



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Conservadorismo químico em *Adelphobates galactonotus* (Anura: Dendrobatidae): Cor, distância geográfica ou barreiras aquáticas não influenciam a diversidade das classes químicas da pele

Lucianne Cabral dos Santos Pereira

Manaus, Amazonas

Set/2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Conservadorismo químico em *Adelphobates galactonotus* (Anura: Dendrobatidae): Cor, distância geográfica ou barreiras aquáticas não influenciam a diversidade das classes químicas da pele

Aluna: Lucianne Cabral dos Santos Pereira

Orientadora: Profa. Dra. Albertina Pimentel Lima

Coorientadora: Profa. Dra. Cecilia Veronica Nunez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, da Universidade Federal do Amazonas/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Zoologia

Manaus, Amazonas

Set/2020

Ficha Catalográfica

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

P436c Pereira, Lucianne Cabral dos Santos
Conservadorismo químico em *Adelphobates galactonotus* (Anura: Dendrobatidae) : cor, distância geográfica ou barreiras aquáticas não influenciam na diversidade das classes químicas da pele / Lucianne Cabral dos Santos Pereira . 2020
30 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Albertina Pimentel Lima
Coorientadora: Cecília Verônica Nunez
Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. metabólitos secundários. 2. alcaloide. 3. anuros. 4. extratos de pele. I. Lima, Albertina Pimentel. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Agradecimentos

Agradeço a minha família por todo apoio incondicional.

As minhas orientadoras pela confiança em mim depositada.

Aos colegas do curso que compartilham da vontade de contribuir com a ciência.

A todos do Laboratório de Biotecnologia e Bioprospecção pelo companheirismo e toda ajuda prestada, em especial ao amigo André Barros, Ana Luisa Vázquez, Laila Pedroza, Maitê Fachin e Weison Lima.

Aos amigos Gleyce Kelly, Jhennyffer Alves e Antônio Alves por toda força e incentivo.

À Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais, principalmente ao Magno.

Aos professores de todas as disciplinas ministradas durante o curso.

À banca examinadora pela atenção e contribuição.

Resumo

Anuros Dendrobatidae que apresentam cores brilhantes e contrastantes com o ambiente usam as cores para alertar seus predadores sobre sua impalatabilidade. Variações de metabólitos secundários em suas peles tem sido relatadas e descritas, sendo a maioria focado na classe dos alcaloides. Neste estudo determinamos as potenciais classes químicas presentes no extrato de Diclorometano/Metanol (DCM/MeOH) da secreção cutânea de três morfotipos de *A. galactonotus*: marrom, laranja e verde-limão; assim como determinamos se a distância geográfica e o rio Xingu tem papel importante nas variações dos perfis químicos dessa espécie. Utilizamos Cromatografia em Camada Delgada Comparativa com diferentes reagentes para determinarmos os tipos potenciais de substâncias por classes químicas. As amostras foram submetidas ao método espectroscópico de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H para avaliação da sua complexidade química. Para evidenciarmos similaridades e/ou diferenças entre perfis químicos das amostras, utilizamos a análise multivariada de PCA/Fuzzy e uma análise hierárquica de *clusters*. Mostramos a presença das classes químicas de terpenos, esteroides e alcaloides. A análise multivariada PCA/Fuzzy revelou que houve diferenças na quantidade de substâncias no perfil de metabólitos nos extratos, dividindo-os em dois agrupamentos, embora não diferindo por morfotipo de cor. Nossos resultados evidenciaram que a composição química da secreção cutânea em *A. galactonotus* não sofrem efeitos da distância geográfica ou barreiras aquáticas.

Palavras chaves: metabólitos secundários; alcaloide; extratos de pele; anuros.

Abstract

Dendrobatidae anurans presenting bright colors, contrasting with the environment use those colors to alert their unpalatability to possible predators. Variations on secondary metabolites in their skin have been reported and described, with most studies focusing on alkaloids. In this study, we determined the potential chemical classes present in dichloromethane/methanol (DCM/MeOH) cutaneous secretion extracts from three *A. galactonotus* morphotypes: brown, orange and lime-green; as well as determined whether geographical distances and the Xingu river play important roles in chemical profile variations of that species. We used Thin Layer Chromatography with different reagents to determine potential types of substances by their chemical classes. The samples were submitted to ¹H Nuclear Magnetic Resonance to assess chemical profile. To show similarities and / or differences between chemical profiles of samples, we used multivariate Principal Component Analysis (PCA) / Fuzzy and hierarchical cluster analysis. We found the presence of terpenes, steroids and alkaloids. PCA / Fuzzy analysis revealed differences in the amount of substances in the metabolite profiles of extracts, dividing them into two groups which did not differ by color morphotype. Our results showed that chemical composition of cutaneous secretions in *A. galactonotus* does not suffer geographical distance or water barrier effects.

Key words: secondary metabolites; alkaloids; skin extracts; anurans.

Sumário

1. Introdução	8
2. Material e Métodos	9
3. Resultados	12
4. Discussão	23
5. Conclusão	25
6. Referência Bibliográfica	25

1. Introdução

As espécies da família Dendrobatidae são frequentemente coloridas com tons brilhantes de azul, vermelho, amarelo, preto, ou podem ser combinações dessas cores, associadas principalmente à coloração preta (Lindström 1999; Toledo e Haddad 2009). As espécies dessa família usam padrões brilhantes como advertência aos predadores sobre sua toxicidade ou impalatabilidade (Cott 1940; Endler 1991; Gamberale e Tulberg 1998, Silverstone 1975; Vences et al. 2000; Summers e Clough 2001; Grant et al. 2006; Maan e Cummings 2009). Esses animais contêm uma grande variedade de substâncias tóxicas armazenadas em glândulas na pele (Daly 1995), que os protegem de ataques predatórios, microbianos e parasitários. Dentre essas substâncias estão incluídas as aminas, peptídeos, esteroides e alcaloides, tanto hidrofílicos quanto lipofílicos e podem ser produzidos pelo próprio organismo ou sequestrados da dieta a partir da ingestão de alguns artrópodes (Daly 2003, 2004; Weldon et al. 2006; Saporito et al. 2012).

Os alcaloides são caracterizados por apresentarem um átomo de nitrogênio em uma cadeia cíclica, apresentarem baixo peso molecular (100 – 900 Da) e por possuírem uma distribuição limitada na natureza (Pelletier 1983). São encontrados principalmente em plantas, mas também foram relatados em cinco famílias de anuros: Bufonidae, Mantellidae, Myobatrachidae, Eleutherodactylidae e Dendrobatidae (Daly et al. 1987, Garraffo et al. 1993; Jones et al. 1999; Grant et al. 2006; Rodríguez et al. 2011).

Espécies de anuros nessas famílias têm uma diversidade de alcaloides com variação substancial entre populações (Clark et al. 2005; Daly et al. 2008; Darst e Cummings 2006; Saporito et al. 2006, Saporito et al. 2007a). As variações podem estar relacionadas a vários fatores, como a abundância das glândulas granulares, sexo, idade, tipo de habitat e localização geográfica, assim como à variação química (Patrick e Sasa 2009; Wang 2011; Maan e Cummings 2012).

Dentre os dendrobatídeos, *Adelphobates galactonotus* Steindachner (1864) é um sapo endêmico do Brasil, podendo ser encontrado principalmente nos estados do Pará, a oeste do Maranhão, norte do Mato Grosso e norte de Tocantins (Frost 2019). É colorido e com grande variação de cor intraespecífica, como: preto com grandes áreas laranja, vermelho, amarelo, azul claro, branco e creme (Hoogmoed e Avila-Pires 2012), apresentando cor única em cada localidade (politipismo). No estudo realizado por Rojas et al. 2015, não foi encontrado evidencia que as cores em *A. galactonotus* serviam como advertência contra os seus respectivos predadores, uma vez que os modelos de cor local foram igualmente atacados que os de cor não local e os marrons menos atacados. No

entanto, os experimentos foram realizados com modelos fixos (sem movimento), e nesse caso é esperado que a cor marrom fosse mais camuflada, e portanto, menos predada que cores mais contrastantes como laranja ou azul (Paluh et al. 2014).

Jeckel et al. (2019) mostraram através das técnicas de espectrometria de massas e cromatografia em fase gasosa que os morfotipos laranja e azul de *A. galactonotus* da Baía de Caxiuanã possuem alguns tipos de alcaloides, e que esses não diferem entre as cores azul e laranja, apesar do isolamento local. Esses resultados se mostraram contrários ao encontrado por Saporito et al. (2006) para duas populações de *Oophaga pumilio*, no qual os tipos de alcaloides mudam com a distância geográfica e por Lawrence et al. (2019) para *Dendrobates tinctorius* que apresentaram diferenças na composição de alcaloides entre os morfotipos, respectivamente.

O rio Xingu foi considerado como uma barreira geográfica para troca gênica entre as populações de *A. galactonotus* (Rojas et al. 2019), porém não se sabe o quanto isto reflete a diversidade química presente no tegumento desta espécie. No estudo realizado por Jeckel et al. (2019) foi avaliado somente os alcaloides de dois morfotipos azul e laranja do lado leste do rio Xingu, em duas localidades isoladas por barreira aquática, mas relativamente próximas uma da outra. Dessa forma, há escassez de dados na literatura acerca das potenciais diferenças entre outros tipos de metabólitos secundários presentes em populações de *A. galactonotus* com diferentes padrões de cor, distância geográfica e clados distintos. Portanto, este estudo tem como objetivo determinar as potenciais classes químicas presentes na secreção cutânea de três morfotipos de *A. galactonotus*, morfotipos marrom, laranja e verde-limão, assim como determinar se a distância geográfica e o rio Xingu tem papel importante nas variações dos perfis químicos dessa espécie.

2. Material e Métodos

2.1 Área de estudo

Os indivíduos foram coletados no estado do Pará, Brasil. Para este estudo foram determinadas por nós três categorias de cores: 1- laranja, dois indivíduos com dorso laranja, sendo a lateral e barriga de cor preta, coletados em uma localidade no município de Itaituba (trilha MU2, no médio rio Tapajós - 5°59'02" S, 57°35'19" W). 2- marrom, dois indivíduos com dorso marrom, sendo lateral e barriga de cor laranja, coletados no município de Portel (igarapé Marapiranga, rio Anapú - 2°24'10.7"S, 51°14'01.4"W) e 3-

verde-limão, dois indivíduos com dorso verde-limão, sendo a lateral e barriga de cor preta, coletados no município Trairão (Sítio seu Antônio – Vicinal 24, S04° 52.895', W056° 09.739'). As três cores estão apresentadas na Figura 1.

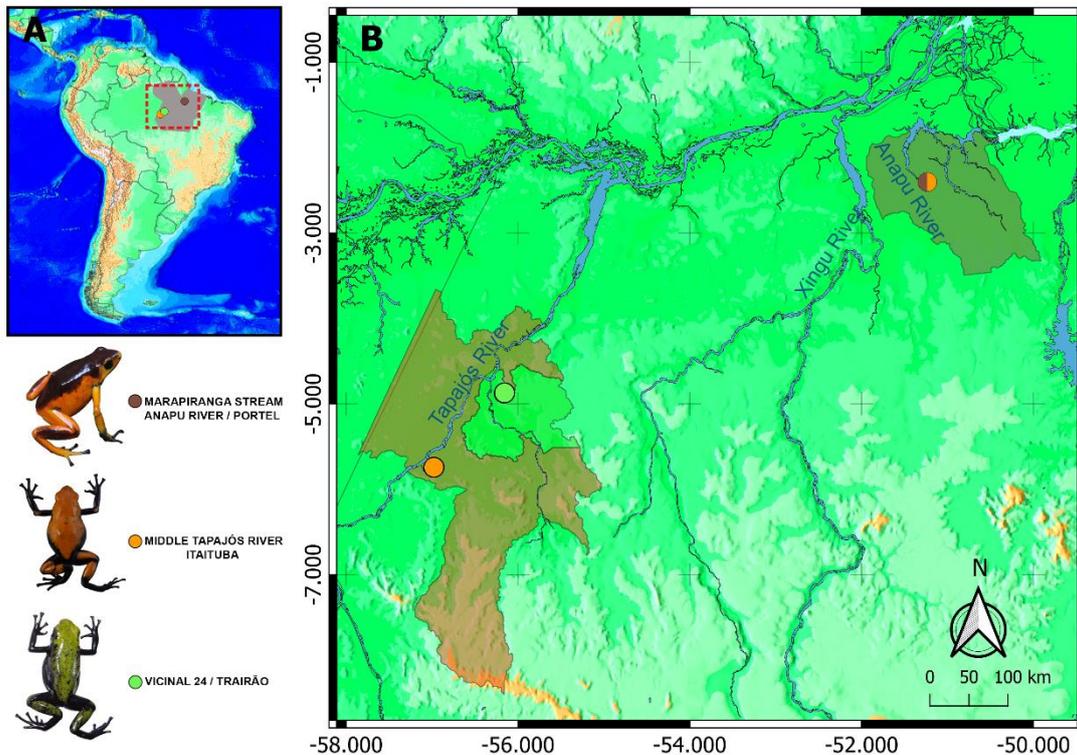


Figura 1. (A) Localização geográfica dos três locais de estudo no estado do Pará (área cinzenta), Brasil. (B) Localidades onde foram coletados indivíduos de *Adelphobates galactonotus*: 1) Município de Portel (Ponto marrom/laranja), igarapé Marapiranga, onde foram coletadas amostras de cor Marrom; 2) Município de Itaituba (ponto laranja), no médio rio Tapajós, onde foram coletadas amostras de cor laranja; e 3) Município de Trairão (ponto verde), onde foram coletadas amostras de cor limão-verde. Na lateral foto dos três morfotipos.

2.2 Obtenção dos extratos da pele

Os animais foram mortos com aplicação de gel anestésico a base de benzocaína (Benzotop® in gel, 2%) diretamente no interior da boca dos animais, evitando assim a contaminação das peles, que foram retiradas imediatamente após a confirmação da morte dos animais, para que não houvesse penetração do anestésico pela pele e conversão/absorção (de Lima Barros et al., 2020 submetido). Para isso, foi realizada uma incisão inguinal de uma extremidade a outra do corpo dos indivíduos. As peles retiradas foram acondicionadas em frascos contendo metanol (100%). Posteriormente, as substâncias presentes nas peles dos indivíduos de *A. galactonotus* foram extraídas utilizando uma combinação de solventes, diclorometano (DCM) + metanol (MeOH), em uma proporção 1:1 (v/v). Essa proporção foi calculada para 1 g de pele/10 mL de solvente.

Analizamos as peles individualmente, por localidade, onde cada uma foi levada ao banho de ultrassom por 20 minutos sendo posteriormente filtrada. Esse processo foi repetido por três vezes e o concentrado armazenado em um único frasco. Para evaporação total dos solventes as amostras foram mantidas em capela por um período de 48 horas.

2.3 Análises da composição química dos extratos da pele

Os extratos foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), empregando cromatoplasmas de alumínio contendo sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV (marca Macherey – NAGEL – MN). A eluição das cromatoplasmas foi realizada utilizando os solventes DCM/MeOH em uma proporção 9:1 (v/v). Utilizamos reveladores físicos em dois comprimentos de onda (254 nm e 365 nm) e químicos (anisaldeído sulfúrico, 2-aminoetil difenilborinato/polietilenoglicol (NP/PEG), cloreto férrico, cloreto de alumínio, sulfato cérico e reagente de Dragendorff). Estes reveladores foram utilizados para indicar os tipos potenciais das classes químicas presentes nas amostras. Cada uma das amostras, solubilizadas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆), foi analisada pelo método espectroscópico de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H (RMN: Bruker model Fourier 300, magneto 300 SB UltraShieldTM, 7.05T, 300 MHz) para análise qualitativa da sua complexidade química. Seus espectros foram comparados simultaneamente para permitir a interpretação dos seus respectivos deslocamentos químicos, evidenciando assim a similaridade e/ou diferença entre as cores visualizadas, utilizando o programa TopSpin (versão 4.0.7, Bruker Biospin).

2.4. Análise quimiométrica

Para a quimiometria, cada extrato foi solubilizado em 650 µL de DMSO-d₆ para obtenção dos espectros por RMN de ¹H. Os espectros foram convertidos em arquivo no formato CSV (Comma-separated values) e criada uma matriz com os dados dos deslocamentos químicos e intensidade dos sinais.

A massa dos extratos não se encontrava padronizada no momento de realizar a prova, no entanto, na matriz todos foram padronizados multiplicando ou dividindo para aparecerem com uma massa de 1,12 mg.

As distorções de fases e bases de todos os espectros de RMN de ¹H foram ajustadas no programa TopSpin (versão 4.0.7, Bruker Biospin). Posteriormente, para

avaliarmos possíveis variações entre as amostras testadas, os dados foram exportados para o programa R Studio version 3.3 (R Core Team, 2019), onde foram selecionadas as regiões de interesse sendo as demais excluídas da análise. Selecionamos um espectro para servir como padrão de comparação. Para evidenciarmos similaridades e/ou diferenças entre perfis químicos das amostras, utilizamos a análise multivariada de PCA/Fuzzy e para uma maior especificidade na divisão foi realizada uma análise hierárquica de *clusters* (HCA) cujo resultado foi representado num dendrograma.

3. Resultados

3.1. Análise por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Através das análises dos extratos (DCM/MeOH) por CCDC foi possível detectar a presença de substâncias fluorescentes quando submetidos à luz ultravioleta com comprimento de onda 365 nm, indicando a presença de cromóforos (Figura 2). Quando submetidos ao reagente de Dragendorff foi detectada a presença de substâncias nitrogenadas em todas as amostras, representadas pela coloração laranja nas cromatoplacas, isso indica a presença de alcaloides (Figura 3). Do mesmo modo, houve reatividades com os reagentes anisaldeído e sulfato cérico em todas as amostras, confirmados pela presença de bandas nas cores lilás e rosa e marrom avermelhado, respectivamente, indicando a presença de terpenos e esteroides. Na cromatoplaca revelada com cloreto férrico, não houve o aparecimento de nenhuma mancha escura (tons de cinza e preto), indicando a ausência de substâncias fenólicas. Quando aplicado o cloreto de alumínio e NP/PEG, foi observada uma intensificação nas fluorescências das amostras, sugerindo a presença de flavonoides (Figura 3).

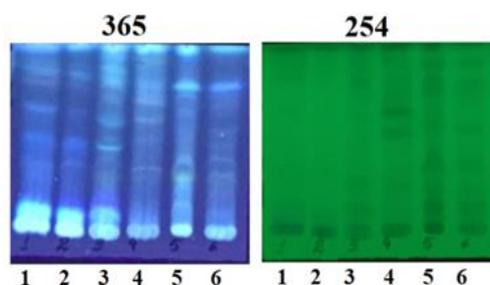


Figura 2. Perfil químico dos extratos de DCM/MeOH das peles de *A. galactobotus* com revelador físico da CCDC. Sistema de eluição DCM/MeOH 9:1. Número no topo das cromatoplacas correspondem as frequências do revelador físico de UV (nm). Valores nas bases das cromatoplacas correspondem as cores de cada pele. 1 e 2 = Marrom; 3 e 4 = Laranja; 5 e 6 = Verde-limão.

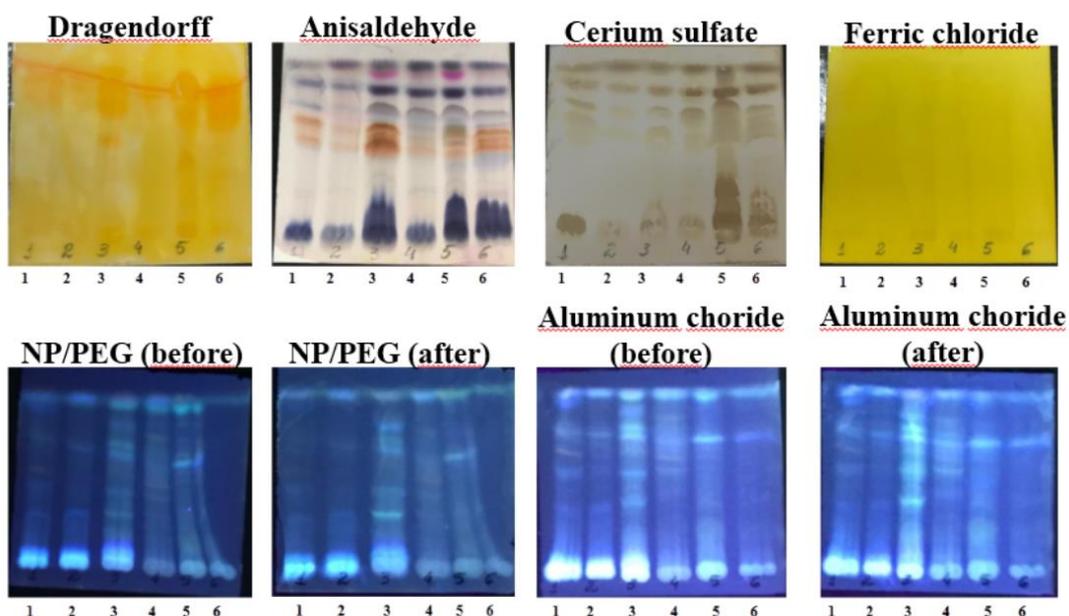


Figura 3. Perfil químico dos extratos de DCM/MeOH das peles de *A. galactonotus* com reveladores químicos. Sistema de eluição DCM/MeOH 9:1 Nomes no topo das cromatoplas correspondem aos reveladores químicos utilizados por CCDC. Valores nas bases das cromatoplas correspondem as cores de cada pele. 1 e 2 = Marrom; 3 e 4 = Laranja; 5 e 6 = Verde-limão.

3.2 Análise por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

O perfil dos extratos de DCM/MeOH (DMSO) analisados por RMN de ^1H apresentaram semelhanças nas classes de metabólitos secundários entre os espectros das três cores testadas, porém variando nos tipos das substâncias presentes, uma vez que apresentaram deslocamentos químicos diferentes entre os espectros de cores (Figura 4).

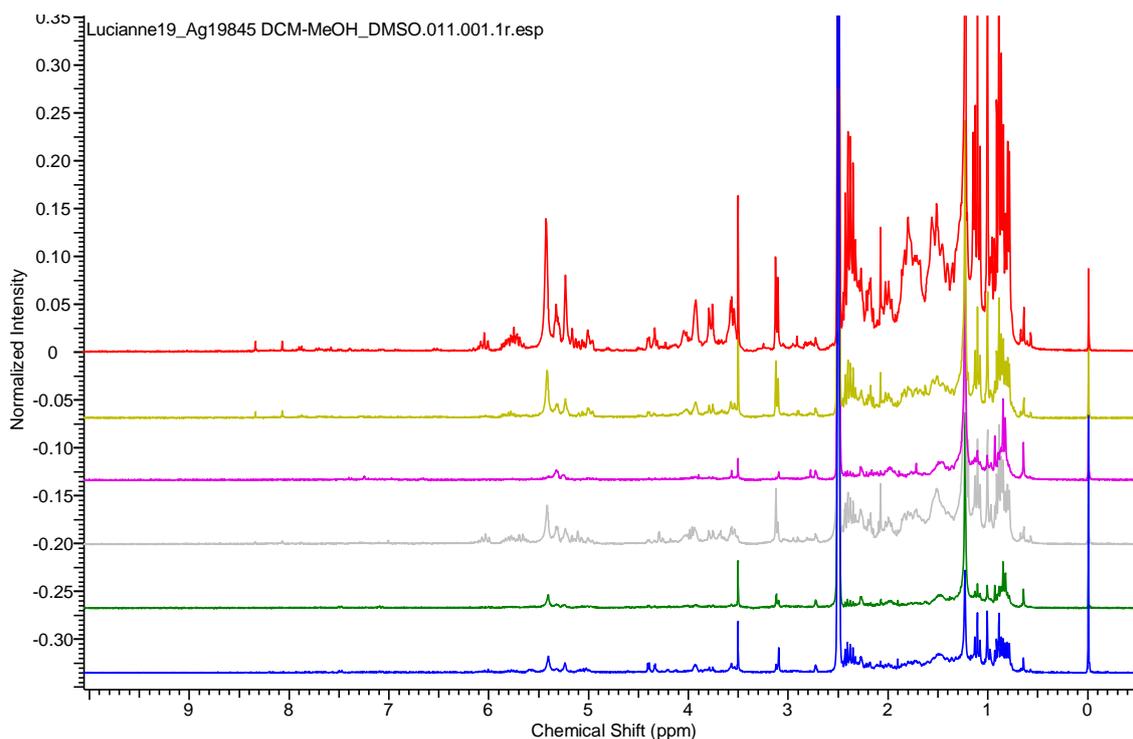


Figura 4. Sobreposição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H dos extratos DCM/MeOH dos indivíduos de *A. galactonotus* das cores amostradas (DMSO-*d*₆, 300 MHz). Espectros de baixo para cima são, respectivamente, dos morfotipos: marrom 1, marrom 2, laranja 1, laranja 2, verde-limão 1 e verde-limão 2.

Foi observado, em todos os espectros, a presença de sinais relativos a hidrogênios de metilas entre os deslocamentos 0,5 a 1,5 ppm, característicos de terpenos e esteroides (Figura 5).

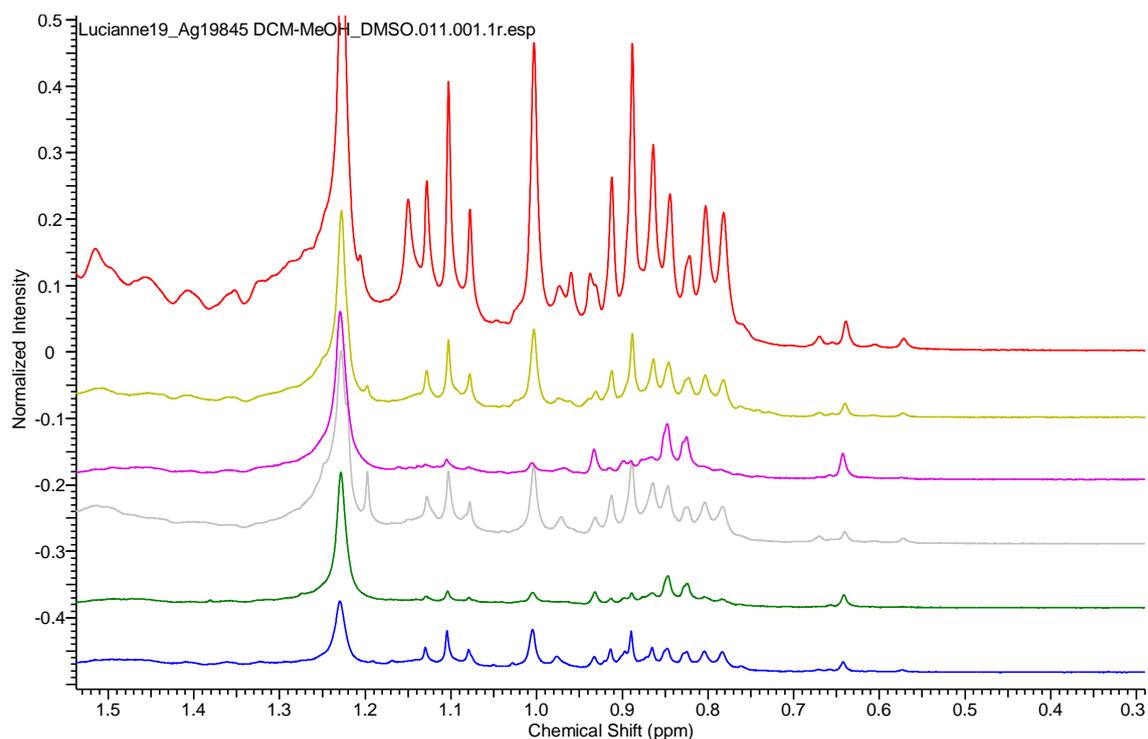


Figura 5. Ampliação na região dos hidrogênios de metilas dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H dos extratos DCM/MeOH dos indivíduos de *A. galactonotus* das cores amostradas (DMSO- d_6 , 300 MHz). Espectros de baixo para cima são, respectivamente, dos morfotipos: marrom 1, marrom 2, laranja 1, laranja 2, verde-limão 1 e verde-limão 2.

Nas regiões entre 1,5 a 2,5 ppm foram observadas a presença de hidrogênios metilênicos e metínicos também em todos os espectros amostrados, sendo menos intensos na coloração laranja, e mais presentes nos extratos da coloração verde-limão (Figura 6).

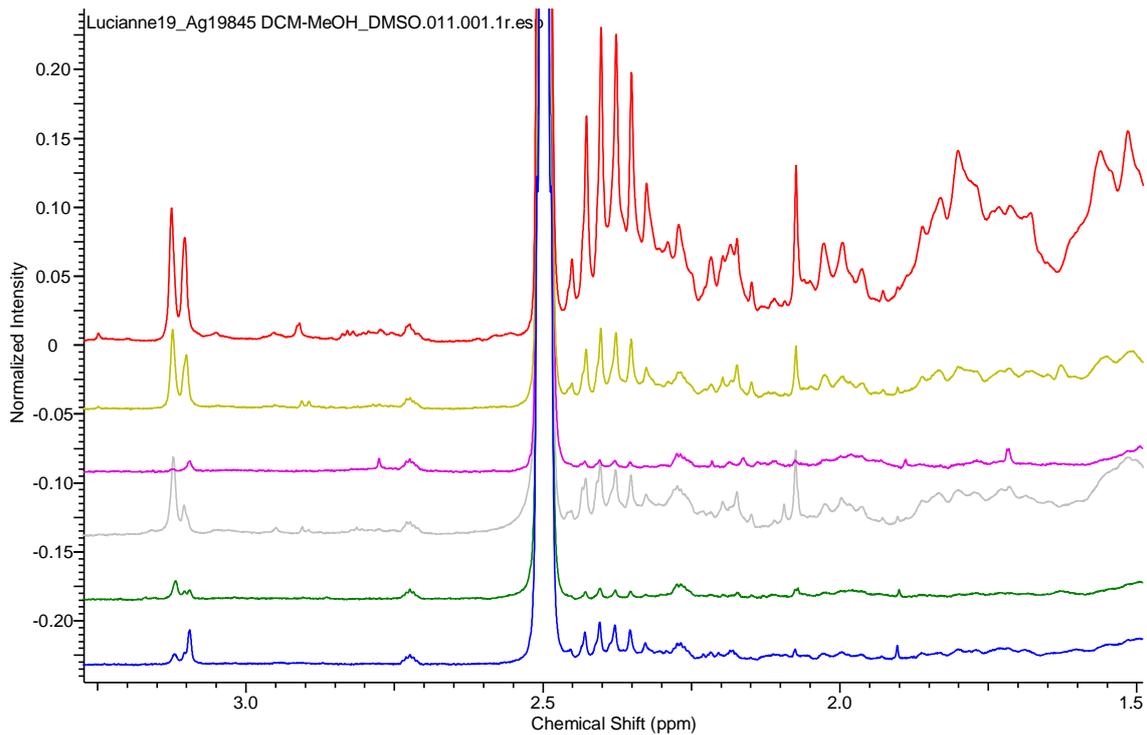


Figura 6. Ampliação na região dos hidrogênios metilênicos e metínicos dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H dos extratos DCM/MeOH dos indivíduos de *A. galactonotus* das cores amostradas (DMSO- d_6 , 300 MHz). Espectros de baixo para cima são, respectivamente, dos morfotipos: marrom 1, marrom 2, laranja 1, laranja 2, verde-limão 1 e verde-limão 2.

Entre as regiões de 3,0 a 4,0 ppm observamos sinais característicos de hidrogênios carbinólicos em todos os espectros, além de açúcares relativamente mais abundantes nas cores laranja e verde-limão (Figura 7).

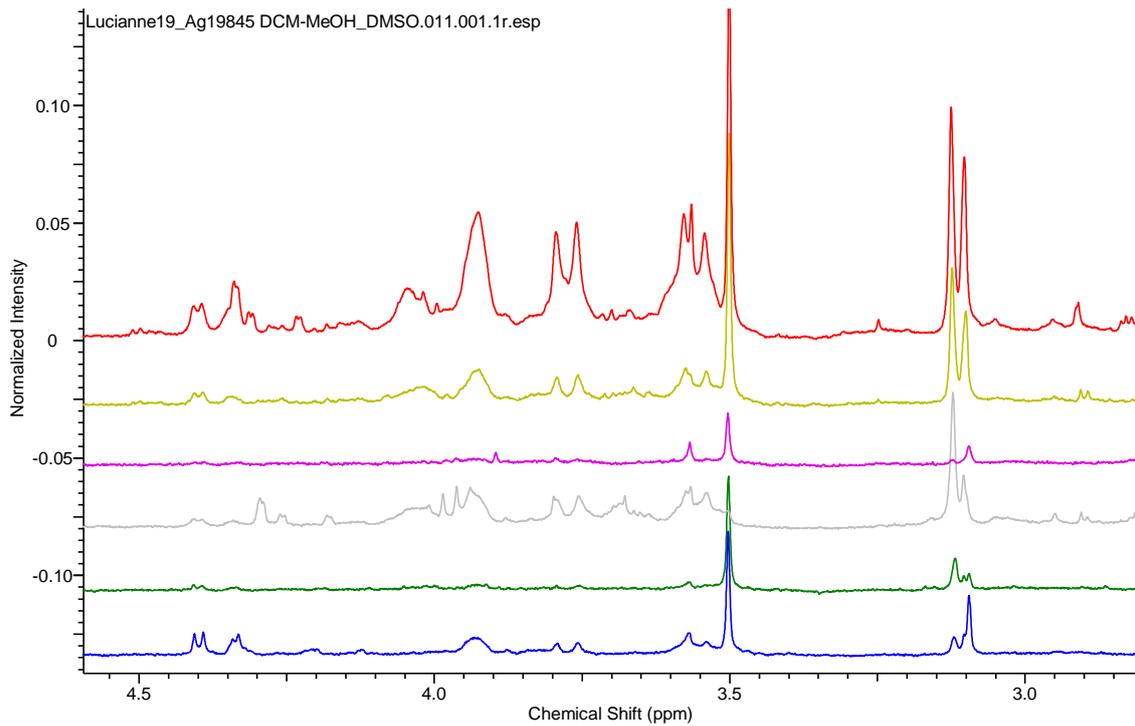


Figura 7. Ampliação na região dos hidrogênios carbinólicos dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H dos extratos DCM/MeOH dos indivíduos de *A. galactonotus* das cores amostradas (DMSO- d_6 , 300 MHz). Espectros de baixo para cima são, respectivamente, dos morfotipos: marrom 1, marrom 2, laranja 1, laranja 2, verde-limão 1 e verde-limão 2.

Na região entre 5,0 a 6,0 ppm detectamos a presença de hidrogênios olefínicos, sendo sinais característicos de ligações de duplas, também relativamente mais abundantes nas cores laranja e verde-limão (Figura 8).

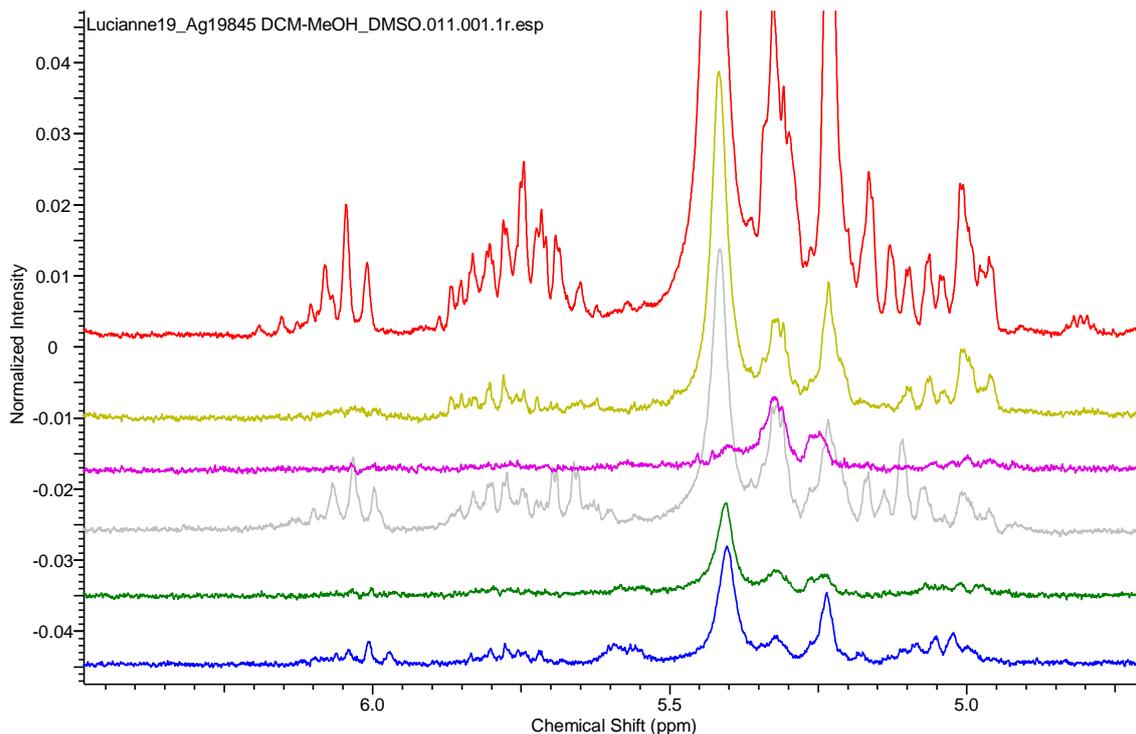


Figura 8. Ampliação na região dos olefínicos dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H dos extratos DCM/MeOH dos indivíduos de *A. galactonotus* das cores amostradas (DMSO- d_6 , 300 MHz). Espectros de baixo para cima são, respectivamente, dos morfotipos: marrom 1, marrom 2, laranja 1, laranja 2, verde-limão 1 e verde-limão 2.

Na região de 6,9 a 8,0 ppm observa-se a presença de hidrogênios aromáticos (Figura 9), podendo inferir que estes sinais sejam característicos de classes como de alguns alcaloides, dados estes que corroboram com os dados observados nas análises de CCDC, quando revelados com reagente de Dragendorff. Sendo que observa-se que nas amostras obtidas das peles dos sapos de cor verde-limão e uma da cor laranja há dois sinais bastante intensos em δ_{H} 8,08 e em 8,35.

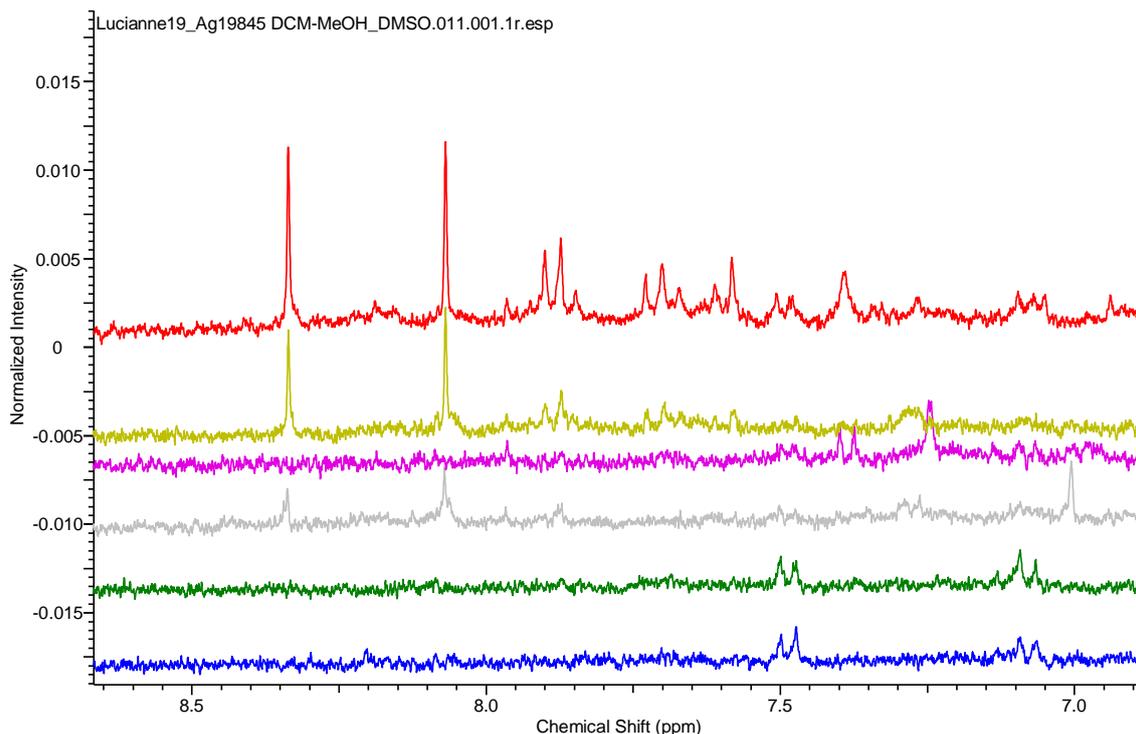


Figura 9. Ampliação na região dos hidrogênios aromáticos dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H dos extratos DCM/MeOH dos indivíduos de *A. galactonotus* das cores amostradas (DMSO- d_6 , 300 MHz). Espectros de baixo para cima são, respectivamente, dos morfotipos: marrom 1, marrom 2, laranja 1, laranja 2, verde-limão 1 e verde-limão 2.

Pelas análises de Ressonância e CCDC foi possível verificar a presença das classes químicas de terpenos, esteroides e alcaloides em todos os morfotipos amostrados. Sendo que houve a detecção da presença de flavonoides em uma amostra da cor laranja.

3.3. Quimiometria

A partir das análises de projeção dos componentes principais (PCA) dos espectros de RMN de ^1H (DMSO- d_6) dos extratos das peles dos indivíduos, foi possível demonstrar a variação entre os perfis químicos dos metabólitos secundários dos indivíduos. Nesse caso, os sinais analisados se encontravam entre δ_{H} 3-8,5, no entanto, foram avaliadas unicamente as regiões do espectro onde haviam sinais e as que não continham foram excluídas da análise: 4,55-4,85 e 6,25-6,96.

A análise multivariada PCA/Fuzzy revelou que houve diferenças significativas no perfil de metabólitos nos extratos, dividindo-os em dois agrupamentos (Fig. 10). O agrupamento 1 foi formado pelos dois indivíduos de dorso marrom, um de dorso laranja e outro de dorso verde-limão (pontos vermelhos) e o agrupamento 2 foi formado por um

indivíduo de dorso verde-limão e um indivíduo de dorso laranja (pontos verdes).

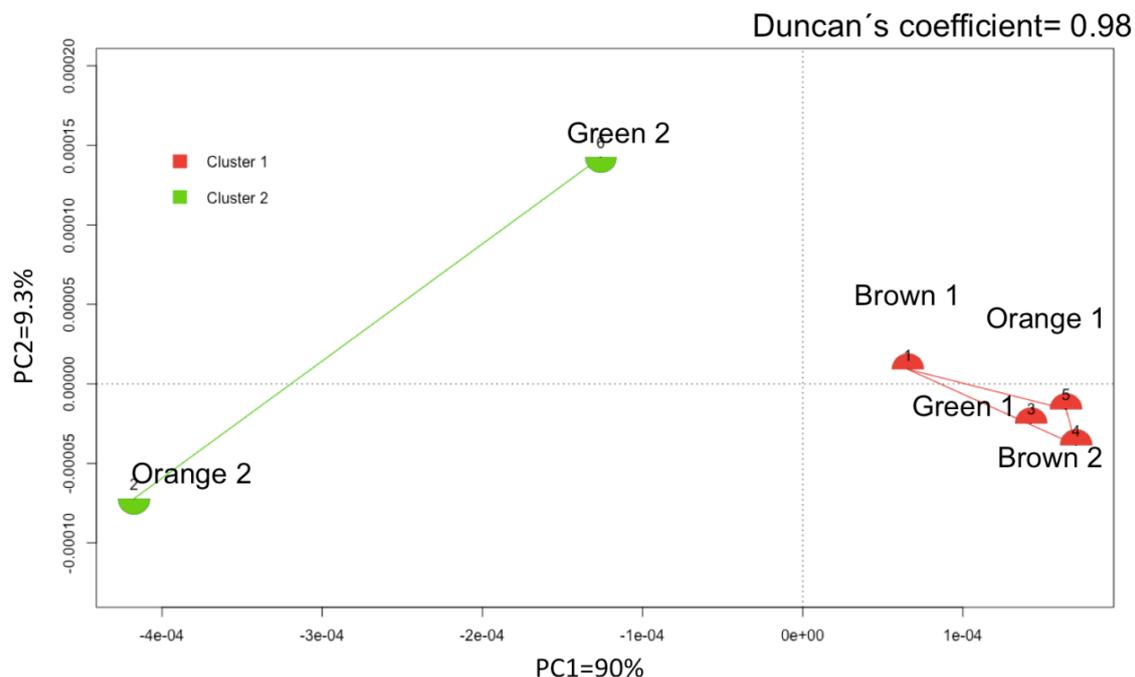


Figura 10. Gráfico de ordenação de clusters PCA/Fuzzy realizado dos espectros de RMN de ^1H dos extratos da pele de *A. galactonotus*, mostrando a formação de dois clusters. Cluster 1 agrupamento 1 foi formado por dois indivíduos de dorso marrom, um de dorso laranja e outro de dorso verde-limão (pontos vermelhos) e o agrupamento 2 foi formado por um indivíduo de dorso verde-limão e um indivíduo de dorso laranja (pontos verdes). Os PC1 e PC2 explicaram (99,3%) da variação nos dados.

A diferença entre as amostras dos dois *clusters* parece estar associada à intensidade de todos os sinais selecionados para a prova, presentes nos deslocamentos químicos entre δ_{H} 3-4,55, 4,85-6,25 e 6,96-8,5 (Fig. 11), que reconheceram uma maior presença desses metabólitos nas peles dos dois indivíduos de dorso marrom, um de dorso laranja e outro de dorso verde-limão (cluster 1).

Dentro dos sinais estudados se encontram hidrogênios ligados a anéis aromáticos, no entanto, levando a conta os resultados das CCDC onde em apenas uma amostra de indivíduo com a pele laranja há indício de substâncias fenólicas e nas demais há ausência, é provável que elas pertencem aos alcaloides revelados com o reagente de Dragendorff nas CCDC. Isto pode ser reforçado com a presença de sinais entre 8-8,5 ppm nos espectros de RMN ^1H das amostras. Nos espectros de RMN de ^1H foi possível visualizar claramente as três regiões estudadas (Figura 8 e 9) em todas as amostras.

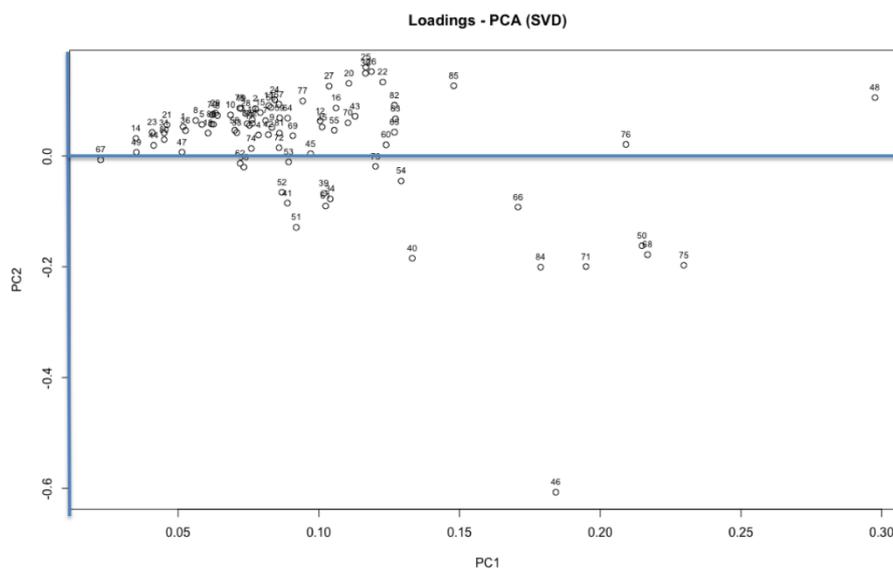


Figura 11. Projeção das variáveis (deslocamentos químicos) dos sinais dos espectros de RMN de ^1H sobre os *loadings* das amostras. Cada número representa uma região do espectro (Anexo), todos os pontos estão localizados no lado direito do espectro o qual indica que todos eles afetam a localização das amostras no gráfico do PCA/Fuzzy.

Nos deslocamentos químicos encontrados nos espectros das amostras das peles de *A. galactonotus* foram encontrados sinais que podem ser característicos de alcaloides do tipo histrionicotoxina, que já foram isolados de espécies da família Dendrobatidae (Tokumaya et al., 1983; Mortari et al., 2004). Para tanto, fizemos uma comparação entre os espectros de *A. galactonotus* e 3 peles (a, b, c) de espécies da família Dendrobatidae realizados por Tokumaya et al., 1983 representada na Figura 12. Na Figura é possível observar que os sinais dos alcaloides (Figura 12A) se encontram em deslocamentos químicos semelhantes aos dos sinais presentes no extrato bruto de *A. galactonotus* (Figura 12B).

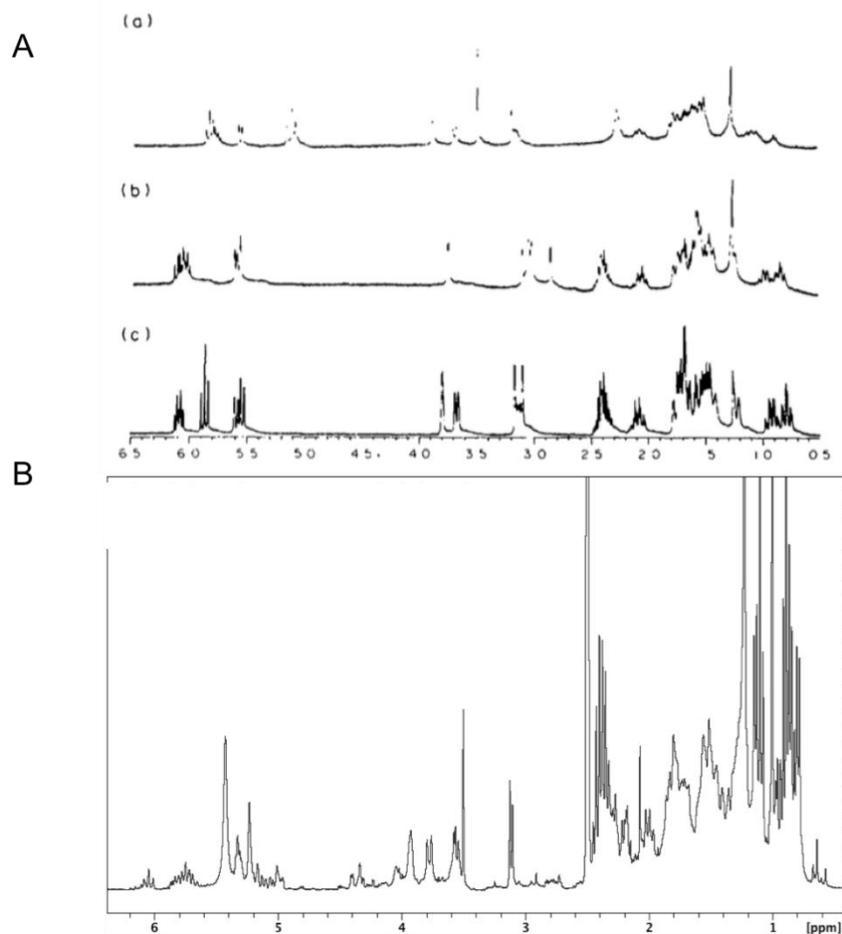


Figura 12. A) Espectros de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) de três peles de Dentrebatidae, demonstrando: (a) Histronicotoxina 259; (b) Δ17-trans-Histronicotoxina; (c) – Histronicotoxina (Tokumaya *et. al.*, 1983) em comparação com B que representa o espectro do extrato bruto da pele de *A. galactonotus* (300 MHz, DMSO-d₆).

Uma análise de ordenação hierárquica de cluster baseada nas regiões anteriormente mencionadas, de extratos das peles de *A. galactonotus* também revelou dois agrupamentos principais, da mesma forma que a análise PCA/Fuzzy realizou. E no *cluster 2* foi possível observar outro nível de diferença do perfil químico dos indivíduos cor marrom e verde-limão que foram agrupados em um sub-*cluster* e em outro o indivíduo laranja (Fig. 13).

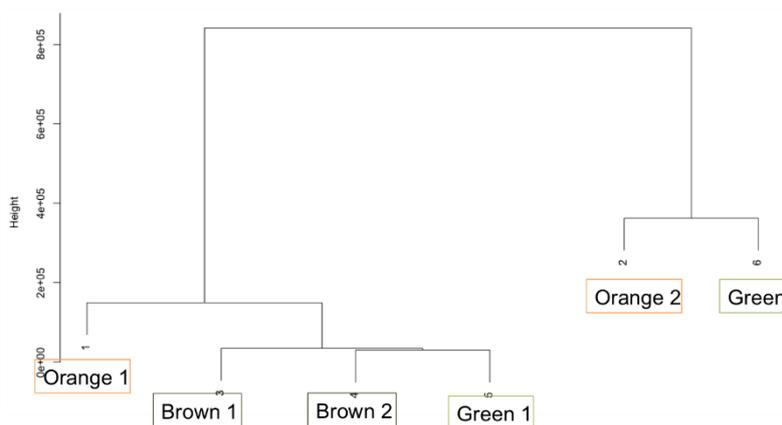


Figura 13. Gráfico de ordenação hierárquica de clusters (HCA) dos espectros inteiros de extratos das peles de *A. galactonotus*.

4. Discussão

Através das técnicas de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H determinamos a existência de alcaloides, terpenos e esteroides na pele das três populações de *A. galactonotus*.

Muitos estudos que envolveram a variação no perfil químico da secreção cutânea de Dendrobatídeos buscaram apenas a classe dos alcaloides, esse direcionamento é devido principalmente porque os estudos estão interessados nos mecanismos de defesa utilizados contra os predadores desses animais (Daly et al. 2008; Saporito et al. 2010; Grant et al. 2012; Jeckel et al. 2019). No entanto, alguns terpenos e esteroides também são relevantes, uma vez que protegem contra ataques de fungos e bactérias que podem ser letais para anuros (Cakir et al. 2004; Hantak et al. 2016). Variações com a ontogenia na quantidade de esteroides também já foi encontrado para *Rhinela marina* (Hayes et al. 2009). Enquanto no estudo realizado por Wabnitz et al. (2000) ficaram evidenciadas as diferenças na composição de macromoléculas entre os sexos dos animais para a perereca *Litoria splendida*.

No nosso estudo, *A. galactonotus* não apresentou diferenças nas classes químicas entre os três morfotipos, porém os perfis químicos diferiram entre os indivíduos (Fig. 10). A diferença parece estar ligada nas quantidades dos metabólitos com sinais em δ_{H} 3-4,55, 4,85-6,25 e 6,96-8,5, uma vez que os sinais que os separaram, que provavelmente pertencem a alcaloides do tipo histrionicotoxinas que já foram isolados na espécie, são sinais característicos deste tipo de moléculas, conforme já foi relatado na literatura em estudos utilizando RMN de ^1H para algumas espécies de anuro da família Dendrobatidae

(Tokuyama et al. 1983). Com isso, pode-se afirmar que os indivíduos marrom, o laranja 1 e verde-limão 1 continham maior quantidade dos metabólitos com deslocamentos em δ_H 3-4,55, 4,85-6,25 e 6,96-8,5 que os indivíduos laranja 2 e verde-limão 2.

Alguns alcaloides esteroidais já foram relatados nos extratos das peles de anfíbios e penas de aves (Daly 2003), como a bufotoxina na família Bufonidae (Shimada et al. 1989) e as batracotoxinas em indivíduos da família Dendrobatidae, onde algumas moléculas apresentam sinais de RMN de 1H similares as encontradas nos extratos do nosso estudo (Tokuyama et al. 1969). Portanto, isto pode ser um indício da presença desses metabólitos nos extratos da pele de *A. galactonotus*. A presença de sinais característicos de alcaloide esteroidal nos morfos investigados neste trabalho é interessante, uma vez que esses metabólitos não tinham sido relatados ainda para *A. galactonotus*, e além do mais, são bastante estudados devido ao seu alto potencial na fabricação de fármacos, como no caso dos encontrados na pele de anuros dos gêneros *Phyllobates* e *Dendrobates* e em algumas espécies vegetais. No entanto é necessário o isolamento do metabólito para que seja feita a estruturação e elucidção desta molécula e posteriormente análises para testar esta afirmação.

Recentemente foi relatado alguns alcaloides presentes nas peles dos sapos, os principais foram do tipo histrionicotoxinas, a allopumiliotoxina e o 5,6,6-indolozidine (Jeckel et al. 2019), resultado este que corrobora com o achado no nosso estudo, uma vez que mostramos sinais característicos da presença de histrionicotoxinas, apesar de ter sido usado técnicas de investigação diferentes nos dois estudos.

Nosso estudo e o estudo de Jeckel e colaboradores (2019) demonstrou que os morfotipos de *A. galactonotus* não sofrem efeitos da distância geográfica ou barreiras aquáticas na composição química. No nosso estudo, os morfos laranja 1, verde-limão 1 e marrom 1 e 2 tiveram perfil químico mais semelhantes entre si ao comparado com os morfos laranja 2 e verde-limão 2, apesar da distância entre laranja e marrom ser duas vezes maior que entre os morfo laranja e verde-limão. Diferindo de *Oophaga pumilio* (Saporito et al. 2006) e *Dendrobates tinctorius* (Lawrence et al. 2019) cuja a distância geográfica tiveram efeito na quantidade ou tipo de metabólicos entre populações da mesma espécie. Do mesmo modo ocorreu diferenças significativas no perfil químico entre diferentes espécies e entre as populações da mesma espécie do gênero *Mantella* (Daly et al. 2008). Aparentemente, *O. pumilio*, *D. tinctorius*, *M. baroni*, *M. bernhardi* e *M. madagascariensis* possuem maior flexibilidade no tipo de presa que consomem enquanto

A. galactonotus é mais seletivo, uma vez que Dendrobatídeos sequestram as substâncias químicas da dieta (Saporito et al. 2009, 2012). Ou por ser um clado basal, *A. galactonotus* tem o mecanismo de sequestro de substância química mais conservador que as espécies com história evolutiva mais recente.

Rojas e colaboradores 2019, demonstraram que o rio Xingu influenciou na história evolutiva de *A. galactonotus*, tendo dois clados situados em margens opostas do rio. Aparentemente essa diferença genética não ocorreu no mecanismo de sequestro de substância química, pois os morfotipos que estão situados em lados opostos do Rio Xingu (marrom x laranja e verde-limão) tiveram semelhanças no perfil químico, ficando separado apenas um morfotipo de cada (laranja x verde-limão) que são do mesmo lado do rio. Indicando que a diversificação química em *A. galactonotus* não segue a mesma velocidade que a diversificação genética, como sugerido para outras espécies (Daly et al. 1994, 2003; Hantak et al. 2013).

5. Conclusão

Neste estudo, mostramos que os extratos de DCM/MeOH das peles de *A. galactonotus* apresentam metabólitos secundários de classes como terpenos, esteroides e alcaloides, variando nas quantidades de substâncias dentro de cada classe entre as cores testadas. No entanto, a distância geográfica e o rio Xingu como barreira não são fatores para a diversificação química nesta espécie, uma vez que as amostras por cada morfotipo se misturaram nos agrupamentos das análises.

6. Referências Bibliográficas

Andriamaharavo NR, Garraffo HM, Saporito RA, Daly JW, Razafindrabe CR, Andriantsiferana M, Spande TF (2010) Roughing it: amantellid poison frog shows greater alkaloid diversity in some disturbed habitats. *J Nat Prod* 73:322–330. <https://doi.org/10.1021/np900721r>

Cakir A, Kordali S, Zengin H, Izumi S, Hirata T (2004) Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. *Flavour and Fragrance Journal* 19: 62 – 68. <https://doi.org/10.1002/ffj.1279>

Cott HB (1940) Adaptive coloration in animals. – Methuen & Co, London.

Daly JW and Witkop B (1971) Chemistry and pharmacology of frog venoms. In *Venomous animals and their venoms*. Vol II. New York: Academic Press.

Daly JW, Myers CW, Whittaker N (1987) Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the amphibian. *Toxicon* 25:1023–1095. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90265-0)

Daly JW, Secunda S, Garraffo HM, Spande TF, Wisnieski A, Cover JF Jr (1994) An uptake system for dietary alkaloids in poison frogs (Dendrobatidae). *Toxicon* 32:657–663. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90335-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90335-2)

Daly JW (1995) The chemistry of poison in amphibian skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9-13. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.1.9>

Daly JW, Garraffo HM, Spande TF, Clark VC, Ma J, Ziffer H, Cover JF (2003) Evidence for an enantioselective pumiliotoxin 7 hydroxylase in dendrobatid poison frogs of the genus *Dendrobates*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11092–11097. <https://doi.org/10.1073/pnas.18344.30100>

Daly JW, Spande TF, Garraffo HM (2005) Alkaloids from amphibian skin: a tabulation of over eight-hundred compounds. *J Nat Prod* 68:1556–1575. <https://doi.org/10.1021/np0580560>

Daly JW, Garraffo HM, Spande TF, Giddings LA, Saporito RA, Vieites DR, Vences M (2008) Individual and geographic variation of skin alkaloids in three species of Madagascan poison frogs (*Mantella*). *J Chem Ecol* 34:252–279. <https://doi.org/10.1007/s10886-007-9396-9>

Darst CR and Cummings ME (2006) Predator learning favours mimicry of a less toxic model in poison frogs. *Nature*. 404: 208–211

Endler JA (1991) Interactions between predators and prey. *Behavioural ecology an evolutionary approach* (Krebs, J.R. & Davies, N.B., eds). Blackwell Scientific Publications, p.169-196.

Frost DR (2019) *Amphibian species of the world: an online reference*. Version 6.0. American Museum of Natural History <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. Accessed 09 Jun 2020

Gamberale G and Tullberg BS (1998) Aposematism and gregariousness: the combined effect of group size and signal repellence. Proc of the Royal Society. 265: 889-894. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0374>

Garraffo HM, Spande TF, Daly JW, Baldessari A and Gros EG (1993) Alkaloids from bufonid toads (*Melanophryniscus*): decahydroquinolines, pumiliotoxins and homopumiliotoxins, indolizidines, pyrrolizidines, and quinolizidines. Journal Natural Products. 56: 357–373. <https://doi.org/10.1021/np50093a008>

Grant T, Frost DR, Caldwell JP, et al. (2006) Phylogenetic Systematics of Dart-Poison Frogs and Their Relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). Bulletin of the American Museum of Natural History, 299:1–262

Grant T, Colombo P, Verrastro L, Saporito RA (2012) The occurrence of defensive alkaloids in non-integumentary tissues of the Brazilian red-belly toad *Melanophryniscus simplex* (Bufonidae). Chemoecology 22:169–178. <https://doi.org/10.1007/s00049-012-0107-9>

Hantak MM, Grant T, Reinsch S, McGinnity D, Loring M, Toyooka N, Saporito RA (2013) Dietary alkaloid sequestration in a poison frog: an experimental test of alkaloid uptake in *Melanophryniscus stelzneri* (Bufonidae). J Chem Ecol 39:1400–1406. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0361-5>

Hantak MG, Paluh DJ, Saporito RA (2016) Bufadienolide and alkaloid-based chemical defences in two different species of neotropical anurans are equally effective against the same arthropod predators. Journal of Tropical Ecology 32: 165 – 169. <https://doi.org/10.1017/S0266467416000055>

Hayes RA, Crossland MR, Hagman M, Capon RJ, Shine R (2009) Ontogenetic Variation in the Chemical Defenses of Cane Toads (*Bufo marinus*): Toxin Profiles and Effects on Predators. J Chem Ecol 35:391–399 <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9608-6>

Hoogmoed MS, Ávila-Pires TCS (2012) Inventory of color polymorphism in populations of *Dendrobates galactonotus* (Anura: Dendrobatidae), a poison frog endemic to Brazil. Phyllomedusa 11:95–115

Jeckel AM, Saporito RA, Grant T (2015b) The relationship between poison frog chemical defenses and age, body size, and sex. *Front Zool* 12:27. <https://doi.org/10.1186/s12983-015-0120-2>

Jeckel AM, Kocheff S, Saporito RA, Grant T (2019) Geographically separated orange and blue populations of the Amazonian poison frog *Adelphobates galactonotus* (Anura, Dendrobatidae) do not differ in alkaloid composition or palatability. *Chemoecology* 29: 225 – 234. <https://doi.org/10.1007/s00049-019-00291-3>

Jones TH, Gorman JST, Snelling RR, DeLabie HC, Blum MS, Garraffo HM, Jain P, Daly JW and Spande TF (1999) Individual and Geographic Variation of skin alkaloids in three swamp-forest species of Madagascan poison frogs (*Mantella*). *Journal of Chemical Ecology*, 25:1179–1193. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0616-4>

Lawrence JP, Rojas B, Fouquet A, Mappes J, Blanchette A, Saporito RA, Bosque RJ, Courtois EA, Noonan BP (2019) Weak warning signals can persist in the absence of gene flow. *Proc Nat Acad Sci USA*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901872116>

Lindström L, Alatalo RV, Mappes J, Riipi M and Vertainen L (1999) Can aposematic signals evolve by gradual change? *Nature* 397: 249-251. <https://doi.org/10.1038/16692>

Maan ME and Cummings ME (2009) Sexual dimorphism and directional sexual selection on aposematic signals in a poison frog. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 19072–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903327106>

Maan ME, Cummings ME (2012) Poison frog colors are honest signals of toxicity, particularly for bird predators. *Am Nat* 179:1–14. <https://doi.org/10.1086/663197>

Mortari MR, Schwartz EN, Schwartz CA, Pires OR Jr, Santos MM, Bloch C Jr, Sebben A. (2004) Main alkaloids from the Brazilian dendrobatidae frog *Epipedobates flavopictus*: Pumiliotoxin 251D, histrionicotoxin and decahydroquinolines. *Toxicon*, 43, 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.01.001>

Patrick LD, Sasa M (2009) Phenotypic and molecular variation in the green and black poison-dart frog *Dendrobates auratus* (Anura: Dendrobatidae) from Costa Rica. *Rev Biol Trop* 57:313–321

- Paluh, D. J., M. M. Hantak, and R. A. Saporito. 2014. A test of aposematism in the dendrobatid poison frog *Oophaga pumilio*: the importance of movement in clay model experiments. *Journal of Herpetology* 48:249–254. <https://doi.org/10.1670/13-027>
- Rodríguez A, Poth D, Schulz S, Vences M (2011) Discovery of skin alkaloids in a miniaturized eleutherodactylid frog from Cuba. *Biology Letters* 7: 414 – 418. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.0844>
- Rojas D, Stow A, Amézquita A, Simões PI, Lima AP, (2015) No predatory bias with respect to colour familiarity for the aposematic *Adelphobates galactonotus* (Anura: Dendrobatidae). *Behaviour* 152:1–21. <https://doi.org/10.1163/1568539x-00003297>
- Rojas D, Lima AP, Momigliano P, Simões PI, Dudaniec RY, Avila-Pires TCS, Hoogmoed MS, Bitar YOC, Kaefer IL, Amézquita A and Stow A (2019) The evolution of polymorphism in the warning coloration of the Amazonian poison frog *Adelphobates galactonotus*. *Heredity* 1-18 <https://doi.org/10.1038/s41437-019-0281-4>
- R Core Team (2019) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Saporito RA, Donnelly MA, Garraffo HM, Spande TF, Daly JW (2006) Geographic and seasonal variation in alkaloid-based chemical defenses of *Dendrobates pumilio* from Bocas del Toro, Panama. *J Chem Ecol* 32:795–814. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9034-y>
- Saporito RA, Donnelly MA, Jain P, Garraffo HM, Spande TF, Daly JW (2007a) Spatial and temporal patterns of alkaloid variation in the poison frog *Oophaga pumilio* in Costa Rica and Panama over 30 years. *Toxicon* 50:757–778. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.06.022>
- Saporito RA, Spande TF, Garraffo HM, Donnelly MA (2009) Arthropod alkaloids in poison frogs: a review of the ‘Dietary Hypothesis’. *Heterocycles* 79:277–297. [https://doi.org/10.3987/REV-08-SR\(D\)11](https://doi.org/10.3987/REV-08-SR(D)11)
- Saporito RA, Isola M, Maccachero VC, Condon K, Donnelly MA (2010) Ontogenetic scaling of poison glands in a dendrobatid poison frog. *J Zool* 282:238-245. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2010.00732.x>

Saporito RA, Donnelly MA, Spande TF, Garraffo HM (2012) A review of chemical ecology in poison frogs. *Chemoecology* 22:159–168. <https://doi.org/10.1007/s00049-011-0088-0>

Silverstone PA (1975) A revision of the poison-arrow frogs of the genus *Dendrobates* Wagler. *Nat Hist Mus L A Sci Bull* 21:155

Siperstein MD, Murray AW, Titus E (1957) Biosynthesis of cardiotoxic sterols from cholesterol in the toad, *Bufo marinus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **67** (1): 154–60. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(57\)90254-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(57)90254-0)

Steindachner F (1864) *Batrachologische Mittheilungen*. *Verhandlungen des Zoologisch-Botanischen Vereins in Wien* 14:239288

Summers K and Clough ME (2001) The evolution of coloration and toxicity in the poison frog family (Dendrobatidae). *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 6227-6232. <https://doi.org/10.1073/pnas.101134898>

Tokuyama T, Daly JW, and Witkop B (1969) *J Am Chem Soc* 91:3931

Tokuyama T, Daly JW (1983) Steroidal alkaloid (batrachotoxins and 4 β -hydroxybatrachotoxins), “indole alkaloids” (calycanthine and chimonanthine) and a piperidinyldipyridine alkaloid (noranabasamine) in skin extracts from the Colombian poison-dart frog *Phylllobates terribilis* (Dendrobatidae). *Tetrahedron* 39:41–47

Toledo LF and Haddad CFB (2009) Colors and Some Morphological Traits as Defensive Mechanisms in Anurans. *International Journal of Zoology*, 1:12. <https://doi.org/10.1155/2009/910892>

Vences M, Kosuch, J, Lötters S et al. (2000) Phylogeny and classification of poison frogs (Amphibia: dendrobatidae), based on mitochondrial 16S and 12S ribosomal RNA gene sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 15: 34–40. <https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0738>

Wabnitz PA, Bowie JH, Tyler MJ, Wallace JC, Smith BP. Differences in the skin peptides of the male and female Australian tree frog *Litoria splendida*: the discovery of the aquatic male sex pheromone splendipherin, together with Phe⁸ caerulein and a new antibiotic peptide caerin 1.10. *Eur J Biochem*.2000;267:269-75. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01010.x>

Wang IJ (2011) Inversely related aposematic traits: reduced conspicuousness evolves with increased toxicity in a polymorphic poison-dart frog. *Evolution* 65:1637–1649. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01257>

Weldon PJ, Kramer M, Gordon S, Spande TF, Daly JW (2006) A common pumiliotoxin from poison frogs exhibits enantioselective toxicity against mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 103:17818–17821. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608646103>