4.6.1.1 Manutenção da cultura de células MCF-7

Todos os procedimentos foram realizados com materiais rigorosamente esterilizados e em câmara de fluxo laminar, cuja luz ultravioleta permaneceu ligada de 30 a 40 minutos antes do uso. Alíquotas das linhagens de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 (ATCC HTB-22) foram removidas de um estoque em nitrogênio líquido e descongeladas a 37°C. Alíquotas de 500 µL foram lentamente adicionadas em 3 mL de meio de cultura DMEM completo (tamponado com bicarbonato de sódio, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico).

Esse meio de cultura foi utilizado em todos os outros procedimentos experimentais. Em seguida, as células foram centrifugadas a 750 g por 5 minutos, ressuspensas em 5 mL de meio de cultura DMEM, transferidas para um frasco de cultura de células e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Para assegurar a qualidade das

células a serem utilizadas nos experimentos, a cada 48 horas o meio de cultura foi substituído por um meio de cultura novo.

A cultura de células foi observada em microscópio de luz invertido e monitorada quanto ao crescimento celular, aspectos morfológicos e presença de contaminantes. Ao atingir o estágio de confluência (elevada densidade de células em uma determinada área), as células foram removidas do frasco de cultura e recultivadas em uma densidade menor seguindo o procedimento descrito a seguir.

O meio de cultura foi descartado e 2 mL de solução de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina contendo 0,53 mM de EDTA) foram adicionados ao frasco de cultura para a remoção da monocamada de células. Após 2 minutos de incubação em estufa a 37°C, a remoção das células foi observada em microscópio de luz invertido. Em seguida, foram acrescentados 2 mL de meio de cultura para inativar a atividade da tripsina. A suspensão de células foi centrifugada a 750 g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em meio de cultura. Aproximadamente 10% das células foram recultivadas em frascos de cultura e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

No estágio de confluência, as células foram removidas dos frascos de cultura e centrifugadas (como descrito acima). Após o descarte do meio de cultura, as células foram ressuspensas em meio de congelamento (DMEM, 20% soro fetal bovino, 1% de antibiótico, 5% de DMSO). A suspensão celular foi rapidamente transferida para criotubos, os quais foram identificados e envolvidos por uma espessa camada de papel toalha e mantidos a -80°C por 24 horas. Em seguida, os criotubos foram estocados imersos em nitrogênio líquido.

4.6.1.2 Tratamento das células com Triptofilina PHA-T2-4

Ao atingir o estágio de confluência, as células de câncer foram removidas do frasco de cultura e centrifugadas como descrito anteriormente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultura. Para a determinação do número de células, um volume de 10 μ L da suspensão de células foi adicionado a 30 μ L de solução de azul tripan (0,4% diluídos em PBS, p/v). Uma alíquota de 8 μ L dessa mistura foi depositada gentilmente em uma câmara de Neubauer, onde células presentes nos quatro quadrantes maiores laterais foram contadas em microscópio de luz. O número de células foi determinado pela seguinte fórmula:

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

As células contadas foram transferidas para placas de cultura e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas para a completa adesão das células no fundo da placa, posteriormente sendo transferidas para placas de tamanhos diferentes.

Placas de 96 poços foram utilizadas para ensaios de viabilidade celular por MTT com concentração inicial de 5 x 10³ células/poço. Após o período de incubação na estufa, as placas de cultura foram observadas em microscópio de luz invertido para a avaliação da morfologia, dispersão das células pela placa e presença de contaminação.

Essa análise foi realizada para decidir se as células estavam homogêneamente dispersas e saudáveis para serem submetidas aos ensaios com o peptídeo. O peptídeo foi ressuspendido em ¼ de água e completados com ¾ do meio de cultura e plaqueados

por diluição seriada das soluções estoque em meio de cultura, sendo que a concentração por poço variou de 500 a 0,24 μ M.

Os grupos controle contém $\frac{1}{4}$ de água e $\frac{3}{4}$ de meio de cultura. O meio de cultura das placas foi substituído pelo meio contendo os peptídeos. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após o período de incubação, as células foram preparadas de maneira adequada para a realização dos testes. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6.1.3 Viabilidade Celular (MTT) para MCF-7

A viabilidade celular foi avaliada de acordo com o método MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina) descrito por (Mosmann, 1983). As células cancerosas de MCF-7 foram cultivadas e tratadas com Triptofilina PHA-T2-4 de *P. azureus* (conforme descrito no item 4.6.1.2) em placa de 96. Após o período de incubação, o meio de cultura da placa foi removido e 150 μ L de solução de uso de MTT (15 μ L de MTT 5 mg/mL diluídos em 135 μ L de DMEM completo) foram adicionados em cada poço. As células foram incubadas por 3 horas em estufa a 37° C e 5% de CO₂. Em seguida, o meio de cultura foi removido e 200 μ L de DMSO foram adicionados em cada poço para dissolver o formazan formado.

A quantificação do formazan foi feita pela medida da absorbância dos poços no comprimento de onda de 595 nm em uma leitora de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA). A viabilidade celular foi determinada pela média da triplicata de cada concentração testada.

4.6.2 Células não tumorais

4.6.2.1 Manutenção da cultura de células RAW 264.7

O ensaio foi realizado na Universidade Federal de Minas Gerais.

As células RAW 264.7 de monócito/macrófago de camundongo (ATCC TIB-71) foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, cultivados a 37°C em atmosfera umidificada em 5% de dióxido de carbono (CO₂).

4.6.2.1 Viabilidade Celular (MTT) para RAW 264.7

O ensaio MTT foi utilizado para detectar a viabilidade celular e avaliar a citotoxicidade. A atividade de succinato desidrogenase das mitocôndrias em células vivas reduz o reagente MTT exógeno a formazan, que é depositado nas células, e o número de células vivas é proporcional aos cristais de formazan.

As células foram cultivadas em placa de 96 poços a uma densidade de 2×10^4 células/mL. Após 24 h de incubação para aderência, as células foram tratadas ou não com triptofilina PHA-T2-4 em concentrações decrescentes de 500 a 7 µM incubadas por 24 e 48 h em incubadora de células. Em seguida, uma solução de MTT (5µg/mL) foi adicionada às células que foram incubadas por mais 4 h.

Após a remoção do sobrenadante, 100 µL de solução dimetilformamida/dodecil sulfato de sódio 10% (1:1) foram adicionados para dissolver o formazan, o valor de densidade óptica de absorção de luz medido pelo leitor de microplaca em comprimentos de 570 nm. As células não tratadas foram consideradas 100% células viáveis, os

resultados são expressos como a porcentagem de células viáveis em comparação com as células não tratadas.

4.7 Atividade inibitória de enzimas

4.7.1 Tripsina

A análise da inibição de tripsina foi realizada segundo o método de Erlanger *et. al.* (1961) com modificações. Primeiramente o substrato é diluído em 500µl de DMSO e o volume final necessário completado com a adição de tampão Tris-HCl (50mM) + CaCl₂ (20mM), pH 8,2. Para os cálculos de concentração da enzima (Tripsina) foi utilizado um espectrofotômetro do modelo Shimadzu 1800 UV (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

O preparo da enzima foi feito dissolvendo-se uma quantidade mínima de enzima em 1 mL de HCl 1mM, que foi diluída consecutivamente em tampão Tris-HCl até atingir a concentração final de 0,064 mg/mL (2.68µM) medida espectrofotômetro ($\lambda = 280$ nm).

Cálculo para a concentração de enzima: $A_{280} \times 10/15,9$, onde 15,9 é a $A^{1\%}_{280}$ da tripsina.

Por meio do leitor de placas Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA) a leitura foi realizada, juntamente com o software SkanIt for multiskan FC 2.5.1 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA).

O substrato utilizado foi o BAPNA - *Benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida* (Sigma-Aldrich) na concentração final de 0,43 mg/mL (1mM). A PHA-T2-4 foi utilizada na concentração de 500µM. O sistema de reação enzimática pode ser observado na tabela 4.

4.7.2 Quimotripsina

A análise da inibição de quimotripsina foi realizada segundo o método de Erlanger *et. al.* (1961) com modificações. Primeiramente o substrato é diluído em 500µl de DMSO e o volume final necessário completado com a adição de tampão Tris-HCl (50mM) + CaCl₂ (20mM), pH 7,6. Para os cálculos de concentração da enzima (Quimotripsina) foi utilizado um espectrofotômetro do modelo Shimadzu 1800 UV (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

O preparo da enzima foi feito dissolvendo-se uma quantidade mínima de enzima em 1 mL de HCl 1mM, que foi diluída consecutivamente em tampão Tris-HCl até atingir a concentração final de 0,63 mg/mL (26 µM) medida em espectrofotômetro ($\lambda = 280$ nm).

Cálculo para a concentração de enzima: $A_{280} \times 10/20,4$, onde 20,4 é a $A^{1\%}_{280}$ da quimotripsina.

Por meio do leitor de placas Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA) a leitura foi realizada, juntamente com o software SkanIt for multiskan FC 2.5.1 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA).

O substrato utilizado foi o GPNA - *N*-glutaryl-L-phenylalanine *p*-nitroanilide (Sigma-Aldrich) na concentração final de 0,80 mg/mL (3 mM). A PHA-T2-4 foi utilizada na concentração de 500µM. O sistema de reação enzimática pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4. Sistema de avaliação da inibição de tripsina sobre BApNA e quimotripsina sobre GpNA.

	Tampão	Amostra	Enzima		Substrato		Ácido acético
100% de hidrolise	40µl	-	40µl	15 minutos	200µl	30 minutos	30µl
0% de hidrolise	80µl	-	-				
Amostra	-	40µl	40µl				

4.7.3 Fosfolipase

Para avaliação da inibição da fosfolipase foi utilizado o método estabelecido por Marinetti (1965), com modificações. As peçonhas de serpentes utilizadas foram gentilmente cedidas pelo banco de peçonhas da Universidade Católica do Goiás.

Para o preparo da emulsão foi utilizado o substrato fosfatidilcolina (“N60%”) – (Sigma, St Louis, MO) 3 mM em um tampão Tris-HCl 100 mM com pH 8.0. As peçonhas de *Bothrops jararaca*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus collilineatus* à 5mg/mL e PHA-T2-4 (5 mM) foram ressuspensas em água deionizada e incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos.

Para o preparo do ensaio, foram pipetadas 150 µl da emulsão em cada poço de uma placa multipoços (TPP, 29 Switzerland) em triplicata. Em seguida, 20 µl das peçonhas incubadas com PHA-T2-4 incubadas foram adicionadas aos poços. Para o controle negativo foram utilizados 150 µl de emulsão, 10 µl de cloreto de cálcio e 10 µl

de peçonha bruta de *Crotalus durissus collineatus* ou *Bothrops spp.* (5 mg/mL). Após incubação por 60 minutos a 37°C, foram realizadas leituras das placas a 405 nm.

4.8 Ensaio antioxidantes

4.8.1 Avaliação da capacidade inibitória na produção de óxido nítrico em RAW 264.7

Para esta análise foi utilizado o sobrenadante da cultura de RAW264.7 proveniente da avaliação da viabilidade celular. Os níveis de óxido nítrico (NO) foram determinados medindo o conteúdo de nitrito no sobrenadante da cultura celular utilizando o reagente de Griess (Wang *et al.*, 2021). As células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10^4 célula/mL.

Após 24 h de incubação para aderência, as células foram tratadas ou não com LPS (1 µg/ mL) com ou sem várias concentrações de triptofilina PHA-T2-4 em concentrações decrescentes de 500 a 7 µM, incubados por 24 e 48 h em incubadora de células.

Em seguida, um total de 50 µL de sobrenadante de cultura de células foi misturado com um volume igual de reagente de Griess e a absorbância foi medida a 540 nm usando leitor de microplaca. As concentrações de nitrito foram calculadas utilizando uma curva de calibração padrão obtida a partir de nitrito de sódio.

4.8.2 Ensaio de redução de Ferricianato de potássio em Ferrocianeto de potássio

Foram incubados 50 µL de ferricianato (0,1%) com 50 µL da PHA-T2-4 (500µM /mL) por 08 horas, após incubação é adicionado de 30 µL cloreto de ferro FeCl₃ (0.1%). O ensaio consiste na redução [Fe (CN)₆]³⁻ em [Fe (CN)₆]⁴⁻ na presença de um agente

reduzindo a cor ferricianato junto as amostras passam de amarelo em nuances entre verde e azul. Para os controles negativos a fração foi substituída por 50 µL água deionizada e peróxido de hidrogênio 1%, para o controle positivo a fração foi substituída por 50 µL ácido ascórbico (10 mg/mL). O ensaio foi realizado em triplicata em placa de 96 poços e lido a 620 nm em leitora de placas (Multiskan FC, Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA).

4.8.3 TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)

Para a realização do ensaio utilizou-se do protocolo descrito por Rufino *et al.* (2007), com modificações. O ensaio de eliminação de radicais ABTS 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) consiste na eliminação do radical do mesmo, sua estabilização ocorre através da reação de oxidação entre o sal de persulfato de potássio com a solução aquosa ABTS. Dessa forma, a atividade antioxidante do agente a ser testado e suas concentrações são analisados mediante o descoramento (de verde escuro para verde claro) da solução do radical ABTS, monitoradas por espectrometria em comprimento de onda de 734 nm.

Para isso, foi utilizado o persulfato de potássio na concentração de 140mM e ABTS à 7mM diluídos em álcool étílico 50% em um tubo vedado por 24 horas. Após esse período, o material foi diluído novamente com álcool 50% até atingir a absorbância de 0.7 nm em espectrofotometro do modelo Shimadzu 1800 UV (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) à 734 λ.

Posteriormente, foi feita a diluição seriada para a curva de calibração com trolox a 15 µM em placa de 96 poços em triplicata com 6 pontos nas concentrações de 15 a

0,48 μM , com a solução de ABTS/PP a 0,7 nm e lida a 734 λ em leitora de placas (CLARIOstar Plus, BMG LABTECH).

Em sequência, foi realizada a diluição seriada da PHA-T2-4 (15 μM) em placa de 96 poços em triplicata com 6 pontos nas concentrações de 15 a 0,48 μM , com a solução de ABTS/PP à 0,7 nm e lida em leitora de placas (CLARIOstar Plus, BMG LABTECH) à 734 λ após 24 horas. O cálculo de equivalência ao trolox foi realizado utilizando a média das triplicatas da diluição da triptofilina na equação R^2 da curva de calibração do trolox, e posteriormente foi realizado um gráfico de diluição com as médias das triplicatas de ambas as diluições. Todo o experimento foi realizado em local escuro para impedir o ABTS a exposição de luz, pois o mesmo é fotossensível.

4.9 Estatística

A estatística entre o controle e as amostras tratadas com o peptídeo foram avaliadas através de cálculos realizados no Excel e plotadas no software GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

5. RESULTADOS

A análise de espectrometria de massa do extrato clorofórmico bruto indicou a presença de compostos hidrofóbicos de baixa massa molecular, destacamos os componentes de 676.38 Da, 1086.72 Da, 1234.74 Da, 1942.20 Da e 2048.25 Da (Figura 3).

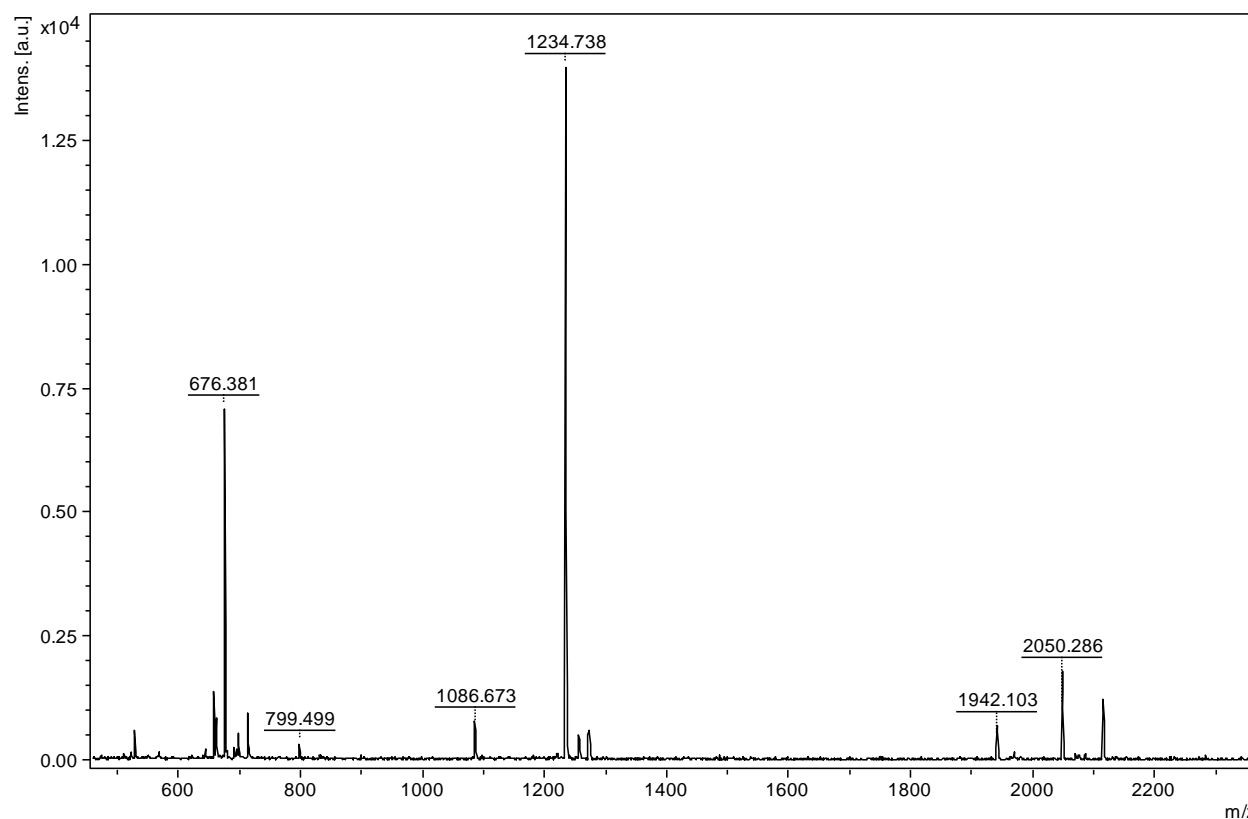


Figura 3. Espectrometria de massa em sistema de MALDI-TOF, a partir do extrato clorofórmico bruto de *P. azureus*, observa-se os componentes de massa de 676.38 Da, 799Da, 1086.72 Da, 1234.74 Da, 1942.20 Da e 2050.28 Da.

5.1 Fracionamento cromatográfico do extrato clorofórmico da secreção Bruta de *P. Azureus* e análise por espectrometria de massas

Alíquotas da secreção bruta de *P. azureus* em extrato clorofórmico foram fracionadas em coluna C18 por RP-HPLC a um fluxo de 1 mL/min, conforme o perfil cromatográfico abaixo (Figura 4). Cada corrida cromatográfica resultou em 4 frações majoritárias que foram coletadas manualmente.

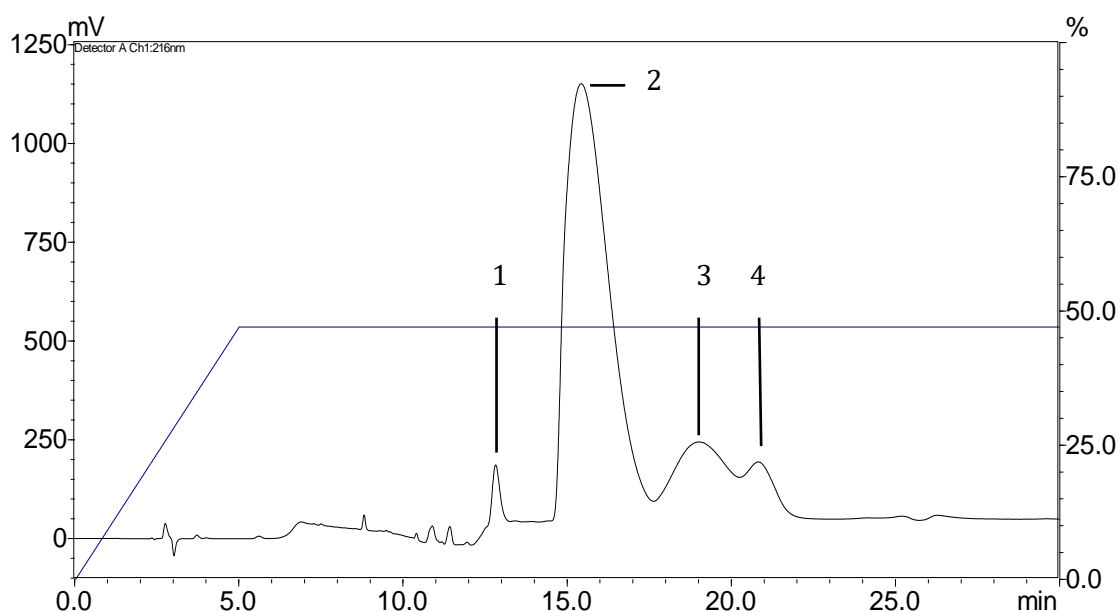


Figura 4. Perfil cromatográfico em RP-HPLC do extrato clorofórmico bruto de *Pithecopus azureus*. Coluna: Kinetex 5u XB-C18 100A, 250 x 4.6 mm; fluxo de 1,0mL/min; absorvância 216 nm.

Essas frações foram submetidas à análise por espectrometria do tipo MALDI-TOF/MS e os espectros foram obtidos plaqueando as amostras com HCCA na proporção de 1:1 com a amostra e analisadas no modo refletido positivo. Deste modo, pode-se observar (Figura 5) que na fração 1 (A) obteve-se uma massa de 692.2 Da; na fração 2 (B) observa-se a massa de 676.3 Da; na fração 3 (C) nota-se a massa de 658.3 Da; e na fração 4 (D) pode-se observar a massa de 658.3 e 815.3 Da.

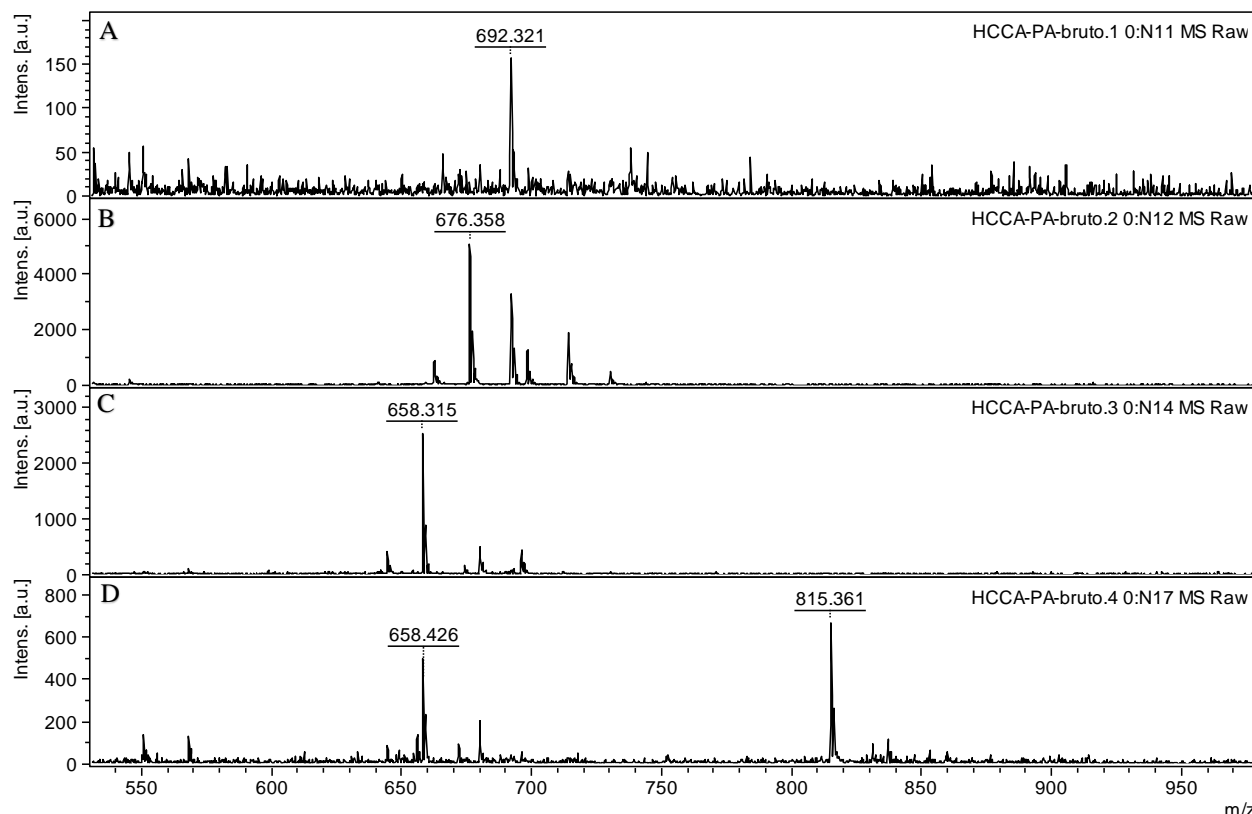


Figura 5. Espectrometria de massa em sistema de MALDI-TOF, das frações: Fração 1 (A) 692.2 Da; Fração 2 (B) 676.3 Da; Fração 3 (C) 658.3 Da; Fração 4 (D) 658.3 e 815.3 Da.

Conforme o disposto acima, visto que as massas de aproximadamente 658.6, 676.35 e 692.2 Da estão próximas as massas das triptofilinas apresentadas na Tabela 3 pode-se sugerir que os peptídeos sejam respectivamente as triptofilinas: PHA-T2-1 e PHA-T2-4 com massa molecular de 691.28 e 675.31 Da preditos por (THOMPSON *et al.*, 2007) e a Triptofilina-5.1 com massa de 657.39 Da predita por (SILVA *et al.*, 2007).

5.2 Recromatografia e análises por espectrometria de massas

As frações 2, 3 e 4 foram recromatografadas por RP-HPLC (Figuras 6, 8 e 10) e posteriormente todas as subfrações foram submetidas à análise por espectrometria do tipo MALDI-TOF/MS (Figuras 7, 9 e 11).

Pode-se observar que na recromatografia da Fr2 há somente uma subfração que foi denominada de Fr2.1 (Figura 6), esta, apresentou componente de massa de 676.26 Da com aductos de sódio e potássio de 698,2 e 714,2 Da, respectivamente (Figura 7).

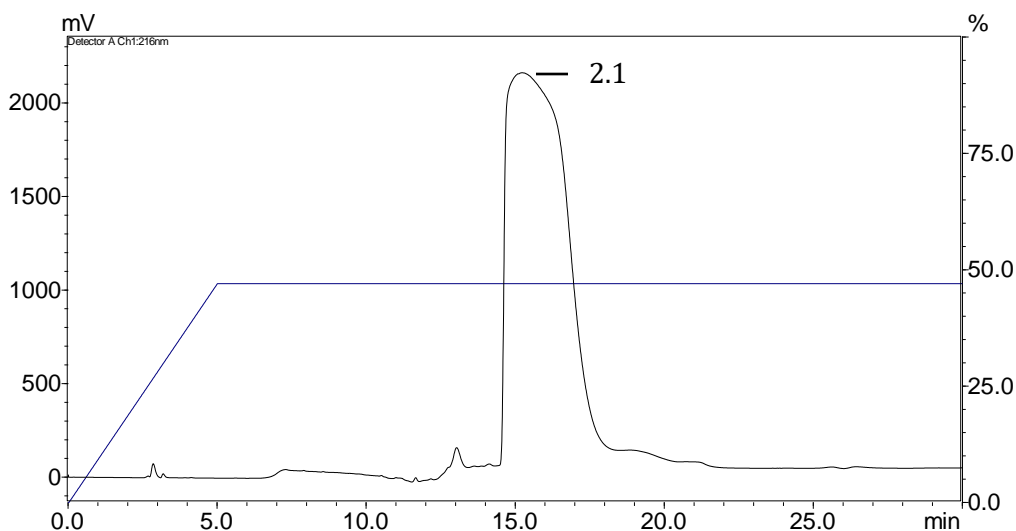


Figura 6. Recromatografia da fração Fr2 de *Pithecopus azureus* em uma coluna Kinetex 5u XB-C18 100A, 250 x 4.6 mm; fluxo de 1,0mL/min, a absorbância foi monitorada a 216 nm.

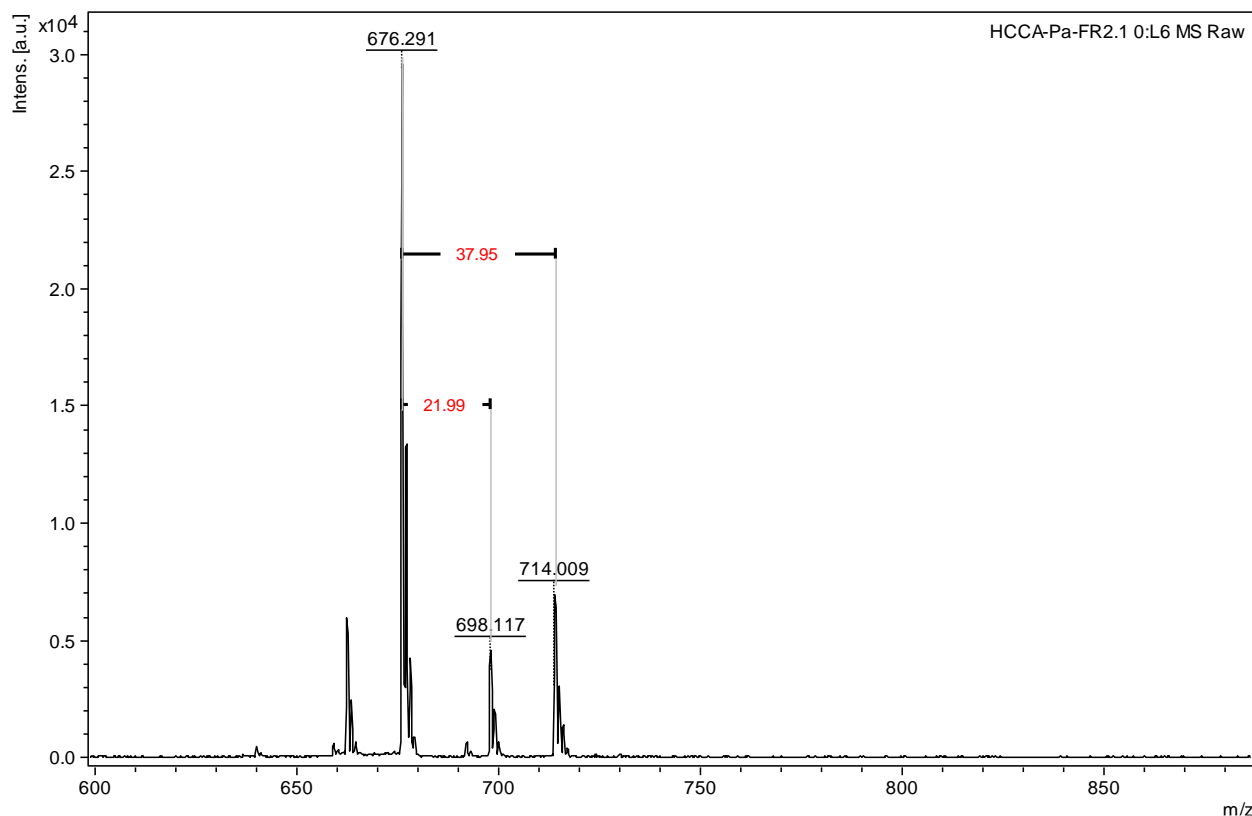


Figura 7. Espectrometria de massa em sistema de MALDI-TOF, da fração 2.1 apresentando massa de 676.2 Da com adutcos de sódio e potássio 698,2 e 714,0 Da, respectivamente. As linhas pretas numeradas em vermelho indicam os acrescimentos de aproximadamente 22 Da. e 38 Da que são respectivamente aductos de sódio e de potássio.

A recromatografia da Fr3 (Figura 8) apresenta três subfrações denominadas de Fr3.1, Fr3.2 e Fr3.3. Obtendo-se para essas subfrações os componentes de massa de: Fr3.1 (A) 676,2 Da, com aductos de sódio e potássio 698,4 e 714,3 Da, respectivamente. Para a Fr3.2 (B) obteve-se componentes de massa de 658.2 Da. com aducto de sódio de 680,2 Da, e massa de 676,2 Da e 692,2 Da com aducto de sódio de 714,1 Da. A Fr3.3 (C) apresentou componentes de massa de 658,3 e de 676,3 Da com aductos de sódio e potássio com 700,4 e 719,8 Da respectivamente (Figura 9).

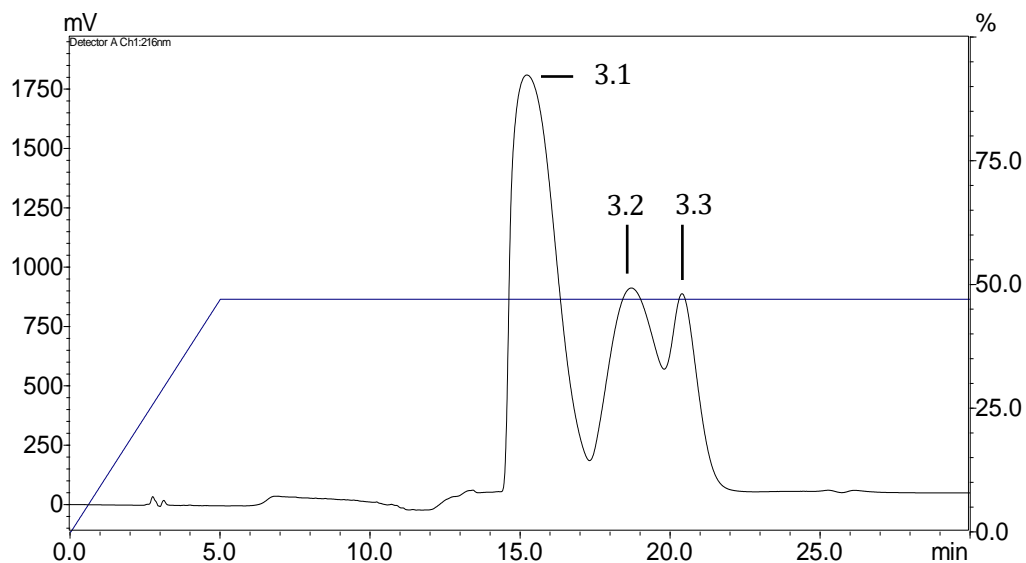


Figura 8. Recromatografia da fração Fr3 de *Pithecopus azureus* em uma coluna Kinetex 5u XB-C18 100A, 250 x 4.6 mm; fluxo de 1,0mL/min, a absorbância foi monitorada a 216 nm.

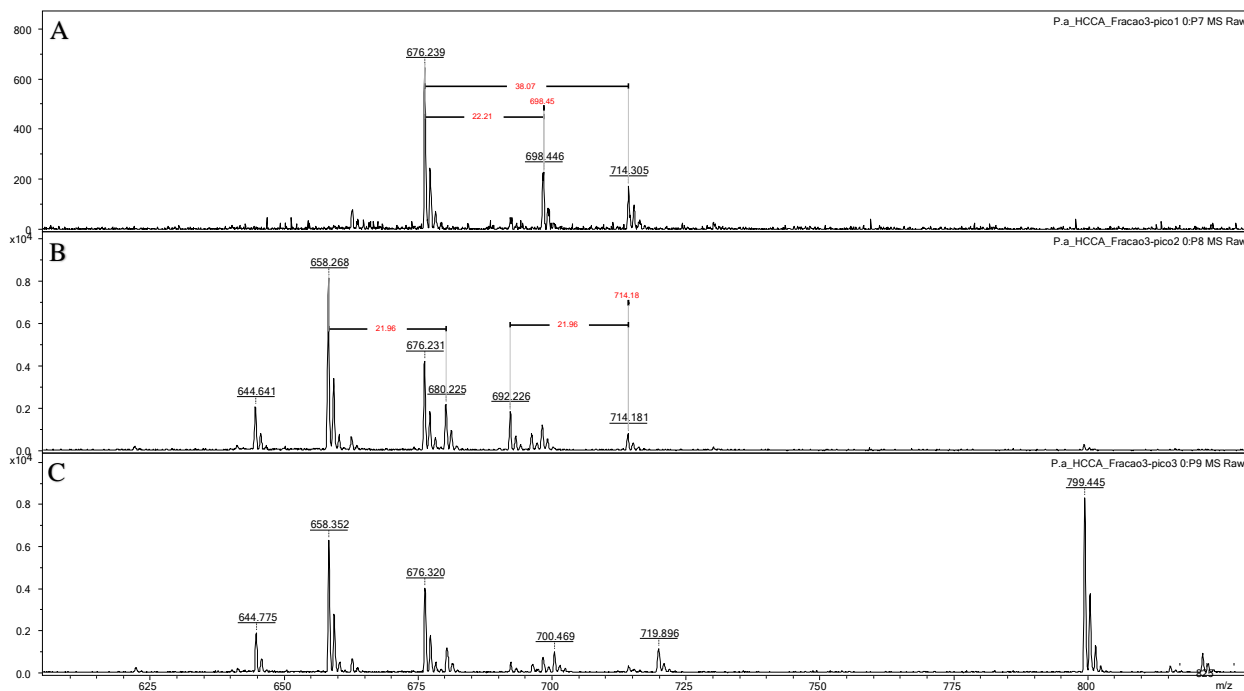


Figura 9. Espectrometria de massa em sistema de MALDI-TOF, das frações: Fr3.1 (A) 676,2 Da, com aductos de sódio e potássio 698,4, 714,3 Da, respectivamente; Fr3.2 (B) 658,2 Da com aducto de sódio de 680,2 Da; massa de 676,2 Da e 692,2 Da com aducto de sódio de 714,1 Da; Fr3.3 (C) 658,3 e de 676,3 Da com aducto de sódio e potássio com 700,4, 719,8 Da, respectivamente. As linhas pretas numeradas

em vermelho indicam os acréscimos de aproximadamente 22 Da e 38 Da que são respectivamente aductos de sódio e de potássio.

Na recromatografia da Fr4 (Figura 10) observa-se três subfrações denominadas de Fr4.1, Fr4.2 e Fr4.3., estas apresentaram componentes de massa de: Fr4.1 (A) obteve-se a massa de 692,3 Da com aductos de sódio e potássio de 714,2 e 730,2 Da respectivamente. A Fr4.2 (B) apresentou massa de 658,3 Da e a Fr4.3 (C) 658,4 Da (Figura 11).

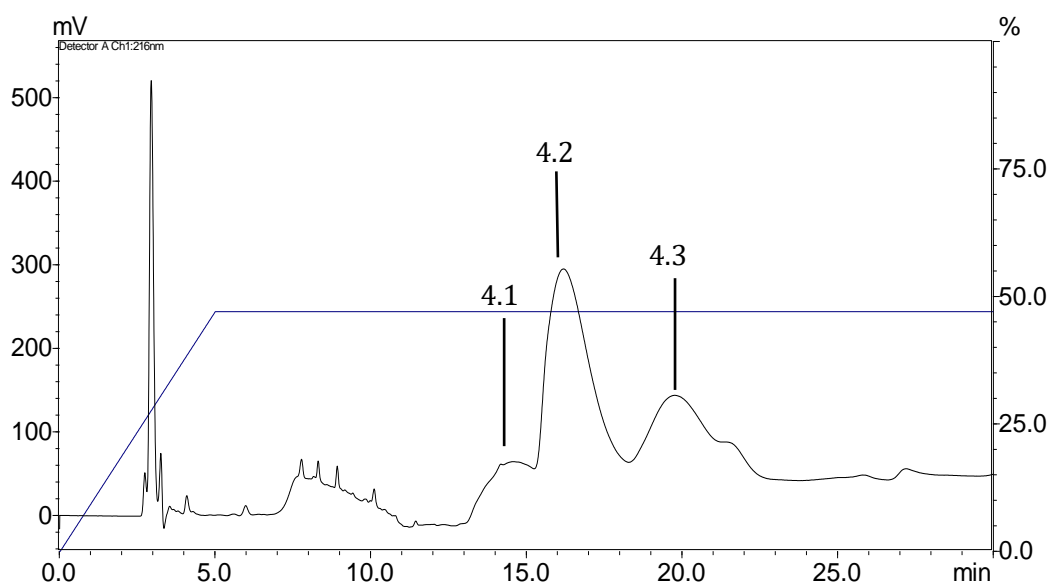


Figura 10. Recromatografia da fração Fr4 de *Pithecopus azureus* em uma coluna Kinetex 5u XB-C18 100A, 250 x 4.6 mm; fluxo de 1,0mL/min, a absorbância foi monitorada a 216 nm.

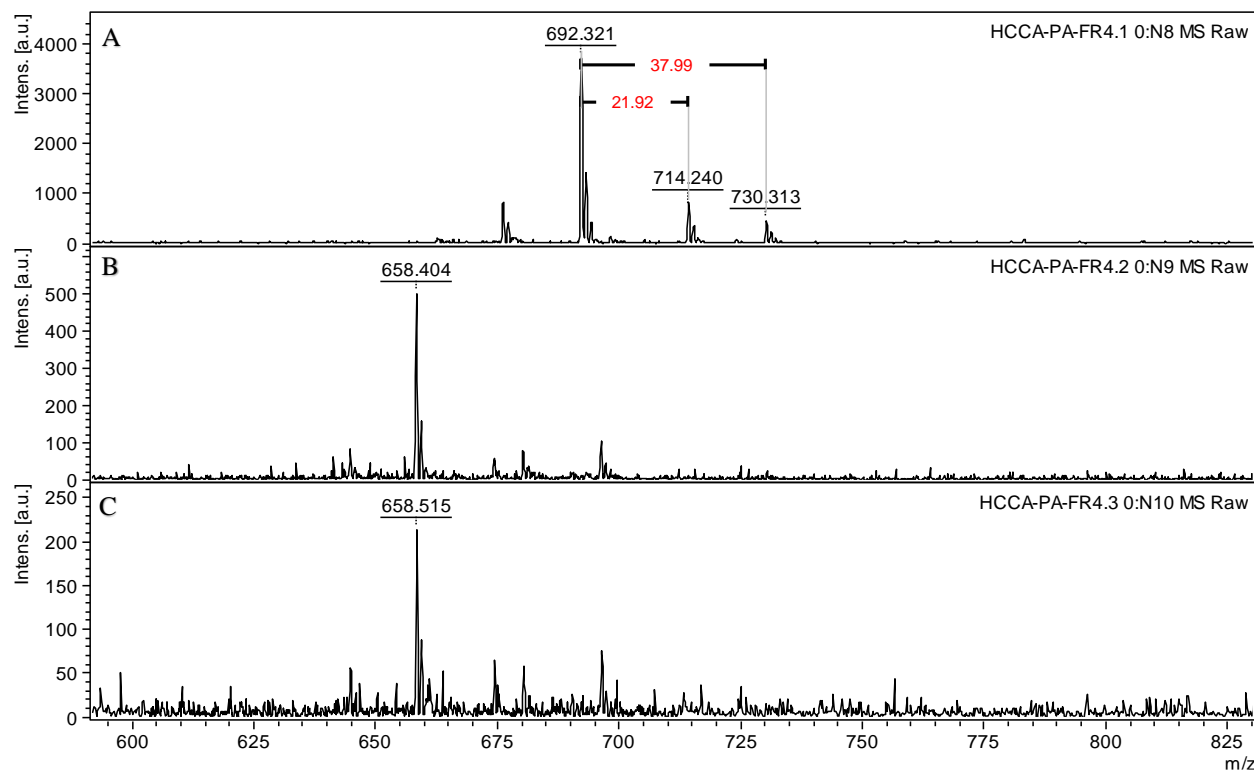


Figura 11. Espectrometria de massa em sistema de MALDI-TOF, das frações: Fr4.1 (A) 692,3 Da com aductos de sódio e potássio de 714,2 e 730,2 Da, respectivamente; Fr4.2 (B) 658,3 Da; e Fr4.3 (C) 658,5 Da. As linhas pretas numeradas em vermelho indicam os acréscimos de aproximadamente 22 Da e 38 Da que são respectivamente aductos de sódio e de potássio.

5.3 Identificação da Triptofilina

Com a realização do sequenciamento de novo (Figura 12) dos componentes e com a comparação dos dados com a Tabela 3, nota-se que as massas de: 658,2 Da da subfração Fr3.2 (A), 676,2 Da das subfrações Fr2.1 e Fr3.1 (B); e 692,3 Da da subfração Fr4.1 (C) sugerem que há a identificação das triptofilinas FPPWM (PHA-T2-4) 675,31 Da (utilizadas neste trabalho para realização de testes) e FPPWF (PHA-T2-2) 691,28 Da descritas por (THOMPSON *et al.*, 2007) e FPPWL (Triptofilina-5.1) 657,31 Da descrita por (SILVA *et al.*, 2007).

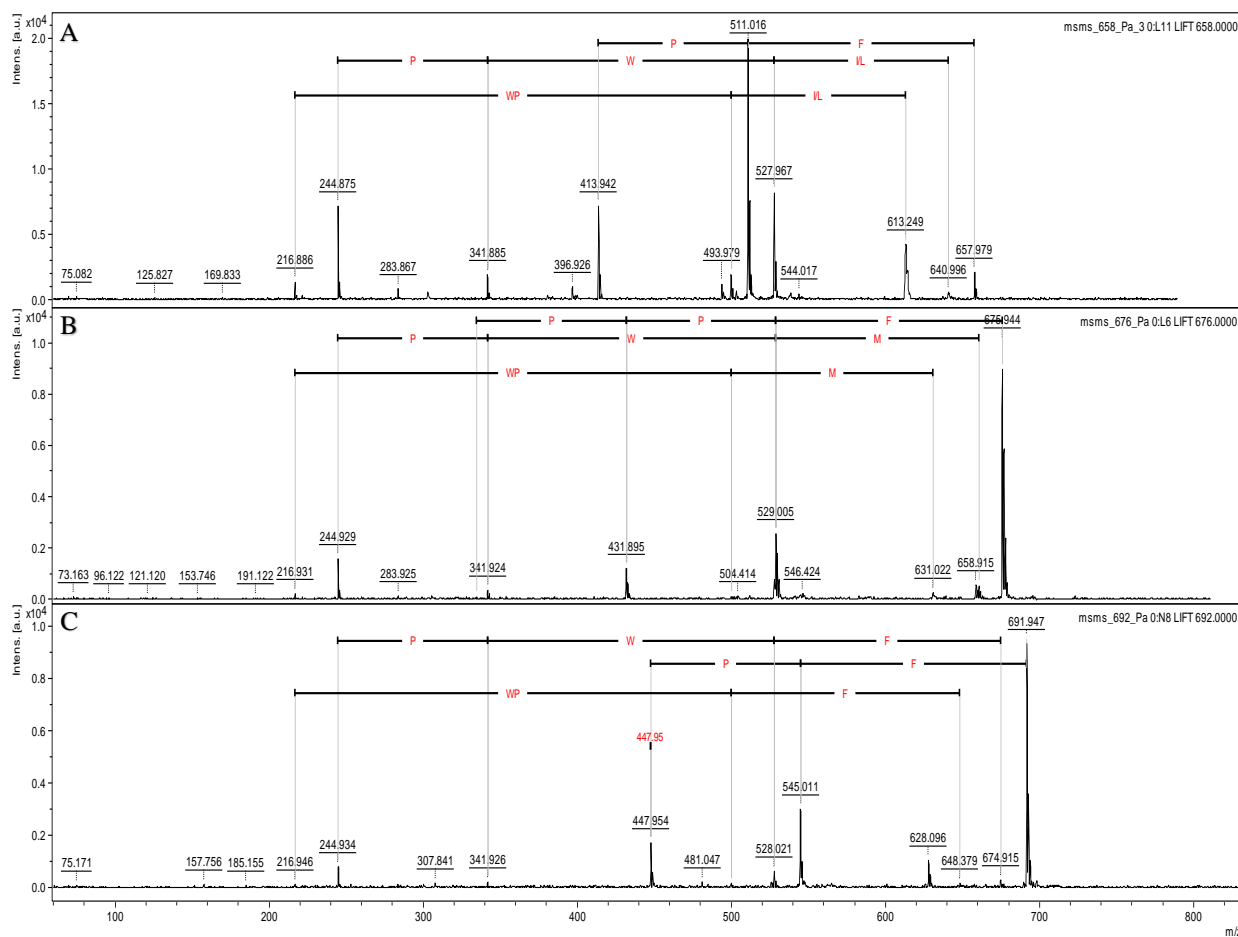


Figura 12. Espectro MS/MS das triptofilinas (A) FPPWL com massa de 658 Da; (B) FPPWM com massa de 676 Da; e (C) FPPWF com massa de 692 Da. Obtidos a partir do sequenciamento de novo com íons das séries b e y obtidos por fragmentação do tipo LIFT.

5.4 Atividade antimicrobiana

A partir disso, foram realizados testes antimicrobianos e antifúngicos utilizando a PHA-T2-4 na concentração inicial de 500 μ M (conforme descrito no item 4.4). O ensaio antimicrobiano revelou que a Triptofilina PHA-T2-4 não apresentou características inibidoras de crescimento microbiano, conforme Figuras 13-15.

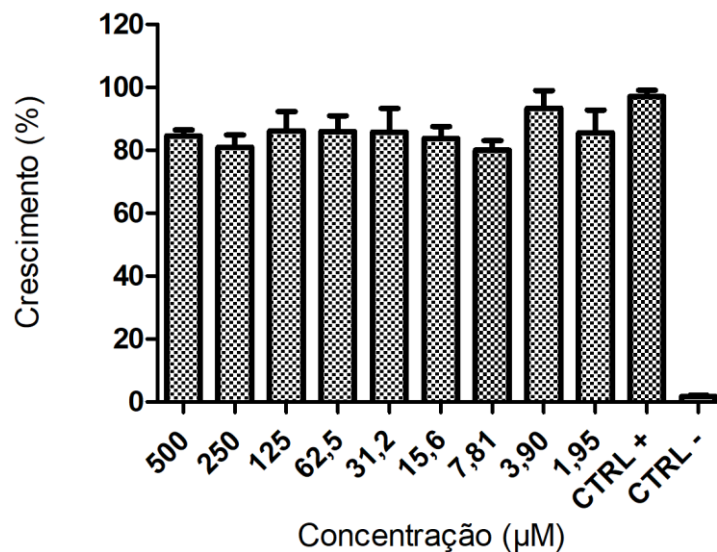


Figura 13. Avaliação do crescimento de *C. albicans* após o tratamento com Triptofilina PHA-T2-4 (500µM) da secreção cutânea de *P. azureus*. O controle positivo se deu através da incubação do meio de cultura com o inóculo, o controle negativo se deu incubando o inóculo com formol 0,8%. Os resultados são expressos pela média e desvio padrão.

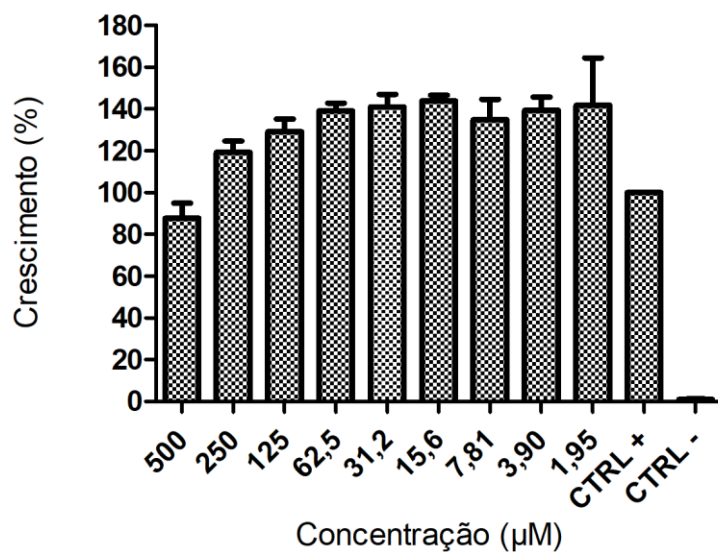


Figura 14. Avaliação do crescimento de *E. coli* após o tratamento com a Triptofilina PHA-T2-4 (500µM) da secreção cutânea de *P. azureus*. O controle positivo se deu através da incubação do meio de cultura com o inóculo, o controle negativo se deu incubando o inóculo com formol 0,8%. Os resultados são expressos pela média e desvio padrão.

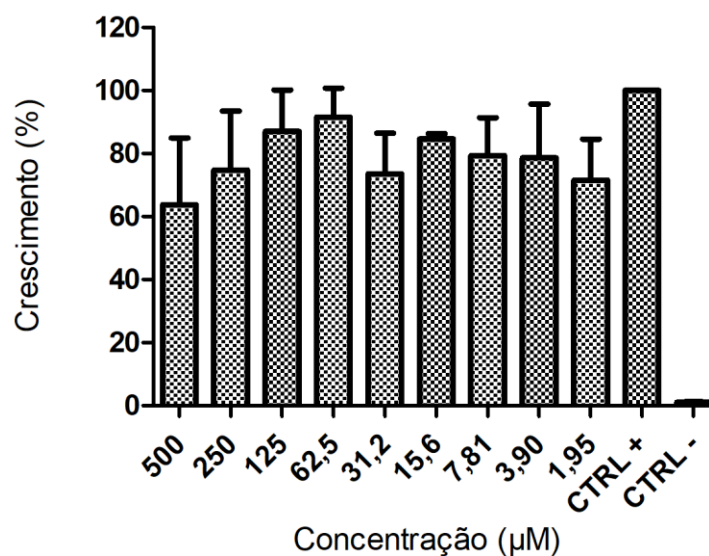


Figura 15. Avaliação do crescimento de *S. aureus* após o tratamento com a Triptofilina PHA-T2-4 (500µM) da secreção cutânea de *P. azureus*. O controle positivo se deu através da incubação do meio de cultura com o inóculo, o controle negativo se deu incubando o inóculo com formol 0,8%. Os resultados são expressos pela média e desvio padrão.

5.5 Análise da viabilidade celular

5.5.1 Viabilidade Celular (MTT) para MCF-7

Com o ensaio de viabilidade celular observa-se que a linhagem MCF-7 mostrou-se sensível à incubação com a Triptofilina PHA-T2-4 na concentração de 500µM e a partir da concentração de 3,90 µM tendo em média mais de 60% de redução na viabilidade em relação ao controle positivo, conforme figura abaixo.

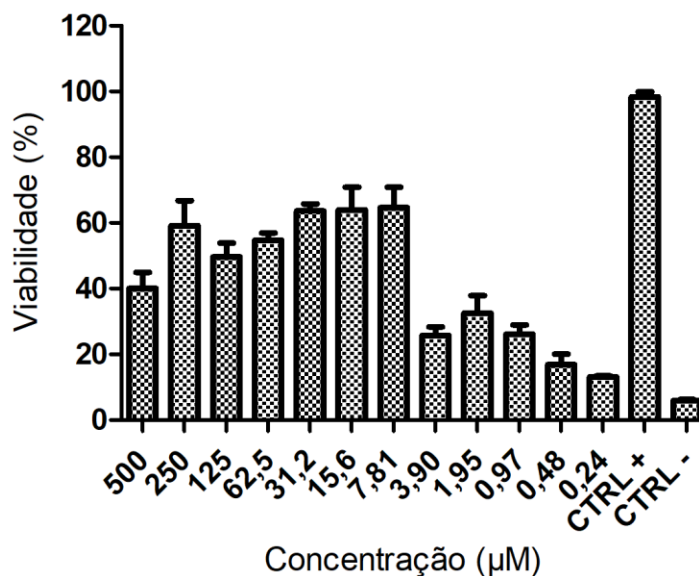


Figura 16. Efeito da Triptofilina PHA-T2-4 (500µM) de *P. azureus* na viabilidade de células MCF-7. Células MCF-7 foram incubadas por 24 horas. A viabilidade celular foi determinada por MTT. Os resultados são expressos pela média e desvio padrão. Significância pelo teste de Anova fator único seguido do teste de Tukey: * $P < 0,05$.

5.5.2 Viabilidade Celular (MTT) para RAW 264.7

Com o ensaio de viabilidade celular sobre a linhagem RAW 264.7 pode-se observar que não houve atividade citolítica nas concentrações testadas em relação ao controle positivo, conforme figura abaixo.

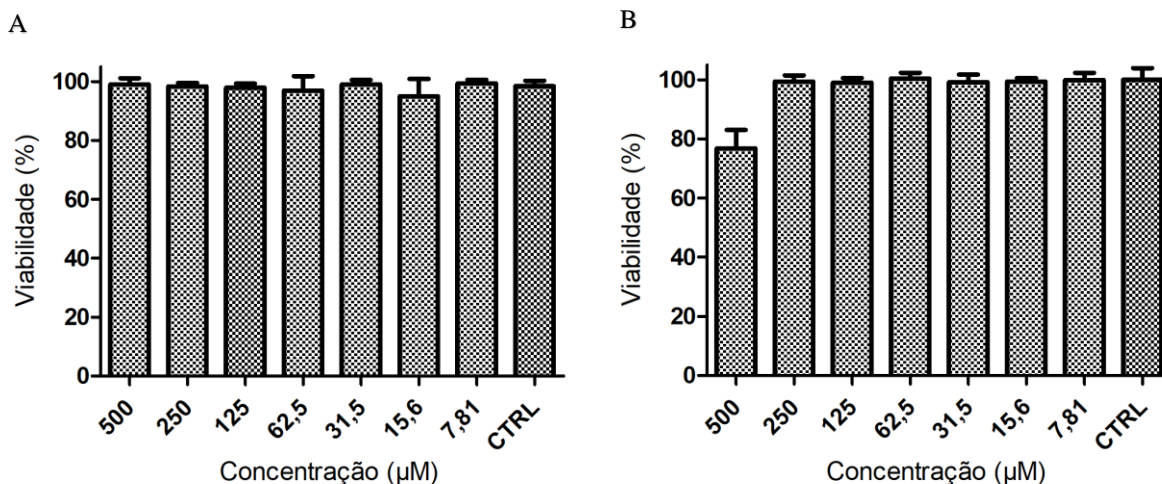


Figura 17. Efeito da Triptofilina PHA-T2-4 (500μM) de *P. azureus* na viabilidade de células RAW 264.7. Células RAW 264.7 foram incubadas por (A) 24 horas e (B) 48 horas. A viabilidade celular foi determinada por MTT. O controle (CTRL) são células não tratadas com a PHA-T2-4 consideradas células 100% viáveis. Os resultados são expressos pela porcentagem de células viáveis em comparação com as células não tratadas.

5.6 Atividade inibitória de enzimas

5.6.1 Tripsina

Foi realizado o ensaio de inibidor de protease onde a atividade inibitória sobre tripsina foi avaliada com o extrato bruto e as Triptofilinas PHA-T2-4 de *P. azureus* a uma concentração de 500μM, o substrato utilizado foi BApNA. Como ilustrado na figura abaixo, neste ensaio observou-se que a PHA-T2-4 causou uma inibição 37% em relação ao controle positivo.

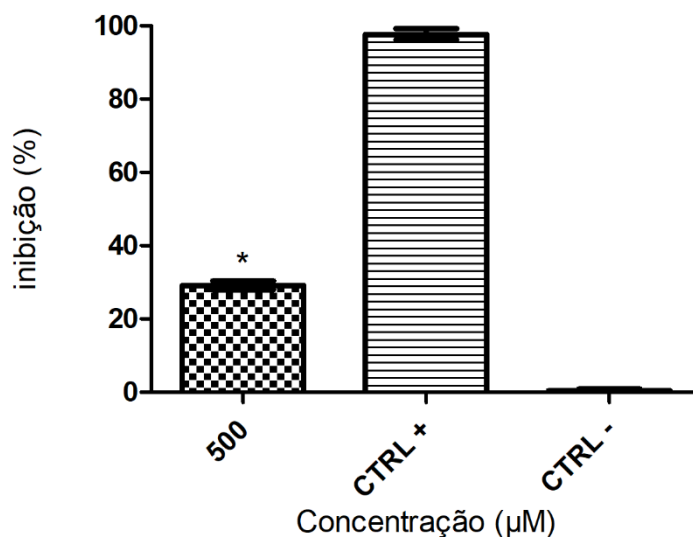


Figura 18. Atividade inibitória de tripsina da PHA-T2-4 (500 µM) da secreção cutânea de *P. azureus* sobre BApNA. O tampão de ensaio usado foi Tris-HCl, pH8,2 a 25°C por 30 minutos. O controle positivo contém enzima e substrato, e o controle negativo contém somente substrato. A leitura foi realizada a 405nm. Os resultados estão expressos pela média e seu respectivo desvio padrão. Significância pelo teste de Anova fator único seguido do teste de Tukey: * P<0,05

5.6.2 Quimotripsina

A atividade inibitória sobre Quimotripsina também foi avaliada com a PHA-T2-4 de *P. azureus* na concentração de 500µM, o substrato utilizado foi GpNA. Neste ensaio observou-se que a PHA-T2-4 causou uma inibição 52% em relação ao controle positivo (Figura 19).

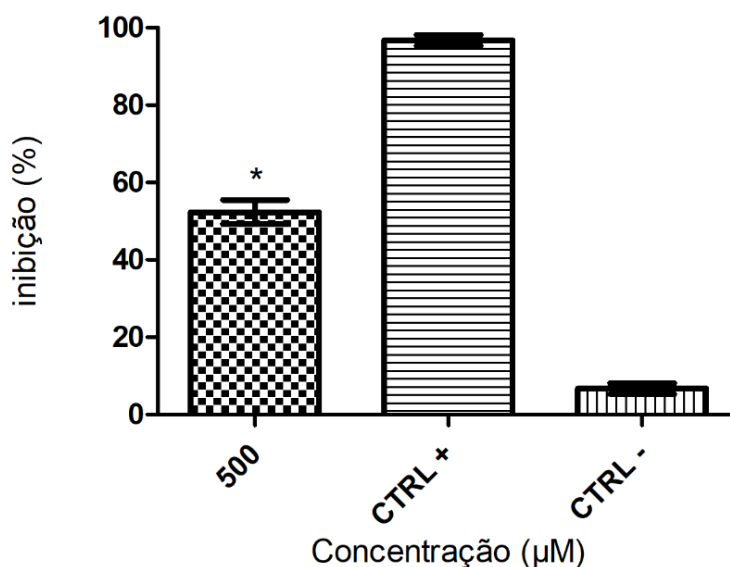


Figura 19. Atividade inibitória de tripsina da PHA-T2-4 (500 µM) da secreção cutânea de *P. azureus* sobre GpNA. O tampão de ensaio usado foi Tris-HCl, pH7,6 a 25°C por 30 minutos. O controle positivo contém enzima e substrato, e o controle negativo contém somente substrato. A leitura foi realizada a 405nm. Os resultados estão expressos pela média e seu respectivo desvio padrão. Significância pelo teste de Anova fator único seguido do teste de Tukey: * P<0,05.

5.6.3 Fosfolipase

A atividade fosfolipásica foi realizada com a PHA-T2-4 ressuspensa nas peçonhas brutas de *Crotalus d. collineatus*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararaca* contra a emulsão de fosfatidilcolina. De acordo com os resultados obtidos a PHA-T2-4 apresentou atividade fosfolipásica com um consumo de substrato equivalente a 14% referente a peçonha de *B. moojeni*, para *B. jararaca* apresentou atividade fosfolipásica com um consumo de substrato equivalente a 54%, e não houve inibição de fosfolipase para *Crotalus d. collineatus*, conforme figuras 20-22.

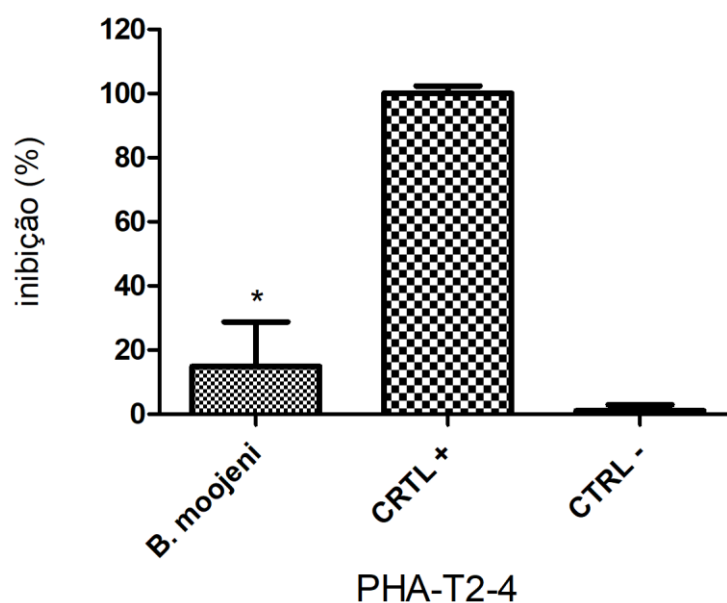


Figura 20. Atividade inibitória de fosfolipase a partir da incubação da PHA-T2-4 (5mM) com a peçonha de *B. moojeni* (5mg/mL) por uma hora. O controle positivo contém o substrato 100% ativo incubado apenas com água deionizada, e controle negativo contém o substrato consumido pelas enzimas de *B. moojeni*. Os resultados são expressos pela média e desvio padrão. Significância pelo teste de Anova fator único seguido do teste de Tukey: * $P < 0,05$.

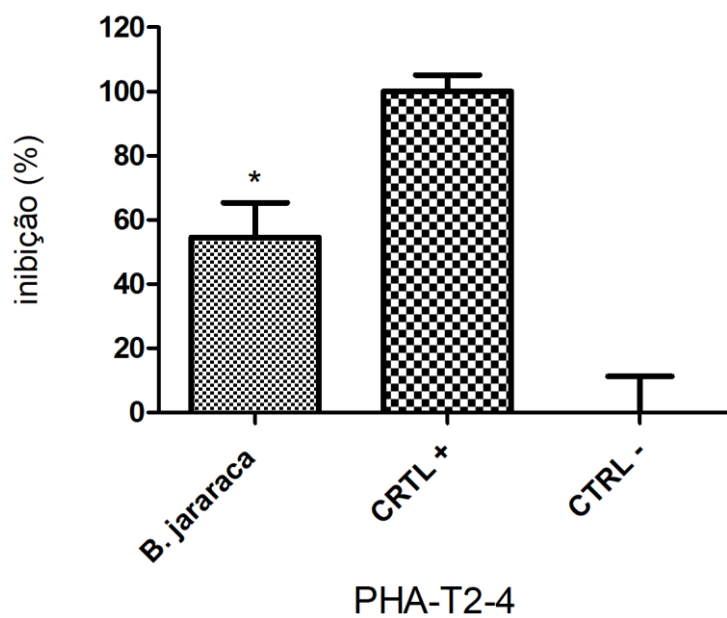


Figura 21. Atividade inibitória de fosfolipase a partir da incubação da PHA-T2-4 (5mM) com a peçonha de *B. jararaca* (5mg/mL) por uma hora. O controle positivo contém o substrato 100% ativo incubado apenas com água deionizada, e controle negativo contém o substrato consumido pelas enzimas de *B. jararaca*. Os resultados são expressos pela média e desvio padrão. Significância pelo teste de Anova fator único seguido do teste de Tukey: * $P < 0,05$.

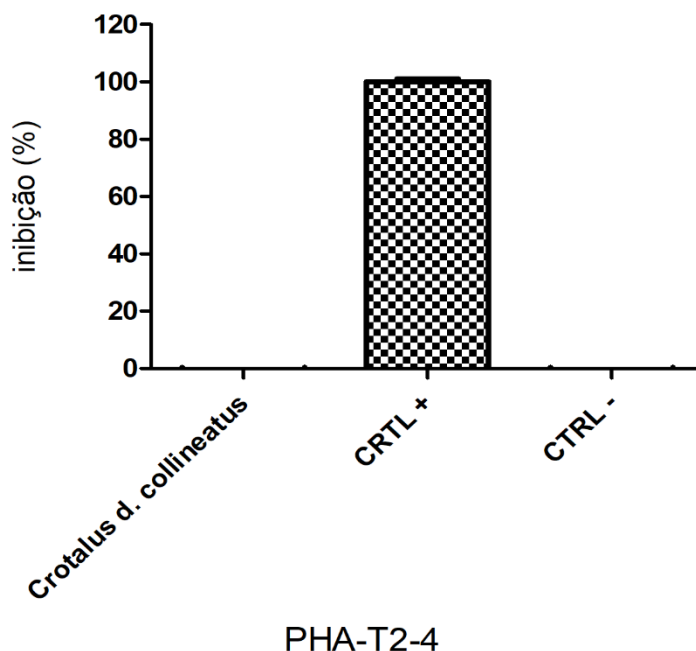


Figura 22. Atividade inibitória de fosfolipase a partir da incubação da PHA-T2-4 (5mM) com a peçonha de *Crotalus d. collineatus* (5mg/mL) por uma hora. O controle positivo contém o substrato 100% ativo incubado apenas com água deionizada, e controle negativo contém o substrato consumido pelas enzimas de *Crotalus d. collineatus*. Os resultados são expressos pela média e desvio padrão.

5.7 Ensaios antioxidantes

5.7.1 Avaliação da capacidade inibitória na produção de óxido nítrico em RAW 264.7

A atividade inibitória da PHA-T2-4 na produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) foi observada na concentração de 500 μ M em 24 horas, inibiu cerca de 5,6% a produção de óxido nítrico em relação ao controle positivo (Figura 23, letra B), e nas concentrações de 500 e 250 μ M em 48 horas, inibiu cerca de 58% e 52%, respectivamente, em relação ao controle positivo (Figura 23, letra D). Foi

observado que nos ensaios sem o tratamento com LPS não houve atividade inibitória, pois basicamente todas as concentrações se assemelham ao controle negativo em 24 e 48 horas (Figura 23 letras A e C)

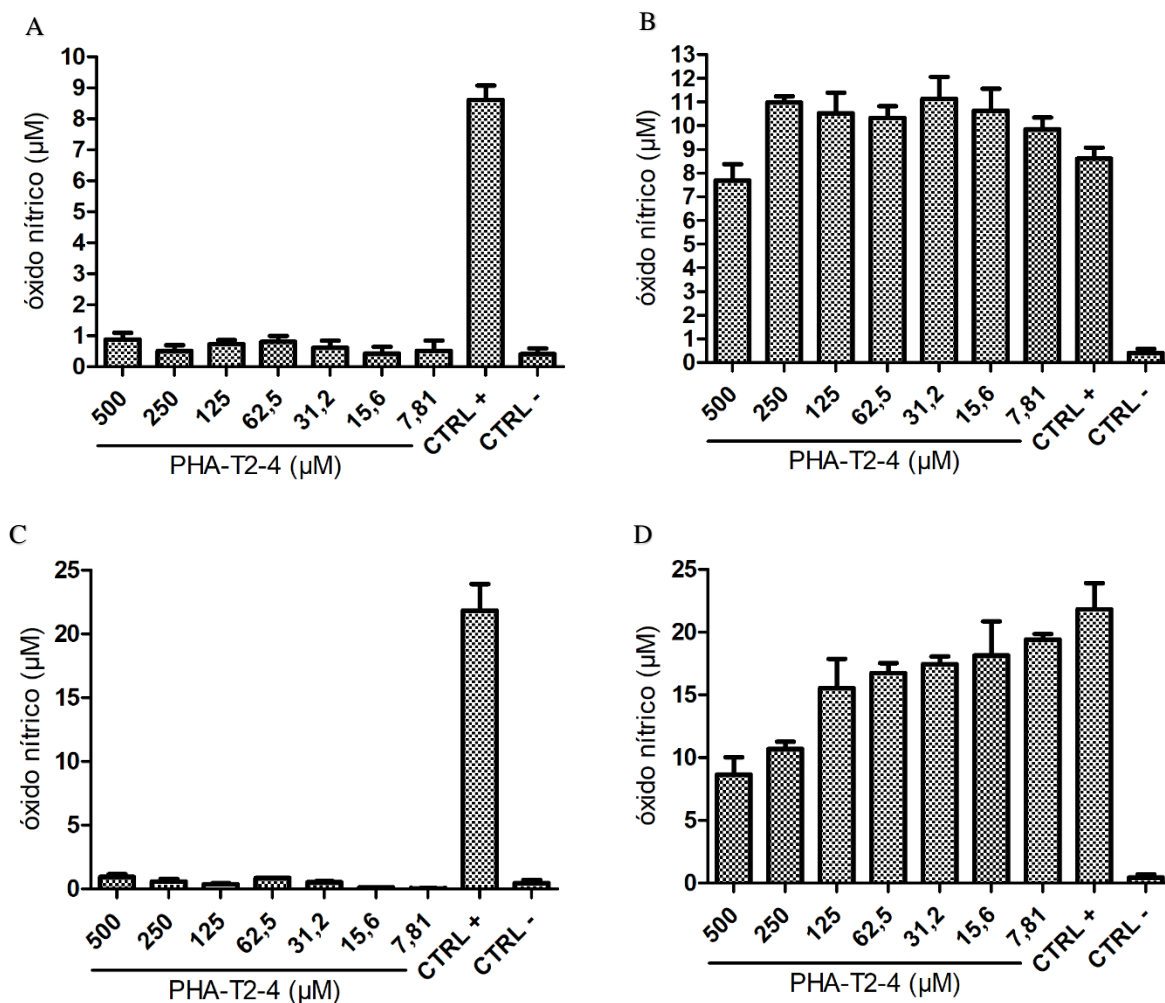


Figura 23. Avaliação da atividade inibitória da PHA-T2-4 na produção de NO por macrófagos RAW 264.7. (A) Macrófagos tratados com a triptofilina PHA-T2-4 em 24 horas; (B) Macrófagos tratados com a triptofilina PHA-T2-4 e estimulados por LPS em 24 horas; (C) Macrófagos tratados com a triptofilina PHA-T2-4 em 48 horas e (D) Macrófagos tratados com a triptofilina PHA-T2-4 e estimulados por LPS em 48 horas. Como controle negativo foram usados macrófagos não tratados e não estimulados e como controle positivo macrófagos estimulados 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS e não tratados com a triptofilina. As concentrações de nitrito foram calculadas usando uma curva de calibração padrão obtida a partir de nitrito de sódio.

5.7.2 Ensaio de redução de Ferricianato de potássio em Ferrocianeto de potássio

O ensaio antioxidante revela a atividade redutora da Triptofilina PHA-T2-4 de *P. azureus* na concentração de 500 μ M sobre $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ transformando-o em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, quando adicionou-se FeCl_3 a cor do ferricianato junto as amostras passou de amarelo para verde azulado indicando colorimetricamente que houve a redução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Pode-se observar na Figura 24 que após a leitura do material a 620nm e comparar a média das triplicatas ao controle positivo observou-se que a PHA-T2-4 conseguiu reduzir 80% do ferricinato.

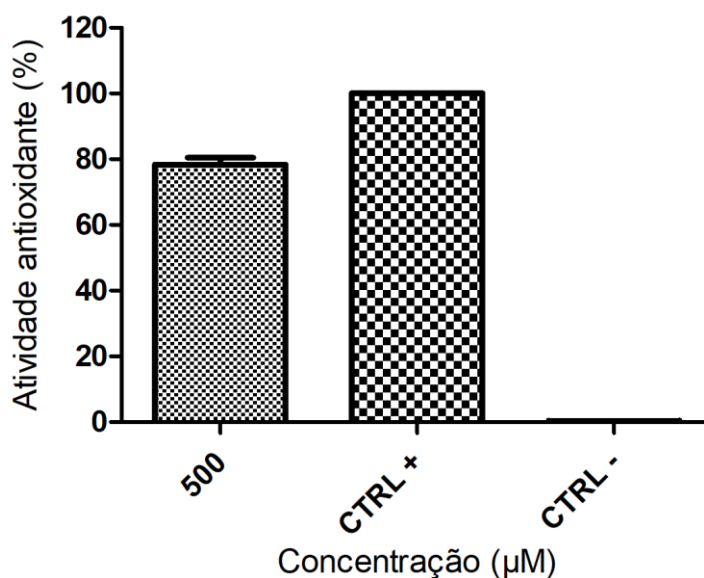


Figura 24. Atividade redutora da Triptofilina PHA-T2-4 de *P. azureus* na concentração de 500 μ M sobre $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. O controle positivo contém $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e ácido ascórbico, e o controle negativo contém $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e água deionizada. A leitura foi realizada a 620nm. Os resultados são expressos pela média e desvio padrão.

5.7.3 TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)

Este ensaio foi realizado para avaliar o potencial antioxidante da triptofilina PHA-T2-4 de *P. azureus* à 15,6 μ M sobre o trolox (15,6 μ M) (Figuras 25 e 26) e compara-los a curva de calibração do trolox $R^2 = 0,9972$.

Foi demonstrado que quanto maior a absorbância, menor será a oxidação, esse fato pode ser percebido olhando a diluição na placa, já que se trata de um teste colorimétrico pode-se notar o gradiente de cores formado pela descoloração da solução na presença de agentes antioxidantes.

A triptofilina PHA-T2-4 em sua maior concentração testada (15,6 μ M) tem uma maior ação antioxidante comparada as demais concentrações, sendo equivalente a 8,8 μ M de trolox (Tabela 5).

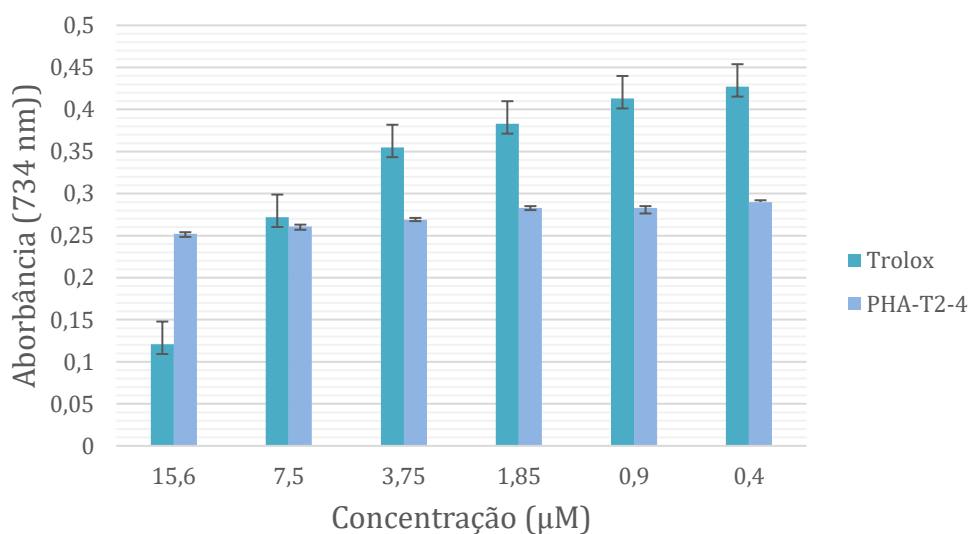


Figura 25. Gráfico de diluição (15,6 - 0,48 μ M) de trolox e triptofilina PHA-T2-4. A leitura foi realizada a 734nm. Os resultados são expressos pela média das triplicatas e sua concentração.

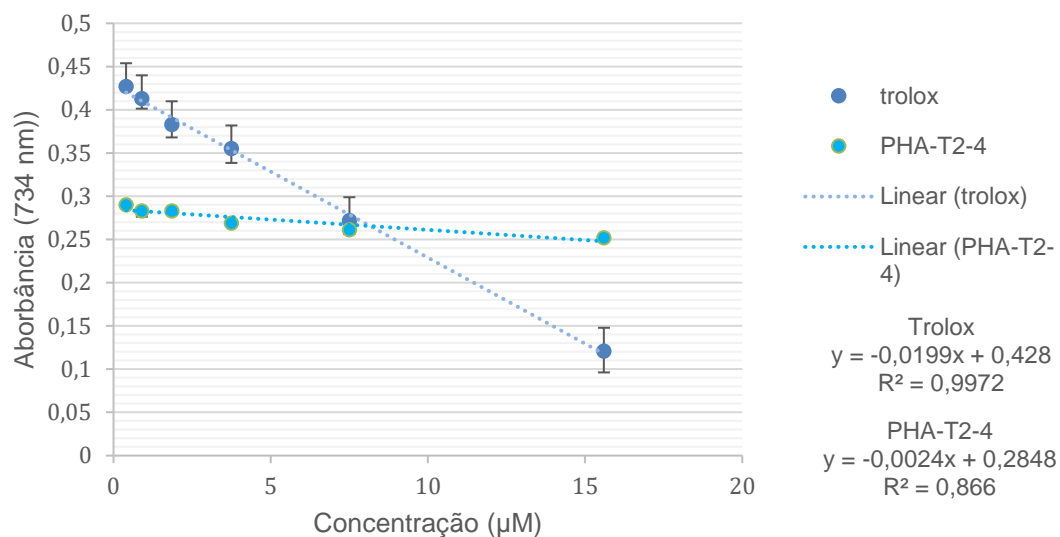


Figura 26. Gráfico de regressão linear para trolox e Triptofilina PHA-T2-4. Em azul representa-se a linha de calibração de trolox (15,6 μM) com 6 pontos calculados. Em laranja representa-se a média da absorbância da Triptofilina PHA-T2-4 (15,6 μM) em razão da concentração, com 6 pontos calculados. A leitura foi realizada a 734nm. Os resultados são expressos pelo R^2 .

Tabela 5. Tabela de equivalência a ação antioxidante de trolox.

Ação antioxidante (Trolox-eq/ μM)	
15,6 μM	$8,8 \pm 0,002$
7,5 μM	$8,3 \pm 0,003$
3,75 μM	$7,9 \pm 0,004$
1,85 μM	$7,2 \pm 0,001$
0,9 μM	$7,2 \pm 0,002$
0,4 μM	$6,9 \pm 0,006$

6. DISCUSSÃO

A pele e a secreção dos anfíbios são amplamente estudadas, devido a sua complexidade química e funcional. A pele dos anuros precisa sempre manter-se íntegra, para que tanto em ambiente aquático quanto terrestre não sofram lesões (XU *et al.*, 2015). Os habitats destes animais estão diretamente relacionados a lesões não biológicas do tipo reativas ao oxigênio que acarreta na produção de radicais ativos que estão presentes nos mesmos que podem vir a causar danos fisiológicos ao indivíduo (XU *et al.*, 2015).

Phitecopus azureus é um anfíbio que possui uma secreção rica em compostos químicos, todavia este em sua maioria isolados a partir de extrato aquoso (BARBOSA, 2014; BARBOSA *et al.*, 2021; Ge. L. *et al.*, 2014). Apesar disso, destacamos os trabalhos de MEBS, POGODA e TOENNES (2018); MONTECUCCH (1983) e CUNHA-FILHO *et al.*, (2005) que utilizaram o extrato metanoico dissolvidos em clorofórmio ou o extrato clorofórmico da pele de anuros e caracterizaram perfis de alcaloides em *Melanophryniscus klappenbachi* (Bufonidae), triptofilinas isolados de *Phyllomedusa rhodei* e bufadienolidos antimicrobianos em *Bufo rubescens*, respectivamente.

O presente estudo teve como base a caracterização dos principais compostos presentes no extrato clorofórmico da secreção bruta de *P. azureus* eluído em metanol, utilizando o fracionamento por RP-HPLC e espectrometria de massa. De forma interessante esta nova abordagem metodológica favorece a extração e isolamento de compostos hidrofóbicos com as massas de 676,6 Da., 658,2 Da, e 692,3 Da, posteriormente caracterizados como triptofilinas, e com o aprimoramento da metodologia

conseguimos de modo eficiente fracionar e purificar esses compostos em uma única etapa.

A sequência primária da triptofilina de massa 676 Da confirma sua identidade como a Triptofilina PHA-T2-4 (FPPWM), assim como a triptofilina de massa 691 Da PHA-T2-1 (FPPWF) ambas preditas por (Thompson *et al.*, 2007) e a triptofilina de massa 657 Da refere-se a Triptofilina -5.1 (FPPWL) descrita por (SILVA *et al.*, 2007).

Os testes relacionados as triptofilinas disponíveis na literatura estão mencionados na Tabela 3, onde nota-se que grande parte dos autores não realizaram testes antimicrobianos com triptofilinas, e os que realizaram encontraram baixas atividades, como por exemplo a Triptofilina-L 1.3 descrita no trabalho de Steinborner *et al.* (1994) contra *Micrococcus luteus* (50pg/mL) e *Streptococcus uperzs* (100pg/mL).

Ge. L. e colaboradores (2013) observaram atividades moderadas da triptofilina AcT-2 contra *Candida albicans* (143,94 μ M) e *Staphylococcus aureus* (287,88 μ M), e baixa atividade para *Escherichia coli* (575.76 μ M). A Triptofilina PHA-T2-4 não teve sua atividade antimicrobiana estudada em Thompson *et al.*, (2007). Todavia neste trabalho não se obteve atividade inibitória contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e nem contra o fungo testado, podemos relacionar a diferença na ação antimicrobiana dentre a triptofilina AcT-2 e a PHA-T2-4 aos seus respectivos tamanhos, pois triptofilinas maiores que 800 Da apresentam atividades inibitórias.

Em relação a viabilidade celular Wang *et al.* (2003) mostraram que a triptofilina AcT-3 possui efeitos anticâncer em três tipos de linhagens de câncer de próstata humana na concentração de 10 μ M. Wang *et al.* (2015) também relatam atividade antitumoral da triptofilina PsT-1 para as mesmas três linhagens celulares mencionadas no artigo do ano

de 2003. O trabalho de Barbosa *et al.* (2021) demonstrou que a PaT-2 não obteve atividade contra células de micróglia BV2 (1029 μM). No entanto, segundo os dados referidos na Tabela 3, até o presente momento, não haviam sido realizados testes de viabilidade celular para PHA-T2-4.

Neste estudo a PHA-T2-4 apresentou diminuição da viabilidade celular contra MCF-7 a partir da concentração de 3,90 μM tendo em média mais de 60% de redução na viabilidade em relação ao controle positivo e para RAW 264.7 não houve atividade citolítica. Este ensaio é colorimétrico caracterizado por um sal de cor amarela solúvel em água que sofre uma redução pela ação de enzimas. Contudo, no ensaio para MCF-7 obtivemos uma coloração arroxeada o que nos faz refletir sobre moléculas que tem outro tipo de reação além da reação enzimática.

Liu & Nair (2010) relatam que agentes com potencial antioxidante tendem a reduzir o MTT, tendo como produto da reação a molécula de formazan que é um sal de coloração arroxeada. Pode-se relacionar as características antioxidantes encontradas na PHA-T2-4 podemos relacionar a alteração na coloração a manutenção da viabilidade celular nas concentrações mais elevadas ao controle que foi feito com meio de cultura e a triptofilina isolada, visto a possibilidade da oxidação do MTT pela própria triptofilina e não pela atividade mitocondrial.

Sabe-se que os três grupos das triptofilinas é majoritariamente descrito por suas características miotrópicas e constritoras de musculatura lisa. Entretanto, apesar de testes deste tipo terem sido realizados não obtiveram atividade miotrópica para a triptofilina PHA-T2-4 de Thompson *et al.*, (2007), nem para a triptofilina L 1.3 de Steinborner *et al.*, (1994), e por essa razão não foram repetidos neste estudo.

Testes como o hemolítico também foram pouco explorados sendo que os únicos que o fizeram foram Ge. L. *et al.* (2014) que relataram atividade hemolítica para a triptofilina AcT-2 na concentração de 575,76 μM e Wang *et al.* (2013 e 2015) que realizaram o teste, mas não obtiveram atividade hemolítica relatada para as triptofilinas AcT-3 e PsT-1.

Apesar de não ter relatos na literatura de inibição enzimática de triptofilinas, a PHA-T2-4 (500 μM) estudada neste trabalho demonstrou uma taxa de inibição de 37% para tripsina e 52% para quimotripsina. Sendo que para fosfolipase obtivemos a inibição do consumo de substrato equivalente a 14% referente a peçonha de *B. moojeni*, e 54% para *B. jararaca*, não houve inibição de fosfolipase para *Crotalus d. collineatus*, mostrando que a PHA-T2-4 age por afinidade em relação as peçonhas. Estes dados sugerem uma nova atividade para este grupo de peptídeos, todavia esta atividade necessita ser melhor caracterizada, pois o papel das triptofilinas em relação a ação de inibição de proteases permanece pouco claro.

Sabe-se que os inibidores de protease se caracterizam por se ligarem às proteases impedindo a sua função, tornando-as inativas. Estes vem recebendo especial destaque por serem moléculas direcionadas contra as enzimas responsáveis pela virulência de vários agentes patogênicos, tornando-se uma alternativa como terapia para o tratamento de enfermidades como hipertensão, diabetes, trombose, osteoporose, câncer e doenças infecciosas, ou atuando como quimioterápicos, a partir do emprego de bloqueadores de aspartil-proteases no tratamento de indivíduos HIV positivos (ZUCCA, 2011).

Yan et al. (2012) revelam que o papel biológico dos inibidores de proteases na secreção cutânea de anfíbios ainda não é conciso. Entretanto, existem algumas hipóteses acerca dos inibidores de protease uma delas é que os IP's fazem parte do conjunto de moléculas que protegem os anfíbios de ataques de microrganismos, devido ao fato de algumas dessas moléculas apresentarem atividade antimicrobiana, hipótese descartada para a triptofilina PHA-T2-4 que não apresentou atividade antimicrobianas. Chen e Shaw. (2003) destacam outra hipótese, que os IP's protegem os peptídeos presentes na própria secreção cutânea do anfíbio contra a ação de endopeptidases de predadores, dificultando que ocorra a degradação de moléculas biologicamente ativas antes de que as mesmas consigam atingir seus alvos moleculares, e esta pode estar correlacionada as triptofilinas devido a ontogenia de *P. azureus* e sua expressão na mudança do ambiente aquático para o terrestre.

Recentemente, alguns estudos vêm sendo realizados relacionando as triptofilinas às atividades antioxidantes empregando diferentes metodologias, como exemplo:

O trabalho de Barbosa *et al.* (2021) nos mostra a primeira triptofilina de *P. azureus* com características antioxidantes a PaT-2 de sequência FPPWL e 658.38 Da., que diminuiu a produção constitutiva de espécies reativas a nitrogênio e oxigênio numa concentração de 100 µM em células de microglia BV2 não estimuladas. Além de inibir a ativação excessiva de receptores de glutamato no sistema nervoso (100 µM) e a produção de ROS pelas células da microglia humana.

O trabalho de Tran *et al.* (2021) descreve pela primeira vez triptofilinas-L de *Litoria rubella* de sequência FPWL e 543.66 Da, como portadoras de atividade antioxidante em ensaios para avaliar as atividades redutores de ferro em plasma (FRAP) numa

concentração de 150 μM Fe^{2+} /mM Triptofilinas-L e capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) de 0.80 e 0.87 μM Trolox/ μM Triptofilinas-L).

Apesar de serem triptofilinas diferentes em ambos os trabalhos, é perceptível que estas tendem a apresentar características antioxidantes distintas relacionadas à espécie. O que nos permite a reflexão da atuação desses peptídeos e qual a sua relação com a fisiologia desses animais.

Em comparação às antioxidinas do estudo de Barbosa *et al.* (2018), nota-se que a antioxidina-I e antioxidina-RP1 de *Physalaemus nattereri*, não apresentaram atividade inibitória relevante contra microorganismos e baixa citotoxicidade no teste de viabilidade com MTT causando 20% de inibição na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$. A antioxidina-I eliminou em menor quantidade em relação à antioxidina-RP1 os radicais livres de ABTS à $0.010 \pm 0.009\text{mg}$ trolox/mg antioxidina-I, e NO $0.019 \pm 0.004\text{mg}$ trolox/mg antioxidina-I, esses valores são mais robustos em outros tipos de antioxidinas que tenham resíduos Cys. A antioxidina-I no ensaio de cultura de células, foi capaz de minimizar ou evitar desequilíbrio redox em células desafiadas oxidativamente numa concentração de 100 μM . Ou seja, mesmo com valores menores em comparação a uma antioxidina e outra, levando em consideração do ensaio e de sua composição estrutural, ainda assim, ambas apresentam características antioxidantes satisfatórias.

Segundo Arnao, (2000) a maioria das metodologias antioxidantes emprega basicamente o mesmo princípio, onde um radical sintético é gerado e a capacidade de uma amostra para eliminar ou neutralizar o radical é monitorada através de um espectrofotômetro, sendo assim, há a possibilidade de comparar essas metodologias levando em consideração suas diferenças.

O Óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora que possui vários efeitos fisiológicos em diversos sistemas orgânicos, em concentrações ideais, como por exemplo a: proteção hospedeiro, inflamação e a supressão imunológica. Porém quando liberado em excesso pode causar danos há algumas moléculas fundamentais, como: proteínas, lipídios e ao DNA (ISLAM *et al.*, 2013; WINK e MITCHELL, 1988). A PHA-T2-4 em 24 horas na concentração de 500µM inibiu cerca de 5,6% e em 48 horas nas concentrações de 500 e 250µM, inibiu cerca de 58% e 52%, respectivamente, a produção de NO em células RAW 264.7 estimuladas por LPS em relação ao controle positivo, podendo ter feitos imunomoduladores.

Sendo que triptofilina PaT-2 de Barbosa *et al.* (2021) na concentração de 100 µM diminuiu em cerca de 62% a produção de ROS induzida por LPS em células de microglia humana HMC3. Esses resultados nos mostram que a capacidades oxidantes nas triptofilinas de *P. azureus* são significativas com mais de 50% de inibição de ROS e NO em relação aos controles com LPS e às concentrações testadas.

Segundo Islam *et al.* (2013) e Buapool *et al.* (2013) há três tipos de oxido nítrico-sintase (NOS): (i) óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS), (ii) óxido nítrico-sintase neuronal (nNOS) e (iii) óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), estes foram encontrados em células de mamíferos de acordo com propriedades físicas e bioquímicas, mostrando que, iNOS é superexpresso em vários tipos de células, incluindo macrófagos em resposta a moléculas imunomoduladoras, como LPS (CHEN *et al.*, 2003).

Analisando o princípio dos ensaios redutores de ferro, pode-se dizer que a PHA-T2-4 se apresentou como um potencial agente redutor de Ferricianato de potássio, pois em 500µM conseguiu reduzir eficientemente o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Tran *et al.*

(2021) realizaram o teste de FRAP e obtiveram atividade moderada na concentração de 150 μM de Fe^{2+} / mM de Tryptofilinas-L, o que nos mostra que a ação redutora de PHA-T2-4 é maior do que a das Tryptofilinas-L.

O ensaio TEAC consiste na ação do trolox que é um análogo de vitamina "E" que atua como antioxidante, revertendo a oxidação do radical ABTS. A PHA-T2-4 teve em sua maior concentração uma ação antioxidante equivalente ao trolox (15,6 μM) moderada (8,8 μM em 24 horas) em relação ao teste realizado por Tran *et al.*, (2021) com a triptofilinas-L na menor concentração testada de 1,76 μM para 2,50 μM de trolox em 6 minutos, ou seja, para *P. azureus* a maior concentração testada obteve maior capacidade antioxidante, e para *L. rubella* a menor concentração testada teve maior capacidade antioxidante. Sugerindo que a atividade antioxidante equivalente ao trolox é mais robusta em Tryptofilinas-L de *L. rubella* do que em PHA-T2-4 de *P. azureus*, levando em consideração o tempo de incubação dos ensaios e o valor equivalente ao trolox.

Nesse sentido, podemos sugerir que as triptofilinas de *L. rubella* atuam como um antioxidante fraco a moderada via mecanismo (SET) que ocorre através da transferência de um único elétron de uma fonte doadora de elétrons, como pode ser visto no teste FRAP, mas um antioxidante forte via outros mecanismos, como transferência de átomo de hidrogênio (HAT), como pode-se perceber no teste TEAC e em comparação com trolox (TRAN *et al.*, 2021).

Barbosa *et al.* (2021) demonstraram em seu estudo que o efeito da triptofilina PaT-2 (100 μM) de *P. azureus* diminuiu a produção constitutiva de ROS e RNS em células da microglia BV2, o que nos faz pensar sobre a possibilidade das triptofilinas de *P. azureus* atuarem de maneira inversa às de *L. rubella*, visto que a triptofilina PHA-T2-4 atua como

um bom antioxidante via mecanismo SET e tem ação moderada em relação aos mecanismos do tipo HAT.

Esse fato pode estar relacionado diretamente à ontogenia de *P. azureus*, pois como demonstrado no trabalho de Barbosa *et al.*, (2021) a triptofilina PaT-2 foi o primeiro peptídeo detectado na secreção desse anfíbio cuja expressão coincide com a maturação da pele e das glândulas, antecipando a transição do ambiente aquático para o terrestre, já que possui ação antioxidante.

Nos fazendo questionar sobre a possibilidade desse grupo de peptídeos exercerem funções significativas para a proteção da pele de *P. azureus* contra danos diversos e contra as lesões ocasionadas por ROS, considerando que, essa espécie vive em diferentes habitats com climas variados como na América do Sul (Brasil, Argentina, Bolívia e Paraguai) em pastagens inundadas sazonalmente ou habitats abertos em florestas tropicais secas. (CEI 1980; CARAMASCHI 2006; FROST 2007; PRADO *et al.* 2008).

É importante destacar que as triptofilinas PHA-T2-1 e Triptofilina 5.1 de (THOMPSON *et al.*, 2007) e (SILVA *et al.*, 2007) ainda não foram testadas em ensaios inibidores de protease. É possível que a PHA-T2-4 descrita neste trabalho seja a segunda triptofilina de *P. azureus* a apresentar características antioxidantes e o primeiro peptídeo do grupo das triptofilinas de anuro a apresentar características inibidoras de protease, o que é algo inédito, mas necessita ser melhor elucidado.

Contudo, é possível correlacionar as atividades encontradas neste estudo com as pressões ambientais sofridas por esses animais, já que uma das hipóteses relacionadas aos inibidores de protease refletirem na proteção de peptídeos presentes na própria

secreção cutânea do anfíbio contra a ação de endopeptidases de predadores, impedindo a degradação molecular, o que também é algo importante na passagem do habitat aquático para terrestre.

Isso nos sugere que as triptofilinas PHA-T2-4 atuam, assim como em *L. Rubella*, como antioxidantes, porém com atividade mais sutil, essa atividade tem o intuito de eliminar os radicais livres protegendo a pele desse anuro das oscilações ambientais provocadas pelas alterações climáticas de seu habitat ou em sua adaptação a novos habitats.

7. CONCLUSÕES

No presente trabalho identificamos a partir do fracionamento do extrato clorofórmico da secreção de *P. azureus* a subfrações Fr2.1 e Fr3.1 que foram identificadas como triptofilina PHA-T2-4 descrita por Thompson *et al.*, (2007) a partir de Espectrometria de massa e sequenciamento *de novo*. Esta triptofilina:

- Não apresentou atividade antimicrobiana contra *E.coli*, *S. aureus* e *C. albicans* nas concentrações testadas;
- Reduziu o MTT em MCF-7, sugerindo que não há ação citolítica, e sim, ação antioxidante;
- Reduziu óxido nítrico em células RAW 264.7 estimuladas por LPS e o Ferricianato de potássio em Ferrocianeto de potássio;
- Apresentou ação antioxidante equivalente ao Trolox, e
- Observa-se, pela primeira vez a atividade inibitórias de enzimas serinoproteases e fosfolipase, sendo que, há preferência por fosfolipase *Bothropica* em detrimento a *Crotalica*.

Estudos posteriores serão necessários para testar a atividade do peptídeo contra células cancerosas sem que ocorra interferência dos fatores antioxidantes ao MTT.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para o presente trabalho, destacamos:

- Realização de testes de inibição de elastase, que também é uma serinoprotease, para avaliar se há atividade inibidora;
- Repetição do ensaio de viabilidade celular com a linhagem MCF-7 utilizando outras metodologias, como por exemplo: o azul de tripan para corar as células;
- Realização de ensaios hemolíticos, para avaliar se há atividade;
- Realização de testes de inibição de enzimas e antioxidantes para as triptofilinas PHA-T2-1 e Triptofilina-5.1 descritas por (THOMPSON et al., 2007 e SILVA et al., 2007) encontradas utilizando a mesma metodologia da PHA-T2-4, para avaliar se esses peptídeos possuem atividades semelhantes as da triptofilina analisada neste trabalho.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-WAHAB, Y. H. A.; POWER, G. J.; FLATT, P. R.; WOODHAMS, D. C.; ROLLINS-SMITH, L. A.; CONLON, J. M. A peptide of the phylloseptin family from the skin of the frog *Hylomantis lemur* (Phyllomedusinae) with potent in vitro and in vivo insulin-releasing activity. **Peptides**, 29: 2136 – 2143, 2008.

ÁLVARES, G.F.R. Sinais acústicos e visuais em *Pithecopus azureus* (Amphibia, Phyllomedusidae), 2017.

ANASTASI, A., BERTACCINI, G., CEI, J. M., CARO, G., ERSPAMER, V., & IMPICCIATORE, M. (1969). Structure and pharmacological actions of phyllocaerulein, a caerulein-like nonapeptide: its occurrence in extracts of the skin of *Phyllomedusa sauvagei* and related *Phyllomedusa* species. **British Journal of Pharmacology**, 37(1), 198–206.

ANASTASI, A., & FALCONIERI ERSPAMER, G. Occurrence of phyllomedusin, a physalaemin-like decapeptide, in the skin of *Phyllomedusa bicolor*. **Experientia**, 26(8), 866–867. 1970.

Arnao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & technology**. 2000.

BARBOSA, Eder Alves. Estrutura gênica, indução, expressão e processamento de peptídeos bioativos isolados a partir da secreção cutânea de *Phyllomedusa azurea* e *Physalaemus nattereri*. 2014. 171 f., il. **Tese** (Doutorado em Biologia Molecular) — Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

BARBOSA EA, OLIVEIRA A, PLÁCIDO A, SOCODATO R, PORTUGAL CC, MAFUD AC, OMBREDANE AS, MOREIRA DC, VALE N, BESSA LJ, JOANITTI GA, ALVES C, GOMES P, DELERUE-MATOS C, MASCARENHAS YP, MARANI MM, RELVAS JB, PINTADO M, LEITE JRSA. Structure and function of a novel antioxidant peptide from the skin of tropical frogs. **Free Radic Biol Med**. 2018 Feb 1; 115:68-79. 2018.

BARBOSA E. A.; PLÁCIDO A.; MOREIRA D. C.; ALBUQUERQUE L.; DEMATEI A.; SILVA-CARVALHO A. É.; CABRAL W. F.; BÁO S. N.; SALDANHA-ARAÚJO F.; KUCKELHAUS S. A. S.; BORGES T. K.; PORTUGAL C. C.; SOCODATO r.; TEIXEIRA C.; LIMA F. C. D. A.; BATAGIN-NETO A.; SEBBEN A.; EATON P.; GOMES P.; BRAND G. D.; RELVAS J. B.; KATO M.J. e LEITE J. R. S.A. The peptide secreted at the water to land transition in a model amphibian has antioxidant effects. *Proc. R. Soc. B* 288: 2021.

BATISTA, C. V. F; ROSENDO DA SILVA, L. A; SEBBEN, A.; SCALONI, FERRARA, L.; PAIVA, G.R.; OLAMENDI–PORTUGAL, T.; POSSANI L.D.; BLOCH JR, C. Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. **Peptides**, 20: 679–686. 1999.

BRAND, G. D. et al. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta* - Anti-*Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49332-49340. 2002.

BRAND, G. D. et al. Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Peptides**, v. 27, n. 9, p.213, 2006.

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

BOMAN, H. G. Antibacterial Peptides: Key components needed in immunity, **Cell**, Vol. 65, 205-207, April 19, 1991.

BUAPOOL, D .; MONGKOL, N .; CHANTIMAL, J .; ROYTRAKUL, S .; SRISOOK, E .; SRISOOK, K. Mecanismo molecular da atividade antiinflamatória de folhas de *Pluchea indica* em macrófagos RAW 264.7 e sua ação em modelos animais de inflamação. J. **Ethnopharmacol**, 146, 495–504. 2013.

CALDERON, L. A. et al. Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. **Amino Acids**, 40: 29-49. 2011.

CARAMASCHI, U. Redefinição do grupo de *Phyllomedusa hypochondrialis*, com redescritção de *P. megacephala* (Miranda-Ribeiro, 1926), revalidação de *P. azurea* Cope, 1862 e descrição de uma nova espécie (Amphibia, Anura, Hylidae). **Arquivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro 62: 159 – 179, 2006.

CARAMASCHI, U. & CRUZ, C.A.G. *Phyllomedusa*: posição taxonômica, hábitos e biologia (Amphibia, Anura, Hylidae). **Phyllomedusa**, Belo Horizonte, 1(1):5-10, 2002.

Cei, J.M. " Amphibians of Argentina." *Monitore Zoologica Italiano*, **New Series Monografia, Firenze**, 2, 1-609. 1980.

CHEN, YH; LAYNE, MD; CHUNG, SW; EJIMA, K.; BARON, RM; AINDA, SF; PERRELLA, MA Elk-3 é um repressor da transcrição da óxido nítrico sintase 2. **J. Biol. Chem.** 2003

CHEN, T.; SHAW, C. Identification and molecular cloning of novel trypsin inhibitor analogs from the dermal venom of the Oriental fire-bellied toad (*Bombina orientalis*) and the European yellowbellied toad (*Bombina variegata*). **Peptides**, v. 24, n. 6, p. 873-80, Jun 2003.

CHEN, T. et al. *Pachymedusa dacnicolor* tryptophyllin-1: structural characterization, pharmacological activity and cloning of precursor cDNA. **Peptides**, v. 117, n. 1, p.25- 32. 2004.

CONCEIÇÃO K.; KONNO K.; MELO R.B; ANTONIAZZI M.M.; JARED C.; SCIANI J. M.; CONCEIÇÃO I.M.; PREZOTO B.C.; CAMARGO A.C.M; PIMENTA D.C. Isolation and characterization of a novel bradykinin potentiating peptide (BPP) from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*., 28(3), 0–523. 2007.

CONCEICAO K., KLITZKE C.F., BRITO R.C., ANDRADE D.F., JUNCA F.A., BIONDI I., LOPES-FERREIRA M."Identification of peptides from *Phyllomedusa burmesteri* skin secretomics by nano LC MS/MS". 2009.

CONLON, J. M.; JOUENNE, T.; COSETTE, P.; COSQUER, D.; VAUDRY, H.; TAYLOR, C. K.; ABEL, P. W. Bradykinin-related peptides and tryptophyllins in the skin secretions of the most primitive extant frog, *Ascaphus truei*. **Gen Comp Endocrinol** [S.I.], v. 143, n. 2, p. 193-9, 2005b.

CUNHA FILHO G.A; SCHWARTZ C. A.; RESCK I. S.; MURTA M. M.; LEMOS S. S.; CASTRO M. S.; KYAW C; PIRES JR. O. R.; LEITE J.R.S; BLOCH JR. C.; SCHWARTZ E. F. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*.2005.

DELFINO, G.; BRIZZI, R.; ALVAREZ, B. B.; KRACKE-BERNDORFF, R. Serous cutaneous glands in *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae): secretory patterns during ontogenesis. **Tissue & Cell**, Tokyo. v. 30 n.1 p.30-40. Aug. 1998.

DUELLMAN, W.E., TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. McGraw-Hill, New York, 1986.

DUELLMAN, W. E., & TRUEB, L. **Biology of amphibians**. JHU press, 1994.

ERLANGER, B.F., KOKOWSKY, N., COHEN W., The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin, **Arch. Biochem. Biophys.** 95 (1961) 271–278. 1961.

ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P. Active polypeptides of amphibian skin and their synthetic analogues. **Pure and applied Chemistry**, 35: 463-494, 1973.

ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P. Active polypeptides: from amphibian skin to gastrointestinal tract and brain of mammals. **Trends Pharmacology Sciences**, 1: 391 – 395. 1980.

ERSPAMER, V. Bioactive Secretions of the Amphibian Integument *Amphibian Biology. The Integument*, vol. 1. **Ed Surray Beatty and Sous**, Chipping Norton, Australia, pp. 179-314. 1994.

EVARISTO G.P.C., Mass Spectrometry Approaches for the Discovery and Full Primary Structure Analysis of Peptides Secreted by the Amphibian Skin, 2012.

FEDER, R.; NEHUSHTAI, R.; MOR, A. Affinity driven molecular transfer from erythrocyte membrane to target cells. **Peptides**, 22: 1683-1690. 2001.

FROST, D.R. 2008. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Disponível em: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/Amphibia/Anura/Phyllomedusidae/Pithecopus/Pithecopus-azureus1> HYPERLINK
["http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/Amphibia/Anura/Phyllomedusidae/Pithecopus/Pithecopus-azureus1%26gt"&](http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/Amphibia/Anura/Phyllomedusidae/Pithecopus/Pithecopus-azureus1%26gt) HYPERLINK
["http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/Amphibia/Anura/Phyllomedusidae/Pithecopus/Pithecopus-azureus1%26gt"](http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/Amphibia/Anura/Phyllomedusidae/Pithecopus/Pithecopus-azureus1%26gt)gt;. Acesso em: 12 nov. 2020.

FROST, D.R. 2021. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org>. Acesso em: 24 nov.2021.

GE, LILIN; LYU, PENG; ZHOU, MEI; ZHANG, HUILING; WAN, YUANTAI; LI, BIN; LI, RENJIE; WANG, LEI; CHEN, TIANBAO; SHAW, CHRIS (2014). AcT-2: A Novel Myotropic and Antimicrobial Type 2 Tryptophyllin from the Skin Secretion of the Central American Red-Eyed Leaf Frog, *Agalychnis callidryas*. **The Scientific World Journal**, 2014.

GREEN, L. C.; LUZURIAGA, K. R.; WAGNER, D. A.; RAND, W.; ISTFAN, N.; YOUNG, V.R.; TANNENBAUM, S. R. Nitrate biosynthesis in man. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 78, No. 12. p. 7764-7768, 1981.

HANCOCK, R. E. W. & CHAPPLE, D. S. Peptides Antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43: 1317–1323. 1999.

HILDEBRAND, M.; GOSLOW, G. Análise da estrutura dos vertebrados. Tradução Ana Maria de Souza, Érica Schlenz. 2. ed. São Paulo: **Atheneu Editora**. 2006.

HOSKIN, D.W. AND RAMAMOORTHY, A. Studies on Anticancer Activities of Antimicrobial Peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, 1778, 357-375. 2008.

ISLAM, MN; ISHITA, IJ; JIN, SE; CHOI, RJ; LEE, CM; KIM, YS; JUNG, HA; CHOI, JS
Atividade antiinflamatória da alga marrom comestível *Saccharina japonica* e seus constituintes feoforbídeo e feofitina a em células de macrófago RAW 264.7 estimuladas por LPS. *Food Chem. Toxicol.* 55, 541–548.2013.

LEITE, J. et al. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. **Peptides**, 26:565–573. 2005.

LIU, C., HONG, J., YANG, H., WU, J., MA, D., LI, D., LAI, R. Frog skins keep redox homeostasis by antioxidant peptides with rapid radical scavenging ability. **Free Radical Biology and medicine**, 48(9), 1173 1181. 2010.

LIU, Y.B. AND NAIR, M.G. An Efficient and Economical MTT Assay for Determining the Antioxidant Activity of Plant Natural Product Extracts and Pure Compounds. **Journal of Natural Products**, 73, 1193-1195. 2010.

MAGALHÃES, Ana Carolina Martins. Caracterização química de inibidores de serino proteases isoladas a partir da secreção cutânea de *Pithecopus* (*Phyllomedusa*) *azureus* (Amphibia, Anura, Phyllomedusidae). 2016. 61 f., il. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Animal) —Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

MANDEL, S. M. S. Prospecção de peptídeos antimicrobianos da secreção cutânea de anfíbios do gênero *Phyllomedusa*. 82f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade de Brasília – UnB, Brasília, 2008.

MEBS, DIETRICH; POGODA, WERNER; TOENNES, STEFAN W. Loss of skin alkaloids in poison toads, *Melanophryniscus klappenbachi* (Anura: Bufonidae) when fed alkaloid-free diet. **Toxicon**, 150, 267–269. 2018.

MIGNOGNA G, SEVERINI C, SIMMACO M, et al. Identification and characterization of two dermorphins from skin extracts of the Amazonian frog *Phyllomedusa bicolor*. **FEBS Lett.** 1992; 302(2):151-154. 1992.

MIGNOGNA, G.; PASCARELLA, S.; WECHSELBERGER, C.; HINTERLEITNER, C.; MOLLAY, C.; AMICONI, G.; BARRA, D.; KREIL, G. BSTI, a trypsin inhibitor from skin

secretions of *Bombina bombina* related to protease inhibitors of nematodes. **Protein sci**, 5, 357–362, 1996.

MONTECUCCHI, P. C.; GOZZINI, L.; ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P. Primary structure of tryptophan-containing peptides from skin extracts of *Phyllomedusa rhodei*. **Int J Pept Protein Res**, 23: 276-281. 1984.

MONTECUCCHI P.C., GOZZINI L., ERSPAMER V."Primary structure determination of a tryptophan-containing tridecapeptide from *Phyllomedusa rohdei*." **Int. J. Pept. Protein Res.** 27:175-182. 1986.

MOR A, N.V.H.; DELFOUR, A.; MIGLIORE-SAMOUR, D.; NICOLAS, P. Isolation, aminoacide sequence and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. **Biochemistry**. 30: 8824-8830. 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**; v. 65, n. 1, p. 55-63. 1983.

MURPHY, J. B., KIES, M. W. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. **Biochim. Biophys. Acta**, 45, 382-384. 1960.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. **NCCLS document M7-A6** [ISBN 1-

56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. 2003.

NEIVA M, VARGAS DC, CONCEIÇÃO K, et al. Gene expression analysis by ESTs sequencing of the Brazilian frog *Phyllomedusa nordestina* skin glands. **Toxicon**. 2013; 61:139-150. 2012.

PIERRE, T. N.; SEON, A. A.; AMICHE, M.; NICOLAS, P. Phylloxin, a novel peptide antibiotic of the dermaseptin family of antimicrobial/opioid peptide precursors. **Eur J Biochem**, 267:370–8. 2000.

PRAADO, VHM, BORGES, RE, SILVA, FR, TOGNOLO, TT E ROSSA-FERES, DC. " Amphibia, Anura, Hylidae, *Phyllomedusa azurea* - Extensão da distribuição. " **Check List** , 4, 55-56. 2008.

POPOV, Cláudia. Caracterização estrutural e funcional de peptídeos isolados da derme de *Hypsiboas raniceps* (Anura). 2017. 154f. (Doutorado) em Ciências Genômicas e Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brasil. 2017

POPOV, Cláudia. Expressão de peptídeos bioativos na derme de *phyllomedusa distincta* em dois estágios de desenvolvimento, 2013. Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brasil. 2013.

POWERS, J. P. & HANCOCK, R. E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, 24: 1681–1691, 2003.

RATES, B. et al. Peptidomic dissection of the skin secretion of *Phasmahyla jandaia* (Bokermann and Sazima, 1978) (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae). **Toxicon**, v. 57, n. 1, p.35-52. 2011.

ROLLINS-SMITH, L.A.; DOERSAM, J.K.; LONGCORE, J.E.; TAYLOR, S.K.; SHAMBLIN, J.C.; CAREY, C.; ZASLOFF, M.A. Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines. **Developmental & Comparative Immunology**, 26:63-72. 2002.

SBH,2020 – Sociedade Brasileira de herpetologia
<https://www.sbherpetologia.org.br/listas/anfibios>

SEBBEN, A.; SCHWARTZ, C. A.; CRUZ, J. S. A defesa química dos anfíbios. **Ciência hoje**, 15: 25-33. 1993.

SILVA L.P., BRAND G.D., BLOCH C. Jr."High-throughput imaging co-localization of peptides and proteins." **Nat. Chem. Biol.** 0:0-0. 2007.

SILVA L.P., BONATTO C.C., BLOCH C. Jr. Submitted to UniProtKB. 2008.

STEINBORNER, S. T.; WABNITZ, P. A.; WAUGH, R. J.; BOWIE, J. H.; GAO, C. W, TYLER, M. J.; WALLACE, J. C. The structures of new peptides from the Australian red tree frog „*Litoria rubella*”. The skin peptide profile as a probe for the study of evolutionary trends of amphibians. **Aust J Chem.** 49:955–63. 1996.

STEINBORNER, S.T., GAO, C., RAFTERY, M.J., WAUGH. R.J, BLUMENTHAL, T., BOWIE, J.H., WALLACE. J.C ABD TYLER, M.J The structures of four tryptophyllin and three rubellidin peptides from the Australian Red Tree Frog *Litoria rubella*. **Aust. J. Chem.**, 47-2099-2108. 1994.

THOMPSON, A. H. et al. Amphibian skin secretomics: application of parallel quadrupole time-of-flight mass spectrometry and peptide precursor cDNA cloning to rapidly characterize the skin secretory peptidome of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*: discovery of a novel peptide family, the hyposins. **J Proteome Res**, v. 6, n. 9, p. 3604-13. 2007.

THOMPSON, A. H. et al. Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*: mass spectrometric structural characterisation and cloning of precursor cDNAs. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 24, p. 3780-3788. 2006.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. REVIEW Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Camp. Biochem. Physiol.** Vol. IIIA, No. I, pp. 1 – 29. 1995.

TRAN, T. T. N., TRAN, D. P., NGUYEN, V. C., TRAN, T. D. T., BUI, T. T. T., & BOWIE, J. H. *Antioxidant activities of major tryptophyllin L peptides: A joint investigation of Gaussian-based 3D-QSAR and radical scavenging experiments. Journal of Peptide Science, 27(4).* 2021.

WANG L., LU S., WANG L., XIN M., XU Y., WANG G., CHEN D., CHEN L., LIU S., ZHAO F. Anti-inflammatory effects of three withanolides isolated from *Physalis angulata* L. in LPS-activated RAW 264.7 cells through blocking NF- κ B signaling pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, Volume 276, 2021.

WANG, R; ZHOU, Y; CHEN, T; ZHOU, M; WANG, L; SHAW, C. Identification and Functional Analysis of a Novel Tryptophyllin Peptide from the Skin of the Red-eye Leaf Frog, *Agalychnis callidryas*. **International Journal of Biological Sciences**, 11(2), 209–219. 2015.

WANG, R; CHEN, T; ZHOU, M; WANG, L; SHAW, C. PsT-1: A new tryptophyllin peptide from the skin secretion of Waxy Monkey Leaf Frog, *Phyllomedusa sauvagei*. **Regulatory Peptides**, 184, 14–21. 2013.

WANG, R., ZHOU, Y., CHEN, T., ZHOU, M., WANG, L., & SHAW, C. Identification and Functional Analysis of a Novel Tryptophyllin Peptide from the Skin of the Red-eye Leaf Frog, *Agalychnis callidryas*. **International Journal of Biological Sciences**, 11(2), 209–219. 2015.

WANG L.; ZHOU M.; CHEN T.; WALKER B.; SHAW C. PdT-2: A novel myotropic Type-2 tryptophyllin from the skin secretion of the Mexican giant leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. 30(8), 0–1561. 2009.

WINK, D. A. MITCHELL, J. B. Chemical biology of nitric oxide - From physiology to diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, 25, 432-456 85 86. 1988.

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

YAN, X. W. et al. Bi-functional peptides with both trypsin-inhibitory and antimicrobial activities are frequent defensive molecules in Ranidae amphibian skins. **Amino Acids**, v. 43, n. 1, p. 309- 316. ISSN 0939-4451. 2012.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, 55: 27–55. 2003.

ZASLOFF, M. Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, 4:3-7. 1992.

ZASLOFF, M. Mysteries that still remain. **Biochimica et Biophysica Acta**, pp.1693- 1694, 2009

ZASLOFF M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**. 24;415(6870):389-95. 2002.

ZUCCA M, SAVOIA D. Current developments in the therapy of protozoan infections. *Open Med Chem J.*; 5: 4-1 Smith HV, Cáccio SM, Tait A, McLauchlin J, Thompson RC. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trens Parasitol**. 2006; 22: 160-7.2011.