

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL

JUCELI MARIA DA SILVA FRANÇA

**A COMPOSIÇÃO DO VENENO DO SAPO-CURURUZINHO
MUDA DE ACORDO COM A SUA DIETA?**

Alfenas/MG

2015

JUCELI MARIA DA SILVA FRANÇA

**A COMPOSIÇÃO DO VENENO DE SAPO-CURURUZINHO
MUDA DE ACORDO COM A SUA DIETA?**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Tecnologia Ambiental para o Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Diversidade Biológica e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Arab Olavarrieta

Coorientador: Prof. Dr. Vinícius Xavier da Silva

Alfenas/ MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

França, Juceli Maria da Silva.

A composição do veneno do sapo-cururuzinho muda de acordo com sua dieta? / Juceli Maria da Silva França. -- Alfenas/MG, 2015. 59 f.

Orientador: Alberto José Arab Olavarrieta.

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Tecnologia Ambiental) - Universidade Federal de Alfenas, 2015.
Bibliografia.

1. Bufanolídeos - toxicidade. 2. Formigas. 3. Bufonidae - fisiologia.
I. Arab Olavarrieta, Alberto José. II. Título.

CDD 597.87



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ecologia e Tecnologia Ambiental
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas - MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1379(Coordenação) / (35) 3299-1392 (Secretaria)
www.unifal-mg.edu.br/ppgecoambiental/



JUCELI MARIA DA SILVA FRANÇA

“A composição do veneno do sapo-cururuzinho muda de acordo com a sua dieta?”

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Pesquisa: Meio Ambiente Sociedade e Diversidade Biológica.

Aprovada em 28 de agosto de 2015.

Prof. Dr. Alberto José Arab Olavarrieta

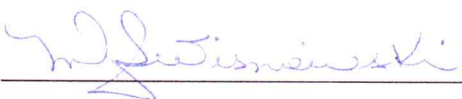
Instituição: UFABC

Assinatura: 

Prof.^a Dra. Maria José dos Santos

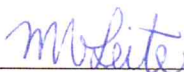
Wisniewski

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof.^a Dra. Melissa Vieira Leite

Instituição: Cesep

Assinatura: 

À Deus, minha família, amigos, colegas de trabalho e orientadores pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

À Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

À coordenação do curso de Pós Graduação pela política de incentivo à produção acadêmica.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alberto José Arab Olavarrieta, pela orientação, críticas e por acreditar em mim, me socorrendo sempre que precisei e por contribuir para meu crescimento profissional.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Vinícius Xavier da Silva por estar presente nos momentos mais difíceis, me aconselhando, incentivando e acreditando no futuro deste projeto. Você foi como um paião para mim, um exemplo a ser seguido!

A minha colaboradora e amiga Prof. Dr^a Daniela Chagas Paula, pela paciência e dedicação ao trabalho, pessoas como você deveriam sempre estar presentes em nossas vidas, nos transmitindo paz e confiança, aprendi muito com você.

À professora Prof. Dr^a Marisi Gomes Soares pela colaboração nas análises químicas e pelo apoio incondicional. A você toda minha gratidão e respeito.

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo. Meus pais Paulo e Fátima meus pilares, obrigada por todo apoio, compreensão e auxílio de forma incondicional. Cada um me ajudou de uma forma, por isso agradeço a todos. Muita coisa não seria possível sem vocês.

Ao meu esposo Edson e minha filha Nathália. Com grande amor, carinho e compreensão, vocês participaram de forma decisiva neste trabalho. O que seria de mim sem vocês?! Agora, além do amor um pelo outro, partilhamos também o amor pelos sapos! Amo muito vocês!!

Ao meu amigo e quase irmão Edimar, por comemorar comigo todas as conquistas e chorar ao meu lado nos momentos difíceis. Crescemos juntos nessa caminhada!

As minhas amigas queridas Ana Raíssa e Daniele, por estarem sempre presentes me aconselhando e apoiando sempre que possível. Meninas, continuaremos a percorrer todo o

caminho unidas.

À Flávia, minha companheira, meu porto-seguro, que me ajudou nesses anos, torceu por mim, e aprendeu a gostar das minhas *Rhinellas ornatas*.

Aos meus amigos que me ajudaram nas coletas de campo e com meus sapos no laboratório, Marcela, Bia, Mayara e Guilherme, sem vocês o trabalho seria praticamente impossível. Essa conquista é de vocês também, muito obrigado!

A técnica de laboratório Julieta pela amizade e por me ajudar sempre que precisei.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá) ”.



RESUMO

A maioria dos anfíbios utilizam compostos químicos contra predadores e parasitas. Em algumas espécies, estes compostos são sintetizados por glândulas especializadas, no entanto, alguns anuros são conhecidos por sequestrar compostos defensivos de suas presas. Há várias evidências de sequestro defensivo em sapos dendrobatídeos, no entanto estudos com sapos bufonídeos ainda são escassos. *Rhinella ornata* (Bufonidae) é um sapo comum no Sudeste do Brasil, que está ameaçado pela fragmentação florestal. De acordo com os resultados anteriores, esta espécie alimenta-se exclusivamente por formigas da espécie *Pachycondyla striata* (Ponerinae). O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre a composição de veneno de *R. ornata* e sua dieta sob condições de laboratório. Os sapos foram capturados a partir de fragmentos florestais localizados em Alfenas-MG e transferidos para o laboratório onde as amostras de veneno foram extraídas por compressão das glândulas paratóides. Em seguida, os sapos foram mantidos em laboratório durante três meses com uma dieta artificial consistindo de moscas da fruta e minhocas. Durante este período, foram extraídas amostras de veneno após uma semana e depois mensalmente. A composição química do veneno das formigas *P. striata* também foi caracterizada. Todas as amostras foram purificadas e analisadas utilizando HPLC-UV-MS. Os nossos resultados mostraram que a composição química do veneno foi alterado significativamente após uma semana em cativeiro. Portanto, a especialização da dieta nesta espécie está intimamente relacionada com a composição do seu veneno. Além disso, os perfis químicos do veneno do sapo e da formiga mostrou substâncias distintas, sugerindo que *R. ornata* sequestra e biotransforma substâncias de suas presas.

Palavras-Chave: Defesa química. Formigas. Sequestro defensivo. Bufonidae.

ABSTRACT

Most amphibians use chemical compounds against predators and pathogens. In some species, these compounds are synthesized in specialized glands, however, some anurans are known to sequester defensive compounds from their preys. There are several evidences of sequestering by Dendrobatidae frogs; however, studies with Bufonidae are scarce. *Rhinella ornata* (Bufonidae) is a common toad in Southeastern Brazil, which is threatened by forest fragmentation. According to previous results, this species feeds exclusively on the stinging ant *Pachycondyla striata* (Ponerinae). The objective of this study was to evaluate the relationship between the composition of the venom of *R. ornata* and the diet under laboratory conditions. Frogs were captured from forest fragments located in Alfenas-MG and transferred to the laboratory where venom samples were extracted by compressing the paratoid glands. Afterwards, the frogs were kept in the laboratory during three months with an artificial diet consisting of fruit flies and earthworms. During this period, venom samples were extracted after one week and then monthly. The chemical composition of the *P. striata* ants was also characterized. All the samples were purified and analyzed using a HPLC-UV-MS. Our results showed that chemical composition of the venom was significantly altered after one-week in captivity. Therefore, diet specialization in this species is intimately associated with its poison composition. Furthermore, chemical profiles of the venom and the ant showed distinct substances suggesting that *R. ornata* sequester and modified substances from their prey.

Keywords: Chemical defense. Ants. Defensive hijacking. Bufonidae.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	Os anfíbios e as funções de seu tegumento.....	13
2.2	A composição do veneno em anfíbios.....	14
2.3	Sequestro químico defensivo.....	17
2.4	Hipótese da dieta-toxicidade.....	19
2.5	Bufonidae como modelo alternativo para testar a hipótese da dieta-toxicidade em anfíbios.....	20
2.6	As espécies-alvo do presente estudo.....	22
3	OBJETIVOS.....	25
3.1	Objetivo geral.....	25
3.2	Objetivos específicos.....	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1	Coleta das amostras.....	26
4.2	Análise da composição química dos venenos de <i>R. ornata</i> e <i>P. striata</i>.....	28
4.3	Preparo das amostras para análise de composição química e análise qualitativa.....	29
5	RESULTADOS.....	31
6	DISCUSSÃO	44
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

As defesas químicas em anfíbios representam um conjunto de adaptações defensivas que atuam na proteção contra predadores, parasitas e microrganismos (SAVITZKY et al., 2012). Apesar de comuns, existe uma enorme complexidade envolvida quanto à origem evolutiva e ecológica dessas adaptações (BERENBAUM et al., 1995). Geralmente esses compostos químicos de defesa são sintetizados no corpo do próprio organismo, porém alguns animais são capazes de sequestrar esses compostos a partir da dieta (DALY et al., 1994). Entre esses compostos químicos estão alguns grupos de alcaloides lipofílicos que são sequestrados a partir de artrópodes (DALY et al., 1994; DALY; SPANDE; GARRAFO, 2005).

Uma grande variedade de alcaloides lipofílicos é observada em alguns grupos de animais. Este é o caso dos anfíbios com mais de 850 alcaloides divididos em mais de 20 classes estruturais. Esses alcaloides representam um grande arsenal de defesa distribuído em glândulas presentes na sua pele, a grande maioria deles é proveniente da dieta de formigas e ainda não foi encontrada em outros lugares da natureza (DALY; SPANDE; GARRAFO, 2005; SAPORITO et al., 2012).

Nos anfíbios anuros (Anura), cinco famílias possuem defesas químicas providas da dieta: Dendrobatidae, Bufonidae, Mantellidae, Myobatrachidae e Eleutherodactylidae (SAPORITO et al., 2012). Geralmente esses anuros apresentam colorações aposemáticas que servem como um alerta visual para seus predadores (DARST, 2006). Experimentos sobre alimentação em algumas famílias, principalmente nos dendrobatídeos, demonstraram que várias espécies adquirem suas defesas químicas sequestrando esses compostos e/ou seus precursores dos artrópodes que consomem (SAPORITO et al., 2012). Porém, dois aspectos ainda não foram totalmente compreendidos sobre o sequestro defensivo: sua abrangência filogenética e quanto tempo depois de deixar a dieta natural, os indivíduos mantêm a composição original do veneno (DARST et al., 2005).

O grupo-irmão dos Dendrobatidae, a família Bufonidae, também apresenta características interessantes sobre sequestro defensivo através da dieta (DALY; SPANDE; GARRAFO, 2005). Esse grupo pode ser usado como um modelo alternativo aos Dendrobatidae por ser filogeneticamente muito próximo, extremamente abundante e mais comum no Centro-sudeste do Brasil enquanto os dendrobatídeos dominam na região Centro-norte do país. Essas duas famílias dividem um ancestral comum exclusivo, provavelmente muito semelhante ao fóssil chamado *Agastrophrynia* (FROST et al., 2006). A maioria dos bufonídeos apresenta na

composição de seu veneno certos compostos orgânicos tóxicos representados principalmente por peptídeos com ação citotóxica e citolítica, assim como também alcaloides, amins biogênicas e esteroides bufadienolídeos (SEBBEN et al., 1993; SCHWARTZ et al., 2005).

Um bufonídeo muito comum na região Sudeste do Brasil é o sapo–cururuzinho, *Rhinella ornata*, uma das espécies do antigo grupo *Bufo crucifer* (BALDISSERRA et al., 2004). Para alguns autores essa espécie geralmente associada a ambientes florestais costuma ser extremamente abundante nas comunidades e, com hábito exigente, pode ser considerada uma potencial bioindicadora de qualidade ambiental (DIXO; VERDADE, 2006). Outros autores, contudo, defendem que essa espécie apresenta hábito generalista e grande capacidade de dispersão, o que lhe permite ocupar ambientes alterados pelo homem (BERTOLUCI et al., 2009; RIBEIRO-JÚNIOR; BERTOLUCI, 2009). Além dessa controvérsia, e mesmo sendo muito comum nos ambientes em que habita, a origem de seus compostos defensivos ainda não foi estudada.

De acordo com estudos ainda não publicados de Pereira (2013), *R. ornata* alimenta-se quase que exclusivamente de formigas *Pachycondyla striata* (subfamília Ponerinae). Essas formigas são relativamente grandes, com colônias não muito numerosas e possuem um ferrão com potente veneno, que as tornam excelentes predadoras (SANTANA, 2008). Essas informações indicam que *R. ornata* caça essa formiga ativa e especificamente.

A proposta básica deste estudo é testar a hipótese que envolve a relação formiscivoria-sequestro defensivo, ou seja, é através da dieta a base de formigas que *R. ornata* consegue elaborar seu veneno? A expectativa aponta para uma resposta positiva. Sugere-se também, que a composição do veneno deste anuro deve variar na ausência de *P. striata* da dieta.

Os resultados obtidos contribuem para ampliar o entendimento sobre como os anfíbios obtêm compostos químicos para a elaboração de suas toxinas e assim compreender uma possível relação entre tipo de dieta e uma especificidade fisiológica. Além disso, esse estudo é pioneiro no que se refere à composição química do veneno de ambas as espécies (*R. ornata* e *P. striata*). A identificação de tais substâncias representa um grande avanço científico em uma área que fica justamente na interface entre duas grandes ciências: ecologia química.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente revisão bibliográfica está organizada em tópicos de acordo com o assunto proposto no título da dissertação para o melhor entendimento da referida pesquisa científica.

2.1 Os anfíbios e as funções de seu tegumento

Dentre os grupos de vertebrados vivos atualmente, os anfíbios foram os primeiros a conquistar o ambiente terrestre há cerca de 390 milhões de anos. Essa conquista, porém, não foi completa, já que muitos dependem da água para reprodução. Seus ovos gelatinosos não-amnióticos são sensíveis à dessecação (POUGH; JANIS; HEISER, 2008; RETALLAK, 2011). Atualmente esses anfíbios pertencem à subclasse Lissamphibia, constituída por três ordens: Anura, representada pelos sapos, rãs e pererecas, Urodela representada pelas salamandras e tritões, e Gymnophiona, que são as cobras-cegas ou cecílias (POUGH; JANIS; HEISER, 2008).

O Brasil possui a maior biodiversidade de anfíbios do mundo com 1026 espécies descritas, sendo a ordem Anura a mais representativa e diversificada, apresentando 988 espécies (SEGALLA et al., 2014). Atualmente, o número de anfíbios no mundo todo vem sendo reduzido em decorrência de diferentes impactos provocados pela ação antrópica, como o aquecimento global, fragmentação de habitats, rarefação da camada de ozônio, etc. (HAYES et al., 2010; LEMES; MELO; LOYOLA, 2014). Desses impactos, as mudanças climáticas compreendem uma das maiores ameaças à biodiversidade de anfíbios, principalmente entre aquelas espécies que vivem na Mata Atlântica e que representam cerca de 18% de todas as espécies desses animais na América do Sul (LEMES; MELO; LOYOLA, 2014).

Segundo estimativa de Lemes, Melo e Loyola (2014), os locais climaticamente adequados para a sobrevivência desses anfíbios na Mata Atlântica deverão diminuir até o ano de 2050 e, como resultado, cerca de 12% das espécies deste grupo deverão entrar em extinção. Essa susceptibilidade associada a outras características biológicas do grupo, tais como: ectotermia, ciclo de vida bifásico, dependência da água para reprodução, padrão de desenvolvimento embrionário, pele permeável, baixa capacidade de dispersão e alta filopatria tornam os anfíbios fortes candidatos a bioindicadores da qualidade ambiental (extremos de temperatura, poluição, escassez e falta de oxigenação da água) (VITT et al., 1990; ANDREANI et al., 2003; HASLAM et al., 2014).

Muitas dessas características são exercidas pela pele dos anfíbios e são vitais para a sua sobrevivência, entre as quais se destaca a respiração, o transporte de solutos, a regulação da temperatura corpórea e a defesa contra patógenos e predadores (LEITE et al., 2005; POUGH;

JANIS; HEISER, 2008). O interesse pela pele desses animais tem aumentado em várias áreas do conhecimento, como neurociência, embriologia, ecologia, genética e evolução por diversas razões: regeneração de tecidos, transporte de íons, crescimento e diferenciação de suas células epiteliais, evolução de sua fisiologia e como modelo de túbulo renal em vertebrados (LILLYWHITE, 2006; YOSHIDA et al., 2013; HASLAM et al., 2014). Além disso, a pele pode ser utilizada também em pesquisas sobre sua composição química, pois poucos estudos tem explorado e determinado a atividade farmacológica de muitos compostos de sua secreção cutânea (SCHWARTZ et al., 2005). Mas como essa adaptação surgiu na pele dos anfíbios?

A superfície externa do corpo dos anfíbios deve ser mantida em constante umidade por meio de glândulas mucosas, estado favorável para a realização da difusão de gases respiratórios, condição para a respiração cutânea (SEBBEN; SHWARTZ; CRUZ, 1993). A permeabilidade da pele associada a altas temperaturas e taxas de umidade características dos ambientes em que vivem tornariam os anfíbios alvo fácil de vírus, bactérias e fungos através de seu tegumento. A defesa que foi selecionada contra esses patógenos foram glândulas granulosas (ou serosas) em sua pele, também conhecidas como glândulas de veneno, responsáveis pela síntese e armazenamento de uma diversidade de compostos químicos com funções antibióticas (SCHWARTZ et al., 2005; HONORATO, 2009; FONTANA, 2012).

Essas glândulas podem ser encontradas agrupadas em estruturas conhecidas como verrugas ou estruturas multiglandulares chamadas de paratóides (JARED et al., 2009). A presença dessas glândulas de veneno é compartilhada por todos os anfíbios atuais (POUGH; JANIS; HEISER, 2008). As secreções cutâneas sintetizadas nessas glândulas de veneno vem sendo uma opção aos antibióticos atualmente comercializados quando isolados de suas secreções devido à resistência que várias gerações de bactérias têm demonstrando aos antibióticos atualmente comercializados (HONORATO, 2009; FONTANA, 2012).

2.2 A composição do veneno em anfíbios

Desde a antiguidade, os sapos eram conhecidos como animais muito venenosos. Na Ásia, durante muitos anos, utilizou-se a toxina de sapos do gênero *Bufo* em preparados para tratamentos de diversas doenças como sinusite, inflamações locais e até mesmo como drogas cardiotônicas. Este foi, possivelmente, o primeiro uso de toxinas de origem animal na farmacoterapia (SEBBEN et al., 1993; TOLEDO; JARED, 1995). Há determinados tipos de

compostos presentes na pele de rãs, por exemplo, que também são encontrados em seres humanos (HASLAM et al., 2014).

As secreções encontradas na pele de sapos apresentam em sua constituição uma complexa mistura de peptídeos bioativos protegendo os mesmos de seus patógenos e predadores. Além disso, esses mesmos peptídeos conseguem inibir outros tipos de patógenos como a infecção pelo vírus do HIV (BRADBURY, 2005). Experiências *in vitro* demonstraram que os peptídeos presentes na pele de determinados sapos conseguem eliminar o vírus do HIV quando ainda se encontra dentro das células T dendríticas, impedindo que se espalhe com maior facilidade pelo sistema imunológico. Essa ação pode ser de grande importância para o desenvolvimento de métodos de prevenção da doença (VANCOMPERNOLLE, 2005; BRADBURY, 2005). Além de exercerem o papel antiviral, certos peptídeos oferecem vantagens únicas também na ação antitumoral ou anti-inflamatória (HASLAM et al., 2005; RAGHAVAN et al., 2010).

Raghavan et al. (2010) demonstraram que a pele das rãs *Hoplobatrachus* sp. possuía certos componentes lipídicos que exercem um importante papel no processo de cicatrização de feridas, acelerando a cura devido às suas características antiinflamatórias. Segundo esses autores, alguns compostos químicos presentes na pele dessas rãs auxiliam também na capacidade de proliferação e desenvolvimento de células da derme e epiderme.

Essas secreções cutâneas encontradas na pele dos anfíbios podem também variar entre espécies de forma qualitativa ou quantitativa, e são utilizadas na defesa contra predadores e parasitas (JARED et al., 2009; FONTANA, 2012). Os anfíbios detêm várias adaptações morfológicas, comportamentais e fisiológicas contra seus predadores (TOLEDO, 2005). Essas adaptações podem variar desde colorações fortes servindo como alerta, um tegumento que se confunde com o habitat em que o animal vive (camuflagem), até a capacidade de inflar seus pulmões, aumentando assim o tamanho do seu corpo e expondo ainda mais suas glândulas paratóides (TOLEDO, 2011; FONTANA, 2012). Para que ocorra um possível envenenamento do predador, essas glândulas devem sofrer uma compressão mecânica externa pelo predador ao abocanhar a presa. Como consequência, o veneno entra em contato com a mucosa oral do predador, caracterizando assim um envenenamento passivo, ou seja, não são os anfíbios que decidem expelir voluntariamente o veneno de suas glândulas (FONTANA, 2012).

Uma exceção a esta regra foi constatada recentemente por pesquisadores do Instituto Butantã em uma espécie de bufonídeo Amazônico, *Rhaebo guttatus*. Essa espécie ao se sentir ameaçada ativa um mecanismo que esguicha seu veneno voluntariamente através de

movimentações de seu corpo causando a compressão de suas glândulas paratóides, comportamento totalmente diferente dos outros bufonídeos. Apesar de ser uma espécie descrita há cerca de 200 anos, tal comportamento de defesa permaneceu desaperecebido até o momento (JARED et al., 2011).

A composição do veneno dos anfíbios é um verdadeiro coquetel de substâncias que varia bastante, mas em geral esses venenos costumam ser constituídos por amins biogênicas, esteroides, peptídeos e alcaloides, cuja consequência farmacológica pode variar desde efeitos cardiotóxicos, neurotóxicos e até mesmo anestésicos, servindo como mecanismo de defesa. Geralmente algumas dessas substâncias apresentam efeito citotóxico, que inibe a respiração celular, provocando hemólise e lesões neuronais em seus predadores (TOLEDO; JARED, 1995).

Conforme Dmitrieva et al. (2000), os esteroides ou bufadienolídeos são sintetizados a partir do colesterol e encontrados na maioria dos anuros da família Bufonidae como em *Rhinella jimi* e *Rhinella schneideri* (SCIANI et al., 2013). Eles compostos dividem-se em bufogeninas e bufotoxinas, ambos possuindo um papel cardiotóxico e cardioacelerador, que elevam os batimentos cardíacos e a pressão arterial de seus predadores (FLIER et al., 1980; TOLEDO; JARED, 1995). As bufogeninas possuem também a capacidade de bloqueio de enzimas $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPases}$, servindo provavelmente como método de defesa para algumas espécies dos gênero *Bufo* e *Atelopus* (FLIER et al., 1980).

Os bufadienolídeos quando isolados podem apresentar ação antitumoral. Isso foi observado com utilização da tradicional droga chinesa Ch'na Su, produzida a partir de secreções da pele de *Bufo gargarizans* e *Bufo melanostictus* (NOGAWA et al., 2001). Além disso, possuem também uma grande capacidade de ação contra a leucemia promielocítica aguda HL-60 humana, aumentando a importância da caracterização dessas substâncias na área científica (CUNHA FILHO et al., 2010).

As amins biogênicas são encontradas em quase todas as famílias de anfíbios e são classificadas em quatro grupos: indolalquilaminas, imidas-zolalquilaminas, monohidroxi-fenilalquilaminas e catecolaminas, sendo a maioria delas já conhecida estruturalmente e tendo seu papel farmacológico identificado (SCHWARTZ et al., 2005). A serotonina, por exemplo, é uma amina encontrada tanto nos anfíbios quanto em alguns vegetais, porém os anfíbios conseguem além de sintetizar, armazenar esses compostos em grandes quantidades em suas peles (SEBBEN et al., 1993).

Apresentando um anel heterocíclico com nitrogênio, os alcaloides são encontrados em grandes quantidades em sapos da família Dendrobatidae variando entre populações de uma mesma espécie de forma qualitativa e quantitativa (SAPORITO et al., 2012). A presença dessas substâncias está geralmente relacionada com a dieta e com estratégias de defesa para esses animais (DALY et al., 1994).

2.3 Sequestro químico defensivo

Em diversos grupos animais defesas químicas são muito comuns, apesar de toda a complexidade envolvida elas surgem como adaptações para escapar de predadores ou evitar parasitas (SAVITZKY et al., 2012). Os anfíbios anuros, porém, se destacam neste quesito (BERENBAUM et al., 1995). Frequentemente na natureza os animais conseguem sintetizar suas próprias defesas químicas fisiologicamente, mas existem aqueles que por algum motivo durante sua evolução conseguiram encontrar meios para se defender sequestrando essas defesas de outras fontes, ou seja, através da dieta (TERMONIA et al., 2001).

O sequestro de compostos químicos através da dieta engloba certos fatores complexos, que exigem estudos mais detalhados para compreender sobre seu funcionamento, como a captação, acumulação, transporte e também armazenamento dos mesmos, já que são originalmente produzidos e alguns estão presentes em outros organismos podendo ocorrer de maneira seletiva e, em alguns casos, de maneira ativa, absorvendo, armazenando e acumulando toxinas de outros organismos, ou passiva por síntese metabólica, através da expressão dos genes (MEBS, 2001).

Esse tipo de sequestro defensivo vem sendo muito estudado entre os invertebrados, porém existem poucos estudos documentados relacionados aos vertebrados. Recentemente, casos que envolvem sequestro defensivo incluindo diversas linhagens de anfíbios, répteis e aves vem aumentando, mas entre os vertebrados, os anfíbios são o grupo mais estudado (SAVITZKY et al., 2012). Na maioria desses estudos, o sequestro de toxinas defensivas tem sido descrito em animais ectotérmicos, entretanto, pesquisas realizadas em três espécies de aves endêmicas da região da Nova Guiné, dos gêneros *Pitohui* e *Ifrita* encontraram o alcaloide esteroideal homobatracotoxina (DUMBACHER et al., 1992). Segundo os mesmos autores, concentrações deste alcaloide variam entre as três espécies, sendo encontrado em quantidades mais elevadas nas penas e na pele. Esse tipo de alcaloide foi também encontrado em espécies tropicais do

gênero de anfíbios anuros *Phylllobates*, o que indica que o sequestro dessa classe de alcaloides evoluiu independentemente em aves e anfíbios (DUMBACHER et al., 1992).

Algumas serpentes também possuem a capacidade de sequestrar toxinas dos anfíbios. É o caso da serpente asiática *Rhabdophis tigrinus*, que possui glândulas no dorso de seu pescoço contendo esteroides bufadienolídeos, muito abundantes na pele de sapos, que são as principais presas dessas serpentes (HUTCHINSON et al., 2012). Já as cobras dessa mesma espécie da ilha japonesa Kinkasan não apresentam esses compostos nas glândulas de sua nuca, indicando que elas não são capazes de sintetizar esses bufadienolídeos defensivos. Porém, ao serem alimentadas por sapos em laboratório, acumularam esses bufadienolídeos em suas glândulas, indicando que sequestram esses compostos defensivos de suas presas e que também são capazes de transferir esses compostos para seus filhotes (HUTCHINSON et al., 2012).

Segundo Darst et al. (2005), existem aspectos sobre o sequestro defensivo que ainda não foram totalmente entendidos, como sua abrangência filogenética, e em quanto tempo os indivíduos mantêm a composição original do veneno depois de deixar a dieta natural. Outro aspecto curioso é a relação custo-benefício dessa estratégia, pois sequestrar toxinas de outros organismos para sua própria defesa não é uma proposta simples e barata em relação à biossíntese endógena, uma vez que o próprio animal deve não somente desenvolver um método de desintoxicação, mas também confiar apenas na dieta para sua defesa (MEBS, 2011).

Entre as diversas famílias de anfíbios anuros, cinco são muito conhecidas por apresentarem certas defesas químicas derivadas de alcaloides provindos de fontes externas como por exemplo os Dendrobatidae, Bufonidae, Mantellidae, Myobatrachidae e Eleutherodactylidae (SAPORITO et al., 2012). A história evolutiva dessas famílias ainda é discutida para se testar a hipótese de que todas elas teriam evoluído de um único ancestral comum (SANTOS; GRANT, 2011; FROST et al., 2006). Dessas cinco famílias, os Dendrobatidae destacam-se por serem o modelo mais comum e intensamente estudado sobre como defesas químicas funcionam e como evoluíram (SAPORITO et al., 2012).

Segundo Frost (2015), a família Dendrobatidae é composta por 8 gêneros e 184 espécies e sua pele possui perigosos alcaloides lipofílicos que, em sua maioria, são encontrados em formigas e besouros que vivem na serapilheira, ambiente natural desses anuros (POUG; JANIS; JONH, 2008). Foi sugerido e testado, que esses sapos extremamente nocivos e tóxicos para seus predadores adquirem essas substâncias de suas presas, caracterizando o papel defensivo dessa dieta (DALY et al., 1994; DALY et al., 2000; SAPORITO et al., 2003; POUGH; JANIS; HEISER, 2008). Quanto mais diversificada for essa dieta, mais variados serão os tipos de

alcaloides existentes em seu tegumento (POUGH; JANIS; HEISER, 2008). Dessa forma, entende-se que a dieta específica e a adaptação desses animais para a aquisição de alcaloides são características inovadoras importantíssimas para o desenvolvimento de sua defesa química, mas podendo também ter possibilitado a diversificação de espécies dentro desta família (DARST et al., 2005). Algumas espécies desta família, porém, não sequestram substâncias e também não possuem alcaloides, indicando que essa capacidade pode ter sido perdida secundariamente (DARST et al., 2005; GRANT, 2007).

2.4 Hipótese da dieta-toxicidade

Estudos recentes têm previsto algumas possibilidades sobre a origem dessas dietas específicas em anuros, principalmente a formiscivoria (SANTOS et al., 2003; DARST et al., 2005; SANTOS; GRANT, 2011). Santos et al. (2003) pesquisaram 15 espécies de anfíbios venenosos para entender um pouco mais sobre o comportamento dos mesmos e fizeram uma avaliação da pele desses animais, analisando também sua dieta. Uma das hipóteses comprovadas no trabalho foi a associação da dieta dos anfíbios ao seu sistema de defesa e coloração, e que a especialização em se alimentar de formigas e até mesmo de cupins pode ter evoluído de forma independente.

Darst et al. (2005), através de pesquisas com dendrobatídeos postularam e testaram a chamada hipótese da dieta-toxicidade. Por meio de métodos comparativos utilizando dados recentemente publicados sobre ecologia alimentar e defesa química de 15 espécies de cinco gêneros dessa família descobriram evidências de que os alcaloides defensivos desses animais surgiam de uma fonte exógena e não endógena, e que a atividade diurna assim como a especialização da dieta composta por formigas e pequenos artrópodes contendo alcaloides estavam correlacionadas. Isso sugere tendências evolutivas no mecanismo de defesa desses animais.

Mais tarde, complementando essa proposta, Santos e Grant (2011) estudaram o padrão de atividade diária de um bufonídeo venenoso encontrado no Brasil, *Melanophryniscus cambaraensis*, e testaram a hipótese de que suas defesas químicas teriam surgido após eles passarem a migrar durante o dia, um desafio para quem correria o risco de ressecamento da pele e ficar exposto a uma variedade de predadores mais adaptados a esse ambiente. Durante este processo de adaptação, o contato com novas fontes de alimentos como formigas e pequenos artrópodes possibilitou o desenvolvimento do sequestro de alcaloides. Os autores sugeriram que

essa atividade diurna poderia ser mais bem explicada pela filogenia do que por aspectos seletivos. Em outras palavras, a atividade diurna é primitiva para o grupo e evoluiu de um ancestral comum do chamado grupo Agastrophrynia, que inclui Bufonidae, Hylodidae, Aromobatidae e Dendrobatidae. Posteriormente teriam sido adquiridas as defesas químicas observadas hoje em dia nos dendrobatídeos e bufonídeos, por exemplo (SANTOS; GRANT, 2011).

2.5 Bufonidae como modelo alternativo para testar a hipótese da dieta-toxicidade em anfíbios

Os Dendrobatidae representam o modelo mais comum e estudado do ponto de vista do sequestro químico (SAPORITO et al., 2012). Apesar de muito estudada, esta família é relativamente restrita tanto na riqueza de espécies (184) quanto na amplitude da área de ocorrência (FROST, 2015). A maioria das espécies desta família, ou pelo menos as consideradas mais tóxicas, são pequenas (2-3 cm de comprimento rostro-cloacal) e tem distribuição predominantemente na América Central e norte da América do Sul, principalmente associada à Floresta Amazônica (FROST, 2015). O tamanho reduzido exige mais indivíduos coletados para obtenção de quantidades suficientes de veneno para análise e a distribuição geográfica relativamente restrita pode dificultar um pouco a coleta de material, especialmente no campo para estudos sobre composição da dieta e disponibilidade de presas. Um outro grupo que pode ser usado como modelo alternativo aos Dendrobatidae para testar a capacidade de sequestrar e acumular substâncias químicas de suas presas é a família Bufonidae. Essa família apresenta 580 espécies com distribuição mundial, com exceção do Ártico, Antártica, Madagascar, regiões oceânicas e Austrália (FROST, 2015). Ainda assim foi introduzida artificialmente pelo homem em várias dessas regiões onde não ocorreria naturalmente (AMPHIBIAWEB, 2015; FROST, 2015).

Também conhecida como a família dos sapos verdadeiros, os bufonídeos se distinguem das demais famílias por possuírem uma grande glândula paratóide de cada lado da cabeça e apresentarem, em sua maioria, tubérculos na pele e no dorso (FROST et al., 2006; HASLAM et al., 2014). São terrestres e insetívoros, sendo as formigas a base principal de sua dieta (RODRIGUEZ; DUELLMAN, 1994). Outra vantagem deste grupo é que as espécies costumam ser muito abundantes e apresentam grandes dimensões corporais, facilitando a obtenção de material para estudos de composição do veneno. Assim, poucos indivíduos secretam grandes

quantidades de veneno, cuja extração também é facilitada pelas grandes glândulas paratóides. Além disso, existe ainda muita discussão sobre as relações filogenéticas internas dos bufonídeos, assim como se eles são ou não o grupo-irmão dos dendrobatídeos (PRAMUK, 2006; FROST, et al., 2006; CHAPARRO et al., 2007; SANTOS; GRANT, 2011).

O segundo maior gênero de Bufonidae é *Rhinella*, com 89 espécies descritas (AMPHIBIAWEB, 2015; FROST, 2015). Uma dessas espécies mais conhecidas é o chamado sapo-cururu amazônico (*Rhinella marina*), nativo da América Central e do Sul, cujos girinos e adultos são altamente tóxicos para seus predadores (CROSSLAND et al., 2008). Essa espécie foi introduzida na Austrália em 1935, visando o controle de pragas que atingiam as plantações de cana-de-açúcar no país (PHILIP; SHINE, 2004). Desde então, *R. marina* tornou-se uma das mais terríveis espécies exóticas invasoras (IUNC, 2001), adaptando-se e espalhando-se rapidamente em torno de 1,2 milhões de km² em todo o território australiano (URBAN et al., 2007). Por ser extremamente tóxica para a maioria de seus predadores, *R. marina* tem provocado o declínio de várias espécies endêmicas da região, como algumas espécies de serpentes, por exemplo (PHILIP; SHINE, 2004).

A base da dieta de *R. marina* são formigas (ISAACS; HOYOS, 2010). Formiscivoria predominante também foi observada em outros bufonídeos na Amazônia (PARMELEE, 1999), no Panamá (TOFT, 1981) e em outros estudos (FILIPELLO; CRESPO, 1994; CAMPENY; MONTORI, 1995; LAJMANOVICH, 1995; DALY et al., 2005; SANTANA; JUNCÁ, 2007). Existem, portanto, fortes indícios para se acreditar que a família Bufonidae inteira tenha preferência por se alimentar de formigas e realize consequentemente sequestro defensivo. A abrangência filogenética desta hipótese, contudo, ainda precisa ser testada (DARST et al., 2005). Infelizmente a perda e fragmentação do habitat desses animais implicam em grandes índices de mortalidade dos mesmos, aumentando a densidade da fauna reduzindo assim a disponibilidade de alimento o qual influencia a dispersão tornando-se mortal para espécies com capacidade de dispersão restrita, principalmente quando a perda ou fragmentação ocorre por longos períodos de tempo (SAUDERS et al., 1991; CUSHMAIN, 2006). A dependência de anuros por fontes alimentares sujeitas às mudanças ambientais causadas pela destruição do habitat pode ter grandes implicações na proteção desses anfíbios contra predadores e patógenos em seus habitats naturais (MINA et al., 2015).

2.6 As espécies-alvo do presente estudo

Outro bufonídeo muito comum na região Sudeste do Brasil é o sapo-cururuzinho (*Rhinella ornata*) (BALDISSERRA et al., 2004) (FIGURA 1). De porte médio a grande, essa espécie costuma ser extremamente abundante nas comunidades de anfíbios (DIXO; VERDADE, 2006; D'ANUNCIAÇÃO et al, 2013). Os indivíduos mais jovens geralmente são diurnos enquanto os adultos saem à noite (GUIX et al., 1989). Reproduz-se em locais com água, mas com correnteza baixa, mas utilizam também locais não naturais para colocar seus ovos, que são fixados por um cordão gelatinoso na vegetação aquática (POMBAL; GORDO, 2004).

Geralmente associada a ambientes florestais preservados, muitas vezes é considerada um táxon exigente e com potencial bioindicador (DIXO; VERDADE, 2006). Já outros estudos defendem que essa espécie apresenta hábito generalista e grande capacidade de dispersão, o que lhe permite ocupar também ambientes bastante alterados pelo homem (IUCN, 2008; BERTOLUCI et al., 2009; RIBEIRO-JÚNIOR, BERTOLUCI, 2009). Sob este ponto de vista, assemelha-se à *R. marina* e seu forte poder de adaptação a novos ambientes, mas ainda não foi alvo de estudos sobre sequestro químico defensivo.



Figura 1 – Fotografia de um exemplar de *Rhinella ornata* em seu ambiente natural.
Fonte: SACRAMENTO, M. (2012).

Um dos motivos para se acreditar que *R. ornata* também realize sequestro químico defensivo é a sua dieta predominantemente formiscívora (PEREIRA, 2013). O mesmo foi observado por Ferreira e Teixeira (2009) em suas pesquisas com *R. crucifer*, espécie próxima e

do mesmo grupo (BALDISSERA et al., 2004). Em seu estudo, Pereira (2003) observou que *R. ornata* alimenta-se principalmente de formigas e também de alguns besouros, sendo as formigas na sua maioria da espécie *P. striata* (Fr. Smith, 1858) da subfamília Ponerinae. Conforme Grimaldi et al., (1997) e Peeters (1997), as formigas da subfamília Ponerinae são consideradas muito antigas se comparadas a outros grupos já extintos, pois apresentam muitos traços característicos de seus ancestrais, como as vespas, por isso representam um grupo de grande interesse para estudos sobre biologia evolutiva (MONNIN; PEETERS, 1999).

De acordo com Rust e Andersen (1999), *P. striata* pertence a um dos mais antigos gêneros de formiga conhecido ainda existente. Possuem cerca de 270 espécies descritas e uma extensa distribuição geográfica, podendo ocorrer desde os EUA até o Brasil e Argentina (KEMPF, 1961; BOLTON, 2013). *P. striata* é encontrada na América do Sul desde o Brasil até o Uruguai, Paraguai e Argentina (KEMPF, 1972). Também conhecida como formiga-de-ferrão, possui indivíduos relativamente grandes e de corpo alongado, chegando a apresentar de 13,2 a 16,7 mm de comprimento (BOLTON, 2013) (FIGURA 2). É generalista, alimentando-se de minhocas, larvas de artrópodes, cupins e principalmente de carcaças de animais mortos (GIANOTTI; MACHADO, 1994). Suas colônias podem conter cerca de 200 indivíduos. São formigas extremamente agressivas dotadas de grandes mandíbulas e de um potente ferrão cuja picada altamente dolorosa as tornam excelentes predadoras em seu habitat, podendo atacar até mesmo indivíduos de sua espécie e de outras espécies de formigas (WILD, 2002; MACKAY; MACKAY, 2006).



Figura 2- Imagem de um exemplar de *Pachycondyla striata*

Fonte: <http://www.myrmecos.net/2013/05/15/pachycondyla-a-genus-that-wasnt/>

A comunicação química dessas formigas é outra característica marcante e complexa, chegando a ser mais avançada que em outros grupos de formigas (MORGAN et al., 2003).

Possuem determinadas glândulas abdominais em seu corpo, dentre elas, glândulas de veneno contendo produtos voláteis porém, informações sobre a origem e identificação desses compostos ainda são escassas (MORGAN et al., 2003). Essas substâncias químicas contidas nas glândulas de veneno provavelmente são utilizadas como mecanismo de defesa para essas formigas, que ao se sentirem ameaçadas, transformam essas substâncias em um tipo de espuma proteica liberada pelo gáster (RODRIGUES, 2009).

Esse tipo de comportamento também foi observado por Maschwitz; Jessen e Maschwitz (1981) em duas outras espécies do mesmo gênero: *Pachycondyla insularis* e *Pachycondyla tridentata*, permitindo uma maior defesa da colônia contra predadores. Segundo esses autores, essa espuma venenosa seria mais eficiente contra animais menores. Contra predadores maiores o ferrão continua a ser a arma mais apropriada.

Já se sabe que as toxinas produzidas por essas formigas não acarretam na morte de todos os seus predadores. Alguns, como os anfíbios, além de não morrerem, incorporam essas toxinas na pele como uma defesa química passiva (LAJMANOVICH, 1995; DALY et al., 2000; DALY et al., 2005; SAPORITO et al., 2005). Atualmente são conhecidos e identificados na literatura mais de 850 tipos de alcaloides biologicamente ativos na pele de anfíbios anuros e toda essa diversidade deve-se teoricamente a sua fonte alimentar, a maioria de formigas (SAPORITO et al., 2012). Constituídos de um anel heterocíclico e nitrogênio, os alcaloides são compostos com distribuição limitada na natureza, sendo encontrados em poucas espécies, podendo variar sua concentração de forma quantitativa e qualitativa na secreção cutânea, mesmo entre populações da mesma espécie (DALY et al., 1987; NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2007). Em seus trabalhos Daly e colaboradores (1994) explicam que a existência desses alcaloides estaria relacionada com a dieta, pois observou que alguns anuros perderam sua toxicidade quando criados em cativeiro. Também observaram que girinos gerados em cativeiro não apresentavam alcaloides em sua pele (DALY et al., 1997).

Avaliar a composição do veneno de *R. ornata* em relação à disponibilidade do alimento em condições laboratoriais e entender melhor se o sequestro defensivo funciona entre *R. ornata* e *P. striata* é o objetivo básico desse estudo. Este é o primeiro passo para compreender como esses anfíbios conseguem suportar os efeitos da toxicidade de suas presas e assim ampliar o teste da hipótese da dieta-toxicidade (SCHWARTZ et al., 2005).

3 OBJETIVOS

Buscamos no decorrer desse estudo científico atingir alguns objetivos gerais e específicos, os quais foram extremamente importantes para o sucesso do mesmo, tais como:

3.1. Objetivo Geral

Testar a hipótese de que a composição química do veneno de *R. ornata* está relacionada à sua dieta a base de formigas *P. striata* (Ponerinae).

3.2. Objetivos Específicos

Foram determinados como objetivos específicos:

- a) determinar a composição do veneno de *R. ornata* e das formigas *P. striata* das quais ela se alimenta;
- b) avaliar como a composição do veneno de *R. ornata* está relacionada à dieta. Neste caso, adultos dessa espécie sequestram esses compostos diretamente das formigas que consomem sem modificá-los ou eles são alterados após a ingestão?
- c) no caso das formigas serem a base da composição do veneno deste sapo, estimaremos o tempo aproximado que o veneno deixa seu caráter original depois de mudar a dieta natural de formigas por outro tipo de alimento em cativeiro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desse estudo científico foi necessário a realização de diferentes metodologias, as quais seguem abaixo.

4.1 Coleta das amostras

Os indivíduos de *R. ornata* foram coletados por meio de 10 armadilhas de interceptação e queda tipo *pitfall* (CORN, 1994). Essas armadilhas já se encontravam instaladas em dois fragmentos remanescentes de Floresta Estacional Semidecidual no município de Alfenas (21°25' 3.72" S e 45°55' 53.41" O), contendo em cada um deles cinco estações distantes 30 m umas das outras e 50 m da borda dos fragmentos.

Este tipo de armadilha é constituída por 4 baldes plásticos de 30 litros, os quais são enterrados no chão até sua borda, possuindo um balde localizado no centro e os outros três radiais a este, formando um “Y” visto de cima. Os baldes radiais são conectados ao balde central por cercas de lona plástica com 4 m de comprimento por 50 cm de altura, sustentadas por estacas de madeira (FIGURA 3). Para que os anuros não passem por debaixo da lona, sua porção inferior é enterrada no solo (CALLEFFO, 2002). As formigas foram coletadas nos mesmos fragmentos por intermédio de 10 armadilhas tipo *pitfall* confeccionadas em recipientes plásticos (garrafa pet) de 21 cm de comprimento e 9,5 cm de diâmetro, com abertura para o solo seguindo a metodologia de AQUINO et al. (2006). Para que as formigas capturadas fossem conservadas até a sua triagem, foi adicionada em cada armadilha uma solução conservante composta de 200 ml água, 5 g de sal e 5 gotas de detergente (MURARI et al., 2009).

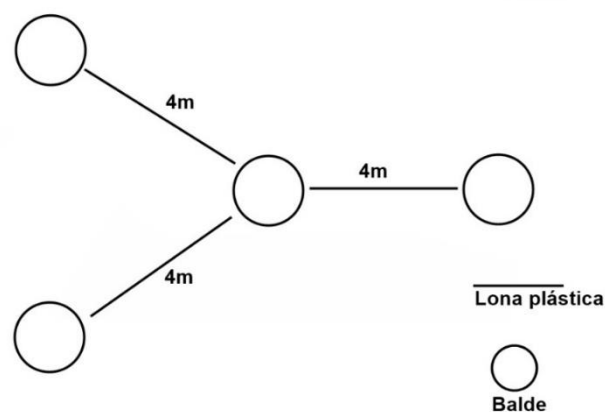


Figura 3 – Desenho esquemático de uma armadilha tipo *pitfall* vista de cima.
Fonte: SILVA, 2013, p.33. (Houve alteração na ilustração tanto na posição quanto no seu tamanho para melhor visualização).

Foram coletados 12 indivíduos de *R. ornata* entre os meses de Abril e Maio de 2013, sob a Licença IBAMA 10704-1. Os espécimes foram encaminhados à Coleção Herpetológica “Alfred Russel Wallace” (CHARW) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL–MG), pesados e medidos (comprimento rostro-cloacal) três vezes por semana. Logo após a chegada ao laboratório, ainda sem receber dieta de cativeiro, a primeira amostra de veneno foi colhida por compressão das glândulas paratóides de acordo com a metodologia de Carvalho (2008) (FIGURA 4).

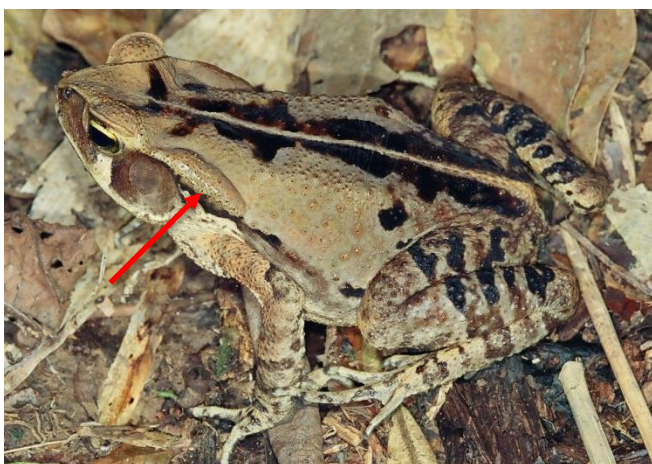


Figura 4 – Fotografia de um exemplar de *R. ornata*, destacando a glândula paratóide.

Fonte: <http://www.ra-bugio.org.br/especies/167.jpg>

Os espécimes foram então mantidos em terrários de vidro (0,4 m de largura x 1 m de comprimento x 0,6 de altura) com tampa telada para impedir fuga ou entrada de animais (DALY et al., 2000). Sua dieta foi alterada basicamente para minhocas, larvas de mosca da laranja e água servidas livre e diariamente.

Amostras de veneno de *R. ornata* foram extraídas a partir da 1ª semana e posteriormente uma única vez cada mês durante 3 meses, conforme (TABELA 1). Foram coletadas um total de 54 amostras, as quais foram diluídas em 500 µL de metanol em *vials* selados e estocados a -20°C até a análise de sua composição química, para determinar se os sapos sequestram compostos defensivos do alimento natural.

As formigas coletadas foram triadas e identificadas no laboratório de Zoologia da Unifal, totalizando 70 indivíduos, os quais tiveram seu corpo dividido em partes com o auxílio de pinça e lupa e armazenados em 500 µL de metanol em *vials* selados até a análise de sua composição química.

4.2 Análise da composição química dos venenos de *R. ornata* e *P. Striata*

A avaliação da composição química das amostras de veneno dos sapos e formigas foram realizadas em UHPLC-UV-MS (Exactive; ThermoScientific[®] equipado com MS de tecnologia Orbitrap). O método cromatográfico utilizado foi: coluna cromatográfica C18 (150 x 3 mm; ACE[®]) com partículas de 3 µm de diâmetro um fluxo de 0,4 ml/min de um gradiente MeCN/água; 0,1% ácido fórmico na água, 2%-55% de MeCN em 17 min, 55%-100% em 3 min, seguidos de 4 min de 100% de MeCN; a temperatura da coluna foi controlada em 45 °C.

O espectrômetro foi operado utilizando os seguintes parâmetros: modo positivo e negativo concomitante; faixa de varredura de 130-1.200 m/z ; alta resolução: 70.000; microvarredura: 1; *lockmass* (ion de m/z conhecida presente nas amostras, que permite a correção, em tempo real, de desvios de leitura de m/z ; 83,0604 m/z do dímero de MeCN + H) no modo positivo; máximo tempo de injeção: 250 ms. Os parâmetros da fonte de ionização por ESI foram: taxa do fluxo de gás: 30; taxa do fluxo de gás auxiliar: 10; voltagem no spray: + e - 3,6 kV; temperatura capilar: 300 °C; voltagem no capilar: + e - 30 V.

Antes da sequência de análises, uma calibração do aparelho foi realizada para cada polaridade, utilizando contaminantes de baixa massa molecular e a solução Thermocalmix (Sigma-Aldrich[®]). Os dados foram gravados usando o software Xcalibur 2.1.0 (Thermo Fisher Scientific[®]).

Com o emprego do software MZmine 2.10 (MZmine Development Team) os cromatogramas das diferentes amostras de veneno foram decovoluídos, tiveram os seus isótopos eliminados, picos idênticos nos diferentes extratos alinhados e os espaços vazios preenchidos.

Depois que os dados cromatográficos foram tratados, a desreplicação foi, então, realizada para todas as amostras por comparação dos dados de massas exata com os de substâncias já descritas na literatura para os gêneros de *Rhinella* e *Pachycondylla*. Foi utilizado o SciFinder Scholar[®] para a pesquisa das substâncias descritas para esses gêneros e construído banco de dados contendo dados de massa monoisotópica. O software MZmine 2.10 é capaz de utilizar bibliotecas de banco de dados de massa de alta resolução.

4.3 Preparo das amostras para análise de composição química e análise qualitativa

As amostras armazenadas para análise de sua composição química (item acima) foram preparadas da seguinte forma: 50 μL de veneno armazenado em metanol de cada indivíduo do seu grupo foram reunidos em um *pool*. Estes *pools* P1 a P5, tabela 1, foram então particionados com 500 μL de hexano e filtrado em filtro de PTFE (Teflon) de diâmetro de poro de 0,22 μm .

Os *pools* representam respectivamente as 5 extrações de veneno, sendo a primeira sob dieta natural (campo) e as outras 4 sob dieta de cativeiro.

Tabela 1 – Amostras de veneno de *Rhinella ornata* foram reunidas em *pools* para análise de sua composição química por UHPLC-UV-MS.

Coleta 1			Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 5
Data	Indivíduos	Dieta do campo	1 semana	1 mês	2 meses	3 meses
22/04/13	1	22/04	29/04	29/05	29/06	29/07
29/04/13	2	29/04	06/05	06/06	06/07	06/08
29/04/13	3	29/04	06/05	06/06	06/07	06/08
29/04/13	4	29/04	06/05	06/06	06/07	06/08
29/04/13	5	29/04	06/05	06/06	06/07	-
30/04/13	6	30/04	07/05	07/06	07/07	07/08
22/05/13	7	22/05	29/05	29/06	29/07	29/08
22/05/13	8	22/05	29/05	29/06	29/07	29/08
23/05/13	9	23/05	30/05	-	-	-
23/05/13	10	23/05	30/05	30/06	30/07	-
23/05/13	11	23/05	30/05	30/06	30/07	30/08
23/05/13	12	23/05	30/05	30/06	30/07	30/08
<i>Pools</i>		P1	P2	P3	P4	P5

Fonte: FRANÇA, 2015.

A análise qualitativa das substâncias de *R. ornata* detectadas foi realizada comparando a área de pico dos cromatogramas obtidos por UHPLC-UV-MS dos diferentes *pools*. Análises de cada amostra individualmente foi adicionalmente realizada.

As análises da composição química do *pool* de amostras de formigas da espécie de *P. striata* (TABELA 2) foram realizadas para identificação das substâncias existentes e posterior comparação com as substâncias detectadas no veneno de *R. ornata*.

Tabela 2 – Amostras de *Pachycondyla striata* foram reunidas em *pools* para análise de sua composição química por UHPLC-UV-MS.

<i>Pools</i>	Partes da formiga
F1	Aparelho de ferrão e glândulas
F2	Gáster sem ferrão e glândula
F3	Cabeça e tórax
F4	Gáster com ferrão

Fonte: FRANÇA, 2015.

5 RESULTADOS

A composição química do veneno de *R. ornata* alterou-se com a mudança da dieta. A intensidade e área dos picos diminuí drasticamente ao longo do tempo de alimentação artificial de *R. ornata* (FIGURA 5). No cromatograma do *pool* 1, que é composto pelo conjunto dos venenos dos 12 indivíduos de *R. ornata* em sua dieta natural (formigas da espécie *P. striata*), detecta-se uma grande variedade de substâncias. O veneno coletado em sapos alimentados por apenas uma semana com a dieta artificial já apresenta uma grande diminuição na intensidade e área dos picos. Nos *pools* 4 e 5, que são compostos pelos venenos de *R. ornata* sob dieta artificial durante 2 e 3 meses, respectivamente, as mesmas substâncias já não podiam mais ser detectadas, sendo o cromatograma igual ao do controle negativo (FIGURA 5). O mesmo foi observado quando foram analisadas as amostras de cada sapinho individualmente, confirmando o que foi observado nas análises dos *pools*.

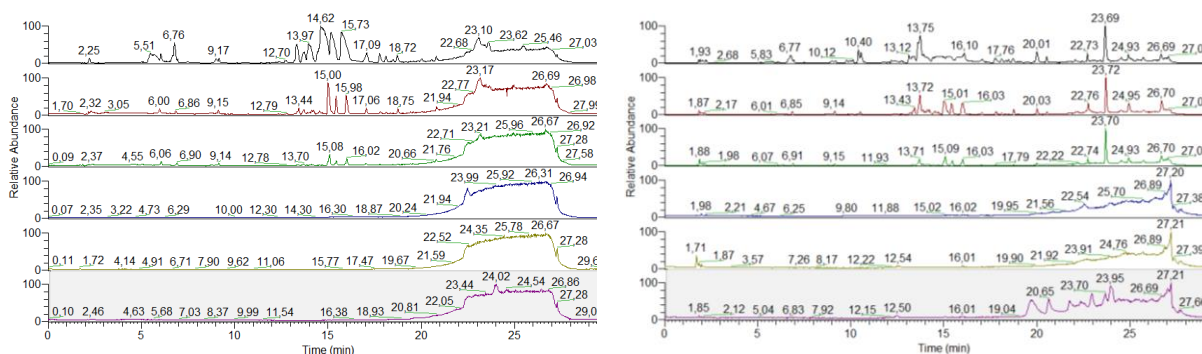
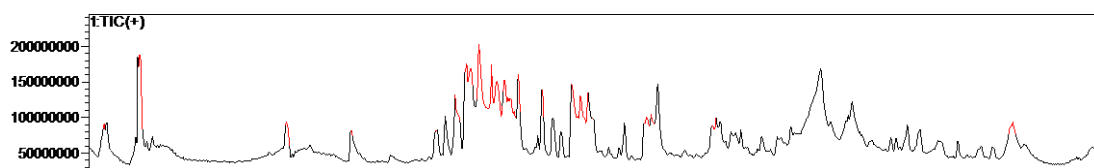


Figura 5 - Cromatogramas das análises por UHPLC-UV-MS do veneno de *R. ornata* e do controle (metanol sem amostra de veneno). De cima para baixo são demonstrados, respectivamente, os cromatogramas dos *pools* de venenos coletados de sapos do campo (dieta natural - *Pool* 1) e mantidos no laboratório sob dieta artificial durante 1 semana (*Pool* 2), 1 mês (*Pool* 3), 2 meses (*Pool* 4) e 3 meses (*Pool* 5), em seguida o controle (somente metanol sem amostra). Dados da esquerda são de detecção no modo positivo e os da direita são de detecção no modo negativo.

Fonte: FRANÇA, 2015.

Foi possível observar uma grande quantidade de metabólitos nos cromatogramas obtidos a partir das análises do veneno em *pool* 1 (dieta natural) tanto no modo positivo quanto negativo (FIGURA 6). Contrapondo ao observado com o *pool* 1, as análises dos venenos dos sapos obtidas na primeira semana - *pool* 2 (dieta de cativeiro) mostram um evidente decaimento dos metabólitos tanto em modo positivo quanto negativo das análises cromatográficas UHPLC-UV-MS (FIGURA 7).

A



B

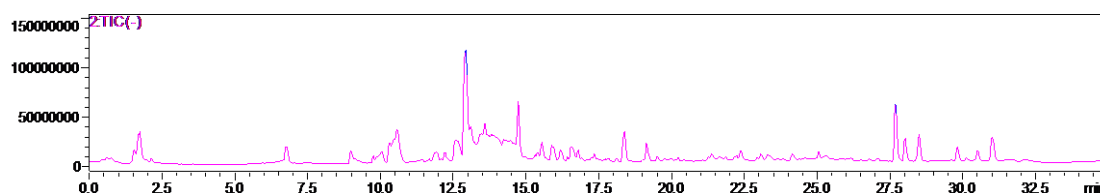
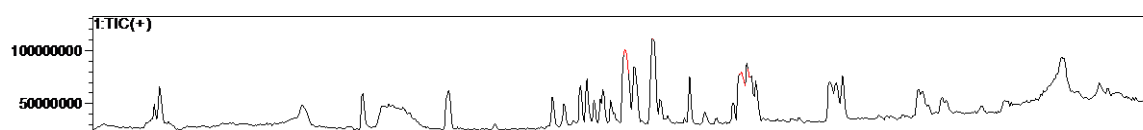


Figura 6 - a) Cromatograma individuais das análises por UHPLC-UV-MS do veneno de *R.ornata* avaliados em *poll 1* (dieta do campo, detecção no modo positivo);
b) Cromatograma das análises por UHPLC-UV-MS do veneno de *R.ornata* avaliados em *poll 1* (dieta do campo, detecção no modo negativo).

Fonte: FRANÇA, 2015.

A



B

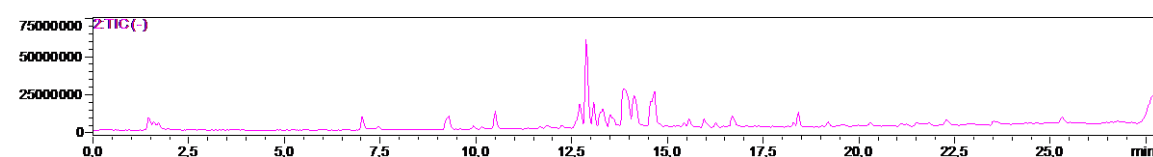


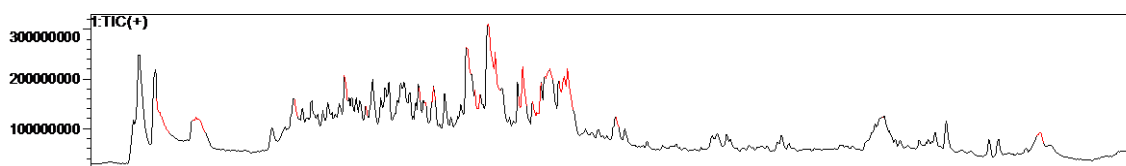
Figura 7 - a) Cromatograma individuais das análises por UHPLC-UV-MS do veneno de *R.ornata* avaliados em *poll 2* (dieta de cativeiro, detecção no modo positivo);
b) Cromatograma das análises por UHPLC-UV-MS do veneno de *R.ornata* avaliados em *poll 2* (dieta de cativeiro, detecção modo negativo).

Fonte: FRANÇA, 2015.

Nos demais *pools* (3, 4 e 5) não houve detecção considerável de substâncias, como pode ser observado na Figura 5.

Os resultados das análises das amostras de formigas *P. striata* evidenciaram uma quantidade considerável de substâncias nas amostras contendo aparelho de ferrão e glândulas das formigas (F1) (FIGURA 8, TABELA 2).

A



B

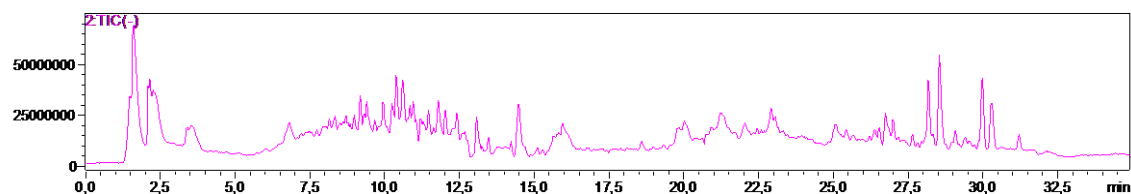
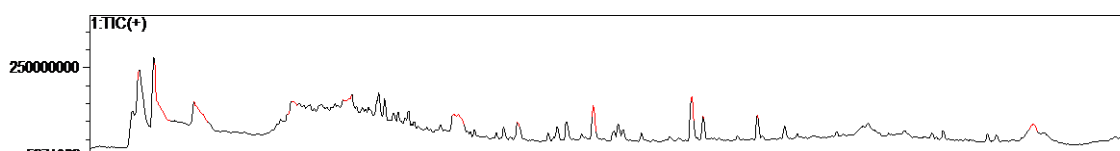


Figura 8 - a) Cromatograma das análises por UHPLC-UV-MS do *pool* (F1) contendo ferrões e glândulas de *P. striata* (modo positivo);
b) Cromatograma das análises por UHPLC-UV-MS do *pool* (F1) de ferrões e glândulas *P. striata* (modo negativo).

Fonte: FRANÇA, 2015.

Se comparados o cromatograma de F1, as análises realizadas a partir do *pool* de gásteres sem ferrão e glândula (F2), cabeças e tórax (F3) e gásteres com ferrão (F4), é nítida a ausência de substâncias nestes (FIGURAS 9, 10 e 11). Foram observados também ruídos comuns aos da fase móvel.

A



B

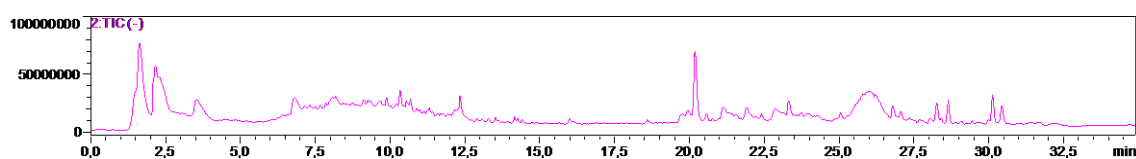
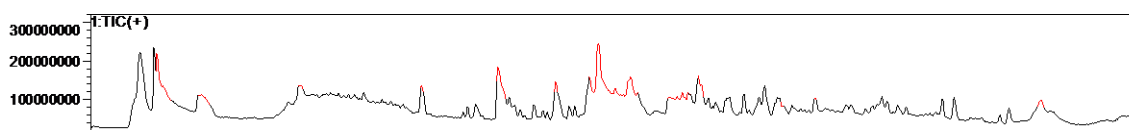


Figura 9 - a) Cromatograma das análises por UHPLC-UV-MS do *pool* de amostras de gásteres sem ferrão (F2) de *P. striata* (modo positivo);
b) Cromatograma das análises por UHPLC-UV-MS do *pool* de amostras do gásteres sem ferrão (F2) *P. striata* (modo negativo).

Fonte: FRANÇA, 2015.

A



B

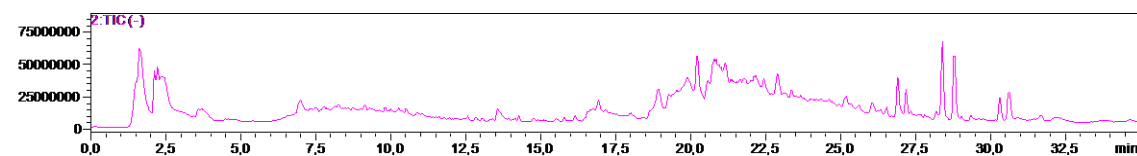
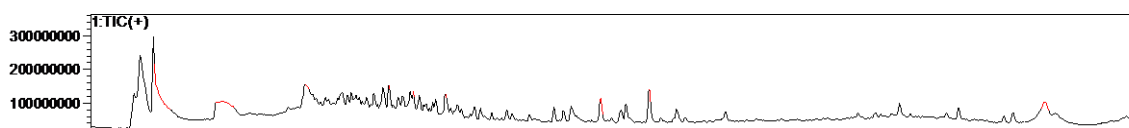


Figura 10 - a) Cromatograma das análises por UHPLC-UV-MS do *pool* amostras de cabeças e tórax (F3) de *P. striata* (modo positivo);
b) Cromatograma das análises por UHPLC-UV-MS do *pool* de amostras de cabeças e tórax (F3) de *P. striata* (modo negativo).

Fonte: FRANÇA, 2015.

A



B

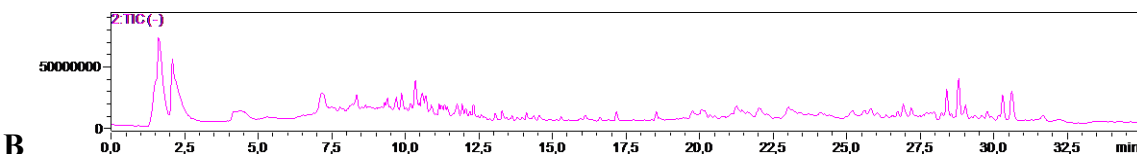


Figura 11- a) Cromatograma das análises por UHPLC-UV-MS do *pool* de amostras do gásteres e ferrões (F4) de *P. striata* (modo positivo);
b) Cromatograma das análises por UHPLC-UV-MS do *pool* de amostras do gásteres e ferrões (F4) de *P. striata* (modo negativo).

Fonte: FRANÇA, 2015.

A análise dos dados de *pool* 1, *pool* 2 e F1 devidamente tratados (deconvolução, eliminação de isótopos e alinhamento) permitiu observar novamente que os sapos alimentados artificialmente deixam ou diminuem quantitativamente a produção dos metabólitos que compõe seu veneno, a área dos picos das substâncias diminui nitidamente (TABELA 3). Além disso, ficou evidente que há substâncias em comuns tanto no veneno dos sapos avaliados (*pool* 1 e *pool* 2) como no veneno da formiga (F1).

As análises por UHPLC-UV-MS levou à detecção de 52 substâncias já descritas na literatura, entre elas 26 de *R. ornata*, 16 de *P. striata* e 10 substâncias em comum entre as duas espécies (TABELA 3). As substâncias foram identificadas com auxílio do banco de dados construído a partir da literatura para *P. striata* e *Rhinella* triadas pelo Scifinder[®].

Tabela 3 – Dados da análise por UHPLC-UV-MS do *pool 1* e *pool 2* de *R. ornata* e F1 de *P. striata* devidamente tratados e alinhados pelo software MZmine. Identificação das substâncias com base na comparação de suas massas exatas com as do banco de dados construídos com dados da literatura. Linhas em laranja (substâncias detectadas para ambas as espécies *R. ornata* e *P. striata*), linhas em verde (substâncias detectadas apenas no veneno de *R. ornata*), linhas em vermelho (substâncias detectadas apenas no veneno de *P. striata*).

(Continua)

Identificação na planilha original do MZmine	<i>m/z</i>	Tempo de retenção	Identificação da substância no banco de dados [#]	Íon detectado	Fórmula molecular	Identificação	P1* Área do pico	P2* Área do pico	F1** Área do pico
3	302.305	20,72	PS113	[M+NH4] ⁺	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Ácido Octadecanóico	2.83E+10	1.10E+10	3.02E+08
52	284.331	22.12	PS51	[M+NH4] ⁺	C ₁₉ H ₃₈	Nonadecano	2.46E+09	1.75E+09	9.57E+08
54	308.2947	24.49	PS60	[M+NH4] ⁺	C ₂₀ H ₃₄ O	2,6,10,14-Hex Decatetraeno-1-ol, 3,7,11,15-tetrametil-, (2E,6E,10E) -	4.17E+09	1.33E+09	0
65	298.274	14.87	RO42	[M+NH4] ⁺	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	Ácido (9Z,12Z) Octadecadienóico	2.67E+09	2.02E+08	2.80E+07
82	205.1332	4.92	RO1	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O	Bufotenina	5.54E+09	2.22E+09	0
94	310.3102	25.82	PS42	[M+NH4] ⁺	C ₂₀ H ₃₆ O	6,10,14-Hexadecatrieno-1-ol, 3,7,11,15-tetrametil-, (10E) -	3.50E+09	9.36E+08	4.80E+08
102	191.1179	4.70	RO22	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O	1H-Indol-5-ol, 3- [2- (metilamino)etil] -	3.75E+09	1.16E+09	0
115	272.2583	19.73	PS99	[M+NH4] ⁺	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	Ácido (9Z) Hexadecanóico	1.15E+09	3.44E+08	1.55E+09
138	233.1284	6.99	RO32	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂	Acetamida, N- [2- (5-metoxi-1H-indol-3-	9.40E+08	0	0
202	300.2895	21.03	PS105	[M+NH4] ⁺	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Ácido (9Z) Octadecanóico	3.65E+08	1.27E+08	1.08E+08
266	219.1129	7.54	RO23	[M+NH4] ⁺	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	-Naftalenol, 1- (N-metilcarbamato)	6.46E+08	0	1.80E+07
268	306.2427	20.47	RO46	[M+NH4] ⁺	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	Androst-4-en-3-ona, 17-hidroxi-, (17b)-	3.41E+08	9.91E+07	0
326	148.0605	1.84	RO17	[M+H] ⁺	C ₅ H ₉ NO ₄	Ácido D-Aspártico, N-metil-	1.59E+08	2.72E+07	0
345	174.1851	12.62	PS82	[M+NH4] ⁺	C ₁₀ H ₂₀ O	2-Nonanona, 3-metil-	2.03E+08	6.65E+07	0
354	300.2897	23.67	PS105	[M+NH4] ⁺	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Ácido (9Z) Octadecanóico	1.97E+08	8.59E+07	4.68E+08
372	233.1284	10.96	RO32	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂	Acetamida, N- [2- (5-metoxi-1H-indol-3-	2.02E+08	0	0

(Continuação)

Identificação na planilha original do MZmine	<i>m/z</i>	Tempo de retenção	Identificação da substância no banco de dados [#]	Íon detectado	Fórmula molecular	Identificação	P1* Área do pico	P2* Área do pico	F1** Área do pico
413	177.1022	4.29	RO21	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	1H-Indol-5-ol, 3- (2-aminoetil) -	5.06E+08	1.50E+08	0
418	387.2531	17.83	RO108	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	Bufa-20,22- dienólido, 3,14-dihidroxi-, (3b,5b) -	1.63E+08	0	0
557	289.216	21.35	RO46	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	Androst-4-en-3-ona, 17-hidroxi-, (17b)-	1.13E+08	0	0
584	337.2158	25.82	RO63	[M+Na] ⁺	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	Pregn-4-eno-3,20-diona	1.02E+08	0	0
593	219.1128	6,00	RO23	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	1-Naftalenol, 1- (N-metilcarbamato)	1.18E+08	9.05E+07	0
659	219.1128	8.82	RO23	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	1-Naftalenol, 1- (N-metilcarbamato)	1.68E+08	0	5.26E+07
705	385.2371	19.31	RO106	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₂ O ₄	Bufa-20,22- dienólido, 14,15-epóxi-3-hidroxi-,	6.75E+07	0	0
709	219.1128	4.46	RO23	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	1-Naftalenol, 1- (N-metilcarbamato)	1.38E+08	0	0
738	200.2374	19.76	PS57	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₃ H ₂₆	Trideceno	4.30E+07	0	0
804	124.0759	6.86	PS112	[M+NH ₄] ⁺	C ₇ H ₆ O	Benzaldeído	5.00E+07	0	0
847	242.2841	21.78	PS2	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₆ H ₃₂	Pentadecane, 7-metil-	3.16E+07	0	0
885	298.2737	22.39	RO42	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	Ácido (9Z,12Z) Octadecadienóico	9.78E+07	0	2.84E+08
890	228.2683	20.17	PS52	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₅ H ₃₀	Pentadecano	3.27E+07	0	0
937	337.216	24.89	RO63	[M+Na] ⁺	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	Pregn-4-eno-3,20-diona	3.85E+07	0	0
1015	300.326	21.40	PS28	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₉ H ₃₈ O	Oxirano, 2-nonil-3-octil-	2.23E+07	0	0
1049	256.2997	21.30	PS56	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₇ H ₃₄	Heptadecano	2.34E+07	0	0
1201	385.2373	17.85	RO106	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₂ O ₄	Bufa-20,22- dienólido, 14,15-epóxi-3-hidroxi-,	9144492	0	0
1324	274.2739	19.08	PS114	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido Hexadecanóico	0	0	1.13E+09
1680	274.2738	20.35	PS114	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido Hexadecanóico	0	0	1.38E+08
1788	265.2269	22.50	PS20	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₈ N ₂ O	2-Piridina metanol, 3,6-dimetil-5-(3-metilbutil) -a-(2-metilpropil) -	0	0	1.85E+08

(Continuação)

Identificação na planilha original do MZmine	<i>m/z</i>	Tempo de retenção	Identificação da substância no banco de dados [#]	Íon detectado	Fórmula molecular	Identificação	P1* Área do pico	P2* Área do pico	F1** Área do pico
2030	226.2527	19.25	PS30	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₅ H ₂₈	Pentadecadieno	0	0	8.60E+07
2382	137.0597	3.01	PS97	[M+H] ⁺	C ₈ H ₈ O ₂	2,5-Cicloexadieno-1,4-diona, 2,3-dimetil-	0	0	5.26E+07
2531	211.144	9.76	PS78	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	Pirrol [1,2-a] piridina-1,4-diona, hexahidro-3-2-metilpropil) -, (3S,8aS)	0	0	4.58E+07
2552	193.1698	21.17	PS19	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₂₀ N ₂	Piridina, 3-hexil-2,5-dimetil-	0	0	4.03E+07
2570	154.0862	3.00	PS97	[M+NH ₄] ⁺	C ₈ H ₈ O ₂	2,5-Cicloexadieno-1,4-diona, 2,3-dimetil-	0	0	5.12E+07
2615	211.144	9.32	PS78	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	Pirrol [1,2-a] piridina-1,4-diona, hexahidro-3-2-metilpropil) -, (3S,8aS)	0	0	3.73E+07
2625	137.0597	2.04	PS97	[M+H] ⁺	C ₈ H ₈ O ₂	2,5-Cicloexadieno-1,4-diona, 2,3-dimetil-	0	0	4.57E+07
2649	151.0754	4.82	PS1	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₀ O ₂	2,5-Cicloexadieno-1,4-diona, 2-etil-3-metil-	0	0	5.23E+07
2746	179.1542	19.66	PS39	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₈ N ₂	Piridina, 2,5-dimetil-3-pentil-	0	0	3.68E+07
2894	154.0862	2.06	PS97	[M+NH ₄] ⁺	C ₈ H ₈ O ₂	2,5-Cicloexadieno-1,4-diona, 2,3-dimetil-	0	0	3.58E+07
2988	193.1701	11.04	PS11	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₂₀ N ₂	Piridina, 2,5-dimetil-3- (4-metilpentil)	0	0	1.37E+07
3088	211.1441	8.44	PS78	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	Pirrol [1,2-a] piridina-1,4-diona, hexahidro-3-2-metilpropil) -, (3S,8aS)	0	0	2.03E+07
3119	211.1441	7.62	PS78	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	Pirrol [1,2-a] piridina-1,4-diona, hexahidro-3-2-metilpropil) -, (3S,8aS)	0	0	9059936

(Conclusão)

Identificação na planilha original do MZmine	<i>m/z</i>	Tempo de retenção	Identificação da substância no banco de dados [#]	Íon detectado	Fórmula molecular	Identificação	P1* Área do pico	P2* Área do pico	F1** Área do pico
3160	310.3104	27.11	PS42	[M+NH ₄] ⁺	C ₂₀ H ₃₆ O	6,10,14-Hexadecatrien-1-ol, 3,7,11,15-tetrametil-, -, (10E) -	0	1.09E+09	0
3249	312.3622	25.16	PS50	[M+NH ₄] ⁺	C ₂₁ H ₄₂	Heneicosano	0	5.99E+08	0
3339	174.1854	11.26	PS82	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₀ H ₂₀ O	2-Nonanona, 3-metil-	0	1.66E+07	0

Legenda:

*P1 e P2= Amostras do pool de veneno de *R.ornata* do tempo 1 e 2, respectivamente (tempo 1: campo; tempo 2: uma semana de alimentação artificial);

**F1= Amostra do veneno obtido do aparelho de ferrão e glândula de *P. striata*.

RO = Substâncias descritas na literatura para *R.ornata*.

PS = Substâncias descritas na literatura para *P. striata*.

Fonte: FRANÇA, 2015.

Nota: A ausência de determinada substância em uma amostra fica evidente nas colunas de áreas dos picos de P1, P2 e F1, aonde tem valor zero significa que não houve detecção.

O veneno de *R. ornata* é composto por bufadienolídeos, esteroides e aminas biogênicas como indolalquilaminas (FIGURA 12). A maioria dessas substâncias, detectadas em grandes quantidades no veneno extraído após a coleta de campo, se estinguem totalmente logo após a primeira semana de alteração da dieta. A classificação dos compostos seguiu a literatura (FLIER et al., 1980; TOLEDO; JARED, 1995; SEBBEN et al., 1993; SHWARTZ et al., 2005).

Entre as 26 substâncias detectadas no veneno de *R. ornata*, 5 são isômeras, ou seja, contém a mesma forma molecular e peso molar, mas apresentam tempo de retenção diferente, então são substâncias diferentes, 11 foram encontradas no banco de dados para substâncias existentes em *P. striata*, 3 parecem ter sido sintetizadas após os sapos passarem pela dieta de cativeiro como 6,10,14- Hexadecatrien- 1-ol, 3,7,11,15- tetrametil-, (10 E)-; Heneicosene e 2-Nonanone, 3-metil- e 1 substância identificada como Carbaril (1-Naftalenol, 1-(N-metilcarbamato), composto utilizado em regiões agrícolas como pesticida (FERRARI et al., 2011) (TABELA 3 e 4).

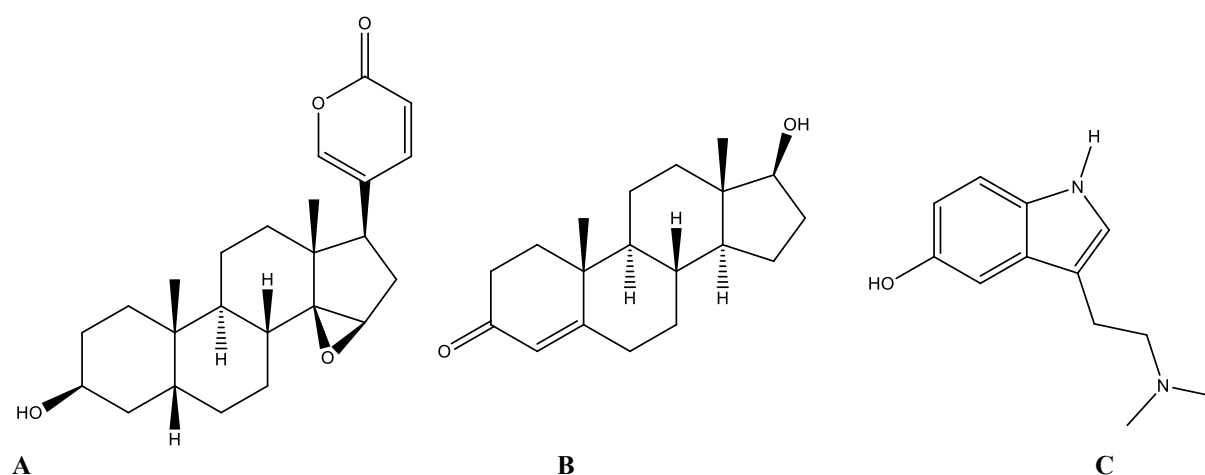


Figura 12- Algumas estruturas de substâncias identificadas no veneno de *R. ornata*.

- A) Bufo-20,22-dienolídeo, 14 β ,15 β -epoxi-3 β -hidroxi-, (5 β ,9 α ,8 β ,10 β ,13 β) (Bufalin/bufadienolídeo);
- B) Androst-4-en-3-one, 17-hidroxi-, (17b) - (esteroide/ Testosterona);
- C) Bufotenin (aminobiogênica).

Fonte: FRANÇA, 2015.

Tabela 4- Substâncias identificadas no veneno de *R. ornata* destacando em vermelho as três substâncias que passaram a ser sintetizadas pelos sapos após passarem por dieta de laboratório.

Identificação	Fórmula molecular	Massa molecular	Referências
*1-Naftalenol, 1- (N-metilcarbamato)	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	201.078979	(FERRARI et al., 2011)
1-Napftalenol, 1- (N-metilcarbamato)	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	201.078979	
*Bufa-20,22- dienolido, 14,15-epoxi-3-hidroxi-	C ₂₄ H ₃₂ O ₄	417.2257	(FERREIRA et al., 2013; SCIANI et al., 2013)
*Acetamida, N- [2- (5-metoxi-1H-indol-3-	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂	232.121185	(JESSOP et al., 2014); (REGUEIRA et al., 2013).
Acetamida, N- [2- (5-methoxi-1H-indol-3-	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂	232.121185	(JESSOP et al., 2014); REGUEIRA et al., 2013; SCIANI et al., 2013)
D-Aspartic acid, N-metil-2,6,10,14-	C ₅ H ₉ NO ₄	147.053162	(Mc ANENEY et al., 2011).
Hexadecatetraen-1-ol, 3,7,11,15-tetrametil-, (2E,6E,10E) -	C ₂₀ H ₃₄ O	290.260956	
2-Nonanona, 3-metil-	C ₁₀ H ₂₀ O	156.151413	(MORGAM et al., 2003).
Benzaldeído	C ₇ H ₆ O	106.041862	
Pentadecano	C ₁₅ H ₃₀	210.234756	
Oxirano, 2-nonil-3-octil-	C ₁₉ H ₃₈ O	282.292267	
Heptadecano	C ₁₇ H ₃₄	238.266052	
Pentadecane, 7-metil-	C ₁₆ H ₃₂	224.250397	(MORGAN et al., 1999)
*Androst-4-en-3-one, 17-hidroxi-, (17b) -	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288.208923	(NARAYAN et al., 2013; McANENEY et al., 2011).
Androst-4-en-3-one, 17-hidroxi-, (17b)-	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288.208923	(NARAYAN et al., 2013; REGUEIRA et al., 2013).
*Pregn-4-ene-3,20-diona	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.224579	(ORTIZ et al., 2014)
Pregn-4-eno-3,20-diona	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.224579	
1H-Indol-5-ol, 3- (2-aminoetil) -	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	176.094955	
Tridecene	C ₁₃ H ₂₆	182.203445	
Bufo-20,22- dienolido, 14,15-epoxi-3-hidroxi-,	C ₂₄ H ₃₂ O ₄	384.230072	(SCIANI et al., 2013).
Bufotenina	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O	204.126266	
1H-Indol-5-ol, 3- [2 - (metilamino)etil] -	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O	190.110611	
Bufo-20,22- dienolido, 3,14-dihidroxi-, (3b,5b) -	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	386.245697	(FERREIRA et al., 2013; SCIANI et al., 2013)
6,10,14-Hexadecatrien-1-ol, 3,7,11,15-tetrametil-, (10E) -	C ₂₀ H ₃₆ O	292.276611	(MORGAN et al., 2003)
Heneicosano	C ₂₁ H ₄₂	294.32.8644	
2-Nonanona, 3-metil-	C ₁₀ H ₂₀ O	156.151413	

*Substâncias isômeras detectadas no veneno de *R. ornata*.

Fonte: FRANÇA, 2015.

Entre as 10 substâncias detectadas em ambas as espécies, 6 delas foram descritas na literatura e detectadas no conteúdo químico do veneno das formigas coletadas como o alceno nonadeceno e alguns ácidos como o ácido 9- Hexadecenóico, ácido octadecanóico e o ácido oleico, sustentando a hipótese do sequestro de substâncias por *R. ornata* através da dieta com *P. striata* (TABELA 5, FIGURA 13). Tais substâncias são detectadas nas amostras dos *Pool* 1(tempo zero) e *Pool* 2 (uma semana de alimentação artificial). A substância 1-Naftalenol, 1-(N-metilcarbamato) encontra-se presente em ambas amostras de veneno (sapo e formiga). Dentre as substâncias detectadas em ambas as espécies 3 delas foram isômeras.

Tabela 5 - Substâncias identificadas no veneno de *R. ornata* e *P. striata* nesse trabalho.

Desreplicação	Fórmula molecular	Massa molecular	Referências
Ácido 9,12 Octadecadienóico (9Z,12Z)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.240234	(CROSSLAND et al., 2012).
*Ácido 9,12 Octadecadienóico (9Z,12Z) -	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.240234	
1-Naftalenol, 1 -(N-metilcarbamato)	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	201.078979	(FERRARI et al., 2011).
*1-Naftalenol, 1 -(N-metilcarbamato)	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	201.078979	
Ácido octadecanóico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.271515	(MORGAN et al., 1999).
Ácido 9-Hexadecenóico, (9Z) -	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254.294579	
Ácido 9-Octadecenóico (9Z) -	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.255890	
*Ácido 9-Octadecenóico (9Z) -	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.255890	
Nonadeceno	C ₁₉ H ₃₈	266.297363	(MORGAN et al., 2003).
6,10,14-Hexadecatrien-1-ol, 3,7,11,15-tetrametil-, (10E) -	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	292.276611	

*Substâncias Isômeras detectadas no veneno de *R. ornata* e *P. striata*.

Fonte: FRANÇA, 2015.

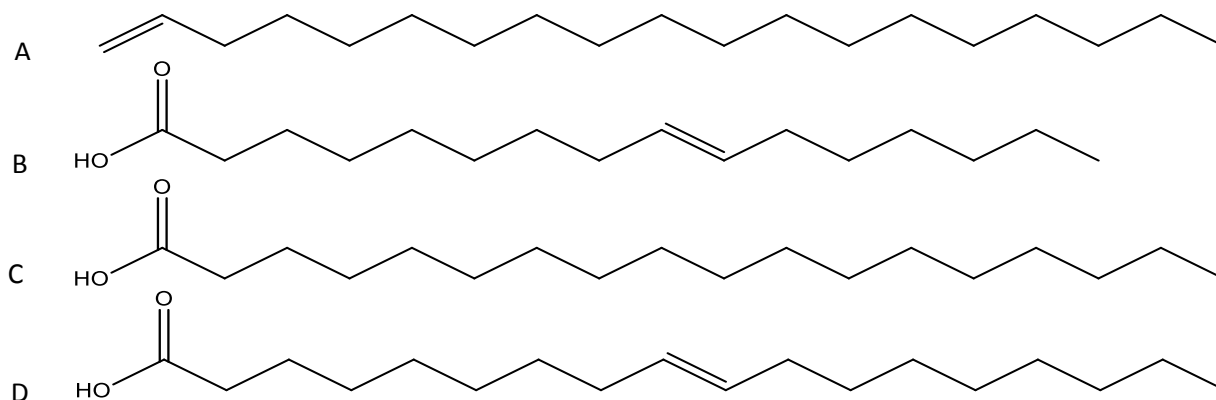


Figura 13- Algumas estruturas das substâncias identificadas no veneno de *R. ornata* e *P. striata*.

- A) Nonadeceno;
 B) Ácido 9-Hexadecenóico, (9Z)-(Ácido palmitoleico);
 C) Ácido octadecanóico (Ácido esteárico);
 D) 9,12- Ácido octadecadienóico (Ácido linoleico).

Fonte: FRANÇA, 2015.

Quanto ao conteúdo químico individual do veneno das formigas *P. striata*, as análises demonstraram que é composto essencialmente por alquilpirazinas, hidrocarbonetos, benzoquinonas e substâncias ácidas (FIGURA 14).

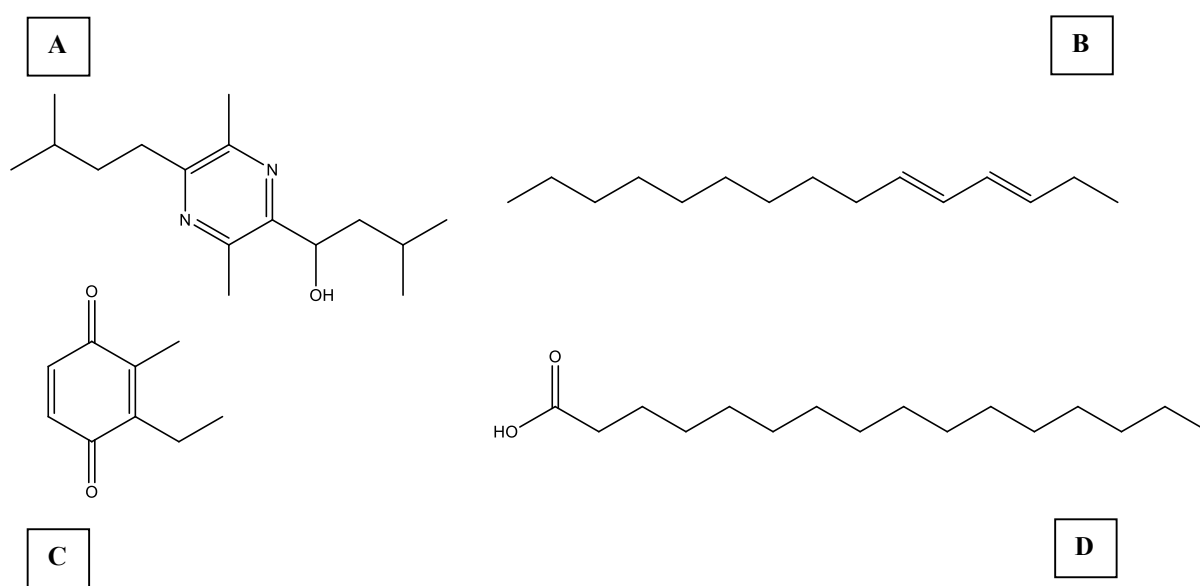


Figura 14- Exemplos de substâncias encontradas no conteúdo químico de *P. striata*.

- A.2- Pirazinemetanol 3, 6-dimetil-a- (2-metilpropil) -.
 B. Pentadecadieno;
 C. 2, 5 - Cicloexadieno-1, 4-diona, 2-etil-3-metil-. ;
 D. Ácido Hexadecanóico.

Fonte: FRANÇA, 2015.

Dentre as 16 substâncias detectadas 8 delas são isômeras, ou seja, contém a mesma forma molecular e peso molar, mas apresentam tempo de retenção diferente, então são substâncias diferentes (TABELA 6). Assim como foi observado substâncias isômeras para *R.ornata* e comuns para ambas as espécies estudadas.

Tabela 6 – Substâncias detectadas no veneno de *P. striata* coletadas nesse trabalho.

Desrepliação	Fórmula molecular	Massa molecular	Referências
2,5-Ciclohexadiene-1,4-diona, 2,3-dimetil-	C ₈ H ₈ O ₂	136.05429	(MACHADO et al., 2005).
*2,5-Ciclohexadiene-1,4-diona, 2,3-dimetil-	C ₈ H ₈ O ₂	136.05429	
*2,5-Ciclohexadiene-1,4-diona, 2,3-dimetil-	C ₈ H ₈ O ₂	136.05429	
2,5-Ciclohexadiene-1,4-diona, 2-etil-3-metil-	C ₉ H ₁₀ O ₂	150.068085	
*2,5-Ciclohexadiene-1,4-diona, 2,3-dimetil-	C ₈ H ₈ O ₂	136.05429	(MORGAN et al., 1999).
Ácido Hexadecanóico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.240234	
*Ácido Hexadecanóico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.240234	
2-Pirazinemetanol, 3,6-dimetil-5-(3-metilbutil)-a-(2-metilpropil)-	C ₁₆ H ₂₈ N ₂ O	264.220154	
Pirazine, 3-hexil-2,5-dimetil-Pentadecadieno	C ₁₂ H ₂₀ N ₂	192.162643	(MORGAN et al., 2003)
	C ₁₅ H ₂₈	208.219101	
*Pirrol[1,2-a] pirazine-1,4-diona, hexahidro-3- (2-metilpropil) -, (3S,8aS) -	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	210.136826	(MORGAN et al., 2003) ORTIZ; MATHIAS, 2006)
Pirazine, 2,5-dimetil-3-pentil-	C ₁₁ H ₁₈ N ₂	178.147003	(MORGAN et al., 1999).
*Pirazine, 2,5-dimetil-3- (4-metilpentil) -	C ₁₂ H ₂₀ N ₂	192.162643	
*Pirrol[1,2-a] pirazine-1,4-diona, hexahidro-3- (2-metilpropil) -, (3S,8aS) -	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	210.136826	(MORGAN et al., 2003); ORTIZ; MATHIAS, 2006)
Pirrol[1,2-a] pirazine-1,4-diona, hexahidro-3- (2-metilpropil) -, (3S,8aS) -	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	210.136826	MORGAN et al., 2003)
*Pirrol[1,2-a] pirazine-1,4-diona, hexahidro-3- (2-metilpropil) -, (3S,8aS) -	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	210.136826	MORGAN et al., 2003) (ORTIZ; MATHIAS, 2006)

*Substâncias isômeras detectadas no veneno de *P.striata*.

Fonte: FRANÇA, 2015.

6 DISCUSSÃO

Os resultados mostram claramente que algumas substâncias encontradas no veneno de *R. ornata* são sequestradas do veneno das formigas, que compõem sua dieta natural. Sob dieta de cativeiro, essas substâncias características do veneno natural de *R. ornata* foram reduzindo já na primeira semana até praticamente desaparecer no 3º mês. Isso corrobora a hipótese de alteração gradativa na composição química do veneno dos sapos estudados quando se modifica sua dieta (DALY et al., 2000).

Essa diminuição na concentração das substâncias presentes no veneno de sapo na primeira semana de dieta artificial poderia ser decorrente de estresse dos animais. A completa diminuição na produção destas substâncias também poderia ser consequência de algum tipo de deficiência nutricional pela dieta artificial. No entanto, essa diminuição demonstrou-se gradual e os animais na primeira semana não poderiam já indicar deficiência nutricional. Entre as substâncias que se reduziram após a mudança da dieta estão os ácidos de cadeia longa provenientes do veneno de *P. striata*, hormônios, algumas aminas e esteroides bufadienolídeos. No que se refere a redução nos índices hormonais, nossos dados corroboram os da literatura, pois os sapos provavelmente em sua atividade noturna ou em resposta a variações do ambiente, conseguem ajustar seu perfil hormonal, evitando perdas desnecessárias (JESSOP et al., 2014). Alguns compostos da formiga podem ser precursores do que os sapos perderam, para isso experimentos específicos deverão ser utilizados.

Várias substâncias de *P. striata* foram detectadas em veneno de *R. ornata*. Sendo assim, sugere-se que os sapos-curuzinho de fato devem sequestrar substâncias ou precursores de substâncias que compõem seu veneno a partir de sua dieta (formigas - *P. striata*). Onze substâncias detectadas em *R. ornata* já foram descritas na literatura para *P. striata* embora não tenham sido detectadas nas amostras de veneno das formigas capturadas. Provavelmente a quantidade dessas substâncias no veneno de *P. striata* estava em níveis abaixo do detectável pelo UHPLC-UV-MS ou ausentes na amostragem estudada. Sabe-se que as formigas podem variar seu perfil químico de acordo com a localidade de seus ninhos e também para cada espécie (EVISON et al., 2012; MORGAN et al., 1999).

Três das substâncias identificadas foram detectadas no veneno extraído após os sapos terem passado pela dieta de cativeiro e as mesmas coincidentemente foram encontradas no banco de dados construído a partir de dados da literatura para *P. striata*: 6,10,14-Hexadecatrien-1-ol; 3,7,11,15-tetrametil-, (10E), Heneicosano e 2-Nonanona, 3-metil-. Várias podem ser as causas desta alteração na composição química do veneno de *R. ornata*

e isso deve ser futuramente investigado. Vale ressaltar que a Tabela 3 resume todas as substâncias identificadas neste trabalho, mas cerca de 100 substâncias não identificadas foram também detectadas. Como as substâncias identificadas representam uma boa amostragem do perfil das substâncias detectadas nos venenos de *R. ornata* e *P. striata* para fazer as comparações objeto deste trabalho, as demais substâncias foram omitidas. Mais de 100 substâncias não puderam ser identificadas apenas com a comparação com a base de dados, possivelmente nunca antes identificadas, ao menos para os gêneros estudados. É importante salientar que a identificação utilizou apenas dados de substâncias descritas para os dois gêneros.

Então, existem várias substâncias não identificadas, além das 3 identificadas acima mencionadas, que passaram a ser detectadas no veneno de *R. ornata* com a alteração da dieta. Isso mais uma vez demonstra que a composição do veneno do sapo-cururuzinho é diretamente influenciada pela dieta.

Nos trabalhos de Daly e colaboradores (2003), 5 espécies dos gêneros *Dendrobates*, *Epipedobates* e *Phyllobates* foram estudadas e todas sequestravam substâncias do veneno de formiga e algumas, além disso, biotransformavam essas substâncias, potencializando ainda mais sua toxicidade. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os obtidos por esses autores. Devido a limitações das análises realizadas neste trabalho não é possível observar se o sapo-cururuzinho também biotransforma as substâncias obtidas de sua dieta. Estratégias similares às empregadas por Daly e colaboradores (2003) devem ser empregadas para este intuito.

Por serem grupos muito próximos filogeneticamente segundo Frost et al. (2006), é possível que a dupla formicivoria-sequestro defensivo tenha surgido uma única vez no ancestral comum de dendrobatídeos e bufonídeos. Um reforço para essa hipótese é o predomínio da formicivoria em bufonídeos (DALY et al., 2005; ISAACS; HOYOS, 2010). Se este comportamento alimentar estiver realmente associado ao sequestro de toxinas, é possível que a família praticamente toda também realize sequestro de substâncias para sua defesa.

Vale ressaltar que 09 substâncias detectadas no veneno de *R. ornata* são exclusivas para o gênero *Rhinella*, como alguns dos bufadienolídeos, aminas biogênicas e esteroides identificados, substâncias biologicamente ativas para a defesa passiva contra microrganismos e predadores potenciais (SCHWARTZ et al., 2005; CUNHA FILHO et al., 2005). Algumas dessas substâncias ainda que preliminarmente, podem ser indicadoras de relações de parentesco entre espécies, como a bufatenin uma indolalquinamina pertencente

ao grupo das aminas biogênicas (MACIEL et al., 2003). Outras substâncias detectadas para *R. ornata* como a Bufa-20,22-dienolido, 14,15-epoxi-3 β ,5 β -hidroxi-, conhecida como marinobufogenina, um esteroide de ação antimicrobiana também encontrado no conteúdo químico de *Rhinella rubescens* e de *Rhinella schneideri* e destacam por sua ação como inibidores da Leucemia promielocítica humana (HL-60) (NOGAWA et al., 2001; CUNHA FILHO et al., 2005; CUNHA FILHO et al., 2010). Isso sugere que a identificação e caracterização dessas substâncias são extremamente importantes e fornece suporte para estudos futuros em diferentes campos científicos, especialmente para a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos.

Os bufadienolídeos detectados fazem parte de um grupo de toxinas poderosas, principais componentes para a toxicidade desse grupo de sapos-cururu (CROSSLAND et al., 2012). Entre os eles estão: Bufa-20,22-dienolido, 14 β ,15 β -epoxi-3 β -hidroxi- e Bufa-20,22-dienolido, 3,14-dihidroxi-, (3b,5b)-, sintetizados a partir do metabolismo do colesterol e apresentando um anel lactônico constituído por 5 carbonos, C24 (3), uma γ -lactona-di-insaturada (= pentadienolídeo) (FLIER et al., 1980; RATES; BRIDI, 2007). Esses bufadienolídeos são geralmente encontrados na pele e na secreção cutânea dos anuros, mais exclusivamente nos da família Bufonidae em praticamente todo seu ciclo de vida (FLIER et al., 1980; DMITRIEVA et al., 2000; HAYES et al., 2009).

Tais compostos químicos (bufadienolídeos), incluindo seus derivados, são de extrema importância farmacológica tanto em condições naturais, quanto modificados quimicamente (CUNHA FILHO et al., 2010). De acordo com Schwartz et al. (2005) e Nogawa et al. (2001), esses compostos são substâncias com características diversas podendo ser cardiotóxicas, aumentando os batimentos cardíacos e pressão arterial, e até mesmo possuir propriedades antitumorais e antivirais contra o HIV como foi observado nos trabalhos de Bradbury (2005). Alguns estudos relatam ainda a ação dos bufadienolídeos como inibidores de Na⁺/K⁺ATPase agindo como reguladores fisiológicos no transporte de íons através da pele dos sapos favorecendo na defesa contra seus predadores (FLIER et al., 1980).

Entre as aminas biogênicas detectadas no conteúdo químico do veneno de *R.ornata*, vale destacar a serotonina, a N- metilserotonin e a bufotenina, aminas indólicas que apesar de estarem entre os compostos mais comuns encontrados principalmente entre os anfíbios do gênero *Bufo*, são extremamente importantes tanto para a defesa química desses animais quanto na farmacoterapia, pois são substâncias tidas como hormônios neurotransmissores e alcaloides indólicos com efeito alucinógenos (SCIANI et al., 2013).

Foram detectadas 5 substâncias isômeras no conteúdo químico de *R. ornata* que não conseguimos identificar ($C_{19}H_{28}O_2$, $C_{13}H_{16}N_2O_2$, $C_{21}H_{30}O_2$, $C_{24}H_{32}O_4$, $C_{12}H_{11}NO_2$). Essas substâncias apresentaram a mesma fórmula molecular e peso molar, porém são substâncias diferentes sendo que apresentam tempo de retenção no cromatograma distintos. Então, outras metodologias são necessárias para a identificação destas substâncias isômeras.

É importante salientar que, além disso, uma substância derivada de pesticidas foi detectada em quantidades significativas no conteúdo químico do veneno extraído dos sapos em P1, o Carbaril (1-Naftalenol, 1- (N-metilcarbamato), composto utilizado em regiões agrícolas como pesticida (FERRARI et al., 2011). Curiosamente o mesmo composto foi detectado no conteúdo químico das formigas coletadas. Assim podemos deduzir que ambas as espécies foram expostas a esses pesticidas, já que o fragmento em que foram coletadas é rodeado por plantações de café e milho. Compostos como Carbaril causam uma significativa redução na atividade de certas enzimas antioxidantes com ação antibacteriana em *R. arenarum* como a catalase (FERRARI et al., 2011).

Certos tipos de inseticidas podem causar ação anticolinesterásica, ou seja, causar inibição de enzimas colinesterase resultando deformações e elevados índices de mortalidade em embriões de *R. arenarum* (PECHEN DE D'ANGELO; VENTURINO, 2005). Por pertencer ao mesmo gênero, *R. ornata* também pode responder de forma similar. Anfíbios tem declinado suas populações em todo o mundo e uma das causas desse declínio é o uso desenfreado de inseticidas (BOONE et al., 2007). Em outro estudo nos fragmentos de Mata Atlântica desta região, foi detectada uma drástica redução da abundância de *R. ornata* e outros anfíbios, principalmente associada a plantações de cana-de-açúcar (D'ANUNCIAÇÃO et al., 2013).

Em relação às substâncias em comum entre as duas espécies (sapo e formiga), nossos dados corroboram os da literatura, em que espécies de dendrobatídeos sequestram substâncias defensivas que compõem seu veneno de formigas de sua dieta natural (DALY et al., 2000; DALY et al., 2005). Seis substâncias identificadas no veneno de *P. striata* capturadas, foram também encontradas no veneno dos sapos, entre elas estão em sua maioria hidrocarbonetos e substâncias ácidas de cadeia longa, ácidos graxos como Ácido octadecanóico, (ácido esteárico), Ácido 9,12- octadecadienóico (9Z,12 Z)-(ácido linoleico), Ácido 9- Hexadecenóico (9z) (ácido palmitoleico) e Ácido 9 – octadecenóico (9Z) (ácido oleico), e 1- nonadecano (nonadecano), provavelmente utilizados por essas formigas na defesa contra predadores (RODRIGUES, 2009).

Até o momento constava-se na literatura que esse tipo de substâncias estaria presente somente nas glândulas de formigas da espécie *P. indica* (MORGAN et al., 1999). Portanto, pela primeira vez estas substâncias estão sendo descritas para *P. striata*.

Os dados sobre o conteúdo químico das formigas sequestrado pelos sapos corroboram aqueles obtidos na literatura para formigas do gênero (MORGAN et al., 1999). Os resultados mostram que *R. ornata* bioacumula as substâncias que sequestra, já que as substâncias do veneno das formigas mantiveram-se ainda que em menores quantidades, pelo menos até a primeira semana após a nova dieta. A maioria dos anfíbios possuem glândulas especializadas para compartimento dessas substâncias, podendo até causar uma certa redução no grau de toxicidade para si, porém o mecanismo de bioacumulação ainda precisa ser melhor elucidado (SAPORITO et al., 2010; SAPORITO et al., 2012).

Comparando os dados gerais do conteúdo químico de *P. striata*, com os de *R. ornata*, pode-se notar que essa espécie de anfíbio teve maior acumulação de substâncias ácidas em seu veneno. Isso indica, ainda que preliminarmente, que essa espécie não consegue bioacumular todos os compostos de suas presas. Parte das substâncias absorvidas podem ter sofrido biotransformação, mas isso deve ser investigado por metodologias adequadas.

Quanto ao conteúdo químico geral das formigas coletadas detectou-se maior quantidade de metabólitos nas amostras extraídas a partir do veneno do aparelho de ferrão e glândula de Dufour. Informações sobre o funcionamento dessas glândulas e composição química ainda são escassas (MORGAN et al., 2003). Das 16 substâncias identificadas observou-se em sua maioria uma complexa mistura de alcaloides pirazinas, cuja origem de sua biossíntese ainda não foi estudada e algumas substâncias voláteis como os alcanos (MORGAN et al., 1999). Tais substâncias podem atuar na defesa e comunicação química auxiliando esses insetos em sua organização dentro dos ninhos (MORGAN et al., 2003). Estudos também apontam que essas substâncias poderiam ser utilizadas na marcação do território em volta dos ninhos, porém não há evidências sólidas sobre esse tipo de comportamento (MORGAN et al., 2009).

Curiosamente dentre essas substâncias, notou-se a presença de algumas benzoquinonas alquiladas (2,5-Cicloexadieno-1,4-diona, 2,3-dimetil-; 2,5-Cicloexadieno-1,4-diona, 2-etil-3-metil-), substâncias defensivas até então descritas na literatura para espécies de opilião como o *Goniosoma longipes* (Gonyleptidae). Essa espécie de opilião consegue através das benzoquinonas contidas em suas secreções defensivas se defender de alguns predadores potenciais (MACHADO et al., 2005). Provavelmente essas substâncias também são utilizadas pelas formigas para sua defesa, já que as mesmas são bastante eficazes

contra vários tipos de predadores invertebrados e vertebrados (MACHADO et al., 2005). As benzoquinonas alquiladas sintetizadas por opilões apresentam distribuição mais restrita na natureza (EISNER; ALSOP; MEINWALD, 1978).

Sobre a composição química da secreção cutânea de *R. ornata*, nossos resultados ainda que preliminares, sugerem um modelo alternativo para estudos sobre sua utilidade farmacológica assim como também sobre o funcionamento do mecanismo de defesa desses animais. Talvez por conta dessa capacidade (sequestro de substâncias defensivas-bioacumulação), essa espécie-alvo tenha o sucesso adaptativo que demonstra, dominando os ambientes que ocupa. Sucesso comparável ao de *R. marina*, que se beneficiou disso para se tornar uma espécie-praga invasora de campos australianos, cujo veneno tem provocado o declínio de muitas espécies de predadores (MAYES; WITHERS, 2005). Curiosamente, na Austrália essa espécie apresenta alta toxicidade, mesmo se alimentando-se de itens diferentes de sua dieta original nativa (SHINE, 2012).

Compreender melhor o fenômeno de sequestro defensivo sob dietas diferentes para *R. ornata* pode ajudar na mitigação dos impactos negativos de espécies tóxicas invasoras, como *R. marina* na Austrália, ou mesmo avaliar melhor o potencial generalista ou bioindicador de *R. ornata* (D'ANUNCIAÇÃO et al., 2013). Isso pode ajudar a explicar o sucesso adaptativo dessa espécie e talvez também porque, apesar desse sucesso, ela parece não responder bem ao avanço de canaviais (PRADO et al., 2009; D'ANUNCIAÇÃO et al., 2013). A compreensão de tal vulnerabilidade pode ajudar na mitigação dos constantes declínios que vem ocorrendo com vários anfíbios nos últimos anos (LEMES et al., 2014).

Estudos sobre dieta-toxicidade de veneno ainda são incipientes e mais trabalhos precisam ser feitos. O presente estudo é o único até o momento realizado com as espécies *R. ornata* e *P. striata*, abordando essa associação e os resultados obtidos viabilizam nossas premissas, além de abrir portas para melhor compreensão sobre o sequestro e acumulação de substâncias nas interações insetos-vertebrados.

REFERÊNCIAS

- AMPHIBIAWEB: **Information on amphibian biology and conservation**. Berkeley: AmphibiaWeb. Disponível em: < <http://amphibiaweb.org/>>. Acesso em: Jul. 2015.
- ANDREANI, P.; SANTUCCI, F.; NASCETTI, G. Le rane verdi del complesso *Rana esculenta* come bioindicatori della qualità degli ambienti fluviali italiani. **Biologia Ambientale**, v.17, n.1, p. 35-44, 2003.
- ALIBARDI, L. Structural and immunocytochemical characterization of keratinization in vertebrate epidermis and epidermal derivatives. **International Review of Cytology**, v. 253, p.177–259, 2006.
- AQUINO, A. M; AGUIAR-MENEZES, E. de A.; QUEIROZ, J. M. **Recomendações para coleta de artrópodes terrestres por armadilhas de queda (“Pitfall- Traps”)**. Seropédica, RJ, 2006. Disponível em: <<http://WWW.cnpab.br/publicacoes/download/cit018.pdf>>. Acesso em: mar. 2013.
- BALDISSERA JÚNIOR, F. A.; CARAMASCHI, U.; HADDAD, C. F. B. Review of the *Bufo crucifer* species group, with descriptions of two new related species (Amphibia, Anura, Bufonidae). **Arquivo do Museu Nacional**, v. 62, n. 3, p. 255-282, 2004.
- BERENBAUM, M. The chemistry of defense: theory and practice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 2–8, 1995.
- BERTOLUCI, J. et al. Herpetofauna da Estação Ambiental de Peti, um fragmento de Mata Atlântica do estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 9, p.147-155, 2009.
- BOLTON, B. Synopsis and classification of formicidae, of memoirs of the American Entomological Institute. **American Entomological Institute**, v. 71, 2003.
- BOONE, M. et al. Multiple stressors in amphibian communities: effects of chemical contamination, bullfrogs, and fish. **Ecological Applications**, v. 17, p. 291-301, 2007.
- BOLTON, B. An online catalog of the Ants of the World. **Antcat**. Disponível em: <<http://www.antcat.org/>>.2013>. Acesso em 16 Jul. 2013.
- BRADBURY, J. Frog skin hope for HIV prevention. **Drug Discovery Today**, v.10, p.1489–1490, 2005.
- CAMPENY, R.; MONTORY, A. Feeding of an Iberian population of *Bufo bufo* during the reproductive period. **Scientia Herpetological**, p. 172–175, 1995.

- CARVALHO, I. F. **Atividade antinociceptiva, em dores agudas, de um novo fator opióide da secreção cutânea de *Rhinella schneideri***. 2008. 110f. Dissertação (Pós-Graduação) - Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.
- CHAPARRO, J. C.; PRAMUK, J.; GLUESENKAMP, A. G. A new species of arboreal *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from the cloud forest of southeastern Peru. **Herpetologica**, v. 63, n. 2, p. 203-212, 2007.
- CORN, P. S. Standard techniques for inventory and monitoring – Straight – line drift fences and pit falls traps. In: HEYER, W. R. et al (Ed.). **Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for amphibians**. Smithsonian Institution Press, [s. l.], 1994. p. 118-124.
- CROSSLAND, M. R. et al. Mass mortality of native anuran tadpoles in tropical Australia due to the invasive cane toad (*Bufo marinus*). **Biological Conservation**, v. 141, p. 2387–2394, 2008.
- CUNHA FILHO, G. A. et al. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*. **Toxicon**, v. 45, n. 6, p. 777–782, 2005.
- CUNHA-FILHO, G. A. et al. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Toxicon**, v. 56, n.3, p. 339–348, 2010.
- DALY, J.W.; MYERS, C.W.; WHITTAKER, N. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs, Dendrobatidae, with a general survey of toxic noxious substances in the Amphibia. **Toxicon**, v. 25, n. 10, p. 1023- 1095, 1987.
- DALY, J.W. et al. Dietary source for skin alkaloids of poison frogs (Dendrobatidae)? **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, p. 943–955, 1994.
- DALY, J. W. et al. Absence of skin alkaloids in captive-raised Madagascan mantelline frogs and sequestration of dietary alkaloids. **Toxicon**, v. 35, n.7, p. 1131-1135, 1997.
- DALY, J.W. et al. Arthropod-Frog connection: Decahydroquinoline and Pyrrolizidine alkaloids common to microsympatric myrmicine ants and Dendrobatid frogs. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p. 73-85, 2000.
- DALY, J.W. et al. Evidence for an enantio selective pumiliotoxin 7-hydroxylase in dendrobatid poison frogs of the genus *Dendrobates*. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 100, p. 11092–11097, 2003.
- DALY, J. W., SPANDE, T. F., GARRAFFO, H. M. Alkaloids from amphibian skin: a

tabulation of over eight-hundred compounds. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1556-1575, 2005.

DALY, J. W, et al. Alkaloids in bufonid toads (*Melanophryniscus*): temporal and geographic determinants for two Argentinian species. **Journal Chemical Ecology**, v. 31, p. 871–887, 2007.

DARST, R. C. et al. Evolution of dietary specialization and chemical defense in poison frogs (*Dendrobatidae*): A comparative analysis. **American Naturalist**, v. 65, p. 56-69, 2005.

DARST, R. C.; CUMMINGS, E. M.; CANNNATELLA, C. D. A mechanism for diversity in warning signals: conspicuousness versus toxicity in poison frogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 5852–5857, 2006.

D'ANUNCIAÇÃO, P. E. R. et al. Forest fragments surrounded by sugar cane are more inhospitable to terrestrial amphibian abundance than fragments surrounded by pasture. **International Journal of Ecology**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

DIMITRIEVA, R. et al. Mammalian bufadienolides is synthesized from cholesterol in the adrenal cortex by a pathway that is independent of cholesterol side-chain cleavage. **Hypertension**, v. 36, p. 442-448, 2000.

DIXO, M.; VERDADE, V. K. Herpetofauna de serapilheira da Reserva Florestal de Morro Grande, Cotia (SP). **Biota Neotropica**, v. 6, p. 1-20, 2006.

DUMBACHER, J. P. et al. Homobatrachotoxin in the genus *Pitohui*: chemical defense in birds? **Science**, v. 258, p. 799–801, 1992.

EISNER, T.; ALSOP, D.; MEINWALD, J. Secretions of opilionids, whip scorpions and pseudoscorpions, **Arthropod Venoms**, v. 48, p. 87-99, 1978.

FERRARI, A. et al. Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and antioxidant enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 34–39, 2011.

FERREIRA, R. B.; TEIXEIRA, R. L. Feeding pattern and use of reproductive habitat of the Striped *Rhinella crucifer* (Anura: Bufonidae) from Southeastern Brazil. **Acta Herpetologica**, v. 4, n. 2, p. 125-134, 2009.

FILIPELLO, A.; CRESPO, F. A. Alimentación em *Melanophryniscus stelzneri* (Anura: Bufonidae). **Cuadernos de Herpetología**, v. 8, p. 18–24, 1994.

FONTANA, P. L. M. **Estudo morfológico comparativo do sistema de defesa química cutânea em duas espécies de sapos amazônicos (*Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus*)**. 2012. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós graduação em Toxinologia do Instituto Butantan, São Paulo – SP, 2012.

FLIER, J. et al. Widespread occurrence in frogs and toads of skin compounds interacting with the Ouabain site of Na⁺, K⁺-ATPase. **Science**, v. 208, p. 503–505, 1980.

FROST, D. R. et al. The Amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 297, p. 1–370, 2006.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. **American Museum of Natural History, New York, USA**. 2015.

Disponível em: < <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. Acesso em: 30 Jul. 2015.

GRANT, T. A new, toxic species of *Colostethus* (Anura: Dendrobatidae: Colostethinae) from the Cordillera Central of Colombia. **Zootaxa**, v. 1555, p. 39–51, 2007.

GIANOTTI, E.; MACHADO, V. L. L. Notes on the foraging of two species of ponerine ants: food resources and daily hunting actives (Hymenoptera, Formicidae). **Bioikos**, v. 6, n. 91-2, p. 7-17, 1994.

GRIMALDI, D. et al. New and rediscovered primitive ants (Hymenoptera: Formicidae) in Cretaceous amber from New Jersey, and their phylogenetic relationships. **American Museum Novitates**, v. 3208, p. 1-43, 1997.

GUIX, J. C.; LOPES, R. M. Occurrence of *Hyla geographica* Spix and *Bufo crucifer* Wied tadpoles in brackish water environment in the Juréia region (São Paulo, SE Brazil). **Amphibia-Reptilia**, v. 10, p. 85-192, 1989.

RAGHAVAN, K. V. et al. Efficacy of frog skin lipids in wound healing. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, p. 74, 2010.

HASLAM, I. S. et al. From frog integument to human skin: dermatological perspectives from frog skinbiology. **Biological Reviews**, v. 89, p. 618–655, 2014.

HAYES, T. B. et al. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 921–933, 2010.

HONORATO, M. **Análise peptidômica da secreção cutânea do anuro *Eupemphix nattereri* com ênfase na prospecção de peptídeos antimicrobianos**. 2009.74f. Dissertação (Mestrado e Ecologia Animal) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2009.

HUTCHINSON, A. et al. Chemical investigations of defensive steroid sequestration by the Asian snake *Rhabdophis tigrinus*. **Chemoecology**, v. 22, p. 199-206, 2012.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES - IUCN. **IUCN Red List of Threatened Species**. Cambridge, 2008. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 05 Mar. 2012.

ISAACS, P.; HOYOS, J. M. Diet of the cane toad in different vegetation covers in the productive systems of the Colombian coffee region. **South American Journal of Herpetology**, v. 5, n. 1, p. 45-50, 2010.

IUCN. 100 of the worlds' worst invasive species: a selection from the global invasive species database See. 2001. Disponível em: <http://www.issg.org/booklet.pdf>. Acesso em: 22 Jul. 2014.

JARED, C. et al. Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): Their structure and functioning in passive defense. **Toxicon**, v. 54, n.3, p. 197-207, 2009.

JARED, et al. The Amazonian toad *Rhaebo guttatus* is able voluntarily squirt poison from the paratoid macroglands. **Amphibia- Reptilia**, v. 32, p. 546-549, 2011.

JESSOP, T. S. et al. Interplay among nocturnal activity, melatonin, corticosterone and performance in the invasive cane toad (*Rhinella marinus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 206, p. 43-50, 2014.

KEMPF, W.W. Catálogo abreviado das formigas da Região Neotropical (Hym. Formicidae). **Studia Entomologica**, n. 15, p. 449- 464, 1972.

KEMPF, W.W. "As formigas do gênero *Pachycondyla* Fr. Smith no Brasil (Hymenoptera: Formicinae)," **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 10, p. 189-204, 1961.

LAJMANOVICH, R. Relaciones tróficas de bufónidos (Anura, Bufonidae) en ambientes del Río Paraná, Argentina. **Alytes**, v. 13, p. 87-103, 1995.

LEITE, J.R. et al. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. **Peptides**, v. 26, n.4, p. 565-73, 2005.

LEMES, P.; MELO, A. S.; LOYOLA, R. D. Climate change threatens protected areas of the Atlantic Forest. **Biodivers Conserv**, v. 23, p. 357-368, 2014.

LILLYWHITE, H. B. Water relations of tetrapod integument. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 202-226, 2006.

MACIEL, N. M. et al. Composition of indolealkylamines of *Bufo rubescens* cutaneous secretions compared to six other Brazilian bufonids with phylogenetic implications.

Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology, v. 134, n. 4, p. 641–649, 2003.

MACHADO, G. et al. Chemical defense in harvestmen (Arachnida, Opiliones): Do benzoquinone secretions deter invertebrate and vertebrate predators? **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 11, p. 2519–2539, 2005.

MACKAY, W. P.; MACKAY, C. E. E. A new species of the ant genus *Pachycondyla* F. Smith, 1858 from Ecuador (Hymenoptera: Formicidae). **Myrmecologische Nachrichten**, v. 8, p. 49-51, 2006.

MAYERS, P. J. et al. Diet and foraging behaviour of the semi-aquatic *Varanus mertensi* (Reptilia: Varanidae). **Wildlife Research**, v. 32, p. 67-74, 2005.

MASCHWITZ, U.; JESSEN, K.; MASCHWITZ, E. Foam *Pachycondyla*. A new defense mechanism in ants. **Behavioral Ecology Sociobiology**, v. 9, p. 79- 81, 1981.

MEBS, D. Toxicity in animals: trends in evolution. **Toxicon**, v. 39, p. 87–96, 2001.

MONNIN, T; PEETERS, C. Dominance hierarchy and reproductive conflicts among subordinates in a monogynous queenless ant. **Behavioral Ecology Sociobiology**, v. 10, p. 23- 332, 1999.

MORGAN, E. D. et al. Comparative study of mandibular gland secretion of workers of ponerine ants. **Journal Of Chemical Ecology**, v. 25, n. 6, p. 1395–1409, 1999.

MORGAN, E. D. et al. Comparative survey of abdominal gland secretions of the ant subfamily Ponerinae. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, p. 95–114, 2003.

MURARI, A. B. et al. Levantamento de arthópodes de solo em fragmento florestal de *Pinus elliotti* Engelm. In: Ecologia do Brasil, 9., 2009, São Lourenço: **Anais...** São Lourenço: UFSM, 2009. Disponível em: <http://www.seb-ecologia.org.br/2009/resumos_ixceb/494.pdf>. Acesso em mar. 2013.

NASCIMENTO, L. B; OLIVEIRA, M. E. **Herpetologia no Brasil II**. 1. ed. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2007.

NOGAWA, T. et al. Isolation and structure of five new cancer cell growth inhibitory bufadienolides from the Chinese traditional drug Ch'an Su. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1148-1152, 2001.

PACHYCONDYLA, a genus that wasn't. Disponível em: <http://www.myrmecos.net/2013/05/15/pachycondyla-a-genus-that-wasnt/>. Acesso em: 23 Jul. 2014.

PARMELEE, J. R. Trophic ecology of a tropical anuran assemblage. **Scientific Papers Natural History Museum The University of Kansas**, v. 11, p. 1-59, 1999.

PECHEN DE D'ANGELO, A. M.; VENTURINO, A. Biochemical targets of xenobiotics: Biomarkers in amphibian ecotoxicology. **Applied Herpetology**, v. 2, n. 3, p. 335–353, 2005.

PEETERS, C. Morphologically 'primitive' ants: comparative review of social characters, and the importance of queen-worker dimorphism. p. 372–391. In: CHOE, J.C.; CRESPI, B. J. (Ed.). **Social behavior in insects and arachnids**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.

PEREIRA, A. A. **A dieta de uma sapo varia de acordo com o sexo e com o uso da terra em volta dos fragmentos de mata em que habita?** 2013.33f. Monografia de conclusão de curso de (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas-MG, 2013.

POMBAL Jr., J. P.; GORDO, M. Anfíbios anuros da Juréia. In: MARQUES, O. A. V.; DULEBA, W. (Ed.). **Estação Ecológica Juréia-Itatins. Ambiente físico, flora e fauna**. Ribeirão Preto: Holos, 2004. p. 243-256.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

PRADO, V.H.M. et al. Anura, Estação Ecológica de Jataí, São Paulo state, southeastern Brazil. **Check List**, v. 5, p. 495-502, 2009.

PRAMUK, J. B. Phylogeny of south American toad *Bufo* (Anura: Bufonidae) inferred from combined analyses. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 146, n. 3, p. 407-452, 2006.

RAGHAVAN, K. et al. Efficacy of frog skin lipids in wound healing. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, n. 74, p. 1-7, 2010.

RATES, S. M. K.; BIRIDI, R. Heterosídeos cardioativos. In: SIMÕES, C.M.O et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007. p. 581- 685, 710, cap. 26.

RETALLAK, G. J. Woodland Hypothesis for Devonian Tetrapod Evolution. **The Journal of Geology**, v. 119, n. 3, p. 235-258, 2011.

RIBEIRO-JUNIOR, J.W.; BERTOLUCI, J. Anuros do cerrado da Estação Ecológica e da Floresta Estadual de Assis, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 9, p. 1676-0603, 2009.

RODRIGUES, M.S. **Ocorrência de poliginia, agressividade e secreção química liberada pelo gáster em *Pachycondyla striata* SMITH (Formicidae: Ponerinae)**. 2009. 53f. Dissertação (Pós graduação em Biologia animal) – Universidade Federal de Viçosa,

Viçosa –MG. 2009.

RODRÍGUEZ, L. O.; DUELLMAN, W. E. Guide to the frogs of the Iquitos region Amazonian Peru. **The University of Kansas Natural History Museum Special Publication**, v. 22, p. 1-80, 1994.

RODRIGUES, M. S. **Ocorrência de poliginia, agressividade e secreção química liberada pelo gáster em *Pachycondyla striata* SMITH (Formicidae: Ponerinae). 2009. 53f.** Dissertação (Pós graduação em Biologia animal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa –MG. 2009.

ROLLINS-SMITH, L. A; CONLON, M. J. Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 29, p. 589 – 598, 2005.

RUST, J.; ANDERSEN, N. M. Giant ants from the Paleogene of Denmark with a discussion of the fossil history and early evolution of ants (Hymenoptera: Formicidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.125, p. 331- 348, 1999.

SANTANA, A. S.; JUNCÁ, F. A. Diet of *Physalaemus* cf. *cicada* (Leptodactylidae) and *Bufo granulosus* (Bufonidae) in a semideciduous forest. **Brazilian Journal Biology**, v. 67, n.1, p. 125-13, 2007.

SANTANA, F. A. **Imunogenicidade do veneno de *Dinoponera australis* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae). 2008. 78 f.** Tese (Dissertação em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2008.

SANTOS, R. R.; GRANT, T. Diel pattern of migration in a poisonous toad from Brazil and the evolution of chemical defenses in diurnal amphibians. **Evolutionary Ecology**, v. 25, p. 249-258, 2011.

SANTOS, J. C. et al. Multiple recurring origins of aposematism and diet specialization in poison frogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 100, p. 12792–12797, 2003.

SAPORITO, R. A. et al. A siphonotid millipede (*Rhinotus*) as the source of spiropyrrolizidine oximes of dendrobatid frogs. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, p. 2781–2786, 2003.

SAPORITO et al. Formicine ants: an arthropod source for the pumiliotoxin alkaloids of dendrobatid poison frogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 101, p. 8045–805, 2004.

SAPORITO et al. Oribatid mites as a major dietary source for alkaloids in poison frogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.104, p. 8885–8890, 2007.

SAPORITO, R. A. et al. A review of chemical ecology in poison frogs. **Chemoecology**, v. 22, p. 159-168, 2012.

SAVITZKY, H. et al. Sequestered defensive toxins in tetrapod vertebrates: principles, patterns, and prospects for future studies. **Chemoecology**, v.22, p.141-158, 2012.

SCIANI, J. M. et al. Differences and similarities among parotoid macrogland secretions in south american toads: a preliminary biochemical delineation. **The Scientific World Journal**, v.1, p. 9, 2013.

SCHWARTZ, C. A. et al. Princípios bioativos da pele de anfíbios: panorama atual e perspectivas. Herpetologia do Brasil II. In: NASCIMENTO, L. B.; OLIVEIRA, M. E. **Sociedade Brasileira de herpetologia**, Belo Horizonte: PUC Minas, 2005. v. 2, p. 146-168.

SEBBEN, A.; SCHWARTZ, C.B.; CRUZ, J. dos S. A defesa química dos anfíbios. **Ciência Hoje**, v.15, p. 25-33, 1993.

SEGALLA, M.V. et al. Brazilian amphibians – List of species. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br>>. Acesso em: 05 Jul. 2014.

SHINE, R. Invasive species as drivers of evolutionary change: cane toads in tropical Australia. **Evolutionary applications**, v. 5, p. 107-116, 2012.

SILVA, M. F. **Influência de fatores externos e internos sobre o deslocamento de guildas da herpetofauna**. 2013. 54f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Tecnologia ambiental). Universidade Federal de Alfenas, Alfenas- MG, 2013.

PHILLIPS, B. L.; SHINE, R. Adapting to an invasive species: toxic cane toads induce morphological change in Australian snakes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 101, p. 17150–17155, 2004.

TERMONIA, A. et al. Dual chemical sequestration: a key mechanism in transitions among ecological specialization. **Proceedings of the Royal Society London**, v. 269, p. 1–6, 2001.

TOLEDO, L. F. Predation of juvenile and adult anurans by invertebrates: current knowledge and perspectives. **Herpetological Review**, v. 36, n. 4, p. 395-400, 2005.

TOLEDO, L. F.; SAZIMA, I.; HADDAD, C. F. B. Behavioural defences of anurans: an overview. **Ethology Ecology & Evolution**, v. 23, n. 1, p. 1-25, 2011.

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

TOFT, C. A. Feeding ecology of Panamanian litter anurans: patterns in diet and foraging mode. **Journal de Herpetology**, v. 15, p. 139-144, 1981.

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

URBAN, M. C. et al. The cane toad's (*Chaunus [Bufo] marinus*) increasing ability to invade Australia is revealed by a dynamically updated range model. **Proceedings of the Royal Society**, v. 274, p. 1413–1419, 2007.

VANCOMPERNOLLE, S. E. et al. Antimicrobial peptides from amphibian skin potently inhibit human immunodeficiency virus infection and transfer of virus from dendritic cells to T cells. **Journal Virology**. v.79, p.11598–11606, 2005.

VITT, L. J. et al. Amphibians as harbingers of decay. **Bioscience**, v. 40, n. 6, p. 418, 1990.

WILD, L. A. The genus *Pachycondyla* (Hymenoptera: Ponerinae) in Paraguay. **Bol. Museo Nacional de História del Paraguai**, v. 14, p.1- 18, 2002.

YOSHIDA, K. et al. A. Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis. **Journal of Dermatological Sciences**, v.71, p. 89–99, 2013.