

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CÂMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP
INSTITUTO DE CIÊNCIAS NATURAIS, HUMANAS E SOCIAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

SHEILA RODRIGUES DO NASCIMENTO PELISSARI

**EXTRATO METANÓLICO DO VENENO DE *Rhinella marina*: COMPOSIÇÃO
QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E IMUNOMODULADORA**

**SINOP
MATO GROSSO - BRASIL
2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CÂMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP
INSTITUTO DE CIÊNCIAS NATURAIS, HUMANAS E SOCIAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

SHEILA RODRIGUES DO NASCIMENTO PELISSARI

**EXTRATO METANÓLICO DO VENENO DE *Rhinella marina*: COMPOSIÇÃO
QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E IMUNOMODULADORA**

Orientador: Prof. Dr. Adilson Paulo Senhorin
Co-orientadora: Profa. Dra. Lindsey Castoldi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus Universitário de Sinop, na área de concentração Bioprospecção, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Linha de pesquisa: Produtos Naturais.

SINOP
MATO GROSSO - BRASIL
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

R696e Rodrigues do Nascimento Pelissari, Sheila.
Extrato metanólico do veneno de *Rhinella marina*: composição química e atividades antioxidante e imunomoduladora / Sheila Rodrigues do Nascimento Pelissari. -- 2020
xi, 60 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Adilson Paulo Sinhorin.
Co-orientadora: Lindsey Castoldi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Sinop, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Bufonidae. 2. Estresse oxidativo. 3. Imunomodulação. 4. Secreção cutânea. 5. Glândula parotoide. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS
Avenida Alexandre Ferronato, nº 1.200 - Setor Industrial - Cep: 78557267 - Sinop/MT
Tel: 66 3531-1663/r. 206 - Email: ppgcam@ufmt.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO : "Extrato metanólico do veneno de *Rhinella marina*: composição química e atividades antioxidante e imunomoduladora"

AUTOR : Mestranda Sheila Rodrigues do Nascimento Pelissari

Dissertação defendida e aprovada em 26/02/2020.

Composição da Banca Examinadora:

Presidente Banca / Orientador	Doutor(a)	Adilson Paulo Sinhorin
Instituição :	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO	
Coorientador	Doutor(a)	Lindsey Castoldi
Instituição :	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO	
Examinador Interno	Doutor(a)	Gisele Facholi Bomfim
Instituição :	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO	
Examinador Externo	Doutor(a)	Simone Tasca Cargnin
Instituição :	Faculdade de Sinop – FASIPE	
Examinador Suplente	Doutor(a)	Valéria Dornelles Gindri Sinhorin
Instituição :	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO	

Adilson Paulo Sinhorin

Lindsey Castoldi

Gisele Facholi Bomfim

Simone Tasca Cargnin

SINOP, 26/02/2020.

Sinopse:

Estudou-se a composição química do extrato metanólico do veneno de *Rhinella marina*, através de UHPLC-MS e, atividade biológica por meio de estudo dos parâmetros do estresse oxidativo, análise histopatológica, testes de linfoproliferação das células esplênicas totais, quantificação da produção de óxido nítrico (NO[•]) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por macrófagos peritoneais e dosagem de citocinas.

Palavras-chave: Bufadienolídeos, Estresse oxidativo, Macrófagos.

DEDICATÓRIA

*Primeiramente a Deus, pois sem Ele nada sou.
Aos meus pais, minhas irmãs, meu amado Daniel, minha
princesa Alice e à família do meu esposo. Vocês são
essenciais na minha vida! E nessa trajetória, vocês
foram os meus alicerces. Por muitas vezes eu quis
desmoronar, mas, vocês acreditaram em mim, me deram
força e, não mediram esforços para que esse sonho fosse
realizado.
Amo muito todos vocês!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e se fazer tão presente em meu caminho.

A Nossa Senhora Aparecida, pela proteção e intercessão ao Seu Amado Filho.

Aos meus pais, José Ary e Neusa, por me ensinarem sobre a vida e como conduzi-la. Meus grandes exemplos e incentivadores. Minhas conquistas serão sempre para vocês.

Às minhas irmãs, Patrícia e Jéssica, por todo apoio e incentivo.

Ao meu querido marido Daniel, por me apoiar e ter sido a minha força em momentos de apreensão nesta fase.

À minha filha Alice, que mesmo tão pequenina precisa compreender as lutas diárias da vida adulta e, ainda assim, tornar a minha vida mais doce.

À minha sogra Marlete, meu sogro Ivanildo, minha cunhada Taís, meus compadres Cristiano e Ana, que acompanharam o processo e sempre me deram apoio físico e emocional.

Ao meu orientador, Adilson Sinhorin, pela orientação e todo o conhecimento compartilhado.

À minha co-orientadora, Lindsey Castoldi, por ter contribuído tanto na minha formação acadêmica quanto na minha formação como ser humano.

À professora Valéria Sinhorin, pela orientação como docente e ser um belo exemplo de mulher, mãe, profissional.

Aos amigos do LIPEQ que de alguma maneira me ajudaram no mestrado: Ana Cláudia, Ana Paula Simões, Bruna Godoy, Eloana Benassi, Jacqueline Kerkhoff, Luiz Daniel, Thaniara Costa, Wagner Bragante, Wesley Bressan.

Às amigas lindas que conheci no mestrado e que levarei para a vida: Alexia, Talita, Camila, Jaqueline que sempre me incentivaram a buscar o melhor de mim.

Às minhas grandes amigas obtidas ao longo da vida, pelas palavras de apoio e por acreditarem nos meus voos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da UFMT e todos os professores que o compõe, em especial ao Professor Leandro Denis Battirola, por ter me instruído e incentivado à fazer o mestrado.

À CAPES por conceder a bolsa de estudos e apoiar a pesquisa.

Aos demais que participaram direta ou indiretamente deste processo, deste trabalho, desta conquista.

De coração, muito obrigado à todos!

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou
o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o
que era antes”.*

(Martin Luther King)

RESUMO

O popular "sapo-cururu", cientificamente *Rhinella marina* (*R. marina*), desperta interesse por ser uma fascinante fonte de compostos bioativos. O objetivo deste trabalho foi estudar a composição química através de métodos de Cromatografia líquida de ultra-alta pressão (UHPLC) acoplado ao detector por espectrometria de massas (EM). Foi realizado ensaios experimentais para verificar as atividades imunomoduladora e antioxidante do extrato metanólico do veneno da *R. marina*. O veneno obtido dos sapos coletados foi seco e extraído com metanol. Para atividade biológica, camundongos Swiss machos foram tratados diariamente (100 µL/animal, via gavagem) com 8 µg mL⁻¹, 16 µg mL⁻¹ ou 32 µg mL⁻¹ de extrato metanólico (solução tween 0,5%) do veneno durante 7 e 30 dias. O grupo controle foi tratado com água e o grupo veículo com solução tween 0,5%. Ao final, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os macrófagos peritoneais foram obtidos para a quantificação *in vitro* de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico (NO•). O baço foi retirado para obtenção da suspensão de células esplênicas totais para realização de ensaios de linfoproliferação através do método colorimétrico utilizando MTT (3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo) e a dosagem das citocinas IL-4, IL-10, IL-12p70, TNF-α. Parte do fígado destinou-se para investigar alguns parâmetros do estresse oxidativo: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), Glutathione Reduzida (GSH), Glutathione-S-transferase (GST) e Catalase (CAT). Os órgãos (coração, fígado, rim e pulmão) foram excisados para avaliação do peso relativo, peso absoluto e análise histopatológica. Os compostos identificados foram: Adipoilarginina, Pimeloilarginina, Diidrobufotenina, Suberoilarginina, Azelailarginina, 3-(N-adipoilargininila)marinobufagina, 3-(N-pimeloilargininila)marinobufagina, 3-(N-suberoilargininila)telecinobufagina, 3-(N-suberoilargininila)marinobufagina, Telecinobufagina, Marinobufagina e 3-(N-suberoilargininila)bufalina. Não houve diferenças significativas no peso absoluto dos órgãos. Apenas o peso relativo do pulmão apresentou diferença significativa entre as doses de 8 µg mL⁻¹ e 32 µg mL⁻¹. As análises histopatológicas demonstraram presença de edemas em todos os órgãos proporcionalmente ao aumento das doses e tempo de tratamento. Além disso, o pulmão apresentou coágulos intravasculares e pequenos infiltrados leucocitários peribronquiolar. Os resultados obtidos das análises bioquímicas demonstraram um efeito bifásico da CAT e GSH somente entre as doses administradas no período de 7 dias não diferenciando do controle. O TBARS apresentou aumento no período de 30 dias na dose 32 µg mL⁻¹. O efeito imunomodulador foi observado apenas quanto a capacidade de produção de IL-12p70 e TNF-α. A menor dose apresentou resultados que sugerem melhor defesa ao organismo do animal tratado enquanto que, a maior dose, houve aumento de danos teciduais. Os compostos encontrados nas amostras do extrato metanólico do veneno são: Argininilas derivadas, esteroides cardioativos e esteroides ligados a argininilas. Nesse primeiro estudo não podemos constatar o efeito antioxidante do extrato. Observamos que o tratamento modulou a produção das citocinas nos animais e este efeito pode estar relacionado aos danos teciduais observados microscopicamente. Esse estudo constatou estímulos positivos no sistema antioxidante e imunomodulador indicando que as moléculas encontradas no extrato apresentam potencial biotecnológico e podem ser aliadas no tratamento de enfermidades que atualmente geram desafios para o mundo medicinal.

Palavras-chave: Bufonidae; Bioprospecção; Estresse Oxidativo; Imunomodulação.

ABSTRACT

The popular "cane toad", scientifically *Rhinella marina* (*R. marina*), arouses interest as it is a fascinating source of bioactive compounds. The objective of this work was to study the chemical composition using methods of ultra high pressure liquid chromatography (UHPLC) coupled to the detector by mass spectrometry (EM). Experimental tests were carried out to verify the immunomodulatory and antioxidant activities of the methanolic extract of *R. marina* venom. The poison obtained from the collected frogs was dried and extracted with methanol. For biological activity, male Swiss mice were treated daily (100 μL / animal, via gavage) with 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ or 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of methanolic extract (0.5% tween solution) of the poison for 7 and 30 days. The control group was treated with water and the vehicle group with 0.5% tween solution. At the end, the animals were euthanized by cervical dislocation. Peritoneal macrophages were obtained for the in vitro quantification of hydrogen peroxide (H_2O_2) and nitric oxide ($\text{NO}\bullet$). The spleen was removed to obtain the suspension of total splenic cells to perform lymphoproliferation assays using the colorimetric method using MTT (3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and the measurement of cytokines IL-4, IL-10, IL-12p70, TNF- α . Part of the liver was used to investigate some parameters of oxidative stress: Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS), Reduced Glutathione (GSH), Glutathione-S-transferase (GST) and Catalase (CAT). The organs (heart, liver, kidney and lung) were excised to assess relative weight, absolute weight and histopathological analysis. The identified compounds were: Adipoyl arginine, Pimeloyl arginine, Diidrobufotenin, Suberoyl arginine, Azeloyl arginine, 3-(N-adipoylargininyl)marinobufagin, 3-(N-pimeloylargininyl)marinobufagin, 3-(N-suberoylargininyl)telecinobufagin, 3-suberoylargininyl)marinobufagin, Telecinobufagin, Marinobufagin and 3-(N-suberoylargininyl)bufalin.. There were no significant differences in the absolute weight of the organs. Only the relative lung weight showed a significant difference between the doses of 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Histopathological analyzes showed the presence of edema in all organs in proportion to the increase in doses and treatment time. In addition, the lung had intravascular clots and small peribronchiolar leukocyte infiltrates. The results obtained from the biochemical analyzes demonstrated a biphasic effect of CAT and GSH only between the doses administered in the period of 7 days, not differentiating from the control. TBARS showed an increase in the period of 30 days in the dose 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The immunomodulatory effect was observed only regarding the production capacity of IL-12p70 and TNF- α . The lowest dose showed results that suggest better defense to the treated animal's organism, while the highest dose increased tissue damage. The compounds found in the samples of the methanolic extract of the poison are: Argininyl derivatives, cardioactive steroids and steroids linked to argininyls. In this first study, we cannot verify the antioxidant effect of the extract. We observed that the treatment modulated the production of cytokines in animals and this effect may be related to tissue damage observed microscopically. This study found positive stimuli in the antioxidant and immunomodulatory system, indicating that the molecules found in the extract have biotechnological potential and can be combined in the treatment of diseases that currently generate challenges for the medicinal world.

Keywords: Bufonidae; Bioprospecting; Immunomodulation; Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anuro <i>R. marina</i>	16
Figura 2. Estrutura química dos compostos presentes no extrato metanólico do veneno de <i>R. marina</i>	24
Figura 3. Cromatograma gerado pelo sistema UHPLC-EM/EM do extrato metanólico do veneno de <i>R. marina</i>	25
Figura 4. Proposta de fragmentação das argininas.....	25
Figura 5. Resultados físicos da análise histopatológica.....	29
Figura 6. Dosagem da capacidade de produção das citocinas IL-12p70 e TNF- α ..	33
Figura 7. Quantificação de H ₂ O ₂ e NO• produzidos por macrófagos peritoneais...	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados físicos experimentais e teóricos do extrato metanólico do veneno de <i>R. marina</i> por UHPLC-MS/MS e identificação dos compostos.....	26
Tabela 2. Resultados dos parâmetros do estresse oxidativo no tecido hepático de camundongos perante o tratamento com extrato metanólico do veneno de <i>R. marina</i>	31

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	12
1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1 – Coleta do veneno e preparo dos extratos	17
2.2 – Análises por Cromatografia Líquida com Detecção por Espectroscopia de Ultravioleta e por Espectrometria de Massas.....	18
2.3 – Animais e delineamento experimental.....	19
2.4 – Análise histopatológica.....	20
2.5 – Parâmetros do estresse oxidativo	20
2.6 – Ensaio Imunomoduladores	21
2.6.1 – Teste de Linfoproliferação das Células Esplênicas Totais.....	21
2.6.2 – Dosagem de Citocinas	21
2.6.3 - Obtenção dos Macrófagos Peritoneais.....	22
2.6.4 – Determinação da Liberação Espontânea de H ₂ O ₂ pelos Macrófagos	22
2.6.5 – Determinação da Produção de NO• pelos Macrófagos	23
2.7 – Análise Estatística.....	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1 Resultados da UHPLC-DAD e ESI-MS-MS	24
3.2 – Análise do peso corporal, consumo alimentar e pesos dos órgãos	28
3.3 – Análise Histopatológica	28
3.4 – Parâmetros do estresse oxidativo	30
3.5 – Ensaio imunomoduladores	32
4. CONCLUSÃO	37
5. REFERÊNCIAS	38
ANEXO 1	43
ANEXO 2	44
ANEXO 3	45

CAPÍTULO I.

EXTRATO METANÓLICO DO VENENO DE *Rhinella marina*: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E IMUNOMODULADORA

O presente manuscrito seguirá as padronizações adotadas pelo periódico *Toxicon*, no qual presente trabalho será submetido (Anexo “3”).

Extrato metanólico do veneno de *Rhinella marina*: composição química e atividades antioxidante e imunomoduladora

Sheila Rodrigues do Nascimento Pelissari^a, Valéria Dornelles Gindri Sinhorin^e, Lindsey Castoldi^c, Leonardo Gomes de Vasconcelos^d, Domingos de Jesus Rodrigues^e, Eloana Benassi de Souza Ribeiro^b, Jacqueline Kerkhoff^b, Adilson Paulo Sinhorin^e.

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal do Mato Grosso, Câmpus de Sinop.

^b Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - BIONORTE.

^c Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus de Sinop.

^d Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus de Cuiabá.

^e Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus de Sinop.

RESUMO

Neste trabalho foi estudado a composição química e atividades imunomoduladora e antioxidante do extrato metanólico do veneno da *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) (*R. marina*). O perfil químico foi analisado utilizando Cromatografia líquida de ultra-alta pressão (UHPLC) acoplado ao detector por espectrometria de massas (EM). Para a atividade biológica, camundongos Swiss machos que foram submetidos a ensaios de parâmetros do estresse oxidativo, testes de linfoproliferação das células esplênicas totais, quantificação da produção de óxido nítrico (NO•) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por macrófagos peritoneais e dosagem de citocinas. Os órgãos (pulmão, coração, rim e fígado) foram excisados para avaliação do peso relativo, peso absoluto e análise histopatológica. Nos resultados do perfil químico foram identificados os compostos: Adipoilarginina, Pimeloilarginina, Diidrobufotenina, Suberoilarginina, Azelailarginina, 3-(N-adipoilargininila)marinobufagina, 3-(N-pimeloilargininila)marinobufagina, 3-(N-suberoilargininila)telecinobufagina, 3-(N-suberoilargininila)marinobufagina, Telecinobufagina, Marinobufagina e 3-(N-suberoilargininila)bufalina. Apenas o peso relativo do pulmão apresentou diferença entre as doses de 8 µg mL⁻¹ e 32 µg mL⁻¹. As análises histopatológicas demonstraram presença de danos teciduais em todos os órgãos proporcionalmente ao aumento das doses e período de tratamento. Além disso, o pulmão apresentou coágulos intravasculares e pequenos infiltrados leucocitários peribronquiolar. Os resultados obtidos das análises bioquímicas demonstraram um efeito da atividade da CAT e na concentração de GSH somente entre as doses no período de 7 dias. O TBARS aumentou na maior dose em comparação com a menor dose no período de 30 dias. O efeito imunomodulador foi observado apenas quanto à capacidade de produção de IL-12p70 e TNF-α. A menor dose apresentou resultados que sugerem melhor defesa ao

organismo do animal tratado enquanto que, na maior dose, houve aumento de danos teciduais. Os compostos encontrados nas amostras do extrato metanólico do veneno são: Argininilas derivadas, esteroides cardioativos e esteroides ligados a argininilas. Nesse primeiro estudo não podemos constatar o efeito antioxidante do extrato. Observamos que o tratamento modulou a produção das citocinas nos animais e este efeito pode estar relacionado aos danos teciduais observados microscopicamente. Esse estudo constatou estímulos positivos no sistema antioxidante e imunomodulador indicando que as moléculas encontradas no extrato apresentam potencial biotecnológico e podem ser aliadas no tratamento de enfermidades que atualmente geram desafios para o mundo medicinal.

Palavras-chave: Bufonidae; Estresse Oxidativo; Imunomodulação, secreção cutânea; glândula parotoide.

ABSTRACT

In this work, the chemical composition and immunomodulatory and antioxidant activities of the methanolic extract of the poison from the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) (*R. marina*) were studied. The chemical profile was analyzed using ultra high pressure liquid chromatography (UHPLC) coupled to the detector by mass spectrometry (EM). For biological activity, male Swiss mice that were subjected to tests of oxidative stress parameters, lymphoproliferation tests of total splenic cells, quantification of nitric oxide (NO•) production and hydrogen peroxide (H₂O₂) by peritoneal macrophages and cytokine dosage. The organs (lung, heart, kidney and liver) were excised to assess relative weight, absolute weight and histopathological analysis. In our results, the following compounds were used: Adipoyl arginine, Pimeloyl arginine, Diidrobufotenin, Suberoyl arginine, Azeloyl arginine, 3-(N-adipoylargininyl)marinobufagin, 3-(N-pimeloylargininyl)marinobufagin, 3-(N-suberoylargininyl)telecinobufagin, 3-suberoylargininyl)marinobufagin, Telecinobufagin, Marinobufagin and 3-(N-suberoylargininyl) bufalin. The absolute weight of the organs did not differ significantly between the groups. The relative lung weight showed a difference between the doses of 8 µg mL⁻¹ and 32 µg mL⁻¹. Histopathological analyzes showed the presence of tissue damage in all organs, in proportion to the increase in doses and treatment period. In addition, the lung shows intravascular clots and small peribronchiolar leukocyte infiltrates. The results obtained from biochemical analyzes demonstrated an effect of CAT and GSH activity, including doses in the period of 7 days. TBARS increased in the highest dose compared to the lowest dose in long-term treatment. The immunomodulatory effect was observed only regarding the production capacity of IL-12p70 and TNF-α. The lower dose showed results that suggest better defense to the organism treated with animals, while the higher dose showed an increase in tissue damage. The compounds found in the methanolic extract samples of the poison are: Arginine derivatives, cardioactive steroids and steroids linked to arginines. In this first study, we cannot verify the antioxidant effect of the extract. We observed that the treatment modulated the production of cytokines in animals and this effect may be related to tissue damage observed microscopically. This study found positive stimuli in the antioxidant and immunomodulatory system indicating that the molecules found in the extract have biotechnological potential and can be combined in the treatment of diseases that currently generate challenges for the medical world.

Keywords: Bufonidae; Immunomodulation; Oxidative stress; cutaneous secretion; parotoid glands.

1. INTRODUÇÃO

Como o próprio Hino Nacional do Brasil diz (“...gigante pela própria natureza...”), o país possui uma natureza riquíssima em flora e fauna. É a nação com maior biodiversidade, e o maior detentor de floresta equatorial e tropical úmida do planeta (Lewinsohn e Prado, 2002; Pinto *et al.*, 2002). Nesse contexto, citamos a Amazônia Brasileira que há séculos desperta interesse de países e instituições internacionais por conter uma grande biodiversidade além de fornecer importantes serviços sistêmicos e como regulador do clima (Coe *et al.*, 2013; Santos, 2016).

O sapo *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758), principal gênero dentro da família Bufonidae, anteriormente conhecido como *Bufo marinus* (Figura 1), pode ser encontrado do extremo sul do Texas (EUA), até o centro da América do Sul na Amazônia Brasileira (Frost, 2015). No Brasil, é conhecido como “sapo cururu”, “sapo gigante”, “sapo marinho” e na Austrália como “sapo-da-cana” (AmphibiaWeb, 2019; Garcia *et al.*, 2019). Algumas espécies produzem toxinas ricas em compostos bioativos que são importantes tanto na manutenção da homeostase da pele quanto nos mecanismos de defesa contra predadores (AmphibiaWeb, 2019; Cunha-Filho *et al.*, 2010; Frost, 2015; Grant, 2019; Jared *et al.*, 2009; Sciani *et al.*, 2013). Essas toxinas são ricas em proteínas, peptídeos, aminas biogênicas, bufadienolídeos esteroidais e alcalóides (Cunha-Filho *et al.*, 2010; Sciani *et al.*, 2013). Os produtos naturais desempenham um papel muito importante no processo da descoberta e desenvolvimento de medicamentos (Newman e Cragg, 2020). Assim, as pesquisas científicas buscam intensificar os estudos dos bufadienolídeos por apresentarem atividades antimicrobiana (Cunha-Filho *et al.*, 2005), antiproliferativa (Ferreira *et al.*, 2013; Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2014), citotóxica e/ou antitumoral (Sciani *et al.*, 2013) e antiplasmodial (Banfi *et al.*, 2016).

Atualmente, nota-se um aumento nos estudos com compostos que apresentam atividades antioxidantes em razão de seu potencial frente a doenças como o câncer, doenças degenerativas, cardiovasculares e disfunções cerebrais como o Alzheimer e Parkinson (Lima e Bezerra, 2012).



Fig. 1. Sapo *R. marina*. (Fonte: Rodrigues, D. J., 2008, Santa Carmem/MT).

O equilíbrio entre a produção de radicais livres e a neutralização realizada pelo sistema antioxidante permite um papel de proteção celular contra o estresse oxidativo (Lambeth e Neish, 2014; Martelli e Nunes, 2014; Zimmermann e Kirsten, 2008). O desequilíbrio entre esses dois fatores levam ao estresse oxidativo que é responsável por vários danos ao organismo como várias doenças, envelhecimento precoce, dentre outros (Carocho e Ferreira, 2013; Leonarduzzi *et al.*, 2010; Wiernsperger, 2003). O sistema antioxidante é dividido em enzimático e não-enzimático que podem agir por diferentes mecanismos seja impedindo a produção dos radicais livres ou espécies não-radicalares ou reparando as estruturas biológicas lesadas (Barbosa *et al.*, 2010).

No sistema imunológico, para impedir a disseminação de patógenos, os macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e reativas de nitrogênio como exemplo, o óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) (Barbosa *et al.*, 2010). O sistema imunológico é dividido entre inato e o adaptativo e é regulado pelas células envolvidas nesses sistemas (Krinski *et al.*, 2010). A resposta imune inata responde rapidamente aos estímulos de maneira não específica e é composta por neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, células natural killer (NK) e a resposta imune adaptativa é a segunda linha de defesa, composta por linfócitos T e B (Krinski *et al.*, 2010). As células do sistema imune secretam uma variedade de proteínas conhecidas como citocinas

(anti e pró-inflamatórias) que apresentam diferentes estruturas e funções para regular e coordenar as atividades da imunidade inata e adaptativa (Cruvinel *et al.*, 2010). Entretanto, existem casos em que a resposta imune não é correspondida pelo organismo, sendo necessária a imunomodulação através de substâncias capazes de estimular ou suprir algumas células do sistema imune (Gaur *et al.*, 2009).

Existem diversas pesquisas que avaliam o potencial antioxidante e imunomodulador de plantas (Boscolo *et al.*, 2007; Nunes-Pinheiro *et al.*, 2003). No entanto, estudos que envolvem extratos obtidos a partir da secreção cutânea de bufonídeos ainda são muito escassos. Conhecer os compostos presentes do veneno é de extrema importância, bem como, entender a possível ação sinérgica entre os bufadienolídeos como foi proposto por Ferreira *et al.*, (2013). A cada dia surgem novas doenças que desafiam a medicina e a indústria farmacêutica, como o câncer, por exemplo, e apesar da introdução de novos fármacos no arsenal terapêutico do câncer, vários tumores ainda não dispõem de tratamento adequado (Costa-Lotufo *et al.*, 2010). Aliar os produtos naturais à Bioprospecção oferece um potencial de descobrir novas estruturas que podem resultar em agentes eficazes contra uma variedade de doenças humanas (Newman e Cragg *et al.*, 2020). Além disso, é importante destacar que esse estudo permite o conhecimento científico da anurofauna amazônica, ainda pouco conhecida, porém ameaçada pelas alterações de habitat e mudanças climáticas, o que pode estar influenciado no declínio populacional de anfíbios, visto que são sensíveis a essas alterações (Haddad *et al.*, 2008).

Dessa maneira, esse trabalho objetivou estudar a composição química e realizar estudos das atividades imunomoduladora e antioxidante do extrato metanólico do veneno do sapo *R. marina*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Coleta do veneno e preparo dos extratos

Os animais adultos (machos e fêmeas) foram capturados e identificados por D. J. Rodrigues (IBAMA, SISBIO: 30034-1). A coleta aconteceu no município de Cotriguaçu/MT (9°49'26.00"S 58°15'26.00"O) nos meses de novembro e dezembro de 2016. O veneno dos sapos foi obtido através da compressão manual das glândulas paratoides. Para obtenção do

extrato metanólico, o veneno foi secado, triturado e extraído por maceração com metanol PA, utilizando banho ultrassônico (Unique, Indaiatuba, São Paulo, Brasil) por duas horas. Após, filtrou-se em papel filtro (Unifil), e o veneno foi remacerado por mais duas vezes nas mesmas condições. Ao final, os extratos foram agrupados e o solvente foi rotaevaporado (IKA, Staufen, Alemanha) a 40 °C, mantido sob vácuo em dessecador à temperatura ambiente por 48 h. O extrato metanólico obtido foi armazenado a 4 °C. As condições experimentais estão de acordo com o trabalho realizado pelo grupo (Kerkhoff *et al.*, 2016).

2.2 – Análises por Cromatografia Líquida com Detecção por Espectroscopia de Ultravioleta e por Espectrometria de Massas

As análises por Cromatografia Líquida foram realizadas num Sistema de Cromatografia Líquida Ultra-alta Pressão com Detecção DAD e EM (UHPLC-DAD-micrOTOF), equipado com: Sistema Binário (Modelo: Shimadzu LC-20AD); Sistema de Injeção Automático (Modelo: Shimadzu SIL-20A HT); Forno para Coluna (Modelo: Shimadzu CTO-20A); Módulo de Controle de Comunicação (Modelo: Shimadzu CBM-20A), Detector de Arranjo de Diodo (Modelo: Shimadzu SPD-M20A), Espectrômetro de Massas (Modelo: Bruker micrOTOF-QIII) e Softwares de Aquisição e Tratamento dos Dados (Compass ot of Control - Versão 3.4; Compass DataAnalysis - Versão 4.2; Compass HyStar – Versão 3.2).

Condições Cromatográficas: Volume de Injeção: 1 µL; Coluna Cromatográfica: (Descrição: Coluna Kromasil 100-5-C18); Dimensão: 250 x 4,6 mm; Tamanho da Partícula: 5 µm; Serial Number: E66320; Fase Estacionária: C18 Fase reversa; Pré-Coluna: (Marca: Kromasil; Descrição: Coluna de Guarda Kromasil 100-5-C18; Dimensão: 4,6 x 10 mm; Tamanho da Partícula: 5 µm).

Método Cromatográfico: Fase Móvel (Solvente A: Solução de Ácido Fórmico 0,5%; Solvente B: Acetonitrila 0,5% de ácido fórmico); Modo de Eluição: Gradiente (seguindo a seguinte programação: 0 – 45 minutos com 8-64% de Solvente B; Fluxo: 1,0 mL/min; Temperatura da Coluna: 40 °C. Método de Aquisição/Detecção dos Espectros: Ion Polarity: Positive; Scan Mode: MS; Mass Range: 50 a 1000 m/z; Rolling Average: 2 x; Spectra Rate: 2,00 Hz; End Plate Offset: 500 V; Capillary Voltage: 4500 V; Nebulizer Gás: 4.0 Bar; Dry Gás: 9.0 L/min; Dry Temperature: 200 °C.

As amostras foram preparadas com 1 mg de extrato metanólico em 1 mL de metanol grau HPLC. Posteriormente foram filtrados em filtro de seringa de PTFE porosidade 0,45 µm. As condições experimentais foram desenvolvidas conforme Schmeda-Hirschmann *et al.* (2014).

2.3 – Animais e delineamento experimental

Esta pesquisa foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), sob o n° ACC9622, e aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) – UFMT, sob o n° 23108.918243/2017-50. Foram utilizados camundongos machos da linhagem não isogênica Swiss, peso médio de 30 g - 40 g (60 dias de idade) obtidos do Biotério Central da UFMT – Câmpus Cuiabá. Durante o período experimental, os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C), umidade relativa ($55 \pm 10\%$), iluminação (12 horas claro / escuro), com dieta comercial (Nuvilab, Colombo, Paraná, Brasil) e água filtrada (*ad libitum*) e mantidos em caixas de polietileno e grade de aço inoxidável. Os animais foram divididos em grupos ($n = 5$) e tratados com água, solução Tween 20 0,5% ou diferentes doses do extrato. As doses foram definidas e adaptadas conforme o estudo realizado por Oliveira *et al.* (2019). Utilizaram-se três doses para o tratamento dos animais: $8 \mu\text{g mL}^{-1}$, $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $32 \mu\text{g mL}^{-1}$. As alíquotas foram preparadas em microtubos, diluídas em solução de Tween 20 0,5% e armazenadas à - 4 °C. Os animais foram tratados por via intragástrica (gavagem) com 100 µL/animal/dia da dose definida de acordo com o grupo experimental.

Os tratamentos iniciaram após o período de aclimação (15 dias) e foram realizados durante 7 ou 30 dias. Durante o período de tratamento, os animais foram observados diariamente quanto ao comportamento e também ao consumo de água e ração. Foram obtidos os pesos dos animais no início e ao final do tratamento para investigação do peso corporal. Ao final do tratamento, 24 horas depois, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os órgãos (pulmão, coração, rim e fígado) excisados para avaliação do peso relativo, peso absoluto e análise histopatológica.

2.4 – Análise histopatológica

Fragmentos de coração, fígado, pulmão e rim foram coletados, após os procedimentos experimentais, imediatamente fixados com formol a 10% em tampão fosfato de sódio, pH 7,4, a 4 °C. Seguido de desidratação alcoólica e diafanização por xilol, os fragmentos foram emblocados em parafina, seccionados a 5 µm em micrótomo HYRAX M60 (Zeiss, GR), desparafinizados e corados com hematoxilina. Os órgãos foram analisados no microscópio AxioScope.A1 (Carl Zeiss, GR). A análise histopatológica foi realizada na forma de escore, variando de 0 a 4, enfatizando dados de edema tecidual, coágulo sanguíneo, presença de infiltrado leucocitário e dano dos túbulos renais, onde 0 significa a ausência de alterações e 4 é a presença de altos índices de alterações (Duan *et al.*, 2004).

2.5 – Parâmetros do estresse oxidativo

O fígado dos animais foi retirado e mantido congelado em ultra-freezer (-80 °C) para as análises dos parâmetros do estresse oxidativo. A atividade enzimática da glutathione-S-transferase (GST) foi determinada de acordo com Habig *et al.* (1974). A técnica baseia-se em medir a formação do aduto GS-DNB, e o resultado foi expresso em µmol GS-DNB min⁻¹ mg proteína⁻¹. A atividade da catalase (CAT) seguiu o método de Nelson e Kiesow (1972) baseada na decomposição de H₂O₂ e medida através de espectrofotômetro em 240 nm e expressada em µmol H₂O₂ min⁻¹ mg de proteína⁻¹. A glutathione reduzida (GSH) foi dosada através do método colorimétrico de Sedlak e Lindsay (1968) e quantificada em 412 nm. O resultado foi expresso em µmol GSH mg proteína⁻¹ e comparado a uma curva padrão de GSH. Para análise de dano lipídico no tecido hepático, seguiu-se o método de Buege e Aust (1978) para determinar os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O resultado obtido foi apresentado como nmol MDA mg proteína⁻¹ seguindo a curva de calibração para o MDA. O conteúdo proteico foi estimado por espectrofotometria de acordo com Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão. A absorbância das amostras foi medida a 595 nm.

2.6 – Ensaios Imunomoduladores

2.6.1 – Teste de Linfoproliferação das Células Esplênicas Totais

O teste de linfoproliferação das células esplênicas totais foi realizado através do método colorimétrico do MTT (3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo), seguindo as recomendações do fabricante (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Para isso, o baço dos animais foi retirado e transferido para uma placa de petri contendo meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, Brasil) e macerado com auxílio de peneira e pistilo. Posteriormente, a suspensão celular foi transferida para um tubo falcon e centrifugada a 1.500 rpm durante 10 minutos. Ao pellet celular foram adicionados 500 µL de RPMI 1640 com 20% Soro Bovino Fetal (SBF) (Cultilab, Campinas, Brasil). A concentração celular da suspensão foi ajustada para 2×10^4 cel mL⁻¹ com auxílio de câmara de Newbauer e através do método de exclusão Azul de Tripan. As células foram transferidas para microplacas de 96 poços, sendo adicionado o mitógeno Concavalina A (ConA, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) em triplicatas ou RPMI 20% SBF como controle basal. As placas foram incubadas por 36 horas em estufa úmida 37 °C contendo 5% CO₂. Após este período, foi adicionado o reagente MTT a cada poço, e incubado por 4 horas. Em seguida, adicionou-se a solução solubilizadora e realizou-se a leitura em Leitor de Elisa com filtro de 630 nm.

2.6.2 – Dosagem de Citocinas

As concentrações das citocinas presentes no sobrenadante das culturas das células esplênicas totais estimulados foram dosadas através de ensaio de imunoabsorção enzimática (Elisa) por meio de kits comerciais (eBioscience, San Diego, Estados Unidos), seguindo o protocolo do fabricante. Para a dosagem de IL-4 e IL-10 foi utilizado o sobrenadante de cultura de células esplênicas estimuladas com o mitógeno ConA (3,5 µg/mL) durante 24 horas. A dosagem de IL12p70 e TNF-α foi realizada no sobrenadante de cultura de células esplênicas estimuladas com suspensão aquosa formolizada de *Staphylococcus aureus* Cowan strain 1 (1:5.000, SAC, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) durante 48 horas.

A leitura da absorbância das amostras foi realizada em leitor de ELISA com filtro de 450 nm. Para o cálculo das concentrações das amostras foi utilizado a equação da reta, estimada de acordo com as concentrações conhecidas de cada citocina (citocina padrão presente no kit).

2.6.3 - Obtenção dos Macrófagos Peritoneais

Após o sacrifício dos animais, os macrófagos peritoneais foram obtidos em cabine de segurança biológica II mediante a inoculação à cavidade peritoneal de 10 mL de Solução Salina Tamponada (PBS) estéril e gelada. Após o inóculo, o abdômen foi massageado por 30 segundos e o fluido peritoneal coletado foi transferido para tubos falcon de 50 mL. Este procedimento foi realizado duas vezes, o que totalizou 20 mL de fluido mantido em banho de gelo e posterior centrifugação sob refrigeração (Novatécnica, Piracicaba, São Paulo, Brasil) com rotação de 1500 rpm por 10 minutos. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado com 1 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) suplementado com 10% de SBF.

As células contidas no lavado peritoneal foram contadas na Câmara de Neubauer e as diluições necessárias foram feitas de forma a atingir a concentração desejada (2×10^6 cel mL⁻¹) para cada experimento. Em seguida, os macrófagos foram plaqueados (triplicata) em microplacas de 96 poços (100 µL/poço) e incubado por duas horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

Após a incubação, o sobrenadante foi retirado e os poços foram lavados com 100 µL de RPMI. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de RPMI 10% de SBF em cada poço, sendo as células incubadas por 36 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

2.6.4 – Determinação da Liberação Espontânea de H₂O₂ pelos Macrófagos

A produção espontânea de H₂O₂ pelos macrófagos peritoneais dos camundongos foi determinada pelo método desenvolvido por Pick & Mizel (1981).

Após o período de incubação, o sobrenadante da cultura de macrófagos foi coletado e reservado para a dosagem de NO•. Para a determinação de H₂O₂ adicionou-se à monocamada de células aderidas nos poços das placas 100 µL de solução de vermelho fenol contendo 140

mM cloreto de sódio (NaCl), 10 mM fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), 5,5 mM dextrose e 5,5 mM de peroxidase. A placa foi incubada em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 60 minutos. Após o período de incubação, a reação foi interrompida com 10 μ L de hidróxido de sódio (NaOH) 1M e a absorbância da solução foi determinada em microleitor de ELISA com filtro de 630 nm. O branco foi constituído pela solução de vermelho fenol e NaOH 1 M. A concentração de H_2O_2 produzida pelos macrófagos foi determinada a partir de uma curva padrão de concentrações conhecidas de solução de H_2O_2 , sendo considerado o valor médio das amostras em triplicata.

2.6.5 – Determinação da Produção de $NO\bullet$ pelos Macrófagos

Com o sobrenadante das culturas de macrófagos previamente reservado foi realizada a dosagem da produção de $NO\bullet$ pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess (Green *et al.*, 1981). Aos sobrenadantes foram adicionados 100 μ L do reagente de Griess constituído de N-(1-naftil)-etilenodiamino dihidroclorídrico (NEED), 1%, diluído em água destilada e sulfanilamida 1% diluída em ácido fosfórico (H_3PO_4), 5%, os quais foram misturados em volumes iguais no momento da reação. As amostras foram lidas em leitor de ELISA em comprimento de onda de 492 nm.

O branco foi constituído pelo reagente de Griess. A concentração de $NO\bullet$ produzida pelos macrófagos foi determinada a partir de uma curva padrão de concentrações conhecidas de solução de nitrito de sódio ($NaNO_2$), sendo considerado o valor médio das amostras em triplicata.

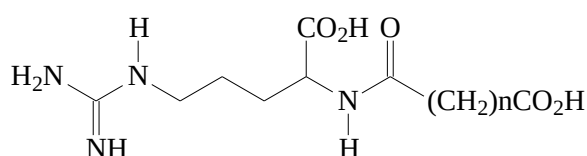
2.7 – Análise Estatística

Os resultados obtidos (mediana $\pm$ intervalo interquartil) foram analisados por análise não-paramétrica de uma via (Kruskal-Wallis), seguida pelo teste de Dunn's para verificar as diferenças entre os grupos experimentais. Foi utilizado um nível de significância para rejeição da hipótese nula de 5% ($p < 0,05$).

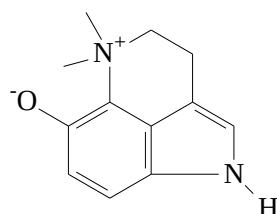
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Resultados da UHPLC-DAD e ESI-MS-MS

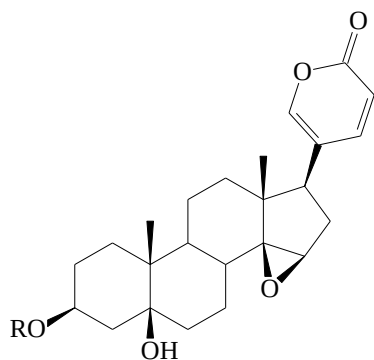
As estruturas químicas dos compostos encontrados no extrato metanólico do veneno de *R. marina* estão representadas na figura 2. Em seguida, o cromatograma gerado pelo sistema CLAE-EM-EM (figura 3) que mostrou a presença de 15 picos no extrato separados por ordem de polaridade. As informações de tempo de retenção (T_r), área relativa dos picos (%), $[M+H]^+$, fragmentos e identificação dos compostos estão resumidos na Tabela 1.



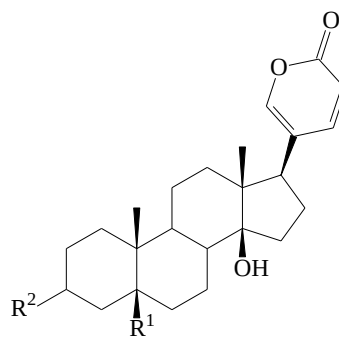
Compound	n	name
1	4	Adipoyl Arginine
2	5	Pimeloyl Arginine
4	6	Suberoyl Arginine
6	7	Azelayl Arginine



3 Diidrobufotenin



Compound	R	name
7	3-(N-adipoylargininyl)	marinobufagin
8	3-(N-pimeloylargininyl)	marinobufagin
10	3-(N-suberoylargininyl)	marinobufagin
12	H	Marinobufagin



Compound	R ¹	R ²	name
9	H	O-(N-suberoylargininyl)	telecinobufagin
11	OH	OH	Telecinobufagin
13	H	O-(N-suberoylargininyl)	bufalin

Fig. 2. Estrutura química dos compostos presentes no extrato metanólico obtido a partir da secreção cutânea de *R. marina*.

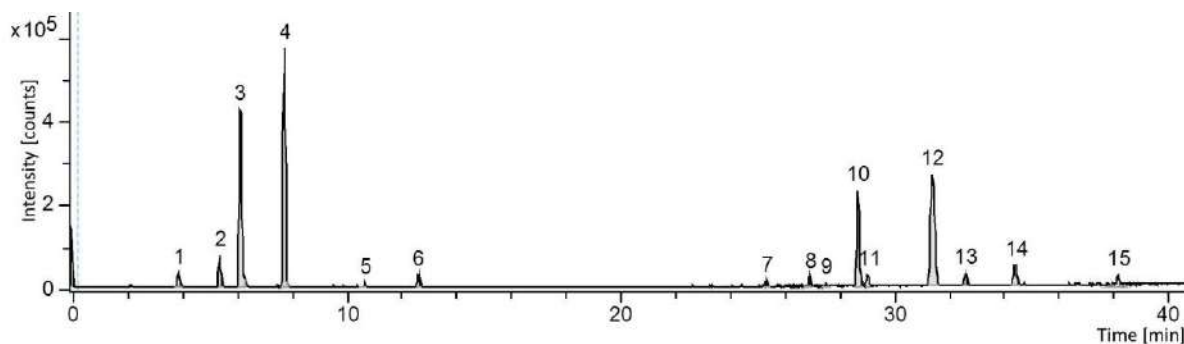


Fig. 3. Cromatograma do extrato metanólico do veneno de *R. marina*.

Pela fragmentação obtida por MS/MS a nossa proposta é que inicialmente o composto **1** sofreu a perda do grupo diacil gerando um fragmento iônico com m/z 175 ($M - 130 + 2H$), a segunda fragmentação foi a perda do grupo NH_2 , gerando um fragmento iônico m/z 158 ($M - 144 + H$), e por último a perda do grupo imino, gerando um fragmento iônico m/z 116 ($M - 188 + H$), conforme proposto na Figura 4. Os compostos **1**, **2**, **4** e **6** apresentaram um padrão de fragmentação conforme descrito por Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2014. Esses compostos foram identificados como Adipoila arginina, Pimeloila arginina, Suberoila arginina, Azelaila arginina de acordo com Gao *et al.*, 2010; Petroselli *et al.*, 2018; Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2014, 2016, 2017; Yoshika, *et al.*, 2007.

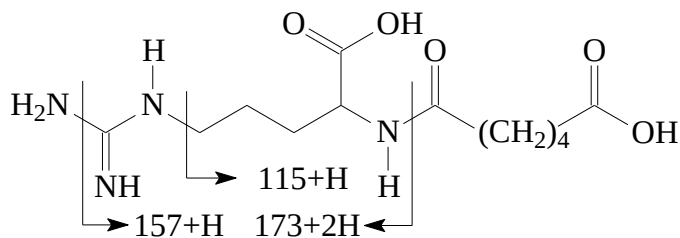


Fig. 4. Proposta de fragmentação da Adipoila arginina de acordo com a fragmentação apresentada nas análises.

O composto **3** foi identificado como desidrobufotenina. Os compostos **7**, **8** e **10** são derivados do esteroide marinobufagina e foram identificados como 3-(N-adipoilargininila)marinobufagina, 3-(N-pimeloilargininila)marinobufagina, 3-(N-suberoilarginina)marinobufagina, respectivamente. O composto **9** é derivado do esteroide telecinobufagina e identificado como 3-(N-suberoilargininila)telecinobufagina.

Tabela 1: Dados físicos experimentais e teóricos do extrato metanólico do veneno de *R. marina* por CLAE-MS-MS e identificação dos compostos.

Composto	T _r (min)	Área relativa (%)	[M+H] ⁺ (m/z)		MS/MS (intensidade relativa)	Identificação
			Experimental/ Literatura	Experimental/		
1	3,4	1,7	303,1601/ 303,3	175,1199 (65), 158,0918 (99), 116,0706 (100)/ 175,1		Adipoila arginina ²
2	5,5	3,2	317,1745/ 317	175,1166 (91), 158,0915 (100), 116,0716 (94)/ 175,1		Pimeloila arginina ¹
3	6,2	24,5	203,1126/ 202,9	188,0893/ 187,6		Diidrobufotenina ^{2,4,5}
4	7,8	26,0	331,1898/ 331,2	175,1158 (100), 158,0911 (91), 116,0707 (68)/ 175,1		Suberoila arginina ^{2,5,6}
5	10,8	0,3	345,2040/ -	264,1648 (47), 175,1183 (100), 158,0907 (44)/ -		não identificado
6	12,7	1,2	345,2049/ 345,3	250,1549 (72), 175,1152 (95), 158,0925 (100)/ 175,1		Azelaila arginina ²
7	25,4	0,5	685,3671/ 685,9	303,1651 (83)/ -		3-(N-adipoilargininila)marinobufagina ²
8	27,0	1,0	699,3837/ 699,6	317,1798 (68)/ -		3-(N-pimeloilargininila)marinobufagina ^{2,5}
9	27,6	0,2	715,4154/ 715,7	331,1967 (63)/ 331,2		3-(N-suberoilargininila)telecinobufagina ^{2,5}
10	28,7	11,0	713,4001/ 713,2	331,1962 (100)/ 331,2		3-(N-suberoilarginina)marinobufagina
11	29,1	1,4	403,2377/ 403,2	385,2300 (24), 349,2099 (96)/ 385,1; 349,2		Telecinobufagina ^{2,5}
12	31,4	21,5	401,2237/ 401,2	383,2156 (100)/ 383,2		Marinobufagina ^{2,4,5}
13	32,6	1,4	699,4198/699,7	681,4073 (10), 331,1961 (100)/ 331,2; 681,6		3-(N-suberoilarginina)bufalina ^{2,3,5}
14	34,5	3,5	450,2542/ -	409,2283 (40), 387,2461 (100), 309,1495 (9)/ -		não identificado
15	38,2	2,5	423,1900/ -	407,2132 (45), 385,2328 (100), 261,1276 (26)/ -		não identificado

¹Gao *et al.*, 2010; ²Petroselli *et al.*, 2018; ³Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2014; ⁴Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2016; ⁵Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2017; ⁶Yoshika, *et al.*, 2007.

O composto **13** é derivado do esteroide bufalina e foi descrito como 3-(N-suberoilarginina)bufalina (Petroselli *et al.*, 2018; Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2014, 2016, 2017). Os compostos derivados de esteroides cardiotônicos apresentaram padrão na fragmentação referente à perda da arginina e diferenciaram apenas no diácido (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2014). Os compostos **11** e **12** são esteroides livres identificados como telocinobufagina e marinobufagina (Petroselli *et al.*, 2018; Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2017). Apenas os compostos **5**, **14** e **15** não foram encontrados registros na literatura.

De acordo com a Tabela 1, pode-se observar que os compostos majoritários presentes no extrato metanólico de *R. marina* são os compostos **3** (24,5%), **4** (26,0%) , **10** (11,0%) e **12** (21,5%), juntos correspondem à 83,0% da amostra. Estes compostos representam quatro classes distintas de compostos, sendo **3** um alcaloide indólico, o **4** pertencente a classe das argininilas derivadas, o composto **10** um esteroide ligado a uma argininila e **12** pertencente a classe dos esteroides cardiotônicos na sua forma livre. Esses compostos são de extrema importância para sobrevivência desses animais tanto nas funções fisiológicas como contra predadores e microorganismos (Ferreira *et al.*, 2013). Estudos demonstraram que as mesmas espécies de sapos obtidas de diferentes regiões geográficas e sob diferentes condições de clima, tempo e outros fatores ambientais apresentam diferenças em suas composições químicas (Qi *et al.*, 2018). Dessa maneira, as análises do perfil químico são cruciais para o desenvolvimento de novos fármacos. Estudos têm demonstrado atividade biológica de moléculas e extratos aquosos obtidos a partir da secreção expelida pelas glândulas dos sapos apresentando bufadienolídeos na sua composição (Ferreira *et al.*, 2013). Na medicina tradicional chinesa, a secreção seca das glândulas e da pele do sapo chinês (*Bufo bufo gargarizans*) é utilizada por vários séculos, no tratamento de infecções e inflamações, inclusive o câncer (Meng *et al.*, 2016; Qi *et al.*, 2018). Os constituintes químicos existentes na família Bufonidae apresentam potencial terapêutico para o tratamento de alergias, inflamações, câncer, infecções e outras doenças (Medeiros *et al.*, 2019). Diferentes bufadienolídeos revelaram uma atividade de inibição diferente na Na⁺/K⁺-ATPase (Tang *et al.*, 2016). Machado *et al.* (2018) realizaram testes com a marinobufagina isolada e verificaram atividade antiproliferativa em células de leucemia humana. Cunha Filho *et al.* (2005) a partir da secreção de veneno do *Bufo rubescens* (*Rhinella rubescens*) constataram o efeito antimicrobiano da telocinobufagina e marinobufagina. Além disso, bufadienolídeos isolados de *Rhinella jimi* apresentaram atividade antiparasitária contra os tripomastigotas de

Trypanosoma cruzi e os promastigotes de *Leishmania chagasi* (Tempone *et al.*, 2008). Schmeda-Hirschmann *et al.* (2014) verificaram no veneno de *Rhinella schneideri* que os compostos antiproliferativos mais ativos são os bufadienolídeos sendo a marinobufagina que apresenta maior atividade, mas a presença de alcalóides como constituintes menores nas mesmas frações podem desempenhar um papel importante no efeito. O veneno de anfíbios têm se mostrado uma fonte rica de compostos bioativos que necessita ser estudado por representarem um grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos (Ferreira *et al.*, 2013).

3.2 – Análise do peso corporal, consumo alimentar e pesos dos órgãos

O peso corporal, o consumo alimentar e o peso dos órgãos foram obtidos a fim de verificar uma possível toxicidade do veneno. Tais avaliações são importantes porque produtos tóxicos normalmente induzem alterações no comportamento do animal, com inapetência e redução do peso corpóreo (Pires *et al.*, 2004). Assim como no trabalho de Oliveira *et al.*, 2019, o consumo de água e ração, bem como o ganho de peso corpóreo, não apresentou diferença significativa entre os grupos avaliados (dados não mostrados). A análise do peso absoluto e relativo dos órgãos também não apresentou diferença em relação aos grupos controles. Citamos apenas o peso relativo do pulmão que, aos 7 dias de tratamento, diferenciou-se entre as doses de $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ (dados não mostrados).

3.3 – Análise Histopatológica

Os resultados da análise histopatológica estão representados na figura 5. A análise histopatológica do coração, fígado, rim e pulmão evidenciaram que o tratamento com o extrato do veneno de *R. marina* foi capaz de induzir alterações nos tecidos, com formação de edema tecidual, de coágulo intravascular, dano na arquitetura dos túbulos renais e indução de infiltrado leucocitário. Coração e rim apresentaram danos histológicos intermediários, com a presença de todas as alterações (edema, coágulos intravasculares e infiltrado leucocitário), com escores 1 e 2, principalmente na dose $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ aos 7 e 30 dias de tratamento.

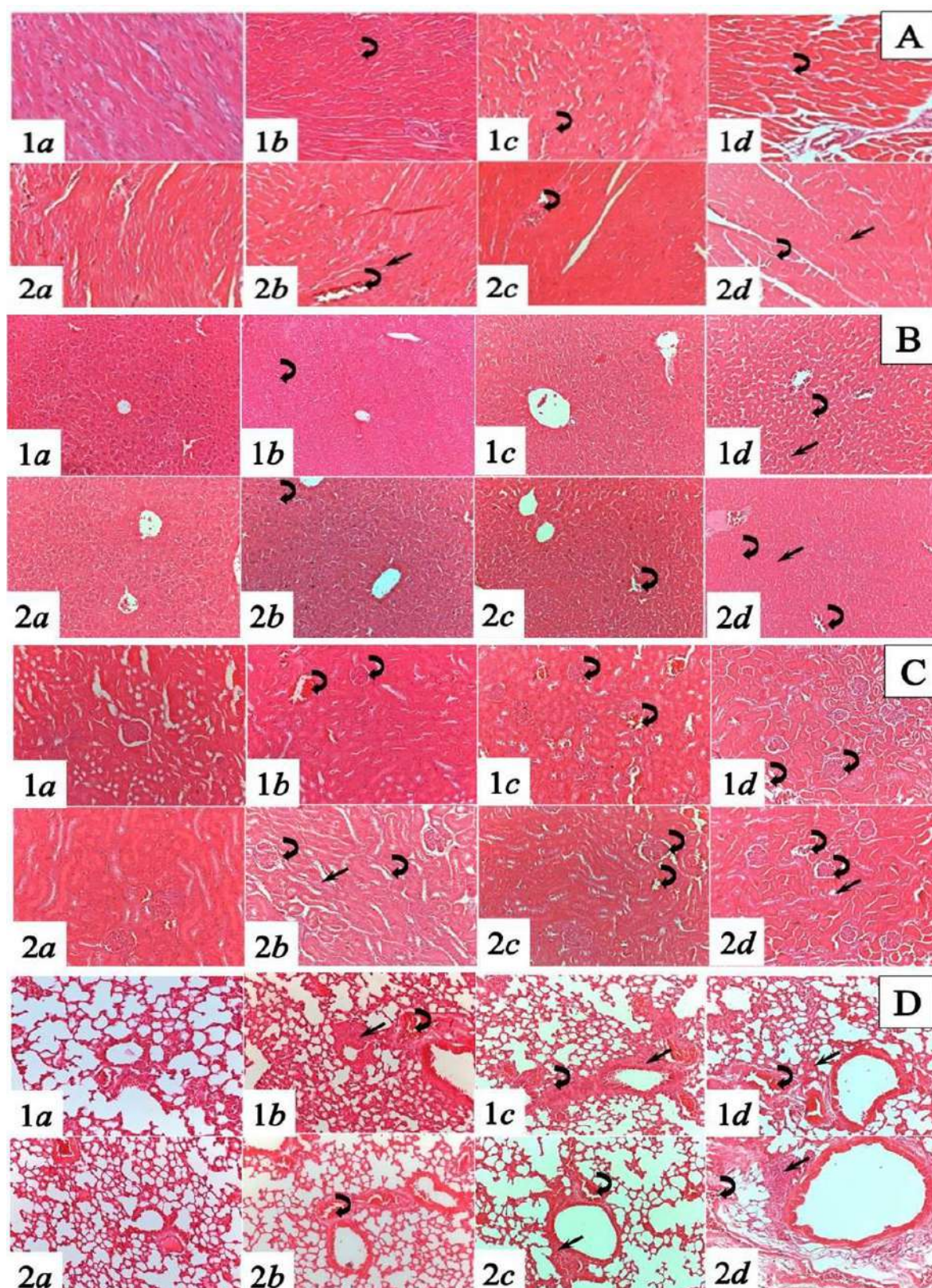


Fig. 5. Resultados físicos dos danos teciduais encontrados; **1:** 7 dias; **2:** 30 dias; **a:** Controle; **b:** Dose $8 \mu\text{g mL}^{-1}$; **c:** $16 \mu\text{g mL}^{-1}$; **d:** Dose $32 \mu\text{g mL}^{-1}$; **A:** Coração; **B:** Fígado; **C:** Rim; **D:** Pulmão; A seta curva indica formação de edemas e a seta reta indica infiltrados leucocitários.

O fígado foi o órgão que apresentou menores danos, sendo observada a presença prioritária de edema com nível de escore 1, nas duas fases de tratamento. Os efeitos no pulmão foram mais pronunciados, com presença de edema, coágulos e infiltrados leucocitários peribronquiolar, de escore 1 e 2, aos 7 e 30 dias de tratamento, principalmente na dose de $32 \mu\text{g mL}^{-1}$. De acordo com o aumento da dose, as alterações teciduais foram mais perceptíveis. O mesmo foi observado para o tempo de tratamento, visto que, o tratamento de 30 dias apresentou mais edemas, coágulos e formação de infiltrados leucocitários do que o tratamento agudo.

Avaliando em conjunto os resultados histológicos e macroscópicos (item 3.2), o pulmão parece ser o órgão mais sensível à ação dos compostos presentes nos extratos utilizados, com redução do peso relativo e presença mais intensa de edemas, coágulos e infiltrados leucocitários peribronquiolar. As alterações histológicas observadas foram restritas a escores mais leves (1 e 2) e não repercutiram nos hábitos dos animais. Neste caso, um fator importante a considerar pode ser o tempo máximo de tratamento (30 dias), sendo possível que com um tempo maior de tratamento, essas alterações poderiam ser vistas macroscopicamente.

3.4 – Parâmetros do estresse oxidativo

Os resultados dos parâmetros do estresse oxidativo estão resumidos e reunidos na Tabela 2.

A CAT é um importante antioxidante enzimático que capta moléculas de H_2O_2 e converte em moléculas de oxigênio e água (Gebika e Krych-Modej, 2019). É encontrada em alta atividade no fígado em razão da sua função ativa na metabolização de xenobióticos (Sani *et al.*, 2006). Em nosso estudo realizado no tecido hepático, percebemos que no tratamento de 7 dias o extrato metanólico do veneno de *R. marina* apresentou um efeito bifásico entre as doses promovendo o aumento da atividade enzimática da CAT nos animais tratados com a concentração $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ em comparação aos animais tratados com a dose de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($H = 13,69$; $df = 5$). No entanto, a atividade antioxidante da CAT não se alterou no fígado dos animais tratados por 30 dias ($H = 5,16$; $df = 5$).

A GST, importante enzima na desintoxicação de xenobióticos (Pereira *et al.*, 2018), apresentou diferença significativa da sua atividade no tratamento de 7 dias ($H = 9,77$; $df = 5$), porém não foi possível identificar que grupos diferiram entre si. Já o tratamento de 30 dias não apresentou diferença estatística ($H = 9,38$; $df = 5$).

Tabela 2. Efeito de diferentes concentrações do extrato metanólico do veneno de *R. marina* sobre os parâmetros do estresse oxidativo no tecido hepático de camundongos após 7 e 30 dias de tratamento.

	7 dias Mediana e Intervalo Interquartil	30 dias Mediana e Intervalo Interquartil
CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$)		
Água	0,825 (0,515-1,135)	1,060 (0,665-1,310)
Veículo	0,740 (0,585-0,965)	1,050 (0,745-1,405)
8 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1,230 (0,987-1,510) [#]	0,865 (0,717-1,148)
16 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,570 (0,382-0,722)	0,880 (0,672-0,950)
32 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,830 (0,765-1,265)	1,080 (1,050-1,265)
GST ($\mu\text{mol GS-DNB min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$)		
Água	1,140 (0,970-1,285)	0,940 (0,800-1,225)
Veículo	1,933 (1,790-2,075)	1,400 (1,175-1,710)
8 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1,110 (0,917-1,593)	1,588 (1,280-1,725)
16 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1,365 (1,183-1,675)	1,380 (0,982-1,968)
32 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,960 (0,915-1,140)	1,060 (0,820-1,195)
GSH ($\mu\text{mol GSH mg protein}^{-1}$)		
Água	1,000 (0,730-1,270)	0,900 (0,700-1,350)
Veículo	0,620 (0,525-0,885)	0,770 (0,475-1,095)
8 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,570 (0,370-0,910)	1,035 (0,765-1,245)
16 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,430 (0,325-0,550)	0,800 (0,662-1,105)
32 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1,620 (1,310-1,970) [*]	1,150 (1,030-1,245)
TBARS ($\text{nmol MDA mg protein}^{-1}$)		
Água	1,010 (0,865-1,125)	1,080 (0,615-1,335)
Veículo	1,090 (0,725-1,370)	0,960 (0,570-1,300)
8 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1,351 (1,143-1,550)	0,450 (0,317-0,678)
16 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1,085 (0,987-1,163)	1,340 (0,985-2,060)
32 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1,570 (0,990-1,795)	1,850 (1,685-2,015) [@]

Os valores estão de acordo com a análise não-paramétrica de uma via (Kruskal-Wallis), seguida pelo teste de Dunn's ($p < 0,01$); [#]Indica diferença em relação à dose 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; ^{*}Indica diferença significativa em relação às doses 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; [@]Indica diferença significativa em relação à dose 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$; N=5.

A GSH mantém a estabilidade dos grupos tióis das proteínas, reduz ligações dissulfetos induzidas pelo estresse oxidativo, neutraliza radicais livres, comportando-se como

indicador da capacidade da célula em manter sua homeostase, por isso, é considerada um agente muito importante do sistema de defesa antioxidante da célula (Berno *et al.*, 2010). Os níveis de GSH também foram avaliados e aos 7 dias de tratamento observamos que a dose 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou um aumento em comparação com os grupos tratados com as demais doses do extrato ($H = 18,44$; $df = 5$). Por outro lado, o extrato metanólico do veneno de *R. marina* não alterou os níveis GSH no tratamento de 30 dias ($H = 5,73$; $df = 5$).

A peroxidação lipídica através do método TBARS demonstra a formação de malondialdeído (MDA) (Samudrala *et al.*, 2015). Neste primeiro estudo houve um aumento significativo no grupo tratado com a dose 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ quando comparado com o tratamento da dose 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no período de 30 dias ($H = 15,23$; $df = 5$). Já para o tratamento por 7 dias não houve mudanças significativas ($H = 6,19$; $df = 5$).

Nesse primeiro estudo, a diferença dos efeitos encontrados entre as doses demonstraram que houve um aumento da atividade enzimática da CAT e do marcador não-enzimático GSH, porém não diferenciaram dos controles, o que não permite a verificação da atividade antioxidante. Em conjunto com a análise histopatológica, o fígado apresentou menor índice de edemas e infiltrados leucocitários em comparação aos demais órgãos estudados, o que sugere que as alterações bioquímicas (CAT, GSH e TBARS) encontradas podem ser um reflexo da tentativa do organismo em equilibrar os danos celulares induzidos em consequência do processo inflamatório local (Ballesteros *et al.*, 2009).

3.5 – Ensaios imunomoduladores

A capacidade imunomoduladora do extrato foi avaliada a partir da resposta linfoproliferativa e da capacidade de produção *in vitro* de citocinas pelos esplenócitos dos animais tratados com o veneno de *R. marina* por 7 e 30 dias. Além disso, avaliamos também a atividade dos macrófagos peritoneais quanto à produção *in vitro* de $\text{NO}\cdot$ e H_2O_2 .

A capacidade linfoproliferativa dos esplenócitos totais não apresentou diferença entre os grupos tratados aos 7 dias ($H = 3,56$, $df = 5$) e 30 dias de tratamento ($H = 4,93$, $df = 5$) (dados não mostrados).

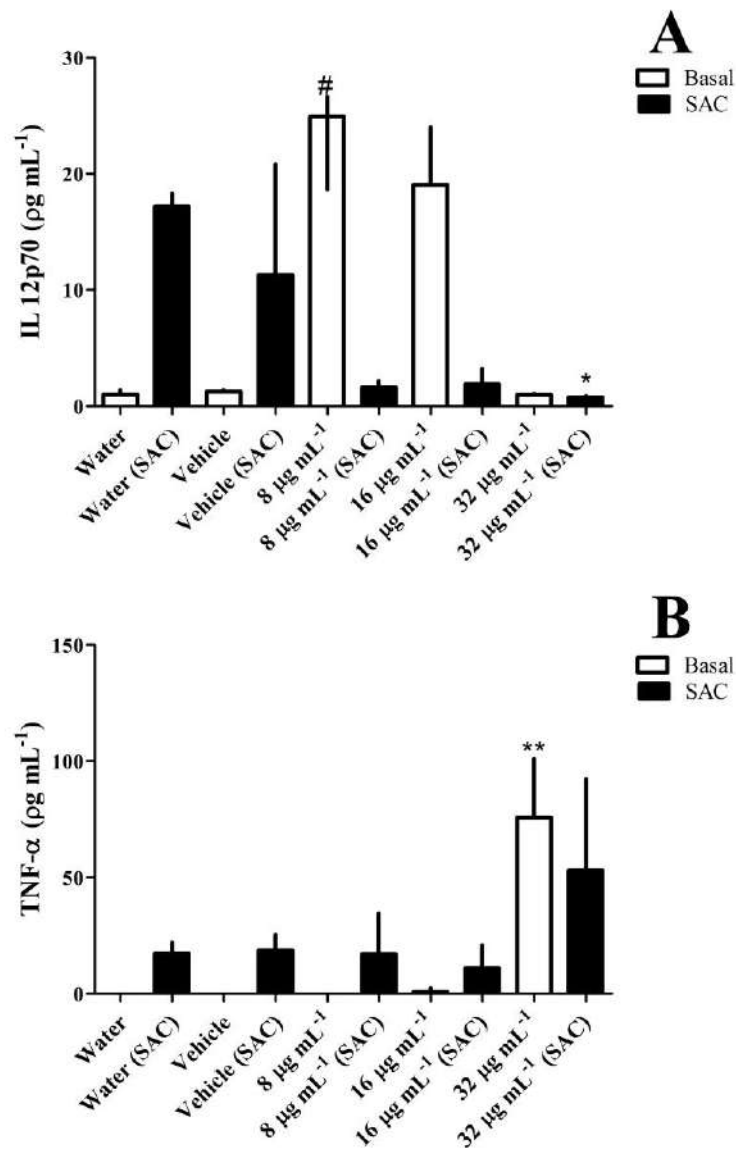


Fig. 6. Dosagem da capacidade de produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta ao estímulo da SAC no tratamento de camundongos com diferentes doses do extrato metanólico do veneno de *R. marina*; **6A:** IL-12p70 no tratamento de 7 dias; **6B:** TNF-α no tratamento de 30 dias; [#]Indica diferença em relação a água basal; ^{*}Indica diferença em relação a água com SAC; ^{**}Indica diferença significativa em relação ao basal da água, veículo, dose 8 µg mL⁻¹ e dose 16 µg mL⁻¹.

Quanto a capacidade de produção de citocinas *in vitro* não foi constatada diferença significativa na produção de IL-4 no tratamento de 7 dias ($H = 36,32$, $df = 5$) e 30 dias ($H = 27,72$, $df = 5$) (dados não mostrados). O mesmo se repetiu com a IL-10 no período de 7 dias ($H = 31,03$, $df = 5$) e 30 dias ($H = 19,27$, $df = 5$,) (dados não mostrados). A IL-4 e a IL-10 são

citocinas anti-inflamatórias pleiotrópicas que funcionam principalmente suprimindo as ações pró-inflamatórias (Chatterjee *et al.*, 2014). A IL-4 é uma citocina multifuncional que regula a imunidade inata e adaptativa, produzida pelas células T CD4 e CD8, células NKT, eosinófilos, mastócitos e basófilos (Gregory *et al.*, 2006). É importante na diferenciação de células Th2 e na limitação das respostas Th1 agindo sobre macrófagos ativados, reduzindo os efeitos das citocinas IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-8, e inibindo a produção de radicais livres (Oliveira *et al.*, 2011).

A IL-10 é um polipeptídeo não glicosilado expresso por muitos tipos de células no sistema imunológico e tecidos neuroendócrino e neural (Oliveira *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2020). Inibe as citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α , IL-1 e IL-6, produzidas por macrófagos e monócitos ativados, estimulando a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias (Oliveira *et al.*, 2011).

Ao contrário das citocinas anti-inflamatórias, observamos diferença significativa na produção de citocinas pró-inflamatórias. Aos 7 dias de tratamento a capacidade de produção de IL-12p70 em resposta ao estímulo da SAC foi reduzida no grupo tratado com a dose 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$, quando comparada ao controle com SAC, e elevada no grupo tratado com a dose 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ basal, em comparação ao controle basal e a dose 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ basal ($H = 42,70$, $df = 10$) (Figura 6A). A produção de IL-12p70 nos grupos tratados durante 30 dias não apresentou diferença (dados não mostrados). Essa citocina age no receptor específico expresso nas células NK e nos linfócitos T ativados (Lawrence *et al.*, 2006). Uma ação importante da IL-12p70 é a produção de IFN- γ que é uma citocina envolvida no combate a infecções por microrganismos intracelulares, por ser potente ativadora das funções de macrófagos, linfócitos T e neutrófilos (Holland, 2000; Lawrence *et al.*, 2006).

A produção de TNF- α também foi avaliada e não apresentou diferença significativa no tratamento de 7 dias ($H = 42,65$, $df = 10$) (dados não mostrados). Em contrapartida, a capacidade de produção de TNF- α foi significativa aos 30 dias de tratamento. A dose 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ basal foi maior que as doses basais 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bem como o controle basal e veículo basal ($H = 42,26$, $df = 10$) (Figura 6B). A TNF- α é produzida pelas células Th1 e macrófagos sendo a principal citocina mediadora do processo inflamatório (Santos *et al.*, 2010).

No processo inflamatório, os macrófagos agem como apresentadores de patógenos ao sistema imunológico, potencializando a ativação de linfócitos T e B e a produção de citocinas

pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e quimiocinas, além ainda de produzirem espécies reativas de oxigênio (EROs) e intermediários reativos de nitrogênio para contribuir com esse processo (Cruvinel *et al.*, 2010). Nesse contexto, a determinação de H₂O₂ e NO• após o tratamento contribui para identificar a ação dos macrófagos frente ao extrato metanólico do veneno de *R. marina*.

A produção de NO• não apresentou diferença significativa entre os grupos tratados, em todos os períodos experimentais (7 dias ($H = 2,09$, $df = 5$) e 30 dias ($H = 12,25$, $df = 5$)) (Figura 7A). A produção espontânea de H₂O₂ pelos macrófagos peritoneais não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados aos 7 dias ($H = 3,18$, $df = 5$) (Figura 7B). No tratamento de 30 dias, foi observado um aumento na produção de H₂O₂ na dose 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ quando comparada à dose 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($H = 14,07$, $df = 5$) (Figura 7B), entretanto não houve diferença em relação aos grupos controles.

De acordo com os resultados, a ação imunomoduladora do extrato do veneno parece se concentrar na modulação da atividade das células imunes quanto a produção de IL-12p70, aos 7 dias de tratamento, e TNF- α , aos 30 dias de tratamento.

A IL-12 e o TNF- α são citocinas importantes para o desenvolvimento das respostas imunes, pois favorecem a organização de respostas inatas capazes de orientar a formação de respostas imunes específicas mais eficientes (Abbas *et al.*, 2015). A IL-12 é uma citocina importante para o desenvolvimento de respostas imunes celulares, favorecendo a atividade de células NK e Th1 e a produção de IFN- γ (Trinchieri, 2003), enquanto que o TNF- α favorece o desenvolvimento do processo inflamatório importante para o recrutamento de células de defesa para o sítio da infecção (Santos *et al.*, 2010). É importante observar que o tratamento modulou a produção destas citocinas nos animais e este efeito pode estar relacionado aos danos teciduais observados microscopicamente, como consequência de um processo inflamatório de baixa intensidade (escores 1 e 2). O estímulo mitogênico utilizado na avaliação da dosagem de IL-12p70 e TNF- α é rico em componentes imunoestimuladores como peptidoglicanos e ácido lipoteicoico, sendo utilizado para o estímulo das funções de macrófagos em cultura (Zhu e Pisetsky, 2001). Os macrófagos são células fundamentais na resposta imunológica respondendo de forma imediata aos estímulos mediados por seus receptores de superfície e são importantes fontes de IL-12 e TNF- α na resposta imune inata (Abbas *et al.*, 2015). De fato, diversos produtos naturais são capazes de modular a ação dos

macrófagos a partir da interação com receptores de padrões moleculares, neste sentido Orsatti *et al.* (2009) e Pannacci *et al.* (2006) demonstraram o aumento de TLR4 em macrófagos peritoneais de animais tratados com própolis e ginseng.

Assim, a ação imunomoduladora do extrato metanólico obtido do veneno de *R. marina* parece ser como alvo principal os macrófagos, favorecendo a produção de IL-12 aos 7 dias de tratamento (dose 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ basal) e a produção de TNF- α aos 30 dias de tratamento (dose 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ basal).

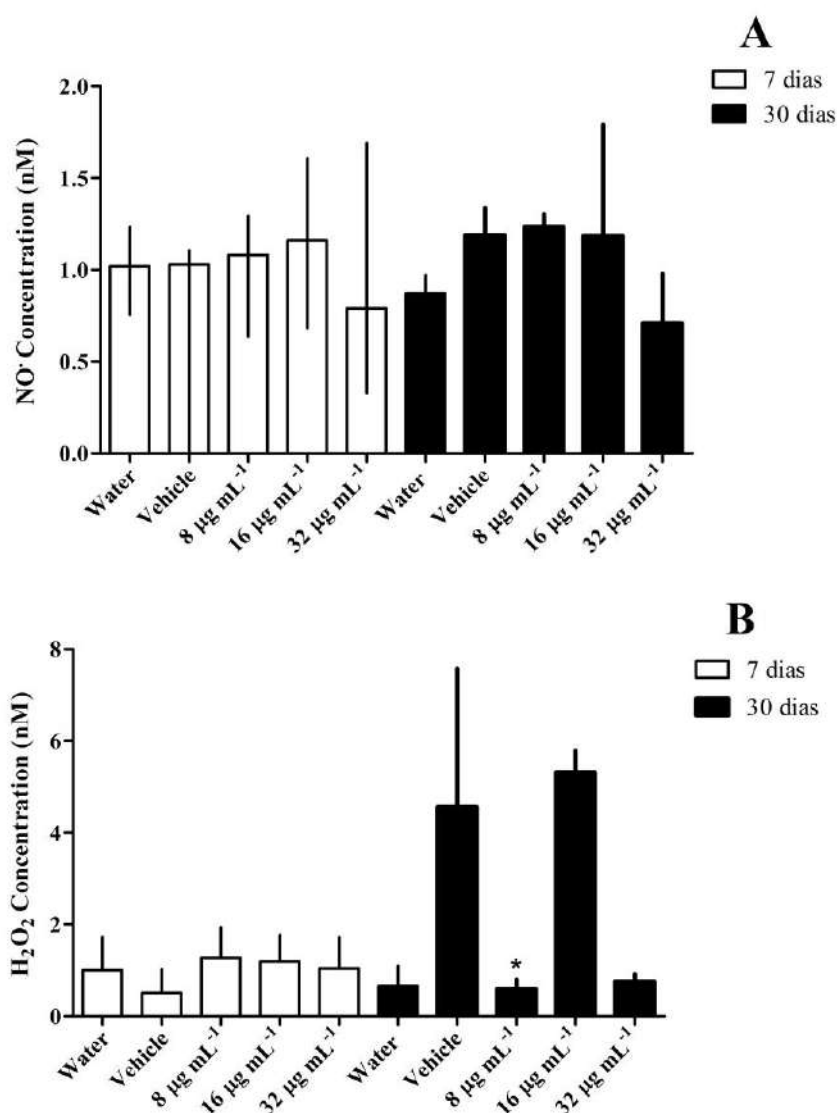


Fig. 7. Quantificação da produção de NO• e H₂O₂ a partir de macrófagos peritoneais de camundongos no tratamento com diferentes doses do extrato metanólico do veneno de *R. marina* no período de 7 e 30 dias; **7A:** NO•; **7B:** H₂O₂; *Indica diferença significativa em relação à dose 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (30 dias).

Associado ao estímulo inflamatório local podemos observar também a participação dos mecanismos de controle do estresse oxidativo com a atividade da CAT e da GSH.

Durante o período experimental avaliado, as alterações sistêmicas observadas nos animais parecem não ter afetado a resposta imunológica específica, uma vez que não observamos diferença na proliferação dos linfócitos e na produção de IL-4 e IL-10.

O efeito modulador sobre o sistema imunológico de compostos presentes no veneno de sapos já foi observado por Carvalho *et al.* (2019). Neste trabalho foi realizado estudo com o esteroide marinobufagina comparando a outros esteroides que possuem atividade imunomoduladora comprovada. Eles evidenciaram a atividade imunomoduladora da marinobufagina, sendo o esteroide capaz de modular negativamente parâmetros da resposta inflamatória como a migração celular, citocinas pró-inflamatórias e a produção de NO•, sem alterar a viabilidade celular de macrófagos em cultura (Carvalho *et al.*, 2019).

É possível que o tratamento crônico superior a 30 dias pudesse induzir danos mais evidentes e permitisse diferenciar melhor os mecanismos associados à ação sobre o sistema imunológico. Neste sentido, é interessante a realização de novos estudos para investigar os efeitos do tratamento prolongado com o extrato, bem como a interação de seus compostos com os receptores presentes no macrófago.

4. CONCLUSÃO

Através do estudo do perfil químico do extrato do veneno de *R. marina*, pode-se detectar 15 compostos, sendo que os que apresentaram maior concentração estão divididos em quatro classes: alcaloide indólico, argininilas derivadas, esteroides cardioativos e esteroides ligados a argininilas. Nesse primeiro estudo, os resultados dos parâmetros do estresse oxidativo demonstram apenas diferenças entre as doses, o que não permite a confirmação do efeito antioxidante. O extrato foi capaz de modular a produção de citocinas nos animais tratados e este efeito pode estar relacionado aos danos teciduais observados microscopicamente. Esses resultados são bastante positivos, visto que demonstram que as moléculas presentes no extrato metanólico do veneno de *R. marina* apresentam potencial biotecnológico validando a hipótese que os venenos desses anfíbios são fontes ricas de compostos bioativos. Estudos são necessários tanto para o avanço no conhecimento dessas

moléculas a fim de explorar os mecanismos de ação das mesmas como para contribuir com o conhecimento anurofauna brasileira.

5. REFERÊNCIAS

- Abbas, Abul K.; Lichtman, Andrew H.; Pillai, Shiv.. Imunologia celular e molecular. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- AmphibiaWeb: Information on Amphibian Biology and Conservation. Berkeley, Califórnia. Disponível em: < <https://amphibiaweb.org/>> Acesso em 7 de agosto de 2019.
- Ballesteros, M.L; Wunderlin, D.A.; Bistoni, M.A. 2209. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 199-205.
- Banfi, F. F., Guedes, K.E.S., Andrighetti, C.R., Aguiar, A.C., Debiasi, B.W., Noronha, J.A.C., Rodrigues, D. J., Júnior, G.M., Sanchez, B.A. Antiplasmodial and cytotoxic activities of toad venoms from southern amazon, Brazil, *Korean J. Parasitol.* 54 (4) (2016) 415–421. <http://dx.doi.org/10.3347/kjp.2016.54.4.415>
- Barbosa, K. B. F.; Costa, N. M. B.; Alfenas, R. de C. G.; Paula, S. O. de; Minim, V. P. R.; Bressan, J.. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.*, Campinas , v. 23, n. 4, p. 629-643, Aug. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>.
- Berno, L.I.; Poeta, P.T.; Maróstica Junior, M.R. Efeitos do Selênio Oriundo da Torta de Castanha-do-Brasil Sobre a Concentração de Glutathione Reduzida (GSH) Em Ratos Wistar. *Alim. Nutr.*, Araraquara. v. 21, n. 2, p. 231- 239, abr./jun. 2010.
- Boscolo, O. H.; Mendonça-Filho, R. F. W.; Menezes, F. S.; Senna-Valle, L. Potencial antioxidante de algumas plantas de restinga citadas como medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinas* v.9, n.1, p.8-12, 2007.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Buege, JA, Aust, SD, 1978 Microsomal lípido peroxidação. *Métodos Enzymol.* 52, 302 - 310. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).
- Carocho, M.; Ferreira, I. C. F. R. "A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives". *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Carvalho, D. C. M.; Cavalcante-Silva, L. H. A.; LIMA, E. ; GALVAO, J. G. ; ALVES, A. K. de A.; Feijo, P. R. O. ; Quintas, L. E. M. ; Rodrigues-Mascarenhas, S. . Marinobufagenin Inhibits Neutrophil Migration and Proinflammatory Cytokines. *Journal of Immunology Research*, v. 2019, p. 1-11, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/1094520>
- Chatterjee P , Chiasson VL , Bounds KR , Mitchell BM . Regulação das citocinas anti-inflamatórias interleucina-4 e interleucina-10 durante a gravidez . *Front Immunol* 2014 ; 5 : 253
- Coe, M. T., Marthews, T. R., Costa, M. H., Galbraith, D. R., Greenglass, N. L., Imbuzeiro, H. M., ... Wang, J. (2013). Deforestation and climate feedbacks threaten the ecological integrity of south–southeastern Amazonia. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368, 20120155. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2012.0155>

- Costa-Lotufo, L. V.; Montenegro, R. C.; Alves, A. P. N. N., Madeira, S. V. F.; Pessoa, C.; Moraes, M. E. A.; Moraes, M. O. Rev. Virtual Quim. 2010, 2, 47.
- Cruvinel, W. M.; Mesquita-Júnior, D.; Araújo, J. A. P.; Catelan, T. T. T.; Souza, A. W. S.; Silva, N. P.; Andrade, L. E. C. 2010. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. Revista Brasileira de Reumatologia, 50, 434-464.
- Cunha-Filho, G.A., Resck, I.S., Cavalcanti, B.C., Pessoa, C.O., Moraes, M.O., Ferreira, J.R., Rodrigues, F.A., Dos Santos, M.L., 2010. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. Toxicon 56, 339–348. doi:10.1016/j.toxicon.2010.03.021
- Cunha-Filho, G.A., Schwartz, C.A., Resck, I.S., Murta, M.M., Lemos, S.S., Castro, M.S., Kyaw, C., Pires Jr., O.P., Leite, J.R.S., Bloch Jr., C., Schwartz, E.F., 2005. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the *Bufo rubescens*. Toxicon 45, 777-782. doi:10.1016/j.toxicon.2005.01.017
- Duan, W., Chan, J.H., Wong, C.H., Leung, B.P., Wong, W.S.. Anti-inflammatory effects of mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor U0126 in an asthma mouse model, J. Immunol. 172 (11) (2004) 7053–7059.
- Ferreira, P.M.P., Lima, D.J.B., Debiassi, B.W., Soares, B.M., Machado, K.C., Noronha, J.C., Rodrigues, D.J., Sinhorin, A.P., Pessoa, C., Vieira-Junior, G.M., 2013. Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* venom extracts from Southern Amazon. Toxicon 72, 43e51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.06.009>
- Frost, D.R., 2015. Amphibian Species of the World: an Online Reference. American Museum of Natural History, New York, USA. Version 6.0 (Date of access). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.
- Gao, H., Zehl, M., Leitner, A., Wu, X., Wang, Z., Kopp, B., 2010. Comparison of toad venoms from different *Bufo* species by HPLC and LC-DAD-MS/MS. Journal of Ethnopharmacology 131, 368–376.
- Garcia, I. J. P., Olivera, G. C. de, Valadares, J. M. de M., Banfi, F. F., Andrade, S. N., Freitas, T. R., Filho, E. dos S. M., Santos, H. de L., Junior, G. M. V., Chaves, M. H., Rodrigues, D. de J., Sanchez, B. A. M., Varotti, F. P., Barbosa, L. A. New bufadienolides extracted from *Rhinella marina* inhibit Na,K-ATPase and induce apoptosis by activating caspases 3 and 9 in human breast and ovarian cancer cells, Steroids, Volume 152, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.108490>.
- Gaur, K.; Kori, M.L.; Nema, R. K. 2009. Comparative screening of immunomodulatory activity of hydro-alcoholic extract of hibiscus *Rosa sinensis* Linn. and ethanolic extract of *Cleome gynandra* Linn. Global Journal Pharmacol, 3, 85-89.
- Gebicka, L, Krych-Madej, J., (2019) The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress, Journal of Inorganic Biochemistry, Volume 197, 110699, doi:10.1016/j.jinorgbio.2019.110699
- Grant, T., Chemical Defense In Poison Frogs. Toxicon 168, 2019.
- Green, L. C.; De Luzuriaga, K. R.; Wagner, D. A.; Rand, W.; Istfan, N.; Young, V. R.; Tannenbaum, S. R. 1981. Nitrate biosynthesis in man. Proceedings of the National Academy of Sciences, 78, 7764-7768.
- Gregory GD, Raju SS, Winandy S, Brown MA. A expressão da IL-4 nos mastócitos é regulada por Ikaros e influencia as respostas encefalitogênicas Th1 no EAE. J Clin Invest (2006) 116 (5): 1327–36. doi: 10.1172 / JCI27227

- Habig, WH, Pabst, MJ, Jakoby, WB, 1974. A glutathione S - transferase, a primeira enzima na formação de ácido mercaptúrico. J. Biol. Chem. 249, 7130 - 7139.
- Haddad, C.F.B.; Giovanelli, J.G.R.; Alexandrino, J. 2008. O aquecimento global e seus efeitos na distribuição e declínio dos anfíbios. Pp. 195-206. In: M.S. Buckeridge (Ed.) A biologia e as mudanças climáticas no Brasil. RiMa Editora, São Carlos. 316p.
- Holland, S.M. Treatment of infections in the patient with Mendelian susceptibility to mycobacterial infection. Microbes Infect 2000; 2: 1579-90.
- Jared, C., Antoniazzi, M.M., Jordão, A.E.C., Silva, J.R.M.C., Greven, H., Rodrigues, M.T. 2009. Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): Their structure and functioning in passive defense. Toxicon, 54: 197-207. 25. doi:10.1016/j.toxicon.2009.03.029
- Kerkhoff, J.; Noronha, J. Da C.; Bonfilio, R.; Sinhorin, A. P.; Rodrigues, D. De J.; Chaves, M. H.; Junior, G. M. V. Quantification of bufadienolides in the poisons of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* by HPLC-UV. Toxicon, 119, 311-318, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.07.003>
- Krinski K, Elsangedy HM, Colombo HB, Cosme F, Soares IA, Campos W, et al. Efeitos do exercício físico no sistema imunológico. Rev. bras. med. 2010; 67(7): 228-233.
- Lambeth, J. D.; Neish, A. S. "Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression". Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 9, 119. 2014.
- Lawrence, T. C., Flores, J. V. F., Costa-Carvalho, B. T.. Cytokines and leukocyte microbicidal defects. Rev. bras. Alerg. Immunopatol., Vol. 29, nº 4, 2006.
- Leonarduzzi, G.; Sottero, B.; Poli, G. "Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited". Pharmacology & Therapeutics, 128, 336. 2010.
- Lewinsohn, T.M.; Prado, P.I. Biodiversidade Brasileira: síntese do estado atual do conhecimento. Brasília: Editora Contexto. 2002
- Lima, F.O.; Bezerra, A.S. Flavonoides e radicais livres. Disciplinarum Scientia, v.13, n.1, p.111-124, 2012.
- Machado, K da C.; Sousa, L. Q. de, Lima, M. J. B., Soares, B. M., Cavalcanti, B. C., Maranhão, S. S., Noronha, J. da C. de, Rodrigues, D. de J., Militão, G. C. G., Chaves, M. H., Vieira-Júnior, G. M., Pessoa, C., Moraes, M. O. de, Sousa, J. M. de C. e, Melo-Cavalcante, A. A. de C., Ferreira, P. M. P., Marinobufagin, uma molécula de sapos venenosos, causam alterações bioquímicas, morfológicas e do ciclo celular. neoplasias humanas e células vegetais, Toxicology Letters, 10.1016 / j.toxlet.2017.12.018, 285, (121-131), (2018)
- Martelli, F; Nunes, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. Cienc. Cult. vol.66 no.3 São Paulo Sept. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252014000300017>
- Medeiros, DS de, Rego, TB, Santos, APDA, Pontes, AS, Moreira-Dill, LS, Matos, NB, ... e Sperotto, ARDM (2019). Corrigenda sobre “Perfil bioquímico e biológico da secreção parotóide da marinha da *Rhinella* na Amazônia (Anura: Bufonidae)”. BioMed research international, 2019.
- Meng, Q.; Yau, L.-F.; Lu, J.-G.; Wu, Z.-Z.; Zhang, B.-X.; Wang, J.-R.; Jiang, Z.H. Perfil químico e ensaio de citotoxicidade de bufadienolidos no veneno e na pele de sapos. J. Ethnopharmacol. 2016, 187, 74–82.
- Nelson, D.P., Kiesow, L.A., 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). Anal. Biochem. 49, 474–478.

- Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. J. *Nat. Prod.* 2020, 83, 770-803. DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285?ref=pdf>
- Nunes-Pinheiro, D. C. S.; Leite, A. K. R. de M.; Farias, V. M.; Braga, L. T.; Lopes, C. A. P. *Atividade Imunomoduladora Das Plantas Medicinais: Perspectivas Em Medicina Veterinária. Ciência Animal*, 13(1):23-32, 2003
- Oliveira, A. F.; Castoldi, L.; Vieira Junior, G. M.; Monção Filho, E. S.; Chaves, M. H.; Rodriques, D. J.; Sugui, M. M. 2019. Evaluation of antimutagenic and cytotoxic activity of skin secretion extract of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* (Anura, Bufonidae). *Acta Amazonica*, 49, 145-151.
- Oliveira, C.B., Sakata, R.K., Issy, A.M., Gerola, L. R., Salomão, R.; *Citocinas e dor*, *Rev. Bras. Anesthesiol.* 61 (2) (2011) 255–265.
- Orsatti, CL, Missima, F., Pagliarone, AC, Bachiega, TF, Búfalo, MC, Araújo, JP e Sforcin, JM (2009). Ação imunomoduladora da própolis na expressão viva dos receptores Toll 2 e 4 e na produção de citocinas pró-inflamatórias em camundongos. *Pesquisa em Fitoterapia*, n / a – n / a. doi: 10.1002 / ptr.3086
- Pannacci M, Lucini V, Colleoni F, Martucci C, Grosso S, Sacerdote P, Scaglione F. 2006. *Panax ginseng* C.A. Mayer G115 modulates pro-inflammatory cytokine production in mice throughout the increase of macrophage toll-like receptor 4 expression during physical stress. *Brain Behav Immun* 20: 546–551.
- Pereira, D.L.; Da Cunha, A.P.S.; Cardoso, C.R.P.; Da Rocha, C.Q.; Vilegas, W.; Sinhorin, A.P.; Sinhorin, V.D.G. 2018. Antioxidant and hepatoprotective effects of ethanolic and ethyl acetate stem bark extracts from *Copaifera multijuga* (Fabaceae) in mice. *Acta Amazonica*, 48: 347-357. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201704473>
- Petroselli, G., Raices, M., Jungblut, L. D., Pozzi, A. G. & Erra-Balsells, R. MALDI-MS argininy l bufadienolide esters finger print from parotoid gland secretions of *Rhinella arenarum*: Age, gender, and seasonal variation. *J. Mass Spectrom.* 53, 465–475 (2018). DOI: 10.1002/jms.4082
- Pick, E.; Mizel, D. 1981. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *Journal of immunological methods*, 46, 211-226
- Pinto, A. C.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. A. *Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. Quim. Nova* 2002, 25, 45.
- Pires, O. C., Taquemasa, A. V. C., Akisue, G., Oliveira, F. De O., Araújo, C. E. P. *Análise Preliminar Da Toxicidade Aguda E Dose Letal Mediana (DL50) Comparativa Entre Os Frutos De Pimenta-Do-Reino Do Brasil (Schinus Terebinthifolius Raddi) E Pimenta Do Reino (Piper Nigrum L.) Acta Farm. Bonaerense* 23 (2): 176-82 (2004).
- Qi, T. et al. Identifying gene targets for brain-related traits using transcriptomic and methylomic data from blood. *Nat. Commun.* 9, 2282 (2018)
- Samudrala, P.K.; Augustine, B.B.; Kasala, E.R.; Bodduluru, L.N.; Barua, C.; Lahkar, M. 2015. Evaluation of antitumor activity and antioxidante status of *Alternanthera brasiliana* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Pharmacognosy Research*, 7: 66-73.
- Sani M, Sebai H, Gadacha W, Boughattas NA, Reinberg A, and Mossadok BA. Catalase activity and rhythmic patterns in mouse brain, kidney and liver. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 145: 331–337, 2006.
- Santos, Carlos José Crêspo. Recursos naturais brasileiros. Centro de Estudos Estratégicos do Exército: Artigos Estratégicos, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 89-111, jul. 2016. ISSN 2525-7099. Disponível em:

- <<http://www.ebrevistas.eb.mil.br/index.php/CEEExArE/article/view/1197>>. Acesso em: 06 ago. 2019.
- Santos, P.P. de A.; Freitas, V.S.; Freitas, R. de A.; Pinto, L. P.; Souza, L.B. de. Relationship between mast cells and T cells in inflammation. *Odontol. Clin.-Cient., Recife*, 9 (3) 215-217, 2010.
- Schmeda-Hirschmann, G., Gomez, C.V., Arias, A.R., Burgos-Edwards, A., Alfonso, J., Rolon, M., Brusquetti, F., Netto, F., Urrea, F.A., Cárdenas, C., 2017. The Paraguayan *Rhinella* toad venom: Implications in the traditional medicine and proliferation of breast cancer cells. *J. Ethnopharmacol.* 199, 106-118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.047>
- Schmeda-Hirschmann, G., Quispe, C., Arana, G.V., Theoduloz, C., Urrea, F.A., Cárdenas, C., 2016. Antiproliferative activity and chemical composition of the venom from the Amazonian toad *Rhinella marina* (Anura: Bufonidae). *Toxicon* 121:119-129. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.09.004>
- Schmeda-Hirschmann, G., Quispe, C., Theoduloz, C., Sousa-Júnior, P.T., Parizotto, C., 2014. Antiproliferative activity and new argininy l bufadienolide esters from the “cururú” toad *Rhinella* (Bufo) *schneideri*. *J. Ethnopharmacol.* 155, 1076e1085. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.06.025>
- Sciani, J.M., Angeli, C.B., Antoniazzi, M.M., Jared, C., Pimenta, D.C., 2013. Differences and similarities among parotoid macrogl and secretions in South American toads: a preliminary biochemical delineation. *Sci. World J.* 2013, 937407. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/937407>.
- Sedlack, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfydryl groups in tissue with Ellman’s reagent. *Analytical Biochemistry* 25, 192–205.
- Tang, N .; Shi, L .; Yu, Z .; Dong, P .; Wang, C .; Huo, X .; Zhang, B .; Huang, S .; Deng, S.; Liu, K. Gamabufotalin, um importante derivado do bufadienolide, inibe a angiogênese induzida por VEGF, suprimindo a via de sinalização de VEGFR-2. *Oncotarget* 2016 , 7 , 3533.
- Tempone, AG, Pimenta, DC, Lebrun, I., Sartorelli, P., Taniwaki, NN, de Andrade Jr., HF, Antoniazzi, MM, Jared, C.; Atividade antileishmanial e antitrypanosomal de bufadienolidos isolados do sapo *Rhinella jimi* parotóide macrogl and secretion. *Toxicon* , 52 (2008) , pp. 13 - 21
- Trinchieri, G.. Interleukin-12 And The Regulation Of Innate Resistance And Adaptive Immunity. *Nature Reviews*, v. 3, p. 133-146, 2003. doi:10.1038/nri1001.
- Wang, S., Wang, J., Ma, R., Yang, S., Fan, T., Cao, J., ... Zhang, H. (2020). A IL-10 melhora a sobrevivência das células T e está associada a recaídas mais rápidas em pacientes com colite ulcerativa inativa. *Molecular Immunology*, 121, 92-98. doi: 10.1016 / j.molimm.2020.03.001
- Wiernsperger, N.F., 2003. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab.* 29, 579–585.
- Yoshika, M., Komiyama, Y., Konishi, M., Akizawa, T., Kobayashi, T., Date, M., Kobatake, S., Masuda, M., Masaki, H., Takashi, H., 2007. Novel digitalis-like factor, marinobufotoxin, isolated from cultured Y-1 cells, and its hypertensive effect in rats. *Hypertension* 49, 209–214. DOI: 10.1161/01.HYP.0000250433.64202.78
- Zhu, Fu-Gang; Pisetsky, D. S.; Role of the Heat Shock Protein 90 in Immune Response Stimulation by Bacterial DNA and Synthetic Oligonucleotides. *Infection and immunity*, V. 69, Nº 9, p. 5546-5552, 2011. DOI: 10.1128/IAI.69.9.5546–5552.2001
- Zimmermann AM, Kirsten VR. Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas: uma abordagem clínica. *Disc Scientia*. 2008; 9(1):51-68.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO
GROSSO
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

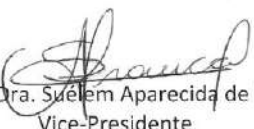
Certificamos que o Protocolo Nº 23108.918243/2017-50, sobre “Estudo químico e bioatividade dos extratos obtidos pela secreção cutânea de bufonídeos da Amazônia Legal”, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Adilson Paulo Sinhorin**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de **23/03/2018**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108.918243/2017-50, entitled “Estudo químico e bioatividade dos extratos obtidos pela secreção cutânea de bufonídeos da Amazônia Legal”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on **March 23, 2018**.

Cuiabá-MT, 02 de abril de 2018.


Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar
Presidente


Profa. Dra. Suellem Aparecida de França
Vice-Presidente

Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT
Cidade Universitária – Av. Fernando Correa da Costa, 2.367
Bairro Boa Esperança – CEP 78060-900 – CUIABÁ-MT, Brasil.

Telefone: (65) 3615 8829
Fax.: (65) 3615 8264
E-mail: ceua@ufmt.br

ANEXO 2



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº ACC9622

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **ACC9622**

Usuário: **Quintino Moura Dias Júnior**

CPF/CNPJ: **889.191.881-49**

Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**

Finalidade do Acesso:



Pesquisa Científica



Bioprospecção



Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Rhinella marina

Rhinella jimi

Rhaebo guttatus

Rhinella schneideri

Rhinella mirandaribeiroi

Rhinella margaritifera

Phyllomedusa camba

Trachycephalus typhonius

Título da Atividade:

Avaliação do potencial farmacológico de secreção de anuros amazônicos das famílias Bufonidae, Dendrobatidae e Hylidae empregando em modelos experimentais in vivo e in vitro.

ANEXO 3



TOXICON

An Interdisciplinary Journal on the Toxins Derived from Animals, Plants and Microorganisms

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.2
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.3
• Guide for Authors	p.5



ISSN: 0041-0101

DESCRIPTION

Toxicon has an open access mirror *Toxicon: X*, sharing the same aims and scope, editorial team, submission system and rigorous peer review. **An introductory offer *Toxicon: X* - full waiver of the Open Access fee.**

Toxicon's "aims and scope" are to publish: articles containing the results of original research on problems related to toxins derived from animals, plants and microorganisms papers on novel findings related to the **chemical, pharmacological, toxicological, and immunological** properties of natural **toxins** **molecular biological** studies of toxins and other **genes** from **poisonous** and **venomous** organisms that advance understanding of the role or function of toxins clinical observations on poisoning and envenoming where a new therapeutic principle has been proposed or a decidedly superior clinical result has been obtained. material on the use of toxins as tools in studying biological processes and material on subjects related to **venom** and **antivenom** problems. articles on the translational application of toxins, for example as drugs and insecticides epidemiological studies on envenoming or poisoning, so long as they highlight a previously unrecognised medical problem or provide insight into the prevention or medical treatment of envenoming or poisoning. Retrospective surveys of hospital records, especially those lacking species identification, will not be considered for publication. Properly designed prospective community-based surveys are strongly encouraged. articles describing well-known activities of venoms, such as antibacterial, anticancer, and analgesic activities of arachnid venoms, without any attempt to define the mechanism of action or purify the active component, will not be considered for publication in *Toxicon*. review articles on problems related to **toxinology**.

To encourage the exchange of ideas, sections of the journal may be devoted to Short Communications, Letters to the Editor and activities of the affiliated societies.

Toxicon strives to publish articles that are current and of broad interest and importance to the toxinology research community. Emphasis will be placed upon articles that further the understanding and knowledge of toxinology.

Types of paper

Full-Length Research Papers: Articles containing the results of original research on problems related to toxins derived from animals, plants and microorganisms.

Short Communications: Short communications differ from full manuscripts only in that the research study does not lend itself to an extended presentation. Even though brief, the Short communication should represent a complete, coherent and self contained study. The quality of Short Communications is expected to be as good as that of full articles, and both full articles and Short communications will be refereed in an identical manner. The form is identical to that for a full article except that the report should not be divided into Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. An abstract of not more than 75 words should be provided. The Short Communication may not be longer than five double-spaced typewritten pages (not including references, tables and figures) and should include not more than two tables of two figures or one of each.

Letters to the Editor: These may be published if judged by the Editor to be of interest to the broad field of toxinology or of special significance to a smaller group of workers in a specialized field of toxinology. They should be headed 'Letter to the Editor' which should be followed by a title for the communication. Names of authors and affiliations should be at the end of the letter.

Announcements: *Toxicon* will only accept for publication announcements of great interest to toxinologists, such as notices of relevant meetings and symposia and activities of the International Society of Toxinology, The Brazilian Society of Toxinology, and the North American Society of Toxinology.

Reviews and mini-Reviews: *Toxicon* will publish reviews and mini-reviews on topics of interest to toxinologists. Suggestions for reviews or mini-reviews can be made at any time to the Editor-in-Chief or the relevant Associate Editor. In addition, articles of significant broad interest to toxinologists that are published in journals other than *Toxicon* may be abstracted in the Reviews section of *Toxicon*. Readers who feel that a particular article or book should be abstracted in this section are encouraged to bring their opinion to the attention of one of the Editor-in-Chief.

Clinical reports: *Toxicon* will publish clinical reports on poisoning or envenoming where a new therapeutic principle has been proposed or a decidedly superior clinical result has been established. Please consult the Clinical Reports Guidelines

AUDIENCE

Toxicologists, toxinologists, molecular biologists and chemists.

IMPACT FACTOR

2018: 2.276 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2019

ABSTRACTING AND INDEXING

EMBiology
Research Alert
BIOSIS Citation Index
Elsevier BIOBASE
Cambridge Scientific Abstracts
Chemical Abstracts
Current Contents - Life Sciences
Embase
Current Contents
Pascal Francis
Current Contents
Current Contents
PubMed/Medline
Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Glenn King, University of Queensland Institute for Molecular Bioscience, Brisbane, 4072, Australia, Fax: +61 7 3346-2101

Honorary Editor-in-Chief

Alan L. Harvey, Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences, G4 0NR, Glasgow, United Kingdom, Fax: +44 141 552 8376

Associate Editors

Envenoming & Antivenoms

Jose Maria Gutiérrez, University of Costa Rica Faculty of Microbiology, 11501-2060, San Jose, Costa Rica

Bacterial Toxins

Ornella Rossetto, University of Padova Department of Biomedical Sciences, Via Ugo Bassi 58/B, 35121, Padova, Italy

Environmental Toxins

Brett A. Neilan, The University of Newcastle School of Environmental and Life Sciences, University Drive, Callaghan, 2308, Australia

Venom Toxins

Denise Tambourgi, Butantan Institute Immunochemistry Laboratory, 05503-900, SAO PAULO, Brazil

Plant Toxins

Kevin Welch, USDA-ARS Poisonous Plant Research, 1150 E 1400 N, Logan, Utah, UT 84341, United States

Editorial Council

Klaus Aktories, University of Freiburg Institute of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, Freiburg, Germany

Isaac Asuzu, University of Nigeria, Dept. of Veterinary Pharmacology and Physiology, Nsukka, Nigeria

Gregory L. Boyer, SUNY College of Environmental Science and Forestry Department of Chemistry, Syracuse, New York, United States

Bryan W. Brooks, Baylor University Institute of Biomedical Studies, Waco, Texas, United States

Juan Calvete, Biomedical Institute of Valencia, Valencia, Spain

Célia R. Carlini, Federal University of Rio Grande do Sul Department of Biophysics, PORTO ALEGRE, Brazil

Edmond E. Creppy, University of Bordeaux Faculty of Medical Sciences, Bordeaux, France

Frederic Ducancel, French Alternative Energies and Atomic Energy Commission Pharmacology and Immunoanalysis Unit, Gif-Sur-Yvette, France

Marc Edery, Communication Molecules and Adaptation of Micro-organisms, Paris, France

Jay Fox, Virginia Commonwealth University Department of Microbiology and Immunology, Richmond, Virginia, United States

Ponnampalam Gopalakrishnakone, National University Singapore Department of Anatomy, Singapore, Singapore

Robert Harrison, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, United Kingdom

Wayne Hodgson, Monash University Department of Pharmacology, Clayton, Victoria, Australia

Ryan Huxtable, University of Arizona College of Medicine, Tucson, Arizona, United States

Geoff Isbister, The University of Newcastle Faculty of Health and Medicine, Callaghan, Australia

Evanguedes Kalapothakis, Universidade Federal de Minas Gerais Departamento de Genetica Evolucao e Ecologia, BELO HORIZONTE, Brazil

William Kem, University of Florida Department of Pharmacology and Therapeutics, Gainesville, Florida, United States

R. Manjunatha Kini, NUS Department of Biological Sciences, Singapore, Singapore

Igor Krizaj, University of Ljubljana Faculty of Chemistry and Chemical Technology, Ljubljana, Slovenia

Michel Lazdunski, Institute of Molecular and Cellular Pharmacology, Valbonne, France

Richard Lewis, University of Queensland Institute for Molecular Bioscience, Brisbane, Australia

Francis Markland Jr., KECK SCHOOL OF MEDICINE UNV OF SC, Los Angeles, California, United States

Marie-France Martin-Eauclaire, Mediterranean University Hospital Institute for Infectious Diseases, Marseille, France

Dietrich Mebs, Hospital of the Goethe University Frankfurt Institute of Forensic Pathology, Frankfurt, Germany

Edward Moczydlowski, Sandia National Laboratories, Albuquerque, New Mexico, United States

Cesare Montecucco, University of Padova Department of Biomedical Sciences, Padova, Italy

Graham M. Nicholson, University of Technology Sydney School of Life Sciences, Broadway, New South Wales, Australia

Raymond S. Norton, Monash Institute of Pharmaceutical Sciences, Parkville, Australia

Baldomero Olivera, University of Utah Department of Biology, Salt Lake City, Utah, United States
Stephan Pflugmacher, Leibniz Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, Berlin, Germany
Mark A. Poli, United States Army Medical Research Inst. of Infectious Diseases (USAMRIID), Div. of Integrated Toxicology, Ft. Detrick, Maryland, United States
Lourival D. Possani, Biotechnology Institute, Morelos, Mexico
Solange M.T. Serrano, Butantan Institute Special Laboratory of Applied Toxinology, Sao Paulo, Brazil
W. Thomas Shier, University of Minnesota Department of Entomology, Saint Paul, Minnesota, United States
Kaarina Sivonen, University of Helsinki Department of Food and Environmental Sciences, HELSINKI, Finland
Toru Tamiya, Sophia University Faculty of Science and Technology Graduate School of Science and Technology Department of Chemistry, Chiyoda-Ku, Japan
Aurelia Tubaro, University of Trieste Department of Engineering and Architecture, Trieste, Italy
Jan Tytgat, KU Leuven Toxicology and Pharmacology, Leuven, Belgium
David Warrell, Nuffield Department of Clinical Medicine, Oxford, United Kingdom
Julian White, Women's and Children's Hospital Adelaide Department of Toxinology, North Adelaide, South Australia, Australia
Yun Zhang, Kunming Institute of Zoology Chinese Academy of Sciences, Kunming, China
Russolina Zingali, Federal University of Rio de Janeiro Institute of Medical Biochemistry, RIO DE JANEIRO, Brazil

International Society on Toxinology

Secretary-Treasurer

Julian White, Women's and Children's Hospital Adelaide Department of Toxinology, 72 King William Road, 7th Fl. Samuel Way Building, North Adelaide, S.A. 5006, South Australia, Australia, Fax: +61 8 8204 6049

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

[TOXICON] has an open access mirror journal, [TOXICON: X]

Official Journal of The International Society on Toxinology (<http://www.toxinology.org/>), *Toxicon's* "aims and scope" are laid down in the journal as:

To publish:

- articles containing the results of original research on problems related to toxins derived from animals, plants and microorganisms
- papers on novel findings related to the chemical, pharmacological, toxicological, and immunological properties of natural toxins
- molecular biological studies of toxin and other genes from poisonous and venomous organisms that advance understanding of the role or function of toxins
- clinical observations on poisoning and envenoming where a new therapeutic principle has been proposed or a decidedly superior clinical result has been obtained. *Toxicon* will not accept single-case reports unless they describe new, previously unreported, clinical features; envenomings or poisonings by rare animals, plants, fungi or microorganisms for which there is little or no clinical information in the literature; or treatment that employs a new therapeutic principle for which effectiveness is convincingly demonstrated. Such case reports must include: (1) expert species identification; (2) meticulous clinical documentation of symptoms, signs, laboratory data, treatment and clinical outcomes; (3) originality (adding to knowledge of the clinical phenotype); (4) where feasible, photographic documentation of clinical signs.
- material on the use of toxins as tools in studying biological processes and material on subjects related to venom-antivenom problems
- articles on the translational application of toxins, for example as drugs and insecticides
- epidemiological studies on envenoming or poisoning, so long as they highlight a previously unrecognised medical problem or provide insight into the prevention or medical treatment of envenoming or poisoning. Retrospective surveys of hospital records, especially those lacking species identification, will not be considered for publication. Properly designed prospective community-based surveys are strongly encouraged.
- articles describing well-known activities of venoms, such as antibacterial, anticancer, and analgesic activities of venoms, without any attempt to define the mechanism of action or purify the active component, will not be considered for publication in *Toxicon*
- review articles on problems related to toxinology.

And

To encourage the exchange of ideas, sections of the journal may be devoted to Short Communications, Letters to the Editor and activities of the International Society on Toxinology.

Toxicon strives to publish articles that are current and of broad interest and importance to the toxinology research community. Emphasis will be placed upon articles that further the understanding and knowledge of toxinology.

Types of paper

Full-Length Research Papers: Articles containing the results of original research on problems related to toxins derived from animals, plants and microorganisms.

Short Communications: Short communications differ from full manuscripts only in that the research study does not lend itself to an extended presentation. Even though brief, the Short communication should represent a complete, coherent and self contained study. The quality of Short Communications is expected to be as good as that of full articles, and both full articles and Short communications will

be refereed in an identical manner. The form is identical to that for a full article except that the report should not be divided into Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. An abstract of not more than 75 words should be provided. The Short Communication may not be longer than five double-spaced typewritten pages (not including references, tables and figures) and should include not more than two tables or two figures or one of each.

Correspondence: These may be published if judged by the Editor to be of interest to the broad field of toxicology or of special significance to a smaller group of workers in a specialized field of toxicology. They should be headed 'Correspondence' which should be followed by a title for the communication. Names of authors and affiliations should be at the end of the letter.

Reviews and Short Reviews: Articles of interest to toxicologists which are published in journals other than *Toxicon* may be abstracted in the Reviews section of *Toxicon*. Readers who feel that a particular article or book should be abstracted in this section are encouraged to bring their opinions to the attention of one of the Review Editors. Mini-Reviews and proposals for mini-Reviews are welcome

Case reports: *Toxicon* will publish clinical reports on poisoning where a new therapeutic principle has been proposed or a decidedly superior clinical result has been established. Please observe the following: Case Reports Guidelines.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; Uniform Requirements for manuscripts submitted to

Biomedical journals. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. For all experiments involving humans or animals, details of the appropriate ethics committee approval(s) must be provided

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors should complete the declaration of interest statement using this template and upload to the submission system at the Attach/Upload Files step. If there are no interests to declare, please choose: 'Declarations of interest: none' in the template. This statement will be published within the article if accepted. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Authors wishing to publish open access can choose to publish open access in [TOXICON: X] [<https://www.journals.elsevier.com/toxicon-x/>], the open access mirror journal of [TOXICON]. One, unified editorial team manages the peer-review for both titles using the same submission system. The authors choice of publishing model will determine in which journal, [TOXICON] or [TOXICON:X], the accepted manuscript will be published. The choice of publishing model will be blinded to referees, ensuring the editorial process is identical.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://ees.elsevier.com/toxcon/default.asp>. Please note that one, unified editorial team manages the peer-review for both [TOXICON] and [TOXICON:X] using the same submission system

Referees

The Editors welcome submissions by the authors of the names and addresses of up to five individuals who could expertly review the paper, and who are not from the same institutions as the authors. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure the text of your paper is double-spaced and has consecutive line numbering– this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the latest Elsevier article class to prepare your manuscript and BibTeX to generate your bibliography.

Our Guidelines has full details.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Experimental

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Experimental procedures

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. **All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines. More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.**

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation

addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/toxicon>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;

2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;

3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Taxonomy and toxin nomenclature

Authors should ensure that they are using the most up-to-date taxonomic description of any animal or plant described in their manuscript. For some taxa, up-to-date taxonomic information is readily available online (e.g., for spiders at <http://www.wsc.nmbe.ch>). For new, unidentified, or potentially cryptic species, a voucher specimen should be deposited in a natural history museum, or other facility, as appropriate.

Authors are encouraged to use rational nomenclature for all toxins described in their manuscript. *Ad hoc* naming schemes only serve to introduce confusion and make it difficult to compare toxins and establish evolutionary relationships. Suggested nomenclature has been published for spider toxins (King et al., *Toxicon* 52, 264–276, 2008; PMID 18619481), centipede toxins (Undheim et al., *Mol. Biol.*

Evol.31, 2124-2148, 2014; PMID 24847043), sea anemone toxins (Oliveira et al., *Toxicon* 60, 539-550, 2012; PMID 22683676), and some classes of scorpion toxins (Tytgat et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 444-447, 1999; PMID 10542442).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use this [template](#) to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the [MethodsX website](#). Please use this [template](#) to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.