

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E  
CONSERVAÇÃO**

**PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM ANFÍBIOS: UM  
ESTUDO CIENCIOMÉTRICO MULTIPARÂMETRO**

Autora: Marcela Melo Peres Goulart  
Orientador: Dr. Fábio Henrique Dyszy  
Coorientadora: Dra. Lia Raquel de Souza Santos

**RIO VERDE - GO  
Março – 2019**

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E  
CONSERVAÇÃO**

**PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM ANFÍBIOS: UM  
ESTUDO CIENCIOMÉTRICO MULTIPARÂMETRO**

Autora: Marcela Melo Peres Goulart  
Orientador: Dr. Fábio Henrique Dyszy  
Coorientadora: Dra. Lia Raquel de Souza Santos

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração em Conservação dos Recursos Naturais.

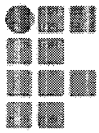
**RIO VERDE – GO  
Março – 2019**

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

G694p GOULART, MARCELA MELO PERES GOULART  
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM ANFÍBIOS: UM ESTUDO  
CIENCIOMÉTRICO MULTIPARÂMETRO / MARCELA MELO PERES  
GOULART GOULART; orientador FABIO HENRIQUE DYSZY  
DYSZY; co-orientador LIA RAQUEL DE SOUZA SANTOS  
SANTOS. -- Rio Verde, 2019.  
94 p.

Dissertação (Mestrado em BIODIVERSIDADE E  
CONSERVAÇÃO) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio  
Verde, 2019.

1. ANURA. 2. CROMATOGRAFIA. 3. PEPTÍDEO  
ANTIMICROBIANO. 4. CIENCIOMETRIA. I. DYSZY, FABIO  
HENRIQUE DYSZY, orient. II. SANTOS, LIA RAQUEL DE  
SOUZA SANTOS, co-orient. III. Título.



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO**

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

**Identificação da Produção Técnico-Científica**

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese                        | <input type="checkbox"/> Artigo Científico              |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação      | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro              |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro                          |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação             | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico             | e Educacional - Tipo:                                   |

Nome Completo do Autor: MARCELA MELO PERES GOULART  
Matrícula: 2017102310840059  
Título do Trabalho: PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM ANFÍBIOS: UM ESTUDO CIENCIOMÉTRICO MULTIPARÂMETRO

**Restrições de Acesso ao Documento**

Documento confidencial:  Não  Sim, justifique: \_\_\_\_\_

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 02/07/19  
O documento está sujeito a registro de patente?  Sim  Não  
O documento pode vir a ser publicado como livro?  Sim  Não

**DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA**

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

R. Verde 02/07/2019  
Local Data

Marcela Melo Peres Goulart  
Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

[Assinatura]  
Assinatura de(a) orientador(a)

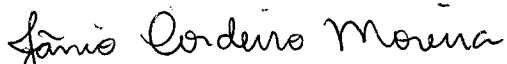
**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E  
CONSERVAÇÃO**

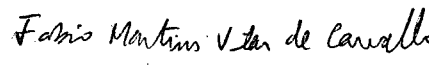
**PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM ANFÍBIOS: UM  
ESTUDO CIENCIOMÉTRICO MULTIPARÂMETRO**

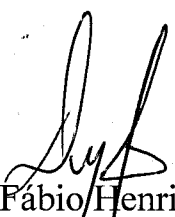
Autora: Marcela Melo Peres Goulart  
Orientador: Fábio Henrique Dyszy

*TITULAÇÃO:* Mestre em Biodiversidade e Conservação – Área de  
concentração Conservação dos Recursos Naturais.

APROVADA em 29 de março de 2019.

  
Prof. Dr. Jânio Cordeiro Moreira  
*Avaliador interno*  
IF Goiano / Rio Verde

  
Prof. Dr. Fábio Martins Vilar de Carvalho  
*Avaliador externo*  
IF Goiano / Rio Verde

  
Prof. Dr. Fábio Henrique Dyszy  
*Presidente da Banca*  
IF Goiano / Rio Verde

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho á minha família

Marcia Gomes de Melo, minha mãe, minha guerreira que me criou com a ajuda da minha família e nunca desistiu de nos da sempre o melhor que podia, e nunca me esquecerei de cada ensinamento e batalha que enfrentou por amor á mim e minhas irmãs.

Amanda Melo e Mariela Melo de Oliveira, minhas irmãs que sempre brigamos muito e diversas vezes ficamos sem se falar, mas que sempre pudemos contar uma com a outra no cuidado, carinho, e risos.

Ao Ricardo Peres Goulart meu esposo amado e aos nossos cachorros juca e juju minha família que quero aumenta. Sempre encontrei apoio e companheirismo em todas as minhas decisões e sempre me incentivou a continuar a investir na profissão que escolhi por amor, sempre sonhamos juntos e continuaremos.

Aos meus tios amados Gilberto e Marli que sempre me confortaram e cuidaram de minha nas minhas dificuldades.

Sou imensamente grata pela benção de ter cada um na minha vida, Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente á Deus que sempre guarda os meus caminhos e me permitiu superar todos as dificuldades, aos meus amigos e familiares que sempre me apoiaram.

Aos meus orientadores, professor Dr. Fábio Henrique Dyszy, por quem aprendi que se obtem sucesso através da dedicação. Obrigada pelo apoio, oportunidade, paciência, sempre impenho em me ajudar em todas as situações. Muito obrigada.

À minha amiga e coorientadora, professora Dra. Lia Raquel de Souza Santos, quando nos conhecemos Deus me agraciou com a oportunidade de cuidar do rafa e desde então não teve uma situação em que não aprendesse sempre com a sua dedicação, profissionalismo, compromisso, parceria, humildade nos estudos e na vida. Resumindo, como sempre digo amo você e sua família.

Ao pessoal com quem convivi no Laboratório de Biologia Animal (LABAN) e que tornaram os dias mais leves e divertidos: Marcelino, Rhayane, Alisson, Leonice, Aline, todos os membros do grupo deste querido laboratório.

Aos meus queridos amigos e parceiros Samylla e Marcelino que me auxiliaram em diversos momentos do mestrado e da vida até nos problemas, sou imensamente grata a vocês. Sempre contem comigo!

## **BIOGRAFIA DA AUTORA**

Marcela Melo Peres Goulart, filha de Márcia Gomes de Melo, nasceu em Rio Verde, Estado de Goiás, em 10 de Julho de 1993. Irmã mais velha de Amanda Melo e Mariela Melo de Oliveira, casada com Ricardo Peres Goulart e mãe de dois dogs o Juca e a Juju. Apaixonada pela minha família e pela obra do Senhor, pratico voleibol como hobby e me desconecto com o mundo viajando, assistindo filmes e me divertindo com os amigos.

Em fevereiro de 2011 iniciou o curso de Licenciatura em Ciências Biológicas no Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, formando-se em maio de 2016. Em março de 2017, ingressou no programa de pós-graduação em Biodiversidade e Conservação, em nível de mestrado, área de concentração em Conservação de Recursos Naturais, submetendo-se à defesa de dissertação, requisito indispensável para a obtenção do título de mestre, em fevereiro de 2019.



## ÍNDICE

	Página
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>vii</b>
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
ÍNDICE DE APÊNDICES .....	xi
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES .....	xi
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>5</b>
1.1 Anfíbios .....	6
1.2 Peptídeo Antimicrobiano (PAM) .....	8
1.3 Cienciometria.....	10
1.4 Referências Bibliográficas.....	11
2. OBJETIVOS.....	18
<b>3. CAPÍTULO I. COMPOSTOS BIOATIVOS NA SECREÇÃO DA PELE DE ANFÍBIOS</b>	
3.1 Introdução .....	19
3.2 Material e Métodos.....	21
3.3 Resultados.....	23
4. Discussão .....	39
3.4 Considerações finais .....	55
3.5 Referências bibliográficas.....	56
CONCLUSÃO GERAL .....	67

MATERIAL SUPPLEMENTAR.....68

## ÍNDICE DE TABELAS

Página

### **CAPÍTULO I: COMPOSTOS BIOATIVOS NA SECREÇÃO DA PELE DE ANFÍBIOS**

Tabela 1. Principais atividades dos dez microrganismos mais estudados quanto à função de peptídeos antimicrobianos de anfíbios entre 1991 e 2018.....	33
Tabela 2. Classificação de conservação, segundo os critérios da IUCN, das espécies de anfíbios avaliadas entre 1991 e 2018.....	39
Tabela 3. Comparação entre as taxas de participação em grupos de pesquisa na área de peptídeos antimicrobianos de anfíbios em relação aos investimentos em C&T, de acordo com os dados disponibilizados pela UNESCO em <a href="http://uis.unesco.org/apps/visualisations/research-and-development-spending/">http://uis.unesco.org/apps/visualisations/research-and-development-spending/</a> . Os números entre parênteses indicam a posição do país na escala analisada.....	42
Tabela 4. Comparação entre o número de espécies de cada família da ordem Anura estudados em relação ao número de indivíduos relatados em cada família, de acordo com <a href="https://amphibiaweb.org/lists/index.shtml">https://amphibiaweb.org/lists/index.shtml</a> . Os números entre parênteses indicam a posição da família na escala analisada.....	49
Tabela 5. Comparação entre o número de espécies de cada família da ordem Caudata estudados em relação ao número de indivíduos relatados em cada família, de acordo com <a href="https://amphibiaweb.org/lists/index.shtml">https://amphibiaweb.org/lists/index.shtml</a> . Os números entre parênteses indicam a posição da família na escala analisada.....	50
Tabela 6. Status de conservação e critérios para classificação, segundo a IUCN.....	51
Tabela 7. Classificação de conservação, segundo os critérios da IUCN, das espécies de anfíbios avaliadas entre 1991 e 2018, categorizadas por continente. Números em	

vermelho indicam que a % de espécies naquela categoria é superior à % de espécies nesta categoria no mundo. Números em azul indicam que a % de espécies naquela categoria é inferior à % de espécies na mesma categoria no mundo.....53

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
INTRODUÇÃO	
Figura 1. Pele nua e úmida (livre de proteção física como pêlos e escamas) em <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> .....	7
CAPÍTULO I: COMPOSTOS BIOATIVOS NA SECREÇÃO DA PELE DE ANFÍBIOS	
Figura 1. Número de publicações encontradas na base de dados Web of Science, no intervalo de 1991 a 2018, buscando pelas palavras-chave “ <i>Antimicrobial peptide</i> ” <i>amphibian</i> , em 18/01/2019..	24
Figura 2. Distribuição de trabalhos publicados na área de peptídeos antimicrobianos de anfíbios, quando analisados a cada década, no intervalo de 1991 a 2018.....	25
Figura 3. Nacionalidade dos grupos de pesquisa que publicaram trabalhos entre 1991 e 2018 na área de peptídeos antimicrobianos de anfíbios.....	26
Figura 4 Continentes onde estão sediados os grupos de pesquisa que publicaram trabalhos entre 1991 e 2018 na área de peptídeos antimicrobianos de anfíbios....	27
Figura 5. Forma de obtenção dos peptídeos antimicrobianos no período de 1991 a 2018.....	28
Figura 6. Técnica de separação utilizada nos trabalhos analisados.....	29
Figura 7. Principais técnicas utilizadas em estudos funcionais de peptídeos antimicrobianos de anfíbios, no período analisado.....	30

Figura 8. Principais técnicas utilizadas em estudos estruturais de peptídeos antimicrobianos de anfíbios, no período analisado.....	31
Figura 9. Número de trabalhos publicados de 1991 a 2018, categorizados para os dez microrganismos mais estudados.....	32
Figura 10. Número de trabalhos publicados de 1991 a 2018, de acordo com a natureza dos microrganismos estudados.....	33
Figura 11. Atividade dos microrganismos estudados entre 1991 e 2018 como alvos de peptídeos antimicrobianos de anfíbios.....	34
Figura 12. Famílias de Anuros estudados entre 1991 e 2018 como fontes de peptídeos antimicrobianos.....	35
Figura 13. Famílias de Caudata estudados entre 1991 e 2018 como fontes de peptídeos antimicrobianos.....	36
Figura 14. Localização geográfica dos anfíbios estudados entre 1991 e 2018 como fonte de peptídeos antimicrobianos.....	37
Figura 15. Países que ratificaram o Protocolo de Nagoya (em azul), que assinaram, mas não ratificaram (em verde), que não assinaram, mas fazem parte de outros acordos de diversidade biológica (em cinza escuro) e que não assinaram e não fazem parte de nenhum acordo de diversidade biológica (em cinza claro) (adaptado de <a href="https://en.wikipedia.org/wiki/Nagoya_Protocol">https://en.wikipedia.org/wiki/Nagoya_Protocol</a> ).....	43
Figura 16. Forma de obtenção dos peptídeos antimicrobianos no período de 1991 a 2018, categorizados por década.....	45

## ÍNDICE DE APÊNDICES

	Página
MATERIAL SUPLEMENTAR	
Tabela 1 Principais alvos de peptídeos antimicrobianos de anfíbios estudados entre 1991 e 2018. ....	69
Tabela II Espécies de anfíbios fonte de peptídeos antimicrobianos estudados entre 1991 e 2018, com suas respectivas ordens, famílias e distribuição geográfica.....	75

**LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES**

<b>Sigla</b>	<b>Significado</b>
PAM	Peptídeo antimicrobiano
IUCN	União Internacional para Conservação da Natureza ( <i>International Union for Conservation of Nature</i> )
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear



## RESUMO

A União Internacional para Conservação da Natureza classifica os Anfíbios como grupo prioritário para a conservação, pois são 40% de todas as espécies em risco de extinção no mundo. São especialmente afetados por alterações no seu habitat ocasionado por mudanças climáticas, desmatamentos, queimadas, poluição e para preservar este grupo, proteger extensões de habitats naturais é essencial para manter a biodiversidade. Estudos mostraram que as secreções coletadas entre espécies de anuros podem apresentar atividades antivirais, antitumorais, anticancerígena, antimicrobiana. O desaparecimento de Anfíbios pode levar consigo milhares de moléculas com potencial interesse biotecnológico, com consideráveis impactos tanto do ponto de vista biológico quanto do ponto de vista econômico. Diversas técnicas têm sido exploradas para obtenção, identificação e caracterização estrutural e funcional dessas moléculas. Levantamento realizado na base de dados Web of Science entre 1991 e 2018 mostra que o número de artigos na área de pesquisa de peptídeos antimicrobianos de anfíbios vem aumentando ao longo do tempo, sendo que 55,7% dos trabalhos foram publicados a partir de 2011. Os peptídeos são obtidos prioritariamente a partir de coletas in natura ou através de síntese de peptídeos em fase sólida, técnicas que são responsáveis por 85% das publicações. A purificação é realizada com a adoção de cromatografia líquida (97,9% dos trabalhos). A caracterização estrutural é realizada principalmente por uso de ressonância magnética nuclear e dicroísmo circular, embora os trabalhos envolvendo técnicas de simulação, modelagem e dinâmica molecular tenham apresentado um ritmo constante de crescimento a partir de 2011. A caracterização funcional dos peptídeos antimicrobianos é realizada principalmente através de testes de hemólise e também com o uso de microrganismos, embora existam críticas a esses métodos. Os principais microrganismos estudados são aqueles que apresentam algum perigo à saúde humana, sendo que fitopatógenos, microrganismos de importância ecológica e com alguma importância à agricultura são negligenciados, representando um nicho a ser explorado. Dois terços dos grupos de pesquisa são oriundos da Ásia e Europa, embora as Américas possuam a maior diversidade de animais. Tendo em vista que diversos países não assinaram e/ou não ratificaram o Protocolo de Nagoya (Brasil inclusive), surge a preocupação sobre o status de conservação e possíveis atos de biopirataria sobre esses recursos naturais, que representam, também, possíveis recursos financeiros ao país. Não há correlação entre as famílias mais estudadas e o número de espécies em cada família, tampouco em relação à sua distribuição geográfica. 16,5% das espécies estudadas em todo o mundo são ameaçadas de extinção, e 9,8% das espécies não possuem informações ou tem poucas informações. A adoção de medidas de conservação se faz

necessária para evitar a extinção desses animais, importantes repositórios de moléculas bioativas.

**Palavras-chave:** anfíbios, peptídeos antimicrobianos (PAMs), cienciometria.

## ABSTRACT

The International Union for the Conservation of Nature classifies Amphibians as a priority conservation group, as they account for 40% of all endangered species in the world. They are especially affected by changes in their habitat caused by climate change, deforestation, burning areas, pollution and, to preserve this group, protecting extensions of natural habitats is essential to maintain biodiversity. Studies have shown that secretions collected between species of anurans may present antiviral, antitumor, anticancer, antimicrobial activities. The disappearance of Amphibians can carry with them thousands of molecules with potential biotechnological interest, with considerable impacts both from a biological and an economic point of view. Several techniques have been explored to obtain, identify and to characterize structural and functionally of these molecules. A search conducted in the Web of Science database between 1991 and 2018 shows that the number of articles in the area of amphibian antimicrobial peptide research has been increasing over time, with 55.7% of the papers being published as from 2011. Peptides are obtained primarily from in natura collections or through the solid phase peptide synthesis, techniques that are responsible for 85% of the publications. The purification is carried out with the use of liquid chromatography (97.9% of the papers). Structural characterization is carried out mainly by use of nuclear magnetic resonance and circular dichroism, although the work involving simulation, modeling and molecular dynamics techniques showed a constant rhythm of growth from 2011. The functional characterization of the antimicrobial peptides is carried out mainly through hemolysis tests and also with the use of microorganisms, although there are criticisms to these methods. The main microorganisms studied are those that present some danger to human health, and phytopathogens, microorganisms of ecological importance and with related to the agriculture are neglected, representing a niche to be explored. Two-thirds of the research groups come from Asia and Europe, although the Americas has the greatest diversity of animals. Since several countries have not signed and/or not ratified the Nagoya Protocol (including Brazil), there is concern about the status of conservation and possible acts of biopiracy on these natural resources, which also represent possible financial resources for the country. There is no correlation between the most studied families and the number of species in each family, nor in relation to their geographical distribution. 16.5% of the species studied worldwide are threatened with extinction, and 9.8% of the species have no information or little information. The adoption of conservation measures is necessary to avoid the extinction of these animals, important repositories of bioactive molecules.

**Keywords:** amphibians, antimicrobial peptide, Scientometrics.

## INTRODUÇÃO

Biodiversidade é conjunto de todas as espécies de seres vivos existentes na biosfera, pode-se definir em três níveis de diversidade: genética, de espécies e de ecossistemas, que fornecem o sistema de suporte da vida no nosso planeta. (JOHNSON, et al., 2017). Diversidade genética descreve a variação no número e tipo de genes, bem como cromossomos presentes em diferentes espécies, a magnitude da variação nos genes de uma espécie aumenta com aumento no tamanho e parâmetros ambientais do habitat. Diversidade de espécies descreve a variedade no número e riqueza das espécies em uma região. E a diversidade dos ecossistemas descreve a assembleia e interação de espécies que vivem juntas e o ambiente físico em uma dada area. (MURALIKRISHNA, I. V., & MANICKAM, V. 2017)

Nas últimas décadas, os produtos e serviços que a biodiversidade fornece foram significativamente degradados (KUBISZEWSKI, et al., 2017) com grandes impactos ecológicos pela ocupação humana, poluição, expansão da agricultura e mudanças climáticas que tem causado sérias implicações e aumentando o risco de extinção das espécies (BELLART, 2007). De acordo com União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN), na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas (*Red List of Threatened Species*) há atualmente no mundo cerca de 26.550 espécies que estão ameaçadas de extinção. Isso é mais do que 27% de todas as espécies avaliadas. Dentre os grupos ameaçados, coníferas representam 34%, corais e recifes 33%, tubarões 31%, mamíferos 25%, aves 14% e os anfíbios, 40%. Presente em grande parte de todo território mundial em habitats com características distintas, os anfíbios representam o primeiro passo na conquista dos animais aquáticos para o ambiente terrestre (POUHG *et al.*, 2008). É um grupo sensível a mudanças ambientais e com vasto leque de moléculas bioativas

utilizadas na indústria farmacêutica (VERLY, 2012). Por esta razão, são considerados prioritários para conservação (IUCN, 2019).

Os países identificados como megabiodiversidade incluem a Austrália, o Congo, Madagascar, África do Sul, China, Índia, Indonésia, Malásia, Papua, Nova Guiné, Filipinas, Brasil, Colômbia, Equador, México, Peru, Estados Unidos e Venezuela. (MURALIKRISHNA, I. V., & MANICKAM, V. 2017). A América Central compreende apenas 0,36% da área terrestre global, abriga 6,8% das espécies de anfíbios existentes, abrange sete países entre o sul do México e norte da América do Sul, é um *hotspot* global de biodiversidade de anfíbios, uma região prioritária para a conservação. (WHITFIELD et al., 2016).

Diversos trabalhos (PADUA *et al.*, 2008; PACIFICO, 2011) mostram que os anfíbios são um grupo especialmente afetados por alterações no seu habitat possuem características morfofisiológicas restritas e devido à alta sensibilidade a alterações ambientais, estes organismos representam um grupo em risco, ameaçado principalmente pela perda e degradação de habitat (IUCN, 2008).

## 1.1 Anfíbios

Os anfíbios tem um ciclo de vida dividido em duas etapas a primeira: fase larval o girino em processo de metamorfose dependente da água para se desenvolver e na segunda etapa já na fase adulta o juvenil ingressa no ambiente terrestre, com dependência da água para posterior reprodução, são animais ectotérmicos que regulam sua temperatura corpórea de acordo com o ambiente explorando assim habitats distintos (POUGH, 2008).

A epiderme de anfíbios é caracterizada por seu aparelho exócrino cutâneo observável com numerosas glândulas granulares e mucosas livre de proteção física libera uma secreção por toda pele, Figura 1 (HADDAD, 2008).



**Figura 1.** Pele nua e úmida (livre de proteção física como pêlos e escamas) em *Leptodactylus labyrinthicus*.

Em anfíbios, muitos mecanismos fisiológicos estão relacionados à sua epiderme. Dentre esses mecanismos, destacam-se a regulação da respiração, transporte de água e solutos, regulação da pressão sanguínea e da temperatura corporal, além da produção de compostos bioativos com funções protetivas contra vírus, fungos, bactérias e predadores (SOUZA *et al.*, 2017). Por essas razões, considera-se que a especialização deste órgão é um dos principais fatores de sucesso para a sobrevivência destes animais em ambiente terrestre (SOUZA *et al.*, 2017; COLLON 2011; NETO 2015; VERLY 2012).

As secreções presentes na pele dos anfíbios são sintetizadas em diferentes glândulas epidérmicas estão dispersas em direção ao dorso dos animais e se comunicam diretamente com a superfície externa por meio de dutos secretores. As glândulas mucosas liberam quantidades discretas de mucopolissacarídeos (KONIG *et al.*, 2015) ricas em peptídeos bioativos. Estes peptídeos são sintetizados por um mecanismo holócrino, sendo que algumas classes de peptídeos antimicrobianos são constitutivamente expressos, enquanto outros são induzidos pela presença de microrganismos ou por citocinas pró-inflamatórias endógenas em situações de estresse ou lesão. Estas moléculas têm importante papel na angiogênese que é o processo de formação de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, que ocorre em condições fisiológicas e patológicas (POUGH *et al.*, 2008), reparo do tegumento, processos

inflamatórios e quimiotaxia importante processo que atua na mudança de orientação de organismos de vida livre ou células, em resposta a um estímulo químico (POUGH *et al.*, 2008),

As composições de secreção diferem entre os grupos de anfíbios de acordo com suas interações com o meio ambiente (LIBERIO *et al.*, 2014). Devido à aplicabilidade destes compostos, a secreção cutânea dos anfíbios tem sido alvo de muitos estudos visando sua identificação e caracterização quantitativa e qualitativa (GOMES *et al.*, 2018).

## 1.2 Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são peptídeos com peso molecular menor do que 10 kDa, de caráter básico devido à presença de aminoácidos carregados positivamente, como lisina e arginina, e também de aminoácidos de cadeia lateral hidrofóbica. As propriedades estruturais e físico-químicas dos PAMs desempenham um papel essencial na determinação da sua especificidade com relação às células-alvo, uma vez que a primeira barreira a ser vencida é a membrana celular (PUSHPANATHAN *et al.*, 2016).

Os PAMs podem agir contra uma ampla variedade de microrganismos patogênicos, tais como bactérias, fungos e vírus (TREFFERS *et al.*, 2005). O mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos geralmente envolve mudanças nas membranas biológicas. O passo inicial geralmente é governado por atrações eletrostáticas entre os peptídeos e a superfície da monocamada externa da membrana celular. Após esta primeira interação, são observadas mudanças conformacionais na estrutura secundária destes peptídeos, e, devido ao seu caráter anfipático, passa-se a observar interações hidrofóbicas entre os resíduos com esta característica e as cadeias alifáticas dos fosfolipídeos. Destas interações, resultam alterações na estrutura da membrana celular, com o aparecimento de poros ou até mesmo a desintegração da membrana. No entanto, existem outros mecanismos de ação, como a internalização destes peptídeos e a interferência em processos celulares como síntese de DNA ou proteínas (GUILHELMELLI *et al.*, 2013).

Os PAMs são uma parte importante do sistema imune inato em superfícies epiteliais e não epiteliais. Até agora, muitos peptídeos antimicrobianos de várias famílias foram descobertos em vertebrados (BRANDENBURG, 2012). Pesquisas



mostra o uso dessas moléculas no desenvolvimento de medicamentos e o uso altamente promissor em pesquisas com atividade anticancerígena, antiviral, antifúngica e antimicrobiana (RAAYMAKERSA 2018; NETO 2012; BARNHART, 2017). Portanto, os peptídeos bioativos têm sido de grande interesse nas últimas décadas do ponto de vista de diferentes áreas como alimentos, farmacêuticos, clínicos, funcionais ou nutricionais (SAMGINA *et al.*, 2016).

Nas técnicas empregadas em estudos com peptídeos antimicrobianos de anfíbios, o procedimento clássico para determinar a fórmula molecular de uma substância tem três passos: (i) Análise elementar qualitativa: descobrir que tipos de átomos estão presentes, como C, H, N, O, S, Cl, entre outros; (ii) análise elementar quantitativa (ou microanálise): para descobrir os números relativos (porcentagens) de cada tipo diferente de átomo presente na molécula; e (iii) determinação da massa molecular (ou peso molecular). Os dois primeiros passos estabelecem uma fórmula empírica do composto. Quando os resultados do terceiro procedimento são conhecidos, encontra-se uma fórmula molecular (PAIVA *et al.*, 2010).

Técnicas espectroscópicas como espectrometria de absorção no infravermelho (IV), espectrometria de absorção no ultravioleta (UV), espectrometria de massa, espectroscopia de ressonância magnética nuclear, têm sido exploradas para tais propostas (KAMECH *et al.*, 2012), e têm sido cada vez mais apontadas como alternativas confiáveis, tanto no controle de qualidade de matérias-primas quanto em processos mais complexos, como monitoramento in-line industrial (COLLINS *et al.*, 2006).

Na tentativa de evitar o isolamento de compostos previamente conhecidos ou de pouco interesse, convencionou-se a utilização da técnica denominada desreplicação, que consiste na identificação suficiente (completa ou parcial) de substâncias bioativas conhecidas, desconhecidas e/ou artefatos presentes em extrato bruto ou frações de produtos naturais por meio de perfis cromatográficos e/ou espectroscópicos (COLLINS *et al.*, 2006). Através de técnicas como cromatografia líquida e espectrometria de massa (LC / MS), venenos e secreções animais têm sido estudados há muito tempo como fontes moleculares bioativas. (CUNHA NETO *et al.*, 2015).

Vários estudos vêm apresentando um amplo espectro de efeitos biológicos, três bufadienólidos - os compostos semelhantes a esteroides arenobufagina, gamabufotalina e telocinobufagina do sapo boreal, *Anaxyrus boreas*, possui ação contra *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), um patógeno fúngico ligado ao declínio global

na população de anfíbios (BARNHART *et al.*, 2017). Bufotenina, por exemplo, é um alcaloide isolado da secreção cutânea do anuro *Rhinella jimi* que inibe a penetração celular pelo vírus da raiva. Peptídeos antimicrobianos, como a ocelatina-P1 e a ocelatina-F1, estão presentes na secreção cutânea de anuros do gênero *Leptodactylus* e fornece defesa química contra predadores e microorganismos. (CUNHA NETO *et al.*, 2015).

Diante disso o interesse em serviços ecossistêmicos nas comunidades de pesquisa e políticas públicas cresce rapidamente nos últimos anos, uma vez que levantamentos mostram que os valores atribuídos giram na casa dos trilhões de dólares por ano (KUBISZEWSKI *et al.*, 2017; CONSTANZA *et al.*, 2014; BALMFORD *et al.*, 2002). Compreender a importância destes compostos bioativos é crucial para proteção e conservação desta classe de vertebrados valorizando os ecossistemas e os bens e serviços que eles fornecem, e seu desaparecimento pode levar consigo milhares de moléculas com potencial interesse biotecnológico, com consideráveis impactos tanto do ponto de vista biológico quanto do ponto de vista econômico (CONSTANZA *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2017). Sendo assim ações rápidas para sua conservação/manutenção deste grupo são extremamente necessárias pois em vista da grande diversidade de espécies mundialmente descritas o conhecimento sobre os potenciais efeitos dos PAMs ainda são escassos.

### 1.3 Cienciometria

A cienciometria estuda os aspectos quantitativos da ciência como disciplina ou atividade econômica, faz parte da sociologia da ciência e encontra aplicação no estabelecimento de políticas científicas, que incluem, entre outras, publicações. Emprega técnicas métricas para a avaliação da ciência, e como um termo emergiu na Europa Oriental e atingiu o seu pico em 1977, com o surgimento da revista *Scientometrics* (BITTENCOURT *et al.*, 2012; HOOD *et al.*, 2001; MACIAS-CHAPULA *et al.*, 1998).

É usada para descrever o estudo da ciência: crescimento, estrutura, inter-relações e produtividade, medir e analisar que sua produção de literatura; por exemplo, as práticas de investigadores, as estruturas sócio-organizacionais, a gestão da investigação

e desenvolvimento, o papel da ciência e da tecnologia na economia nacional, as políticas governamentais em relação a ciência e tecnologia (HOOD *et al.*, 2001).

A cienciometria tem sido usada para descrever as tendências atuais de conhecimento em vários campos da ciência, sobre a conservação de anfíbios e répteis neotropicais, além de identificar alguns problemas e desafios para o manejo da herpetofauna e planejamento de conservação. A Avaliação Global de Anfíbios (GAA) alerta a comunidade científica quanto à extensão dos fatores que ameaçam a sobrevivência das espécies de anfíbios (URBINA-CARDONA *et al.*, 2008; MACIAS-CHAPULA 1998). Ainda não sabemos o suficiente sobre o conhecimento atual na herpetofauna mundial nos últimos anos o aumento no número de artigos sobre biologia de anfíbios com uma visão detalhada das publicações sobre anfíbios pode ser muito útil para avaliar o estado de conhecimento sobre este grupo taxonômico (CAMPOS, *et al.*, 2014).

Estudos demonstraram que a pesquisa de herpetofauna precisa ser conduzido dentro do quadro sócio-político e econômico adequado, a fim de efetivamente implementar redes de área de conservação. (CAMPOS *et al.*, 2014; URBINA-CARDONA *et al.*, 2008). A maioria dos artigos científicos, agora e no passado, geralmente tem uma ou duas descobertas importantes. Mas, com a tendência de publicar histórias científicas mais maduras, tornou-se mais difícil publicar apenas uma descoberta inicial chave ou uma hipótese ousada, tem sido oneroso o tempo para formação de profissionais, coletas de dados e análises experimentais. (VALE, R. 2015). E com o avanço do conhecimento produzido pelos pesquisadores tem de ser transformado em informação acessível para a comunidade científica. Em tudo o que se refere à ciência, os indicadores cienciométricos tornaram-se essenciais (VALE, R. 2015; MACIAS-CHAPULA, 1998)

Sendo assim, o presente estudo investiga a tendência de pesquisas envolvendo peptídeos antimicrobianos em anfíbios a partir de levantamento científicos em base de dados, com o intuito de apontar lacunas de conhecimento e subsidiando portanto propostas de trabalhos futuros.

#### **1.4 Referências Bibliográficas**

ASTOLFI FILHO, S. et al. Bioprospecção e biotecnologia. Parcerias Estratégicas. Brasília-DF, v. 19, n. 38, p. 45-80, 2014.

BARNHART, K. Identification of Bufadienolides from the Boreal Toad, *Anaxyrus boreas*, Active Against a Fungal Pathogen. *Microb Ecol*, 74(4):990-1000. 2017.

BALMFORD, A. et al., Economic Reasons for Conserving Wild Nature. *SCIENCE*, v. 297. 2002.

BERNARDO, B. et al., Moment of truth for the Cerrado hotspot. **nature ecology & evolution** 1, 0099. 2017.

BITTENCOURT, L. et al., Análise cienciométrica de produção científica em unidades de conservação federais do Brasil. *Enciclopedia biosfera* 8(14), 2004-20054. 2012.

BRANDENBURG, L-O, *et al.* Antimicrobial Peptides: Multifunctional Drugs for Different Applications. **Polymers**, n. 4, p. 539-560; Review, 2012.

CARVALHO, P. Cromatografia líquida de alta eficiência aplicada à análise de alimentos. Manual técnico. Campinas, São Paulo. 1993.

CAMPOS, F. et al., Diversity patterns, research trends and mismatches of the investigative efforts to amphibian conservation in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 86 (4):1873-1886. 2014.

CESPEDES, G.F. et al. Mechanism of action and relationship between structure and biological activity of Ctx-Ha: a new ceratotoxin-like peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 6, p. 3004-3010, 2012.

COLLINS, C. et al., Fundamentos de cromatografia. Campinas, : Editora da UNICAMP. 2006.

COSTANZA, R. et al. Changes in the global value of ecosystem services. *Global Environmental Change*, v. 26, p. 152-158, 2014.

CUNHA NETO et al. Synergic effects between ocellatin-F1 and bufotenine on the inhibition of BHK-21 cellular infection by the rabies virus. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. 2015.

CRUZ e CARVALHO, A. et al. Cytotoxic Activity and Antiproliferative Effects of Crude Skin Secretion from *Physalaemus nattereri* (Anura: Leptodactylidae) on in vitro Melanoma Cells. **Toxins**, v. 7, p. 3989-4005, 2015.

CHEN, X. et al.,. A novel antimicrobial peptide, Ranatuerin-2PLx, showing therapeutic potential in inhibiting proliferation of cancer cells. **Bioscience reports**. 2018.

GOMES, A. et al.,. NMR structures in different membrane environments of three ocellatin peptides isolated from *Leptodactylus labyrinthicus*. **Peptides**, 103, 72–83, 2018.

GUSMÃO, K. A. G. et al. Ocellatin peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus labyrinthicus* (Leptodactylidae): characterization, antimicrobial activities and membrane interactions. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v.23, n. 4, p. 2-14, 2017.

GUILHELMELLI, F. *et al.*,. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Frontiers in Microbiology**. 4:353. 2013.

HADDAD, C. F. B.; GIOVANELLI, J. G. R.; ALEXANDRINO, J. O aquecimento global e seus efeitos na distribuição e declínio dos anfíbios. *Biologia e Mudanças Climáticas no Brasil*. 1 ed. São Carlos SP: Rima Editora. p. 195-206, 2008.

HARRIS, D. *Análise química quantitativa*. 8ª edição, c. 22. Rio de Janeiro. 2016.

HOOD, W. et al.,. The literature of bibliometrics, scientometrics, and informetrics. **Scientometrics**. Vol. 52, No. 2, 291–314. 2001.

HOU, Y. et al., Identification of <10 KD peptides in the water extraction of Venenum Bufonis from Bufo gargarizans using Nano LC–MS/MS and De novo sequencing. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 2018.

JORGE, M. et al., Mammal defaunation as surrogate of trophic cascades in a biodiversity Hotspot. **Biological Conservation**. 2013.

JOLY, C. A. et al. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. Revista. USP, São Paulo, n. 89, 2011. Disponível em <[http://rusp.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-99892011000200009&lng=pt&nrm=iso](http://rusp.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-99892011000200009&lng=pt&nrm=iso)>. Acessado em: 14 junho. 2017.

JOHNSON, C.; et al. Biodiversity losses and conservation responses in the Anthropocene. **Science**. Volume: 356 Edição: 6335 Páginas: 270-274. 2017.

KAMECH, N. Improving the Selectivity of Antimicrobial Peptides from Anuran Skin. **Journal of chemical information and modeling**. 52 (12), pp 3341–3351. 2012.

KONIG, E. et al. The diversity and evolution of anuran skin peptides. *Peptides*, n. 63, p. 96-117, 2015.

KUBISZEWSKI, I. et al., The future value of ecosystem services: Global scenarios and national implications. *Ecosystem Services*, 2212-0416. 2017

LIBERIO, M. et al., A secreção de pele bruta da rã de pimenta *Leptodactylus labyrinthicus* é rica em metálicas e serina peptidases. *Plos one*, n. 9, p. 6, 2014.

MACIAS-CHAPULA, C. A. O papel da infometria e da cienciometria e sua perspectiva nacional e internacional. *Ci. Inf. Brasília*, v. 27, n. 2, p. 134-140, 1998.

MENDES, V. A. et al. The cutaneous secretion of the casque-headed tree frog *Corythomantis greeningi*: Biochemical characterization and some biological effects, *Toxicon*, v. 122, p. 133-141, 2016.

MURALIKRISHNA, I. V., & MANICKAM, V. Natural Resource Management and Biodiversity Conservation. **Environmental Management**, 23–35. 2017.

MYERS, N. et al., Biodiversity hotspots for conservation Priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-8, 2000.

NELSON, David L.; COX, Michael M. Princípios de Bioquímica de Lehninger- 6. Artmed Editora, 2014.

NETO, C. et al., Synergic effects between ocellatin-F1 and bufotenine on the inhibition of BHK-21 cellular infection by the rabies virus. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.**, 2;21:50. 2015.

PACIFICO, E. S. Anuros do cerrado em um mundo de mudanças: fatores de vulnerabilidade. 2011. Dissertação (Magister scientiae em ecologia e evolução) apresentada a Universidade Federal de Goiás. Goiânia. Goiás. 2011.

PADUA, G. C. et al. Escolha de áreas prioritárias de conservação de anfíbios anuros do Cerrado através de um modelo de populações centrais-periféricas. **Iheringia Série Zoológica**, Porto Alegre, v. 98, n. 2, p. 200-204, 2008.

PAIVA, D. et al., Introdução à espectroscopia. 4<sup>o</sup> edição. São Paulo: Cengage learning. ISBN 9788522107087. 2010.

POUGH, H. et al., A vida dos vertebrados. [coordenação editorial da edição brasileira Ana Maria de Souza; tradutores Ana Maria de Souza, Paulo Auricchio]. 4. Ed, São Paulo: Atheneu Editora, ISBN: 978-85-7454-095-555. 2008.

PUSHPANATHAN, F. *et al.* Antimicrobial Peptides : Versatile Biological Properties. **International Journal of Peptides**, v. 2013, n. 2013, p. 1–23, 2016.

RAAYMAKERSA, C. et al., The anuran skin peptide bradykinin mediates its own absorption across epithelial barriers of the digestive tract. **Peptides**.103:84-89. 2018.

SACCARO, N. L. Governo Federal. Secretaria de Assuntos Estratégicos da Presidência da República. Desafios da Bioprospecção no Brasil. Brasília: Editora Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), 2011.

SAMGINA, T. Y. et al. Proteolytic degradation and deactivation of amphibian skin peptides obtained by electrical stimulation of their dorsal glands. **Anal bioanalchem**, v. 408, n. 14, p. 3761-8, 2016.

SEGALLA, M. V., et al. "Brazilian amphibians: list of species." **Herpetologia Brasileira** 5.2: 34-46. 2016.

SIANO, A. et al. A Comparative Study of the Biological Activity of Skin and Granular Gland Secretions of *Leptodactylus latrans* and *Hypsiboas pulchellus* from Argentina. **Records of Natural Products** 8:2, 128-135. 2014.

SIYUAN, T. Development of a GC-MS/SIM method for the determination of phytosteryl esters. **Food Chemistry**. volume 281, pages 236-241. 2018.

SOUZA, L. Q. et al. Bufadienolides from amphibians: A promising source of anticancer prototypes for radical innovation, apoptosis triggering and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase inhibition. **Toxicon**, v.127, p. 63-76. 2017.

SUTTON, P. et al.,. The ecological economics of land degradation: Impacts on ecosystem service values. **Ecological Economics** 129, 182–192. 2016.

SHAHABUDDIN, M. et al.,. Characterisation of crude and partially purified peptides with antimicrobial activity from the skin of Bornean frogs. **Journal of Sustainability Science and Management**. 2018.

The IUCN Red List of Threatened Species. (IUCN, 2019). Red List. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org/initiatives/amphibians/analysis/2008-update>>. Acessado em: 20 janeiro. 2019.



TREFFERS, C. *et al.* Isolation and characterisation of antimicrobial peptides from deer neutrophils, n. 26, p. 165–169, 2005.

URBINA-CARDONA, N. J. Conservation of neotropical herpetofauna: research trends and challenges. **Tropical Conservation Science**, Vol.1 (4):359-375, 2008.

VALE, R. D. Accelerating scientific publication in biology. **PNAS**, 3, 112 (44) 13439-13446. 2015.

VALDUJO, P. H. **Diversidade e distribuição de anfíbios no cerrado: o papel dos fatores históricos e dos gradientes ambientais**. 2011. Tese/dissertação (Doutorado em Ciências) apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2011.

VALDUJO, P. H. *et al.* Anuran species composition and distribution patterns in Brazilian Cerrado, a neotropical hotspot. **South American Journal of Herpetology**, v. 7, n. 2, p. 63-78, 2012.

VARDON, M. *et al.*. Putting biodiversity into the national accounts: Creating a new paradigm for economic decisions. **Ambio** Volume: 48 Edição: 7 Páginas: 726-731. 2019.

WHITFIELD, S. *et al.*. Amphibian Decline and Conservation in Central America. **Copeia** 104, No. 2, 2016, 351–379. 2016.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar a tendência de pesquisas envolvendo peptídeos antimicrobiano em anfíbios a partir de levantamento em bases de dados.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a quantidade de artigos publicados no tema, a nacionalidade dos grupos de pesquisa, quais as técnicas mais utilizadas para obtenção e caracterização estrutural e funcional dos peptídeos antimicrobianos.
- Identificar as espécies de microorganismos mais estudados, tanto no que diz respeito à sua classificação taxonômica e composição estrutural e funcional.
- Verificar as ordens, famílias e espécies de anfíbios mais utilizadas como fonte de peptídeos antimicrobianos, bem como seus habitats.
- Entender quais as possíveis lacunas dentro dessa área de pesquisa no que diz respeito às técnicas empregadas e aos anfíbios e microorganismos estudados.
- Prover informações a respeito dos grupos de pesquisa envolvidos nesta área.
- Entender o impacto que esta área tem sobre a conservação de anfíbios no mundo.

### 3. CAPÍTULO I

## COMPOSTOS BIOATIVOS NA SECREÇÃO DA PELE DE ANFÍBIOS: tendência de estudos

**Resumo:** As secreções presentes na pele dos anfíbios contêm muitos compostos bioativos, que exercem funções antimicrobianas, antitumorais e de defesa contra predadores. Compreender a importância destes peptídeos antimicrobianos é crucial para proteção e conservação desta classe. Para alcançar esse objetivo, a pesquisa foi realizada a partir da base de dados ISI Web of Science com as palavras-chave “*Antimicrobial peptide*” *Amphibian*. Para critério de seleção, foram excluídos trabalhos de revisão, focando apenas nos trabalhos que efetivamente avaliaram peptídeos antimicrobianos de anfíbios. Foram publicados, entre 1991 e 2018, 262 trabalhos inéditos que atendiam aos critérios de pesquisa. Nota-se que, apesar de ainda faltarem dois anos (2019 e 2020) para completar a análise da década de 2011 a 2020, mais da metade dos trabalhos na área encontram-se publicados neste intervalo. Como esperado, China e Estados Unidos da América lideram entre os grupos de pesquisa que publicaram na área, sendo que os dois países respondem por 56,49% de toda a produção científica da área. A técnica preferencial de purificação de peptídeos antimicrobianos é a cromatografia líquida. Dentre as técnicas de caracterização estrutural, destacam-se o dicroísmo circular e a ressonância magnética nuclear. Quando analisa-se atividade dos 114 microrganismos que foram testados como alvo de peptídeos antimicrobianos de anfíbios, há ampla preferência por estudar a ação antimicrobiana em microrganismos causadores de doenças em humanos. A ordem Anura contém 94,8% das espécies estudadas, e as famílias mais estudadas foram Ranidae e Hylidae, com ampla distribuição geográfica. A IUCN considera as espécies ameaçadas de extinção aquelas que estão classificadas como “Vulnerável”, “Em perigo” e “Criticamente em perigo”, o que soma 16,5% das espécies estudadas. Assim, é necessário apontar para a necessidade de preservação destes recursos naturais, protegendo-os tanto de ameaças à sua existência quanto a possíveis atos de biopirataria.

**Palavras Chave:** Anura, cromatografia e peptídeo antimicrobiano.

**Abstract:** The secretions present in the skin of amphibians contain many bioactive compounds, which exert antimicrobial, antitumor and defense functions against predators. Understanding the importance of these antimicrobial peptides is crucial for the protection and conservation of this class. To achieve this goal, the research was conducted from the ISI Web of Science database with the keywords "Antimicrobial peptide" Amphibian. For the selection criterion, revision works were excluded, focusing only on the works that effectively evaluated amphibian antimicrobial peptides. Between 1991 and 2018, 262 unpublished works that met the research criteria were published. It is noteworthy that, although there are still two years (2019 and 2020) to complete the analysis of the decade 2011 to 2020, more than half of the works in the area are published in this interval. As expected, China and the United States of America lead among the research groups that published in the area, with the two countries accounting for 56.49%, the preferred technique of purification of antimicrobial peptides is the chromatography. Among the techniques of structural characterization, circular dichroism and nuclear magnetic resonance stand out. When analyzing the activity of the 114 microorganisms that have been tested as target of amphibian antimicrobial peptides, there is a broad preference to study the antimicrobial action in microorganisms that cause diseases in humans. The order Anura 94.8% of the species studied, the families most studied were Ranidae and Hylidae, precisely the two largest families of anurans, and also with a wide geographic distribution. The IUCN considers endangered species as "Vulnerable", "Endangered" and "Critically endangered", which accounts for 16.5% of the species studied. Thus, it is necessary to point out the need to preserve these natural resources, protecting them both from threats to their existence and possible acts of biopiracy.

**Key words:** Anuran, chromatography and antimicrobial peptide.

### 3.1 Introdução

Atualmente são descritas no mundo um total de 7.958 espécies de anfíbios (FROST, 2019). Embora seja um grupo com grande diversidade, vem sofrendo forte declínio populacional oriundos de fatores como mudanças climáticas, alterações na disponibilidade e na qualidade dos corpos de água, poluentes químicos, doenças infecciosas e parasitárias, introdução de predadores e a destruição de habitats para urbanização, agricultura e pecuária extensiva (ALMEIDA *et al.*, 2014; HADDA *et al.*, 2008; PAULA *et al.*, 2012). Dado a esses problemas é preocupante a situação do grupo, uma vez que fornecem importantes serviços ambientais e compostos bioativos para a indústria farmacológica.

Em anfíbios, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) foram descritos pela primeira vez no final da década de 1980 no sapo africano *Xenopus laevis*. Nas décadas seguintes, uma variedade de diferentes peptídeos foram identificados e isolados em muitos organismos (BRANDENBURG *et al.*, 2012). Diversos trabalhos, além de relatar as já conhecidas atividades bactericida e fungicida, vêm mostrando que estes compostos

podem apresentar ação antimicrobiana, antifúngica, antitumoral e antiviral (CRUZ e CARVALHO, 2015). Estudos recentes mostram que as secreções coletadas entre espécies pertencentes à família *Bufo* na América, na Ásia e na Europa, podem apresentar atividades antivirais, antitumorais, anti-inflamatórias, anti-hemorrágicas e analgésicas, (ZHANG *et al.*, 2005; GONZALEZ, 2016; NING *et al.*, 2016; RODRIGUEZ, 2017).

O interesse em serviços ecossistêmicos nas comunidades de pesquisa e políticas públicas cresce rapidamente nos últimos anos, uma vez que levantamentos que datam de 2011 mostram que os valores atribuídos aos serviços de ecossistemas giram na casa dos US\$ 130 trilhões por ano (CONSTANZA *et al.*, 2014). Anfíbios são especialmente sensíveis à mudanças ambientais, e seu desaparecimento pode levar consigo milhares de moléculas com potencial interesse biotecnológico, com consideráveis impactos tanto do ponto de vista biológico quanto do ponto de vista econômico (CONSTANZA *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2017).

Segundo Liberio *et al.*, (2014) as glândulas da pele desses animais produzem secreções que apresentam uma mistura de diferentes compostos bioativos, como aminas, esteroides, alcaloides, e peptídeos (MENDES *et al.*, 2016) têm desempenhado funções como proteção contra patógenos e predadores, reparo de tecidos, quimiotaxia, angiogênese, processos inflamatórios entre outros (SAMGINA, 2016) que ao longo dos anos tem sido estudado com relação a atividades biológicas, efeitos anestésicos, alucinógenos, anticancerígenos e principalmente antimicrobianos. (MUNOZ-CAMARGO *et al.*, 2018; MALIK *et al.*, 2015; SIANO *et al.*, 2014). Esses compostos são integrantes da imunidade inata, presente em praticamente todos os seres vivos, tendo despertado um crescente interesse na comunidade científica, por apresentar uma intensa atividade antimicrobiana contra diversos grupos de microrganismos, sendo atóxica para o organismo de mamíferos, (HUANG LI 2016; CARVALHO, 2011). Tendo necessidade de aprofundamento de pesquisas, devido a diversidade de espécies e aplicabilidade dos compostos biologicamente ativos (PINTO, 2009).

Nesse sentido, dado que os anfíbios apresentam importantes compostos bioativos, buscou-se conhecer a colaboração científica sobre essa respectiva temática. Para verificar então a tendência dos estudos, analisamos as seguintes variáveis, (i) ano de publicação, (ii) origem (distribuição) do animal, (iii) nacionalidade do grupo de pesquisa, (iv) alvo do peptídeo (bactéria, vírus, fungo, célula tumoral) e (v) famílias

mais estudadas. Além disso, o estudo tem potencial indicador para discutir a importância da conservação dos anfíbios.

### 3.2 Material e Métodos

#### *Investigação da tendência científica*

Para conhecer a tendência da produção científica sobre compostos bioativos em anuros selecionou-se a base de dados ISI Web of Science ([www.isiknowledge.com](http://www.isiknowledge.com)) utilizando as palavras-chave “*Antimicrobial peptide*” *Amphibian*. A base de dados considera, nesse tipo de pesquisa, a expressão booleana *and* entre os termos “*Antimicrobial peptide*” e *Amphibian*. As aspas foram utilizadas para selecionar exatamente a expressão “*antimicrobial peptide*”, evitando resultados falsos. Como critério, estudos de revisão não foram compilados para não tendenciar a análise temporal do número de estudos. Além disso, não foram compilados trabalhos em que apenas o título estava presente nas bases de dados e que em buscas posteriores não foram encontrados por completo. Para cada artigo encontrado analisou-se as seguintes variáveis: (i) ano de publicação; (ii) nacionalidade do grupo de pesquisa (avaliada pelo vínculo do primeiro autor); (iii) técnicas de obtenção e caracterização estrutural e funcional dos peptídeos; (iv) alvo do peptídeo (bactéria, vírus, fungo, célula tumoral) e (v) famílias de anfíbios mais estudadas e sua distribuição geográfica, bem como seu status de conservação.

#### *Análise de dados*

Termos técnicos na investigação das espécies de anfíbios? (classificação e nomenclatura científica) e categoria de conservação foram utilizados os dados de sites oficiais do American Museum of Natural History (<https://www.amnh.org/>), The IUCN Red List of Threatened Species (<https://www.iucnredlist.org/>).

Para analisar tendência temporal da produção científica, testamos a relação entre número de trabalhos publicados versus ano de publicação através de uma correlação de Pearson ( $P < 0,05$ ). Já os países (distribuição geográfica) foram apresentados em forma de proporção. Teste kruska wallis (H) avaliando as principais técnicas de coleta e o teste Mann Whitney (U) para a técnica de detecção. Além disso demonstramos a frequências de compostos e técnicas utilizadas.

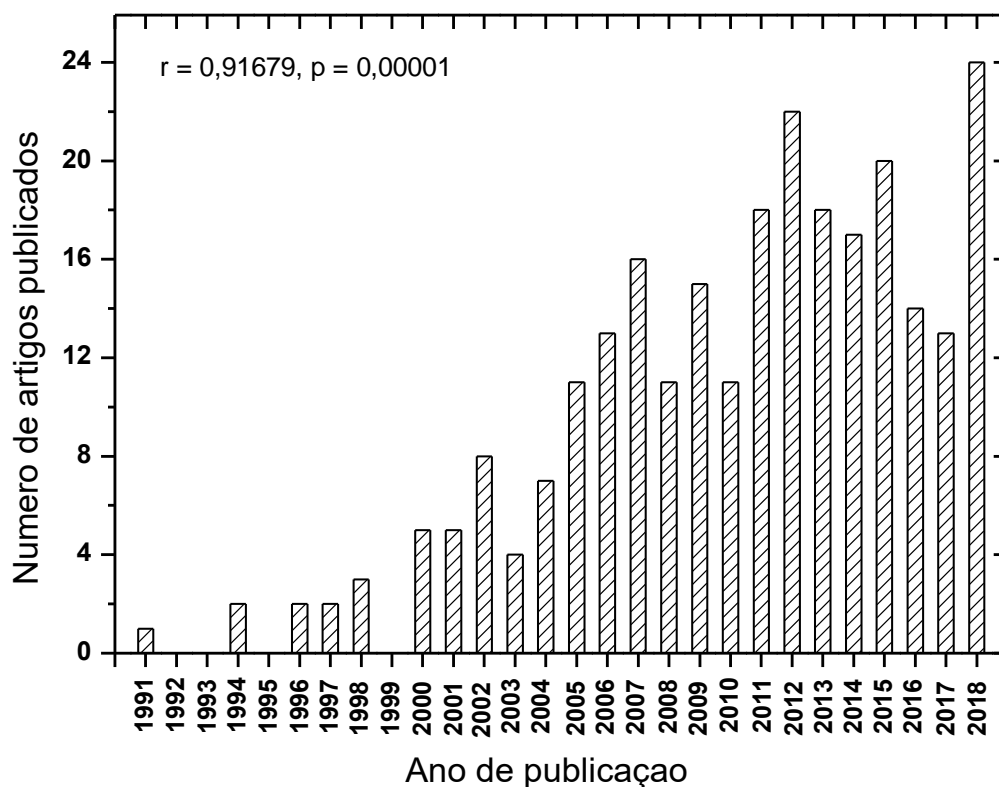
### 3.3 Resultados

A primeira proteína antimicrobiana descrita foi a lisozima, em 1922, por Alexander Fleming (ZHANG e GALLO, 2016). Logo após, em 1928 este mesmo pesquisador foi responsável pela descoberta da penicilina, uma droga amplamente utilizada no combate às infecções até a década de 1960, quando foram observados, pela primeira vez, microrganismos resistentes a esta droga (CULLEN et al., 2015). Ainda na década de 1960, foram descritos os dois primeiros peptídeos antimicrobianos, a bombinina de sapos e a lactoferrina no leite de vaca (ZHANG e GALLO, 2016). No entanto, os trabalhos foram bastante escassos até a década de 1980, quando foram publicados trabalhos sobre as cecropinas e magaininas, dois potentes antimicrobianos oriundos do bicho da seda e de uma espécie de sapo africano, respectivamente (ZHANG e GALLO, 2016). A partir da década de 1990, o interesse nesta área de pesquisa, bem como o aumento no número de casos de microrganismos resistentes a múltiplas drogas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018) cresceu enormemente.

Tendo em vista este cenário, este trabalho ocupou-se em analisar qual o estado-da-arte no que diz respeito a área de pesquisa de peptídeos antimicrobianos de anfíbios, uma vez que estes animais vem sofrendo uma diminuição de suas populações frente à destruição de seus habitats e/ou o surgimento de doenças letais como a quitridiomiose. Foram analisadas as seguintes variáveis: ano de publicação, localização geográfica dos grupos de pesquisa, meios de obtenção dos peptídeos antimicrobianos, métodos de purificação e caracterização dos peptídeos antimicrobianos, espécies de microrganismos-alvo estudados, espécies, localização geográfica e status de conservação de espécies de anfíbios fontes de peptídeos antimicrobianos.

#### 3.1. Número de publicações

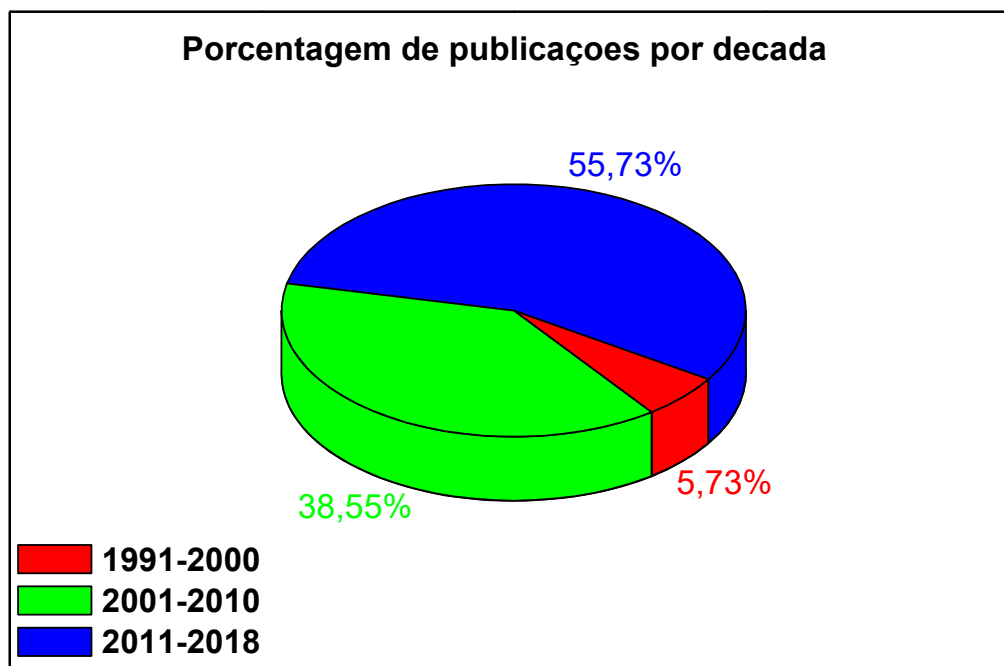
A figura 1 mostra o número de publicações encontradas após busca utilizando as palavras-chave “*Antimicrobial peptide*” *amphibian* na base de dados Web of Science, até o limite de janeiro de 2019. Foram publicados, entre 1991 e 2018, 262 trabalhos inéditos que atendiam aos critérios de pesquisa.



**Figura 1.** Número de publicações encontradas na base de dados Web of Science, no intervalo de 1991 a 2018.

Analisando-se os resultados obtidos, pode-se perceber que até o início dos anos 2000, os trabalhos publicados na área e, por extensão, o próprio interesse nesta área de pesquisa ainda era bastante baixo. Comparando-se década a década (figura 2), observa-se, ainda de forma mais clara, a evolução no que diz respeito ao número de publicações na área de pesquisa de peptídeos antimicrobianos em anfíbios. Nota-se que, apesar de ainda faltarem dois anos (2019 e 2020) para completar a análise da década de 2011 a 2020, mais da metade dos trabalhos na área encontram-se publicados neste intervalo.



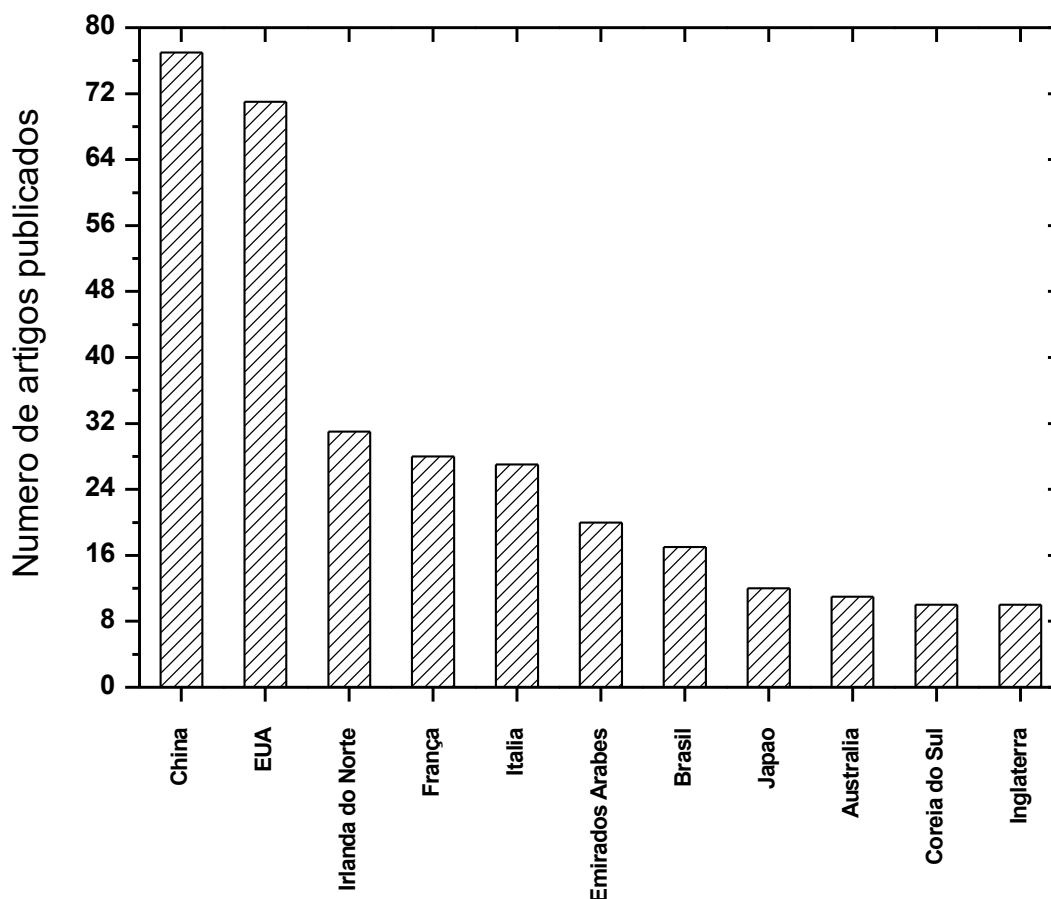


**Figura 2.** Distribuição de trabalhos publicados na área de peptídeos antimicrobianos de anfíbios, quando analisados a cada década, no intervalo de 1991 a 2018.

### 3.2. Nacionalidade do grupo de pesquisa principal

Uma segunda variável analisada foi a nacionalidade do grupo de pesquisa principal. Esta análise seguiu o critério de categorização da própria base de dados Web of Science, que lista as nacionalidades de todos os grupos participantes do trabalho, e, por essa razão, o número aqui listado supera o número de artigos publicados. A análise desta variável pretende nortear sobre qual(is) país(es) tem maior interesse sobre o assunto, e abre a janela para uma discussão sobre o interesse destes países sobre a biodiversidade do planeta.

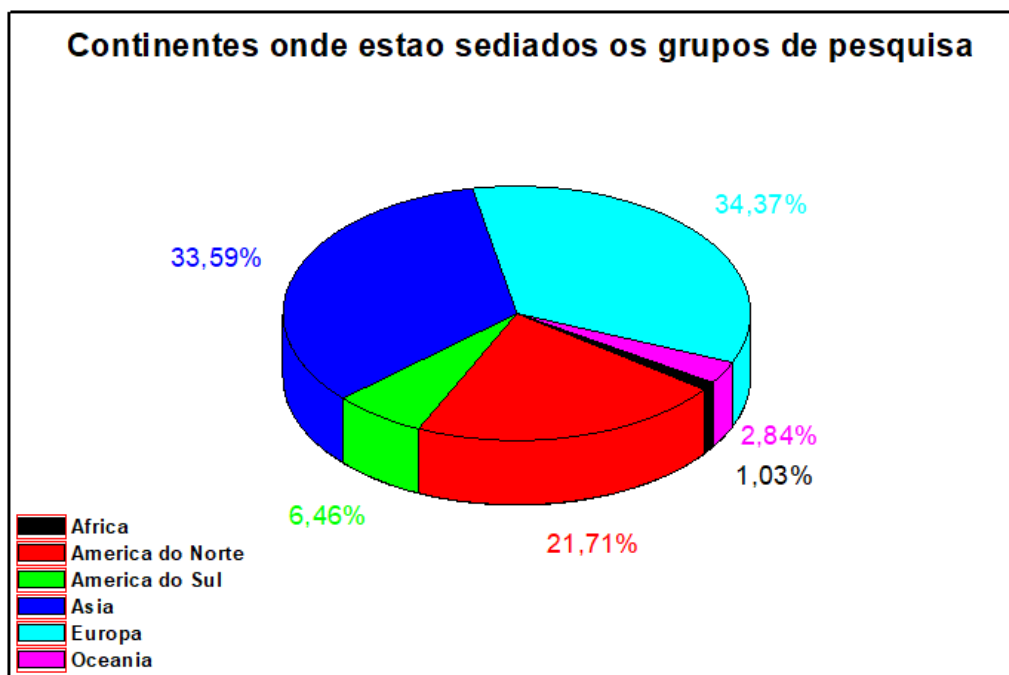
Foram encontrados 38 diferentes países que sediaram grupos de pesquisa cujo interesse focou-se em peptídeos antimicrobianos de anfíbios. A lista completa dos países, bem como o número de publicações e sua porcentagem relativa ao total encontram-se nos materiais suplementares. Nesta seção, por motivos de clareza, serão analisados os dez países com mais publicações na área, sendo que Coreia do Sul e Inglaterra aparecem empatados na décima posição, com dez trabalhos cada.



**Figura 3.** Nacionalidade dos grupos de pesquisa que publicaram trabalhos entre 1991 e 2018 na área de peptídeos antimicrobianos de anfíbios.

Como esperado, China e Estados Unidos da América lideram entre os grupos de pesquisa que publicaram na área, sendo que os dois países respondem por 56,49% de todas as publicações sobre peptídeos antimicrobianos de anfíbios entre 1991 e 2018. Surgem algumas surpresas, como a Irlanda do Norte (3ª posição) e os Emirados Árabes Unidos (6ª posição), a frente do Brasil, Austrália, Japão, Coreia do Sul e Inglaterra. Se categorizarmos Irlanda do Norte, Inglaterra e Escócia como “Reino Unido”, este ocuparia o mesmo 3º lugar da Irlanda do Norte, com 42 trabalhos, ainda muito atrás dos dois primeiros.

Se a análise for realizada de acordo com o continente ao qual pertencem os grupos de pesquisa, podemos verificar que grupos asiáticos e europeus estão presentes em mais de dois terços dos trabalhos (figura 4), seguidos por grupos americanos, com predominância de grupos norte-americanos dentro deste subgrupo.



**Figura 4.** Continentes onde estão sediados os grupos de pesquisa que publicaram trabalhos entre 1991 e 2018 na área de peptídeos antimicrobianos de anfíbios.

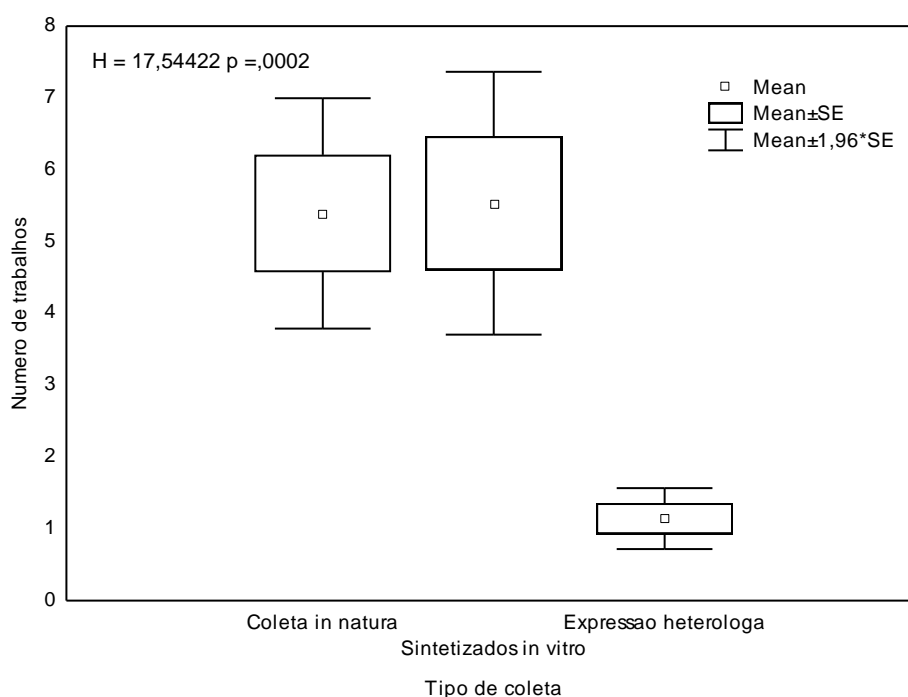
### 3.3. Forma de obtenção dos peptídeos

Esta análise foi realizada a fim de se obter a informação sobre a forma de obtenção dos peptídeos estudados. O objetivo desta análise foi realizar um levantamento para se obter conhecimento a respeito de coletas *in natura* dos peptídeos ou se estes peptídeos foram sintetizados *in vitro*, a partir de informações já existentes em bases de dados. Destaca-se que uma forma de obtenção não inviabiliza a outra, isto é, um peptídeo pode ter sido coletado *in natura* e também sintetizado *in vitro* dentro do mesmo trabalho.

Na figura 5 de acordo com o teste estatístico kruskal waallis a diferença significativa foi entre as técnicas coleta *in natura* e sintetizados *in vitro* para expressão heteróloga, pode-se verificar que os peptídeos obtidos diretamente de secreções de anfíbios, bem como aqueles sintetizados *in vitro*, fazendo uso da técnica de síntese de peptídeos em fase sólida são os mais estudados, mostrando uma preferência por essas formas de obtenção do material de trabalho. A produção de peptídeos utilizando técnicas de biologia molecular e expressão heteróloga de proteínas é sempre relegada a um segundo plano, provavelmente devido aos custos envolvidos tanto na produção quanto na purificação dos peptídeos. No entanto, do ponto de vista ambiental essa escolha deveria ser

considerada, uma vez que a síntese de peptídeos em fase sólida gera resíduos, em especial solventes orgânicos (STRANER et al., 2016).

Percebe-se também que em 2011, 2015 e 2018, o levantamento mostra que há um menor número de trabalhos que relatam um dos três tipos de coleta analisados acima (17, 15 e 19 artigos), quando comparados ao total de trabalhos publicados nestes mesmos anos (18, 20 e 24 artigos, como mostrado na figura 1). Este fenômeno pode ser explicado pela utilização de ferramentas de bioinformática, como discutido na seção 4.4, mais abaixo. Isso sugere que alguns grupos de pesquisa buscam peptídeos em base de dados e fazem as suas análises exclusivamente através de ferramentas de bioinformática.

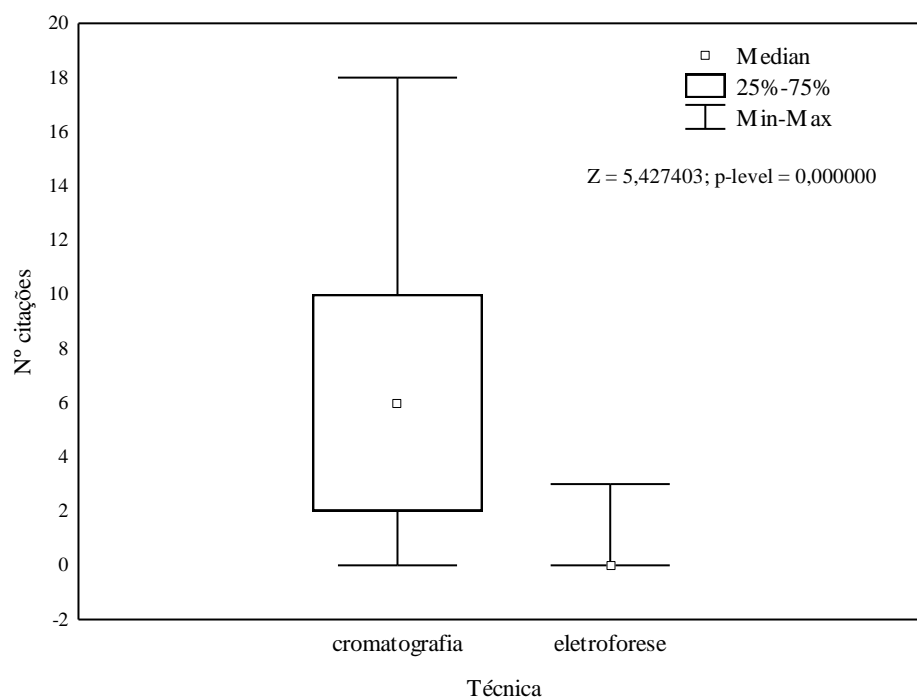


**Figura 5.** Forma de obtenção dos peptídeos antimicrobianos no período de 1991 a 2018.

### 3.4. Técnicas de purificação e caracterização funcional/estrutural de peptídeos.

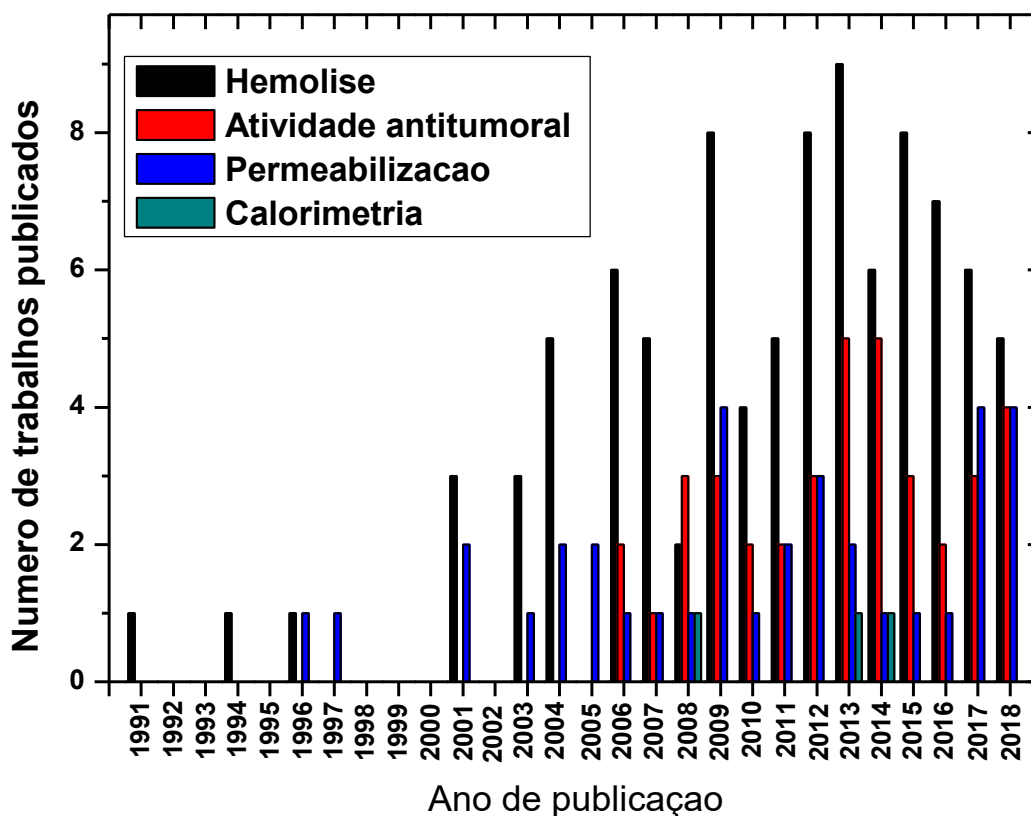
Na figura 6, pode-se observar que a técnica preferencial de purificação de peptídeos antimicrobianos é a cromatografia, seja ela acoplada a um detector UV-Vis, a um detector de fluorescência ou a um detector de massas. A técnica de eletroforese foi praticamente abandonada como método de separação, sendo utilizada apenas em seis trabalhos, dentro dos resultados analisados. É importante destacar que um mesmo trabalho pode ter aplicado técnicas de separação acopladas, isto é, várias cromatografias em série, ou eletroforese seguida de cromatografia. A técnica de cromatografia líquida, principalmente acoplada à espectrometria de massas, é a mais poderosa técnica de

detecção para a cromatografia oferecendo informações qualitativas e quantitativas, possuindo alta sensibilidade e capacidade de distinção entre diferentes substâncias com o mesmo tempo de retenção (HARRIS, D. 2016).



**Figura 6.** Técnica de separação utilizada nos trabalhos analisados.

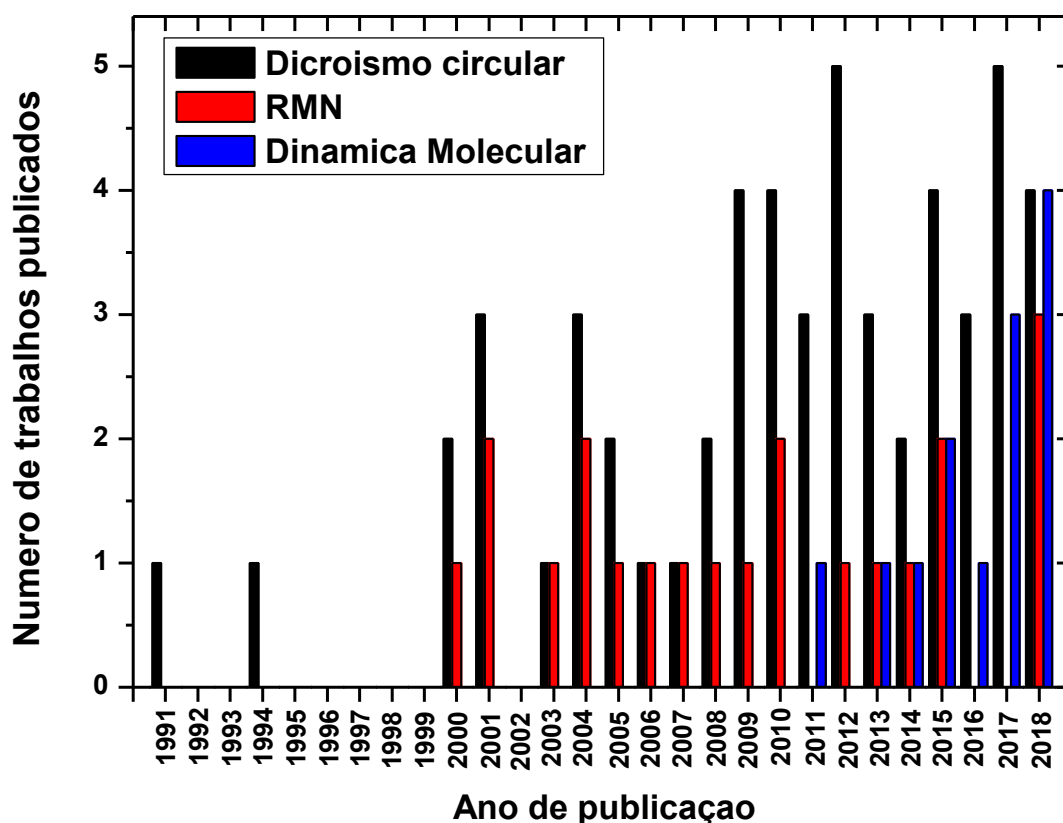
Quanto à caracterização funcional dos peptídeos, a figura 7 mostra que na primeira década analisada (1991 a 2000), poucos estudos foram realizados, e concentraram-se em determinar a atividade hemolítica e/ou a capacidade dos peptídeos estudados em permeabilizar vesículas sintéticas. Esta abordagem persiste até os dias atuais, como pode ser visto pelo alto número de estudos envolvendo atividade hemolítica.



**Figura 7.** Principais técnicas utilizadas em estudos funcionais de peptídeos antimicrobianos de anfíbios, no período analisado.

Ainda na figura 7, percebe-se que, a partir de meados da segunda década analisada (2001 – 2010) começam a ser estudadas as propriedades antitumorais de peptídeos antimicrobianos de anfíbios, impulsionadas principalmente pelo pioneiro trabalho de Dennison et al.(2006). Percebe-se ainda a falta de trabalhos que possibilitem determinar constantes de afinidade de peptídeos antimicrobianos e membranas. Esses dados podem ser acessados através de estudos de calorimetria, mas, como demonstrado na figura 7, ainda são pouco abordados (DENNISON et al., 2006).

Estudos estruturais de peptídeos antimicrobianos também costumam ser realizados, dado que a relação estrutura-função é fundamental dentro da bioquímica e biofísica. No entanto, estes estudos demandam peptídeos em altas concentrações, com um grau de pureza acima de 95% (LARIVE et al., 1997). Estas características só puderam ser alcançadas através da utilização de síntese de peptídeos em fase sólida e/ou produção heteróloga de peptídeos, situação que, como demonstrado na figura 5, só ocorreram a partir de 2005. Dentre as técnicas de caracterização estrutural, destacam-se o dicroísmo circular e a ressonância magnética nuclear (figura 8).



**Figura 8.** Principais técnicas utilizadas em estudos estruturais de peptídeos antimicrobianos de anfíbios, no período analisado.

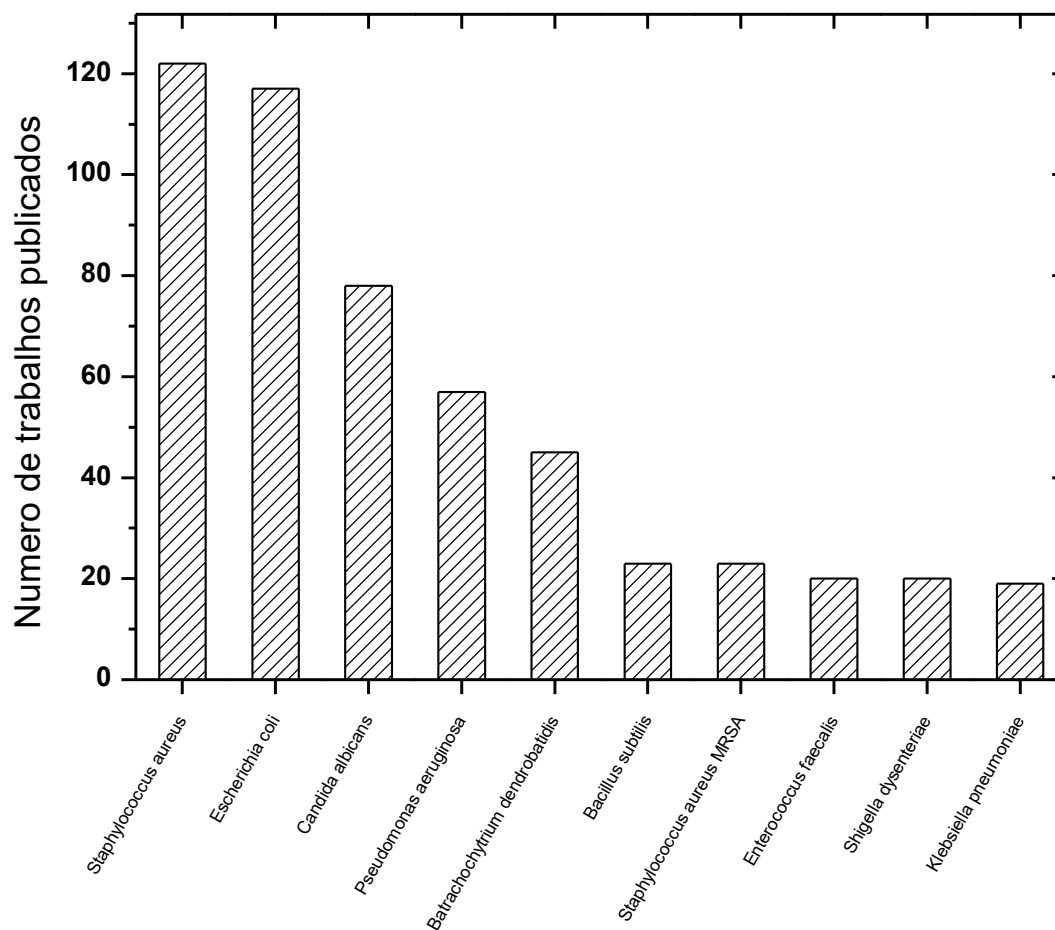
Destaca-se, ainda, na figura 8, a ocorrência, desde 2011, de um crescente número de trabalhos utilizando-se de técnicas de simulação, modelagem e dinâmica molecular. Esses experimentos, realizados *in silico*, apresentam a grande vantagem de dispensar os equipamentos de laboratório, muito caros, fazendo uso de plataformas de trabalho computacionais especialmente construídas para essas técnicas (TORRENT et al., 2012; BAI et al., 2018).

### 3.5. Análise funcional de peptídeos antimicrobianos de anfíbios.

A principal função dos peptídeos antimicrobianos é atuar contra microrganismos. Apesar destes estudos estarem ligados diretamente à função dos peptídeos, abordados no item anterior, as medidas diretas de atividade funcional merecem lugar de destaque e serão analisadas a parte. Evita-se, nesta seção, utilizar a expressão “atividade antimicrobiana”, pois será mostrado que os peptídeos antimicrobianos vêm sendo testados não só quanto a sua atividade bactericida/fungicida

(ou bacteriostática/fungistática), mas também quanto a sua atividade contra protozoários.

Entre 1991 e 2018, 114 diferentes espécies e cepas de vírus, bactérias, fungos e protozoários foram testados para verificar a ação de peptídeos antimicrobianos de anfíbios. A lista completa encontra-se nos anexos desta dissertação. Por motivos de clareza, apenas os dez microrganismos mais estudados serão mostrados nesta seção (figura 9).



**Figura 9.** Número de trabalhos publicados de 1991 a 2018, categorizados para os dez microrganismos mais estudados.

A figura 9 mostra que os três microrganismos mais estudados são modelos de estudos para microbiologistas (CRUZ et al., 2014). *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* são alvos preferenciais de trabalhos com peptídeos antimicrobianos por servirem de modelo para bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, respectivamente.

Analisando-se ainda a figura 9, pode-se perceber que, dos dez microrganismos mais estudados, oito são causadores de algum tipo de doença em seres humanos, como



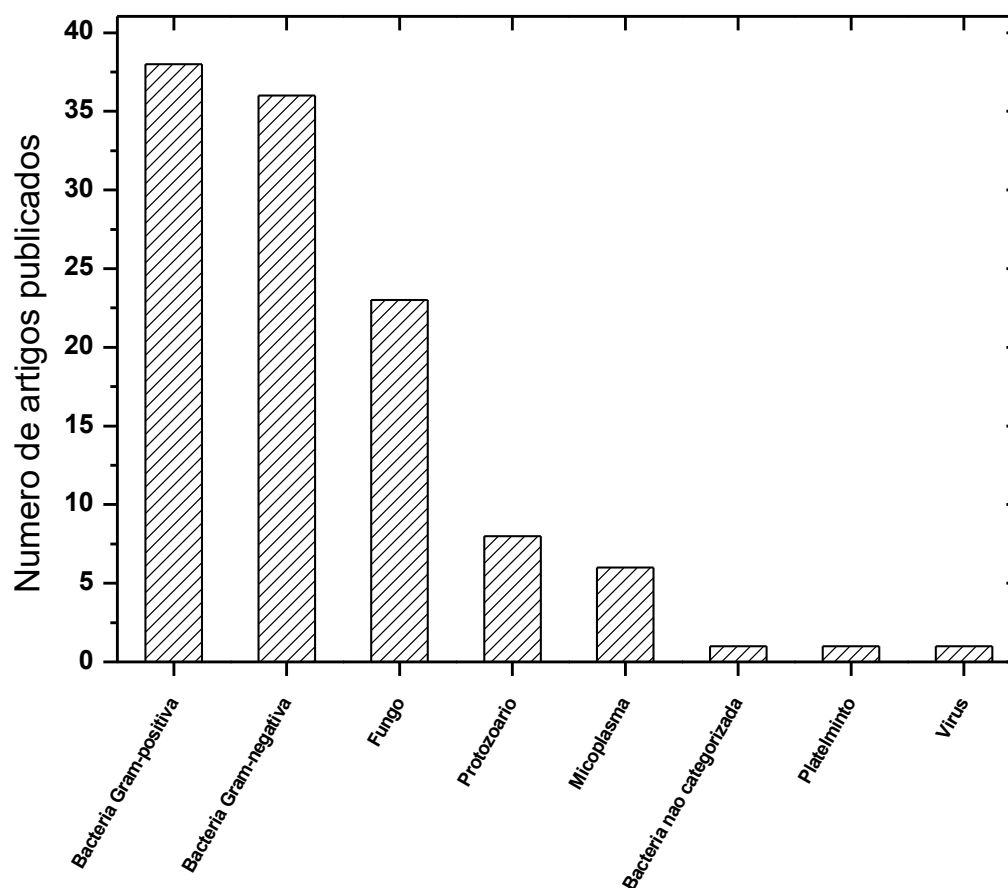
mostrado na tabela I. Os dados foram obtidos utilizando-se a ferramenta World Data Centre for Microorganisms – WDCM Reference Strain Catalogue (Disponível em: <http://refs.wdcm.org/home.htm>).

**Tabela I.** Principais atividades dos dez microrganismos mais estudados quanto à função de peptídeos antimicrobianos de anfíbios entre 1991 e 2018.

<b>Microrganismo</b>	<b>Principal atividade</b>
<i>Bacillus subtilis</i>	Bactéria Gram-positiva não patogênica
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Fungo causador de infecções cutâneas em anfíbios
<i>Candida albicans</i>	Fungo causador de infecções orais e vaginais em animais
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bactéria Gram-positiva, pode causar infecções oportunistas
<i>Escherichia coli</i>	Bactéria Gram-negativa, geralmente não patogênica, mas pode causar intoxicações alimentares
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bactéria Gram-negativa, pode causar infecções hospitalares
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactéria Gram-negativa, pode causar infecções hospitalares
<i>Shigella dysenteriae</i>	Bactéria Gram-negativa, pode causar infecções estomacais
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactéria Gram-positiva, pode causar infecções graves
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	<i>S. aureus</i> resistente a antibióticos da família da penicilina

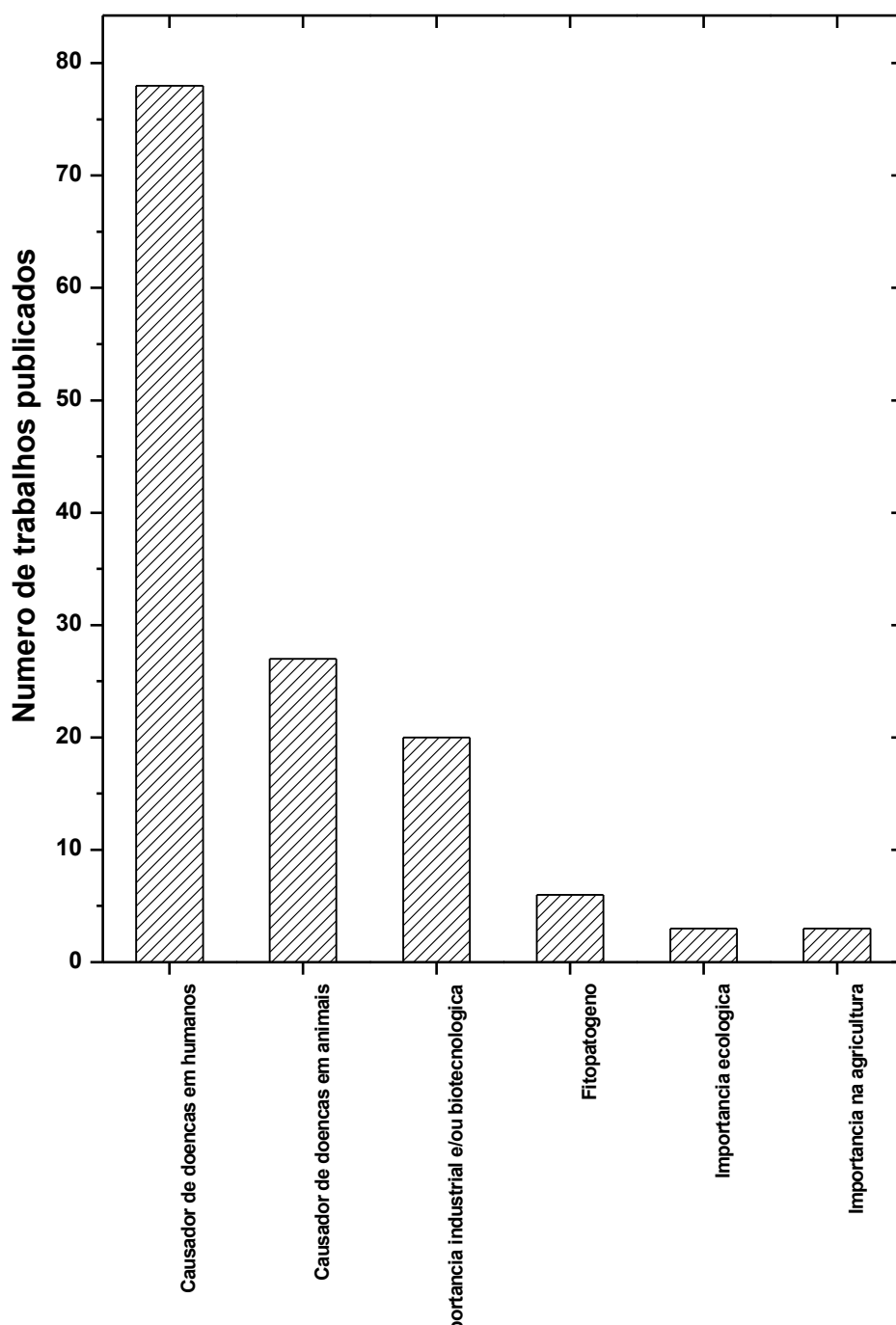
*Bacillus subtilis* é uma bactéria amplamente presente no meio ambiente, e pode ser utilizada a fim de monitorar um possível impacto ambiental do uso de peptídeos antimicrobianos (GARRITY et al., 1995). *Batrachochytrium dendrobatidis*, por sua vez, é um fungo que causa a quitridiomiose, uma doença letal para os anfíbios e que, segundo recentes trabalhos, vem causando a diminuição de até 30% da população de anfíbios nas Américas e Oceania, sendo então seu controle uma preocupação mundial para os pesquisadores da área (CUNNINGHAM, 2018; KOSCH et al., 2018; OSLOM et al., 2013).

Categorizando-se as 114 diferentes espécies e cepas de vírus, bactérias, fungos e protozoários em que foram testados como alvos de peptídeos antimicrobianos de anfíbios, pode-se observar uma preferência por estudos em bactérias, seguidos por fungos (figura 10), e, em terceiro lugar, protozoários. *Mycobacterium tuberculosis* não pôde ser categorizada como bactéria Gram-positiva ou Gram-negativa por possuir características de ambos os grupos.



**Figura 10.** Número de trabalhos publicados de 1991 a 2018, de acordo com a natureza dos microrganismos estudados.

Quando analisa-se a atividade (dados foram obtidos utilizando-se a ferramenta World Data Centre for Microorganisms – WDCM Reference Strain Catalogue (Disponível em: <http://refs.wdcm.org/home.htm>) dos 114 microrganismos que foram testados como alvo de peptídeos antimicrobianos de anfíbios, pode-se perceber uma ampla preferência por estudar a ação antimicrobiana em microrganismos causadores de doenças em humanos (figura 11).



**Figura 11.** Atividade dos microrganismos estudados entre 1991 e 2018 como alvos de peptídeos antimicrobianos de anfíbios.

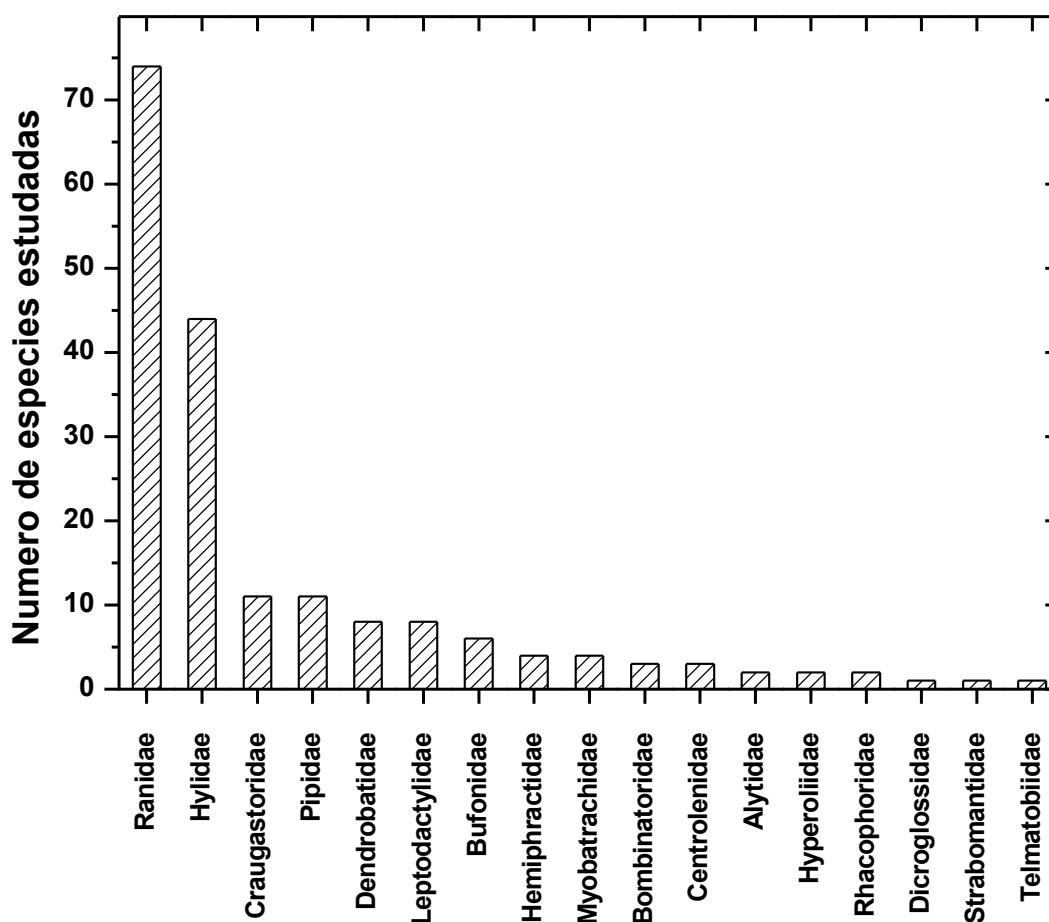
É importante ressaltar que a classificação acima é baseada na(s) principal(is) atividade(s) que o microrganismo apresenta, e pode ser considerada um tanto arbitrária, uma vez que fungos, por exemplo, apresentam importância ecológica por decompor matéria orgânica, independentemente se causadores de doenças ou não. De qualquer forma, percebe-se uma ampla preferência por organismos causadores de doenças em

humanos, seguidos por microrganismos causadores de doenças em animais e, em terceiro lugar, microrganismos com importância industrial ou biotecnológica.

### 3.6. Análise da origem e classificação dos animais estudados.

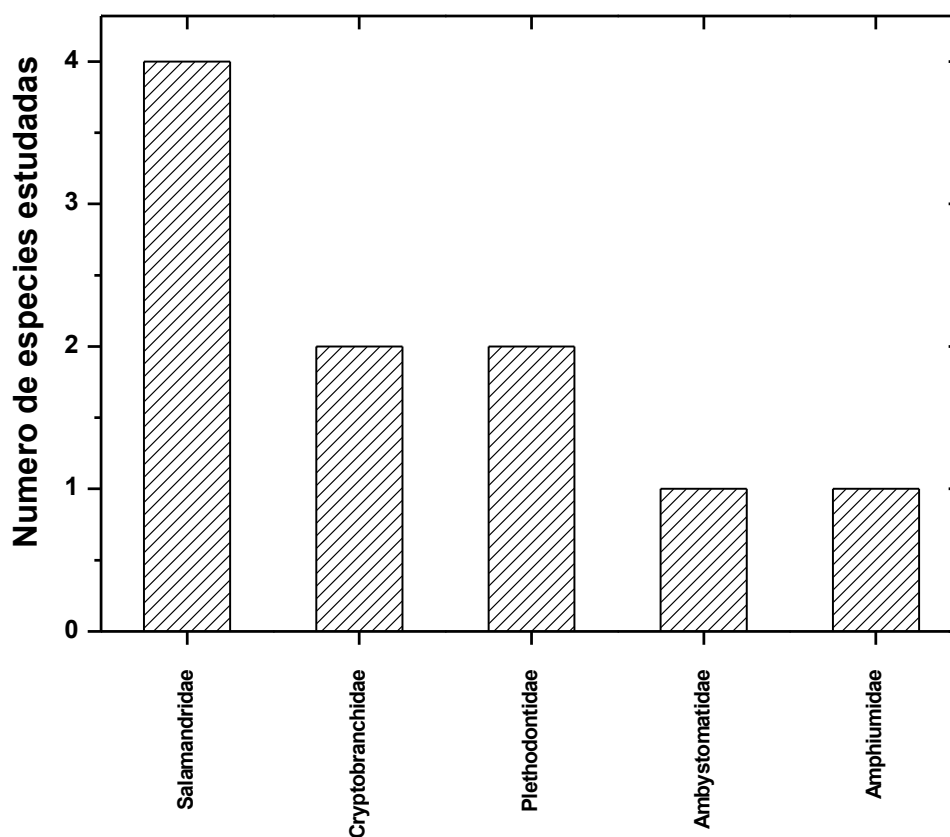
Dentro do período analisado, ou seja, de 1991 a 2018, 194 espécies de anfíbios foram estudadas como fonte de peptídeos antimicrobianos. Dentro da classe Amphibia, a ordem Anura foi fonte predominante de peptídeos antimicrobianos, com 184 espécies, seguida por Caudata com 10 espécies. Todos os dados apresentados nesta seção foram obtidos consultando-se a base de dados Amphibiaweb (Disponível em: <https://amphibiaweb.org/>), respeitando-se a taxonomia mais moderna ali apresentada. Nos anexos, há a lista com os nomes de todas as espécies estudadas.

Dentro da ordem Anura, as famílias mais estudadas (figura 12) foram Ranidae e Hylidae, justamente as duas maiores famílias de anuros, e também com ampla distribuição geográfica.



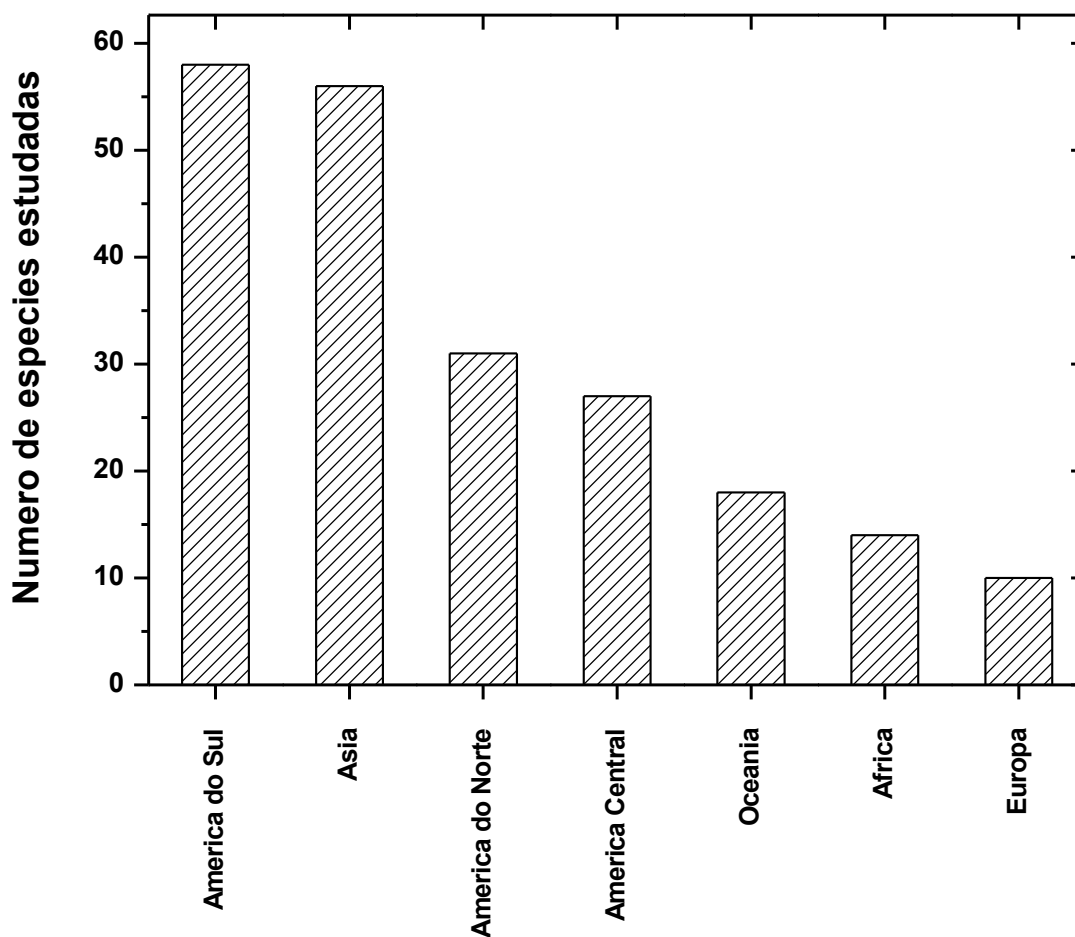
**Figura 12.** Famílias de Anuros estudados entre 1991 e 2018 como fontes de peptídeos antimicrobianos.

Dentro da ordem Caudata, cinco famílias foram estudadas (figura 13), e, conseqüentemente, um número muito menor de espécies quando comparada a ordem Anura.



**Figura 13.** Famílias de Caudata estudados entre 1991 e 2018 como fontes de peptídeos antimicrobianos.

Quanto à localização geográfica, América do Sul e Ásia lideram os locais onde foram coletados a maior parte dos animais estudados (figura 14), mostrando que essas regiões detém um reservatório importante da biodiversidade de anfíbios do planeta.



**Figura 14.** Localização geográfica dos anfíbios estudados entre 1991 e 2018 como fonte de peptídeos antimicrobianos.

Quanto ao status de conservação (tabela II), segundo a classificação da União Internacional para Conservação da Natureza (*International Union for Conservation of Nature*, IUCN), pouco mais de 67% das espécies estão categorizadas como “não preocupantes”, ao passo que pouco menos de 3% das espécies avaliadas entre 1991 e 2018 estão classificadas como “criticamente em perigo”, a última categoria antes de se considerar um organismo extinto na natureza. A IUCN considera as espécies ameaçadas de extinção aquelas que estão classificadas como “Vulnerável”, “Em perigo” e “Criticamente em perigo”, o que soma 16,5% das espécies estudadas.

**Tabela II.** Classificação de conservação, segundo os critérios da IUCN, das espécies de anfíbios avaliadas entre 1991 e 2018.

<b>Classificação</b>	<b>% de espécies</b>
Pouco preocupante	67,5
Vulnerável	7,2
Em perigo	6,7
Quase ameaçada	6,2
Deficiente de dados	5,7
Não avaliado	4,1
Criticamente em perigo	2,6

#### **4. Discussão**

A cienciometria é uma ciência que se ocupa de avaliar a produção científica, mediante indicadores numéricos e uso de técnicas e análises, inclusive estatísticas, amplamente discutidas e validadas (LEYDESDORFF e MILOJEVIĆ, 2012). Neste trabalho, foram realizadas análises cienciométricas a respeito da produção científica na área de peptídeos antimicrobianos de anfíbios. Essa análise teve por objetivo fornecer subsídios para (i) entender quais as possíveis lacunas dentro dessa área de pesquisa no que diz respeito às técnicas empregadas e aos anfíbios e microorganismos estudados, (ii) prover informações a respeito dos grupos de pesquisa envolvidos nesta área e (iii) entender o impacto que esta área tem sobre a conservação de anfíbios no mundo.

##### **4.1. Análises cienciométricas dentro da área de pesquisa em peptídeos antimicrobianos de anfíbios e suas contribuições em um contexto científico, político e econômico.**

Um primeiro aspecto que pode-se notar é o aumento no número de trabalhos publicados a partir do século XXI (figura 1,  $r = 0,91679$ ,  $p = 0,00001$ ). Esse aumento é ainda mais notável ao se analisar, década a década, a produção científica relacionada aos peptídeos antimicrobianos de anfíbios (figura 2), denotando que, no período compreendido entre 2011 e 2018, temos mais da metade de toda a produção científica, embora num tempo menor quando comparada às duas primeiras décadas (1991 a 2000 e 2001 a 2010).

Esse aumento no número de publicações pode refletir o crescimento observado nas publicações científicas como um todo, já que este padrão pode ser observado em outras áreas de conhecimento, como: mudanças climáticas (Nabout et al., 2012) e estudos ecológicos sobre insetos pertencentes à ordem Odonata (Miguel et al., 2017). Entretanto, o aumento no número de publicações pode não representar um aumento no conhecimento científico, logo que existe uma prática, conhecida como ciência-salame (*salami science*), que preocupa pesquisadores em diferentes áreas do conhecimento. Tal prática consiste em fatiar um corpo de dados em pedaços menores para publicação nos casos em que um único artigo abrangente seria mais apropriado (Laitman e Rikkers, 2000; Reinach, 2013).

Sobre esse incremento, algumas hipóteses podem ser levantadas, tais como: (i) formalização das instituições e áreas de conhecimentos, (ii) períodos de crescimento econômico e (iii) e a própria revolução industrial. LARSEN e VON INS (2010) mostram que a ciência passou por 3 grandes fases de crescimento, em que se observou um notável aumento de publicações: no período do século XVI a XVII, no período XVII a XIX e, por fim, no período pós II Guerra Mundial.

Van Noorden, em texto publicado no News Blog da revista Nature (Disponível em: <http://blogs.nature.com/news/2014/05/global-scientific-output-doubles-every-nine-years.html>) mostra que a produção científica, ao ritmo em que crescia em 2014, dobraria o número de trabalhos a cada nove anos, e questiona justamente se esse aumento não está sendo muito rápido, discutindo as implicações disso. Dentre os principais prejuízos apontados, estão justamente aquelas publicações que jamais serão lidas e citadas e, por isso mesmo, são inúteis. Outros trabalhos também atribuem esse aumento no número de publicações ao surgimento de jornais predatórios (COBEY et al., 2018), que se notabilizam por publicar trabalhos de baixa qualidade com pouco ou nenhum rigor no processo de revisão por pares, e que buscam tão somente o lucro proporcionado pelas taxas pagas pelos autores.

Existem trabalhos (LARSEN e VON INS, 2010) que mostram que esse aumento é ainda subdimensionado pelas buscas em bases de dados como o Web of Science, uma vez que vem sendo cada vez mais comum a divulgação de trabalhos de formas alternativas, como em anais de conferências, publicações de acesso aberto e em endereços eletrônicos independentes. Estes fenômenos podem colocar em xeque uma das ferramentas mais importantes da ciência, que é a revisão por pares (GANNON, 2001), embora seja também alvo de críticas, seja por sua morosidade ou enviesamento



ideológico das críticas (KELLY et al., 2014). Tendo estes aspectos em vista, urge à Ciência e aos cientistas que consigam lidar com os aspectos de uma sociedade que tem cada vez mais pressa no acesso ao conhecimento, sem, no entanto, descuidar do rigor e profundidade de discussão tão caros à essa mesma Ciência.

Quando analisam-se as nacionalidades dos grupos de pesquisa envolvidos na busca por peptídeos antimicrobianos, surgem constatações preocupantes. Analisando os dez países listados (figura 3), e comparando a participação destes países nos grupos de pesquisa envolvidos com peptídeos antimicrobianos de anfíbios, com dados levantados pela UNESCO sobre gastos em ciência e tecnologia (tabela III), podemos perceber que o Brasil ocupa um lugar de destaque nessa área de pesquisa. Os dados da Unesco (Disponível em: <http://uis.unesco.org/apps/visualisations/research-and-development-spending/>) são baseados em duas análises: correlacionando a porcentagem do investimento em ciência e tecnologia em relação ao produto interno bruto (% PIB) e em paridade de poder de compra (*purchasing power parity* - PPP), uma teoria proposta pelo economista sueco Gustav Cassel (CASSEL, 1918) que permite comparar o poder de compra – e, por consequência, mede o valor relativo do dinheiro – de dois ou mais países.

**Tabela III.** Comparação entre as taxas de participação em grupos de pesquisa na área de peptídeos antimicrobianos de anfíbios em relação aos investimentos em C&T, de acordo com os dados disponibilizados pela UNESCO em (Disponível em: <http://uis.unesco.org/apps/visualisations/research-and-development-spending/>). Os números entre parênteses indicam a posição do país na escala analisada.

País	% de participação em artigos da área	Investimento em C&T		
		% PIB	Paridade do poder de compra (bilhões de US\$)	Nº de pesquisadores/10 <sup>6</sup> habitantes
China	19,8 (1º)	2,0 (6º)	370,61 (2º)	1.096 (8º)
EUA	18,3 (2º)	2,7 (3º)	476,46 (1º)	4.255 (4º)
Reino Unido	10,6 (3º)	1,7 (7º)	43,81 (6º)	4.254 (5º)
França	7,2 (4º)	2,3 (4º)	60,59 (5º)	4.233 (6º)
Itália	7,0 (5º)	1,3 (8º)	29,45 (8º)	1.983 (7º)
Emirados Árabes Unidos	5,2 (6º)	0,7 (9º)	4,24 (10º)	n/d

Brasil	4,4 (7º)	1,3 (8º)	42,00 (7º)	881 (9º)
Japão	3,1 (8º)	3,4 (2º)	169,55 (3º)	5.328 (2º)
Austrália	2,8 (9º)	2,2 (5º)	23,13 (9º)	4.539 (3º)
Coréia do Sul	2,6 (10º)	4,3 (1º)	73,11 (4º)	6.856 (1º)

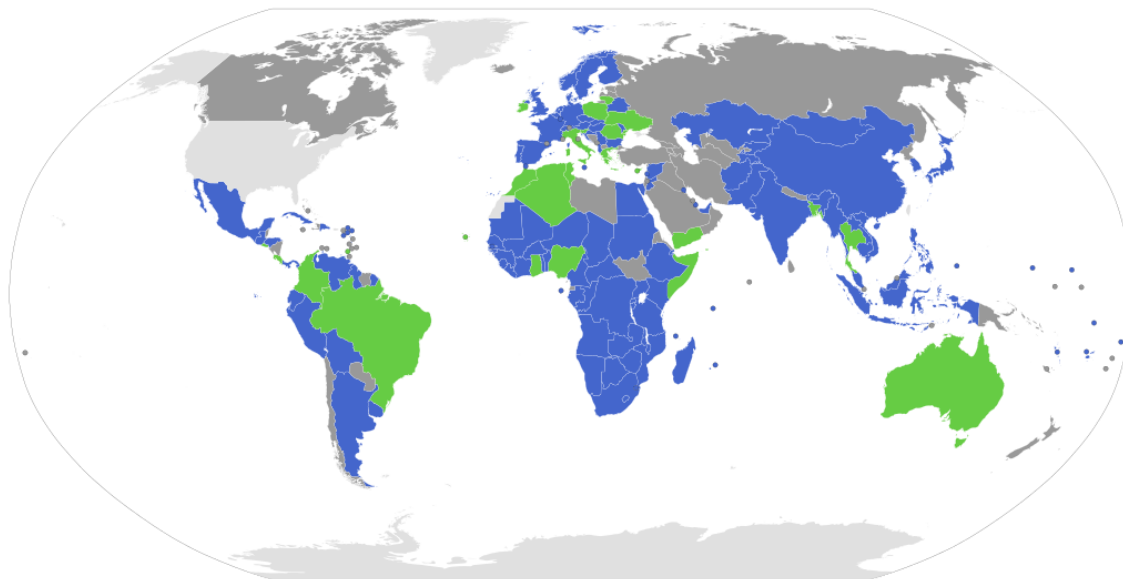
---

n/d = não disponível

Analisando-se esses dados, percebe-se que o Brasil, dentre os dez países analisados, é o que tem o segundo menor investimento em relação ao PIB, o terceiro que tem o menor investimento em relação ao PPP e o lanterna em número de pesquisadores por milhão de habitantes, mas que ocupa o sétimo lugar em publicações na área de pesquisa em peptídeos antimicrobianos. Essa posição, a frente de países tidos como modelo em investimento em C&T, como Japão e Coréia do Sul, é uma demonstração da excelência da pesquisa no Brasil, dentro dessa área. Diversos trabalhos mostram a importância do financiamento à pesquisa (PINHEIRO-MACHADO e DE OLIVEIRA, 2001; VOORWALD, 2010; DE NEGRI e RAUEN, 2018), e são categóricos ao afirmar que, além do aumento do capital financeiro aplicado à C&T, é necessário garantir estabilidade nesse suprimento, além de aumentar a formação de pesquisadores no país. . A adoção de medidas distorcidas como a Emenda Constitucional do Teto de Gastos Públicos (BRASIL, 2016) pode, segundo diversos especialistas (BRASIL, 2018; SBPC, 2017) comprometer ainda mais a pesquisa científica no Brasil, tanto no que diz respeito ao financiamento quanto à formação de mão de obra qualificada. Em 2015, por exemplo (BRASIL, 2015), o CNPq experimentou um declínio de 14% no valor de bolsas concedidas, e de 51% a menos em projetos de fomento a pesquisa, neste mesmo ano.

Outra constatação preocupante é quanto ao interesse de pesquisadores estrangeiros em recursos naturais de outros países. O Protocolo de Nagoya, que entrou em vigor em outubro de 2014, ainda não foi ratificado pelo Congresso Nacional (DAVIS et al., 2016;\_ BUCK e HAMILTON, 2011). Este documento estabelece as diretrizes para as relações comerciais entre o país provedor de recursos genéticos e aquele que vai utilizá-los, abrangendo pontos como pagamento de *royalties*, estabelecimento de *joint ventures*, direito a transferência de tecnologias e capacitação. A não assinatura e/ou não ratificação pode trazer consequências diretas para a exploração de recursos naturais sem o devido controle. A figura 15 mostra a atual situação mundial

em relação a esse protocolo (ABSCH, 2018; Disponível em: [https://en.wikipedia.org/wiki/Nagoya\\_Protocol](https://en.wikipedia.org/wiki/Nagoya_Protocol) acessado: 18/03/2019).



**Figura 15.** Países que ratificaram o Protocolo de Nagoya (em azul), que assinaram, mas não ratificaram (em verde), que não assinaram, mas fazem parte de outros acordos de diversidade biológica (em cinza escuro) e que não assinaram e não fazem parte de nenhum acordo de diversidade biológica (em cinza claro) (adaptado de Disponível em: [Disponível em: https://en.wikipedia.org/wiki/Nagoya\\_Protocol](https://en.wikipedia.org/wiki/Nagoya_Protocol) acessado: 18/03/2019).

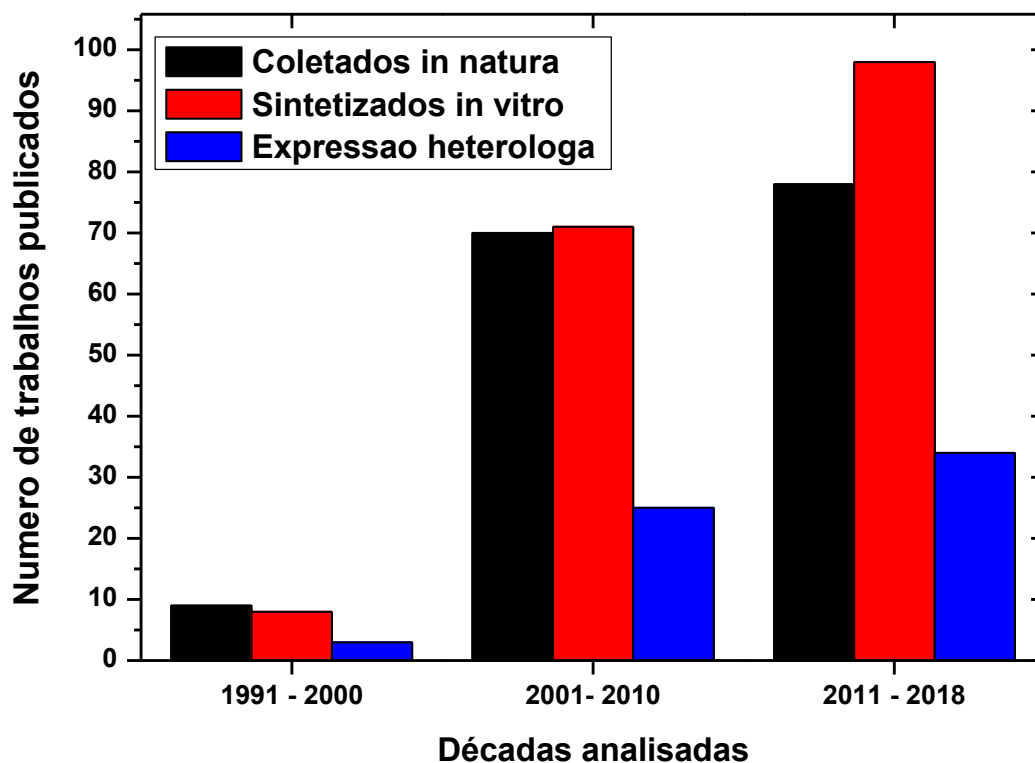
Este tipo de preocupação surge quando percebe-se que países europeus e asiáticos são responsáveis por mais de dois terços das publicações na área de peptídeos antimicrobianos de anfíbios (figura 4), mas as Américas (do Norte, Central e do Sul) respondem por mais da metade (54,2%, calculados de acordo com os dados apresentados na figura 14) das espécies de sapos estudadas. Causa especial preocupação a alta participação de espécies nativas da América Central (12,6%, calculada de acordo com os dados apresentados na figura 14), mas a absoluta ausência de grupos de pesquisa oriundos desse continente (figura 4). Notável é também a discrepância entre o número de espécies africanas (6,5%, calculada de acordo com os dados apresentados na figura 14), e o número de grupos de pesquisa também africanos, apenas 1,03%. No extremo oposto, temos 34,37% de grupos europeus atuando na área de peptídeos antimicrobianos de anfíbios, mas apenas 4,67% das espécies de anfíbios estudadas são europeias. No que diz respeito a América do Sul, o papel do Brasil se faz ainda mais importante, uma vez este continente é o líder no número de espécies identificadas em pesquisas com peptídeos antimicrobianos (27,10%, calculados de acordo com os dados apresentados na

figura 14) e o Brasil é o único representante da região entre os dez países que mais publicam nessa área.

Assim, é necessário apontar para a necessidade de preservação destes recursos naturais, protegendo-os tanto de ameaças à sua existência quanto a possíveis atos de biopirataria. É importante lembrar que a falta de clareza nestes aspectos comerciais levou a episódios como o desenvolvimento da droga anti-hipertensiva Captopril, que teve participação crucial de diferentes pesquisadores, inclusive brasileiros, mas os lucros foram auferidos apenas pelas indústrias farmacêuticas (SMITH e VANE, 2003; GRAVAS, 2004; ERDÖS, 2004).

#### **4.2. Análises cienciométricas dentro da área de pesquisa em peptídeos antimicrobianos de anfíbios: aspectos técnico-científicos e consequências para a conservação.**

Ao analisar as formas de obtenção de peptídeos antimicrobianos de anfíbios, é natural esperar que os primeiros trabalhos baseiem-se em coletas dos peptídeos *in natura*, a fim de identifica-los tanto do ponto de vista funcional quanto estrutural. É isso que se observa na figura 5 e na figura 16, onde percebe-se que os peptídeos coletados *in natura*, apesar de mostrar aumento no número de publicações, vem perdendo espaço para os peptídeos sintetizados *in vitro*. A partir dos dados mostrados na figura 16, percebe-se que a porcentagem de trabalhos onde os peptídeos antimicrobianos coletados *in natura* são 45% dos trabalhos publicados na primeira década analisada, e caem para 37,2% na década que se iniciou em 2011, ao passo que os peptídeos sintetizados *in vitro* passaram de 40% para 46,7% dos trabalhos publicados, nos mesmos períodos. Os peptídeos obtidos por expressão heteróloga permaneceram praticamente estáveis, 15% para a primeira década e 16,2% na última década analisada.



**Figura 16.** Forma de obtenção dos peptídeos antimicrobianos no período de 1991 a 2018, categorizados por década.

A síntese de peptídeos em fase sólida é uma técnica desenvolvida por Robert Bruce Merrifield na década de 1960 para obtenção de peptídeos através de reações sequenciais de formação de ligações peptídicas em aminoácidos presos a uma matriz insolúvel (MERRIFIELD, 1963; MITCHELL, 2008). Os problemas que se apresentaram desde a década de 1960, chegando aos anos 1990, diziam respeito a problemas de solubilidade de peptídeos mais longos (20 aminoácidos ou mais), bem como à ocorrências de reações colaterais (MERRIFIELD, 1963). Esses problemas foram contornados utilizando-se combinações de solventes orgânicos, grupos protetores e reagentes sequestrantes, em um trabalho pioneiro de Fields e colaboradores (KING et al., 1990).

O desenvolvimento de novas técnicas de cromatografia, em especial a cromatografia líquida de alta resolução (*high performance liquid chromatography* – HPLC) impulsionou a área, uma vez que, além de permitir a síntese de peptídeos, foi possível purificá-los de forma muito rápida e eficiente, chegando a níveis de pureza da ordem de 98%. Na HPLC, a combinação de colunas de alta resolução, aliada à alta pressão imposta por um sistema de bombas e a facilidade e precisão de sistemas de detecção através de detectores de absorção no UV-Vis, fluorescência e análise de massa

permitiu um grande salto de qualidade para os pesquisadores que pretendem trabalhar com peptídeos antimicrobianos (UNGER et al., 2010). Estes fatos explicam o fenômeno observado na figura 6, onde 97,9% dos trabalhos publicados entre 1991 e 2018 utilizaram-se de técnicas cromatográficas para separação e identificação de peptídeos antimicrobianos, enquanto apenas 2,1% utilizaram-se de eletroforese para o mesmo fim.

No entanto, tanto a síntese de peptídeos em fase sólida quanto a própria cromatografia possuem a desvantagem de não serem ecologicamente limpas, uma vez que há a geração de resíduos como solventes orgânicos, que não podem ser descartados na natureza. Isso vem sendo contornado com a adoção de sistemas automáticos de síntese, que lidam com volumes menores, e, por consequência, menor geração de resíduos (BROWN et al., 1998; e MITCHELL, 2008). A expressão heteróloga poderia ser uma alternativa, mas esbarra nos problemas de custos, pois sua utilização envolve a necessidade de todo um instrumental relacionado à biologia molecular.

Assim, pode-se concluir que, em um futuro próximo, a síntese de peptídeos em fase sólida consolide-se como uma ferramenta importante na pesquisa de peptídeos antimicrobianos. Neste contexto, percebe-se a importância de ferramentas de bioinformática, uma área que começou a se desenvolver na década de 1960, mas que teve um grande impulso a partir do começo dos anos 2000. No século XXI, com a chegada da era do “*Big Data*”, ou seja, a geração de dados em massa, especialmente na genômica, impossibilitando ao ser humano a análise desses dados (GAUTHIER et al., 2018), há uma corrida por ferramentas computacionais que permitam essas análises. A figura 8 é representativa desse fenômeno, mostrando que, a partir de 2010 começam a ser publicados trabalhos nas áreas de bioinformática, especialmente em dinâmica molecular, isto é, a análise estrutural de peptídeos utilizando-se modelos *in silico* (KURODA et al., 2016).

A combinação destas técnicas promete uma série de inovações na área de peptídeos antimicrobianos (PEARSON et al., 2016 e WU et al., 2014), utilizando uma combinação de inteligência artificial para gerar bibliotecas de peptídeos antimicrobianos a partir de um “molde” de um peptídeo encontrado *in vivo*, passando pela síntese e purificação dos peptídeos com maior potencial antimicrobiano e chegando aos testes funcionais.

Em relação aos testes funcionais citados acima, a figura 7 mostra uma preferência por testes hemolíticos. Estes testes, assim como os testes com

microrganismos vivos (discutidos mais abaixo), são o grande alvo dos pesquisadores da área de peptídeos antimicrobianos, uma vez que são capazes de mostrar tanto a efetividade dos peptídeos antimicrobianos contra microrganismos como também a capacidade destes mesmos peptídeos de lesionarem ou não as células de mamíferos, tendo como modelo as hemácias (WU et al., 2014) A atividade hemolítica é facilmente determinada, uma vez que são necessários apenas um simples espectrofotômetro, amostras de sangue e poucos reagentes como detergentes e tampões, para realizar os testes (EVANS et al., 2013), explicando assim a preferência por esse tipo de teste.

No entanto, existem críticas a esse tipo de abordagem (WIMLEY e HRISTOVA, 2011). Estas críticas estão focadas principalmente no fato de existir uma alta razão peptídeo:lipídeo nestes testes (de 200 a 1000, tipicamente). Com essa alta razão, diversos pesquisadores apontam que há um favorecimento da ligação do peptídeo à membrana celular, o que seria então uma situação limite. Estes críticos apontam a permeabilização de vesículas como uma alternativa (WIMLEY e HRISTOVA, 2011), uma vez que nesse tipo de experimento é possível controlar a razão peptídeo:lipídeo, chegando a razões tão baixas quanto 0,01, e assim permitindo uma análise mais clara da interação entre peptídeo e membrana. Analisando a figura 7, percebe-se que não há um padrão na utilização desta técnica, o que poderia ser atribuído à necessidade de equipamentos especialmente requeridos para a obtenção de vesículas, como extrusores, membranas extrusoras e lipídeos sintéticos, o que poderia encarecer os projetos (SPINELLA et al., 2012). Por outro lado, técnicas como a calorimetria, tanto a de titulação isotérmica como a de varredura diferencial, podem fornecer informações a respeito da interação peptídeo-membrana (REZANSOFF et al., 2005; ARIAS et al., 2017). Aqui, novamente, os problemas parecem estar relacionados tanto à questão financeira quanto a de disponibilidade de mão de obra especializada nestas novas técnicas, e talvez isso justifique os poucos trabalhos que se utilizam da calorimetria.

Quanto à caracterização estrutural, as técnicas experimentais mais utilizadas são o dicroísmo circular e a ressonância magnética nuclear (figura 8). O dicroísmo circular é uma técnica que se baseia na absorção diferencial de luz polarizada à esquerda e à direita, de acordo com as estruturas secundárias presentes no peptídeo estudado (FASMAN, 2013). Já a ressonância magnética nuclear permite mapear, átomo a átomo, toda a estrutura do peptídeo (TYSZKA et al., 2005). Dessa forma, é comum que o dicroísmo circular, uma técnica mais barata, seja realizado em uma primeira abordagem, para um posterior refinamento estrutural utilizando a ressonância magnética nuclear,

técnica mais cara. A figura 8 consegue mostrar essa realidade de forma bastante clara, pois há mais estudos utilizando a primeira técnica do que a segunda.

Mesmo com as críticas acima citadas, os testes de atividade antimicrobiana de peptídeos utilizando microrganismos é ainda o teste funcional de preferência entre os pesquisadores da área. A figura 10 mostra que há uma ampla preferência por testes em bactérias, já que, dos trabalhos onde houve esse tipo de experimento, 65,8% deles optou por testar a ação bactericida/bacteriostática de peptídeos antimicrobianos de anfíbios em bactérias Gram-positivas (33,3%), Gram-negativas (31,6%) e bactérias não categorizadas (0,9%). Em seguida, 20,2% dos testes foram realizados em espécies de fungos, seguidos por 7,0% de testes em protozoários, 5,3% em micoplasmas e 0,9% em platelmintos e vírus. As espécies mais estudadas foram modelos de estudos para microbiologistas (CRUZ et al., 2014), como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, que são organismos modelo para bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, respectivamente.

Quanto à atividade destes microrganismos é natural que exista uma preocupação maior com microrganismos causadores de doenças em humanos. Grande parte (56,9%) dos estudos visaram microrganismos que causam algum tipo de doença em humanos, seguidos por microrganismos causadores de doenças em animais (19,7%) e com importância industrial e/ou biotecnológica (14,6%). Há uma carência de estudos com microrganismos fitopatógenos (apenas 4,4%) ou com destacado papel ecológico e na agricultura (microrganismos decompositores, ou fixadores de fósforo, por exemplo), já que apenas 2,2% dos trabalhos estão contemplados em cada uma dessas áreas.

Isso mostra que esse tipo de informação pode e deve ser acessada, uma vez que a preocupação com microrganismos resistentes a antibióticos já é uma realidade no que diz respeito às doenças em seres humanos, e contemplada nos trabalhos com peptídeos antimicrobianos de anfíbios, onde estão sendo testados estes peptídeos contra formas resistentes de *S. aureus* (*S. aureus* MRSA) e *E. coli* (*E. coli* EBSL) a antibióticos e aos próprios peptídeos antimicrobianos (BELGUESMIA et al., 2017; JOO et al., 2016). Assim, é natural que se pense nos possíveis prejuízos e/ou pressão seletiva exercida pelo uso de peptídeos antimicrobianos de anfíbios em microrganismos não alvo. Essa lacuna de conhecimento pode representar um importante alvo para grupos de pesquisa, uma vez que microrganismos fitopatógenos e/ou com importância na agricultura são candidatos a receber investimentos para pesquisa, uma vez que o agronegócio tem extrema importância econômica (CEPEA, 2018).



Finalmente, no que diz respeito aos anfíbios que serviram de fonte para a coleta e/ou síntese de peptídeos antimicrobianos, percebe-se que 94,8% das espécies estudadas pertencem à ordem Anura, enquanto que 5,2% pertencem à ordem Caudata. Essa discrepância é esperada, uma vez que, das 7.993 espécies de anfíbios, 88% estão na ordem Anura e 9% na ordem Caudata (FROST 2019).

Dentro da ordem Anura, as famílias Ranidae e Hylidae são as mais estudadas, com 40,0% e 23,8%, respectivamente. No entanto, não há correlação entre o número de espécies estudadas em cada família e o número de espécies de cada família, como pode ser visto na tabela IV. Pode-se observar que a família Strabomantidae, a segunda mais numerosa, que concentra quase 10% de todas as espécies de anuros, é uma das últimas em número de estudos, com apenas 0,5% de participação nos trabalhos publicados. Michrohylidae, a terceira família mais numerosa (9,32% das espécies de anuros estão categorizadas nesta família), sequer aparece nos levantamentos, apesar de ser amplamente distribuída geograficamente nas Américas, África, Ásia e Oceania. A explicação está na biologia dos animais desse grupo. Normalmente por terem reprodução explosiva eles aparecem rapidamente no início da estação chuvosa e depois só no próximo ano. Diferente das famílias mais estudadas.

**Tabela IV.** Comparação entre o número de espécies de cada família da ordem Anura estudados em relação ao número de indivíduos relatados em cada família, de acordo com <https://amphibiaweb.org/lists/index.shtml>. Os números entre parênteses indicam a posição da família na escala analisada.

<b>Família</b>	<b>% de participação nos trabalhos publicados</b>	<b>% de espécies encontradas na família</b>
Ranidae	40,0 (1°)	5,76 (6°)
Hylidae	23,8 (2°)	14,11 (1°)
Craugastoridae	5,9 (3°)	1,76 (17°)

Pipidae	5,9 (3°)	0,58 (27°)
Dendrobatidae	4,3 (4°)	4,54 (7°)
Leptodactylidae	4,3 (4°)	3,02 (12°)
Bufo	3,2 (5°)	8,75 (4°)
Hemiphractidae	2,2 (6°)	1,67 (18°)
Myobatrachidae	2,2 (6°)	1,90 (16°)
Bombinatoridae	1,6 (7°)	0,14 (38°)
Centrolenidae	1,6 (7°)	2,25 (14°)
Alytidae	1,1 (8°)	0,16 (37°)
Hyperoliidae	1,1 (8°)	3,29 (8°)
Rhacophoridae	1,1 (8°)	6,04 (5°)
Dicroglossidae	0,5 (9°)	2,99 (13°)
Strabomantidae	0,5 (9°)	9,88 (2°)
Telmatobiidae	0,5 (9°)	0,88 (23°)

Na ordem Caudata, observa-se o mesmo fenômeno (tabela V), isto é, não há correlação entre o número de espécies estudadas e o número de espécies encontradas nas famílias. A terceira família mais numerosa, Hynobiidae, com quase 11% das espécies da ordem Caudata, não aparece em nenhum estudo. Assim como dito para a ordem Anura, não encontramos uma explicação para essa discrepância.

**Tabela V.** Comparação entre o número de espécies de cada família da ordem Caudata estudados em relação ao número de indivíduos relatados em cada família, de acordo com <https://amphibiaweb.org/lists/index.shtml>. Os números entre parênteses indicam a posição da família na escala analisada.

<b>Família</b>	<b>% de participação nos trabalhos publicados</b>	<b>% de espécies encontradas na família</b>
Salamandridae	36,4 (1°)	16,3 (2°)
Cryptobranchidae	27,3 (2°)	0,4 (8°)
Plethodontidae	18,2 (3°)	65,0 (1°)

Ambystomatidae	9,1 (4°)	4,4 (4°)
Amphiumidae	9,1 (4°)	0,4 (8°)

A União Internacional para Conservação da Natureza (*International Union for Conservation of Nature*, IUCN) categoriza o status de conservação de espécies em oito níveis (IUCN, 2019) agrupados de acordo com suas diretrizes como mostra a tabela VI.

**Tabela VI.** Status de conservação e critérios para classificação, segundo a IUCN.

Status	Crítérios
Não avaliado	O táxon não passou por nenhum tipo de avaliação
Deficiente de dados	O táxon não possui informação adequada para fazer uma avaliação direta ou indireta de seu risco de extinção com base em sua distribuição e / ou status da população. Um táxon nesta categoria pode ser bem estudado, e sua biologia é bem conhecida, mas dados apropriados sobre abundância e / ou distribuição estão faltando.
Pouco preocupante	O táxon pode ser bem estudado, e os dados a respeito de sua abundância e distribuição são conhecidos, e não representam perigo para a existência do táxon.
Quase ameaçada	O táxon não se qualifica para Criticamente em Perigo, Ameaçado ou Vulnerável agora, mas está perto de se qualificar para ou é provável que se qualifique para uma categoria ameaçada no futuro próximo.
Vulnerável	O táxon encontra-se em alto risco de extinção na natureza, baseados nos critérios apresentados nas diretrizes da IUCN.
Em perigo	O táxon encontra-se em muito alto risco de extinção na natureza, baseados nos critérios apresentados nas diretrizes da IUCN.
Criticamente em perigo	O táxon encontra-se em extremo risco de extinção na natureza, baseados nos critérios apresentados nas diretrizes da IUCN.
Extinto na natureza	O táxon apresenta populações apenas em cultivo ou

cativeiro

Extinto

Não há dúvida razoável de que o último indivíduo do táxon morreu. Um táxon é considerado extinto quando levantamentos exaustivos em habitat conhecido e / ou esperado, em épocas apropriadas (diurnas, sazonais, anuais), ao longo de sua área histórica falharam em registrar um indivíduo.

Dentre essas categorias, a IUCN considera ameaçadas as espécies classificadas como “Vulnerável”, “Em perigo” e “Criticamente em perigo”. Assim, analisando a tabela II, percebe-se que 16,5% das espécies estão categorizadas como ameaçadas de extinção, e 5,7% das espécies não tem dados suficientes para se permitir uma análise.

Quando os status de conservação são categorizados por continente (tabela VII), pode-se observar que a América do Sul e Ásia são os continentes que mais se ressentem da falta de dados a respeito do status de conservação das espécies de anfíbios fontes de peptídeos antimicrobianos, uma vez que, somando-se as classificações “Deficientes de dados” e “Não avaliados”, ambos os continentes apresentam 15,8% e 12,5%, respectivamente, acima do que é encontrado mundialmente, que é 9,8%.

Américas Central e do Sul, além da Ásia, apresentam, proporcionalmente, mais espécies no status “Criticamente em perigo” do que a média mundial: 11,1%, 3,5% e 3,6%, contra 2,6%, respectivamente. África e, novamente, América Central, também apresentam mais espécies categorizadas como “Em perigo”, quando comparadas à média mundial: 14,3% e 7,4%, contra 6,7%, respectivamente. Quando se analisa o status “Vulnerável”, América do Norte e Ásia apresentam, proporcionalmente, mais espécies nessa condição do que a média mundial: 9,7% e 10,7% contra 7,2%.

Estes resultados mostram que há necessidade de mais estudos para aquisição de conhecimentos nas espécies que habitam a América do Sul e Ásia. O continente americano como um todo, assim como a Ásia e África possuem muitas espécies categorizadas como ameaçadas de extinção na natureza, o que é preocupante.

**Tabela VII.** Classificação de conservação, segundo os critérios da IUCN, das espécies de anfíbios avaliadas entre 1991 e 2018, categorizadas por continente. Números em vermelho indicam que a % de espécies naquela categoria é superior à % de espécies nesta categoria no mundo. Números em azul indicam que a % de espécies naquela categoria é inferior à % de espécies na mesma categoria no mundo.

Classificação	% de espécies						
	Mundo	África	América			Ásia	Oceania
			do Norte	Central	do Sul		
Pouco preocupante	67,5	78,6	61,3	77,8	68,4	57,1	83,3
Vulnerável	7,2	0,0	9,7	3,7	7,0	10,7	5,6
Em perigo	6,7	14,3	6,5	7,4	5,3	5,4	5,6
Quase ameaçada	6,2	0,0	19,4	0,0	0,0	10,7	0,0
Deficiente de dados	5,7	7,1	0,0	0,0	10,5	7,1	0,0
Não avaliado	4,1	0,0	3,2	0,0	5,3	5,4	5,6
Criticamente em perigo	2,6	0,0	0,0	11,1	3,5	3,6	0,0

O número de espécies ameaçadas de extinção ultrapassa largamente recursos de conservação disponíveis e a situação parece piorar (MAYERS, 2000). Ainda, tendo em vista que os ecossistemas fornecem o sistema de suporte de vida do nosso planeta, e que estes ecossistemas tem passado, nas últimas décadas, por uma significativa degradação de seus produtos e serviços (KUBISZEWSKI 2017) devido a ocupação humana, poluição, expansão da agricultura e mudanças climáticas, aumentando o risco de extinção das espécies (BELLART, 2007), os dados mostrados na tabela II são preocupantes.

Dentre as características em que se destacam os anfíbios, pode-se citar uma epiderme altamente desenvolvida e especializada para auxiliar na respiração, processos metabólicos, fisiológicos e proteção contra predação e patógenos (HADDAD 2008; POUGH 2008). Fazem parte da imunidade inata um aparato de glândulas dispersas pelo

corpo que produz secreção cutânea com um vasto leque de moléculas bioativos e efeito sinérgico (COLLON, M. 2011; VERLY et al., 2010) Diversas pesquisas mostra o uso dessas moléculas no desenvolvimento de medicamentos e o uso altamente promissor em pesquisas com atividade anticancerígena, antiviral, antifúngica e antimicrobiana (RAAYMAKERSA et al., 2018; NETO et al., 2012; BARNHART et al., 2017).

Diante disso o interesse em serviços ecossistêmicos nas comunidades de pesquisa e políticas públicas cresce rapidamente nos últimos anos, uma vez que levantamentos que datam de 2011 mostram que os valores atribuídos aos serviços de ecossistemas giram na casa dos US\$ 130 trilhões por ano (KUBISZEWSKI et al., 2017; CONSTANZA et al., 2014; BALMFORD et al., 2002). Compreender a importância destes compostos bioativos é crucial para proteção e conservação desta classe valorizando os ecossistemas e os bens e serviços que eles fornecem os anfíbios são especialmente sensíveis à mudanças ambientais, e seu desaparecimento pode levar consigo milhares de moléculas com potencial interesse biotecnológico, com consideráveis impactos tanto do ponto de vista biológico quanto do ponto de vista econômico (CONSTANZA et al., 2014; SOUSA et al., 2017) requer ações rápidas para sua conservação.

## **5. Considerações finais**

Neste trabalho pôde-se considerar que o número de publicações na área de peptídeos antimicrobianos de anfíbios aumentou consideravelmente na segunda década do século XXI. Estes trabalhos foram realizados, em sua maioria por grupos europeus, asiáticos e norte americanos, muito embora os animais estudados estejam presentes majoritariamente na América do Sul, Ásia e América Central. Isso enseja preocupação quanto a um possível efeito de biopirataria deste patrimônio natural.

A síntese de peptídeos em fase sólida, aliada a estratégias de purificação como a cromatografia líquida de alta resolução, técnicas de resolução de estrutura de proteínas como o dicroísmo circular e a ressonância magnética nuclear, bem como o suporte de estudos *in silico* parecem representar o futuro dos estudos envolvendo peptídeos antimicrobianos de anfíbios. Há a necessidade de uma maior cuidado com a interpretação de resultados da atividade antimicrobiana dos peptídeos antimicrobianos de anfíbios, pois há diversos autores apontando essas limitações, que parecem favorecer a atividade antimicrobiana. Em seu lugar, diversos autores sugerem estratégias como permeabilização de vesículas e técnicas calorimétricas. Há carência de estudos com

microrganismos fitopatógenos e com importância ecológica ou agroindustrial, o que representa um nicho importante para os pesquisadores brasileiros. A maior parte dos estudos com microrganismos concentra-se em microrganismos patogênicos para seres humanos, incluindo bactérias resistentes a antibióticos de primeira escolha.

As famílias mais estudadas não são necessariamente as mais numerosas dentro das Ordens Anura e Caudata. A maior parte das espécies não se encontra ameaçada de extinção, mas mais de 16% das espécies está ameaçada de extinção e mais de 5% não possuem informações suficientes. Esses fatos ensejam preocupação, uma vez que a perda de biodiversidade implica na perda de um importante repositório de biomoléculas ativas.

## 6. Referências bibliográficas

ABSCH. The access and benefit-sharing clearing-house. Disponível em: <https://absch.cbd.int/countries>. Acesso em 18 de março de 2019.

ARIAS, Mauricio et al. Calorimetry Methods to Study Membrane Interactions and Perturbations Induced by Antimicrobial Host Defense Peptides. In: **Antimicrobial Peptides**. Humana Press, New York, NY. p. 119-140. 2017.

ALMEIDA, P. R. **Toxicidade aguda (lc50) e efeitos comportamentais e morfológicos do formulado comercial roundup original® em girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae) e *Rhinella icterica* (Anura, Bufonidae)**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) -Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, f.95, 2014.

AMPHIBIAWEB. Disponível em: <https://amphibiaweb.org/>, Acesso em 18 de março de 2019.

BARNHART, K. Identification of Bufadienolides from the Boreal Toad, *Anaxyrus boreas*, Active Against a Fungal Pathogen. *Microb Ecol*, 74(4):990-1000. 2017.

BALMFORD, A. et al., Economic Reasons for Conserving Wild Nature. *SCIENCE*, v. 297. 2002.

BELGUESMIA, Y. et al. Resistance to Antibiotics and Antimicrobial Peptides: A Need of Novel Technology to Tackle This Phenomenon. In: **Functionalized Nanomaterials for the Management of Microbial Infection**. Elsevier. p. 1-22. 2017.

BERNADE, P. S. Anfíbio e repetéis: introdução ao estudo da hepertofauna brasileira. Curitiba, Anolisbooks, 2012. 320 p. :il. ISBN: 978856522004. 2012.

BUCK, Matthias; HAMILTON, Clare. The Nagoya Protocol on access to genetic resources and the fair and equitable sharing of benefits arising from their utilization to the Convention on Biological Diversity. **Review of European Community & International Environmental Law**, v. 20, n. 1, p. 47-61, 2011.

BRASIL. Senado Federal. (2016) Promulgada Emenda Constitucional do Teto de Gastos Públicos. Disponível em <https://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2016/12/15/promulgada-emenda-constitucional-do-teto-de-gastos>. Acesso em 18 de março de 2019.

BRASIL. Fundação CAPES (2018). O orçamento de 2019 e a incerteza do investimento na educação pública. Disponível em: <http://www.capes.gov.br/sala-de-imprensa/noticias/8954-o-orcamento-de-2019-e-a-incerteza-do-investimento-na-educacao-publica>. Acesso em 18 de março de 2019.

BRASIL. CNPq (2015). Séries históricas até 2015. Disponível em: <http://cnpq.br/series-historicas/>. Acesso em 18 de março de 2019.

BRANDENBURG, L-O, *et al.* Antimicrobial Peptides: Multifunctional Drugs for Different Applications. **Polymers**, n. 4, p. 539-560; Review, 2012.

BROWN, Angus R. et al. Solid phase synthesis. **Synlett**, v. 1998, n. 08, p. 817-827, 1998.

CASSEL, Gustav. Abnormal deviations in international exchanges. **The Economic Journal**, v. 28, n. 112, p. 413-415, 1918.



CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. PIB do agronegócio brasileiro. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>. Acesso em 18 de março de 2019.

CESPEDES, G.F. *et al.* Mechanism of action and relationship between structure and biological activity of Ctx-Ha: a new ceratotoxin-like peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3004-3010, 2012.

COBEY, Kelly D. *et al.* What is a predatory journal? A scoping review. **F1000Research**, v. 7, 2018.

COLLON, M. J. Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. *Cell. Mol. Life Sci.* 68:2303–2315. 2011

COSTANZA, R. *et al.* Changes in the global value of ecosystem services. **Global Environmental Change**, v. 26, p. 152-158, 2014

CULLEN, T. W. *et al.* Antimicrobial peptide resistance mediates resilience of prominent gut commensals during inflammation. **Science**, v. 347, n. 6218, p. 170-175, 2015.

CUNNINGHAM, A. A. Infectious disease threats to amphibian conservation. In: **The Glasgow Naturalist**. Glasgow Natural History Society, 2018.

CRUZ e CARVALHO, A. *et al.* Cytotoxic Activity and Antiproliferative Effects of Crude Skin Secretion from *Physalaemus nattereri* (Anura: Leptodactylidae) on in vitro Melanoma Cells. *Toxins*, v. 7, p. 3989-4005, 2015.

CRUZ, J. *et al.* Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic microorganisms. **Current medicinal chemistry**, v. 21, n. 20, p. 2299-2321, 2014.

DAVIS K. *et al.* Implementation of the Nagoya Protocol on Access and Benefit Sharing: Dialogue between Brazil and the European Union (2016). Disponível em:

[https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/mmaa0019\\_ingles\\_web.pdf](https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/mmaa0019_ingles_web.pdf). Acesso em 18 de março de 2019.

DENNISON, Sarah R. et al. Anticancer  $\alpha$ -helical peptides and structure/function relationships underpinning their interactions with tumour cell membranes. **Current Protein and Peptide Science**, v. 7, n. 6, p. 487-499, 2006.

DE NEGRI, Fernanda; RAUEN, Andre Tortato. Innovation policies in Brazil during the 2000s: the need for new paths. 2018.

ERDÖS, Ervin G. The discovery of captopril: reply. **The FASEB journal**, v. 18, n. 2, p. 226-226, 2004.

EVANS, Brian C. et al. Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 73, 2013.

FASMAN, Gerald D. (Ed.). **Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules**. Springer Science & Business Media, 2013.

FROST, D.R 2019. Amphibian species of the world: na oline reference. Version 6.0. Eletronic database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.php//Amphibia> / **American Natural History**, New York, USA (ultimo acesso em 08/01/2019).

GARRITY, Liam F.; ORDAL, George W. Chemotaxis in *Bacillus subtilis*: how bacteria monitor environmental signals. **Pharmacology & therapeutics**, v. 68, n. 1, p. 87-104, 1995.

GANNON, Frank. The essential role of peer review. **EMBO reports**, v. 2, n. 9, p. 743-743, 2001.

GAUTHIER, Jeff et al. A brief history of bioinformatics. **Brief Bioinform**, p. 1-16, 2018.

GAVRAS, Haralambos. The discovery of captopril: reply. **The FASEB journal**, v. 18, n. 2, p. 225-225, 2004.

GONZÁLEZ, A. *et al.* O uso de vertebrados selvagens em medicina etnoveterinária espanhola contemporânea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 191, p. 135-151, 2016.

GUSMÃO, K. A. G. *et al.* Ocellatin peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus labyrinthicus* (Leptodactylidae): characterization, antimicrobial activities and membrane interactions. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v.23, n. 4, p. 2-14, 2017.

HADDAD, C. F. B.; GIOVANELLI, J. G. R.; ALEXANDRINO, J. O aquecimento global e seus efeitos na distribuição e declínio dos anfíbios. **Biologia e Mudanças Climáticas no Brasil**. 1 ed. São Carlos SP: Rima Editora. p. 195-206, 2008.

HARRIS, D. Análise química quantitativa. 8ª edição, c. 22. Rio de Janeiro. 2016.

HUANG, LI. *et al.*, Comparative transcriptome analyses of seven anurans reveal functions and adaptations of amphibian skin. **Scientific reports**. 2016.

IUCN. Disponível em: <http://www.iucn-csg.org/index.php/red-list-categories/>. Acesso em 18 de março de 2019.

JOO, Hwang-Soo *et al.* Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1695, p. 20150292, 2016.

KELLY, Jacalyn *et al.* Peer review in scientific publications: benefits, critiques, & a survival guide. **EJIFCC**, v. 25, n. 3, p. 227, 2014.

KING, D. S. *et al.* A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. **International journal of peptide and protein research**, v. 36, n. 3, p. 255, 1990.

KOSCH, T. A. et al. Genetic potential for disease resistance in critically endangered amphibians decimated by chytridiomycosis. **Animal Conservation**, 2018.

KURODA, Yutaka et al. All-atom molecular dynamics analysis of multi-peptide systems reproduces peptide solubility in line with experimental observations. **Scientific reports**, v. 6, p. 19479, 2016.

KUBISZEWSKI, I. et al., The future value of ecosystem services: Global scenarios and national implications. *Ecosystem Services*, 2212-0416. 2017

.LAITMAN, C. J.; RIKKERS, L. F. Politics in surgical publishing. **British Journal of Surgery**, v. 87, n. 10, p. 1284-1286, 2000.

LARIVE, Cynthia K. et al. Quantitative analysis of peptides with NMR spectroscopy. **Applied spectroscopy**, v. 51, n. 10, p. 1531-1536, 1997.

LARSEN, Peder; VON INS, Markus. The rate of growth in scientific publication and the decline in coverage provided by Science Citation Index. **Scientometrics**, v. 84, n. 3, p. 575-603, 2010.

LEYDESDORFF, Loet; MILOJEVIĆ, Staša. *Scientometrics*. **arXiv preprint arXiv:1208.4566**, 2012.

LIBERIO, M. *et al.*, A secreção de pele bruta da rã de pimenta *Leptodactylus labyrinthicus* é rica em metálicas e serina peptidases. **Plos one**, n. 9, p. 6, 2014.

MALIK, U. *et al.*, In Vivo Efficacy of Anuran Trypsin Inhibitory Peptides against Staphylococcal Skin Infection and the Impact of Peptide Cyclization. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. 2015.

MYERS, N.*et al.* Biodiversity hotspots for conservation Priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-8, 2000.

MENDES, V. A. *et al.* The cutaneous secretion of the casque-headed tree frog *Corythomantis greeningi*: Biochemical characterization and some biological effects, **Toxicon**, v. 122, p. 133-141, 2016.

MERRIFIELD, Robert B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.

MIGUEL, Thiago Barros et al. A scientometric study of the order Odonata with special attention to Brazil. **International Journal of Odonatology**, v. 20, n. 1, p. 27-42, 2017.

MITCHELL, Alexander R. Bruce Merrifield and solid-phase peptide synthesis: A historical assessment. **Peptide Science**, v. 90, n. 3, p. 175-184, 2008.

MUNOZ-CAMARGO, C. *et al.*. Unveiling the Multifaceted Mechanisms of Antibacterial Activity of Buforin II and Frenatin 2.3S Peptides from Skin Micro-Organs of the Orinoco Lime Treefrog (*Sphaenorhynchus lacteus*). **International journal of molecular sciences**. 2018.

NABOUT, João Carlos et al. Trends and biases in global climate change literature. **Natureza & Conservação**, v. 10, n. 1, p. 45-51, 2012.

NATURE. Global scientific output doubles every nine years. Disponível em: <http://blogs.nature.com/news/2014/05/global-scientific-output-doubles-every-nine-years.html>. Acesso em 18 de março de 2019.

NETO, C. et al., Synergic effects between ocellatin-F1 and bufotenine on the inhibition of BHK-21 cellular infection by the rabies virus. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.**, 2;21:50. 2015.

NING, J. Characterization of regio- and stereo-selective sulfation of bufadienolides: exploring the mechanism and providing insight into the structure–sulfation relationship by experimentation and molecular docking analysis. **Royal Society of Chemistry Advances**, n. 6, p. 5774, 2016.

OLSON, Deanna H. et al. Mapping the global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56802, 2013.

PAULA, A. **Estrutura e dinâmica de uma comunidade de anuros no hotspot de biodiversidade do cerrado**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, f. 70, 2012

PEARSON, C. Seth et al. Combined bioinformatic and rational design approach to develop antimicrobial peptides against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 2757-2764, 2016.

PINHEIRO-MACHADO, R.; DE OLIVEIRA, P. L. The Brazilian investment in science and technology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 12, p. 1521-1530, 2001.

PINTO, E. G; FELIPE, A. C; NADALETTO, D; RALL, V. L. M; MARTINEZ M. Investigação da atividade antimicrobiana do veneno de *Rhinella icterica* (*Amphibia, Anura*). **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impresso)**, v.68, n.3, p.471-475, 2009.

POUGH, H. et al., A vida dos vertebrados. [coordenação editorial da edição brasileira Ana Maria de Souza; tradutores Ana Maria de Souza, Paulo Auricchio]. 4. Ed, São Paulo: Atheneu Editora, ISBN: 978-85-7454-095-555. 2008.

RAAYMAKERSA,C. et al,. The anuran skin peptide bradykinin mediates its own absorption across epithelial barriers of the digestive tract. **Peptides**.103:84-89. 2018.

REINACH, Fernando. Darwin e a prática da " Salami Science". **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 4, p. 402-403, 2013.

REZANSOFF, A. J. et al. Interactions of the antimicrobial peptide Ac-FRWWHR-NH<sub>2</sub> with model membrane systems and bacterial cells. **The Journal of peptide research**, v. 65, n. 5, p. 491-501, 2005.

RODRÍGUEZ, C. *et al.* Toxins and pharmacologically active compounds from species of the family Bufonidae (Amphibia, Anura). **Journal of Ethnopharmacology**, n. 198, p. 235–254, 2017.

SAMGINA, T. Y. *et al.* Proteolytic degradation and deactivation of amphibian skin peptides obtained by electrical stimulation of their dorsal glands. **Anal bioanalchem**, v. 408, n. 14, p. 3761-8, 2016.

SIANO, A. *et al.* A Comparative Study of the Biological Activity of Skin and Granular Gland Secretions of *Leptodactylus latrans* and *Hypsiboas pulchellus* from Argentina. **Records of Natural Products** 8:2, 128-135. 2014.

SOUZA, L. Q. *et al.* Bufadienolides from amphibians: A promising source of anticancer prototypes for radical innovation, apoptosis triggering and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibition. **Toxicon**, v.127, p. 63-76. 2017.

SBPC – Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. Mesmo com ajuste, orçamento para C&T em 2018 continua menor que 2017. Disponível em: <http://portal.sbpnet.org.br/noticias/mesmo-com-ajuste-orcamento-para-ct-em-2018-continua-menor-que-2017/>. Acesso em 18 de março de 2019.

SMITH, Charles G.; VANE, John R. The discovery of captopril. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 8, p. 788-789, 2003.

SPINELLA, Sara A. *et al.* Measuring peptide translocation into large unilamellar vesicles. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 59, 2012.

STRÁNER, Pál *et al.* Bacterial expression and/or solid phase peptide synthesis of 20-40 amino acid long polypeptides and miniproteins, the case study of Class B GPCR ligands. **Current Protein and Peptide Science**, v. 17, n. 2, p. 147-155, 2016.

TORRENT, Marc *et al.* Discovering new in silico tools for antimicrobial peptide prediction. **Current drug targets**, v. 13, n. 9, p. 1148-1157, 2012.

TYSZKA, J. Michael et al. Magnetic resonance microscopy: recent advances and applications. **Current opinion in biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 93-99, 2005.

UNESCO. Disponível em: <http://uis.unesco.org/apps/visualisations/research-and-development-spending/>. Acesso em 18 de março de 2019.

UNGER, Klaus K. et al. Liquid chromatography—its development and key role in life science applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 13, p. 2300-2312, 2010.

VALDUJO, P. H. *et al.* Anuran species composition and distribution patterns in Brazilian Cerrado, a neotropical hotspot. **South American Journal of Herpetology**, v. 7, n. 2, p. 63-78, 2012

VERLY, R. M. **Peptídeos antimicrobianos: síntese, ensaios biológicos, estudos termodinâmicos e análise estrutural por RMN em meios biomiméticos**. Tese (Doutorado em Ciências)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, f. 182, 2010.

VOORWALD, Herman Jacobus C. The importance of research for progress. **Journal of Aerospace Technology and Management**, v. 2, n. 1, p. 7-8, 2010.

ZHANG, Ling-juan; GALLO, Richard L. Antimicrobial peptides. **Current Biology**, v. 26, n. 1, p. R14-R19, 2016.

ZHANG, P. *et al.* Quality Evaluation of Traditional Chinese Drug Toad Venom from Different Origins through a Simultaneous Determination of Bufogenins and Indole Alkaloids by HPLC. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 12, p. 1582-1586, 2005.



WIMLEY, William C.; HRISTOVA, Kalina. Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. **The Journal of membrane biology**, v. 239, n. 1-2, p. 27-34, 2011.

WORLD DATA CENTRE FOR MICRORGANISMS – WDCM Reference Strain Catalogue. Disponível em: <http://refs.wdcm.org/home.htm>. Acesso em 18 de março de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial Resistance. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em 18 de março de 2019.

WU, Xiaozhe et al. In vitro and in vivo activities of antimicrobial peptides developed using an amino acid-based activity prediction method. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5342-5349, 2014.

## CONCLUSÃO GERAL

Os anfíbios são um grupo importante para sociedade como demonstrado aqui com os nossos resultados essa mega diversidade presta varios serviços ecossitemicos. Ameaças à existência deste grupo surgem devido a mudanças no seu habitat, principalmente causadas por poluição, crescimento urbano, mudanças climáticas, doença infecciosa dentre outros fatores que levam milhares de espécies ao risco iminente de extinção. Situação que requer a atenção de todos para a conservação do grupo evitando assim o declínio global. Além de sua importância ecológica, os anfíbios são um repositório importante de moléculas bioativas, especialmente peptídeos antimicrobianos, que resultam em importantes serviços ecossistêmicos prestados aos seres humanos.

## **7. Anexos**

**Tabela I.** Principais alvos de peptídeos antimicrobianos de anfíbios estudados entre 1991 e 2018.

<b>Alvo do peptídeo antimicrobiano</b>	<b>Principal atividade</b>
<i>Acetobacter calcoaceticus</i>	Bactéria Gram-negativa, causa infecções oportunistas
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	Micoplasma, contaminante de meios de cultura
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Bactéria Gram-positiva, pode causar infecções oportunistas
<i>Acinetobacter junii</i>	Bactéria Gram-positiva, pode causar infecções oportunistas
<i>Aerococcus viridans</i>	Bactéria Gram-positiva, causa infecções em artrópodos marinhos e tem importância biotecnológica
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Bactéria Gram-negativa, causadora de fascíte necrosante
<i>Aeromonas sobria</i>	Bactéria Gram-negativa, pode causar infecções oportunistas
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Bactéria Gram-negativa, fitopatógeno e com importância biotecnológica
<i>Arthroderma simii</i>	Fungo causador de micose em animais
<i>Aspergillus flavus</i>	Fungo que infesta grãos, produz aflatoxina
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fungo causador de pneumonia em imunodeprimidos
<i>Aspergillus niger</i>	Fungo causador do mofo preto em alimentos
<i>Bacillus cereus</i>	Bactéria Gram-positiva, causa infecções alimentares e tem importância industrial
<i>Bacillus licheniformis</i>	Bactéria Gram-positiva, tem importância biotecnológica
<i>Bacillus megaterium</i>	Bactéria Gram-positiva, solubiliza fosfato no solo
<i>Bacillus pumilus</i>	Bactéria Gram-positiva, tem importância industrial
<i>Bacillus subtilis</i>	Bactéria Gram-positiva não patogênica
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Fungo causador de infecções cutâneas em anfíbios
<i>Botrytis cinerea</i>	Fungo causador do mofo preto em alimentos
<i>Candida albicans</i>	Fungo causador de infecções orais e vaginais em animais
<i>Candida glabrata</i>	Fungo causador de infecções orais e vaginais em animais
<i>Candida guilliermondii</i>	Fungo causador de infecções orais e vaginais em animais
<i>Candida krusei</i>	Fungo causador de infecções orais e vaginais em animais
<i>Candida parapsilosis</i>	Fungo causador de infecções orais e vaginais em animais
<i>Candida tropicalis</i>	Fungo causador de infecções orais e vaginais em animais

<i>Chryseobacterium indologenes</i>	Bactéria Gram-negativa, causa infecções em sapos e humanos
<i>Citrobacter freundii</i>	Bactéria Gram-negativa, pode causar infecções oportunistas
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Bactéria Gram-positiva, tem importância industrial
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Fungo causador de pneumonia e meningite
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Bactéria Gram-negativa, pode causar infecções oportunistas
<i>Enterobacter cloacae</i>	Bactéria Gram-negativa, geralmente não patogênica, mas pode causar intoxicações
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bactéria Gram-positiva, pode causar infecções oportunistas
<i>Enterococcus faecium</i>	Bactéria Gram-positiva, pode causar infecções oportunistas
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Fungo causador de micoses em animais
<i>Escherichia coli</i>	Bactéria Gram-negativa, geralmente não patogênica, mas pode causar intoxicações
<i>Escherichia coli</i> EBSL	Bactéria Gram-negativa, geralmente não patogênica, mas pode causar intoxicações. Produtora de beta-lactamase
<i>Fungo mucilaginoso</i>	Fungo mucilaginoso, tem importância ecológica
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Bactéria Gram-negativa, causadora de doenças periodontais
<i>Helicobacter pylori</i>	Bactéria Gram-negativa, causa infecções estomacais
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Bactéria Gram-negativa, pode causar infecções hospitalares
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bactéria Gram-negativa, pode causar infecções hospitalares
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Bactéria Gram-positiva, tem importância biotecnológica, industrial e probiótica
<i>Lactococcus lactis</i>	Bactéria Gram-positiva, tem importância industrial
<i>Leishmania amazonensis</i>	Protozoário causador da leishmaniose tegumentar
<i>Leishmania braziliensis</i>	Protozoário causador da leishmaniose tegumentar
<i>Leishmania infantum</i>	Protozoário causador da leishmaniose visceral
<i>Leishmania major</i>	Protozoário causador da leishmaniose tegumentar
<i>Leishmania tropica</i>	Protozoário causador da leishmaniose tegumentar
<i>Leuconostoc lactis</i>	Bactéria Gram-positiva, causa infecções alimentares e tem importância industrial
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Bactéria Gram-positiva, causa infecções alimentares e tem importância industrial
<i>Listeria innocua</i>	Bactéria Gram-positiva, pode causar infecções oportunistas
<i>Listeria ivanovii</i>	Bactéria Gram-positiva, causa infecções graves

<i>Micrococcus luteus</i>	Bactéria Gram-positiva, causa infecções em pacientes imunodeprimidos
<i>Microsporium gypseum</i>	Fungo causador de micoses em animais
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Bactéria que possui características tanto de Gram-positiva quanto Gram-negativa, causadora da tuberculose
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Micoplasma, causadora de doenças respiratórias em aves
<i>Mycoplasma mycoides</i>	Micoplasma, causadora de doenças respiratórias em bovinos
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Bactéria Gram-negativa, causadora de gonorréia
<i>Nocardia asteroides</i>	Bactéria Gram-positiva, causa infecções na pele e pulmonares
<i>Phytophthora nicotianae</i>	Fungo fitopatógeno
<i>Plasmodium berghei</i>	Protozoário causador de malária em roedores
<i>Proteus mirabilis</i>	Bactéria Gram-negativa, pode causar infecções
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactéria Gram-negativa, pode causar infecções hospitalares
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bactéria Gram-negativa, pode causar infecções hospitalares
<i>Pseudomonas syringae</i>	Bactéria Gram-negativa, fitopatogena
<i>Pseudomonas tabaci</i>	Bactéria Gram-negativa, fitopatogena
<i>Psychrobacter faecalis</i>	Bactéria Gram-negativa, presente nas fezes de pombos.
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Fungo com importância biotecnológica
<i>Pythium sulcatum</i>	Fungo fitopatógeno
Ranavirus	Vírus, causa zoopatologias em peixes e anfíbios
<i>Rhizobium meliloti</i>	Bactéria Gram-negativa, fixadora de nitrogênio no solo
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Fungo causador do mofo preto em alimentos
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	Bactéria Gram-positiva, tem importância biotecnológica
<i>Rothia nasimurium</i>	Bactéria Gram-positiva, causa infecções oportunistas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fungo, tem importância industrial
<i>Saccharomyces pombe</i>	Fungo, tem importância biotecnológica
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Bactéria Gram-positiva, causa intoxicações alimentares
<i>Salmonella enteritidis</i>	Bactéria Gram-positiva, causa intoxicações alimentares
<i>Salmonella typhimurium</i>	Bactéria Gram-positiva, causa intoxicações alimentares

<i>Schistosoma mansoni</i>	Platelminto causador de esquistossomose
<i>Serratia marcescens</i>	Bactéria Gram-negativa, pode causar infecções hospitalares
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Bactéria Gram-negativa, ambiente marinho, importância ecológica na decomposição
<i>Shigella dysenteriae</i>	Bactéria Gram-negativa, pode causar infecções estomacais
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Bactéria Gram-negativa, fixadora de nitrogênio no solo
<i>Spiroplasma apis</i>	Micoplasma, causadora de infecções em abelhas
<i>Spiroplasma citri</i>	Micoplasma, causadora de doenças em citros
<i>Spiroplasma melliferum</i>	Micoplasma, causadora de infecções em abelhas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactéria Gram-positiva, pode causar infecções graves
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	S. aureus resistente a antibióticos da família da penicilina
<i>Staphylococcus capitis</i>	Bactéria Gram-positiva, causa infecções hospitalares
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Bactéria Gram-positiva, causa infecções hospitalares
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Bactéria Gram-positiva, causa infecções hospitalares
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Bactéria Gram-positiva, causa infecções hospitalares
<i>Staphylococcus hominis</i>	Bactéria Gram-positiva, causa infecções hospitalares
<i>Staphylococcus sciuri</i>	Bactéria Gram-positiva, causa infecções hospitalares
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Bactéria Gram-negativa, causadora de infecções hospitalares graves
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Bactéria Gram-negativa, causa infecções hospitalares
<i>Streptococcus iniae</i>	Bactéria Gram-negativa, causa infecções em animais marinhos
<i>Streptococcus mutans</i>	Bactéria Gram-positiva, causadora de cáries
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Bactéria Gram-positiva, causa pneumonia e meningite
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Bactéria Gram-positiva, causa desde faringites a escarlatina
<i>Streptococcus salivarius</i>	Bactéria Gram-positiva, causadora de infecções do trato respiratório
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Bactéria Gram-positiva, causadora da placa bacteriana nos dentes
<i>Streptococcus uberis</i>	Bactéria Gram-positiva, causa infecções hospitalares
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Fungo causador de micoses em animais
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	Protozoário causador da doença do sono do Oeste Africano

<i>Trypanosoma cruzi</i>	Protozoário causador da doença de Chagas
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Bactéria Gram-negativa, causa infecções em ouvidos
<i>Vibrio cholerae</i>	Bactéria Gram-negativa, causa o cólera
<i>Vibrio harveyi</i>	Bactéria Gram-negativa, causa infecções em animais marinhos
<i>Vibrio splendidus</i>	Bactéria Gram-negativa, causa infecções em invertebrados marinhos
<i>Vibrio vulnificus</i>	Bactéria Gram-negativa, causa infecções graves
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	Bactéria Gram-negativa, pode causar infecções oportunistas
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Bactéria Gram-negativa, causadora da pseudo-tuberculose



**Tabela II.** Espécies de anfíbios fonte de peptídeos antimicrobianos estudados entre 1991 e 2018, com suas respectivas ordens, famílias e distribuição geográfica .

<b>Espécie</b>	<b>Ordem</b>	<b>Família</b>	<b>Distribuição geográfica</b>
<i>Acris blanchardi</i>	Anura	Hylidae	América do Norte
<i>Adenomera andreae</i>	Anura	Leptodactylidae	América do Sul
<i>Agalychnis annae</i>	Anura	Hylidae	América Central
<i>Agalychnis callidryas</i>	Anura	Hylidae	América Central
<i>Agalychnis lemur</i>	Anura	Hylidae	América do Sul e Central
<i>Alytes obstetricans</i>	Anura	Alytidae	Europa
<i>Ambystoma tigrinum</i>	Caudata	Ambystomatidae	América do Norte e Central
<i>Ameerega picta</i>	Anura	Dendrobatidae	América do Sul
<i>Amolops afghanus</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Amolops granulopus</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Amolops hainanensis</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Amolops jingdongensis</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Amolops lifanensis</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Amolops loloensis</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Amolops mantzorum</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Amphiuma tridactylum</i>	Caudata	Amphiumidae	América do Norte
<i>Anaxyrus americanus</i>	Anura	Bufoidea	América do Norte
<i>Anaxyrus boreas</i>	Anura	Bufoidea	América do Norte
<i>Andrias davidianus</i>	Caudata	Cryptobranchidae	Ásia
<i>Andrias davidianus</i>	Caudata	Cryptobranchidae	Ásia
<i>Atelopus varius</i>	Anura	Bufoidea	América Central
<i>Babina pleuraden</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Boana albopunctata</i>	Anura	Hylidae	América do Sul

<i>Boana cinerascens</i>	Anura	Hylidae	América do Sul e Central
<i>Boana crepitans</i>	Anura	Hylidae	América do Sul e Central
<i>Boana gladiator</i>	Anura	Hylidae	América do Sul
<i>Boana pulchella</i>	Anura	Hylidae	América do Sul
<i>Boana punctata</i>	Anura	Hylidae	América do Sul e Central
<i>Boana punctata</i>	Anura	Hylidae	América do Sul
<i>Boana semilineata</i>	Anura	Hylidae	América do Sul
<i>Bolitoglossa colonnea</i>	Caudata	Plethodontidae	América Central
<i>Bolitoglossa schizodactyla</i>	Caudata	Plethodontidae	América Central
<i>Bombina maxima</i>	Anura	Bombinatoridae	Ásia
<i>Bombina orientalis</i>	Anura	Bombinatoridae	Ásia
<i>Bombina variegata</i>	Anura	Bombinatoridae	Europa
<i>Bryophryne cophites</i>	Anura	Leptodactylidae	América do Sul
<i>Bufo gargarizans</i>	Anura	Bufo	Ásia
<i>Bufo variabilis</i>	Anura	Bufo	Europa e Ásia
<i>Colostethus panamensis</i>	Anura	Dendrobatidae	América do Sul e Central
<i>Craugastor punctariolus</i>	Anura	Craugastoridae	América Central
<i>Cryptobranchus alleganiensis</i>	Caudata	Cryptobranchidae	América do Norte
<i>Cynops fudingensis</i>	Gymnophiona	Salamandridae	Ásia
<i>Cynops pyrrhogaster</i>	Gymnophiona	Salamandridae	Ásia
<i>Dendrobates auratus</i>	Anura	Dendrobatidae	América do Sul e Central
<i>Dendrobates auratus</i>	Anura	Dendrobatidae	América do Sul e Central
<i>Dendrobates leucomelas</i>	Anura	Dendrobatidae	América do Sul
<i>Dendrobates tinctorius</i>	Anura	Dendrobatidae	América do Sul
<i>Dendropsophus rhodopeplus</i>	Anura	Hylidae	América do Sul
<i>Engystomops freibergi</i>	Anura	Leptodactylidae	América do Sul
<i>Espadarana prosoblepon</i>	Anura	Centrolenidae	América do Sul e Central

<i>Fejervarya cancrivora</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Fejervarya limnocharis</i>	Anura	Dicroglossidae	Ásia
<i>Gastrotheca antoniihoai</i>	Anura	Hemiphractidae	América do Sul
<i>Gastrotheca excubitor</i>	Anura	Hemiphractidae	América do Sul
<i>Gastrotheca nebulanastes</i>	Anura	Hemiphractidae	América do Sul
<i>Gastrotheca testudinea</i>	Anura	Hemiphractidae	América do Sul
<i>Glandirana emeljanovi</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Glandirana rugosa</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Hyalinobatrachium bergeri</i>	Anura	Centrolenidae	América do Sul
<i>Hylarana latouchii</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Hylarana nigrovittata</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Hylarana picturata</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Hylarana spinulosa</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Hylarana taipehensis</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Hylarana temporalis</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Hylomantis lemur</i>	Anura	Hylidae	América do Sul e Central
<i>Ichthyosaura alpestris</i>	Urodela	Salamandridae	Europa
<i>Kassina maculata</i>	Anura	Hyperoliidae	África
<i>Kassina senegalensis</i>	Anura	Hyperoliidae	África
<i>Latonia nigriventer</i>	Anura	Alytidae	Ásia
<i>Leptodactylus latrans</i>	Anura	Leptodactylidae	América do Sul
<i>Leptodactylus lineatus</i>	Anura	Leptodactylidae	América do Sul e Central
<i>Leptodactylus sypfax</i>	Anura	Leptodactylidae	América do Sul
<i>Limnodynastes peronii</i>	Anura	Myobatrachidae	Oceania
<i>Limnodynastes tasmaniensis</i>	Anura	Myobatrachidae	Oceania
<i>Limnonectes fujianensis</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Limnonectes kuhlii</i>	Anura	Ranidae	Ásia

<i>Lissotriton helveticus</i>	Caudata	Salamandridae	Europa
<i>Litoria aurea</i>	Anura	Hylidae	Oceania
<i>Litoria caerulea</i>	Anura	Hylidae	Oceania
<i>Litoria chloris</i>	Anura	Hylidae	Oceania
<i>Litoria citropa</i>	Anura	Hylidae	Oceania
<i>Litoria dahlii</i>	Anura	Hylidae	Oceania
<i>Litoria ewingi</i>	Anura	Hylidae	Oceania
<i>Litoria fallax</i>	Anura	Hylidae	Oceania
<i>Litoria genimaculata</i>	Anura	Hylidae	Oceania
<i>Litoria gilleni</i>	Anura	Hylidae	Oceania
<i>Litoria infrafrrenata</i>	Anura	Hylidae	Oceania
<i>Litoria raniformis</i>	Anura	Hylidae	Oceania
<i>Litoria rubella</i>	Anura	Hylidae	Oceania
<i>Litoria serrata</i>	Anura	Hylidae	Oceania
<i>Litoria splendida</i>	Anura	Hylidae	Oceania
<i>Mixophyes fasciolatus</i>	Anura	Myobatrachidae	Oceania
<i>Nanorana parkeri</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Noblella pygmaea</i>	Anura	Craugastoridae	América do Sul
<i>Odorrana grahami</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Odorrana hainanensis</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Odorrana hosii</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Odorrana ishikawae</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Odorrana jingdongensis</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Odorrana livida</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Odorrana schmackeri</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Odorrana versabilis</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Oophaga pumilio</i>	Anura	Dendrobatidae	América Central

<i>Oreobates amarakaeri</i>	Anura	Strabomantidae	América do Sul
<i>Osteocephalus mimeticus</i>	Anura	Hylidae	América do Sul
<i>Osteocephalus taurinus</i>	Anura	Hylidae	América do Sul e Central
<i>Paa boulengeri</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Paa spinosa</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Pachymedusa dacnicolor</i>	Anura	Hylidae	América Central
<i>Pelophylax fukienensis</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Pelophylax lessonae</i>	Anura	Ranidae	Europa
<i>Pelophylax nigromaculatus</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Pelophylax nigromaculatus</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Pelophylax plancyi</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Pelophylax porosus</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Pelophylax ridibundus</i>	Anura	Ranidae	Europa
<i>Pelophylax saharicus</i>	Anura	Ranidae	África
<i>Pelophylax kl. esculentus</i>	Anura	Ranidae	Europa
<i>Phyllobates bicolor</i>	Anura	Dendrobatidae	América do Sul
<i>Phyllomedusa baltea</i>	Anura	Hylidae	América do Sul
<i>Phyllomedusa bicolor</i>	Anura	Hylidae	América do Sul
<i>Phyllomedusa burmeisteri</i>	Anura	Hylidae	América do Sul
<i>Phyllomedusa camba</i>	Anura	Hylidae	América do Sul
<i>Phyllomedusa distincta</i>	Anura	Hylidae	América do Sul
<i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	Anura	Hylidae	América do Sul
<i>Phyllomedusa oreades</i>	Anura	Hylidae	América do Sul
<i>Phyllomedusa sauvagii</i>	Anura	Hylidae	América do Sul
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	Anura	Hylidae	América do Sul
<i>Pleurodema thaul</i>	Anura	Leptodactylidae	América do Sul
<i>Polypedates puerensis</i>	Anura	Rhacophoridae	Ásia

<i>Pristimantis cruciocularis</i>	Anura	Craugastoridae	América do Sul
<i>Pristimantis danae</i>	Anura	Craugastoridae	América do Sul
<i>Pristimantis diadematus</i>	Anura	Craugastoridae	América do Sul
<i>Pristimantis lindae</i>	Anura	Craugastoridae	América do Sul
<i>Pristimantis pharangobates</i>	Anura	Craugastoridae	América do Sul
<i>Pristimantis platydactylus</i>	Anura	Craugastoridae	América do Sul
<i>Pristimantis pluvialis</i>	Anura	Craugastoridae	América do Sul
<i>Pristimantis salaputum</i>	Anura	Craugastoridae	América do Sul
<i>Pristimantis toftae</i>	Anura	Craugastoridae	América do Sul
<i>Pseudacris crucifer</i>	Anura	Hylidae	América do Norte e Central
<i>Pseudacris regilla</i>	Anura	Hylidae	América do Norte
<i>Pseudis paradoxa</i>	Anura	Hylidae	América do Sul e Central
<i>Psychophrynella usurpator</i>	Anura	Leptodactylidae	América do Sul
<i>Rana areolata</i>	Anura	Ranidae	América do Norte
<i>Rana aurora</i>	Anura	Ranidae	América do Norte
<i>Rana blairi</i>	Anura	Ranidae	América do Norte
<i>Rana boylei</i>	Anura	Ranidae	América do Norte
<i>Rana capito</i>	Anura	Ranidae	América do Norte
<i>Rana cascadae</i>	Anura	Ranidae	América do Norte
<i>Rana catesbeiana</i>	Anura	Ranidae	América do Norte
<i>Rana chensinensis</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Rana clamitans</i>	Anura	Ranidae	América do Norte
<i>Rana draytonii</i>	Anura	Ranidae	América do Norte
<i>Rana dybowskii</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Rana italica</i>	Anura	Ranidae	Europa
<i>Rana japonica</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Rana luteiventris</i>	Anura	Ranidae	América do Norte

<i>Rana muscosa</i>	Anura	Ranidae	América do Norte
<i>Rana ornativentris</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Rana palustris</i>	Anura	Ranidae	América do Norte
<i>Rana pipiens</i>	Anura	Ranidae	América do Norte
<i>Rana pretiosa</i>	Anura	Ranidae	América do Norte
<i>Rana pustulosa</i>	Anura	Ranidae	América do Norte
<i>Rana sakuraii</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Rana septentrionalis</i>	Anura	Ranidae	América do Norte
<i>Rana shuchinae</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Rana sierrae</i>	Anura	Ranidae	América do Norte
<i>Rana spectabilis</i>	Anura	Ranidae	América do Norte
<i>Rana sphenocephalus</i>	Anura	Ranidae	América do Norte
<i>Rana sylvatica</i>	Anura	Ranidae	América do Norte
<i>Rana tagoi</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Rana tarahumarae</i>	Anura	Ranidae	América do Norte e Central
<i>Rana temporaria</i>	Anura	Ranidae	Europa e Ásia
<i>Rana vaillanti</i>	Anura	Ranidae	América do Norte e Central
<i>Rana warszewitschii</i>	Anura	Ranidae	América Central
<i>Rana yavapaiensis</i>	Anura	Ranidae	América do Norte e Central
<i>Rana amurensis</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Rhinella manu</i>	Anura	Bufoiidae	América do Sul
<i>Sachatamia ilex</i>	Anura	Centrolenidae	América Central
<i>Scinax ruber</i>	Anura	Hylidae	América do Sul
<i>Sylvirana guentheri</i>	Anura	Ranidae	Ásia
<i>Telmatobius marmoratus</i>	Anura	Telmatobiidae	América do Sul
<i>Theloderma kwangsiensis</i>	Anura	Rhacophoridae	Ásia
<i>Uperoleia mjobergii</i>	Anura	Myobatrachidae	Oceania

<i>Xenopus borealis</i>	Anura	Pipidae	África
<i>Xenopus clivii</i>	Anura	Pipidae	África
<i>Xenopus fraseri</i>	Anura	Pipidae	África
<i>Xenopus gilli</i>	Anura	Pipidae	África
<i>Xenopus laevis</i>	Anura	Pipidae	África
<i>Xenopus largeni</i>	Anura	Pipidae	África
<i>Xenopus muelleri</i>	Anura	Pipidae	África
<i>Xenopus petersii</i>	Anura	Pipidae	África
<i>Xenopus pygmaeus</i>	Anura	Pipidae	África
<i>Xenopus tropicalis</i>	Anura	Pipidae	África
<i>Xenopus victorianus</i>	Anura	Pipidae	África



