

Universidade Regional do Cariri – URCA
Pró – Reitoria de Pós Graduação e Pesquisa – PRPGP
Programa de Mestrado em Bioprospecção Molecular
Departamento de Química Biológica

INVESTIGAÇÃO ANTIBACTERIANA DE
EXTRATOS E FRAÇÕES DA PELE DE *Rhinella*
jimi (STEVAUX, 2002) (ANURA: BUFONIDAE)

Samuel Vieira Brito

Crato-CE
Julho de 2009

Universidade Regional do Cariri – URCA
Pró – Reitoria de Pós Graduação e Pesquisa – PRPGP
Programa de Mestrado em Bioprospecção Molecular
Departamento de Química Biológica

INVESTIGAÇÃO ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS E
FRAÇÕES DA PELE DE *Rhinella jimi* (STEVAUX, 2002)
(ANURA: BUFONIDAE)

Orientando: Samuel Vieira Brito
Orientador: Prof. Dr Waltécio de Oliveira Almeida

Dissertação apresentada ao
Programa de Mestrado em
Bioprospecção Molecular como
parte dos requisitos necessários
para a obtenção do título de
Mestre

Crato-CE
Julho de 2009

Brito, Samuel Vieira.
B862i Investigação antibacteriana de extratos e frações da pele de *Rhinella jimi*
(Stevaux, 2002) (anura: Bufonidae)/ Samuel Vieira Brito. – Crato-CE, 2009.

44p.; il.

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Mestrado em
Bioprospeção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA

Orientador: Prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida.

1. Compostos da pele de anfíbios.
2. *Rhinella jimi*.
3. Atividade fototóxica.
4. Efeito protetor

I. Título.

CDD: 597.8

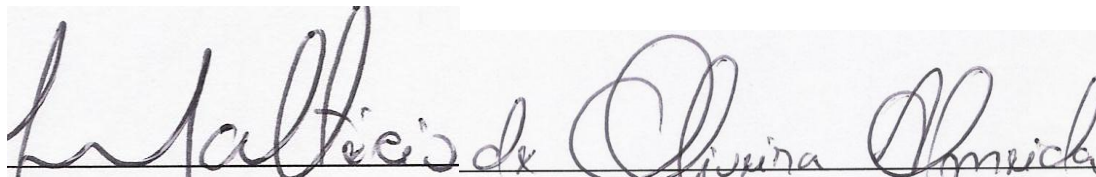
SAMUEL VIEIRA BRITO

INVESTIGAÇÃO ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS E FRAÇÕES DA PELE DE
Rhinella jimi (Stevaux,2002) (Anura: Bufonidae)

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri - URCA, como requisito necessário para a obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Linha de Pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Aprovada em: 17/07/2009

Banca examinadora



Prof. Dr Waltécio de Oliveira Almeida (Orientador)
Universidade Regional do Cariri-URCA



Prof. Dr Henrique Douglas Melo Coutinho (Co-orientador)
Universidade Regional do Cariri-URCA



Prof. Dr Alexandre Vasconcellos (Avaliador)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN

*Dedico ao meu pai José Vieira
de Melo (In memorium)*

Agradecimentos

Ao meu orientador o Prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida, por todo apoio dado na realização desse trabalho e pelas valorosas críticas e sugestões que em muito contribuíram para a melhoria de qualidade do trabalho;

Ao meu co-orientador o Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho por todo apoio, parceria pelas valorosas sugestões e também pelo marcado otimismo e bom humor mesmo nos momentos mais difíceis;

Ao Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa que abriu as portas do seu laboratório possibilitando o desenvolvimento desse trabalho e por toda sua dedicação e luta frente a coordenação do Mestrado em Bioprospecção Molecular;

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap) pela bolsa concedida;

A todos os meus professores do Mestrado em Bioprospecção molecular pelo aprendizado nas disciplinas e pelo companheirismo durante esses últimos dois anos;

Ao meu grande amigo e companheiro de longas datas e das horas difíceis Felipe Ferreira, que em muito contribuiu com suas críticas, sugestões e apoio, sempre regadas com café ou cerveja, além do bom humor e das piadas que se escritas dariam uma enciclopédia;

Ao meu grande amigo e colega de mestrado Prof. Francisco de Assis Bezerra da Cunha (Vulgo *Minha jóia*), pela parceria e apoio, além do bom humor, onde certos episódios serão lembrados por longas datas, quem de nos esquecerá as histórias de Beбето, a reunião do PT, a carta de São Paulo apóstolo aos coríntios entre outras que se eu fosse comentar seria uma dissertação a parte;

Ao meu grande amigo Samuel Cardozo vulgarmente conhecido pelos bizarros apelidos (Goiaba ou Monstro) pela grande contribuição na busca pela literatura sobre anfíbios que em muito contribuiu na qualidade desse trabalho, além do auxílio na coleta de *Rhinella*;

Aos meus colegas de mestrado pelo companheirismo durante os últimos dois anos;

A toda equipe do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) pela valorosa ajuda durante a execução dos testes microbiológicos que fundamentam esse trabalho;

A Dra. Alana Kellen e ao meu companheiro de mestrado Erlânio pela ajuda nos desenhos das estruturas dos compostos que fazem parte do texto desse manuscrito;

A toda a minha família por todo apoio, compreensão e carinho.

Resumo

A pele dos anfíbios contém uma numerosa quantidade de substâncias como aminas biogênicas, alcalóides, esteróides cardiotônicos e peptídeos. Essas substâncias possuem uma larga variedade de propriedades farmacológicas e funcionam como uma defesa química contra predadores e microorganismos patogênicos. Vários pesquisadores têm observado que os declínios das comunidades de anfíbios estão relacionados a fatores como doenças infecciosas, perda de habitats, radiação UV, introdução de espécies exóticas e poluição. Embora muitas publicações nos últimos anos mostrem as propriedades farmacológicas de compostos de anfíbios, não tem sido demonstradas evidências de atividade fototóxica ou efeito protetor dos produtos naturais da pele de anfíbios, o presente trabalho registra o primeiro evidência dessas atividades entre os compostos obtidos de *Rhinella jimi*. As linhagens bacterianas utilizadas foram *Escherichia coli* (ATCC10536), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) e linhagens multirregistentes *Escherichia coli* (EC27) e *Staphylococcus aureus* 358 (SA358). Todas as linhagens foram mantidas em Heart Infusion Agar (HIA, Difco Laboratories Ltd). Peles de 37 espécimes de *R. jimi* foram removidas, esses espécimes foram coletados nos municípios de Caririçu (07°02'S x 39°17'W), Crato (07°14'S x 39°24'W), Mauriti (07°23'S x 38°46'W), e Várzea Alegre (06°47'S x 39°17'W) no estado do Ceará, assim como no município de Exú (07°30'S x 39°43'W) no estado do Pernambuco, todas essas localidades estão incluídas no bioma *Caatinga*, vegetação típica da região Nordeste do Brasil. O extrato metanólico (EM) foi obtido através de extração com metanol em temperatura ambiente, usando 295g de peles secas por 96 horas, apresentando um rendimento de 5,5%. Os extratos foram submetidos à coluna cromatográfica com gel Sephadex LH 20 e o eluente utilizado foi metanol. Após análises de diferentes frações por cromatografia de camada delgada usando o reagente de Dragendorff's, as frações foram separadas baseadas em seus perfis cromatográficos e fatores de retenção (R_f), as frações obtidas foram analisadas por espectro na região do infravermelho (IV), após separação cromatográfica cinco diferentes frações foram obtidas, extrato metanólico (EM), fração clorofórmica do extrato metanólico (FCEM), fração metanólica do extrato metanólico (FMEM), solução aquosa alcaloídica (SAA) e uma solução se acetato não alcaloídica (SANA). A exposição à luz UV-A demonstrou atividade fototóxica contra *E. coli* em três extratos (FMEM, FCEM e SNA). Em relação a atividade modificadora da ação antibiótica, foi observada com FMEM e canamicina na linhagem EC27, com a linhagem SA358 todos os produtos naturais demonstraram antagonismo quando associados a gentamicina. Os resultados mostraram que *R. jimi* não produz compostos com atividade antibacteriana, talvez as bactérias possuam um papel essencial na epiderme de *R. jimi* devido a isso os compostos de sua pele protegem essas comunidades bacterianas, que em contrapartida pode ser importantes protegendo os anfíbios contra o ataque de patógenos.

Palavras chave: *Rhinella jimi*, compostos da pele de anfíbios, atividade fototóxica, Efeito protetor.

Abstract

Amphibian skins contain numerous substances such as biogenic amines, steroids, lipophilic alkaloids and peptides. These substances have a wide variety of pharmacological properties and constitute chemical defenses against predators and pathogenic microorganisms. Several researchers have observed that the communities of amphibian declines are related to factors such as infectious diseases, habitat loss, UV radiation, introduction of exotic species and pollution. Although numerous publications have appeared in recent decades none have demonstrated evidence of any phototoxic or protective effects of natural products from the skin of amphibians, the present report the first evidence of such activity among the compounds obtained from *Rhinella jimi*. The bacterial strains used were *Escherichia coli* (ATCC10536), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) and multiresistant strains *Escherichia coli* (EC27) and of *Staphylococcus aureus* 358 (SA358). All strains were maintained on heart infusion agar slants (HIA, Difco Laboratories Ltd.), and were grown overnight at 37°C in brain heart infusion medium just prior to the assays (BHI, Difco Laboratories Ltd.). The skins were removed from 37 specimens of *R. jimi*. These specimens were collected in the municipalities of Caririaçu (07°02'S x 39°17'W), Crato (07°14'S x 39°24'W), Mauriti (07°23'S x 38°46'W), and Várzea Alegre (06°47'S x 39°17'W) in Ceará State, as well as from the municipality of Exú (07°30'S x 39°43'W) in Pernambuco State, Brazil. All these sites are included within the *Caatinga* biome, a dryland vegetation typical of northeastern Brazil. The methanol extract (ME) was obtained by methanol extraction at room temperature using 295 g of dry skins for 96 hours, with a total yield of 5.5%. The extracts were submitted to column chromatography using Sephadex LH20 that was packed and washed with methanol. After analyses of the different column fractions by thin-layer chromatography using Dragendorff's reagent, the fractions were pooled based on their chromatographic profiles and their respective retention factor values (R_f). The obtained fractions were then analyzed by infrared region (IV). After chromatographic separation of the *R. jimi* skin extract, five different fractions were prepared: a methanol extract (ME), a Methanol extract chloroform fraction (MECF), Methanol fraction of methanol extract (MFME), an aqueous alkaloid fraction (AAF), and acetate non-alkaloid fraction (ANAF). Exposure to UV-A light elicited phototoxic activity against *E. coli* in three skin extracts (MFME, MECF and ANAF). In relation to the modifying effect of the methanol extract and fractions on antibiotic activity, antagonism was observed with MFME and kanamycin in strain EC27, while no effect of the natural products was seen with the other antibiotics. With strain SA358, all natural products showed antagonism against gentamicin. The results showed that *R. jimi* does not produce compounds with antibacterial activity; maybe the bacteria have an essential role in the epidermis of *R. jimi* due to the compounds that protect your skin from these bacterial communities, which in return may be important to protect the amphibians from the attack of pathogens.

Key words: *Rhinella jimi*, Amphibian skin compounds, Fototoxic activity, Protective effect.

Sumário

Introdução	12
A pele dos anfíbios e seus compostos	14
O declínio das comunidades de anfíbios	18
A fauna microbiana da pele dos anfíbios	20
Os efeitos da radiação UV sobre a Biologia dos Anfíbios	25
Objetivos	27
Objetivo Geral	27
Objetivos Específicos	27
Materiais e Métodos	28
Seleção e coleta dos anfíbios	28
Obtenção dos extratos metanólicos	29
Preparo das soluções a partir do extrato	30
Preparo da solução inicial e das soluções de teste	30
Microorganismos	30
Meios de cultura	30
Preparo e padronização de inóculos bacterianos	30
Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	31
CIM pelo método de microdiluição em caldo	31
Preparo dos inóculos bacterianos	31
Execução e leitura dos ensaios	31
Avaliação da atividade fotosensibilizante dos extratos sob luz UV-A	32
Execução e leitura do ensaio	33
Avaliação da interferência dos extratos na resistência aos antibióticos aminoglicosídios	33
Execução e leitura do ensaio	33
Resultados	34
Atividade fototóxica	34
Análise dos Extratos frente às linhagens ATCC e multirresistentes de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> .	35
Teste da atividade moduladora da ação antibiótica	36
Discussão	40
Atividade fototóxica	40
Atividade microbiológica frente a linhagens padrões e multirresistentes de <i>E. coli</i> .	42

Avaliação da atividade moduladora da ação antibiótica	42
Conclusões	45
Referências bibliográficas	46

Introdução

O gênero *Rhinella* faz parte da família Bufonidae que é composta por aproximadamente 471 espécies e 33 gêneros (Amphibiaweb, 2009). Essa família segundo Pramuk (2008) surgiu na América do Sul e diversificaram-se pelo mundo não sendo encontrada naturalmente apenas nos continentes Ártico, Antártico, e nos países, Madagascar, Nova Guiné, Austrália e ilhas oceânicas.

Rhinella é constituído por mais de 250 espécies (Frost, 2004) que geograficamente estão presentes na maioria dos continentes com exceção do Ártico, Antártico, Madagascar, Nova Guiné, Austrália e ilhas oceânicas (Pramuk, 2008). Porém apesar da grande diversidade demonstrada por esse gênero, o número atual de espécies pode estar de certa forma subestimado, já que várias espécies novas desse gênero tem sido publicadas recentemente, (Maciel et al., 2007; 2008), portanto provavelmente nos próximos anos um número maior de espécies deverá ser acrescentado ao grupo.

Rhinella jimi (Stevaux, 2002) está inserido no grupo *Rhinella.marina* (Linnaeus, 1758), que possui como sinapomorfia distintiva dos outros grupos do gênero um ponto de articulação entre o ramo medial da pterigóide e ala do paraesfenóide formado por uma sutura (Figura 01, página 02) Pramuk (2004, 2006). Segundo Maciel (2008) o grupo *R. marina* é composto por 10 espécies: (1) *R. arenarum* (Hensel, 1867), (2) *R. icterica* (Spix, 1824), (3) *R.marina*, (4) *R. schneideri* (Werner, 1894), (5) *R. poeppigii* (Tschudi, 1845), (6) *R. rubescens* (A. Lutz, 1925), (7) *R. jimi* (Stevaux, 2002), (8) *R.achavali* (Maneyro, Arrieta e de Sá, 2004), (9) *R. veredas* (Brandão, Maciel & Sebben, 2007) e (10) *R. cerradensis* (Maciel, Brandão, Campos & Sebben, 2007). Geograficamente *R. jimi* está distribuído em toda a região nordeste do Brasil, tanto em

lugares de baixas altitudes, como em lugares de altitudes elevadas, não havendo especializações entre as populações (Figura 02, página 03.) (Stevaux, 2002).

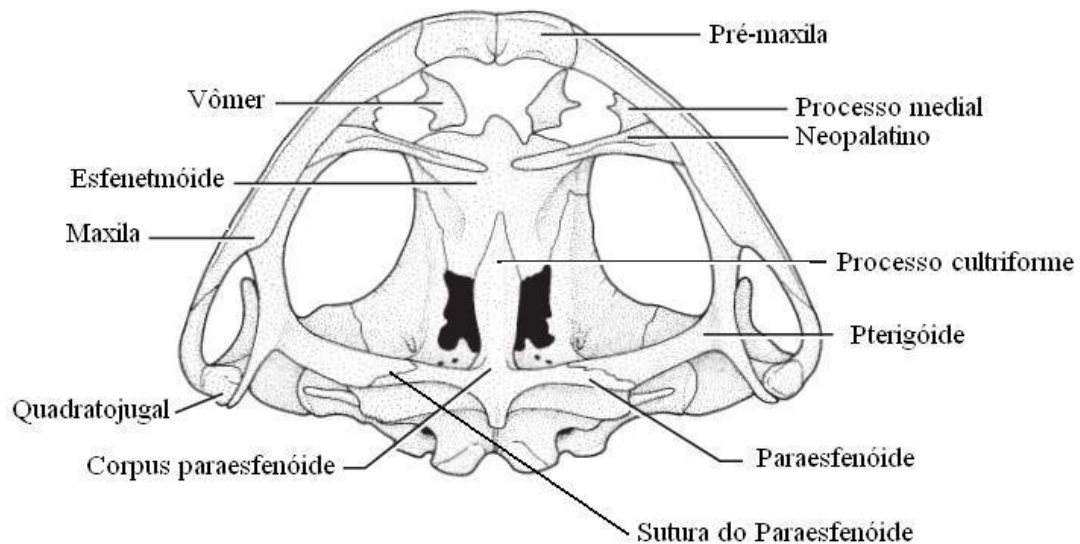


Figura 01: Modificada de Pramuk et al (2004) ilustrando um crânio de um exemplar do grupo *Rhinella marina*, mostrando a articulação entre o ramo medial da pterigóide e a ala do paraesfenóide formado por uma sutura.



Figura 02: Modificada do sitio Amphibiaweb, mostrando a distribuição geográfica de *Rhinella jimi*, que se estende do Maranhão até o estado do Espírito Santo (Amphibiaweb Species map, 2009).

A pele dos anfíbios e seus compostos

A pele de um anfíbio é delgada, úmida e frouxamente ligada ao corpo (apenas em certos pontos). Histologicamente é composta de duas camadas: uma epiderme externa, estratificada e uma derme interna esponjosa. A camada mais interna da epiderme dá origem a dois tipos de glândulas tegumentares: (i) pequenas glândulas mucosas que secretam um muco protetor à prova d'água na superfície da pele, e (ii) grandes glândulas serosas que produzem um veneno aquoso esbranquiçado que é irritante para predadores em potencial. Todos os anfíbios produzem veneno na epiderme, mas seu efeito varia de uma espécie para outra (Hickmann et al., 2004).

Compostos produzidos pelas glândulas da pele dos anfíbios vêm demonstrando uma grande quantidade de atividades biológicas, como proteção antipredador, antimicrobiana e antifúngica (Mortari et al., 2004). Várias substâncias biologicamente ativas como: aminas biogênicas, esteróides cardiotônicos, peptídeos e alcalóides lipofílicos, são encontrados na pele desses animais. Essas substâncias possuem uma grande variedade de propriedades farmacológicas, fornecendo uma defesa química contra predadores (Ceï et al., 1972, Daly et al., 2004).

Alcalóides são os compostos mais estudados, caracterizando-se por serem nitrogenados farmacologicamente ativos além de possuírem caráter alcalino. Segundo Daly et al. (2005) existem cerca de 800 alcalóides descritos ocorrendo em peles de anfíbios, esses alcalóides estão distribuídos em 24 classes, existindo ainda cerca de 150 que permanecem sem classificação, podendo representarem novas classes.

Diversos alcalóides são utilizados na terapêutica, possuindo uma ampla variedade de atividades biológicas, por exemplo, a emetina (amebicida e emético), atropina, hiosciamina e escopolamina (anticolinérgicos), reserpina e protoveratina A (anti-hipertensivos), quinina (antimalárico), camptotecina, vimblastina e vincristina (antitumorais), codeína e noscapina (antitussígenos), morfina (hipnoanalgésico), quinidina (depressor cardíaco), cafeína (estimulante do SNC) (Henriques et al., 2007). Segundo Daly et al. (2005) os alcalóides não são sintetizados pelos anfíbios, sendo absorvidos durante a alimentação que consiste basicamente de artrópodes, e armazenados na pele.

De acordo com Ceï et al. (1972) a pele dos bufonídeos pode ser considerada um verdadeiro depósito natural de aminas biogênicas. Esses compostos apresentam atividades vasoconstritoras, convulsionantes, alucinógenas e colinérgicas.

Maciel et al.(2003) isolou e caracterizou várias indolalquilaminas, principais aminas biogênicas presentes na pele dos bufonídeos (Figura 03, página 5). O referido autor analisou as secreções cutâneas das glândulas paratóides das espécies, *Bufo regularis* (Ouganda, 1969), *Melanophryniscus cambaraensis* Braun & Braun, 1979, *Bufo arenarum*, *Bufo crucifer* Wied-Neuwied, 1821, *Bufo ictericus*, *Bufo schneideri*, *Bufo marinus*, *Bufo granulatus* (Spix, 1824) e *Bufo rubescens*, encontrando um total de 15 indolealquilaminas para estes bufonídeos.

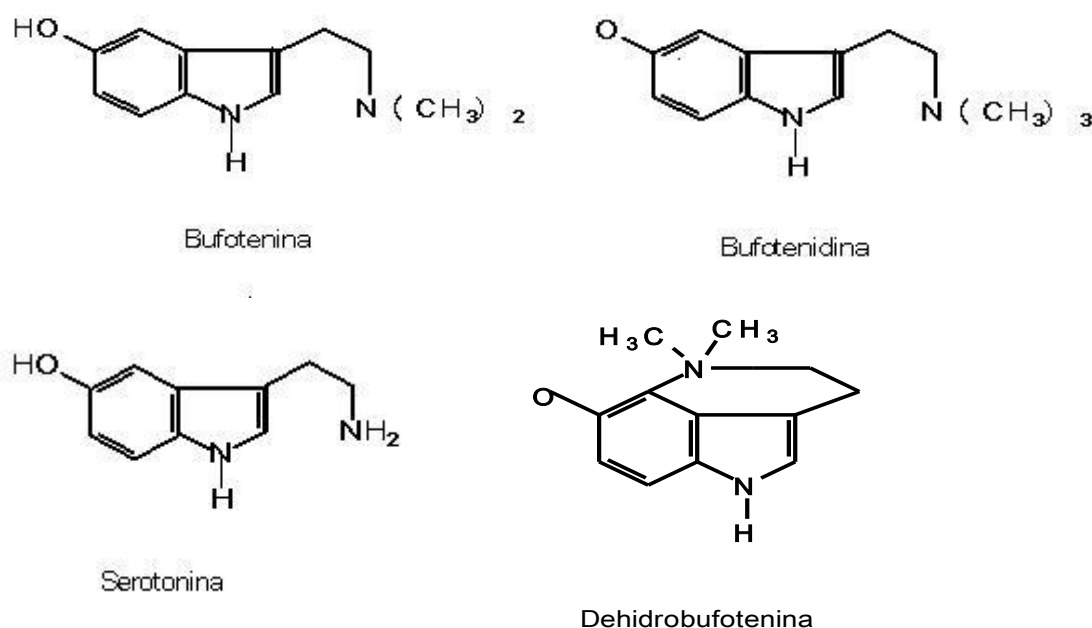


Figura 03: Modificada de Maciel et al (2003) mostrando quatro indolalquilaminas oriundas da pele de bufonídeos do gênero *Rhinella*.

Os esteróides cardiotônicos são os principais compostos presentes nas peles de anfíbios da família Bufonidae. Daly et al (2004) ao analisar compostos presentes nas peles de bufonídeos e outros 20 gêneros de anfíbios coletados em diferentes localidades na Tailândia, identificou uma grande diversidade de esteróides cardiotônicos (Figura 04 página 6). Nos últimos anos esses compostos têm sido isolados e após realização de testes demonstram diversas atividades biológicas (Cunha-Filho et al., 2005; Tempone et al., 2008). No Brasil alguns trabalhos vêm sendo conduzidos com esteróides

cardiotônicos oriundos das espécies *R rubescens* (Cunha-Filho et al., 2005) e *R. jimi* (Tempone et al., 2008).

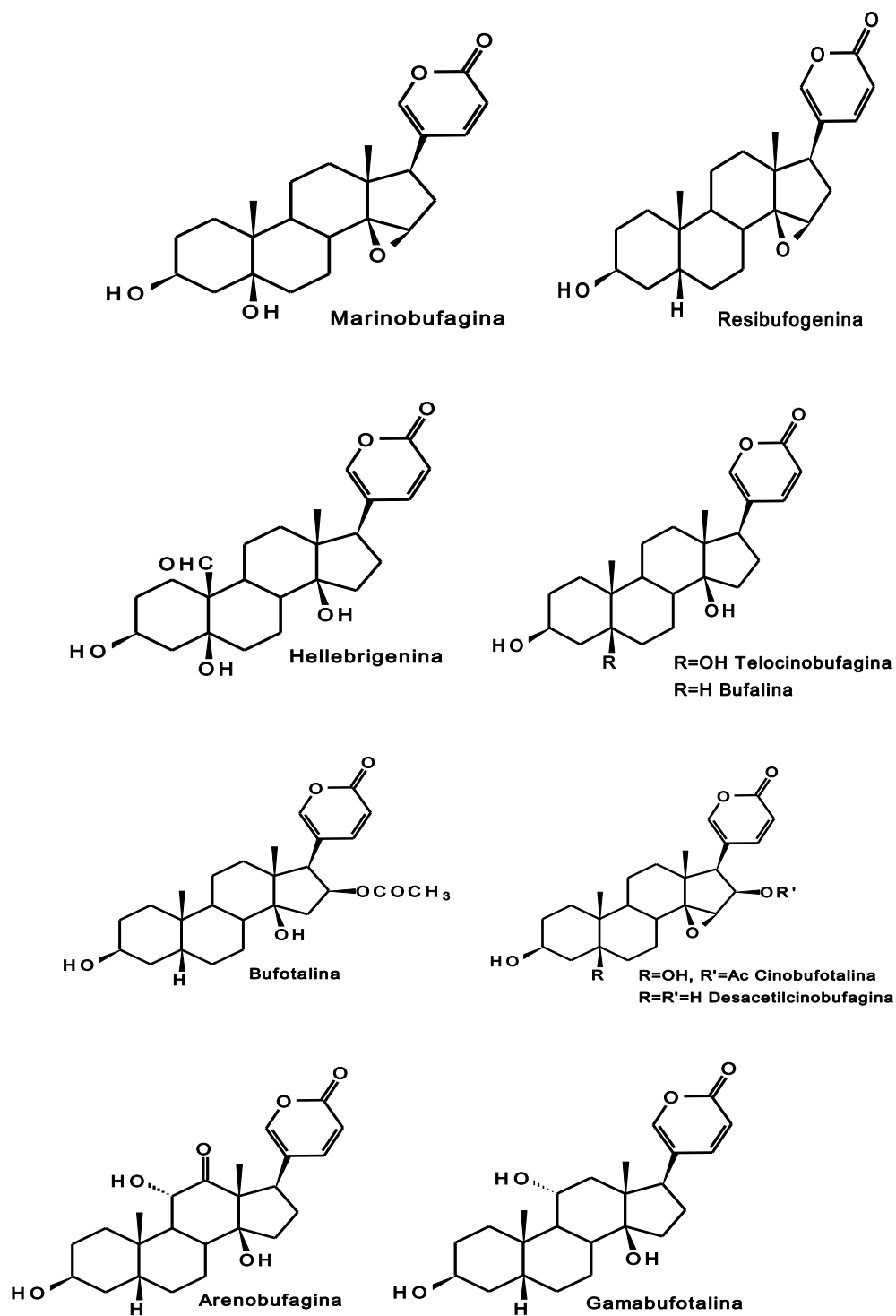


Figura 04: modificada de Daly et al (2004), mostrando oito diferentes estruturas de esteróides cardiotônicos presente nas peles de bufonídeos da Tailândia.

O Declínio das comunidades de anfíbios

Atualmente os herpetólogos vêm alertando sobre o declínio das comunidades de anfíbios em várias localidades do planeta (Figura 05, página 7), porém as causas reais do desaparecimento de muitas espécies de anfíbios ainda não estão completamente esclarecidas, de um lado alguns pesquisadores afirmam que o desaparecimento está relacionado à crescente destruição de seus habitats naturais, devido principalmente a expansão das fronteiras agrícolas (Beebe & Griffiths, 2005).

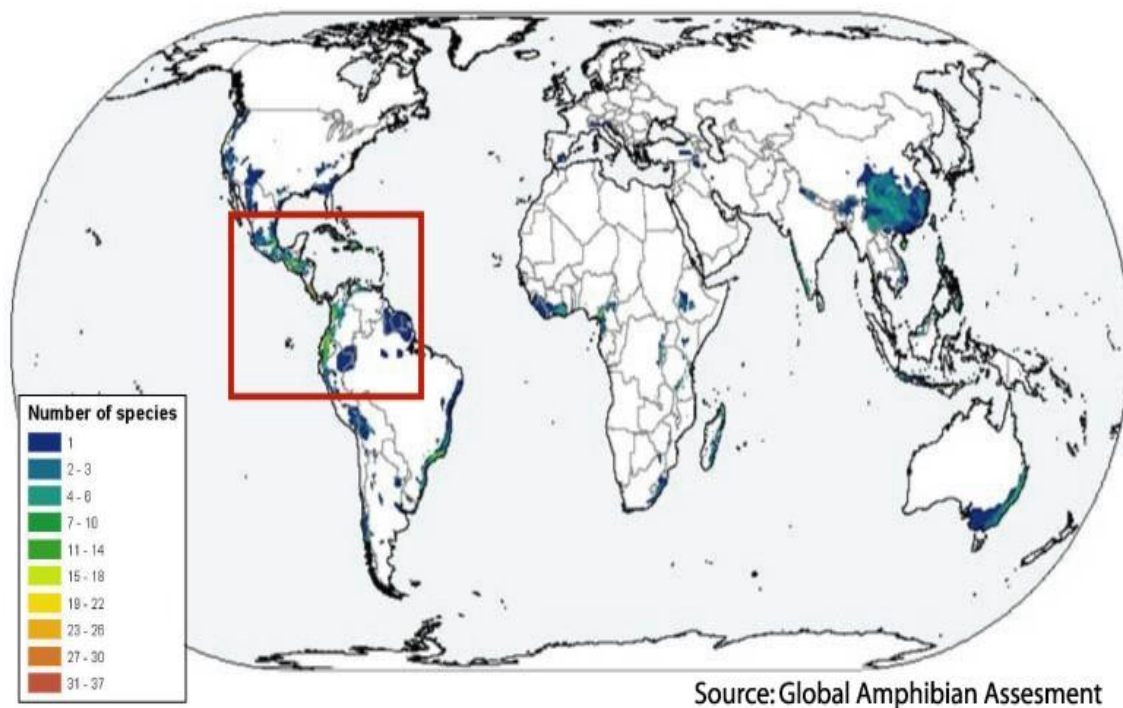


Figura 05: Modificada a partir do sítio amphibiaweb, demonstrando o mapa do declínio de anfíbios pelo mundo, o quadro a esquerda mostra o número de espécies em declínio por localidade estudada.

Um segundo grupo de pesquisadores, que associa a atual decadência das comunidades de anfíbios a mudanças climáticas e principalmente a doenças causadas por patógenos (Figura 06 Página 8) que nas últimas décadas vem levando algumas comunidades desses anfíbios ao declínio (Blaustein et al., 1994a; Rachowicz et al., 2005). O fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, vem sendo atualmente associado com

o declínio dos anfíbios estando associados a mortalidades em massa em várias regiões do planeta (Figura 07 página 9), dois mecanismos de ação tem sido propostos para o parasitismo deste fungo (I) a causa da doença causada pelo fungo poderia estar associada à produção de toxinas. (II) a causa das doenças poderia estar relacionada com o fato de o crescimento do fungo interferir com as funções dos fluidos e com o balanço iônico da pele dos anfíbios (Berger et al., 1998; Pessier et al., 1999).



Figura 06: modificada a partir de Woodhams et al (2007), mostrando uma mortalidade em massa da espécie *Rana mucosa* Cam, 1917, em Kings Canyon National Park, California, USA, causada pelo fungo patogênico *B. dendrobatidis*.



Figura 07: Modificada de (spatialepidemiology, 2009), mostrando as regiões onde foram encontrados registros de *B. dendrobatidis* parasitando anfíbios, os pontos em laranja são os casos confirmados por técnicas moleculares, os pontos brancos foram confirmados por métodos morfológicos.

A fauna microbiana da pele dos anfíbios.

Embora não sejam muito estudadas as comunidades bacterianas da pele dos anfíbios possuem uma importante função: podendo estar relacionado com a proteção da pele contra a invasão de outros microorganismos (Harris et al., 2006; Lauer et al., 2007; Woodhams et al 2007 a, b). Harris et al (2006) isolou várias linhagens de bactérias da pele de duas espécies de salamandras (*Plethodon cinereus* (Green, 1818) e *Hemidactylium scutatum* Temminck & Sclegel, 1838) e verificou que há uma grande diversidade de bactérias vivendo sobre as peles dessas salamandras, onde para *P. cinereus* foram encontradas bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Lysobacter* e *Pseudomonas*) e para *H. scutatum* foram encontrados os gêneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Kitasatospora*, *Paenibacillus*, *Pedobacter*, *Pseudomonas* e *Streptomyces* , estas bactérias demonstraram uma significativa atividade antifúngica, onde os isolados bacterianos de *P. cinereus* inibiram o fungo *B. dendrobatidis* e os isolados de *H. scutatum* inibiram *B.*

dendrobatidis, *Mariannaea* sp. E os gêneros *Bacillus*, *Lysobacter* e *Pedobacter* inibiram outras duas linhagens de fungos *Basidiobolus ranarum* e *Allomyces* sp.

Lauer et al. (2007) ao estudar a fauna de bactérias presentes na pele de *Plethodon cinereus* encontrou 17 espécies de bactérias com atividade antifúngica, onde os gêneros que apresentaram as melhores atividades contra o crescimento de fungos patogênicos foram *Lysobacter*, *Bacillus* e *Chrysobacterium*. E ainda segundo Lauer et al. (2007) essa fauna de bactérias pode ser transmitida entre os anfíbios de três maneiras, (i) transmissão horizontal, que acontece durante o acasalamento e interações agressivas, (ii) inoculação ambiental que é comum para espécies transitórias e pode ser um método de colonização de espécies residentes em uma área específica. (iii) transmissão vertical que ocorre principalmente em espécies onde existe o cuidado parental onde a fauna de bactérias da pele dos pais é transmitida para os juvenis.

Os estudos com bactérias que habitam a pele de anfíbios estão bastante concentrados em anfíbios da ordem Caudata (Salamandras), com exceção Woodhams et al., 2007a; Culp et al., 2007. Woodhams et al (2007a) analisou a diversidade bacteriana de *Rana muscosa* Cam, 1917, que é um Anuro da família Ranidae, nesse trabalho foram estudadas populações de duas regiões diferentes uma população denominada “Conness” coletada em Yosemite National Park, Califórnia, EUA, que não está sofrendo declínio populacional, e a população “Sixty Lake” coletada em Kings Canyon National Park, Califórnia, EUA, que está enfrentando declínio populacional, após análises bacterianas das duas populações de *R. muscosa* foi observado que a população “Conness” possuía 85% dos indivíduos com bactérias com atividade antifúngica na pele, enquanto a população de “Sixty Lake” possuía 62% dos seus representantes com bactérias antifúngicas na pele, os autores observaram também que nas duas populações havia a presença do fungo patogênico *B. dendrobatidis*. Frente a esses dados concluiu-se que a

população “Conness” possui maior resistência a infecções causadas por fungo devido à maior parte da sua população possuir bactérias com atividade antifúngica.

Woodhams et al. (2007b) afirma que se a microbiota mutualista é uma extensão do sistema imune dos anfíbios, pode-se então prever que (i) hospedeiros que são resistentes a doenças causadas por patógenos demonstrariam ter uma grande diversidade de simbiontes, que beneficiariam o hospedeiro por impedir a colonização do patógeno. (ii) populações de hospedeiros resistentes a fungos patogênicos demonstrariam ter uma elevada proporção de indivíduos inibidores de fungos, enquanto as populações susceptíveis não possuiriam uma grande proporção de microorganismos em suas peles. (iii) Após remover a microbiota simbiote, hospedeiros tornariam-se mais susceptíveis a infecções por patógenos e desenvolvimento de doenças. (iv) a adição de uma microbiota mutualística a anfíbios com microbiota reduzida, diminuiria sua susceptibilidade a colonização de patógenos e doenças. (v) os mecanismos de defesa do hospedeiro devem interagir com a microbiota, reduzindo os patógenos em potencial, mas não eliminariam os simbiontes mutualísticos, ou seja, os compostos da pele dos anfíbios podem regular e selecionar a microbiota de suas peles. Woodham et al.(2007b) demonstraram essa última hipótese quando em um experimento preliminar observaram bactérias simbiontes que inibem o crescimento de *B. dendrobatidis* demonstraram resistir a elevadas concentrações de peptídeos antimicrobianos produzidos pela pele de *Rana pipiens* Schreber, 1782.

Culp et al.(2007) investigou as populações bacterianas em três diferentes espécies de anfíbios (*Notophthalmus viridescens* (Rafinesque, 1820), *Rana catesbiana* Shaw, 1802, *Plethodon cinereus*) no estado da Virginia EUA. O autor observou que muitas bactérias isoladas das peles desses anfíbios são produtoras de muco, Wingender et al. (1999) afirma que as funções do muco produzido por colônias bacterianas são

prevenção contra a desidratação, formação de barreiras protetoras, adesão a superfícies além de possivelmente estar relacionado a formação de relações simbióticas, frente a esses dados Culp et al.(2007) argumentaram que as bactérias da pele dos anfíbios podem servir de barreira e inibir a colonização da pele por outros organismos. Os autores observaram ainda que as bactérias presentes no ambiente em que os anfíbios foram coletados são diferentes das bactérias presentes nas peles, sugerindo que para que seja uma flora bacteriana natural pode haver um mecanismo regulatório que pode ser resultado de um sinergismo do sistema imune dos anfíbios e dos compostos produzidos pela sua pele.

Lauer et al. (2008) isolou 48 espécies de bactérias que pertenciam a 16 gêneros na pele da salamandra *Hemidactylium scutatum* Temminck & Sclegel, 1838, e foi observado também que essas bactérias possuem atividade antifúngica, contra duas linhagens de fungos *Mariannaea elegans* e *Rhizomucor variabilis*, esse estudo demonstrou também que várias dessas bactérias são epibióticas.

Brucker et al. (2008a) demonstrou que na salamandra *Plethodon cinereus* que não é parasitada naturalmente pelo fungo *B. dendrobatidis*, possui uma bactéria simbiote *Janthinobacterium lividum* que produz dois compostos Indol-3-carboxaldeído e violaceina (Figura 08, página 13), esses dois compostos demonstraram uma grande atividade antifúngica e devem estar associados a proteção antifúngica fornecida pelas bactérias.

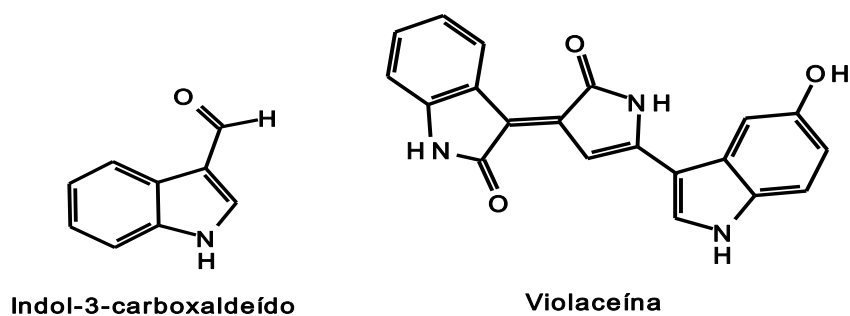


Figura 08: modificada a partir de Brucker et al. (2008), mostrando as estruturas químicas do Indol-3-carboxaldeído e da Violaceína isolados da bactéria *Janthinobacterium lividum* encontrada na pele da salamandra *Plethodon cinereus*.

Brucker et al. (2008b) isolou o composto 2,4- diacetilfloroglucinol (Figura 09, página 13) a partir da bactéria *Lysobacter gummosus*, que é um organismo que vive como simbiote na pele da salamandra *P. cinereus* em testes microbiológicos esse composto demonstrou atividade antifúngica.

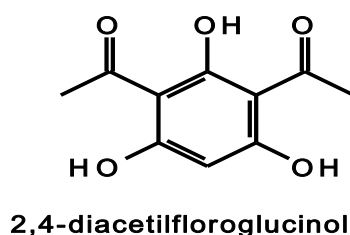


Figura 09: modificada de Brucker et al (2008b), mostrando a estrutura química do 2,4 diacetilfloroglucinol isolado da bactéria *Lysobacter gummosus*.

Harris et al. (2009) testou os efeitos da exposição de salamandras *P. cinereus* contra *B. dendrobatidis* observou que as espécies infectadas pelo fungo sofriam uma grande perda de peso, mas que quando foi adicionado a bactéria *Pseudomonas reactants* que é constituinte da flora bacteriana desta espécie de salamandra, houve um decréscimo na perda de peso em relação as salamandras que não foram tratadas com a

bactéria *P. reactants*, demonstrando que a bactéria reduz os sintomas causados pela infecção por *B. dendrobatidis*.

Os efeitos da radiação UV sobre a Biologia dos anfíbios.

A radiação ultravioleta é importante fator que de maneira independente ou em sinergismo com outros fatores pode estar desempenhando um importante papel no declínio dos anfíbios, entre os principais malefícios causados pelos aumentos nos índices de radiação UV podemos destacar a má formação de embriões, o ressecamento da pele dos anfíbios, danos ao DNA desses animais além do dessecamento de ovos de algumas espécies que se reproduzem fora da água (Blaustein & Belden, 2003; Blaustein et al., 2005).

Blaustein et al.(1997) demonstraram que a radiação UV-B afeta de maneira negativa o desenvolvimento embrionário de anfíbios induzindo a deformidades, segundo o autor esses efeitos podem variar entre as espécies devido ao nível de fotoliase presente na espécie, onde um elevado nível de fotoliase pode remover os compostos fotoativados pela radiação ou diminuir os efeitos citotóxicos e mutagênicos desses compostos (Blaustein et al., 1994).

Blaustein et al. (2003) realizou uma extensa revisão e observou que várias espécies de anfíbios já demonstraram sofrer efeitos danosos quando expostas a radiação ultravioleta ou quando expostas a radiação ultravioleta associada com outros fatores que causam declino em comunidades de anfíbios, como fungos patogênicos.

Apesar da radiação, em geral, provocar danos aos anfíbios esses animais possuem diversas estratégias para se protegerem contra os efeitos dessa radiação,

(Blaustein & Belden, 2003) comentam essas estratégias: (i) Exposição limitada à UV-B, várias espécies de anfíbios limitam o seu tempo de exposição à luz e quando colocam seus ovos em áreas abertas que estão mais expostas a luz esses ovos são pigmentados, mas quando os ovos são colocados em áreas fechadas onde a exposição a luz é menor esses ovos são despigmentados.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar as atividades microbiológicas dos extratos e frações, obtidos da pele de *Rhinella jimi*, e sua relação com o declínio de anfíbios.

Objetivos Específicos

- 1- Avaliar o espectro de ação e o grau de inibição dos extratos obtidos a partir de peles de *Rhinella jimi*, oriundos da Biorregião do Araripe frente a linhagens bacterianas patogênicas.
- 2- Investigar a atividade antibacteriana ativada pela luz UV-A dos extratos e frações da pele de *R. jimi*, comprovando e comparando a sua eficiência.
- 3- Verificar a eficácia dos extratos na modulação da resistência bacteriana à aminoglicosídeos.
- 4- Correlacionar os dados obtidos com o declínio de comunidades de anfíbios.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção e coleta dos anfíbios

Os espécimes de *Rhinella jimi* (Figura 10, página 17) foram coletados nos municípios de Caririáçu (07°02'S x 39°17'W), Crato (07°14'S x 39°24'W), Mauriti (07°23'S x 38°46'W), e Várzea Alegre (06°47'S x 39°17'W), assim como no município de Exu (07°30'S x 39°43'W) no estado de Pernambuco, todos esses municípios estão incluídos no Bioma da *Caatinga*, vegetação típica da região nordeste do Brasil, o clima nessa região é o semi-árido que é quente e seco com um período de chuvas limitado de três a quatro meses por ano (IPECE, 2005), a sua identificação foi realizada mediante a literatura especializada (Stevaux, 2002), após isso os animais foram depositados na coleção de vertebrados do laboratório de Zoologia da Universidade Regional do Cariri-URCA LZ-URCA 0469-500, 0503, 0504. 0506-508.



Figura 10: Espécime de *Rhinella jimi* coletado para a obtenção dos extratos para a realização dos testes microbiológicos.

Obtenção dos extratos metanólicos

Peles de 37 espécimes foram removidas e os espécimes foram depositados na coleção Zoológica da Universidade Regional do Cariri: LZ-URCA 0469-500, 0503, 0504, 0506-0508. Os espécimes de *Rhinella jimi* foram investigados na forma de cinco diferentes extratos: fração metanólica de extrato metanólico (FMEM), fração clorofórmica de extrato metanólico (FCEM), extrato metanólico (EM), solução aquosa alcaloídica (SAA) e solução de acetato não alcaloídica (SANA), obtidos a partir de suas peles e objetivando identificar e avaliar suas atividade antibacterianas, fototóxicas e moduladoras da ação de antibióticos.

Os extratos brutos foram obtidos a partir de peles secas (295g) em metanol, durante 96 horas à temperatura ambiente, com um rendimento total de 5,5%. A prospecção química para a identificação das classes dos metabólitos no extrato metanólico da pele de *R. jimi*, seguiu a metodologia sugerida por Matos (2000).

Os extratos foram submetidos à coluna cromatográfica, usando Sephadex LH20, sendo empacotada e eluída com metanol, para separar as diferentes frações. Após análise por cromatografia de camada delgada, usando o reagente de Dragendorff's como agente revelador, as frações foram separadas baseadas em seus perfis cromatográficos. Grupos funcionais de compostos presentes nas frações foram identificados por análise de espectro na região do infravermelho, obtido em espectômetro PERKIN-ELMER model FT-IR spectrophotometer, spectrum 1000 usando pastilha de KBr.

Preparo das soluções a partir do extrato

Preparo da solução inicial e das soluções de teste.

No preparo da solução inicial a amostra foi solubilizada em Dimetilsulfóxido (DMSO- Merck, Darmstadt, Alemanha), sendo observadas as seguintes proporções: 10 mg da amostra solubilizados em 1mL de Dimetilsulfóxido DMSO, para obter uma concentração inicial de 10 mg/mL. A partir dessa concentração, foi efetuada uma diluição em água destilada estéril para se obter uma concentração de 1024µg/mL.

Microrganismos

Os microrganismos utilizados nos testes foram obtidos através do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde. Foram utilizadas duas linhagens padrão de bactérias *Escherichia coli* ATCC10536; *Staphylococcus aureus* ATCC25923. As linhagens multirresistentes *S. aureus* (SA358) e *E. coli* (EC27) foram obtidas a partir de amostras clínicas obtidas nas cidades de Juazeiro do Norte- CE e João Pessoa - PB.

Meios de cultura

Foram utilizados nos ensaios biológicos os seguintes meios de cultura: Agar Heart Infusion - HIA (Difco Laboratories Ltda.), Caldo Brain Heart Infusion – BHI (concentração indicada pelo fabricante e 10%) (Acumedia Manufacturers Inc.). Todos os meios de cultura preparados segundo as especificações do fabricante.

Preparo e padronização de inóculos bacterianos

Culturas de bactérias foram mantidas a 4°C em Heart Infusion Agar (HIA). Antes dos testes, as linhagens foram repassadas para o meio citado e incubadas a 35°C por 24 horas. As linhagens a serem testadas foram inoculadas em Caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas na mesma situação antes do teste. Suspensões com crescimento bacteriano foram diluídas até a obtenção de 10⁵ céls/mL (NCCLS, 2000).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Os ensaios para determinação da CIM dos extratos metanólicos foram efetuados através do método de microdiluição em caldo, com concentrações variando de 512 a 8 µg/mL.

CIM pelo método de microdiluição em caldo

Preparo dos inóculos bacterianos

As suspensões bacterianas previamente padronizadas foram diluídas 1:10 em caldo BHI para obtenção da concentração final de 10^5 céls/mL (NCCLS, 2000).

Execução e leitura dos ensaios

Esse método utiliza pequenos volumes de meio de cultura e de amostra, distribuídos em cavidades de microplacas estéreis. As amostras foram preparadas em concentração dobrada (1024 µg/mL) em relação à concentração inicial definida e volumes de 100 µL e posteriormente foram diluídas seriadamente 1:2 em caldo BHI 10%. Em cada cavidade com 100 µL do meio de cultura uma amostra suspensão bacteriana diluída 1:10. Controles negativos com o meio de cultura, controles positivos (meio + inóculo) e controles de inibição utilizando antimicrobianos em concentração de 512 a 8 µg/mL foram incluídos nos ensaios. As placas preenchidas foram incubadas a 35°C por 24 horas (Javadpour et al., 1996).

Para evidenciar a CIM das amostras, foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma) em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após a incubação, 20 µL da solução indicadora foram adicionados em cada cavidade e as placas passarão por um período de incubação de 1 hora em temperatura ambiente. A mudança de coloração azul para rosa devido à redução da Resazurina indica o crescimento bacteriano (Mann & Markhan, 1998; Palomino et al., 2002), auxiliando a

visualização da CIM, definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, evidenciado pela cor azul inalterada.

Avaliação da atividade fotosensibilizante dos extratos sob luz UV-A

Todos os extratos foram testados quanto à possibilidade de interação com luz Ultravioleta A (UV-A) segundo procedimentos descritos na literatura (Lopez et al., 2001).

Execução e leitura do ensaio

Nestes ensaios foram utilizadas as linhagens padrão de *S. aureus* e *E. coli*. O ensaio foi realizado através do método de difusão em agar, modalidade em disco (*Agar Disk Diffusion*). Foram utilizados como controles positivos discos de norfloxacina (Laborclin - 10 µg) e discos *Blank* com 20 µL de 8 – metóxipsoraleína (8-MOP) dissolvida em etanol para fotoativação. Para visualizar o efeito fototóxico, cada placa foi preparada em réplica: uma réplica foi exposta à luz UV-A (5 Wy/m², 320–400 nm, quatro lâmpadas Sylvania F20T12-BLB, emissão máxima: 350 nm) por 2 horas. Após isso, as placas expostas à luz foram incubadas a 37°C por 24h. A outra réplica foi diretamente colocada na estufa a 37°C para incubação, sem contato com a luz UV-A enquanto a outra foi mantida no escuro. A leitura foi realizada através da aferição do tamanho das zonas de inibição (mm) e a atividade fototóxica foi avaliada através da comparação entre as duas réplicas.

Avaliação da interferência dos extratos na resistência aos antibióticos aminoglicosídeos.

Os extratos e frações obtidos de *R. jimi* foram avaliados com relação à sua atividade moduladora da ação antibiótica contra as linhagens multirresistentes de *Escherichia coli* 27 e de *Staphylococcus aureus* 358

Para avaliar os extratos como moduladores da ação antibiótica, a CIM de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (canamicina, amicacina, neomicina e gentamicina) foram avaliadas na presença e na ausência de todos os extratos em microplacas estéreis. Todos os antibióticos testados foram obtidos junto a Sigma.

Execução e leitura do ensaio

Os extratos foram misturados em caldo BHI 10% em concentrações subinibitórias. A preparação das soluções de antibióticos realizou-se com a adição de água destilada estéril em concentração dobrada (1024 µg/mL) em relação à concentração inicial definida e volumes de 100 µL diluídas seriadamente 1:2 em caldo BHI 10%. Em cada cavidade com 100 µL do meio de cultura contendo a suspensão bacteriana diluída (1:10). Os mesmos controles utilizados na avaliação da CIM para os extratos foram utilizados (Sato et al., 2004, modificado). As placas preenchidas foram incubadas a 35°C por 24 horas e a leitura foi evidenciada pelo uso de Resazurina sódica como citado anteriormente.

RESULTADOS

A bioprospecção do extrato metanólico de *R. jimi* revelaram a predominância de alcalóides, assim como terpenos, esteróides e saponinas, em análises espectrofotométricas o extratos na região infravermelha demonstraram uma grande absorção em 3434 cm^{-1} , indicando a presença de grupos NH e /ou grupos OH, que são característicos de aminas e alcoóis, porém acreditamos em uma maior probabilidade da presença de aminas biogênicas, já que estes compostos encontram-se bastante difundidos em peles de anfíbios, as análises em CCD confirmaram a presença de alcalóides nas frações obtidas.

Atividade fototóxica

A exposição à luz UV-A demonstrou efeito sobre a atividade de três extratos contra *E. coli*, onde a atividade foi demonstrada por FMEM, FCEM e SNA (Tabela 01). Embora existam muitos trabalhos que demonstram os efeitos biológicos da radiação sobre anfíbios (Bancroft et al., 2007; Blaustein et al., 1997, 2003), esses trabalhos consistem em atividades mediadas pela luz UV-B e geralmente esses estudos concentram-se em relacionar a radiação com mortalidades de anfíbios ou avaliar a efeitos da radiação UV-B com o aumento na vulnerabilidade desses animais frente a organismos patogênicos, nosso estudo é o primeiro a avaliar compostos isolados a partir da pele de um anfíbio e relacioná-lo com atividade antibacteriana com radiação UV-A, sendo o primeiro a observar esse tipo de atividade até o momento.

Tabela 01: Atividade fototóxica apresentada pelos extratos FMEM, FCEM e SNA frente a linhagens de *E. coli*.

	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923						<i>Escherichia coli</i> ATCC10536							
	Fmem	Fcem	Em	Saa	Sna	NOR	8MOP	Fmem	Fcem	Em	Saa	Sna	NOR	8MOP
UV+	-	-	-	-	-	34	16	11	10	-	-	11	40	18
UV-	-	-	-	-	-	31	-	-	-	-	-	-	32	-

Fm (fração metanólica), Fc (fração clorofórmica), Em (extrato metanólico), Saa (solução aquosa alcaloídica), Sna (solução aquosa não alcaloídica), Nor(norfloxacina) e 8MOP(8 – metóxipsoraleína)

Análise dos Extratos frente às linhagens ATCC e multirresistentes de *E. coli* e *S. aureus*.

Como apresentado na Tabela 02, às cinco frações não demonstraram atividade microbiológica de relevância clínica sobre as linhagens padrões de *E. coli*, onde todas as frações apresentaram $CIMs \geq 1024 \mu\text{g/mL}$, porém em relação as linhagens multiresistentes os resultados demonstraram atividades microbiológicas, embora essa atividade não tenha sido muito relevante, as frações que apresentaram essa atividade; Fração clorofórmica de extrato metanólico (FCEM), Extrato metanólico(EM) e Solução de acetato não alcaloídica, apresentaram todas elas $CIMs 512 \mu\text{g/mL}$.

Na linhagem padrão de *S. aureus* não foram observadas atividades microbiológicas relevantes do ponto de vista clínico sendo o CIM de todas as cinco frações maior ou igual a $1024 \mu\text{g/mL}$, já em relação às linhagens multirresistentes SA358, a fração metanolica do extrato metanólico, demonstrou atividade, apresentando $CIM 512 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 02: *E. coli* linhagens padrão ATCC e multiresistentes EC 27, testadas com os produtos naturais, as concentrações inibitórias mínimas estão em $\mu\text{g/mL}$.

	<i>E. coli</i> ATCC 10536	<i>E. coli</i> (EC 27)
FMEM	≥ 1024	≥ 1024
FCEM	≥ 1024	512
EM	≥ 1024	512
SAA	≥ 1024	≥ 1024
SNA	≥ 1024	512

Fm (fração metanólica do extrato metanólico), Fc (fração clorofórmica do extrato metanólico), Em (extrato metanólico), Saa (solução aquosa alcaloídica), Sna (solução aquosa não alcaloídica), *E. coli* ATCC (linhagem padrão de *E. coli* ATCC 10536) e *E. coli* (EC27) (linhagem multirresistente de *E. coli*).

As linhagens padrão e multirresistentes de *S. aureus*, os extratos e frações não apresentaram atividade inibitória contra o crescimento bacteriano na linhagem ATCC, sendo todas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$. Em relação à linhagem multirresistente SA358 os extratos e frações também não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano, com exceção da fração FMEM que inibiu o crescimento bacteriano em uma concentração em torno de 512 $\mu\text{g/mL}$. (ver tabela 03).

Tabela 03: *S. aureus* nas linhagens padrão ATCC e multiresistente SA 358, testada com os produtos naturais, todos os resultados estão em $\mu\text{g/mL}$

	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> (SA 358)
FMEM	≥ 1024	512
FCEM	≥ 1024	≥ 1024
EM	≥ 1024	≥ 1024
SAA	≥ 1024	≥ 1024
SNA	≥ 1024	≥ 1024

FM (Fração metanólica do extrato metanólico), FC (Fração clorofórmica do extrato metanólico), EM (Extrato metanólico), SAA (Solução aquosa alcaloídica), SNA (Solução aquosa não alcaloídica).

Teste da atividade moduladora da ação antibiótica

À atividade moduladora da ação antibiótica a fração metanol do extrato metanólico FMEM, em comparação com os antibióticos, canamicina, amicacina, neomicina e gentamicina, observaram-se os seguintes resultados: com relação à linhagem EC27, foi observado um efeito antagônico com o antibiótico canamicina, que foi capaz de inibir o microorganismo em uma concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$, mas quando em associação a FMEM teve o CIM aumentado quatro vezes (128 $\mu\text{g/mL}$), os demais antibióticos mostraram-se indiferentes com relação à inibição de crescimento dos microorganismos (Tabela 04).

Na linhagem de *Staphylococcus aureus* SA358, todos os antibióticos mostraram-se indiferentes quando associados com FMEM, com exceção a gentamicina que assim

como a canamicina em *E. coli* também demonstrou efeito antagônico quando associada com a FMEM, quando teve sua CIM aumentada quatro vezes (Tabela 04).

Tabela 04: teste da atividade modificadora da ação antibiótica da FMEM, com os antibióticos canamicina, amicacina e neomicina e gentamicina, todos os resultados em µg/mL.

Antibióticos	CIM EC27	FMEM (64 µg/mL) + antibiótico	CIM SA358	FMEM (64 µg/mL) + antibiótico
FMEM	≥ 1024	-	512	-
Canamicina	32	128	32	32
Amicacina	32	32	64	64
Neomicina	256	256	64	64
Gentamicina	64	64	256	1024

Fmem (Fração metanólica do extrato metanólico), CIM EC27 (Concentração inibitória mínima da linhagem multirresistente de *E.coli*) e CIM SA358 (concentração inibitória mínima da linhagem multirresistente de *S. aureus*).

Na fração clorofórmica de extrato metanólico (FCEM), os antibióticos canamicina, amicacina, neomicina e gentamicina, mostraram-se indiferentes quando associados a essa fração quanto testados com EC27, mantendo suas CIMs sem alterações significativas.

Para SA358 os testes com FCEM, demonstraram o seguinte resultado: os antibióticos canamicina, amicacina e neomicina, também foram indiferentes, a gentamicina apresentou efeito antagônico, tendo aumentando a sua CIM de 256 µg/mL, para um valor ≥1024 µg/mL (Tabela 05).

Tabela 05: Avaliação da Fração clorofórmica do extrato metanólico associada a antibióticos.

Antibióticos	CIM EC27	FCEM (64 µg/mL) + antibiótico	CIM SA358	FCEM (64 µg/mL) + antibiótico
FCEM	512	-	≥ 1024	-
Canamicina	128	128	64	64
Amicacina	32	32	64	64
Neomicina	256	256	32	32
Gentamicina	64	64	256	≥ 1024

Fcem (Fração clorofórmica do extrato metanólico), CIM EC27 (concentração inibitória mínima da linhagem multirresistente de *E. coli*) e CIM SA358 (concentração inibitória mínima da linhagem multirresistente de *S. aureus*).

O extrato metanólico (EM), os resultados com EC27, mostraram que os antibióticos canamicina, amicacina, neomicina e gentamicina, mostraram-se indiferentes, ou seja, não apresentaram alterações nas suas CIMs de forma clinicamente relevante. Em SA358, os antibióticos canamicina, amicacina e neomicina foram indiferentes, porém a gentamicina apresentou efeito antagônico, onde a sua CIM independente foi de 256 µg/mL, mas quando associada com o EM teve seu valor ampliado para 1024 µg/mL, o que representa um aumento de quatro vezes na sua CIM (tabela 06).

Tabela 06: Resultados dos testes com o Extrato Metanólico de *R. jimi*, com os antibióticos, mostrando os resultados em µg/mL.

Antibióticos	CIM EC27	EM (64 µg/mL) + antibiótico	CIM SA358	EM (64 µg/mL) + antibiótico
EM	512	-	≥ 1024	-
Canamicina	64	64	128	128
Amicacina	64	64	128	128
Neomicina	128	128	64	64
Gentamicina	64	64	256	1024

Em (extrato metanólico), CIM EC27 (concentração inibitória mínima da linhagem multirresistente de *E. coli*) e CIM SA358 (concentração inibitória mínima da linhagem multirresistente de *S. aureus*).

A solução aquosa alcaloídica (SAA), como pode ser observado na Tabela 07, não foi registrado nenhum tipo de atividade microbiológica para nenhuma das linhagens multirresistentes, quando os antibióticos foram associados com SAA, não houve alterações nos valores de suas CIMs.

Tabela 07: teste da atividade modificadora da ação antibiótica da Solução Aquosa Alcaloídica, onde todos os resultados obtidos estão em µg/mL.

Antibióticos	CIM EC27	SAA (64 µg/mL) + antibiótico	CIM SA358	SAA (64 µg/mL) + antibiótico
SAA	≥ 1024	-	≥ 1024	-
Canamicina	128	128	32	32
Amicacina	32	32	64	64
Neomicina	256	256	64	64
Gentamicina	32	32	512	512

Saa (solução aquosa alcaloídica), CIM EC27 (concentração inibitória mínima da linhagem multirresistente de *E. coli*) e CIM SA358 (concentração inibitória mínima da linhagem multirresistente de *S. aureus*).

Para a solução aquosa não alcaloídica (SNA), não foi observado nenhum tipo de atividade antimicrobiana com relação a EC27, permanecendo todas CIMs dos antibióticos sem alterações significativas. Para SA358, os antibióticos canamicina, amicacina, neomicina e gentamicina, mostraram-se indiferentes, como pode ser visto na tabela 08.

Tabela 08: teste da ação modificadora dos antibióticos com a solução aquosa não alcaloídica, mostrando todos os resultados em µg/mL.

Antibióticos	CIM EC27	SNA (64 µg/mL) + antibiótico	CIM SA358	SNA (64 µg/mL) + antibiótico
SNA	512	-	≥ 1024	-
Canamicina	32	32	64	64
Amicacina	16	16	64	64
Neomicina	128	128	64	64
Gentamicina	32	32	256	256

SNA (solução aquosa não alcaloídica), CIM EC27 (concentração inibitória mínima da linhagem multirresistente de *E. coli*) e CIM SA358 (concentração inibitória mínima da linhagem multirresistente de *S. aureus*).

DISCUSSÃO

Atividade Fototóxica

A exposição à luz UV-A demonstrou efeito sobre a atividade de três extratos contra *E. coli*, onde a atividade foi demonstrada por fração metanólica do extrato metanólico (FMEM), fração clorofórmica do extrato metanólico (FCEM) e solução aquosa não alcaloídica (SNA).

Muitas substâncias quando expostas a luz ultravioleta, são excitadas e exibem fototoxicidade, essas substâncias estão distribuídas ao longo de várias famílias de plantas e fungos, provavelmente podem desempenhar o papel de defesa contra o ataque de insetos e nematódeos ou contra a predação de herbívoros (Taylor et al., 1995; Berenbaum, 1995; Towers et al., 1997; Cheeptham & Towers, 2002; Kang et al., 2007).

Essa atividade consiste basicamente em dois mecanismos: (i) produção de radicais livres, que podem afetar diretamente o crescimento das células bacterianas, como as furocumarinas (Song & Tapley, 1979; Foote, 1991). (ii) a formação de isômeros opticamente ativos, que possam ser ativados na presença da luz, Provavelmente algum dos vários compostos presentes na pele de *R. jimi*, na presença da luz UV tem a propriedade de formar radicais livres ou isômeros que possuem atividade microbiológica.

A bioprospecção do extrato metanólico de *R. jimi* demonstrou a presença de vários compostos e provavelmente estas substâncias individualmente ou em associação são responsáveis pelo efeito fototóxico apresentado pelos compostos da pele de *R. jimi*, mas na literatura científica não existem relatos que tais compostos apresentassem esse tipo de atividade biológica. Provavelmente alterações nos índices de radiações UV, podem estar desempenhando um papel fundamental em relação à fauna de microorganismos associada à pele dos anfíbios, Belden & Harris. (2007) sugerem que

fatores bióticos e abióticos além das variações ambientais podem alterar a microbiota natural, conduzindo a distúrbios que como consequência direta pode tornar os anfíbios mais susceptíveis a infecções por patógenos. Harris et al. (2006, 2009) demonstraram que a fauna de bactérias possui uma função ecológica muito importante para a sobrevivência de algumas espécies de anfíbios, produzindo algumas substâncias que protegem o animal contra fungos patogênicos. Brucker et al. (2008) argumentam que apesar dessas bactérias produzirem esses compostos antifúngicos, uma competição entre bactérias e fungos patógenos também não poderia ser descartada, onde essas bactérias provavelmente desenvolveram um mutualismo com o anfíbio utilizando a sua pele como substrato e em contrapartida dificultam a colonização da pele por outros microorganismos. Apesar de que o principal tipo de radiação associada ao declínio de anfíbios ser a radiação UV-B, onde existem vários estudos demonstrando os efeitos nocivos desse tipo de radiação tanto de maneira individual como em sinergismo com outros fatores, nossos resultados sugerem que não somente a radiação UV-B pode estar associada ao declínio das comunidades de anfíbios já que a radiação UV-A em nossos testes demonstrou também causar efeitos danosos não a *R. jimi* diretamente, mas afetou significativamente bactérias e como demonstrado nos trabalhos de (Harris et al., 2006, 2009; ; Woodhams et al., 2007a,b; Brucker et al., 2008a, b) essas bactérias fornecem proteção adicional a esses organismos, onde podem protegê-los através da competição com outros organismos evitando assim a colonização da pele dos anfíbios assim como através da produção de compostos que dificultam o desenvolvimento desses organismos (Brucker et al., 2008).

Teste da atividade microbiológica frente a linhagens padrões ATCC

multirresistentes EC 27 de *E. coli*.

Os extratos de *R. jimi* demonstraram atividade microbiológica mais significativa em linhagens Gram negativas, contrariamente a extratos de origem vegetal que geralmente apresentam atividades mais significativas contra linhagens Gram positivas (Rabe & Van Staden, 1997; Afolayan, 2003), estes resultados podem indicar que os compostos que possuem atividade biológica na pele de *R. jimi* são diferentes dos compostos presentes em vegetais.

Avaliação da atividade moduladora da ação antibiótica.

Frente aos resultados, vemos que nenhum dos antibióticos quando em associação com os extratos e frações tiveram suas atividades biológicas potencializadas. Contudo o antibiótico canamicina (Tabela 4) teve sua ação inibida cerca de quatro vezes, quando associada à fração metanólica do extrato metanólico. A gentamicina também demonstrou antagonismo com três dos cinco produtos testados (FMEM, FCEM e EM), sendo assim o antibiótico a demonstrar maior interação com as substâncias da pele de *R. jimi*.

Trabalhos onde foram testados compostos oriundos de anfíbios em associação com antibióticos são escassos na literatura científica, resumindo-se ao trabalho de Giacometti et al. (2005), que testou a associação de três diferentes peptídeos com atividade antibiótica (Citropina 1.1, Margainina II e Temporina A) que são encontrados na pele de anfíbios em associação com antibióticos de uso comercial. Foi observado sinergismo entre esses peptídeos de anfíbios com os antibióticos Claritromicina, antibióticos betalactâmicos e Polimixina A. Porém o trabalho acima citado demonstra sinergismo ao contrário dos resultados obtidos a partir de compostos de *R. jimi* que

apontam para um antagonismo entre a associação de antibióticos e compostos da pele do anfíbio em estudo.

De certa forma não é normal se esperar de um composto presente na pele de um anfíbio apresentar atividade protetora contra linhagens bacterianas, já que a pele de um anfíbio e seus compostos tem como uma de suas principais funções defenderem o animal de ataques deferidos por organismos patogênicos.

Os resultados nos levam a imaginar que as substâncias presentes na pele de *R. jimi* protegem o animal contra o ataque de patógenos da seguinte maneira: como a pele dos anfíbios pelo fato de ser úmida e não queratinizada, pode tornar-se um ambiente propício ao desenvolvimento de microorganismos como os fungos, bactérias ou protozoários. Devido a isso há a necessidade do anfíbio produzir substâncias para se auto defender das ameaças microbiológicas. *R. jimi* aparentemente usa um mecanismo diferenciado onde as substâncias produzidas pela sua pele, atuam protegendo uma flora bacteriana associada a sua pele. Essas bactérias em contrapartida impediriam que a pele do anfíbio fosse colonizada por outros microorganismos, mantendo estável a fauna de microorganismo da pele do animal, essa hipótese é reforçada pelo fato dos compostos da pele de *R. jimi* inibirem a ação de aminoglicosídeos, que são compostos isolados inicialmente a partir de microorganismos actinomicetos, como podemos ver nas Tabelas 4, 5 e 6.

Embora existam alguns registros de *B. dendrobatidis* parasitando anfíbios da família Bufonidae, essa família parece ser menos susceptível ao parasitismo deste fungo, já que trabalhos de monitoramento do parasitismo de *B. dendrobatidis* como Toledo et al. (2006), que analisou girinos de 28 diferentes espécies de anfíbios e concluiu que entre as espécies parasitadas pelo fungo, nenhuma pertencia a família Bufonidae. Berger et al. (1999), ao analisar várias espécies de anfíbios australianas,

quanto ao parasitismo pelo *B. dendrobatidis* observou que esse fungo estava presente na pele de *Rhinella marinus* (*Bufo marinus*). Essa espécie de anfíbio não é endêmica do continente australiano e talvez esse fator possa ter influenciado o parasitismo pelo *B. dendrobatidis*. Já que em um ambiente diferente a fauna de insetos que é a base alimentar dos anfíbios muda consideravelmente. Conseqüentemente também deve provocar alterações na composição dos compostos com atividades biológicas nas peles desses animais, visto que muitos desses compostos não são sintetizados pelo animal, mas absorvidos a partir da alimentação, e mudanças no ambiente como mostrado por Saporito et al. (2006) afetam a composição, principalmente a de compostos como os alcalóides.

CONCLUSÕES

1. Os extratos e frações da pele de *Rhinella jimi* interagem de diferentes formas com linhagens, tanto para *E. coli*, como para *S. aureus*, tendo apresentado CIMs ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$ não são relevantes do ponto de vista clínico;

2. No teste da atividade modificadora da ação antibiótica, os produtos de *R. jimi* apresentam antagonismo com os antibióticos canamicina e gentamicina contra as linhagens multirresistentes EC27 e SA358. Esses resultados indicam que a microbiota associada à pele de *R. jimi*, pode estar sendo quimicamente protegida pelo anfíbio;

3. Os compostos presentes na pele de *R. jimi* apresentaram atividade fototóxica (Tabela 01), ou seja, na presença da luz esses produtos formaram radicais livres ou isômeros opticamente ativos, que tornaram-se tóxicos para as bactérias. Vários trabalhos vêm demonstrando que a radiação UV pode provocar vários danos fisiológicos graves em anfíbios, e esses danos podem variar de espécie para espécie assim como em diferentes estágios do ciclo de vida em muitos anfíbios (Bancroft et al., 2008; Blaustein et al., 1997, 2003 e 2005). Frente a esses dados podemos argumentar que o aumento da radiação UV possa estar relacionado com a alteração na fauna microbiana da pele dos anfíbios, já que como os dados de atividade fototóxica demonstraram que os compostos da pele de *R. jimi* não demonstraram atividade microbiológica, mas quando submetidos a presença da luz UV demonstraram-se tóxicos para bactérias e partindo-se do pressuposto de que as bactérias possam estar associadas a defesa contra outros microorganismos. No momento em que estas bactérias tenham seu crescimento comprometido, poderia portando abrir um caminho para o ataque de fungos patógenos, porém estudos adicionais são necessários para uma avaliação mais generalizada a fim de obter dados entre os diversos grupos de anfíbios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFOLAYAN, A.J. Extracts from the shoots of *Arctotis artotoides* inhibit the growth of bacteria and fungi. **Pharmaceutical Biology**, v.41 n.1, p. 22-25, 2003.

Amphibiaweb Species map: *Bufo jimi* 2009. Disponível em <http://berkeleymapper.berkeley.edu/run.php>. (acessado em 31/03/2009).

Amphibiaweb: Information on amphibian biology and conservation. [Web application]. 2009. Berkeley, California: Amphibiaweb. Available: <http://amphibianweb.org/> (acessado em 04/05/2009).

BANCROFT, B.A.; BAKER, N.J.; BLAUSTEIN, A.J. A meta analysis of the effects of ultraviolet B radiation and its synergistic interactions with pH, contaminants, and disease on amphibian survival. **Conservation Biology**, v.22 n.4, p. 987-996. 2008.

BEBBEE, T.J.C.; GRIFFITHS, R.A. The amphibian decline crisis a watershed for conservation Biology? **Biological Conservation**, v. 125 p. 271-285, 2005.

BELDEN, L.K.; HARRIS, R.N. Infectious diseases in wildlife: the community ecology context. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v.5 n.10 p. 533-539, 2007

BEREMBAUM, M. Phototoxicity of plant secondary metabolites: insect and mammalian perspectives. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 29, p. 119-134, 1995.

BERGER, L.; SPEARE, R.; DASZAK, P.; GREEN, D.E.; CUNNINGHAM, A.A.; GOGGIN, C.L.; SLOCOMBE, R.; RAGAN, M.A.; HYATT, A.D.; MCDONALD, K.R.; HINES, H.B.; LIPS, K.R.; MARANTELLI, G.; PARKES, H. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95 p. 9031-9036, 1998.

BERGER, L.; SPEARE, R.; HYATT, A.D. **Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions**. In: CAMPBELL, A. (ed) Declines and disappearances of Australian frogs. Environment Australia: Canberra. 23-33, 1999.

BLAUSTEIN, A.R.; HOKIT, D.G.; O'HARA, R.K.; HOLT, R.A. Pathogenic fungus contributes to Amphibian losses in the Pacific Northwest. **Biological Conservation**, v. 67 p 251-254, 1994a.

BLAUSTEIN, A.R. Chicken little or Nero's fiddle? A perspective on declining amphibian populations. **Herpetologica**, v 50 p 85-97, 1994b.

BLAUSTEIN, A.R.; KIESECKER, J.M.; CHIVERS, D.P. Anthony, R.G. Ambient UV-B radiation causes deformities in amphibian embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94 p. 13735–13737, 1997.

BLAUSTEIN, A.R.; ROMANSIC, J.M.; KIESECKER, J.M.; HATCH, A.C. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian populations declines. **Diversity and Distributions**, v.9 p. 123-140, 2003.

BLAUSTEIN, A.R.; BELDEN, L.K. Amphibian defenses against ultraviolet-B radiation. *Evolution & Development*, v.5 n.1 p. 89–97, 2003.

BLAUSTEIN, A.R.; ROMANSIC, J.M.; SCHEESSELE, E.A.; HAN, B.A.; PESSIER, A.P. LONGCORE, J.E. Interspecific Variation in Susceptibility of Frog Tadpoles to the Pathogenic Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Conservation Biology**, v.19 n 5 p.13735-13738, 2005.

BRUCKER, R.M.; BAYLOR, C.M.; WALTERS, R.L.; LAUER, A.; HARRIS, R.N.; MINBIOLE, K.P.C. The Identification of 2,4-diacetylphloroglucinol as an Antifungal Metabolite Produced by Cutaneous Bacteria of the Salamander *Plethodon cinereus*. **Journal of chemical ecology**, v.34 p.39–43, 2008(a).

- BRUCKER, R.M.; HARRIS, R.N.; SCHWANTES, C.R.; GALLAHER, T.N.; FLAHERTY, D.C.; LAM, B.A.; MINBIOLE, K.P.C. Amphibian Chemical Defense: Antifungal Metabolites of the Microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the Salamander *Plethodon cinereus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34 p.1422–1429, 2008(b).
- CEI J.M.; ERSPAMER, V.; ROSEGHIN, M. **Biogenic amines**. In: BLAIR, F.(Ed), Evolution in the genus *bufo*. University of Texas press, Austin/London, v.1 p. 233-243, 1972.
- CHEEPHAM, N.; TOWERS, G.H.N. Light – mediated activities of some Thai medicinal plant teas. **Fitoterapia**, v.73 p. 651-662, 2002.
- CULP, C.E.; FALKINHAM III, J.O.; BELDEN, L.K. Identification of the natural bacterium microflora on the skin of eastern newts, bullfrog tadpoles and redback salamanders. **Herpetologica**, v. 63 n. 1 p 66-71, 2007.
- 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.; 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*. **Toxicon**, v. 45 p. 777–782, 2005.
- DALY, J.W.; NOIMAI, N.; KONGKATHIP, B.; KONGKATHIP, N.; WILHAM, J.M.; GARRAFO, H.M.; KANEKO, T.; SPANDE, T.F.; NIMIT, Y.; NABHITABHATA, J.; CHAN-ARD, T. Biologically active substances from amphibians: preliminary studies on anurans from twenty-one genera of Thailand. **Toxicon**, v. 44 p. 805-815, 2004.
- DALY, J.W.; SPANDE, T.F.; GARRAFO, H.M. Alkaloids from amphibian skin: a tabulation of over eight-hundred compounds. **Journal of Natural Products**, v. 68 n.10 p. 1556-1575, 2005.

FOOTE, C.S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation, **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 54 p. 659, 1991.

FROST, D.L. Amphibian Species of the World: an online reference version 3.0 (22, August, 2004). (Disponível) <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. **American Museum of Natural History**, New York, USA, 2004.

GIACOMETTI, A.; CIRIONI, O.; KAMYSZ, W.; SILVESTRI, C.; LICCI, A.; RIVA, A.; LUKASIAK, J.; SCALISE, G. In vitro activity of amphibians peptides alone and in combination with antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens isolated from surgical wound infection. **Peptides**, v. 26 p. 2111-2116, 2005.

HARRIS, R.N.; JAMES, T.Y.; LAUER, A.; SIMON, M.A.; PATEL, A. Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* Is Inhibited by the Cutaneous Bacteria of Amphibian Species. **EcoHealth**, v. 3 p. 53–56, 2006.

HARRIS, R.N.; LAUER, A.; SIMON, M.A.; BANNING, J.L.; ALFORD, R.A. Addition of antifungal skin bacteria to salamanders ameliorates the effects of chytridiomycosis. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.83 p. 11–16, 2009.

HENRIQUES, A.T.; LIMBERGER, R.P.; KERBERV, A.; MORENO, P.R.H. **Alcalóides: Generalidades e aspectos básicos**. IN: Farmacognosia da planta ao medicamento. Organizadores: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. 6ª ed, **Editora da UFRGS**, Pp 651-666, 2007.

HICKMAN JR, C.P.; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. Princípios integrados de Zoologia, **Guanabara Koogan**, Ed: 11ª, pp 846, 2003.

IPECE-Instituto de Pesquisa Estratégica Econômica do Ceará, perfil básico municipal. Governo do Estado do Ceará, Secretaria do Planejamento e Coordenação, 2005.

JAVADPOUR, M.M.; JUBAN, M.M.; LO, W.C.; BISHOP, S.M.; ALBERTY, J.B.; COWELL, S.M.; BECKER, C.L.; MCLAUGHLIN, M.L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39 p. 3107–3113, 1996.

KANG, S.J.; KIM, S.H.; LIU, P.; JOVEL, E.; TOWERS, G.H.N. Antibacterial activities of some mosses including *Hylocomium splendens* from South Western British Columbia, **Fitoterapia**, v.78 p. 373-376, 2007.

LAUER, A.; SIMON, M.A.; BANNING, J.L.; ANDRÉ, E.; DUNCAN, K.; HARRIS, R.N. Common cutaneous bacteria from the Eastern Red-Backed salamander can inhibit pathogenic fungi. **Copeia**, v.3 p.630-640, 2007.

LAUER, A.; SIMON, M.A.; BANNING, J.L.; LAM, B.A.; HARRIS, R.N. Diversity of cutaneous bacteria with antifungal activity isolated from female four-toed salamanders. **International Society for Microbial Ecology**, v.2 p. 145-157, 2008.

LOPEZ, A.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H.N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77 p.189 –196, 2001.

MACIEL, N.M.; SCHWARTZ, C.A.; PIRES JÚNIOR, O.R.; SEBEN, A.; CASTRO, M.S.; SOUSA, M.V.; FONTES, W.; SCHWARTZ, E.N.F. Composition of indolealkylamines of *Bufo rubescens* cutaneous secretions compared to six other Brazilian bufonids with phylogenetics implications. **Comparative Biochemistry and Physiology part B**, v.134 p. 641-649, 2003.

MACIEL, N.M.; BRANDÃO, R.A.; CAMPOS, L.A.; SEBEN, A. A large new species of *Rhinella* (Anura : Bufonidae) from Cerrado of Brazil. **Zootaxa**, v. 1627 p. 23-29, 2007.

MACIEL, N.M. **Sistemática e Biogeografia do grupo *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) (Anura : Bufonidae)**. Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biológicas Universidade de Brasília. 2008.

MANN, C.M.; MARKHAN, J.L. A new method for determine the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of applied Microbiology**, v. 84 p.538-544, 1998.

MATOS, F.J.A. Introdução à fitoquímica experimental. Fortaleza: ED-UFC, 2000.

MORTARI, M.R.; SCHWARTZ, E.N.F.; SCHWARTZ, C.A.; PIRES JR, O.R.; SANTOS, M.M.; BLOCH JR. C.; SEBBEN, A. Main alkaloids from the Brazilian dendrobatidae frog *Epipedobates flavopictus*: pumiliotoxin 251D, histrionicotoxinand decahydroquinolines. **Toxicon**, v.43 p.303–310, 2004.

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 5^a ed. Villanova, PA: NCCLS approved standard M7-A5, v. 20, n. 2, 2000.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and unexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46 n.8 p. 2720-2722, 2002.

PESSIER, A.P.; NICHOLS, D.K.; LONGCORE, J.E.; FULLER, M.S. Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates spp*) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 11 p.194-199, 1999.

PRAMUK, J.B. **The systematic of South American toads (Anura : Bufonidae)**. PhD dissertation University of Kansas, Laurence, Kansas. 2004.

PRAMUK, J.B. Phylogeny of South American *Bufo*(Anura:Bufonidae) inferred from combined evidence. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.146 p. 407-452, 2006.

PRAMUK, J.B.; ROBERTSON, T.; SITES, J.; NOONAM, B. Around the world in 10 million years: Biogeography of the nearly cosmopolitan true toads (Anura: Bufonidae). **Global Ecology and Biogeography**, v. 17. P.72-83. 2008.

RABE, T.; VAN STADEN, J. Antimicrobial activity of South African plants used for medical purposes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.56 p. 81-87, 1997.

RACHOWICZ, L.J.; HERO, J.M.; ALFORD, R.A.; TAYLOR, J.W.; MORGAN, J.A.T.; VREDENBURG, V.T.; COLLINS, J.P.; BRIGGS, C.J. The novel and endemic pathogen hypotheses: Competing explanations for the origin of emerging infectious diseases of wildlife. **Biological Conservation**, v. 19 p.1441-1448, 2005.

SAPORITO, R.A.; DONNELLY, M.A.; GARRAFO, M.H.; SPANDE, T.F.; DALY, J.W. Geographic and seasonal variation in alkaloid-based chemical defenses of *Dendrobates pumilio* from Bocas del Toro, Panama **Journal of chemical ecology**, v. 32 p. 795–814, 2006.

SATO, Y.; SHIBATA, H.; ARAI, T.; YAMAMOTO, A.; OKIMURA, Y.; ARAKAKI, N.; HIGUTI, T. Variation in synergistic activity by flavone and its related compounds on the increased susceptibility of various strains of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* to β – lactam antibiotics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 28-35, 2004.

SONG, P.S.; TAPLEY, K.J. Photochemistry and photobiology of psoralens, **Journal of Photochemistry Photobiology**, v. 29 p.1177-1197, 1979.

Spatialepidemiology.net/bd-maps. Disponível: <http://www.spatialepidemiology.net/bd/>, data de acesso 13/03/2009.

STEVAUX, M.N. The new species of *Bufo* (Anura, Bufonidae) in the Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.19 n 1 p. 235-242, 2002.

TAYLOR, R.S.; MANADHAR, N.P.; TOWERS, G.H.N. Screening of selected medicinal plants of Nepal for antimicrobial activities, **Journal of ethnopharmacology**, v.46 p. 153-159, 1995.

TEMPONE, A.G.; PIMENTA, D.C.; LEBRUN, I.; SARTORELLI, P.; TANIWAKI, N.N.; ANDRADE –JÚNIOR, H.F.; ANTINIAZZI, M.M.; JARED C. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* paratoid macrogland secretion. **Toxicon**, v.52 p. 13-21, 2008.

TOLEDO, L.F.; BRITTO, F.B.; ARAÚJO, O.G.S.; GIASSONI, L.M.O.; Haddad, C.F.B. The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and the inclusion of 17 new cases of infection. **South American Journal of Herpetology**, v. 1 n.3 p. 185-191, 2006.

TOWERS, G.H.N.; PAGE, J.; HUDSON, J.B. Light – Mediated Biological activities of natural products from plants and fungi, **Current Organic Chemistry**, v.1 p. 395 –414, 1997.

WINGENDER, J.; NEU, T.R.; FLEMMING, H.C. **What are bacterial extracellular polymeric substances?** In: Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function. Organization: WINGENDER, J.; NEU, T.R.; FLEMMING, H.C. 1ª ed, **Springer**, Pp 1-19, 1999.

WOODHAMS, D.C.; VREDENBURG, V.T.; SIMON, M.A.; BILLHEIMER, D.; SHAKHTOUR, B.; BRIGGS, Y.S.C.J.; ROLLINS-SMITH, L.A.; HARRIS, R.N.

Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. **Biological Conservation**, v.138 p.390-398, 2007a.

WOODHAMS, D.C.; ROLLINS-SMITH, L.A.; ALFORD, R.A.; HARRIS, R.N. Innate immune defenses of amphibian skin: antimicrobial peptides and more. **Animal Conservation**, v. 10 p. 425-428, 2007b.