

Investigação da atividade antimicrobiana do veneno de *Rhinella icterica* (Amphibia, Anura)

Research of the antimicrobial activity of the poison from *Rhinella icterica* (Amphibia, Anura)

RIALA6/1245

Érika Gracielle PINTO^{1*}, Andrea Cardador FELIPE², Daniel NADALETTO³, Vera Lúcia Mores RALL⁴, Rosângela Marques MARTINEZ⁵

*Endereço para correspondência: Laboratório de Biologia Celular, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500 CEP: 05503-900, São Paulo, Brasil, Tel: (11), e-mail: erikagp@butantan.gov.br

¹Laboratório de Biologia Celular, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil,

²Departamento de Biologia, Universidade do Sagrado Coração, Bauru, SP, Brasil

³Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP) Botucatu, SP, Brasil.

⁴Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, (UNESP) Botucatu, SP, Brasil.

⁵Departamento de Biologia, Universidade do Sagrado Coração, Bauru, SP, Brasil

Recebido: 02.06.2009 – Aceito para publicação: 03.09.2009

RESUMO

Os anfíbios apresentam dois tipos de glândulas cutâneas: as mucosas e as granulosas. As secreções produzidas nas suas glândulas de sua pele apresentam componentes químicos diversos que têm sido estudados com relação as suas atividades biológicas, com efeito anestésico, alucinógeno e até antimicrobiano. Devido à diversidade de espécies no Brasil e ainda poucos estudos dessa natureza, o presente estudo objetivou investigar a atividade antimicrobiana do veneno das glândulas parotóides do sapo *Rhinella icterica*, procedentes do Distrito de Rubião Junior, Botucatu, estado de São Paulo. Foi avaliado o efeito de diferentes concentrações do veneno sobre colônias de bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, bem como o tempo necessário para a ação antimicrobiana. Observou-se que o veneno extraído apresentou atividade antimicrobiana leve para as duas bactérias estudadas, porém com maior ação para *S. aureus*. O veneno agiu somente em concentrações maiores de 50 mg/mL, com maior eficiência na concentração de 100 mg/mL, em tempo igual ou superior a 30 minutos para *S. aureus* e a partir de 15 minutos para *E. coli*. Estes dados poderão servir de base para estudos futuros envolvendo o isolamento das substâncias do veneno que apresentaram atividade antimicrobiana e as concentrações mínimas necessárias para a referida ação.

Palavras-chave. Amphibia, Anura, ação antimicrobiana, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Rhinella icterica*.

ABSTRACT

Amphibians exhibit two types of cutaneous glands: mucous and granular. The secretion produced in their skin glands exhibit several chemical components. These substances have been studied regarding biological activity, showing anesthetic, hallucinogen and antimicrobial effects, among others. Due to the diversity of Brazilian species, and considered that only few studies assessed this issue, the present study aim to investigate the antimicrobial activity of the poison produced by the parotoid macroglands of the toad *Rhinella icterica* originated from Rubião Júnior, Botucatu, São Paulo state. We assessed the effect of different poison concentrations on *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* cultures, as well as the time required for antimicrobial action to perform. *R. icterica* poison presented weak antimicrobial activity for both bacteria considered, with a stronger effect on *S. aureus*. The poison acts in concentrations higher than 50 mg/mL, with a larger effectiveness at 100mg/mL. Time required for action was equal or superior than 30 minutes for *S. aureus* and superior than 15 minutes to *E. coli*. These data may support future studies involving the isolation of the substances conferring antimicrobial activity to the poison of *R. icterica*, as well as the minimum concentrations required for the referred action.

Key words. Amphibian, Anura, antimicrobial activity, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Rhinella icterica*.

INTRODUÇÃO

Os anfíbios são divididos em três ordens: Anura, representada pelos sapos, rãs e pererecas; Caudata, salamandras e tritões; e Gymnophiona, as cobras-cegas¹. As três ordens caracterizam-se pela presença de dois tipos de glândulas cutâneas: glândulas mucosas e as glândulas granulosas. As glândulas mucosas produzem muco, o qual controla o pH, o grau de umidade na pele, atua na termoregulação, respiração cutânea e na defesa. Já as glândulas granulosas (também chamadas de serosas ou venenosas) produzem secreções tóxicas, repelentes para várias espécies de vertebrados, e protegem contra a proliferação de micro-organismos na superfície do corpo, sendo um dos primeiros elementos de defesa dos anfíbios². O veneno produzido pelas glândulas granulosas é bem diversificado quanto aos seus componentes químicos³, incluindo aminas biogênicas, esteróides, alcalóides e peptídeos, com diferentes atividades biológicas: colinomimética, simpatomimética, anestésica, hemolítica, miotóxica, neurotóxica e antibiótica^{2,4}.

Os anfíbios são ricos em moléculas antimicrobianas, particularmente peptídios⁵. Em algumas espécies, essas moléculas estão no muco que recobre o tegumento dos anfíbios, como é o exemplo de um potente antibiótico que foi isolado da pele de *Xenopus laevis*, e que talvez tenha aplicações médicas⁶. Em *Lithobates palustris* foram encontrados 22 peptídeos com atividade antimicrobiana⁷. No sapo asiático *Bufo gargarizans* foi purificado e caracterizado um peptídeo antimicrobiano presente em seu estômago, o qual mostrou forte atividade contra uma ampla variedade de micro-organismos incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos⁵. Em *Rhinella arenarum* foi registrada atividade antimicrobiana de lecitinas construtoras da lactose da pele, que mostraram forte atividade bacteriostática contra bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *Proteus morganii*) e Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*), concluindo que as lecitinas podem suprir uma defesa eficaz contra a invasão de micróbios nesses sapos⁸.

Em anos recentes, o uso indiscriminado e sem controle médico de antibióticos fez com que cepas de bactérias resistentes a estas drogas fossem selecionadas⁷. Por isso, tornou-se necessária a descoberta constante de novos agentes fungicidas e bactericidas mais eficazes, que podem ter utilidade clínica⁹. Considerando a diversidade da fauna de anuros do Brasil e os poucos trabalhos dessa natureza, o presente estudo objetivou testar a

ação antimicrobiana do veneno de sapos da espécie *Rhinella icterica* em colônias de bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, bem como verificar o tempo mínimo para a referida ação e a concentração na qual o veneno apresenta máxima atividade antimicrobiana.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos animais

Foram coletados nove exemplares machos da espécie *Rhinella icterica*, no mês de julho de 2007, no Distrito de Rubião Júnior, município de Botucatu (SP). Os exemplares foram transferidos para o Laboratório de Zoologia da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, e mantidos em terrários para posterior extração de veneno, que foi realizada na manhã seguinte.

Extração, processamento e armazenamento do veneno

Cada uma das glândulas parotóides de cada exemplar sofreu compressão manual. O veneno projetado foi recolhido sobre um vidro transparente e plano posicionado diante da glândula. O veneno total foi recolhido do vidro por raspagem e imediatamente liofilizado conforme descrito por Nadaletto e colaboradores (2001)¹⁰. Após liofilizado, o veneno colhido (total de 2,793g) foi mantido em freezer à -70°C. Para utilização nos ensaios, o veneno foi descongelado e imediatamente macerado até transformar-se em pó.

Pesquisa da atividade antibacteriana

Os micro-organismos *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) utilizados nesse estudo foram obtidos no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu.

Técnica 1: As bactérias (*Escherichia coli* - ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* - ATCC 25923) foram semeadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Difco) e incubadas a 37°C/16-18 horas. Após esse período, as concentrações dessas bactérias foram ajustadas à escala 0,5 de McFarland (1,5 x 10⁸ UFC). Concentrações de 5 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL do veneno foram diluídas diretamente nessas culturas. Após os tempos 15, 30 e 60 minutos de contato, foram realizadas diluições seriadas decimais. 100 µl dessas diluições foram espalhados na superfície do ágar Plate Count Agar (PCA, Difco), com

o auxílio de uma alça em L, e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após período de incubação, pôde ser verificada a diminuição do número de bactérias nas placas analisadas.

Houve o controle da esterilidade do veneno pela sua sementeira em PCA, para a observação do possível crescimento de contaminantes. Como controle positivos, as bactérias foram semeadas no mesmo ágar, mas sem o contato prévio com o veneno.

Técnica 2: O veneno foi espreado com o auxílio de uma alça em L diretamente sobre placas de Petri, nas concentrações de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL. Após a absorção do veneno pelo ágar, 100 µl das bactérias, na concentração de 1,5 x 10⁸ UFC, foram espreadas na superfície e incubadas a 37°C/24h. Foi realizada contagem das colônias após 25 horas, 26 horas e 27 horas da estriagem. Após período de incubação, pode ser verificada a diminuição do número de bactérias nas placas analisadas.

Técnica 3: Essa técnica é uma modificação da técnica de antibiograma. Cada bactéria, na concentração de 1,5 x 10⁸ UFC, foi espreada com o auxílio de uma alça em L, na superfície do ágar PCA. Em cada placa, foram perfurados cinco poços nos quais foram aplicados diferentes diluições do veneno, nas concentrações de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL, diluídos em água tamponada esterilizada. Para a confecção dos poços, utilizou-se uma seringa para a aspiração do meio, deixando um orifício redondo na placa. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 horas, ao fim das quais verificou-se a presença de halo de inibição do crescimento bacteriano ao redor dos poços.

Avaliação do efeito antibacteriano

Não foi possível realizar a contagem das UFC. Portanto, realizamos uma avaliação qualitativa do efeito do veneno sobre a proliferação bacteriana. Observamos 4 níveis de inibição: (-) nenhuma inibição; (+) pouca inibição; (++) média inibição; (+++) máxima inibição.

RESULTADOS

A técnica 1 apresentou resultados satisfatórios, pois possibilitou a análise do fator tempo de exposição ao veneno e concentração do veneno na atividade antimicrobiana. Os resultados da relação entre o tempo e o efeito antimicrobiano estão sumarizados na Tabela

1. Os resultados da relação entre concentração e efeito antimicrobiano estão sumarizados na Tabela 2.

No experimento, utilizando *Escherichia coli*, o número de UFC diminuiu conforme aumentava a concentração de veneno de *Rhinella icterica*. Na concentração de 100 mg/mL, houve forte inibição bacteriana. Por outro lado, com 5 mg/mL, houve uma mínima inibição. Quanto ao tempo, utilizando-se a concentração de 100 mg/mL, houve inibição a partir dos 15 minutos (0-15). Contudo, não houve diferenças no grau de inibição entre 15 minutos e os demais tempos de exposição (30 e 60 minutos).

Em relação à *Staphylococcus aureus*, o número de UFCs diminuiu conforme aumentava a concentração de veneno. Na concentração de 100 mg/mL, o veneno apresentou maior atividade em relação as demais concentrações utilizadas. Observou-se variação quanto ao tempo de ação, pois a concentração de 100 mg/mL não apresentou efeito inibitório em 15 minutos (0-15 minutos) e sim em 30 (15-30) minutos, que se manteve constante com 60 minutos.

Para uma mesma concentração e tempo de exposição, o veneno de *Rhinella icterica* mostrou ação antimicrobiana mais eficaz em *Staphylococcus aureus* do que em *Escherichia coli*, em qualquer dos tratamentos utilizados.

Tabela 1. Efeito do veneno em relação ao tempo

Tempo (minutos)	0	15	30	60
<i>E. coli</i>	-	++	++	+++
<i>S. aureus</i>	-	-	++	+++

Legenda: (-) Nenhuma inibição; (+) pouca inibição; (++) média inibição; (+++) máxima inibição.

Tabela 2. Efeito do veneno em relação à concentração

Concentração (mg/mL)	5	25	50	100
<i>E. coli</i>	+	++	++	+++
<i>S. aureus</i>	+	++	++	+++

Legenda: (-) Nenhuma inibição; (+) pouca inibição; (++) média inibição; (+++) máxima inibição.

Na técnica 2, o veneno não inibiu o crescimento das duas espécies de bactérias em nenhum dos tratamentos aplicados, tanto com relação aos diferentes tempos (30

min às 3h) e concentrações. Portanto, o método não foi eficiente para discriminar os efeitos dos diferentes tratamentos sobre o desenvolvimento das bactérias.

Em relação ao terceiro método, o veneno não inibiu o crescimento das bactérias em nenhum dos tratamentos aplicados. Uma vez que não foram observados halos ao redor dos poços, é provável que o veneno não tenha conseguido dispersar-se dentro das poças, deste modo, não inibindo o crescimento das bactérias.

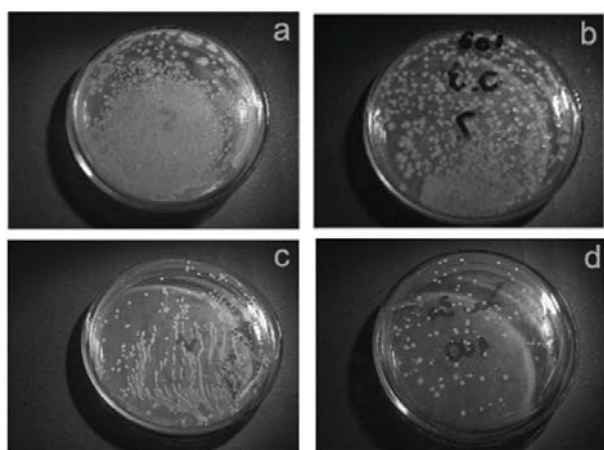


Figura 1. Fotos ilustrando diferentes concentrações do veneno e diferentes tempos de atividade antibacteriana: a) Placa de *Escherichia coli* em 30 minutos na concentração de 5 mg/mL; b) Placa de *Escherichia coli* em 60 minutos na concentração de 5 mg/mL; c) Placa de *Staphylococcus aureus* em 30 minutos na concentração de 5 mg/mL; d) Placa de *Staphylococcus aureus* em 30 minutos na concentração de 100 mg/mL.

DISCUSSÃO

O veneno bruto de *Rhinella icterica* apresentou ação antimicrobiana em concentrações maiores de 50 mg/mL para as duas bactérias e em tempo igual ou superior a 30 minutos (15 e 30 minutos) para *S. aureus* e igual ou superior à 15 minutos (0 e 15 minutos) para *E. coli*. Os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com a observação de que as secreções da pele e/ou das macroglândulas de sapos e de outros anfíbios apresentam atividades antimicrobianas. As moléculas que apresentam tal característica estão presentes na pele, glândulas mucosas, glândulas de veneno e no tecido estomacal e têm sido isoladas e estudadas em algumas espécies de anuros dos gêneros *Xenopus*, *Bombina*, *Phyllomedusa*, *Lithobates* e *Rhinella*^{5,7,11}.

Com relação ao veneno de *Rhinella*, Rieira e colaboradores⁸ demonstraram atividade antimicrobiana de lecitinas construtoras da lactose da pele de *Rhinella arenarum*, mostrando inibição de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Proteus morgani*. Foi demonstrada

atividade antibiótica de dois bufadienólídeos da pele de *Rhinella rubescens* sobre bactérias *S. aureus* e *E. coli*¹¹. Esses autores verificaram que *S. aureus* é menos suscetível do que *E. coli* à esses compostos, em oposição ao presente trabalho. É possível que a atividade antibiótica observada na secreção bruta do veneno de *Rhinella icterica* esteja relacionada à presença desses compostos, tendo em vista o alto grau de conservação de componentes do veneno entre espécies do gênero *Rhinella*¹². A pele de sapos *Rhinella* apresenta uma grande diversidade de compostos bioativos, representando importante fonte de novos fármacos. Tempone e colaboradores¹³ demonstraram que dois bufadienólídeos denominados telocinobufagina e helebrigenina, isolados de *Rhinella jimi*, apresentam potente atividade anti-*Leishmania* e anti-*T. cruzi*.

Em nossos ensaios, a maior suscetibilidade de *Staphylococcus aureus* em relação à *Escherichia coli* ao veneno de *R. icterica* pode estar relacionada ao fato de a primeira ser uma bactéria Gram-positiva enquanto a segunda é Gram-negativa. Essa efetividade diferencial entre os dois tipos de bactérias está descrita para uma série de antibióticos, como lincomicina e eritromicina, estando associada à diferenças na estrutura da parede celular e RNA ribossomal entre esses dois grupos¹⁴.

O presente trabalho demonstrou que o veneno do sapo *Rhinella icterica* possui ação antimicrobiana sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, e que essa ação é dependente da concentração e do tempo de exposição ao veneno. Estes dados poderão servir de base para estudos futuros envolvendo o isolamento das substâncias do veneno com atividade antimicrobiana e a determinação de concentrações mínimas necessárias para a referida ação. Estudos dessa natureza são fundamentais para busca de novos fármacos, os quais podem se tornar importantes armas no combate a doenças causadas por bactérias e outros micro-organismos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte de André Tempone e Ivan Prates por terem lido o texto criticamente e sugerido comentários para sua melhoria.

REFERÊNCIAS

1. Monti R, Cardello L. Bioquímica do Veneno de Anfíbios. In: Barraviera B, editor. Venenos Animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro: EPUC; 1994. p. 225-32.

2. Toledo RC, Jared C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* 1995; 111(1): 1-29.
3. Toledo RC. Breve apreciação sobre a secreção cutânea dos anfíbios. *Ciência e Cultura.* 1984; 38: 279-84.
4. Daly JW, Myers CW, Whittaker N. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the amphibia. *Toxicon.* 1987; 25(10): 1023-95.
5. Park CB, Kim MS, KIM SC. A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 218: 408-13.
6. Pough FH. Salamandras, Anuros e Cecílias. In: *A vida dos vertebrados.* São Paulo: Atheneu; 2003. p.346-55.
7. Conlon JM, Kolodziejek J, Nowotny N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potencial source of new therapeutic agents. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2004; 1696(1):1-14.
8. Rieira AS, Daud A, Gallo A, Genta S, Aybar M, Sanches S. Antibacterial activity of lactose-binding lectins from *Bufo arenarum* skin. *Biocell.* 2003; 27(1): 37-46.
9. Nascimento ACC, Zanotta LC, Kyaw CM, Schwartz ENF, Schwartz CA, Sebben A, Sousa MV, Fontes W, Castro MS. Ocellations: New antimicrobial peptides from the skin secretion of the south american frog *Leptodactylus ocellatus* (anura: Laeptodactylidae). *The Protein Journal.* 2004; 23: 501-08.
10. Nadaletto D. Avaliação da toxicidade do veneno de adultos de *Bufo ictericus* Spix, 1824, criados em cativeiro desde a fase larval e de sapos capturados no campo e mantidos em cativeiro. [tese de bacharelado] Botucatu, São Paulo: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP), 2001.
11. Cunha Filho GSA, Schwartz CA, Resck IS, Murta MM, Lemos S, Kyaw CM, Castro MS, Leite JR, Pires JROR, Block JRC, Schwartz ENF. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*. *Toxicon.* 2005; 45: 777-82.
12. Maciel NM, Schwartz CA, Junior ORP, Sebben A, Castro MS, Souza MV, Fontes W, Schwartz ENF. Composition of indolealkylamines of *Bufo rubescens* cutaneous secretions compared to six other Brazilian bufonids with phylogenetic implications. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 2003; 134: 641-49.
13. Tempone AG, Pimenta DC, Ivo L, Patrícia S, Noemi NT, Heitor FAJR, Marta MA, Calos J. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. *Toxicon.* 2008; 52: 13-21.
14. Tanaka R, Weisblum B. Systematic difference in the methylation of ribosomal ribonucleic acid from Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Jornal of Bacteriology.* 1975; 123: 771-4.