



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SAULO GONÇALVES DE SANTIAGO BEZERRA

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE BIOESPUMAS DE *LEPTODACTYLUS* SPP. e
PHYSALAEMUS SPP.**

FORTALEZA

2017

SAULO GONÇALVES DE SANTIAGO BEZERRA

ANÁLISE PROTEÔMICA DE BIOESPUMAS DE *LEPTODACTYLUS* SPP. e
PHYSALAEMUS SPP.

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

Coorientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B469a Bezerra, Saulo Gonçalves de Santiago.
Análise proteômica de bioespumas de *Leptodactylus* spp. e *Physalaemus* spp. / Saulo Gonçalves de Santiago Bezerra. – 2017.
57 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

Coorientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

1. Ninhos de espuma. 2. Anura. 3. Proteoma. 4. Proteínas surfactantes naturais. I. Título.

CDD 570

SAULO GONÇALVES DE SANTIAGO BEZERRA

ANÁLISE PROTEÔMICA DE BIOESPUMAS DE *LEPTODACTYLUS* SPP. e
PHYSALAEMUS SPP.

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas do Departamento de Biologia da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do Título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Paulo Cascon
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Cleverton Diniz Teixeira De Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Denise Hissa pela excelente orientação e pelos grandes ensinamentos.

À Profa. Vânia Melo pela coorientação, pela ilimitada disponibilidade da infraestrutura do laboratório e de reagentes e pelo apoio financeiro.

À Dra. Mirella Pereira por auxiliar na execução nos experimentos de atividade hemaglutinante e hemolítica e análise estatística.

Aos colegas do Lembiotech pelas reflexões, críticas e sugestões.

À Profa. Ana de Fátima, ao Dr. Luiz Carlos Almeida Filho e aos colegas do Bioprospec por oferecerem a infraestrutura e por ajudarem em alguns experimentos.

Ao pesquisador Prof. Fábio Nogueira da Universidade Federal do Rio de Janeiro e ao Leonardo Vieira pelo apoio nas análises proteômicas.

Ao Prof. Cleverton Diniz por disponibilizar o laboratório para execução de alguns experimentos e por participar da banca de defesa desta monografia.

Ao Prof. Paulo Cascon por ajudar nas coletas, tirar dúvidas e participar da banca de defesa desta monografia.

Aos herpetólogos Me. Igor Joventino, Dr. Hugo Fernandes e Dra. Juliana Borges pelas contribuições nas coletas dos ninhos de espuma.

À CAPES e à FUNCAP, pelo apoio financeiro por meio de bolsas de Iniciação Científica pelo programa PIBIC.

“This intriguing phenomenon [foam nest] clearly must be pursued further, as more information on the [...] amphibian genomes and proteomes becomes available.” (COOPER; KENNEDY, 2010)

RESUMO

Os ninhos de espuma de anuros são bioestruturas estáveis utilizadas para a deposição e manutenção de ovos e de girinos fora da água. Esse modo reprodutivo é evolutivamente importante para a conquista do ambiente terrestre. Essas bioespumas apresentam diversas funções para o desenvolvimento da prole, como fornecimento de oxigênio e de nutrientes, proteção contra raios ultravioletas e contra predadores e aumento da taxa de crescimento. Apesar de ser um fenômeno que desperta curiosidade, pouco se conhece sobre a composição bioquímica dos mesmos. Sabe-se, atualmente, que os ninhos de espuma de anuros são formados por um coquetel de proteínas e de carboidratos, que são importantes para a arquitetura e estabilidade dessas estruturas. Dessa forma, o atual estudo teve por objetivo a caracterização bioquímica e a análise proteômica dos ninhos de espuma das espécies *Leptodactylus vastus*, *Leptodactylus macrosternum*, *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus albifrons*. Os ninhos foram coletados no período chuvoso no estado do Ceará. Foram analisados o conteúdo de carboidratos e de proteínas, as atividades antimicrobiana, hemaglutinante, hemolítica, emulsificante e de redução da tensão superficial da água. A diversidade de proteínas foi analisada por SDS-PAGE-Tricina e LC-MS/MS. As concentrações de proteínas e de carboidratos variaram, em geral, entre 1 e 2 mg/mL. Os ninhos de espuma reduziram a tensão superficial da água de 71 mN/m para, aproximadamente, 40 mN/m e obtiveram índices de emulsão acima dos 60%. As bioespumas não apresentaram atividade antimicrobiana nem hemolítica. Somente *P. albifrons* apresentou atividade hemaglutinante para o sangue de coelho. O gel de eletroforese demonstrou a presença de uma rica diversidade de proteínas de massas moleculares entre 10 e 150 kDa. A partir dos dados de espectrometria de massa, foi possível identificar 33, 95, 284 e 246 proteínas para o ninho de *L. vastus*, *L. macrosternum*, *P. cuvieri* e *P. albifrons* respectivamente. Somente as proteínas malato desidrogenase isoforma mitocondrial X1 e proteína bifuncional da biossíntese de purina foram comuns nos quatro ninhos. Nenhuma das proteínas que já foram isoladas a partir de bioespumas de anuros foi identificada em *L. macrosternum*, *P. cuvieri* e *P. albifrons*. Portanto, esses resultados fornecem novos dados sobre a composição e a evolução dos ninhos de espuma de anuros, além da possibilidade da presença de novas proteínas surfactantes.

Palavras-chave: ninhos de espuma, Anura, proteoma, proteínas surfactantes naturais.

ABSTRACT

Frog foam nests are stable structures used for the deposition and maintenance of eggs and tadpoles outside of water. This reproductive mode is evolutionarily important for the conquest of the terrestrial environment. These biofoams present several important functions for the offspring development, such as oxygen and nutrient supply, increase of the growth rate and protection against ultraviolet rays and predators. Although it is a phenomenon that arises curiosity, little is known about its biochemical composition. Currently, it is known that frogs foam nests are formed by a cocktail of proteins and carbohydrates, which are important for the architecture and stability of this structures. Thus, the present study aimed at the biochemical characterization and proteomic analysis of the foam nests of the species *Leptodactylus vastus*, *Leptodactylus macrosternum*, *Physalaemus cuvieri* and *Physalaemus albifrons*. The nests were collected in the rainy season in the state of Ceará. The content of carbohydrate and proteins, the antimicrobial, hemagglutinating, hemolytic, emulsifying and water surface tension reduction activities were analyzed. Protein diversity was analyzed by SDS-PAGE-Tricine and LC-MS/MS. In general, protein and carbohydrate concentrations ranged from 1 to 2 mg/mL. The foam nests reduced the surface tension of water from 71 to approximately 40 mN/m and obtained emulsion indices above 60%. The biofoams showed no antimicrobial or hemolytic activity. Only, *P. albifrons* showed hemagglutinating activity for rabbit blood. The electrophoresis gel demonstrated the presence of a range of proteins with molecular masses between 10 to 150 kDa. From the mass spectrometry data, it was possible to identify 33, 95, 284 e 246 proteins for the nests of *L. vastus*, *L. macrosternum*, *P. cuvieri* and *P. albifrons* respectively. Only the malate dehydrogenase mitochondrial isoform X1 protein and the bifunctional purine biosynthesis protein were identified in common for the four nests. None of the proteins that have already been isolated from anuran biofoams were identified in *L. macrosternum*, *P. cuvieri* and *P. albifrons*. Therefore, these results provide new data on the composition and evolution of anuran foam nests, and highlights the potential of the nests for the presence of new surfactant proteins.

Keywords: foam nest, Anura, proteome, natural surfactante proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Bioespuma do tunicado <i>Pyura praeputialis</i> na Baía de Antofagasta, Chile.	15
Figura 2 – Ninho de espuma do peixe <i>Hoplosternum littorale</i>	16
Figura 3 – <i>Adenomera hylaedactyla</i> e o seu respectivo ninho de espuma	17
Figura 4 – <i>Physalaemus cuvieri</i> em amplexo e o seu respectivo ninho de espuma	17
Figura 5 – Efeito das moléculas de surfactante sobre a tensão superficial da água	20
Figura 6 – Arranjo hipotético das ranaspuminas com os carboidratos, formando a arquitetura dos ninhos de espuma.	25
Figura 7 – Esquema do ensaio da atividade antimicrobiano	30
Figura 8 – Esquema do ensaio da atividade hemaglutinante e hemolítico	31
Figura 9 – Esquema do ensaio da atividade emulsificante	32
Figura 10 – Ensaio hemaglutinante com sangue de coelho dos ninho de espuma de <i>L. vastus</i> (Lv), <i>L. macrosternum</i> (Lm), <i>P. cuvieri</i> (Pc) e <i>P. albifrons</i> (Pa). CFL corresponde ao controle positivo lectina de <i>Cratylia floribunda</i>	35
Figura 11 – Ensaio hemaglutinante com sangue humano dos ninho de espuma de <i>L. vastus</i> (Lv), <i>L. macrosternum</i> (Lm), <i>P. cuvieri</i> (Pc) e <i>P. albifrons</i> (Pa). CFL corresponde ao controle positivo lectina de <i>Cratylia floribunda</i>	35
Figura 12 – Atividade emulsificante para em cada ninho de espuma	36
Figura 13 – Gel de eletroforese para os fluidos de ninho de espuma	38
Figura 14 – Diagrama de Venn comparando a quantidade de proteínas similares entre os ninhos de espuma.....	46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Redução da tensão superficial da água ocasionada pelos ninhos de espuma das quatro espécies estudadas	37
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proteínas estudadas de ninhos de espuma de rãs.	26
Tabela 2 – Concentração de proteínas e de carboidratos totais para cada os ninhos de espuma de <i>L. vastus</i> , <i>L. macrosternum</i> , <i>P. cuvieri</i> e <i>P. albifrons</i>	34
Tabela 3 – Índices de emulsificação com as respectivas concentrações de proteínas totais dos ninhos de espuma	36
Tabela 4 – Número total de diferentes proteínas identificadas a partir do banco de dados de Anura do NCBI no ninho de espuma de cada espécie.....	38
Tabela 5 – Lista das 30 proteínas com maior número de espectros para cada ninho de espuma de <i>L. vastus</i> (Lv), <i>L. macrosternum</i> (Lm), <i>P. cuvieri</i> (Pc) e <i>P. albifrons</i> (Pa).	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
BSA	Albumina sérica bovina
C-terminal	Extremidade carboxi-terminal de uma cadeia polipeptídica
DTT	Ditiotreitol
ESI-LTQ-Orbitrap	<i>Electrospray Ionization with Linear Trap Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IAA	Iodoacetamida
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
Lm	<i>Leptodactylus macrosternum</i>
Lv	<i>Leptodactylus vastus</i>
MS	Espectrometria de massa
N-terminal	Extremidade amino-terminal de uma cadeia polipeptídica
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Estados Unidos)
Pa	<i>Physalaemus albifrons</i>
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
Pc	<i>Physalaemus cuvieri</i>
RPLC	Cromatografia líquida de fase reversa
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
TFA	Ácido Trifluoroacético
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	As bioespumas em animais	15
2.2	As bioespumas em anuros (Amphibia): evolução e ecologia	16
2.3	Surfactantes naturais	19
2.4	Composição dos ninhos de espuma de anuros	22
2.5	Proteômica	26
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivos gerais	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	METODOLOGIA	29
4.1	Coleta de material biológico	29
4.2	Quantificação de proteínas e de carboidratos totais	29
4.3	Atividade antimicrobiana em meio líquido	29
4.4	Atividade hemaglutinante e hemolítica	30
4.5	Medida da tensão superficial	31
4.6	Atividade emulsificante	32
4.7	Eletroforese	32
4.8	Preparação das amostras dos ninhos de espuma para análise por LC-MS/MS	33
5	RESULTADOS	34
5.1	Caracterização de macromoléculas	34
5.2	Atividades biológicas	34
5.3	Atividades tensoativas	35
5.4	Análise proteômica por espectrometria de massa	37
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Os ninhos de espuma são um dos modos reprodutivos utilizados pelos anfíbios para a deposição de ovos em ambientes tropicais (HADDAD; PRADO, 2005). Dentro desse grupo, a família Leptodactylidae (Anura) apresenta uma diversidade de espécies que deposita esse tipo de ninho, como as do gêneros *Leptodactylus* e *Physalaemus* (HADDAD; PRADO, 2005; HEYER, 1969; HÖDL, 1990). Essas estruturas podem ser classificadas em aquáticas ou terrestres/arbóreas (HADDAD; PRADO, 2005), variando com relação à independência da água entre esses dois extremos.

Os ninhos oferecem importantes funções para o desenvolvimento dos anuros, como fornecimento de oxigênio (SEYMOUR; LOVERIDGE, 1994); proteção contra raios ultravioletas (HISSA *et al.*, 2008), contra predadores e contra dessecação (DOBKIN; GETTINGER, 1985; HEYER, 1969); aumento da taxa de crescimento (PRADO *et al.*, 2005) e de fertilização (ARZABE, 1999); e estabilidade térmica (DOBKIN; GETTINGER, 1985).

Apesar das funções ecológicas dos ninhos de espuma em anuros serem relativamente bem conhecidas, pouco se sabe sobre a composição proteica e características bioquímicas dessas estruturas. Cooper *et al.* (2005) foram os primeiros a estudarem os ninhos com um viés bioquímico. Esses autores demonstraram proteínas com massas entre 10 e 40 kDa, denominando-as de ranaspuminas, e a presença de carboidratos.

McMahon *et al.* (2006) e Oke *et al.* (2008) isolaram a primeira proteína de um ninho de espuma. A ranasmurfina, ou Pl-RSF-1, apresenta uma coloração azul e está presente na bioespuma de *Polypedates leucomystax*. No entanto, a função biológica dessa molécula, até o momento, é desconhecida. Em outro estudo, a partir da bioespuma de *Engystomops pustulosus*, Fleming *et al.* (2009) descreveram seis proteínas ranaspuminas. Dentre elas, uma com função surfactante, Ep-RSN-2; quatro com função de lectina, Ep-RSN -3, -4, -5 e -6; e uma inibidora de proteinase cisteínica, Ep-RSN-1. Além da Ep-RSN-2, Hissa *et al.* (2014) isolaram e caracterizaram outra proteína surfactante, a Lv-RSN-1, ao estudarem a espécie *Leptodactylus vastus*, espécie endêmica do nordeste brasileiro.

Dessa forma, acredita-se que os ninhos de espuma possuem, em sua composição, proteínas surfactantes e proteínas capazes de se ligarem a carboidratos, que também estão presentes nos ninhos. Fleming *et al.* (2009) propõem uma interação cruzada entre essas biomoléculas que mantém e estabiliza os ninhos de espuma. Segundo esses autores, a proteína surfactante seria responsável pela formação inicial da espuma e, então, os demais componentes, por ligações cruzadas, estabilizariam a estrutura do ninho.

Portanto, devido ao escasso conhecimento acerca da composição bioquímica dos ninhos de espuma, o acesso à proteômica pode auxiliar na identificação das proteínas presentes nessas estruturas, ajudando a compreender o papel das mesmas na ecologia e na evolução das bioespumas de anuros. Dessa forma, este estudo investigou o proteoma dos ninhos de espuma das espécies *Leptodactylus vastus* A. Lutz, 1930, *Leptodactylus macrosternum* Miranda-Ribeiro, 1926, *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 e *Physalaemus albifrons* Spix, 1824, sendo as três últimas nunca estudadas bioquimicamente. Além disso, caracterizou-se algumas atividades biológicas e tensoativas com o objetivo de verificar o papel ecológico e o potencial biotecnológico dos ninhos dessas espécies.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 As bioespumas em animais

As bioespumas, misturas água-ar produzidas por seres vivos, são estruturas relativamente raras na natureza, pois precisam vencer a alta tensão superficial da água para serem formadas, o que as tornam susceptíveis ao colapso e energeticamente custosas (COOPER; KENNEDY, 2010). Como será discutido posteriormente, alguns organismos resolveram esse problema com a produção de biomoléculas capazes de reduzir, eficientemente, a tensão superficial da água. Quando essas bioespumas participam do processo reprodutivo em animais são denominadas de ninhos de espuma ou, em alguns casos, de ninho de bolhas (COOPER; KENNEDY, 2010; SCHOR *et al.*, 2016).

Nos tunicados (Urochordata), a espécie de águas rasas e intermarés *Pyura praeputialis* é responsável pela produção de uma notável massa de espuma (Figura 1) durante o período de liberação de gametas na Baía de Antofagasta, Chile. Nesse caso, a espuma melhora o sucesso reprodutivo ao impedir a dispersão dos gametas, mantendo-os próximos. Conseqüentemente, por se tratar de um organismo sésil e pelo fato de o estágio larval se apresentar somente por 2,5 horas no plâncton, a espuma pode ser uma das explicações da distribuição restrita dessa espécie (CASTILLA *et al.*, 2007).

Figura 1 – Bioespuma do tunicado *Pyura praeputialis* na Baía de Antofagasta, Chile



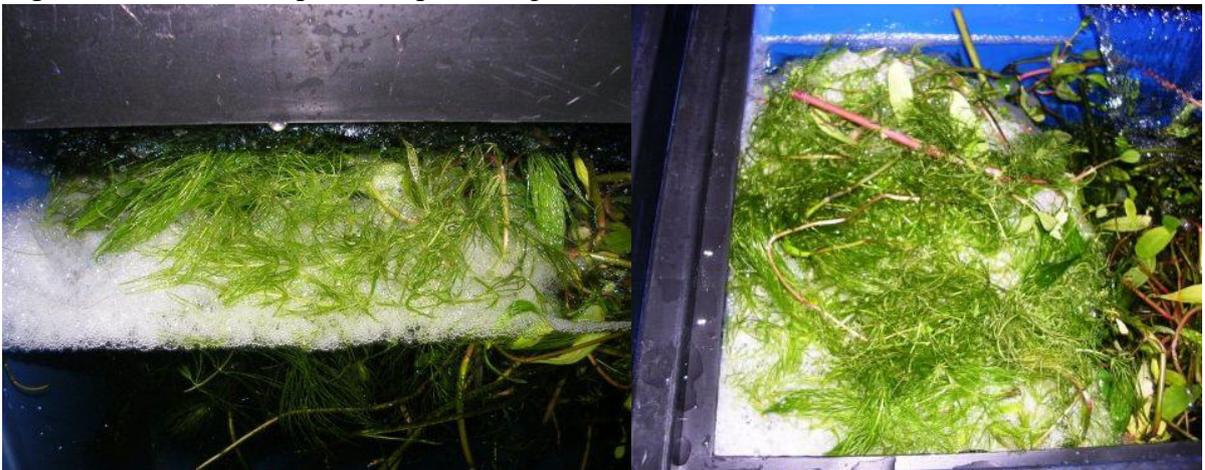
Fonte: Castilla *et al.* (2007).

Nos peixes, a reprodução por ninhos de bolhas é bastante frequente, sendo relatada por diversos autores (ANDRADE, D.; ABE, 1997; ARZABE, 1999; BRONSTEIN, 1981; HOLLIS, 1999; MILLER, 1964). De modo geral, os machos se deslocam até a superfície, capturam o ar, misturam-no com uma secreção mucosa com o auxílio da boca ou das nadadeiras

pélvicas e produzem as bolhas logo abaixo da superfície, onde os ovos são depositados. Além disso, o macho de algumas espécies, como em *Trichogaster trichopterus*, patrulha o território contra rivais, repõe a bioespuma periodicamente e devolve os ovos e os juvenis que estão fora do ninho. O macho de *Hoplosternum littorale*, além de produzir e proteger a bioespuma (Figura 2), captura restos de plantas e os adiciona ao ninho com ajuda da boca e das nadadeiras peitorais.

Um outro grupo de animal produtor de bioespumas são os anuros, que apresentam diversos modos reprodutivos envolvendo essas estruturas.

Figura 2 – Ninho de espuma do peixe *Hoplosternum littorale*



Fonte: publicado pelo usuário *rcbows* no fórum do site PlanetCatfish em 2014, disponível em: <https://www.planetcatfish.com/forum/viewtopic.php?t=41074>.

2.2 As bioespumas em anuros (Amphibia): evolução e ecologia

Os ninhos de espuma em anuros são produzidos no momento do amplexo, que consiste no posicionamento do macho sobre a região dorsal da fêmea. Com isso, ambos participam do processo de produção dos ninhos de espuma. A fêmea libera os ovos juntamente com um fluido proteico produzido na região glandular do oviduto, e o macho mistura esse fluido com o esperma e com o ar por meio de rápidos movimentos das pernas traseira. Analogicamente, as pernas do macho funcionam como uma “batedeira de ovos”, fertilizando-os e formando o ninho de espuma (COOPER *et al.*, 2005; DALGETTY; KENNEDY, 2010; HISSA *et al.*, 2008, 2016).

O sistema de classificação mais aceito para a reprodução de anuros relata a existência de 39 modos reprodutivos, sendo 10 envolvendo ninhos de espumas, que podem ser classificados em aquáticos ou terrestres/arbóreos. (HADDAD; PRADO, 2005). Dentre essa variedade, alguns ninhos são mais independentes da água para o desenvolvimento dos girinos

do que outros. Por exemplo, em *Adenomera hylaedactyla*, os machos cavam uma câmara no solo úmido, sem água livre, com o focinho, e o ninho é depositado nesse local com 3 a 14 ovos repletos de vitelo (Figura 3). O desenvolvimento dos girinos ocorre completamente na bioespuma, sem precisar de um meio aquático (BORGES-LEITE *et al.*, 2015; KOKUBUM; GIARETTA, 2005; KOKUBUM; SOUSA, 2008).

Figura 3 – *Adenomera hylaedactyla* e o seu respectivo ninho de espuma



Fonte: elaborada pelo autor.

Por outro lado, existem espécies com um maior grau de dependência de água, como ocorre em *Physalaemus cuvieri* e no grupo *Leptodactylus ocellatus*. Nesses casos, os ninhos de espuma são depositados na lâmina de água de poças temporárias. Assim, os girinos abandonam a bioespuma e se desenvolvem na água lântica (HADDAD; PRADO, 2005).

Figura 4 – *Physalaemus cuvieri* em amplexo e o seu respectivo ninho de espuma



Fonte: elaborada pelo autor.

Em uma condição intermediária, há espécies, como *Leptodactylus fuscus*, que depositam os ninhos de espuma em câmaras terrestres que estão localizadas próximas às lagoas e que são inundáveis pela chuva. Parte do desenvolvimento dos girinos ocorre dentro da bioespuma, e a outra parte, na água, quando a prole abandona o ninho. (DOWNIE, 1984; HEYER, 1969)

Para explicar essa diversidade de modos reprodutivos envolvendo ninhos de espuma, as hipóteses evolutivas mais recentes sugerem que essa estrutura surgiu, pelo menos, sete vezes de maneira independente, ocorrendo nos grupos: Hylidae, Hyperoliidae, Leptodactylidae (Leiuperinae e Leptodactylinae), Limnodynastidae, Microhylidae e Rhacophoridae (FAIVOVICH *et al.*, 2012; FROST *et al.*, 2006; GRANT *et al.*, 2006; PYRON; WIENS, 2011).

A família Leptodactylidae apresenta a maior diversidade de espécies produtoras de ninhos de espuma (FROST *et al.*, 2006). Esse grupo é característico da zona tropical (HADDAD; PRADO, 2005; HEYER, 1969; HÖDL, 1990), onde há regiões sem chuvas periódicas e alta incidência de luz solar. Além disso, dentro do gênero *Leptodactylus*, é notável a evolução de ninhos de espuma aquáticos até os terrestres, com espécies apresentando características intermediárias (HEYER, 1969).

As vantagens reprodutivas oferecidas pelos ninhos de espuma estão relacionadas, dentre outros fatores, com a proteção da prole contra desidratação (HEYER, 1969). O autor discute que esse tipo de mecanismo foi e é essencial para o sucesso evolutivo desse gênero em regiões com chuvas sazonais. O mesmo ainda ressalta a resistência mecânica das bioespumas e a importância dessa característica, pois permite uma maior proteção dos ovos e dos girinos (DOBKIN; GETTINGER, 1985; HEYER, 1969).

Por conseguinte, os ninhos de espuma de anuros são ambientes únicos com condições ótimas de desenvolvimento para a prole. Eles proporcionam a manutenção de um ambiente oxigenado, o que permite a permanência dos girinos dentro do ninho mesmo após a eclosão dos ovos. No caso de *Chiromantis xerampelina*, por exemplo, esse período é de, aproximadamente, dois dias (SEYMOUR; LOVERIDGE, 1994).

Além disso, as condições de temperatura dentro das bioespumas são distintas das do ambiente ao redor. Essas estruturas possuem facilidade para ganhar calor e evitam a perda do mesmo. Dessa forma, a região interna do ninho permanece úmida e não perde calor por evaporação. Essa elevação de temperatura acelera o desenvolvimento dos girinos, o que é uma vantagem em ambientes com poças e lagos temporários (DOBKIN; GETTINGER, 1985).

Resultados semelhantes foram obtidos com os ninhos terrestres de *Leptodactylus*

fuscus e *L. knudseni* e com o ninho aquático de *Physalaemus fischeri* (MÉNDEZ-NARVÁEZ; FLECHAS; AMÉZQUITA, 2015). Esses autores discutem que as bioespumas oferecem estabilidade térmica, com poucas variações de temperatura ao longo do dia, principalmente naquelas que são mais independentes de água.

No caso dos anuros que depositam as bioespumas em ambientes terrestres, há evidências de que os ninhos oferecem a nutrição da prole até o preenchimento das poças com as primeiras chuvas. Em *Rhacophorus viridis*, os girinos apresentaram uma taxa de crescimento maior quando cresceram na presença de porções do ninho de espuma sem ovos (TANAKA; NISHIHARA, 1987). Essa função da bioespuma como fonte de alimento também foi observada em ninhos aquáticos, como em *Leptodactylus labyrinthicus* (PRADO *et al.*, 2005). No entanto, nessa espécie, o mais comum é a ovofagia intraespecífica de ovos não fecundados dentro do ninho e interespecífica fora do mesmo (PRADO *et al.*, 2005; SILVA; GIARETTA; FACURE, 2005).

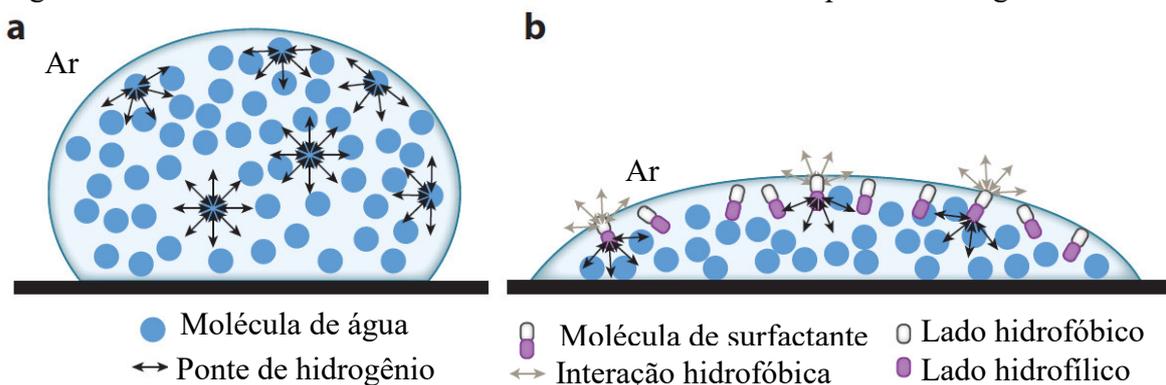
Heyer (1969) discute que os ninhos de espuma protegem a prole contra predadores. Para o autor, os ninhos depositados em água estão protegidos contra insetos aquáticos, cobras e girinos carnívoros. Além disso, o mesmo ainda propõe que a migração do habitat aquático para o terrestre foi impulsionada pela presença de predadores na água, o que é corroborado por Magnusson e Hero (1991). A bioespuma também pode evitar outro tipo de predação, a intraespecífica, o que é observado em *Pleurodema diplolistris* e em *Physalaemus ephippver* (HÖDL, 1990, 1992). Outro exemplo ocorre em *Chiromantis simus*, na qual uma camada adicional de espuma sobre o ninho arbóreo protege os ovos contra a predação por formigas (BANERJEE, 2014).

2.3 Surfactantes naturais

Surfactantes são moléculas que apresentam uma região hidrofóbica e uma região hidrofílica que reduzem a energia livre de um sistema ao substituir moléculas de maior energia presentes em uma determinada interface. Monômeros dessas moléculas podem formar estruturas esféricas ou lamelares capazes de reduzir as tensões superficiais e interfaciais (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001; MULLIGAN, 2005). Como mostra a Figura 5, as moléculas de água, na ausência de surfactante (a), só formam pontes de hidrogênio com moléculas vizinhas e abaixo dela, não interagindo com o ar. Assim, há uma distribuição desigual das forças de atração entre as moléculas de água periféricas, que tendem a ser atraídas para o interior, criando a tensão superficial. As moléculas de surfactantes (b) são capazes de formar

pontes de hidrogênio com a água e, ao mesmo tempo, interagir com o ar, o que reduz a tensão superficial (SUNDE; PHAM; KWAN, 2017). No caso das espumas, os surfactantes adsorvem na interface água-ar, expondo a região hidrofóbica para o ar e a região hidrofílica para a camada superficial da água, e reduzem a tensão superficial da mesma, o que permite a mistura desses dois meios e a formação de espuma (COOPER; KENNEDY, 2010).

Figura 5 – Efeito das moléculas de surfactante sobre a tensão superficial da água



Fonte: Sunde, Pham e Kwan (2017), traduzido para o português. (a) ausência e (b) presença de surfactante.

Esses compostos são amplamente usados na indústria devido à capacidade de reduzir a tensão superficial, de aumentar a solubilidade de compostos hidrofóbicos, de detergentes e de formar espumas (MULLIGAN, 2005). Na indústria do petróleo, por exemplo, os surfactantes ajudam na retirada de componentes do óleo ao aumentar a solubilidade do mesmo (FALATKO; NOVAK, 1992; MULLIGAN, 2005). Essas moléculas também podem funcionar como emulsificantes, ajudando na mistura de ingredientes na indústria de alimentos (SAGALOWICZ; LESER, 2010). A retirada de contaminantes do solo também pode ser uma das diversas aplicações dos surfactantes (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001)

Os surfactantes naturais são moléculas com atividades de superfície produzidas por seres vivos. Os mais estudados são aqueles provenientes de fungos e bactérias (RODRIGUES *et al.*, 2006), mas também são encontrados em diversos outros seres vivos como os surfactantes pulmonares em mamíferos e as saponinas em plantas. Esses compostos apresentam algumas vantagens quando comparados com os surfactantes sintéticos: baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, biocompatibilidade e digestibilidade (KOSARIC, 1992). Essas moléculas também podem resistir às condições extremas de salinidade, temperatura e pH (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998). Além disso, os surfactantes naturais apresentam inúmeras funções na área médica. Eles podem atuar como agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirais e antitumorais, além de atuar como inibidores de certas proteínas, de apresentar propriedades imunológicas e

de alterar propriedades de membranas lipídicas (RODRIGUES *et al.*, 2006).

Essas biomoléculas podem ser classificadas em: glicolipídios, como os ramnolipídios, produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*; de natureza lipídica (fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros); biossurfactantes poliméricos, formados por complexos polissacarídeos-proteínas; e biossurfactantes particulados (SANTOS *et al.*, 2016).

No entanto, apesar de pouco conhecidas e estudadas, existem algumas proteínas que, evolutivamente, foram selecionadas para desempenhar a função nativa de surfactante (SCHOR *et al.*, 2016). Por outro lado, vale ressaltar que algumas proteínas, como a albumina, podem ter atividade de superfície, mas são instáveis e pouco eficientes, além de envolver a desnaturação dessas proteínas (COOPER *et al.*, 2005; FLEMING *et al.*, 2009).

Um exemplo de surfactante natural proteico é a proteína BslA (ou YuaB) que foi isolada a partir do biofilme da bactéria *Bacillus subtilis*. Ela é uma das responsáveis pela característica enrugada típica de colônias dessa espécie, além de conferir alta hidrofobicidade à superfície dessas colônias (HOBLEY *et al.*, 2013; KOBAYASHI; IWANO, 2012). Interessantemente, essa proteína apresenta um *cap* altamente hidrofóbico que não é exposto na superfície da molécula em solução aquosa. Entretanto, ela sofre modificação conformacional, expondo esse *cap*, quando presente na região interfacial entre dois meios, como água-óleo (BROMLEY *et al.*, 2015).

Em fungos filamentosos, há a produção de pequenas proteínas denominadas hidrofobinas, que são capazes de reduzir a tensão superficial da água (WÖSTEN; DE VOCHT, 2000). Elas compartilham a presença de 8 resíduos de cisteínas, o que permite a formação de quatro pontes dissulfeto (WESSELS, 1996). Funcionalmente, as hidrofobinas, ao reduzirem a tensão superficial, facilitam a saída das hifas submersas para ar, o que facilita a formação de corpos vegetativos aéreos e a liberação dos esporos no ar (EUSTON, 2014; WILLEY; WÖSTEN, 2000; WÖSTEN *et al.*, 1999).

Com relação aos surfactantes naturais proteicos de origem animal, a laterina é uma proteína composta por quase 25% de leucina e que está presente no suor e na saliva de cavalos. Ela apresenta uma ótima e eficiente redução da tensão superficial da água e aumenta a molhabilidade de superfícies hidrofóbicas mesmo em concentrações de 10 µg/mL. Desse modo, essa molécula facilita a distribuição da água do suor na pele e na pelagem, que são oleosos em cavalos, o que ajuda no processo de resfriamento corporal. No entanto, a função dessa proteína na saliva ainda é incerta, mas acredita-se que ela auxilie na mastigação e no processamento de vegetais secos (BEELEY; EASON; SNOW, 1986; MCDONALD *et al.*, 2009).

Ainda em mamíferos, é possível encontrar surfactantes pulmonares, dos quais 10%

são formados por proteínas. Elas podem (SP-A, -B e -C) ou não (SP-D) estar associadas à membrana plasmática das células dos alvéolos e podem participar na defesa contra patógenos, visto que SP-A e -D são lectinas do tipo C (PÉREZ-GIL, 2008). Esse tipo de lectina é cálcio-dependente e pode apresentar especificidade para glicídios presentes no envoltório celular de microrganismos patogênicos (DRICKAMER; TAYLOR, 2015). Além disso, os mamíferos também produzem uma classe de surfactante proteico nativamente desnaturado, as caseínas. Elas estão presentes no leite e formam micelas, que evitam a precipitação do cálcio (HORNE, 2002, 2006).

Por fim, certos anuros também são relatados pela produção de surfactantes proteicos. Essas moléculas fazem parte de um grupo de proteínas encontradas nos ninhos de espuma, denominadas ranaspuminas.

2.4 Composição dos ninhos de espuma de anuros

Apesar de existirem diversos estudos no que diz respeito à ecologia e à evolução dos ninhos de espumas de anuros, pouco se sabe sobre a composição bioquímica dos mesmos e como essas moléculas podem influenciar a estabilidade e as funções que os ninhos exercem. O primeiro estudo com um viés bioquímico demonstrou que a bioespuma arbórea de *Polypedates leucomystax* é constituída de 93% de proteína e 7% de carboidratos (KABISCH *et al.*, 1998).

Alguns anos depois, a bioespuma aquática de *Engystomops pustulosus* (antes *Physalaemus pustulosus*) foi caracterizada com essa abordagem (COOPER *et al.*, 2005). Os autores encontraram uma variedade de proteínas, denominando-as de ranaspuminas, com massas entre 10 e 40 kDa, cuja concentração total variou entre 1 e 2 mg/mL. Concentração semelhante de carboidratos totais foi encontrada.

Esses autores também detectaram uma concentração menor do que 0,01 mg/mL de lipídios, valor inferior ao que seria necessário para explicar a atividade surfactante, caso este fosse de origem lipídica. Dessa forma, a arquitetura da bioespuma é assegurada por carboidratos e proteínas. Apesar de incomum, esses resultados não foram inesperados, visto que a presença de pequenas moléculas de origem lipídicas, como os tradicionais detergentes, tende a danificar membranas biológicas, como as dos ovos e girinos presentes nos ninhos. Além disso, as proteínas e os carboidratos conferem alta durabilidade e resistência aos ninhos de espuma, que podem permanecer intactos por vários dias. (COOPER *et al.*, 2005).

Com relação à atividade superficial, as proteínas da bioespuma de *Engystomops*

pustulosus reduziram a tensão superficial da água de 74 para, aproximadamente, 50 mN/m, o que demonstra uma redução maior do que as proteínas-controle, lisozima e albumina, na mesma concentração de 1 mg/mL (COOPER *et al.*, 2005). Com isso, esses autores sugeriram que proteínas desconhecidas com função biológica surfactante evoluíram em anuros.

Leptodactylus vastus é uma espécie endêmica do nordeste brasileiro e uma das poucas espécies a ter o ninho de espuma caracterizado bioquimicamente. Essa estrutura apresentou uma concentração de 1 mg/mL para proteínas e de 0,3 mg/mL de carboidratos (HISSA *et al.*, 2008). Além disso, os autores ainda demonstraram a inexistência de atividade antimicrobiana, de toxicidade em ratos e de ação larvicida contra *Aedes aegypti*. Com relação à atividade de superfície, Hissa *et al.* (2008) demonstrou que o fluido da bioespuma de *L. vastus* reduziu a tensão superficial da água de 74 para 52 mN/m.

A primeira proteína a ser isolada a partir dos ninhos de espuma foi a ranasmurfina (PI-RSF-1), uma proteína de coloração azulada de 26 kDa e presente na bioespuma de *Polypedates leucomystax* (MCMAHON *et al.*, 2006; OKE *et al.*, 2008). Essa macromolécula é um dímero e que está associado por meio da ligação ao metal zinco, o que explica sua coloração azulada. A função biológica da PI-RSF-1 ainda é desconhecida, mas os autores propõem, com base na sua estrutura tridimensional, possíveis funções de proteção contra radiação solar e espécies reativas de oxigênio, camuflagem e atividade antimicrobiana.

A partir do ninho de *Engystomops pustulosus*, foram isoladas e caracterizadas 6 proteínas. A primeira delas, a Ep-RSN-2, é uma proteína com função surfactante, cuja sequência não tem similaridade com outras conhecidas (hidrofobinas, caseína do leite, proteínas pulmonares de mamíferos), caracterizando uma nova classe de proteínas surfactantes (FLEMING *et al.*, 2009; MACKENZIE *et al.*, 2009).

Essa proteína apresenta uma estrutura secundária composta por uma α -hélice, uma β -conformação antiparalela, uma região ligante flexível e duas caldas flexíveis, uma N-terminal hidrofóbica e uma C-terminal polar. Quando em solução aquosa, a α -hélice recobre a β -conformação. Por outro lado, durante o processo de adsorção, essas duas regiões tendem a se distanciar em um movimento semelhante a abertura de uma concha de marisco. Essa mudança conformacional auxilia na estabilização da atividade surfactante que é iniciada pela calda da região N-terminal. No entanto, vale ressaltar que a estrutura secundária da proteína se mantém estável em regiões interfaciais mesmo havendo essa mudança na estrutura tridimensional (BRANDANI *et al.*, 2017; MACKENZIE *et al.*, 2009).

As proteínas Ep-RSN-3, -4, -5 e -6 apresentam sequências de aminoácidos que as classificam como ligantes de carboidratos, ou seja, são lectinas. As Ep-RSN-3, -4 e -5 fazem

parte da família das fuclectinas, que se liga a fucose, e a -6, da família das lectinas do tipo C, uma ligante à galactose nesse caso. No entanto, interessantemente, Ep-RSN-4 não apresentou especificidade para fucose, e sim para galactose e lactose (FLEMING *et al.*, 2009).

A Ep-RSN-1 apresentou similaridade com o grupo de inibidores de proteinases cisteínicas. No entanto, Fleming *et al.* (2009) não conseguiram caracterizar essa proteína, mas os autores mostraram que o fluido do ninho de espuma de *Engystomops pustulosus* é capaz de inibir a ação da enzima papaína.

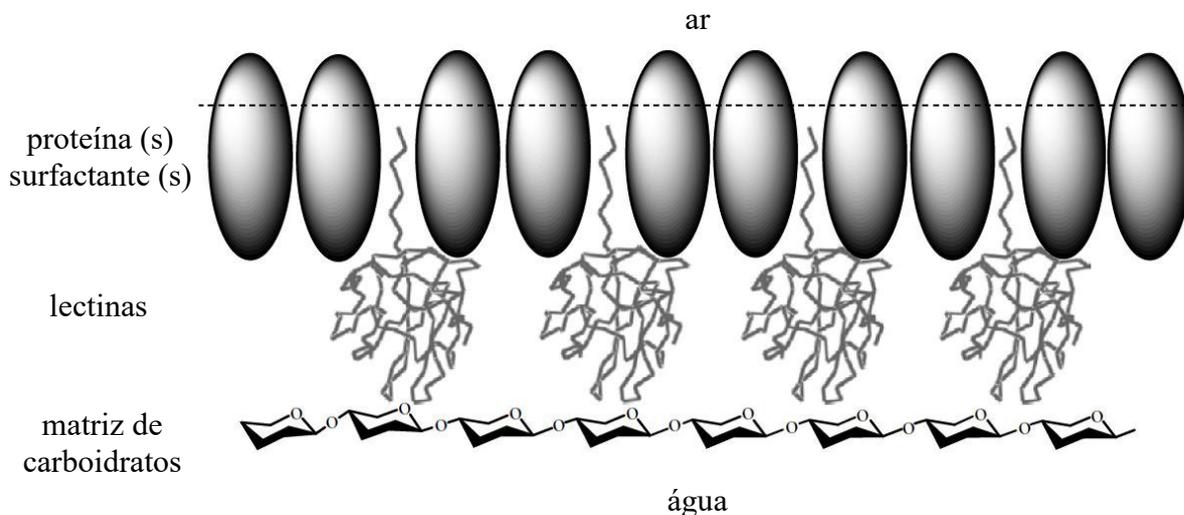
Com esses conhecimentos, Fleming *et al.* (2009) discutem acerca da eficiência e da estabilidade do ninho de espuma. Com apenas 10 µg/mL, a RSN-2 consegue reduzir consideravelmente a tensão superficial da água, que é um indicador para a formação de bolhas. Assim, há um menor gasto energético no processo de síntese proteica, visto que uma quantidade relativamente pequena de proteína é necessária para a formação da bioespuma. Da mesma forma, com a baixa da tensão superficial, há uma economia de energia mecânica para a mistura do ar com a água. Além disso, o tamanho dessa proteína impede a infiltração na bicamada fosfolipídicas, o que a torna compatível com sistemas biológicos (FLEMING *et al.*, 2009).

Nesse contexto, a bioespuma, gerada inicialmente pela proteína surfactante, seria, então, estabilizada por ligações cruzadas entre lectinas e carboidratos, formando um complexo de superfície multicamada (Figura 6). A presença de uma região N-terminal hidrofóbica em RSN-3 e -5 pode indicar que essas moléculas estão presente na interface água-ar junto com a proteína surfactante, corroborando com esse modelo. Ademais, essa interação lectina-carboidrato também pode impedir a difusão de macromoléculas para o meio adjacente ao ninho e ajudar na retenção de água, o que dificulta a desidratação (FLEMING *et al.*, 2009).

Essas lectinas também podem apresentar uma função protetora ao se ligarem à carboidratos de microrganismos, o que evitaria a disseminação de possíveis patógenos pelo ninho. No entanto, vale ressaltar que o ninho de *Engystomops pustulosus* não apresenta atividade antimicrobiana. Além disso, a presença de cistatinas também pode auxiliar no sistema de defesa dos ninhos contra predadores e parasitas. (FLEMING *et al.*, 2009).

Outro ninho de espuma com uma proteína isolada é proveniente da espécie *Leptodactylus vastus*. Lv-RSN-1 possui uma massa molecular de 23,5 kDa. Ela apresenta dois domínios, um N-terminal com seis α -hélices antiparalelas e um C-terminal com três α -hélices antiparalelas e com mais uma perpendicular a essas três. Há também quatro pontes dissulfetos, nenhuma delas entre os domínios. Lv-RSN-1 ainda apresenta duas pequenas β -conformações antiparalelas (HISSA *et al.*, 2014).

Figura 6 – Arranjo hipotético das ranaspuminas com os carboidratos, formando a arquitetura dos ninhos de espuma



Fonte: Fleming *et al* (2009), traduzido para o português.

Similar ao que foi discutido sobre a Ep-RSN-2, Lv-RSN-1 apresentou uma eficiente atividade surfactante ao diminuir a tensão superficial da água com apenas 15 $\mu\text{g/mL}$. Ademais, essa proteína na concentração de 0,1 mg/mL , obteve um índice de emulsão de 35% água/querosene, o qual permaneceu estável por mais de um mês (HISSA *et al.*, 2014).

Interessantemente, ao contrário da maioria das moléculas anfipáticas, Lv-RSN-1 não apresentou nenhuma tendência para formação de agregados, de oligômeros ou de micelas em solução aquosa. Além disso, essa proteína é altamente solúvel em água e apresenta apenas uma cavidade hidrofóbica que pode explicar parcialmente as atividades de superfície (HISSA *et al.*, 2014).

A fim de explicar sua atividade surfactante, esses autores propõem a necessidade de uma mudança conformacional na proteína para a exposição de resíduos hidrofóbicos. Esse mecanismo já é conhecido para Ep-RSN-2 e para laterina, que também não possuem tendência para a formação de agregados ou de micelas em solução. Com isso, são sugeridas a ocorrência de duas mudanças conformacionais: exposição do núcleo hidrofóbico da proteína a partir de movimentos entre os dois domínios; e o aumento da cavidade hidrofóbica por meio de modificações das β -conformações (HISSA *et al.*, 2014).

A Tabela 1 sumariza todas as proteínas isoladas a partir de ninhos de espuma de rãs com as respectivas espécies, atividades e massas moleculares.

Tabela 1 – Proteínas estudadas de ninhos de espuma de rãs.

Proteína	Espécie de rã	Atividade	Massa molecular (kDa)	Publicação
Ranasmurfina (PI-RSF-1)	<i>Polypedates leucomystax</i>	Desconhecida	2 x 13	Oke <i>et al.</i> (2008)
Ep-RSN-1	<i>Engystomops pustulosus</i>	Cistatina-like	14,2	Fleming <i>et al.</i> (2009)
Ep-RSN-2	<i>E. pustulosus</i>	Surfactante	11,0	Fleming <i>et al.</i> (2009)
Ep-RSN-3	<i>E. pustulosus</i>	Lectina	18,9	Fleming <i>et al.</i> (2009)
Ep-RSN-4	<i>E. pustulosus</i>	Lectina	21,3	Fleming <i>et al.</i> (2009)
Ep-RSN-5	<i>E. pustulosus</i>	Lectina	18,8	Fleming <i>et al.</i> (2009)
Ep-RSN-6	<i>E. pustulosus</i>	Lectina	27,2	Fleming <i>et al.</i> (2009)
Lv-ranaspumina (Lv-RSN-1)	<i>Leptodactylus vastus</i>	Surfactante	23,5	Hissa <i>et al.</i> (2014)

Fonte: elaborada pelo autor.

2.5 Proteômica

A definição mais aceita para proteoma se refere a todas as proteínas expressas em um dado organismo, órgão, tecido ou quaisquer outras estruturas biológicas em uma condição definida no espaço-tempo. Na maioria dos casos, dois ou mais proteomas são comparados em condições distintas a fim de relacionar a expressão ou a modificação de certas proteínas com determinadas funções. Em outros estudos, objetiva-se a descrição completa do proteoma a fim de compará-los entre diferentes espécies (LOVRIC, 2011).

Diferentemente das demais “ômicas”, a proteômica enfrenta um grande desafio: alta diversidade de estrutura primária e, conseqüentemente, uma grande diversidade de proteínas. Assim, torna-se complexa a elaboração de metodologias que consigam abranger toda essa diversidade desde a extração proteica até a análise de dados (LOVRIC, 2011).

Aproximadamente 90% dos estudos em proteômica utiliza a metodologia *bottom-up*, que consiste na digestão de proteínas em pequenos peptídeos. Conseqüentemente, a obtenção de dados a partir da espectrometria de massa é facilitada, bem como a análise dos mesmos. Nessa técnica, é possível utilizar uma abordagem dependente ou independente de gel de poliacrilamida de acordo com a natureza da amostra (LOVRIC, 2011; RABILLOUD, 2002; YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009).

A espectrometria de massa (MS) tem se tornado uma técnica indispensável para a proteômica. Existem diversos equipamentos de MS, que exibem variações relacionadas ao tipo de fonte de ionização, de analisador de massa, que pode ser um ou mais, e do detector de íons. Vale ressaltar, entretanto, que cada equipamento pode gerar um conjunto de dados distinto para uma mesma amostra. Isso ocorre devido à diversidade de proteínas e às diferentes propriedades de cada espectrômetro de massa (LOVRIC, 2011; YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009).

Por fim, ainda é possível acoplar técnicas de separação ao MS, o que aumenta a sensibilidade, a acurácia e a identificação de peptídeos pouco abundantes. Normalmente, utiliza-se técnicas cromatográficas para esse propósito, como HPLC (*high-pressure liquid chromatography*), RPLC (*reverse phase liquid chromatography*), cromatografia de afinidade ou cromatografia multidimensional (YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Objetiva-se acessar o perfil proteico dos ninhos de espuma de quatro espécies de anuros do nordeste brasileiro, *Leptodactylus vastus*, *Leptodactylus macrosternum*, *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus albifrons*, e verificar se há alguma relação proteica entre as bioespumas. Além disso, visa-se conhecer algumas atividades biológicas e surfactantes dessas estruturas a fim de enriquecer os escassos conhecimentos acerca dos papéis ecológicos e biotecnológicos das espumas de anuros.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar proteínas e carboidratos totais dos ninhos coletados;
- Testar funções biológicas por meio das atividades antibacteriana, hemaglutinante e hemolítica;
- Testar funções surfactantes por meio da mensuração da redução da tensão superficial da água e do índice de emulsificação da mistura água/querosene;
- Analisar o perfil proteico por meio de SDS-PAGE-Tricina;
- Identificar as proteínas dos ninhos de espuma por técnicas de espectrometria de massa (LC-MS/MS) e de bioinformática.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta de material biológico

A coleta foi realizada em diversos municípios do estado do Ceará durante o período chuvoso que corresponde, aproximadamente, aos meses de janeiro a abril, sempre no final da tarde e à noite. Foi possível coletar ninhos de espumas de *L. vastus* (Fortaleza), *L. macrosternum* (Pecém e Fortaleza), *P. cuvieri* (Pacatuba) e *P. albifrons* (Pecém). Os ninhos foram coletados em tubos cônicos de modo asséptico, retirando-se galhos, folhas e outras partículas maiores. Foram seguidas as normas da legislação vigente no período da coleta com licença SISBIO de número 58036-1 liberada pelo Ministério do Meio Ambiente.

Após a coleta, no laboratório, as amostras foram deixadas em repouso na geladeira até que as espumas se desintegrassem para o estado líquido viscoso. Com isso, o material foi centrifugado a 7.000 g por 15 minutos a fim de se retirar os vestígios sólidos provenientes do local de coleta e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2 Quantificação de proteínas e de carboidratos totais

Utilizou-se o método descrito por Bradford (1976) para a quantificação proteica com o uso da albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A quantificação de carboidratos totais foi realizada pelo método Ácido sulfúrico-UV descrito por Albalasmeh, Berhe e Ghezzehei (2013), utilizando a glicose como padrão.

4.3 Atividade antimicrobiana em meio líquido

A fim de avaliar o efeito do fluido dos ninhos de espuma sobre o crescimento de bactérias, 50 μL de uma cultura em caldo Müeller-Hinton, cuja absorvância foi previamente ajustada entre 0,1 e 0,2 a 600 nm, foi inoculada à 50 μL do ninho estéril em diferentes concentrações. Os fluidos foram esterilizados em contato com luz ultravioleta por 5 minutos.

Foram realizadas seis diluições seriadas dos ninhos na razão 1:2 em NaCl 0,15 M, sendo a concentração inicial de proteínas igual a 1 mg/mL em todos os ninhos. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços e foram incubadas a 37°C por 24 horas após a inoculação.

Para verificar o crescimento da cultura, foram realizadas duas medidas de absorvância a 630 nm, uma antes da incubação e outra com 24 horas. O experimento foi

realizado em triplicata para cada diluição de cada ninho. O controle positivo foi 50 μ L de NaCl 0,15 M, e o controle negativo, 50 μ L de formaldeído 1%. Foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. Após a leitura da absorbância, realizou-se um subcultivo em ágar Müeller-Hinton para verificar a viabilidade das culturas. Esquema apresentado na Figura 7.

Figura 7 – Esquema do ensaio da atividade antimicrobiano



Fonte: elaborada pelo autor. As diluições seriadas na razão 1:2 foram realizadas na vertical. Três colunas foram destinadas para o ninho de cada espécie. A penúltima linha foi preenchida com NaCl 0,15 M (C+). A última linha foi preenchida com formaldeído 1% (C-).

4.4 Atividade hemaglutinante e hemolítica

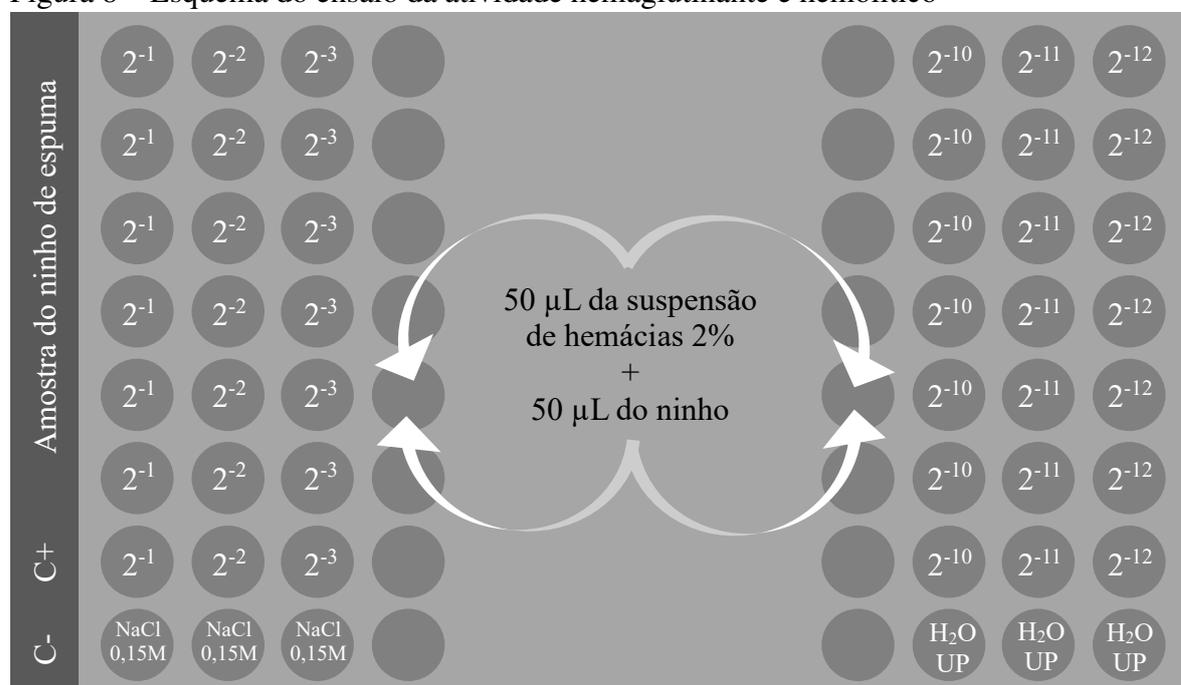
O ensaio de hemaglutinação foi realizado com sangue humano do tipo O⁻ e sangue de coelho de acordo com Fleming *et al.* (2009) com algumas modificações. 50 μ L de cada diluição, na razão 1:2 em NaCl 0,15 M, de cada fluido do ninho foi misturado com 50 μ L de uma suspensão de 2% (v/v) de hemácias. O sangue a 2% foi previamente tratado com 100 μ L de tripsina 1 mg/mL por uma hora a 4°C em um volume total de 10 mL e lavado cinco vezes com NaCl 0,15 M.

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços e estas foram incubadas a 37 °C por uma hora após a mistura. O controle positivo foi 50 μ L de uma solução de 1 mg/mL da lectina CFL de *Cratylia floribunda* (CAVADA *et al.*, 1999), e o controle negativo consistiu de

50 μL de NaCl 0,15 M. Ambos misturados com 50 μL da suspensão de hemácias 2%. A concentração de proteínas inicial nos ninhos de espuma foi 1 mg/mL. O experimento foi realizado em triplicata. Esquema demonstrado na Figura 8.

Para verificar a atividade hemolítica, utilizou-se a metodologia descrita por Farias *et al.* (2014) com modificações. As microplacas do ensaio hemaglutinante foram centrifugadas a 1.000 g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novas microplacas e analisados visualmente. Como controle positivo, foi misturado 50 μL de água ultrapura e 50 μL da suspensão de hemácias 2%.

Figura 8 – Esquema do ensaio da atividade hemaglutinante e hemolítico



Fonte: elaborada pelo autor. As diluições seriadas na razão 1:2 foram realizadas na horizontal. Três linhas foram destinadas para o ninho de cada espécie. A penúltima linha foi preenchida com a CFL (C+). Os três primeiros poços da última linha foram preenchidos com NaCl 0,15 M (C-). Os três últimos poços da última linha foram preenchidos com água ultrapura (H_2O UP) como controle para a atividade hemolítica.

4.5 Medida da tensão superficial

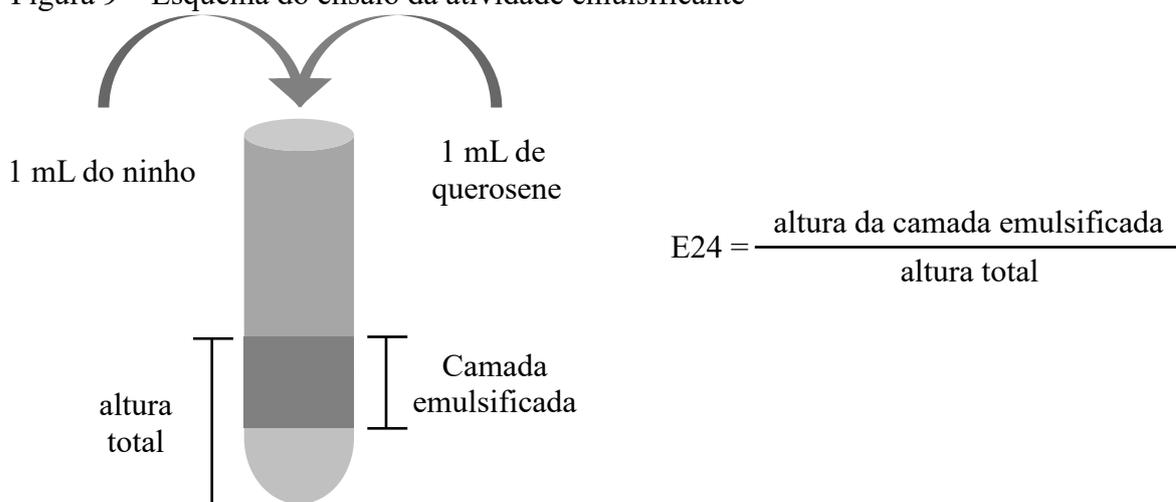
A mensuração da tensão superficial dos ninhos de espuma foi realizada por meio do método de *De Nöuy* utilizando um tensiômetro *Krüß EasyDyne K20* (*Krüss GmbH*, Hamburgo, Alemanha). Utilizou-se 15 mL de cada ninho de espuma em um *vessel* de 30 mL. O tensiômetro foi previamente calibrado com água destilada atingindo valores de 71 mN/m. Foram realizadas pelo menos 5 medições para cada amostra. A concentração de proteínas nos ninhos permaneceu a mesma que foi encontrada na natureza. Para verificar se houve diferença

significativa, foi utilizado *One-way ANOVA* com teste de Tukey no programa *GraphPad Prism* 6.01, *GraphPad Software*, Califórnia, EUA.

4.6 Atividade emulsificante

A atividade emulsificante do fluido dos ninhos de espuma foi medida por meio da metodologia descrita por Iqbal, Khalid e Malik (1995) com adaptações. Misturou-se 1 mL do ninho com 1 mL de querosene em um tubo de ensaio. A mistura foi homogeneizada por meio de um *vortex* durante dois minutos. Os tubos de ensaio ficaram em repouso por 24 horas em temperatura ambiente. Ao término desse período, foi calculado o índice E24, que é a razão entre altura da camada emulsificada e a altura da camada total, dado em porcentagem. O ensaio foi realizado em triplicata, tendo a água destilada como controle negativo. Esquema demonstrado na Figura 9.

Figura 9 – Esquema do ensaio da atividade emulsificante



Fonte: elaborada pelo autor.

4.7 Eletroforese

O perfil proteico dos ninhos de espuma foi elucidado por meio da eletroforese desnaturante descontínua em gel de poliacrilamida na presença de tricina-SDS descrita em Schägger e von Jagow (1987). Após a corrida, o gel foi corado com a técnica *Colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250* (NEUHOFF et al., 1988). O número de bandas foi determinado com o programa *BioNumerics* 6.6, criado por *Applied Maths NV*.

4.8 Preparação das amostras de ninhos de espuma para análise por LC-MS/MS

Utilizou-se a abordagem proteômica *bottom-up gel-free*. Dessa forma, 50 µg de proteínas totais foram reduzidas com DTT na concentração final de 50 mM a 70° C por uma hora sob agitação de 500 RPM. Posteriormente, as amostras foram alquiladas com a adição de IAA na concentração final de 50 mM a 37 °C por 30 minutos sob agitação de 500 RPM. Ao volume final desses dois processos, foram adicionados 4 volumes de acetona, deixando *overnight* a – 20° C. Então, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado. Esperou-se a acetona evaporar completamente a 37 °C. Para a fragmentação das proteínas, adicionou-se 15 µL de tripsina 0,1 mg/mL. A digestão ocorreu por 16 horas a 37 °C sob agitação de 500 RPM. A reação foi parada com TFA na concentração final de 0,1%, e as soluções proteicas foram levadas para um *speed vac*. Para a dessalinização, foi utilizada uma resina de fase reversa POROS 20 R2 (Applied Biosystems). A eluição ocorreu em 60% de ACN com TFA 0,05%. Os peptídeos foram secados em um *speed vac*, ressuspensos em 0,1% de ácido fórmico e quantificados. As amostras proteicas foram sequenciadas a partir de um sistema de cromatografia líquida EasyII-nano acoplado a um espectrômetro de massa ESI-LTQ-Orbitrap. As amostras foram analisadas em triplicatas contendo duas réplicas técnicas.

Os dados foram analisados utilizando o programa *PatternLab for Proteomics* (CARVALHO et al., 2015). Nenhuma das espécies estudadas ou alguma outra produtora de ninho de espuma apresentam genomas sequenciados. Dessa forma, escolheu-se utilizar o banco de dados do NCBI para todas as proteínas associadas à ordem Anura. As proteínas identificadas foram concatenadas por meio do critério de *maximum parsimony*. Com a lista concatenada, foi utilizado a plataforma *Venny 2.1* (OLIVEROS, 2007-2015) para verificar quantas e quais proteínas eram comuns entre as quatro espécies estudadas por meio de um diagrama de *Venn*.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização de macromoléculas

Como demonstra a Tabela 2, a concentração de proteínas nos ninhos de espuma estudados variou entre 1,02 e 2,27 mg/mL. Já a concentração de carboidratos variou entre 0,23 a 1,37 mg/mL.

Tabela 2 – Concentração de proteínas e de carboidratos totais para cada ninho de espuma de *L. vastus*, *L. macrosternum*, *P. cuvieri* e *P. albifrons*

	Concentração de proteínas (mg/mL)	Concentração de carboidratos (mg/mL)
<i>L. vastus</i>	1,37 ± 0,24	0,23 ± 0,01
<i>L. macrosternum</i>	1,02 ± 0,10	1,37 ± 0,07
<i>P. cuvieri</i>	2,27 ± 0,48	1,16 ± 0,06
<i>P. albifrons</i>	1,66 ± 0,27	1,30 ± 0,07

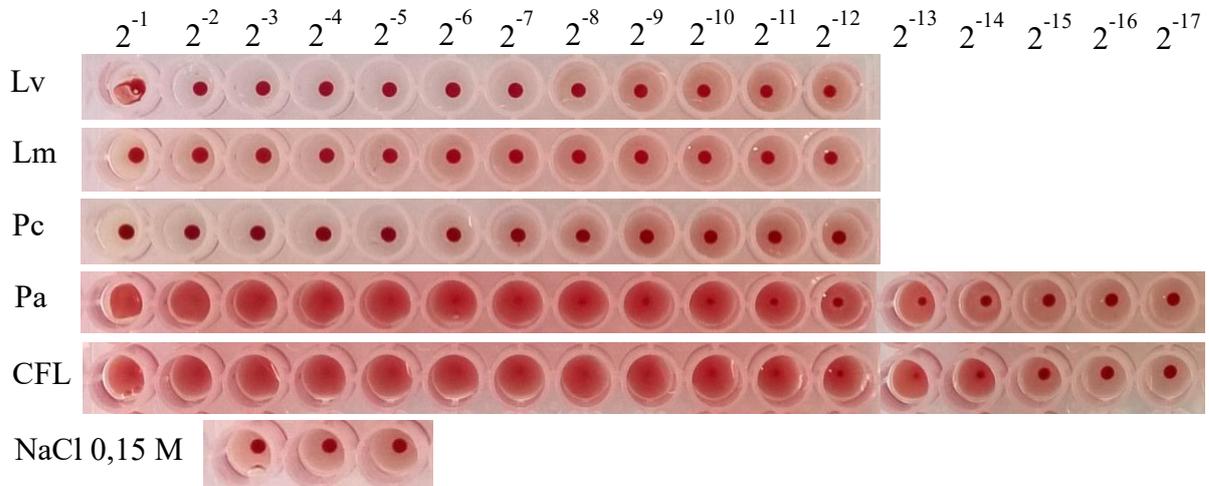
Fonte: elaborada pelo autor.

5.2 Atividades biológicas

Os ninhos de espuma das quatro espécies deste trabalho não apresentaram atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145.

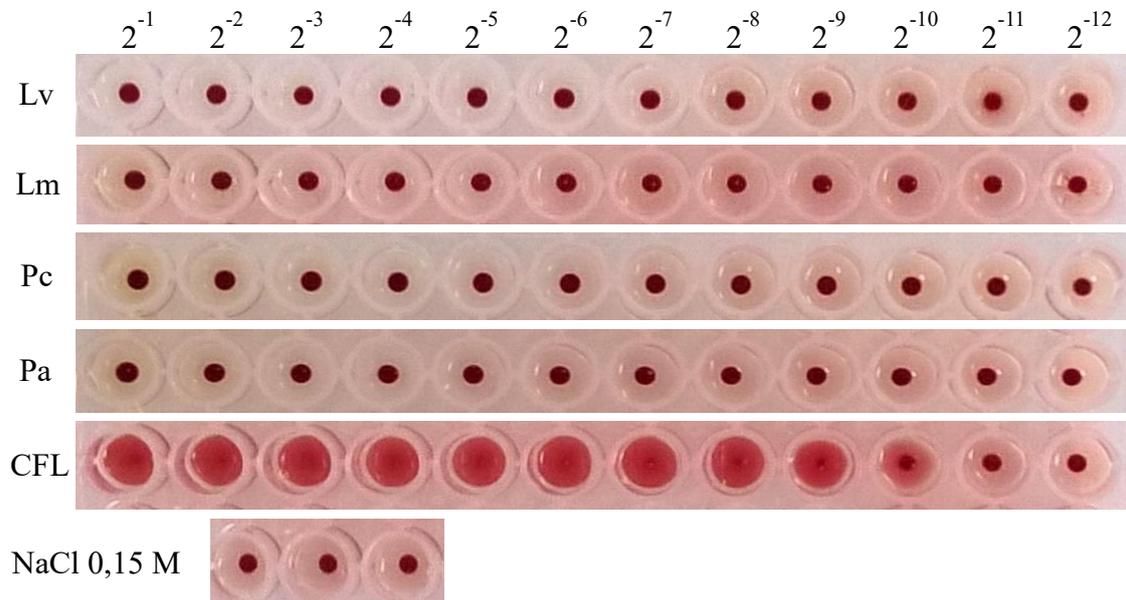
Com relação à atividade hemaglutinante, apenas o fluido do ninho de *P. albifrons*, como mostra a Figura 10, apresentou atividade em sangue de coelho até, aproximadamente, a diluição 2^{-13} (0,12 µg/mL de proteína). Também é possível verificar traços dessa atividade no ninho de *L. vastus* em sangue de coelho na primeira diluição. Com relação ao sangue humano O⁺, nenhum fluido apresentou essa atividade como mostra a Figura 11. Após a centrifugação das placas, não foi observada atividade hemolítica para nenhuma das amostras.

Figura 10 – Ensaio hemaglutinante com sangue de coelho dos ninhos de espuma de *L. vastus* (Lv), *L. macrosternum* (Lm), *P. cuvieri* (Pc) e *P. albifrons* (Pa). CFL corresponde ao controle positivo lectina de *Cratylia floribunda*



Fonte: elaborada pelo autor. Um volume de 50 μ L do fluido do ninho de espuma em diluições na escala 1:2 em salina 0,15 M foi misturado com 50 μ L de uma suspensão de 2% (v/v) de hemácias.

Figura 11 – Ensaio hemaglutinante com sangue humano O⁻ dos ninhos de espuma de *L. vastus* (Lv), *L. macrosternum* (Lm), *P. cuvieri* (Pc) e *P. albifrons* (Pa). CFL corresponde ao controle positivo lectina de *Cratylia floribunda*



Fonte: elaborada pelo autor. Um volume de 50 μ L do fluido do ninho de espuma em diluição na escala 1:2 em salina 0,15 M foi misturado com 50 μ L de uma suspensão de 2% (v/v) de hemácias.

5.3 Atividades tensoativas

Os índices de emulsificação água/querosene obtidos pelos fluidos dos ninhos de espuma, como mostra a Tabela 3, variaram entre 62% e 68%. Em todos os casos, a emulsão

persistiu por várias semanas. A Figura 12 compara a diferença entre a condição controle e as condições correspondentes ao *pool* de proteínas dos diferentes ninhos.

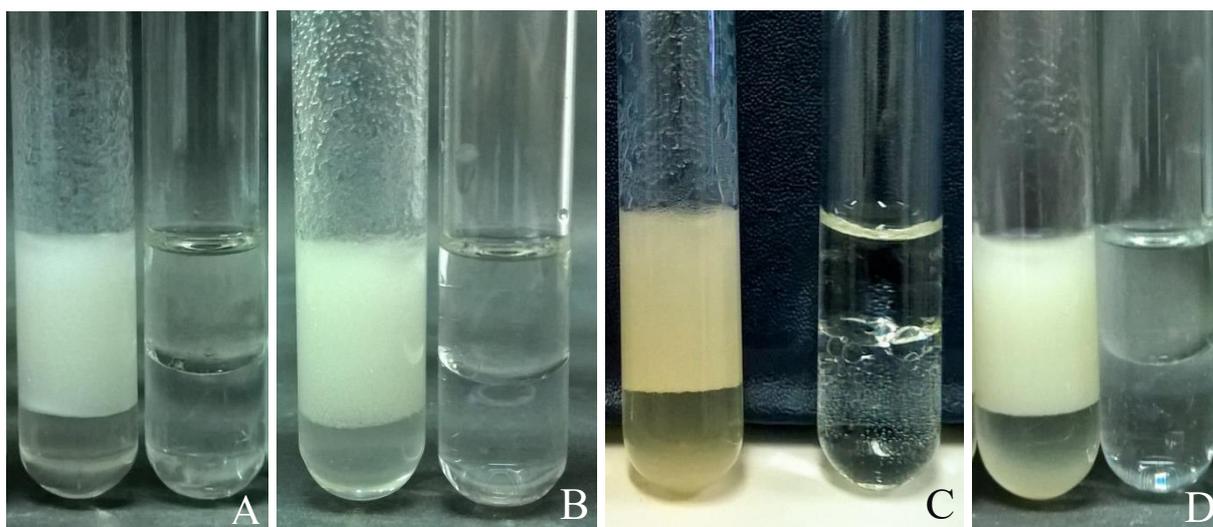
Com relação à tensão superficial, todos os ninhos de espuma, conforme o Gráfico 1, foram capazes de reduzir a tensão superficial da água. Os fluidos dos ninhos de espuma de *L. vastus* ($1,37 \pm 0,24$ mg/mL de proteína), *L. macrosternum* ($1,08 \pm 0,11$ mg/mL), *P. cuvieri* ($2,05 \pm 0,28$ mg/mL) e *P. albifrons* ($1,66 \pm 0,27$ mg/mL) reduziram a tensão superficial da água de $71,12 \pm 0,16$ mN/m para $45,34 \pm 0,70$ mN/m, $39,1 \pm 0,6$ mN/m, $39,66 \pm 0,50$ mN/m e $39,5 \pm 0,14$ mN/m, respectivamente. Com ANOVA e teste de Tukey, as amostras de *L. macrosternum*, *P. cuvieri* e *P. albifrons* não apresentaram diferenças significativas entre si, mas apresentaram diferenças significativas com relação a *L. vastus* e a água, sendo $p < 0,0001$.

Tabela 3 – Índices de emulsificação com as respectivas concentrações de proteínas totais dos ninhos de espuma

	E24 (%)	Concentração de proteínas (mg/mL)
<i>L. vastus</i>	$64,10 \pm 2,22$	$1,37 \pm 0,24$
<i>L. macrosternum</i>	$64,70 \pm 4,22$	$1,02 \pm 0,10$
<i>P. cuvieri</i>	$62,82 \pm 2,22$	$2,27 \pm 0,48$
<i>P. albifrons</i>	$67,13 \pm 1,51$	$1,66 \pm 0,27$

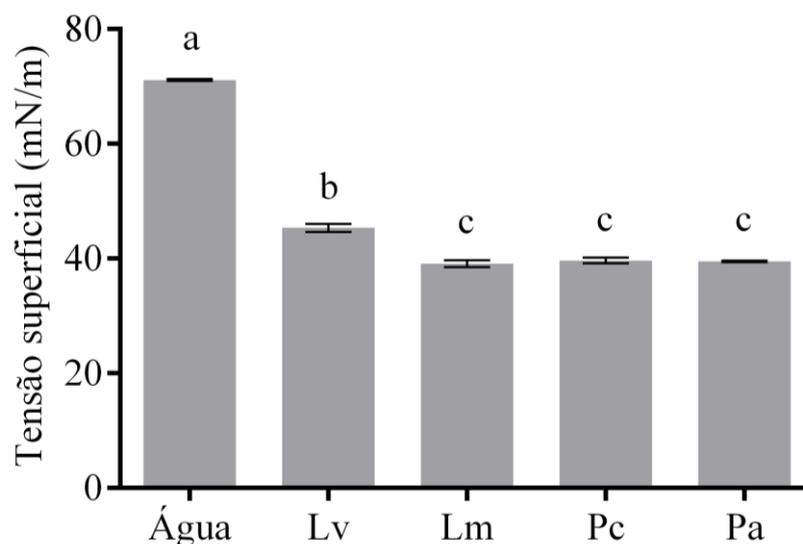
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 12 – Atividade emulsificante para cada ninho de espuma



Fonte: elaborada pelo autor. *L. vastus* (A), *L. macrosternum* (B), *P. cuvieri* (C) e *P. albifrons* (D).

Gráfico 1 – Redução da tensão superficial da água ocasionada pelos ninhos de espuma das quatro espécies estudadas

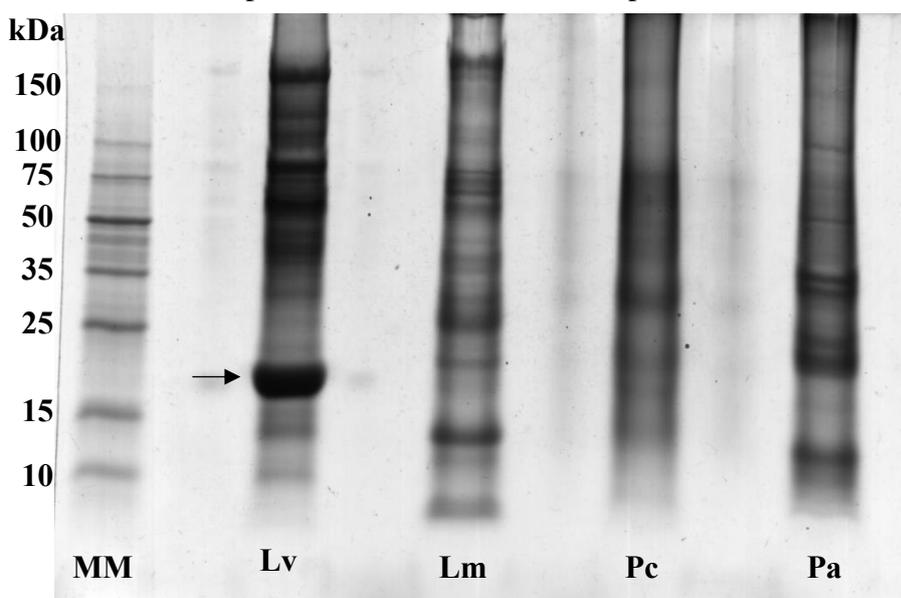


Fonte: elaborado pelo autor. *L. vastus* (Lv); *L. macrosternum* (Lm); *P. cuvieri* (Pc); *P. albifrons* (Pa). Foi utilizado ANOVA com teste de Tukey, $p < 0,0001$. As letras iguais indicam que as amostras são significativamente iguais entre si. Se as letras forem diferentes, as amostras são significativamente diferentes entre si.

5.4 Análise proteômica por espectrometria de massa

Com base na Figura 13, observa-se uma grande diversidade de proteínas para os diferentes ninhos de espuma com ampla faixa de massa molecular. Os quatro ninhos estudados demonstram um perfil proteico diferente um do outro. É possível perceber a presença de uma banda evidente em *L. vastus* (Lv), correspondente a proteína Lv-RSN-1 (Hissa *et al*, 2014). Na amostra de *L. macrosternum* (Lm), nota-se a presença de uma proteína de alta massa molecular, estimada em 162,66 kDa, e de outra com baixa massa molecular, estimada em 7,13 kDa. Com relação à bioespuma de *P. cuvieri* (Pc), a maioria das proteínas possuem massa molecular entre 10 e 100 kDa. Já o ninho de *P. albifrons* (Pa) apresentou duas bandas bem evidentes com massas estimadas em 19 e 10,3 kDa. Com o *BioNumerics* 6.6, foram identificadas, respectivamente, 12, 16, 8 e 11 bandas em *L. vastus*, *L. macrosternum*, *P. cuvieri* e *P. albifrons*.

Figura 13 – Gel de eletroforese para os fluidos de ninho de espuma



Fonte: elaborada pelo autor. A seta indica a proteína Lv-RSN-1. *Leptodactylus vastus* (Lv), *Leptodactylus macrosternum* (Lm), *Physalaemus cuvieri* (Pc) e *Physalaemus albifrons* (Pa). Marcador molecular à esquerda (MM). Gel separador T 16,5% C 3%, gel espaçador T 10% C 3% e gel de empilhamento T 4% C 3%. Foram aplicados 40 µg de proteína em cada poço.

Com relação aos dados obtidos por espectrometria de massa, a quantidade de proteínas identificadas a partir do banco de dados de Anura do NCBI nos ninhos de espuma variou entre 33 e 284, como mostra a Tabela 4. Ao analisar o diagrama de *Venn* (Figura 14), mais de 50% das proteínas identificadas para o ninho de cada espécie foram espécie-específica. Somente duas foram identificadas em todos os ninhos: malato desidrogenase isoforma X1 e proteína bifuncional da biossíntese de purina. A lista das 30 proteínas com maior contagem de espectros (SC), junto com a cobertura da proteína identificada e com a contagem de peptídeos (PC), para cada ninho de espuma está apresentada na Tabela 5.

Tabela 4 – Número total de diferentes proteínas identificadas a partir do banco de dados de Anura do NCBI no ninho de espuma de cada espécie.

Espécie	Número de proteínas identificadas
<i>Leptodactylus vastus</i>	33
<i>Leptodactylus macrosternum</i>	95
<i>Physalaemus cuvieri</i>	284
<i>Physalaemus albifrons</i>	246

Fonte: elaborada pelo autor. Foi utilizado o critério de máxima parsimônia para contatenação dos dados encontrados.

Tabela 5 – Lista das 30 proteínas com maior número de espectros para cada ninho de espuma de *L. vastus* (Lv), *L. macrosternum* (Lm), *P. cuvieri* (Pc) e *P. albifrons* (Pa).

Espécie	Nº de acesso	PC	SC	Cobertura	Descrição
Lv	pdb 4K83 A	26	203	40.55%	Lv-RSN-1
	sp P53506.1	15	86	38.03%	Actina citoplasmática tipo 8
	XP_01841141.4.1	11	72	5.23%	Predita: proteína epitelial do canal de cloro-like [<i>Nanorana parkeri</i>]
	OCT84086.1	13	67	35.28%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>]
	OCT79597.1	12	56	32.77%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>]
	XP_01809562.9.1	12	55	14.49%	Predita: proteína não caracterizada [<i>Xenopus laevis</i>]
	XP_01794605.8.1	8	41	16.78%	Predita: proteína não caracterizada [<i>Xenopus tropicalis</i>]
	XP_01841639.1.1	6	32	10.31%	Predita: proteína do choque térmico de 71 kDa [<i>Nanorana parkeri</i>]
	XP_01842010.7.1	5	19	10.53%	Predita: proteína bifuncional da biossíntese de purina [<i>Nanorana parkeri</i>];
	OCT67168.1	5	18	9.27%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>]
	XP_01841695.4.1	3	18	14.20%	Predita: malato desidrogenase isoforma mitocondrial X1 [<i>Nanorana parkeri</i>]
	XP_01811863.2.1	2	17	2.45%	Predita: homóloga do componente do complemento 9 L isoforma X1 [<i>Xenopus laevis</i>]
	NP_00108532.6.1	3	17	17.16%	Homóloga da malato desidrogenase 2 S [<i>Xenopus laevis</i>]
	XP_01809649.5.1	4	15	5.24%	Predita: proteína não caracterizada [<i>Xenopus laevis</i>]
	OCT97127.1	2	15	3.59%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>]
	ASU47338.1	3	14	15.96%	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase [<i>Bufo gargarizans</i>]

	XP_01840915	2	13	3.76%	Predita: proteína dissulfeto-isomerase isoforma X1 [<i>Nanorana parkeri</i>]
	7.1				
	OCT61433.1	3	12	18.84%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>]
	AEQ17726.1	3	12	22.96%	Nucleosídeo difosfato quinase putativa, parcial [<i>Hymenochirus curtipes</i>]
	XP_01842120	5	11	3.28%	Predita: Complemento C3 [<i>Nanorana parkeri</i>]
	6.1				
	XP_01841357	2	11	6.29%	Predita: L-lactato desidrogenase cadeia B-like [<i>Nanorana parkeri</i>];
	8.1				
	XP_01841394	2	9	3.39%	Predita: proteína do choque térmico HSP 90-alfa isoforma X1 [<i>Nanorana parkeri</i>];
	7.1				
	XP_01841489	2	8	1.81%	Predita: alfa-1-antitripsina-like [<i>Nanorana parkeri</i>]
	0.1				
	NP_00108576	2	7	5.06%	Homóloga da glicose-6-fosfato isomerase S [<i>Xenopus laevis</i>];
	5.1				
	XP_01808619	2	7	1.47%	Predita: Complemento C5-like [<i>Xenopus laevis</i>];
	4.1				
	OCT71375.1	2	7	10.48%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>];
	OCT93175.1	2	6	7.40%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>];
	XP_01842679	2	4	16.90%	Predita: hemoglobina subunidade alfa-5-like [<i>Nanorana parkeri</i>]
	7.1				
	ADK27487.1	2	4	11.71%	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase [<i>Polypedates maculatus</i>]
	OCA43074.1	2	3	1.31%	Proteína hipotética [<i>Xenopus tropicalis</i>]
Lm	AAB08760.1	19	75	31.00%	Cadeia pesada da proteína de ligação BiP [<i>Xenopus laevis</i>]
	ACY69995.1	22	70	29.57%	Cognato de choque térmico 70 [<i>Pelophylax lessonae</i>]
	NP_00101141	12	70	38.76%	Malato desidrogenase, mitocondrial [<i>Xenopus tropicalis</i>]
	2.1				

XP_01841313	8	67	5.37%	Predita: poliubiquitina-C [<i>Nanorana parkeri</i>]
9.1				
OCT92257.1	14	67	40.53%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>];
NP_00108006	20	66	25.54%	Proteína Heat shock família A (Hsp70)
8.1				member 1 like S homeolog [<i>Xenopus laevis</i>]
XP_01842069	10	65	35.03%	Predita: cadeira pesada da ferritina
1.1				[<i>Nanorana parkeri</i>]
NP_00109123	19	63	24.46%	Proteína Heat shock família A (Hsp70)
8.1				member 1B L homeolog [<i>Xenopus laevis</i>]
XP_01841695	11	58	35.80%	Predita: malato desidrogenase, isoforma
4.1				mitocondrial X1 [<i>Nanorana parkeri</i>]
XP_01842160	13	56	27.40%	Predita: Ribose-5-fosfato isomerase
5.1				[<i>Nanorana parkeri</i>]
ALS87258.1	14	50	39.89%	Gamma actina [<i>Bufo gargarizans</i>]
AEQ16954.1	7	49	19.77%	Ferritina mitocondrial putativa, parcial
				[<i>Pipa carvalhoi</i>]
AEQ17726.1	7	41	29.63%	Nucleosídeo difosfato quinase putativa,
				parcial [<i>Hymenochirus curtipes</i>];
XP_01794548	10	40	34.41%	Predita: ribose-5-phosphate isomerase
5.1				[<i>Xenopus tropicalis</i>]
BAM10994.1	11	40	24.57%	Aspartato aminotransferase 1 [<i>Buergeria buergeri</i>]
ACO51981.1	8	38	13.51%	Transaldolase [<i>Rana catesbeiana</i>]
NP_00101680	7	38	13.49%	Provável precursor da serina
7.1				carboxipeptidase CPVL [<i>Xenopus tropicalis</i>]
CBF96230.1	10	37	26.03%	Produto proteico sem nome [<i>Xenopus laevis</i>]
XP_01840838	8	37	9.77%	Predita: dipeptidil peptidase 3
7.1				[<i>Nanorana parkeri</i>]

	XP_01840915	8	30	10.50%	Predita: proteína dissulfeto-isomerase isoforma X1 [<i>Nanorana parkeri</i>]
	7.1				
	OCA20861.1	9	30	12.24%	Proteína hipotética [<i>Xenopus tropicalis</i>]
	NP_00103789	10	27	25.64%	Adenosilhomocisteinase [<i>Xenopus tropicalis</i>]
	4.1				
	XP_01811227	6	26	11.44%	Predita: homóloga da dipeptidil-peptidase 3 L isoforma X1 [<i>Xenopus laevis</i>]
	1.1				
	OCT84003.1	6	25	16.00%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>]
	AAH63337.1	4	25	11.24%	Proteína hipotética [<i>Xenopus tropicalis</i>]
	XP_01841167	9	25	23.54%	Predita: adenosilhomocisteinase [<i>Nanorana parkeri</i>]
	1.1				
	OCT60588.1	9	24	22.63%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>]
	OCA43074.1	6	24	3.09%	Proteína hipotética [<i>Xenopus tropicalis</i>]
	XP_01842242	8	24	13.23%	Predita: proteína dissulfeto-isomerase A3 [<i>Nanorana parkeri</i>]
	0.1				
	AAH74714.1	8	21	21.52%	Inibidor da dissociação de GDP 1 [<i>Xenopus tropicalis</i>]
Pc	XP_01809562	36	233	24.64%	Predita: proteína não caracterizada [<i>Xenopus laevis</i>]
	9.1				
	OCT77458.1	26	195	48.07%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>]
	XP_00491387	29	184	51.22%	Predita: histona H3-like [<i>Xenopus tropicalis</i>]
	4.2				
	NP_00108985	26	176	51.06%	Actina citoplasmática tipo 8 [<i>Xenopus laevis</i>]
	2.1				
	sp P10995.1	26	145	49.34%	Alfa actina do músculo esquelético 2 [<i>Xenopus laevis</i>]
	CAJ82467.1	25	144	49.34%	Nova proteína similar à alfa actina cardíaca (Actc1) [<i>Xenopus tropicalis</i>]
	XP_01810959	26	121	40.35%	Predita: tropomiosina isoforma X1 [<i>Xenopus laevis</i>]
	9.1				

OCT79588.1	17	121	24.21%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>]
NP_00100125 6.1	22	115	53.52%	ATP sintase subunidade beta, mitocondrial [<i>Xenopus tropicalis</i>]
XP_01842455 7.1	21	94	29.33%	Predita: ATPase de transição do retículo endoplasmático [<i>Nanorana parkeri</i>]
OCA17969.1	21	91	29.31%	Proteína hipotética [<i>Xenopus tropicalis</i>]
OCT72244.1	20	90	24.30%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>]
AEQ17543.1	17	89	48.67%	Tropomiosina putativa 3, parcial [<i>Hymenochirus curtipes</i>]
sp P30883.1	17	76	35.73%	Cadeia beta-4 da tubulina
XP_01841117 5.1	14	72	33.47%	Predita: cadeia alfa-4 da tropomiosina isoforma X4 [<i>Nanorana parkeri</i>]
OCT66217.1	15	67	31.51%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>]
AMZ00214.1	13	62	13.42%	Proteína do choque térmico 90 [<i>Quasipaa spinosa</i>]
XP_01842286 6.1	10	61	31.45%	Predita: triose-fosfato isomerase [<i>Nanorana parkeri</i>]
XP_01811993 8.1	13	60	15.66%	Predita: heat shock protein 90kDa alpha family class B member 1 S homeolog isoform X1 [<i>Xenopus laevis</i>]
OCA45491.1	8	60	31.95%	Proteína hipotética [<i>Xenopus tropicalis</i>]
XP_01809900 6.1	13	57	14.69%	Predita: fator de alongamento 2 [<i>Xenopus laevis</i>]
OCT70556.1	11	56	23.81%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>];
OCT71375.1	10	55	38.31%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>];
OCT90514.1	8	49	4.15%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>]
AAH89730.1	11	49	11.18%	Proteína MGC108369 [<i>Xenopus tropicalis</i>]
AEQ17363.1	10	49	20.06%	Beta-enolase putativa isoforma 3, parcial [<i>Hymenochirus curtipes</i>]

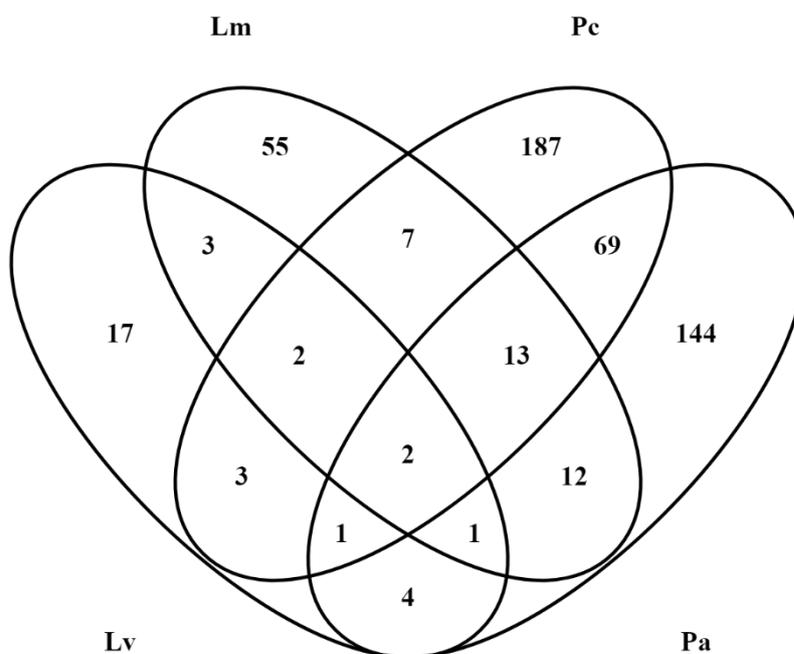
	XP_01841789	14	48	12.22%	Predita: interleucina <i>enhancer-binding factor 3</i> [<i>Nanorana parkeri</i>]
	8.1				
	XP_01841695	8	48	26.33%	Predita: malato desidrogenase, mitocondrial isoforma X1 [<i>Nanorana parkeri</i>]
	4.1				
	NP_00118419	12	47	13.05%	Proteína não caracterizada [<i>Xenopus laevis</i>]
	9.1				
	AAT85638.1	8	46	25.15%	Malato desidrogenase mitocondrial 2b [<i>Xenopus laevis</i>]
Pa	XP_01842455	33	143	39.73%	Predita: ATPase de transição do retículo endoplasmático [<i>Nanorana parkeri</i>]
	7.1				
	XP_01809562	28	139	23.67%	Predita: proteína não caracterizada [<i>Xenopus laevis</i>]
	9.1				
	OCA17969.1	31	139	32.76%	Proteína hipotética [<i>Xenopus tropicalis</i>]
	sp P53506.1	23	132	42.29%	Actina citoplasmática tipo 8
	AAH41201.1	24	128	25.38%	Proteína HSC70 [<i>Xenopus laevis</i>]
	OCA46471.1	23	126	51.81%	Proteína hipotética [<i>Xenopus tropicalis</i>];
	NP_00109123	22	118	25.39%	Proteína Heat shock família A (Hsp70) member 1B L homeolog [<i>Xenopus laevis</i>]
	8.1				
	AAH46739.1	20	109	31.03%	Proteína MGC53823 [<i>Xenopus laevis</i>]
	XP_00491387	21	103	50.41%	Predita: histona H3-like [<i>Xenopus tropicalis</i>]
	4.2				
	XP_01841834	3	103	8.53%	Predita: intelectina-1a-like [<i>Nanorana parkeri</i>]
	5.1				
	XP_01842286	11	100	31.45%	Predita: triose-fosfate isomerase [<i>Nanorana parkeri</i>]
	6.1				
	NP_00108006	20	92	33.89%	Proteína Heat shock família A (Hsp70) member 5 S homeolog precursor [<i>Xenopus laevis</i>]
	4.1				
	OCT79588.1	15	85	27.38%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>]

OCT66217.1	17	83	28.78%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>];
XP_01841985 2.1	17	80	33.26%	Predita: cadeia beta-2B da tubulina isoforma X2 [<i>Nanorana parkeri</i>]
XP_01842543 3.1	16	79	30.79%	Predita: cadeia beta-4B da tubulina-like isoforma X1 [<i>Nanorana parkeri</i>]
XP_01808052 0.1	11	76	41.13%	Predita: triose-fosfato isomerase-like [<i>Xenopus laevis</i>];
XP_01843019 5.1	9	73	12.54%	Predita: N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase 2-like, parcial [<i>Nanorana parkeri</i>];
AAH90153.1	17	67	17.25%	Desconhecida (proteína para MGC:98463) [<i>Xenopus laevis</i>]
XP_01809649 5.1	17	67	16.41%	Predita: proteína não caracterizada [<i>Xenopus laevis</i>];
XP_01809900 6.1	16	67	16.43%	Predita: fator de alongamento 2 [<i>Xenopus laevis</i>]
XP_01842069 1.1	7	66	46.89%	Predita: cadeira pesada da ferritina [<i>Nanorana parkeri</i>];
CAC83783.1	14	66	29.84%	Fosfoglicose isomerase [<i>Duttaphrynus melanostictus</i>];
XP_01808603 6.1	13	65	14.60%	Predita: glicogênio fosforilase, forma do fígado [<i>Xenopus laevis</i>];
XP_01842649 7.1	15	64	25.79%	Predita: 78 kDa glucose-regulated protein isoform X1 [<i>Nanorana parkeri</i>]
OCT70556.1	10	61	26.09%	Proteína hipotética [<i>Xenopus laevis</i>];
XP_01840830 4.1	14	61	26.13%	Predita: piruvato quinase PKM isoforma X1 [<i>Nanorana parkeri</i>];
NP_00108025 5.1	12	60	27.87%	Aspartato aminotransferase 2 [<i>Xenopus laevis</i>];
XP_01841695 4.1	11	59	28.11%	Predita: malato desidrogenase mitocondrial isoforma X1 [<i>Nanorana parkeri</i>];

NP_00108645	11	56	33.14%	Homólogo da malato desidrogenase 2 L
2.1				[<i>Xenopus laevis</i>]

Fonte: elaborada pelo autor. Contagem de espectros (SC). Contagem de peptídeos (PC).

Figura 14 – Diagrama de *Venn* comparando a quantidade de proteínas similares entre os ninhos de espuma



Fonte: elaborado pelo autor. Foi utilizado o critério de máxima parsimônia para contatendar os dados encontrados. *Leptodactylus vastus* (Lv), *Leptodactylus macrosternum* (Lm), *Physalaemus cuvieri* (Pc) e *Physalaemus albifrons* (Pa)

6 DISCUSSÃO

Apesar dos quatro ninhos de espuma estudados neste trabalho serem aquáticos (HADDAD; PRADO, 2005), eles apresentam propriedades distintas relacionadas à consistência desses biomateriais. As bioespumas de *L. macrosternum*, *P. cuvieri* e *P. albifrons* duram entre dois e cinco dias a 4 °C antes de desintegrarem a um estado líquido viscoso, enquanto que as de *L. vastus* permanecem estáveis por mais de uma semana. Diferentemente dos demais que desovam diretamente sobre a lâmina da água, *L. vastus* deposita os ninhos em depressões preenchidas com água próximas à lagoa/lago. Quando chove, a água da chuva leva os girinos, em estágio inicial de desenvolvimento, para a água lântica, onde terminam o desenvolvimento (HADDAD; PRADO, 2005; PRADO; UETANABARO; HADDAD, 2002). Dessa forma, uma maior durabilidade dessa bioespuma é desejada visto a incerteza das precipitações e o risco de evaporação da água presente nessas depressões. Esse modo de reprodução garante uma vantagem evolutiva adicional de proteção contra predadores das poças maiores (HADDAD; PRADO, 2005).

Além disso, há diferenças no que diz respeito à coloração do fluido do ninho. Foi possível perceber que os ninhos das duas espécies de *Physalaemus* estudadas possuem uma cor marrom mais escura, principalmente o de *P. cuvieri*. Nas espécies de *Leptodactylus*, os fluidos apresentam uma cor levemente amarelada, sendo o de *L. vastus* mais claro. Esses compostos cromáticos podem ser intrínsecos à composição do ninho, como a proteína PI-RSF-1 do ninho de *Polypedates leucomystax* que possui um íon de zinco em sua estrutura (OKE *et al.*, 2008). Essa coloração pode estar associada a uma proteção contra radiação ultravioleta, principalmente no nordeste brasileiro onde há altos índices UV (INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS, 2017). Hissa *et al.* (2008) ressaltou essa função ao relatar que o fluido do ninho de *L. vastus* apresenta alta absorvância em comprimentos de onda na faixa do ultravioleta, atingindo valores máximos em 280 nm, visto a presença de proteínas nos ninhos, que absorvem a luz nesse comprimento devido às ligações peptídicas. Dessa forma, a presença de uma estrutura à base de proteínas pode ser mais uma vantagem evolutiva contra os altos índices de UV.

As concentrações entre 1 e 2 mg/mL de carboidratos e de proteínas em *L. macrosternum*, *P. cuvieri* e *P. albifrons* foram semelhantes às encontradas em *Engystomops pustulosus* (COOPER *et al.*, 2005). Dessa forma, é possível que essas macromoléculas desempenhem um papel importante para a arquitetura do ninho dessas espécies, além de evitar a desidratação do mesmo pela retenção de água por carboidratos complexos, semelhante ao

modelo (Figura 6) proposto por Fleming *et al.* (2009).

Em *L. vastus*, a concentração dessas biomoléculas foi semelhante à descrita por Hissa *et al.* (2008), o que indica que não há uma variação significativa de indivíduo para indivíduo. Interessantemente, quando comparado aos ninhos das outras espécies, a quantidade de carboidratos é quase cinco vezes menor e há uma grande dominância de uma única proteína, a Lv-RSN-1 (HISSA *et al.*, 2014), como indica a seta da Figura 13. Dessa forma, essa proteína também pode estar envolvida na estabilização do ninho além da função já conhecida de surfactante, o que pode indicar uma possível variação do modelo proposto por Fleming *et al.* (2009).

A ausência de atividade hemolítica dos ninhos de *L. macrosternum*, de *P. cuvieri* e de *P. albifrons* não foi surpreendente, visto que resultados semelhantes foram encontrados em *L. vastus* (HISSA *et al.*, 2008) e em *Engystomops pustulosus* (FLEMING *et al.*, 2009). No entanto, esse fenômeno é incomum quando comparado com detergentes convencionais (MANAARGADOO-CATIN *et al.*, 2016), que atuam desestabilizando a membrana plasmática. Este fato sugere a presença de moléculas surfactantes inofensivas às membranas biológicas, isto é, biocompatíveis, e abre uma gama de possíveis aplicações biotecnológicas na área de indústrias farmacêuticas, cosméticas entre outras.

Além disso, a ausência de atividade antibacteriana dos ninhos estudados para os modelos testados também sugere essa propriedade. A presença de uma microbiota associada aos ninhos foi demonstrada em Hissa *et al.* (2008). Ecologicamente, os microrganismos da pele de anuros são espécie-específicos (KUENEMAN *et al.*, 2014) e são fundamentais para o desenvolvimento do sistema imunológico do animal (KNUTIE *et al.*, 2017). Dessa forma, futuros estudos envolvendo a microbiota associadas aos ninhos são importantes para compreender o papel da mesma nessas estruturas e o efeito dela sobre a colonização e desenvolvimento da imunidade dos girinos.

A presença de lectinas, demonstrada por meio do ensaio de hemaglutinação, ocorreu apenas no ninho de *P. albifrons* e somente para o sangue de coelho, demonstrando especificidade por algum carboidrato associado à membrana desse animal. A lectina, ou as lectinas, desse ninho se mostrou eficiente: mesmo em concentração de aproximadamente 0,12 µg/mL de proteína total. Ao levar em consideração esse resultado, é possível a interação de diferentes proteínas que constituem os ninhos e que estejam relacionadas com a estabilidade da atividade surfactante dos mesmos (COOPER *et al.*, 2005; FLEMING *et al.*, 2009; HISSA *et al.*, 2008, 2014). No entanto, vale ressaltar que a ausência de atividade hemaglutinante não implica a ausência de lectinas por dois motivos principais. Primeiro, algumas dessas proteínas podem

apresentar apenas um sítio de ligação (merolectinas) e, conseqüentemente, não ocasionar aglutinação (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Segundo, os carboidratos associados às membranas desses dois tipos de sangue podem não possuir afinidade pelo sítio de ligação das possíveis lectinas presentes nesses ninhos.

Os valores de redução da tensão superficial da água obtidos pelos ninhos de *L. macrosternum*, de *P. cuvieri* e de *P. albifrons* se mostraram promissores. Em todos os casos, as medidas foram abaixo dos 40 mN/m, o que é menor do que os resultados para o fluido dos ninhos de *L. vastus* (presente estudo; HISSA *et al.*, 2008) e de *E. pustulosus* (COOPER *et al.*, 2005). Dessa forma, relata-se a presença de moléculas surfactantes, possivelmente proteínas como relatado por esses autores.

Com relação à atividade emulsificante, todos os ninhos apresentaram índices acima de 60%, o que é considerado um ótimo resultado, pois, de acordo com Willumsen e Karlson (1997), um bom agente emulsificante apresenta um índice de emulsificação superior a 50%. Em todos os casos, a emulsão se mostrou estável, persistindo por mais de um mês. Essa estabilidade se mostrou proeminente no fluido das duas espécies do gênero *Physalaemus* em que foi possível verter os tubos sem apresentar sinais de desintegração da emulsão. Com isso, esses dados corroboram com a ideia de que algumas proteínas dos ninhos foram selecionadas, ao longo do tempo evolutivo, a desempenharem o papel específico de surfactantes (COOPER *et al.*, 2005; FLEMING *et al.*, 2009).

O gel de eletroforese, apresentado na Figura 13, mostra uma diversidade de proteínas, principalmente em *L. vastus* e em *L. macrosternum*, que apresentaram o maior número de bandas, 12 e 16 respectivamente. A banda mais expressiva, indicada pela seta e que corresponde a proteína Lv-RSN-1 de 23,5 kDa, não apareceu, na mesma altura, em nenhum outro ninho estudado. Essa diversidade proteica foi diferente do relatado para *Engystomops pustulosus* no qual aparecem apenas 6 proteínas principais na SDS-PAGE (COOPER *et al.*, 2017)

Além disso, as bandas mais evidentes, que podem indicar uma maior importância para a estrutura do ninho, também não se sobrepõem. Dessa forma, cada bioespuma pode ter uma, ou mais, proteína surfactante própria, o que ressalta uma nova fonte de surfactantes naturais e uma provável evolução independente dessas estruturas (FAIVOVICH *et al.*, 2012; FROST *et al.*, 2006). Os dados obtidos por MS também corroboram com essas ideias. As ranaspuminas ou ranasmurfinas conhecidas não foram identificadas nos ninhos de *L. macrosternum*, de *P. cuvieri* e de *P. albifrons*. Somente a Lv-RSN-1 apareceu em *L. vastus*, como já era esperado.

A falta de conhecimento sobre a composição bioquímica dos ninhos e a presença de apenas quatro espécies de anuros com genoma completo (*Nanorana parkeri*, *Rana catesbeiana*, *Xenopus laevis* e *X. tropicalis*), sendo nenhum deles produtores de ninhos de espuma, são fatores que subestimam a identificação de proteínas. A maior parte das proteínas identificadas provavelmente são provenientes de detritos de ovócitos, espermatozoide, embriões, girinos, células epidérmicas ou outros tipos celulares. Esse fato pode ser observado ao analisar o diagrama de *Venn* (Figura 14), as duas únicas proteínas identificadas nos quatro ninhos, malato desidrogenase isoforma mitocondrial X1 e proteína bifuncional da biossíntese de purina, participam do metabolismo celular básico. Vale ressaltar que ambas foram preditas a partir de análises computacionais daqueles quatro genomas existentes nos bancos de dados.

Um fato interessante é que mais de 50% das proteínas identificadas de cada ninho são espécie-específicas como mostra a Figura 14. Esse resultado ilustra a distinção do perfil proteico que existe entre espécies diferentes e pode corroborar com a hipótese de evolução independente já citada (FAIVOVICH *et al.*, 2012; FROST *et al.*, 2006). Uma delas é uma proteína semelhante a intelectina 1a, predita a partir do genoma de *Nanorana parkeri*, e foi identificada no ninho de *P. albifrons*, sendo a única lectina encontrada nos quatro ninhos. Essa proteína apresenta por volta de 60% de identidade de aminoácidos totais com outras da família lectina tipo-X, isoladas inicialmente a partir de *Xenopus laevis*, mas essa família também pode ser encontrada em humanos, peixes-zebra e camundongos. Sabe-se as lectina tipo-X que já foram caracterizadas desempenham papel reprodutivo, embriológico e imunológico (LEE *et al.*, 2004; WANGKANONT *et al.*, 2016). Dessa forma, sugere-se que essa lectina identificada pode apresentar um papel importante na defesa do ninho contra patógenos e/ou no processo de reprodução e desenvolvimento de *P. albifrons*, podendo explicar a atividade hemaglutinante apresentada pelo ninho dessa espécie.

Outro ponto a ser discutido é a diferença na quantidade de proteínas identificadas entre os ninhos do gênero *Leptodactylus* e do gênero *Physalaemus*: estes últimos apresentaram cerca de quatro vezes mais o número de proteínas dos primeiros, como é demonstrado na Tabela 4. É possível também que essa diferença se dê pela presença de um maior número de proteínas desconhecidas em *Leptodactylus* que não foram identificadas pela análise proteômica. Além disso, interessantemente, ao analisar o gel (Figura 13), os ninhos de *Physalaemus* apresentam uma menor quantidade de bandas, o que é contrário aos resultados de MS. Nesse caso, a explicação está na diferença de sensibilidade de detecção entre a espectrometria de massa e o corante *Colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250*. Dessa forma, as bioespumas de *Physalaemus* podem apresentar mais proteínas que estão em baixas quantidades. No entanto,

vale ressaltar, que mais estudos são necessários para o entendimento do papel dessas proteínas na estabilidade, ecologia e evolução dos ninhos. As análises proteômicas dos ninhos de espuma de anuros só poderão avançar quando mais informações acerca dos genomas desses táxons estiverem disponíveis nos bancos de dados.

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou dados inéditos de caracterização dos ninhos de espuma de *L. macrosternum*, *P. cuvieri* e *P. albifrons*, demonstrando a possibilidade de novas proteínas surfactantes e de carboidratos responsáveis pela composição e estabilidade dessas estruturas. A presença de lectina multivalente ficou evidente somente para *P. albifrons*. Nenhum dos ninhos estudados apresentou atividade hemolítica ou antibacteriana.

A proteômica das bioespumas de anuros mostrou uma diversidade de proteínas com perfis diferentes entre as espécies, corroborando com a hipótese de homoplasia dessas estruturas, o que pode indicar uma alta diversidade de ranaspuminas e, conseqüentemente, a descoberta de uma nova fonte de surfactantes naturais.

Por fim, os resultados obtidos são promissores e compõem um passo inicial na elucidação do papel estrutural e ecológico das proteínas dos ninhos de espuma de anuros, bem como o potencial biotecnológico dessas estruturas.

REFERÊNCIAS

- ALBALASMEH, A. A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate polymers**, v. 97, n. 2, p. 253–61, 12 set. 2013.
- ANDRADE, D.; ABE, A. S. Foam nest production in the armoured catfish. **Journal of Fish Biology**, v. 50, n. 3, p. 665–667, mar. 1997.
- ARZABE, C. Reproductive activity patterns of anurans in two different altitudinal sites within the Brazilian Caatinga. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 3, p. 851–864, 1999.
- BANERJEE, A. Jelly secretion by a foam-nesting tree frog *Chiromantis simus* (Anura: Rhacophoridae): An unreported behaviour. **Alytes**, v. 31, n. 3–4, p. 77–82, 2014.
- BEELEY, J. G.; EASON, R.; SNOW, D. H. Isolation and characterization of latherin, a surface-active protein from horse sweat. **The Biochemical journal**, v. 235, n. 3, p. 645–50, 1 maio 1986.
- BORGES-LEITE, M. J. et al. Reproductive activity of *Adenomera* aff. *hylaedactyla* (Anura: Leptodactylidae) in a coastal area of Brazil. **Animal Biology**, v. 65, n. 2, p. 101–111, 16 jul. 2015.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 7 maio 1976.
- BRANDANI, G. B. et al. Adsorption of the natural protein surfactant Rsn-2 onto liquid interfaces. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 19, n. 12, p. 8584–8594, 2017.
- BROMLEY, K. M. et al. Interfacial self-assembly of a bacterial hydrophobin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 17, p. 5419–5424, 28 abr. 2015.
- BRONSTEIN, P. M. Commitments to aggression and nest sites in male *Betta splendens*. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 95, n. 3, p. 436–49, jun. 1981.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 5, p. 520–529, 27 nov. 1998.
- CARVALHO, P. C. et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature Protocols**, v. 11, n. 1, p. 102–117, 10 dez. 2015.
- CASTILLA, J. C. et al. Bio-foam enhances larval retention in a free-spawning marine tunicate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 46, p. 18120–18122, 13 nov. 2007.
- CAVADA, B. S. et al. Primary Structure and Kinetic Interaction with Glycoproteins of the Lectin from Seeds of *Craotylia floribunda*. **Protein and Peptide Letters**, v. 6, n. 1, p. 27–34, 1999.

COOPER, A. et al. Adsorption of Frog Foam Nest Proteins at the Air-Water Interface. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 3, p. 2114–2125, mar. 2005.

COOPER, A. et al. Frog foams and natural protein surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 534, p. 120–129, dez. 2017.

COOPER, A.; KENNEDY, M. W. Biofoams and natural protein surfactants. **Biophysical Chemistry**, v. 151, n. 3, p. 96–104, 2010.

DALGETTY, L.; KENNEDY, M. W. Building a home from foam--tungara frog foam nest architecture and three-phase construction process. **Biology Letters**, v. 6, n. 3, p. 293–296, 23 jun. 2010.

DOBKIN, D. S.; GETTINGER, R. D. Thermal Aspects of Anuran Foam Nests Thermal Aspects of Anuran Foam Nests. **Journal of Herpetology**, v. 19, n. 2, p. 271–275, 1985.

DOWNIE, J. R. How *Leptodactylus fuscus* Tadpoles Make Foam, and Why. **Copeia**, v. 1984, n. 3, p. 778, 1 ago. 1984.

DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E. Recent insights into structures and functions of C-type lectins in the immune system. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 34, p. 26–34, out. 2015.

EUSTON, S. R. Molecular simulation of adsorption of hydrophobin HFBI to the air–water, DPPC–water and decane–water interfaces. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 66–74, dez. 2014.

FAIVOVICH, J. et al. A phylogenetic analysis of *Pleurodema* (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) based on mitochondrial and nuclear gene sequences, with comments on the evolution of anuran foam nests. **Cladistics**, v. 28, n. 5, p. 460–482, out. 2012.

FALATKO, D. M.; NOVAK, J. T. Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. **Water Environment Research**, v. 64, n. 2, p. 163–169, 1 mar. 1992.

FARIAS, D. F. et al. Evaluation of cytotoxic and antimicrobial effects of two Bt Cry proteins on a GMO safety perspective. **BioMed research international**, v. 2014, p. 810490, 23 jul. 2014.

FLEMING, R. I. et al. Foam nest components of the tungara frog: a cocktail of proteins conferring physical and biological resilience. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1663, p. 1787–1795, 22 maio 2009.

FROST, D. R. et al. The Amphibian Tree of Life. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 297, n. 297, p. 1–291, 2006.

GRANT, T. et al. Phylogenetic Systematics of Dart-Poison Frogs and Their Relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 299, n. 299, p. 1–262, 2006.

HADDAD, C. F. B.; PRADO, C. P. DE A. Reproductive Modes in Frogs and Their

- Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience**, v. 55, n. 3, p. 207, 2005.
- HEYER, W. R. The Adaptive Ecology of the Species Groups of the Genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Evolution**, v. 23, n. 3, p. 421, set. 1969.
- HISSA, D. C. et al. Novel surfactant proteins are involved in the structure and stability of foam nests from the frog *Leptodactylus vastus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 16, p. 2707–2711, 15 ago. 2008.
- HISSA, D. C. et al. Unique crystal structure of a novel surfactant protein from the foam nest of the frog *Leptodactylus vastus*. **ChemBioChem**, v. 15, n. 3, p. 393–398, 10 fev. 2014.
- HISSA, D. C. et al. Frog Foam Nest Protein Diversity and Synthesis. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 325, n. 7, p. 425–433, ago. 2016.
- HOBLEY, L. et al. BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 33, p. 13600–13605, 13 ago. 2013.
- HÖDL, W. An Analysis of Foam Nest Construction in the Neotropical Frog *Physalaemus ephippifer* (Leptodactylidae). **Copeia**, v. 1990, n. 2, p. 547–554, 27 jun. 1990.
- HÖDL, W. Reproductive behaviour in the neotropical foam-nesting frog *Pleurodema diplolistris* (Leptodactylidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 13, n. 3, p. 263–274, 1 jan. 1992.
- HOLLIS, K. L. The Role of Learning in the Aggressive and Reproductive Behavior of Blue Gouramis, *Trichogaster trichopterus*. **Environmental Biology of Fishes**, v. 54, n. 4, p. 355–369, 1999.
- HORNE, D. S. Casein structure, self-assembly and gelation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 7, n. 5–6, p. 456–461, nov. 2002.
- HORNE, D. S. Casein micelle structure: Models and muddles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, n. 2–3, p. 148–153, jun. 2006.
- INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **DSA - Radiação Ultravioleta**. Disponível em: <<http://satelite.cptec.inpe.br/uv/>>. Acesso em: 14 nov. 2017.
- IQBAL, S.; KHALID, Z. M.; MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in applied microbiology**, v. 21, n. 3, p. 176–9, set. 1995.
- KABISCH, K. et al. Foam gland and chemical analysis of the foam of *Polypedates leucomystax* (Gravenhorst 1829) (Anura: Rhacophoridae). **Russ J Herpetol**, v. 5, p. 10–14, 1998.
- KNUTIE, S. A. et al. Early-life disruption of amphibian microbiota decreases later-life resistance to parasites. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 86, 2017.

KOBAYASHI, K.; IWANO, M. BslA(YuaB) forms a hydrophobic layer on the surface of *Bacillus subtilis* biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 85, n. 1, p. 51–66, jul. 2012.

KOKUBUM, M. N. DE C.; GIARETTA, A. A. Reproductive ecology and behaviour of a species of *Adenomera* (Anura, Leptodactylinae) with endotrophic tadpoles: Systematic implications. **Journal of Natural History**, v. 39, n. 20, p. 1745–1758, set. 2005.

KOKUBUM, M. N. DE C.; SOUSA, M. B. DE. Reproductive ecology of *Leptodactylus* aff *hylaedactylus* (Anura, Leptodactylidae) from an open area in northern Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v. 3, n. 1, p. 15–21, 2008.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, n. 11, 1 jan. 1992.

KUENEMAN, J. G. et al. The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 6, p. 1238–1250, 2014.

LEE, J. K. et al. The X-lectins: a new family with homology to the *Xenopus laevis* oocyte lectin XL-35. **Glycoconjugate journal**, v. 21, n. 8–9, p. 443–50, 2004.

LOVRIC, J. **Introducing Proteomics: From Concepts to Sample Separation, Mass Spectrometry and Data Analysis**. 1. ed. Oxford: Wiley-Blackwell Publishing, Inc., 2011.

MACKENZIE, C. D. et al. Ranaspumin-2: Structure and Function of a Surfactant Protein from the Foam Nests of a Tropical Frog. **Biophysical Journal**, v. 96, n. 12, p. 4984–4992, jun. 2009.

MAGNUSSON, W. E.; HERO, J.-M. Predation and the evolution of complex oviposition behaviour in Amazon rainforest frogs. **Oecologia**, v. 86, n. 3, p. 310–318, 1991.

MANAARGADOO-CATIN, M. et al. Hemolysis by surfactants — A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 228, p. 1–16, fev. 2016.

MCDONALD, R. E. et al. Latherin: A Surfactant Protein of Horse Sweat and Saliva. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5726, 29 maio 2009.

MCMAHON, S. A. et al. Crystallization of Ranasmurfin, a blue-coloured protein from *Polypedates leucomystax*. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 62, n. 11, p. 1124–1126, 1 nov. 2006.

MÉNDEZ-NARVÁEZ, J.; FLECHAS, S. V.; AMÉZQUITA, A. Foam Nests Provide Context-Dependent Thermal Insulation to Embryos of Three Leptodactylid Frogs. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 88, n. 3, p. 246–253, maio 2015.

MILLER, R. J. Studies on the Social Behavior of the Blue Gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pisces, Belontiidae). **Copeia**, v. 1964, n. 3, p. 469, 10 set. 1964.

MULLIGAN, C. .; YONG, R. .; GIBBS, B. . Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, n. 1–4, p. 371–380, jun. 2001.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183–198, jan. 2005.

NEUHOFF, V. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, n. 6, p. 255–262, 1988.

OKE, M. et al. Unusual Chromophore and Cross-Links in Ranasmurfin: A Blue Protein from the Foam Nests of a Tropical Frog. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 41, p. 7853–7856, 29 set. 2008.

OLIVEROS, J. C. **Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams.** Disponível em: <<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>>. Acesso em: 17 nov. 2017.

PÉREZ-GIL, J. Structure of pulmonary surfactant membranes and films: The role of proteins and lipid–protein interactions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1778, n. 7–8, p. 1676–1695, jul. 2008.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347–352, out. 1995.

PRADO, C. P. A. et al. Trophic eggs in the foam nests of *Leptodactylus labyrinthicus* (Anura, Leptodactylidae): An experimental approach. **Herpetological Journal**, v. 15, n. 4, p. 279–284, 2005.

PRADO, C. P. A.; UETANABARO, M.; HADDAD, C. F. B. Description of a New Reproductive Mode in *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae), with a Review of the Reproductive Specialization toward Terrestriality in the Genus. **Copeia**, v. 2, n. 4, p. 1128–1133, 2002.

PYRON, R. A.; WIENS, J. J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 61, n. 2, p. 543–583, nov. 2011.

RABILLOUD, T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. **Proteomics**, v. 2, n. 1, p. 3–10, jan. 2002.

RCBOWS. **Hoplosternum littorale Spawned! - planetcatfish.com.** Disponível em: <<https://www.planetcatfish.com/forum/viewtopic.php?t=41074>>. Acesso em: 27 nov. 2017.
RODRIGUES, L. et al. Biosurfactants: potential applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 609–618, 1 abr. 2006.

SAGALOWICZ, L.; LESER, M. E. Delivery systems for liquid food products. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, n. 1–2, p. 61–72, abr. 2010.

SANTOS, D. et al. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 18 mar. 2016.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical**

biochemistry, v. 166, n. 2, p. 368–79, 1 nov. 1987.

SCHOR, M. et al. The Diverse Structures and Functions of Surfactant Proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 7, p. 610–620, jul. 2016.

SEYMOUR, R. S.; LOVERIDGE, J. P. Embryonic and larval respiration in the arboreal foam nests of the African frog *Chiromantis xerampelina*. **The Journal of experimental biology**, v. 197, p. 31–46, dez. 1994.

SILVA, W. R.; GIARETTA, A. A.; FACURE, KÁ. G. On the natural history of the South American pepper frog, *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824) (Anura: Leptodactylidae). **Journal of Natural History**, v. 39, n. 7, p. 555–566, 1 fev. 2005.

SUNDE, M.; PHAM, C. L. L.; KWAN, A. H. Molecular Characteristics and Biological Functions of Surface-Active and Surfactant Proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 585–608, 20 jun. 2017.

TANAKA, S.; NISHIHARA, M. Foam nest as a potential food source for anuran larvae: a preliminary experiment. **Journal of Ethology**, v. 5, n. 1, p. 86–88, jun. 1987.

WANGKANONT, K. et al. Structures of *Xenopus* Embryonic Epidermal Lectin Reveal a Conserved Mechanism of Microbial Glycan Recognition. **The Journal of biological chemistry**, v. 291, n. 11, p. 5596–610, 11 mar. 2016.

WESSELS, J. G. H. Hydrophobins: Proteins that Change the Nature of the Fungal Surface. In: [s.l: s.n.]. p. 1–45.

WILLEY, J. M.; WÖSTEN, H. A. B. Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. **Microbiology**, v. 146, n. 4, p. 767–773, 1 abr. 2000.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, n. 5, p. 415–423, 1997.

WÖSTEN, H. A. B. et al. How a fungus escapes the water to grow into the air. **Current Biology**, v. 9, n. 2, p. 85–88, jan. 1999.

WÖSTEN, H. A.; DE VOCHT, M. L. Hydrophobins, the fungal coat unravelled. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1469, n. 2, p. 79–86, 18 set. 2000.

YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. **Annual review of biomedical engineering**, v. 11, p. 49–79, 2009.