

PUCRS

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Seqüestro e variação geográfica dos alcalóides na defesa química de *Melanophryniscus simplex* (Caramaschi e Cruz, 2002) (Anura, Bufonidae)

Patrick Colombo

TESE DE DOUTORADO

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

Av. Ipiranga 6681 - Caixa Postal 1429

Fone: (051) 320-3500 - Fax: (051) 339-1564

CEP 90619-900 Porto Alegre - RS

Brasil

ANO 2012

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Seqüestro e variação geográfica dos alcalóides na defesa
química de *Melanophryniscus simplex* (Caramaschi e Cruz,
2002) (Anura, Bufonidae)

Patrick Colombo
Orientador: Dr. Taran Grant

TESE DE DOUTORADO
PORTO ALEGRE - RS - BRASIL
ANO 2012

SUMÁRIO

1. AGRADECIMENTOS.....	iv
2. RESUMO.....	v
3. ABSTRACT.....	vi
4. APRESENTAÇÃO.....	1
5. CAPÍTULO I – ARTIGO: Geographic variation in the alkaloid profiles of the brazilian red belly toad <i>Melanophryniscus simplex</i> (Caramaschi and Cruz, 2002) (Bufonidae).....	16
6. CAPÍTULO II – ARTIGO: Distribuição de alcalóides do sapo-de-barriga- vermelha <i>Melanophryniscus simplex</i> (Caramaschi e Cruz 2002) (Bufonidae) em quatro diferentes microambientes.....	69
7. CAPÍTULO III – ARTIGO: Variação do perfil de alcalóides entre fêmeas e machos do sapo-de-barriga-vermelha <i>Melanophryniscus simplex</i> (Caramaschi e Cruz, 2002) (Bufonidae).....	106
8. CAPÍTULO IV – ARTIGO: The occurrence of defensive alkaloids in non- integumentary tissues of the Brazilian red-belly toad <i>Melanophryniscus simplex</i> (Bufonidae).....	144
9. COCLUSÕES GERAIS.....	175

1. AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos à Iaro Colombo, Marilene Colombo, Yordanna Colombo; à Caroline Zank; às Famílias, Colombo, Borges, Zank, Oliveira e Losekann Paiva; à Cristiano Agra Iserhard, Luiz Ernesto Costa Schmidt, Felipe Zílio e Marcelo Duarte Freire; a todos os Colegas e Amigos do Setor de Herpetologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; a todos os Colegas e Amigos do Laboratório de Herpetologia e Helmintologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; a todos os Colegas e Amigos da “Division of Herpetology” da John Carroll University, Ohio, EUA; ao Pessoal do Departamento de Química da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; à Tânia Mara Pizzolato e o Pessoal do Laboratório de Química Analítica Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ao Programa de Pós Graduação em Zoologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; à banca examinadora desta tese: Carlos Bloch, Leandro Duarte e Tiago Gomes; à Laura Verrastro, à Ralph Saporito, à Célio Haddad; à Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; à Universidade Federal do Rio Grande do Sul; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; à John Carroll University, e por fim, à Pessoa mais importante, em todos os aspectos, para a realização deste trabalho, meu Orientador, Taran Grant.

- *É verdade que da Europa voltaste feito doutor?*
- *Parece-te isto impossível? É verdade, sim senhor.*
- *E qual ciência então?*
- *Isso não sei: o diploma é escrito em alemão.*

Gonçalves de Magalhães

2. RESUMO

O sapo-de-barriga-vermelha *Melanophryniscus simplex* (Caramaschi e Cruz 2002), é um anfíbio anuro da família Bufonidae que ocorre na região do planalto das araucárias, no sul do Brasil. Sabe-se que as espécies deste gênero possuem alcalóides como parte de sua defesa química contra predadores e organismos patogênicos. Possivelmente estas toxinas têm origem de artrópodes que contêm alcalóides e são itens da dieta destes pequenos sapos. Estudos têm demonstrado uma grande variação geográfica nos perfis de alcalóides da pele de *Melanophryniscus*, esta variação pode, aparentemente, estar relacionada com mudanças na disponibilidade de presas e, possivelmente, com a dieta destes sapos. Mesmo com a existência de estudos sobre a defesa química de algumas espécies de *Melanophryniscus*, ainda existem uma série de lacunas importantes sobre este aspecto da história natural para este gênero. O presente estudo é o primeiro depois de uma década a ser realizado com uma espécie que ocorre no Brasil e trará uma base para o entendimento sobre o seqüestro de alcalóides, a variação geográfica e ambiental destes alcalóides de *Melanophryniscus simplex*. A tese está estruturada em quatro artigos. O primeiro artigo apresenta dados sobre a variação geográfica e individual de *Melanophryniscus simplex*, abordando estes aspectos de maneira mais ecológica do que tradicionalmente tem sido feito em trabalhos que tratam deste tema em anuros que contêm alcalóides. O segundo artigo traz informações inéditas sobre a composição de alcalóides de invertebrados em diferentes microambientes e em sapos, aqui são testadas as relações de composição de alcalóides nestes microambientes em diferentes áreas, comparando invertebrados e sapos. O terceiro artigo é sobre um aspecto da variação individual da diversidade e da composição de alcalóides em *Melanophryniscus*, aqui é testada a diferença da diversidade e composição de alcalóides entre sexos de *M. simplex*. Este estudo ainda não havia sido realizado para as espécies de *Melanophryniscus*. O quarto artigo mostra informações que ainda não haviam sido reportadas para nenhum anuro que contém alcalóides. Neste artigo é demonstrada a presença de alcalóides em músculo, fígado e ovos de *Melanophryniscus simplex*.

3. ABSTRACT

Sequester and geographic variation of the alkaloids-based chemical defense of *Melanophryniscus simplex* (Caramaschi e Cruz, 2002) (Anura, Bufonidae)

Red bellied toads of the genus *Melanophryniscus* occur in southern South America and represent one of several lineages of anurans with the ability to sequester defensive alkaloids from a diet of alkaloid-containing arthropods and are presumably used as a chemical defense against predators, parasites and pathogens. The alkaloid diversity present in alkaloid-containing frogs may vary geographically among populations as well as among individuals of the same population. This variation appears to be associated with differences in the availability of alkaloid-containing arthropods at different locations. Aspects of chemical defense in alkaloid containing frogs has been well documented in dendrobatid and mantellid frogs, but less so in *Melanophryniscus*. Herein we show new data about chemical defense in *Melanophryniscus*. This thesis is organized in four articles. In the first article we present data on the geographic and individual variation of *Melanophryniscus simplex*. The second show new information about the environmental distribution of the alkaloids of *M. simplex*, comparing samples of soil invertebrates and frogs. The third paper brings some data about the variation on alkaloid diversity between females and males of *M. simplex*. And the fourth article presents new information about the presence of alkaloids in non-integumentary tissues of alkaloid-containing frogs.

4. APRESENTAÇÃO

A presente tese de doutorado trata de um estudo sobre aspectos da ecologia da defesa química do sapo-de-barriga-vermelha *Melanophryniscus simplex* (Caramaschi e Cruz, 2002), espécie de anfíbio anuro da família Bufonidae que faz parte de uma das oito linhagens de anfíbios que contém alcalóides usados para sua defesa química. Esta espécie ocorre na região do planalto das araucárias, no sul do Brasil (Fig.1).

O uso de compostos químicos para proteção contra predadores, parasitas e agentes patogênicos é reconhecido em diversos grupos de organismos, como por exemplo, plantas, moluscos, insetos, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (e.g. Dumbacher et al., 1992; Daly, 1995; Fry et al., 2006; Smith e Wheeler, 2006; Huchinson et al., 2007; Kingdon et al., 2011). Tais substâncias, que podem ser produzidas pelo próprio organismo, seqüestradas da dieta ou derivadas de simbiose são utilizadas principalmente como defesa química contra predadores e microorganismos patogênicos (Daly, 1995, 2004; Weldon et al., 2006). Entre os vertebrados, os anfíbios são notáveis por conterem uma grande variedade de substâncias tóxicas armazenadas em glândulas na pele (Daly, 1995). Estes compostos incluem aminas, peptídeos, proteínas, esteróides e alcalóides, tanto hidrofílicos quanto lipofílicos, estes dois últimos são os únicos que não são produzidos pelos anfíbios (Daly, 1995). Os alcalóides são caracterizados por apresentarem um átomo de nitrogênio em uma cadeia cíclica e por possuir uma distribuição limitada na natureza (Pelletier, 1983).

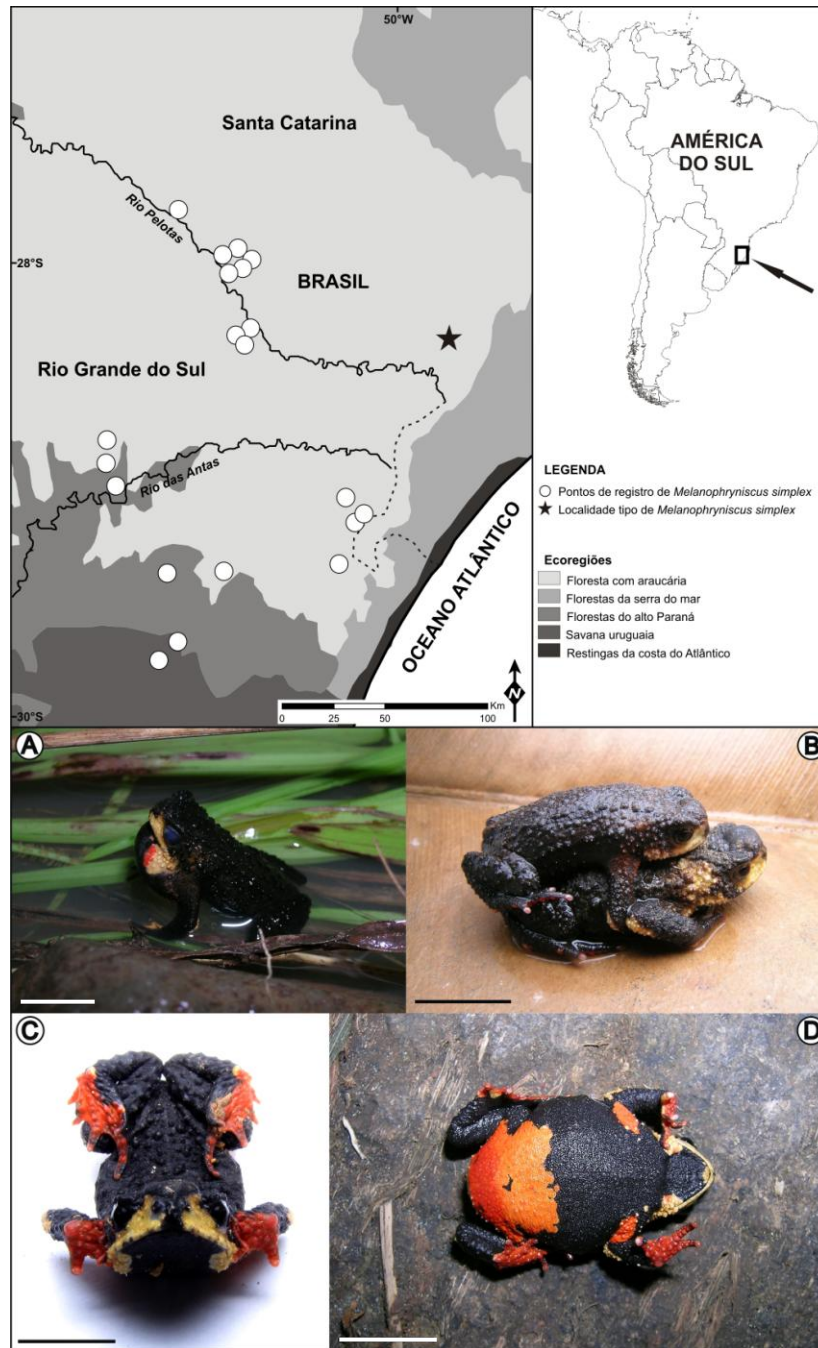


Figura 1 - Mapa com as localidades de registro de *Melanophryniscus simplex*. **A)** exemplar de *Melanophryniscus simplex* vocalizando, **B)** casal em amplexo, **C)** indivíduo de *Melanophryniscus simplex* em postura de defesa, denominada de reflexo “unken” e **D)** exemplar de *Melanophryniscus simplex* em vista ventral. As barras nas imagens dos indivíduos correspondem a 10 mm.

Estes compostos são encontrados principalmente em plantas, mas também são observados em uma grande variedade de animais (Daly et al., 1987). Anfíbios são relativamente ricas fontes de tais substâncias sendo encontrados mais de 850 alcalóides organizados em cerca de 28 classes estruturais (muitas delas não observadas em outros grupos de organismos) em extratos da pele de anfíbios anuros (Saporito et al., 2011).

Tanto em anfíbios quanto em outros animais, a origem de tais substâncias, em geral, ainda é relativamente incerta sendo que nestes animais é confirmada em poucos grupos (Daly, 2004; Saporito et al., 2007a, 2009, 2011). A dieta à base de artrópodes que contém alcalóides, como ácaros, formigas, besouros e milípedes, pode ser a fonte de obtenção de alcalóides lipofílicos em oito linhagens de cinco famílias de anfíbios anuros (Dendrobatidae, Bufonidae, Mantellidae, Myobatrachidae e Eleutherodactylidae) (Garraffo et al., 1993; Daly et al., 1994a, 1997a, 2005; Jones et al., 1999; Grant et al., 2006; Rodríguez et al., 2011). Animais que seqüestram sua defesa química de itens da dieta podem desenvolver relações complexas com outros organismos e com o ambiente em que vivem, incluindo interações entre predador-presa, a dependência de certos recursos alimentares e de determinados habitats, resultando em interações ecológicas e evolutivas complexas (Saporito et al., 2007a; Colombo et al. dados não publicados, capítulo II).

Estudos têm demonstrado que a diversidade e a composição de alcalóides em anuros que contém alcalóides podem variar tanto temporal quanto espacialmente entre diferentes populações e entre indivíduos da mesma população (Clark et al., 2006; Saporito et al., 2006, 2007b, 2010 2011; Daly et al., 2007, 2008a). Esta

variação está associada com diferenças na disponibilidade de artrópodes que contém alcalóides em diferentes localidades (Saporito et al., 2006, 2007a,b; Daly et al., 2008a). A variação geográfica e individual da diversidade de alcalóides em anuros que contém alcalóides é documentada em sapos das famílias Dendrobatidae (Daly et al., 1987; 2009; Saporito et al. 2006, 2007b), Bufonidae (Daly et al., 1992, 2007, 2008b; Mebs et al., 2005, 2007a, b), Mantellidae (Daly et al., 1996, 2008a; Clark et al., 2006), e Myobatrachidae (Daly et al., 1990; Smith et al., 2002). Entretanto a maior parte das pesquisas, e conseqüentemente das descobertas, sobre este aspecto da defesa química em anuros que contém alcalóides tem sido conduzidas em dendrobatídeos e mantelídeos, sendo que se espera que o conhecimento sobre a diversidade de alcalóides em bufonídeos, particularmente em *Melanophryniscus*, seja incrementado com o aumento de estudos sobre estes anuros (Saporito et al., 2011).

Sapos do gênero *Melanophryniscus* representam uma das oito linhagens de anuros que possuem alcalóides lipofílicos (Frost et al., 2006) na pele para sua defesa química (Mebs et al., 2005, 2007a, b; Daly et al., 2007, 2008b). Até o momento são identificados cerca de 150 alcalóides presentes nas glândulas da pele de oito espécies de *Melanophryniscus*: *M. atroluteus*, *M. cupreuscapularis*, *M. devincenzii*, *M. klappenbachi*, *M. montevidensis*, *M. moreirae*, *M. rubriventris*, *M. stelzneri*, e em populações do Uruguai e da Argentina (Garraffo et al., 1993; Mebs et al., 2005, 2007a, b; Daly et al., 1984, 2007, 2008b).

Estudos baseados na comparação de conteúdos estomacais de diferentes espécies de *Melanophryniscus* sugerem que ácaros e formigas são fontes possíveis

de alcalóides, assim como em dendrobatídeos (Mebs et al., 2005; Bonansea and Vaira, 2007; Daly et al., 2007). Estes estudos têm também demonstrado a existência de variação geográfica e temporal na diversidade de alcalóides da pele de *Melanophryniscus* esta variação pode, aparentemente, estar relacionada com mudanças na disponibilidade de presas e, possivelmente, com a dieta destes sapos (Daly et al., 2007). Apesar disso, estes estudos têm um caráter descritivo, sendo que hipóteses sobre a variação, tanto espacial quanto temporal da diversidade de artrópodes não foram testadas. Uma das lacunas mais importantes sobre o tema de seqüestro e origem de alcalóides em anfíbios é sobre o que determina a variação dos perfis de alcalóides nestes organismos e nas suas presas potenciais.

Em nenhum destes trabalhos mencionados se deu atenção à coleta de invertebrados. As amostras, eventualmente coletadas, foram coletadas de maneira não sistemática, tanto no espaço quanto no tempo, não sendo observadas, por exemplo, o quanto estas amostras estimam a riqueza de invertebrados de solo nas áreas estudadas. Estudos intensivos que colem a maior parte de invertebrados que sirvam de alimento para sapos que contém alcalóides, em uma determinada área necessitam ser conduzidos (Daly et al., 1994b). Isto significa que uma abordagem útil seria a coleta de amostras em diferentes microambientes em uma determinada localidade gerando subsídios para determinar como é a variação da composição de alcalóides nos invertebrados e conseqüentemente no ambiente.

Caracterizar os padrões de variação da diversidade de alcalóides de invertebrados e anuros que contém alcalóides, principalmente dos grupos pouco estudados, é fundamental para entender a natureza das relações que estes

organismos tem entre si e com o ambiente. Esta abordagem é também, essencial para compreender alguns aspectos da história natural/ecologia de anuros que contém alcalóides, tais como dieta, comportamento, uso de habitat, entre outros.

Esta tese abordará alguns aspectos sobre o sequestro de alcalóides em sapos do gênero *Melanophryniscus*, constituindo-se no primeiro estudo depois de uma década a ser realizado com uma espécie deste gênero que ocorre no Brasil. Esperamos trazer aqui o início de uma base para o entendimento da variação geográfica e individual da diversidade de alcalóides em *Melanophryniscus* e de suas possíveis relações com o ambiente.

Até o momento as abordagens no estudo da defesa química, não só de *Melanophryniscus*, mas de anuros que contém alcalóides em geral, tem focado para descoberta de novos produtos naturais, bem como a caracterização química destas moléculas novas. Outro aspecto tradicionalmente abordado é a caracterização de alcalóides de fontes específicas (artrópodes) sem ênfase com as relações destas fontes com os ambientes em que vivem.

O objetivo geral deste trabalho é determinar, identificar e avaliar a variação espacial (geográfica e em microambientes) e individual da diversidade de alcalóides presentes em *Melanophryniscus simplex*, tanto em sapos quanto no ambiente em que vivem.

A tese está estruturada em quatro capítulos. O primeiro capítulo (artigo) cujo título é: **“Geographic variation in the alkaloid profiles of the Brazilian red belly toad *Melanophryniscus simplex* (Caramaschi and Cruz, 2002)”**, apresenta dados sobre a variação geográfica e individual de *Melanophryniscus simplex*, abordando

estes aspectos de maneira mais ecológica do que tradicionalmente tem sido feito em trabalhos que tratam deste tema em anuros que contém alcalóides. O segundo capítulo (artigo): **“Distribuição de alcalóides do sapo-de-barriga-vermelha *Melanophryniscus simplex* (Caramaschi e Cruz 2002) (Bufonidae) em quatro diferentes microambientes”** traz informações inéditas sobre a composição de alcalóides de invertebrados em diferentes microambientes e em sapos. Aqui são testadas as relações de composição de alcalóides nestes microambientes em diferentes áreas, comparando invertebrados e sapos. O terceiro capítulo (artigo): **“Variação do perfil de alcalóides entre fêmeas e machos do sapo-de-barriga-vermelha *Melanophryniscus simplex* (Caramaschi e Cruz, 2002) (Bufonidae)”** é sobre um aspecto da variação individual da diversidade e da composição de alcalóides em *Melanophryniscus*, aqui é testada a diferença da diversidade e composição de alcalóides entre sexos de *M. simplex*. Este estudo ainda não havia sido realizado para as espécies de *Melanophryniscus*. O quarto e último capítulo (artigo): **“The occurrence of defensive alkaloids in non-integumentary tissues of the Brazilian red-belly toad *Melanophryniscus simplex* (Bufonidae)”** mostra informações que ainda não haviam sido reportadas para nenhum anuro que contém alcalóides. Neste artigo é demonstrada a presença de alcalóides em músculo, fígado e ovos de *Melanophryniscus simplex*.

Os três primeiros artigos da tese serão submetidos para o *Journal of Chemical Ecology*, revista de relevância no tema “ecologia química”. O quarto artigo foi publicado no jornal *Chemoecology*, em uma edição especial homenageando John W. Daly, um dos maiores pesquisadores sobre o tema defesa química em anfíbios,

falecido no ano de 2008. Muitas das citações desta tese são de trabalhos de John Daly.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (conforme *Journal of Chemical Ecology*)

BONANSEA, M. I., e VAIRA, M. 2007. Geographic variation of the diet of *Melanophryniscus rubriventris* (Anura: Bufonidae) in northwestern Argentina. *J. Herpetol.* 41:231-236.

CARAMASCHI, U. e CRUZ C. A. G. 2002. Taxonomic status of *Atelopus pachyrhynchus* Miranda-Ribeiro, 1920, redescription of *Melanophryniscus tumifrons* (Boulenger, 1905), and descriptions of two new species of *Melanophryniscus* from the state of Santa Catarina, Brazil (Amphibia, Anura, Bufonidae). *Arq. Mus. Nac. Rio de Janeiro* 60:303-414.

CLARK, V. C., RAKOTOMALALA, V., RAMILJAONA, O., ABRELL, L., and FISHER, B. L. 2006. Individual variation in alkaloid content of poison frogs of Madagascar (*Mantella*; Mantellidae). *J. Chem. Ecol.* 32:2219–2233.

DALY, J. W. 1995. The chemistry of poisons in amphibian skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:9-13.

DALY, J. W., HIGHET, R. J., and MYERS, C. W. 1984. Occurrence of skin alkaloids in non-dendrobatid frogs from Brazil (Bufonidae), Australia (Myobatrachidae) and Madagascar (Mantellidae). *Toxicon* 22:905–919.

DALY, J. W., MYERS, C. W., e WHITTAKER, N. 1987. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the amphibian. *Toxicon* 25:1023–1095

DALY, J. W, GARRAFFO, H. M., PANNELL, L. K., and SPANDE, T. F. 1990. Alkaloids from Australian frogs (Myobatrachidae): Pseudophrynamines and pumiliotoxins. *J. Nat. Prod.* 53:407–421.

DALY, J. W., SHERRIE, I., SECUNDA, S., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F. WISNIESKI, A., NISHIHIRA, C., and COVER, J. F. Jr. 1992. Variability in alkaloid profiles in neotropical poison frogs (Dendrobatidae): genetics versus environmental determinants. *Toxicon* 30:887-898.

DALY, J. W., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., JARAMILLO, C., and RAND, S. A. 1994a. Dietary source for skin alkaloids of poison frogs (Dendrobatidae)? *J. Chem. Ecol.* 20:943–955.

DALY, J. W., SECUNDA, S., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., WISNIESKI, A., and COVER, J. F. Jr. 1994b. An uptake system for dietary alkaloids in poison frogs (Dendrobatidae). *Toxicon* 32:657–663.

DALY, J. W., ANDRIAMAHARAVO, N. R., ANDRIANTSIFERANA, M., and MYERS, C. W. 1996. Madagascan poison frogs (*Mantella*) and their skin alkaloids. *Am. Mus. Nov.* 3177:1–34.

DALY, J. W., GARRAFFO, H. M., HALL, G. S. E., and COVER, J. F. JR. 1997a. Absence of skin alkaloids in captive-raised Madagascan mantelline frogs (*Mantella*) and sequestration of dietary alkaloids. *Toxicon* 35:1131–1135.

DALY, J. W. 2004. Marine toxins and nonmarine toxins: convergence or symbiotic organisms? *J. Nat. Prod.* 67:1211-1215.

DALY, J. W., SPANDE, T. F., and GARRAFFO, H. M., 2005, Alkaloids from amphibian skin: a tabulation of over eight-hundred compounds. *J. Nat. Prod.* 68:1556-1575.

DALY, J. W., WILHAM, J. M., SPANDE, T. F., GARRAFFO, H. M., GIL, R. R., SILVA, G. L., e VAIRA, M. 2007. Alkaloids in bufonid toads (*Melanophryniscus*): temporal and geographic determinants for two Argentinian species. *J. Chem. Ecol.* 33:871–887.

DALY, J. W., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., GIDDINGS, L. A., SAPORITO, R. A., VIEITES, D. R., and VENCES, M. 2008a. Individual and geographic variation of skin alkaloids in three species of Madagascan poison frogs (*Mantella*). *J. Chem. Ecol.* 34:252–279

DALY, J. W., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., YEH, H. J. C., PELTZER P. M., CACIVIO, P. M., BALDO, J. D. and FAIVOVICH, J. 2008b. Indolizidine 239Q and quinolizidine 275I. Major alkaloids in two Argentinian bufonid toads (*Melanophryniscus*). *Toxicon* 52:858–870.

DALY, J. W., WARE, N., SAPORITO, R. A., SPANDE, H. M., and GARRAFFO, H. M. 2009. N-Methyldecahydroquinolines: an unexpected class of alkaloids from Amazonian poison frogs (Dendrobatidae). *J. Nat. Prod.* 72:1110–1114.

DUMBACHER, J. P., BEEHLER, B. M., SPANDE, T. F., GARRAFFO, H. M., e DALY, J. W. 1992. Homobatrachotoxin in the genus *Pitohui*: chemical defense in birds? *Science* 258:799-801.

FROST, D. R., GRANT, T., FAIVOVICH, J., BAIN, R., HASS, A., HADDAD, C. F. B., DE SÁ, R. O., CHANNING, A., WILKINSON, M., DONNELLAN, S. C., RAXWORTHY, C. J., CAMPBELL, J. A., BLOTTO, B. L., MOLER, P., DREWES, R. C., NUSSBAUM, R. A., LYNCH, J. D., GREEN, D. M., and WHEELER, W. C. 2006. The amphibian tree of life. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 297:1-370.

FRY, B. G., VIDAL, N., NORMAN, J. A., VONK F. J., SCHEIB H., RAMJAN, S. F. R., KURUPPU S., FUNG, K., S. HEDGES, B., RICHARDSON M. K., HODGSON, W. C., IGNJATOVIC, V., SUMMERHAYES, R., e KOCHVA, E. 2006. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature*. 439:584-588.

GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., DALY, J. W., BALDESSARI, A., and GROS, E. G. 1993. Alkaloids from bufonid toads (*Melanophryniscus*): decahydroquinolines, pumiliotoxins and homopumiliotoxins, indolizidines, pyrrolizidines, and quinolizidines. *J. Nat. Prod.* 56:357-373.

GRANT, T., FROST, D. R., CALDWELL, J. P., GAGLIARDO, R., HADDAD, C. F. B., KOK, P. J. R., MEANS, B. D., NOONAN, B. P., SCHARGEL, W. E., AND WHEELER, W. C. 2006. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Anura: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 299:1-262.

HUTCHINSON, D. A., SAVITZKY, A. H., MORI, A., BURGHARDT, G. M., MEINWALD, J., e SCHROEDER, F. C. 2011. Chemical investigations of defensive steroid sequestration by the Asian snake *Rhabdophis tigrinus* *Chemoecology* published online 01 May 2011.

JONES, T. H., GORMAN, J. S. T., SNELLING, R. R., DELABIE, J. H. C., BLUM, M. S., GARRAFFO, H. M., JAIN, P., DALY, J. W., and SPANDE, T. F. 1999. Further alkaloids common to ants and frogs: decahydroquinolines and a quinolizidine. *J. Chem. Ecol.* 25:1179–1193.

KINGDON, J., AGWANDA, B., KINNAIRD, M., O'BRIEN, T., HOLLAND, C., GHEYSENS T., BOULET-AUDET, M., e VOLLRATH, F. 2011. A poisonous surprise under the coat of the African crested rat. *Proc. R. Soc. B.* published online 3 August 2011doi: 10.1098/rspb.2011.1169

MEBS, D., POGODA, W., MANEYRO, R., and KWET, A. 2005. The alkaloid composition of the poisonous skin secretion of the red bellied toad, *Melanophryniscus montevidensis* (Anura, Bufonidae), from Uruguay. *Toxicon* 46:641-650.

MEBS, D., MANEYRO, R., and POGODA, W. 2007a. Further studies on the pumiliotoxin 251D and hydroquinone content of the skin secretion of *Melanophryniscus* species (Anura, Bufonidae) from Uruguay. *Toxicon* 50:166-169.

MEBS, D., WAGNER, M. G., POGODA, W., MANEYRO, R., KWET, A., and KAUERT, G. 2007b. Lack of bufadienolides in the skin secretion of red bellied toads, *Melanophryniscus* spp. (Anura, Bufonidae), from Uruguay. *Comp. Biochem. Physiol.* 144:398-402.

PELLETIER, S. W. 1983. The nature and definition of an alkaloid, *in* Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives. Wiley, New York.

RODRÍGUEZ, A., POTH, D., SCHULZ, S., and VENCES, M. 2011. Discovery of skin alkaloids in a miniaturized eleutherodactylid frog from Cuba. *Biol. Lett.* 7:414–418.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., and DALY, J. W. 2006. Geographic and seasonal variation in alkaloid-based chemical defenses of *Dendrobates pumilio* from Bocas del Toro, Panamá. *J. Chem. Ecol.* 32:795-814.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., NORTON, R., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., e DALY, J. W. 2007a. Oribatid mites as a new and significant source of alkaloids in poison frogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:8885-8890.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., JAIN, P., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., e DALY, J. W. 2007b. Spatial and temporal patterns of alkaloid variation in the poison frog *Oophaga pumilio* in Costa Rica and Panama over 30 years. *Toxicon* 50:757–778.

SAPORITO, R. A., SPANDE, T. F., GARRAFFO, H. M., e DONNELLY, M. A. 2009. Arthropod alkaloids in poison frogs: a review of the “dietary hypothesis”. *Heterocycles* 79:277–297.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., MADDEN, A. A., GARRAFFO, H. M., and SPANDE, T. F. 2010. Sex-related differences in alkaloid defenses of the dendrobatid frog *Oophaga pumilio* from Cayo Nancy, Bocas del Toro, Panama. *J. Nat. Prod.* 73:317–321.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., SPANDE, T. F., and GARRAFFO, H. M. 2011. A review of chemical ecology in poison frogs. *Chemoecology* DOI 10.1007/s00049-011-0088-0

SMITH, B. P., TYLER, M. J., KANEKO, T., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., and DALY, J. W. 2002. Evidence for biosynthesis of pseudophrynamine alkaloids by an Australian myobatrachid frog (*Pseudophryne*) and for sequestration of dietary pumiliotoxins. *J. Nat. Prod.* 65:439–447.

SMITH, W. L., e WHEELER, W. C. 2006. Venom evolution widespread in fishes: a phylogenetic road map for the bioprospecting of piscine venoms. *J. Hered.* 97:206–217.

WELDON, P. J., KRAMER, M., GORDON, S., SPANDE, T. F., and DALY, J. W. 2006. A common pumiliotoxin from poison frogs exhibits enantioselective toxicity against mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:17818-17821.

5. CAPÍTULO I

Geographic variation in the alkaloid profiles of the Brazilian red belly toad

Melanophryniscus simplex (Caramaschi and Cruz, 2002)

Patrick Colombo^{1*}

Ralph Saporito²

Laura Verrastro³

Taran Grant⁴

*1 Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Instituto de Biociências, Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul Avenida Ipiranga 6681, 90619-900, Porto
Alegre, RS, Brazil*

2 John Carroll University, Department of Biology, University Heights, Ohio, 44118, USA

*3 Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, 91540-000,
Porto Alegre, RS, Brazil*

*4 Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, C.P.
11461, 05422-970, São Paulo, SP, Brazil*

* Corresponding author e-mail: patrick_colombo@hotmail.com

Abstract - Red bellied toads of the genus *Melanophryniscus* occur in southern South America and are one of several lineages of anurans that sequester defensive alkaloids from dietary arthropods which are presumably used as a chemical defense against predators, parasites and pathogens. Alkaloid diversity (composition, richness and abundance) can vary within and among populations, and the detection of patterns in this variation is fundamental to understanding predator-prey interactions and the use of food resources by these frogs. Variation in alkaloid diversity has been well documented in dendrobatid and mantellid frogs, but less so in *Melanophryniscus*. We studied variation in alkaloid diversity of *M. simplex* from the Atlantic Forest Biome in southern Brazil. We analyzed alkaloids of 39 individuals from eight populations. Skin extracts contained 262 alkaloids distributed in 19 structural classes. Of these, 171 (65%) are new alkaloids, 49 (19%) are reported for the first time in *Melanophryniscus* and 42 (16%) were reported in *Melanophryniscus* species previously. Most alkaloids were rare, with just six alkaloids collectively contributing with more than 70% of the total alkaloid amount in more than 74% of the frogs. Using ANOVA via randomization tests we detected differences in alkaloid diversity and composition within and among populations. Rarefaction curves based on the abundance of all alkaloids found revealed that the number of alkaloids still increasing and some populations differed in alkaloid richness. Those differences found between the populations may be due the variation in the availability of the alkaloid containing preys of *M. simplex*.

Key words – Chemical defense, Atlantic forest, Araucaria forest, Rio Grande do Sul, Anura, Bufonidae.

INTRODUCTION

The use of chemical compounds to protect against predators, parasites and pathogens are recognized in a wide range of organisms, including plants, mollusks, insects, fish, amphibians, reptiles, birds and mammals (e.g. Dumbacher et al., 1992; Daly, 1995; Fry et al., 2006; Smith and Wheeler, 2006; Hutchinson et al., 2011; Kingdon et al., 2011). In amphibians these substances can be biosynthesized, obtained from symbiotic interactions or sequestered from diet (e.g. Flier et al., 1980; Bevins and Zasloff, 1990; Daly et al., 1994). This last group includes some lipophilic alkaloids that are sequestered from a diet of alkaloid-containing arthropods (e.g. Daly et al., 1994, 1995, 1997, 2005; Saporito et al., 2009). Organisms that sequester these compounds from diet may develop complex relationships with other organisms and with their environment, including predator-prey interactions, use of food resources and use of determined microhabitat, resulting in ecological interactions and complex evolutionary relationships (Saporito et al., 2007a; Colombo et al., unpublished data).

Among vertebrates, amphibians are notable for containing a large variety (more than 850 alkaloids, organized into approximately 28 structural classes) of lipophilic alkaloids present in skin glands, several of these are dietary compounds (Daly, 1995, 2005; Saporito et al., 2011). Probably such substances can be used against some predators and ectoparasitic arthropods (Daly and Myers, 1967; Brodie and Tumbarello, 1978; Fritz et al., 1981; Szelistowski, 1985; Daly et al., 2005, Weldon et al., 2006).

The alkaloid sequestration is distributed among eight different lineages in five anuran families of frogs including members of certain genera in the families Dendrobatidae, Bufonidae, Mantellidae, Myobatrachidae and Eleutherodactylidae, (Garraffo et al., 1993; Daly et al., 1984; 1994, 1997, 2005; Jones et al., 1999; Grant et al., 2006; Rodríguez et al., 2011). The diversity (composition, richness and abundance) of sequestered alkaloids present in alkaloid-containing frogs may vary geographically among populations as well as among individuals of the same population (e.g. Daly et al., 1992, 2007, 2008a, b; Mebs et al., 2005, 2007a, b; Saporito et al., 2006,). This variation appears to be associated with differences in the availability of alkaloid-containing arthropods at different locations (Saporito et al., 2006, 2007a, b; Daly et al., 2008).

Characterizing the patterns of variation in alkaloid composition in alkaloid-containing frogs is fundamental to understanding some ecological and/or natural history features (e.g. predator-prey interactions, use of habitat and use of food resources) of these frogs.

Geographic and individual variation in alkaloid profiles of alkaloid-containing frogs has been documented for dendrobatids (Daly et al., 1992; Saporito et al., 2006, 2007b), bufonids (Mebs et al., 2005, 2007a, b; Daly et al., 2007, 2008b), mantellids (Daly et al., 1996, 2008a; Clark et al., 2006), and myobatrachids (Daly et al., 1990; Smith et al., 2002). However, most research on alkaloids in poison frogs has been conducted on dendrobatids and mantellids. The diversity of alkaloids known from bufonids, particularly on *Melanophryniscus* spp., and eleutherodactylids is expected to increase significantly with additional research (Saporito et al., 2011).

The individual and geographic variation in alkaloid diversity of dendrobatids, mantellids and bufonids is remarkable. Some individuals may have high levels of determined alkaloid until low levels (or the absence) of the same alkaloid. This also occurs between populations of these frogs; some populations have exclusive alkaloids, while others may share several alkaloids (e.g. Clark et al., 2006; Saporito et al., 2006, 2007b, 2011; Daly et al., 2007). Populations of the same species differ in alkaloid diversity among locations, and some populations of different species have similar alkaloid diversity when present in the same location (e.g. Myers et al., 1995; Saporito et al., 2006, 2007b; Daly et al., 2008a).

The red bellied toads of the genus *Melanophryniscus* are small bufonids (approximately 3 cm snout-vent length) characterized by explosive breeding, diurnal migration activity, bright orange or red ventral coloration that they partially expose by arching the back and raising the limbs in the unken reflex (e.g. Fernández, 1926; Langone, 1994; Baldo and Basso, 2004; Santos and Grant 2011). The genus includes 26 species in southeastern South America, extending from the Brazilian state of Minas Gerais to Uruguay (Frost, 2011; Zank et al., unpublished data). Of the 26 known species, the defensive alkaloids of nine species have been studied, yielding 132 alkaloids (including isomers) of 18 structural classes and another 28 unclassified alkaloids, totalizing 160 alkaloids to the genus *Melanophryniscus* (Daly et al., 1984, 2007, 2008b; Garraffo et al., 1993; Mebs et al., 2005, 2007a, b; Grant et al., unpublished data, capítulo IV). Some data provided in the literature show the geographical and individual variation in alkaloid diversity of *Melanophryniscus* species (e.g. Mebs et al., 2005, Daly et al., 2007,; Grant et al., unpublished data,

capítulo IV) but some of these studies were exploratory and in some cases lacked analytical approaches like rarefaction curves comparing the alkaloid richness among different populations with different sample sizes. Furthermore the majority of those studies used “open field” species of *Melanophryniscus* (Garraffo et al., 1993; Mebs et al., 2005, 2007a, b; Daly et al., 2007, 2008b), only recently studies with “forest” *Melanophryniscus* are being conducted increasing the probability to find new patterns of alkaloid diversity and composition among individuals and populations as well as the possibility to find new compounds. We expected that some closer populations of *Melanophryniscus simplex* share more alkaloids than farthest populations as we can find in other alkaloid-containing frogs. Herein we evaluate the variation in the alkaloid diversity within and among eight populations of *M. simplex* from Atlantic Forest in southern Brazil. We determined the alkaloid profile of the species, compare the alkaloid richness among the populations, test the differences in alkaloid diversity and composition of these populations and discuss our obtained results in terms of comparison with the variation in alkaloid profiles founded in frogs of families Dendrobatidae and Mantellidae.

MATERIAL AND METHODS

Frog Collections We collected 39 adult *Melanophryniscus simplex* from eight localities in southern Brazil (Fig. 1): Gateados AC32 (municipality of Campo Belo do Sul, Santa Catarina state, GPS coordinates 27°59'50.4" S and 50°53'59.4" W), five frogs (PC

0210, 0212, PC 0216, 0217 and MCP 11929) collected in September 8th 2009; Gateados AC34 (Campo Belo do Sul, Santa Catarina state, GPS coordinates 27°59'39.9" S and 50°53'31.4" W), five frogs (PC 0222, 0223, 0225, 0227 and 0228) collected in September 8th 2009; Gateados AD23 (Campo Belo do Sul, Santa Catarina state, GPS coordinates 28°01'29.7" S and 50°50'33.0" W), four frogs (PC 0527, 0532, 0540 and 0541) collected in September 9th 2009; Gateados AD25 (Campo Belo do Sul, Santa Catarina state, GPS coordinates 28°02'05.6" S and 50°51'08.3" W), five frogs (MEL 0006, 0007, 0009, 0010 and 0011) collected in October 27th 2008; Gateados AD22 (Campo Belo do Sul, Santa Catarina state, GPS coordinates 28°02'17.1" S and 50°51'31.3" W), five frogs (PC 0516-0518, 0526 and 0531) collected in September 9th 2009; Bomjesus AD62 (municipality of Bom Jesus, Rio Grande do Sul state, GPS coordinates 28°16'21.4" S and 50°42'29.4" W), five frogs (PC 0191, 0194, 0197, 0198 and 0200) collected in August 20th 2009; Bomjesus AD61 (municipality of Bom Jesus, Rio Grande do Sul state, GPS coordinates 28°16'28.1" S and 50°42' 42.9" W), five frogs (PC 0183, 0184, 0186, 0189 and 0190) collected in August 19th 2009 and Novaroma (municipality of Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul state, GPS coordinates 28°59'19.8" S and 51°23'58.1" W), five frogs (PC 0339-0343) collected in February 07th 2010. The linear distance between the collection sites are presented in the caption of Fig. 1. The collection sites are included in two ecoregions, Araucaria Moist Forest and Alto Paraná Atlantic forest, following the classification of Olson et al. (2001). For the analyses we considered a *M. simplex* population all frogs in an reproductive site closed in an area with no more than 120 m. That number is the best evidence of

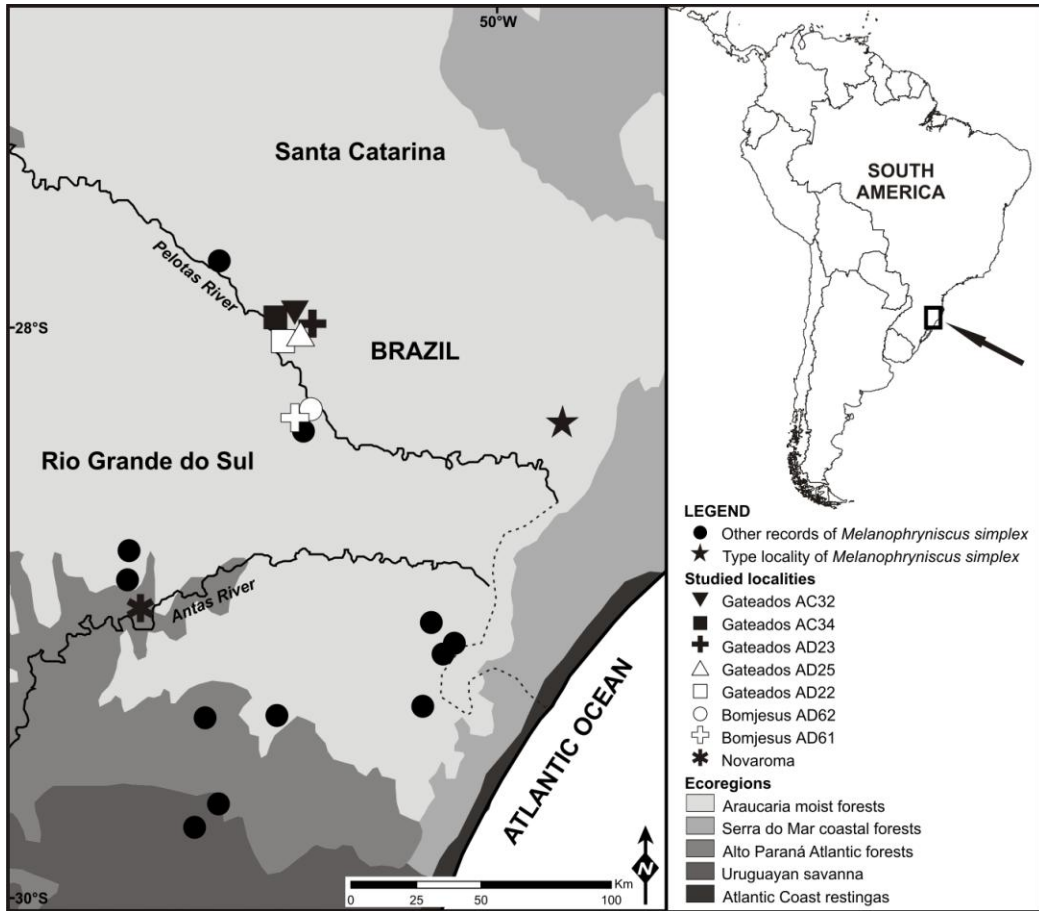


Figure 1 – Map with the localities with records of *Melanophryniscus simplex* including the localization of study sites. The black arrow (right) indicates the zoomed area in South America on left. The ecoregions were drawn following Olson et al. (2001) and the records based on Zank et al. (unpublished data). The linear distance between the studied sites are: Gateados AC32 to Gateados AC34 – 0.83 km; Gateados AC32 to Gateados AD23 – 5.93 km; Gateados AC32 to Gateados AD25 – 5.92 km; Gateados AC32 to Gateados AD22 – 5.85 km; Gateados AC32 to Bomjesus AD62 – 35.73 km; Gateados AC32 to Bomjesus AD61 – 35.73 km; Gateados AC32 to Novaroma – 120.89 km; Gateados AC34 to Gateados AD23 – 6.41 km; Gateados AC34 to Gateados AD25 – 6.23 km; Gateados AC34 to Gateados AD22 – 6.06 km; Gateados AC34 to Bomjesus AD62 – 35.85 km; Gateados AC34 to Bomjesus AD61 – 35.83 km; Gateados AC34 to Novaroma – 120.28 km; Gateados AD23 to Gateados AD25 – 1.46 km; Gateados AD23 to Gateados AD22 – 2.16 km; Gateados AD23 to Bomjesus AD62 – 30.45 km; Gateados AD23 to Bomjesus AD61 – 30.41 km; Gateados AD23 to Novaroma – 119.94 km; Gateados AD25 to Gateados AD22 – 0.72 km; Gateados AD25 to Bomjesus AD62 – 29.91 km; Gateados AD25 to Bomjesus AD61 – 29.92 km; Gateados AD25 to Novaroma – 118.52 km; Gateados AD22 to Bomjesus AD62 – 29.90 km; Gateados AD22 to Bomjesus AD61 – 29.90 km; Gateados AD22 to Novaroma – 117.92 km; Bomjesus AD62 to Bomjesus AD61 – 0.42 km; Bomjesus AD62 to Novaroma – 104.23 km and Bomjesus AD61 to Novaroma 103.87 km.

maximum distance that one individual of *Melanophryniscus* can reach from its reproductive site (Santos and Grant, 2011). Frogs were captured by hand in its breeding sites (small and shallow temporary streams) in general after heavy rains. Individuals were measured snout to vent (SVL) using a caliper to the nearest 0.1 mm, weighted using a scale with 0.1 g precision and sex and maturity was determined by examining secondary sex characteristics and gonads. All frogs were euthanized and skinned in the laboratory. Individual *M. simplex* skins were stored in 100% methanol in separate glass vials with 4 ml and Teflon lined caps. All voucher specimens were fixed in formalin and stored in 70% ethanol in the *Coleção de Anfíbios e Répteis, Museu de Ciências e Tecnologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCP)* and the *Coleção Herpetológica, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)*

Chemical Analysis We performed gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis on a Varian Saturn 2100T ion trap MS instrument coupled to a Varian 3900 GC with a 30 m x 0.25 mm i.d. Varian Factor Four VF-5ms fused silica column. We achieved GC separation of alkaloids using a temperature program from 100 to 280°C at a rate of 10°C per minute with He as the carrier gas (1 mL/min). We analyzed each alkaloid fraction with both electron impact MS and chemical ionization MS with methanol as the reagent gas. We prepared individual alkaloid fractions from methanol extracts of skin, for each specimen of *Melanophryniscus simplex*. For all samples we added 10 µg of nicotine ((-)-nicotine ≥99%, Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wisconsin) in a methanol solution (internal standard) and 50 µL of 1N HCl to 1 mL

of the original MeOH extract. We concentrated this combined MeOH extract with N₂ to 100 μ L and then diluted it with 200 μ L of water. We then extracted this solution 4 times, each time with 300 μ L of hexane. We basified the HCl fraction with saturated NaHCO₃, followed by extraction 3 times, each time with 300 μ L of ethyl acetate. We then dried the combined ethyl acetate fractions with anhydrous Na₂SO₄ and evaporated them to 100 μ L. We identified all individual alkaloids larger than 0.1 μ g by comparing the observed MS properties and GC retention times with those of previously reported anuran alkaloids (Daly et al., 2005). To determine the quantity of alkaloids in frog skins, we compared the observed alkaloid peak area to the peak area of the nicotine internal standard, using a Varian MS Workstation v.6.9 SPI. We chose nicotine as an internal standard because its retention time is outside of the chromatographic range of most frog alkaloids. The amount of nicotine standard in each final solution correspond to 10 μ g. Anuran alkaloids have been assigned code names that consist of a bold-faced number corresponding to the nominal mass and a bold-faced letter to distinguish alkaloids of the same nominal mass (Daly et al., 2005). To differentiate new alkaloids from those previously known alkaloids we assign a unique code for each using the nominal mass followed by the word "Mel" in parentheses and followed by a unique letter. The new isomers of previously known alkaloids and isomers of the new compounds had the word "Isomer" after the code followed by the symbol "#" and the number of the isomer, all in parentheses.

Statistical Analysis To compare the alkaloid richness among the populations we built rarefaction curves based on alkaloid abundance in each population. The rarefaction

curves were generated in software PAST (Hammer et al., 2001). We analyse the relationship of alkaloid frequency and abundance using a linear regression with the logarithmized average of alkaloid abundance and the percentage of alkaloid frequency. To assess the significance of the differences in alkaloid diversity and composition among localities we used an analysis of variance (ANOVA) via randomization tests between sample units (in this case each frog) following procedures in Pillar (2006). We used 10.000 randomizations in this test. We performed the randomization tests using the software MULTIV 2.4 (Pillar, 2006). Non-metric multidimensional scaling (nMDS) plots were generated in the software PRIMER-E version 6, to visualize patterns of alkaloid diversity (composition, richness and abundance) and composition (presence/absence of alkaloids) of *Melanophryniscus simplex* among the eight studied sites. For both analyses (nMDS and ANOVA) we used chord distance as a dissimilarity measure. To examine the relationship between geographic distance and alkaloid diversity among populations we performed a Mantel test in software PAST (Hammer et al., 2001). For all statistical tests we used a significance level $P < 0.05$.

RESULTS

We identified 262 different alkaloids distributed in 19 structural classes in skin extracts of 39 individuals of *Melanophryniscus simplex* in the eight studied sites (Table 1). Of these compounds, 171 (65%) are new alkaloids, not previously documented in any alkaloid-containing frogs, 49 (19%) are new alkaloids for the

genus *Melanophryniscus*, but previously documented in other alkaloid-containing frogs and 42 (16%) previously found in *Melanophryniscus* species and other alkaloid-containing frogs.

Table 1 – Alkaloids found in the eight populations of *Melanophryniscus simplex* studied. Absence of the alkaloid (-), major alkaloid (present in an amount greater than or equal to 50 µg per 100 mg frog skin) (+++), minor alkaloid (present in an amount between 5 and 50 µg per 100 mg frog skin) (++) and trace alkaloid (present in an amount less than 5 µg per 100 mg frog skin) (+). The abbreviations are as follows: Unclass (Unclassified alkaloids); 5,8-I (5,8-Disubstituted indolizidines); 5,6,8-I (5,6,8-Trisubstituted indolizidines); PTX (Pumiliotoxins); DHQ (Decahydroquinolines); Dehydro 5,8-I (Dehydro-5,8-Indolizidines); 3,5-P (3,5-Disubstituted pyrrolizidines); Pip (Piperidines); I (Izidines); Tricyclic (Coccinelline-like tricyclics); 3,5-I (3,5-Disubstituted indolizidines); SpiroP (Spiropyrrrolizidines); aPTX (Allopumiliotoxins); Polyzo (Polyzonimine); OHQ (Octahydroquinolines); CPQ (Cyclopentaquinazolines); hPTX (Homopumiliotoxins); 4,6-Q (4,6-Disubstituted quinolizidines) and 1,4-Q (1,4-Disubstituted quinolizidines). The number between parentheses before the alkaloid class name is the number of alkaloids in that class.

Alkaloid class	Alkaloid code	Studied sites							Novaroma
		Gateados AC32	Gateados AC34	Gateados AD23	Gateados AD25	Gateados AD22	Bomjesus AD62	Bomjesus AD61	
Unclass (126)	153(Mel)B	-	-	+	-	-	-	-	-
	181(Mel)A	+	+	-	+	+	+	+	+
	124(Mel)A	+	-	-	-	-	-	-	-
	122(Mel)B	-	-	+	+	-	-	-	+
	195(Mel)B	-	-	-	-	-	+	-	-
	153(Mel)A	-	-	-	-	+	-	-	-
	195(Mel)A	+	+	-	+	+	+	-	-
	122(Mel)A	+	+	+	-	+	+	+	-
	197(Mel)A	-	-	-	+	+	+	+	-
	186(Mel)A	-	-	-	-	-	-	-	+
	195(Mel)C	-	-	-	-	-	-	-	+
	199B*	-	-	-	-	-	-	+	-

Table 1 – continued

Alkaloid class	Alkaloid code	Studied sites							Novaroma
		Gateados AC32	Gateados AC34	Gateados AD23	Gateados AD25	Gateados AD22	Bomjesus AD62	Bomjesus AD61	
Unclass (126)	223(Mel)A	+	+	+	-	+	-	+	-
	191(Mel)A	-	-	-	-	+	-	-	-
	207(Mel)A	+	+	-	-	+	+	+	-
	179(Mel)C	+	-	-	-	+	+	-	-
	223T	+	-	-	+	+	+	+	-
	179(Mel)B	+	+	-	+	+	+	+	+
	223L*	+	+	-	-	+	+	+	-
	193(Mel)G	-	-	-	-	-	-	-	+
	223L (New isomer #2)*	+	-	-	-	+	-	+	-
	253M*	+	+	-	+	+	+	+	+
	237(Mel)N	-	-	+++	-	-	-	-	-
	237(Mel)B	-	-	-	-	+	-	-	-
	223(Mel)J	-	+	-	-	-	-	-	-
	196(Mel)B	-	-	-	+	-	-	-	-
	196(Mel)A	-	+	-	-	+	-	-	-
	219(Mel)B	+	-	-	+	-	-	+	-
	223(Mel)L	+	-	-	-	-	-	-	-
	227(Mel)B	-	+	-	-	-	-	-	-
	211(Mel)B	-	-	-	-	-	-	-	+
	241B*	-	+	-	-	-	-	-	-
	221(Mel)N	-	-	-	-	-	-	-	+
	237(Mel)M	-	-	+	-	-	-	-	-
	249(Mel)D	+	+	-	-	+	-	-	+
	239(Mel)L	-	+	-	-	-	-	-	+
	239(Mel)E	-	-	-	-	+	-	-	-
	247(Mel)B	-	-	-	-	+	-	-	-
	251(Mel)G	-	-	++	-	-	-	-	-
	247(Mel)C	-	-	-	-	+	-	-	-
	251(Mel)C	-	-	-	+	-	-	-	-
	245(Mel)B	-	-	-	-	+	-	-	-
	223(Mel)K	-	+	-	-	-	-	-	-
	249(Mel)F	-	-	-	-	-	-	-	+
	249(Mel)C	+	+	+	+	+	+	+	+
	239(Mel)M	-	+	-	-	-	-	-	-
	251(Mel)F	-	-	-	-	+	-	-	-
	233(Mel)A	+	+	-	+	+	+	+	-
	247(Mel)D	-	-	+	-	-	-	-	-
	251(Mel)G	-	+	-	-	-	-	-	-

Table 1 – continued

Alkaloid class	Alkaloid code	Studied sites							Novaroma
		Gateados AC32	Gateados AC34	Gateados AD23	Gateados AD25	Gateados AD22	Bomjesus AD62	Bomjesus AD61	
Unclass (126)	237(Mel)M (Isomer #2)	-	+	-	-	-	-	-	-
	265(Mel)I	-	-	-	-	-	-	+	-
	205(Mel)A	-	-	-	-	+	-	-	-
	251(Mel)D	-	+	+	-	+	+	+	-
	265(Mel)C	-	-	+	-	+	-	-	+
	251(Mel)D (Isomer #2)	+	-	+	-	+	-	-	-
	221(Mel)L	-	+	-	-	-	-	-	-
	251(Mel)H	-	-	-	+	-	-	-	-
	239(Mel)M (Isomer #2)	-	-	-	-	+	-	-	-
	209(Mel)B	-	+	+	+	+	-	-	-
	237(Mel)H	-	-	-	+	-	-	-	+
	291(Mel)B	-	+	+	-	-	-	-	-
	239(Mel)I	-	-	-	-	-	-	-	+
	239(Mel)L (Isomer #2)	+	-	-	-	-	-	-	-
	249P*	-	-	-	-	-	-	-	+
	247(Mel)A	+	+	+	+	+	+	+	-
	249P (Isomer #2)*	+	+	+	+	+	+	+	+
	249P (New isomer #3)	+	-	-	-	-	-	-	-
	239(Mel)C	-	+	-	-	-	-	+	-
	265(Mel)Q	-	-	-	-	+	-	-	-
	265(Mel)P	-	-	-	-	+	-	-	-
	249P (New isomer #4)	-	-	-	-	-	-	-	+
	255(Mel)A	-	+	-	-	-	-	-	-
	239(Mel)N	-	+	-	-	-	-	-	-
	268(Mel)C	-	-	-	-	+	-	-	-
	234(Mel)A	-	-	-	-	-	-	-	+
	253(Mel)B	-	-	-	-	-	+	-	-
	57(Mel)B	-	+	-	-	-	-	-	-
	249(Mel)K	-	-	-	-	-	-	-	+
	277(Mel)A	+	-	+	+	+	-	-	-
	279(Mel)A	-	-	+	-	-	-	-	-
	265(Mel)H	+	+	-	+	+	+	+	-
	249(Mel)H	-	-	+	-	-	+	+	-
	249P (New isomer #5)	+	-	-	-	-	-	-	-
	249(Mel)L	+	-	-	-	-	-	-	-
	239(Mel)O	-	-	-	-	-	-	-	+
	267(Mel)B	-	-	+	+	+	-	+	-
	265(Mel)M	-	+	-	-	-	-	-	-

Table 1 – continued

Alkaloid class	Alkaloid code	Studied sites							Novaroma
		Gateados AC32	Gateados AC34	Gateados AD23	Gateados AD25	Gateados AD22	Bomjesus AD62	Bomjesus AD61	
Unclass (126)	249(Mel)A	+	+	-	+	+	+	-	-
	267(Mel)D	++	++	++	++	+	++	++	+
	251(Mel)H (Isomer #2)	-	-	-	-	-	-	-	+
	221(Mel)O	-	-	-	+	-	-	-	-
	251(Mel)H (Isomer #3)	-	-	-	-	-	-	-	+
	265(Mel)F (Isomer #2)	-	-	+	-	-	-	-	-
	267(Mel)D (Isomer #2)	-	-	-	+	-	-	-	-
	265(Mel)F	-	-	+	-	-	+	+	-
	251(Mel)I	-	-	-	-	-	-	-	+
	263(Mel)D	-	+	-	-	-	-	-	-
	282(Mel)A	-	+	-	+	-	-	-	-
	307J	-	-	-	-	-	-	-	+
	106(Mel)A	-	-	-	-	-	-	-	+
	305J*	+	+	+	-	+	-	+	-
	286(Mel)A	-	+	-	+	-	-	-	-
	309(Mel)A	-	-	-	+	-	-	-	-
	276(Mel)A	-	-	-	-	-	+	+	-
	263(Mel)C	-	-	-	-	-	-	-	+
	259(Mel)A	-	-	+	-	-	-	-	-
	296(Mel)B	-	-	-	-	-	-	-	+
	283(Mel)A	-	+	-	-	-	-	-	-
	296(Mel)A	-	+	-	-	-	-	-	-
	265(Mel)R	-	-	-	-	-	-	-	+
	296(Mel)B (Isomer #2)	-	-	-	-	-	-	-	+
	57(Mel)A	+	+	+	-	+	+	+	-
	57(Mel)A (Isomer #2)	-	-	-	-	-	+	-	-
	298(Mel)A	-	-	+	+	-	-	-	-
	293(Mel)A	+	-	++	+	+	+	+	+
	295(Mel)A	-	-	+	+	-	-	-	-
	305(Mel)B	-	-	-	-	+	-	-	-
	321(Mel)A	-	-	-	-	-	-	+	-
	295(Mel)B	+	-	-	+	-	-	-	-
	289(Mel)B	-	-	-	-	-	-	+	-
	355(Mel)A	-	-	-	-	-	+	-	-
	297(Mel)A	+	-	+	-	-	-	-	-
	276(Mel)B	-	-	-	-	-	+	-	-
	380(Mel)A	-	-	-	-	+	-	-	-
	380(Mel)A (Isomer #2)	-	-	-	-	+	-	-	-
5,8-I (27)	207A	++	++	+	++	++	++	++	+

Table 1 – continued

Alkaloid class	Alkaloid code	Studied sites							Novaroma
		Gateados AC32	Gateados AC34	Gateados AD23	Gateados AD25	Gateados AD22	Bomjesus AD62	Bomjesus AD61	
5,8-I (27)	209S*	+	+	+	+	+	+	+	-
	223D	-	-	+	-	-	-	-	-
	221A (New isomer #3)	+	+	+	+	+	+	+	-
	223D (Isomer #2)*	++	+	+	++	++	+++	+++	+
	221A(New isomer)	+	-	-	-	-	++	+	-
	223D (Isomer #3)*	-	+++	+	-	+++	-	-	-
	237D	+	-	+	-	+	+	+	-
	223D (New isomer #4)	-	+	-	-	-	-	-	-
	219F*	-	+	-	+	-	-	-	-
	217B*	-	-	-	-	+	-	-	-
	237(Mel)L	-	++	+	+	-	+	+	-
	237(Mel)L (Isomer #2)	+	+	-	+	+	+	+	-
	249L*	-	-	-	-	+	-	+	-
	239(Mel)A	++	++	-	++	++	++	+	-
	239(Mel)A (Isomer #2)	-	+	-	-	-	+	+	+
	268(Mel)B	-	-	-	+	-	-	-	-
	239G (New isomer #2)	-	+	-	-	-	-	-	-
	275(Mel)C	+	-	-	-	+	-	-	+
	275(Mel)A	+	-	-	-	-	-	-	-
	273(Mel)C	-	-	-	-	-	-	-	+
	271(Mel)D	-	-	-	-	-	-	-	+
	271(Mel)A	+	+	+	+	+	+	+	++
	271(Mel)C	+	+	+	-	-	-	-	-
271(Mel)A (Isomer #2)	-	-	-	-	-	-	-	+	
273(Mel)A	-	+	-	-	+	+	+	+	
277(Mel)B	-	-	+	-	-	-	-	-	
5,6,8-I (27)	197H	+	+	+	+	+	+	+	+
	197H (Isomer #2)*	-	+	-	-	-	-	-	+
	223X	++	++	++	++	++	++	++	+
	237S	+	+	++	+	+	+	+	-
	237C*	+	-	-	-	-	-	-	-
	235E	-	-	+	-	-	-	-	-
	231B	+	++	++	+	+	-	-	+
	237S (New isomer #2)	-	+	-	+	+	-	-	-
	235E (Isomer #2)	-	-	-	-	+	+	+	-
	237D*	-	-	-	+	-	-	-	-
	231B (Isomer #2)*	+	-	-	-	-	-	-	-
	231B (New isomer #3)	++	++	-	+	+	++	++	-
	231B (New isomer #4)	+	+	+	+	+	+	+	-

Table 1 – continued

Alkaloid class	Alkaloid code	Studied sites							Novaroma
		Gateados AC32	Gateados AC34	Gateados AD23	Gateados AD25	Gateados AD22	Bomjesus AD62	Bomjesus AD61	
5,6,8-I (27)	237(Mel)K	-	-	-	-	+	-	-	-
	233G	+	+	-	+	-	+	+	-
	231B (New isomer #5)	-	-	-	+	-	+	+	-
	249U*	-	-	-	-	-	+	-	-
	231K*	-	+	-	+	+	-	-	+
	245G*	+	+	++	+	-	-	-	-
	245G (New isomer #2)	-	+	+	-	-	-	-	-
	237(Mel)C	+	+	-	+	+	+	+	-
	239Z*	-	-	-	-	-	-	-	+
	2650*	-	-	-	-	-	-	-	+
	239Z (New isomer #2)	-	-	-	-	-	-	-	+
	239Z (New isomer #3)	-	-	-	-	-	-	-	+
	281M*	-	-	-	+	-	-	-	-
281M (New isomer #2)	-	+	-	+	-	-	+	-	
PTX (25)	251D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	251(Mel)A	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+
	251(Mel)B	++	++	++	++	++	+++	++	+
	253F*	-	+	+	-	-	-	-	-
	265G	-	+	-	+	+	+	+	-
	253F (Isomer #2)	-	+	+	-	-	-	-	-
	253F (New isomer #3)	-	-	+	-	-	-	-	-
	265(Mel)L	-	-	+	-	-	-	-	-
	265D	-	+	-	+	-	-	-	-
	267C (Isomer #2)*	-	-	-	+	+	-	-	-
	267C	+	+	+	+	+	+	+	-
	265D (Isomer #2)*	-	+	-	-	-	-	-	-
	303(Mel)A	-	+	-	-	-	-	-	-
	321A*	-	+	-	-	-	-	-	-
	307G	-	+	-	-	-	-	-	-
	305B*	-	-	-	+	-	-	-	-
	307(Mel)B	-	+	+	-	-	-	-	-
	305B (New isomer #2)	-	-	-	+	-	-	-	-
	309A	+	+	-	+	+	+	+	-
	319C*	-	+	-	-	-	-	+	-
379(Mel)A	+	+	+	++	+	++	+	-	
321F*	-	+	-	-	-	-	-	-	
323F*	++	++	+	++	++	++	++	-	
323F (New isomer #2)	-	-	-	-	-	+	-	-	
323F (New isomer #3)	-	-	-	-	-	+	-	-	

Table 1 – continued

Alkaloid class	Alkaloid code	Studied sites							Novaroma
		Gateados AC32	Gateados AC34	Gateados AD23	Gateados AD25	Gateados AD22	Bomjesus AD62	Bomjesus AD61	
DHQ (13)	<i>cis</i> -223F	-	-	-	-	-	-	-	+
	<i>trans</i> -223F	+	-	-	-	-	-	-	++
DHQ (13)	5- <i>epi-trans</i> -223F*	-	-	-	-	-	-	-	+
	223F (New isomer #4)	-	-	-	-	-	-	-	++
	223F (New isomer #5)	-	-	-	-	-	-	-	++
	223F (New isomer #6)	+	-	-	-	-	-	+	++
	<i>trans</i> -249E	-	-	-	-	-	-	-	+
	249E (New isomer #2)	+	-	-	-	-	-	-	++
	275B (New isomer #3)	-	-	-	+	-	-	-	-
	<i>cis</i> -275B	-	-	-	-	-	-	-	+
	2- <i>epi-cis</i> -275B*	+	-	-	-	-	-	-	+
	<i>cis</i> -269AB	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>trans</i> -269AB	-	-	-	+	+	-	-	-	
Dehydro 5,8-I (7)	221J*	+	+	+	-	+	+	+	-
	233(Mel)D	-	-	+	-	-	-	-	-
	233(Mel)F	-	-	+	-	-	-	-	-
	2210*	-	-	-	-	-	+	+	-
	249K*	+	+	+	+	+	+	+	-
	265Y*	++	-	++	-	+	+	++	+
	265Y (Isomer #2)*	-	-	-	-	-	+	-	-
3,5-P (6)	<i>cis</i> -223B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
	<i>trans</i> -223B	+	+	+	-	+	+	+	-
	<i>cis</i> -251K	-	-	+	-	-	-	-	-
	249I*	-	-	-	-	+	-	-	-
	2510*	-	-	-	-	-	-	-	+
	239Y*	+	-	-	+	+	-	-	-
Pip (5)	223(Mel)I	+	+	+	+	+	-	+	-
	223(Mel)I (Isomer #2)	-	-	-	-	-	+	-	-
	225I	-	-	-	+	-	+	+	-
	225(Mel)A	+	+	+	+	+	+	+	-
	241G*	-	-	-	-	-	-	+	-
I (5)	211C	+	+	+	+	++	+	+	++
	223I	-	-	-	-	-	-	-	+
	211C (New isomer #2)	-	-	-	-	-	-	-	+
	229(Mel)A	+	++	+	-	+	-	-	-
	229(Mel)A (Isomer #2)	+	+	-	-	+	-	-	-
Tricyclic (5)	221S	-	-	+	-	-	-	-	-
	193C	-	-	-	-	-	-	-	+

Table 1 – continued

Alkaloid class	Alkaloid code	Studied sites							Novaroma
		Gateados AC32	Gateados AC34	Gateados AD23	Gateados AD25	Gateados AD22	Bomjesus AD62	Bomjesus AD61	
Tricyclic (5)	221S (New isomer #2)	-	-	-	-	-	+	-	-
	221W	+	-	-	-	+	-	-	+
	237Q*	-	-	-	-	+	-	-	-
3,5-I (4)	223R	-	-	-	-	+	-	-	-
	5Z,9E-223AB	++	++	+	+++	++	++	+	++
	223R (New isomer #2)	+	++	++	-	-	-	-	-
	239Q	-	-	-	+	-	-	-	-
SpiroP (3)	222(Mel)B	-	-	+	-	-	-	-	-
	265(Mel)K	-	+	-	-	-	-	-	-
	252B	+	-	+	-	-	-	-	-
aPTX (3)	323J*	-	-	-	-	-	-	+	-
	325A*	+	-	-	-	-	-	-	-
	325A (Isomer #2)*	-	-	-	-	-	-	+	+
Polyzo (1)**	151B	-	-	+	-	-	-	-	-
OHQ (1)**	193D	-	-	-	-	-	-	-	+
CPQ (1)**	249B	+	+	+	+	+	+	+	-
hPTX (1)	265(Mel)J	+	+	-	+	-	+	-	-
4,6-Q (1)	275I	-	-	-	-	-	-	-	+
1,4-Q (1)	293L*	+	-	-	+	-	-	+	-
TOTAL	262	86	102	79	85	96	76	78	76
TOTAL exclusives		10	20	17	15	18	10	6	40

* New alkaloids to genus *Melanophryniscus*, previously found in alkaloid-containing frogs.

** New classes of alkaloids for *Melanophryniscus*.

- Other trace alkaloids were detected in some extracts, but the data were inadequate for characterization.

- To access the information of new alkaloids we have the new compounds and new compounds for *Melanophryniscus* assigned in (Grant et al., unpublished data; Daly et al., 1984; Garraffo et al., 1993; Mebs et al., 2005; Mebs et al., 2007; Daly et al., 2007; Daly et al., 2008)

Three classes of alkaloids, polyzonimine (polyzo), octahydroquinolines (OHQ) and cyclopentaquinazolines (CPQ) are new for the genus *Melanophryniscus* (but reported in other alkaloid-containing frogs), raising the number of alkaloid classes in the genus to 19.

The cumulative curves of total alkaloid richness, based on total abundance of alkaloids, are presented in the Figs. 3 and 2, and it indicates that the number of alkaloids in *Melanophryniscus simplex* still increasing. This analysis also indicates that Novaroma was the richest site studied and all other presented a similar number of alkaloids. But when we consider only the amount of minor and major alkaloids the number of alkaloid raise sooner in the curve (Fig. 4).

To show the relationship with alkaloid frequency and abundance we generate a linear regression with logarithmized average of alkaloid abundance and the percentage of alkaloid frequency (Fig. 5). We found that these two variables were positively correlated (R^2 adjusted=0.82, $P < 0.05$), frequent alkaloids increase abundance exponentially.

The total alkaloid richness varied from 76 (Bomjesus AD6 and Novaroma) to 102 (Gateados AC34) compounds and the total alkaloid amount of each population varied from 357 μg (Novaroma) to 1684 μg (Bomjesus AD61). The individuals showed an alkaloid richness variation from 6 (one individual in Gateados AD23) to 61 alkaloids (one individual in Gateados AC34) and the amount in each individual varied from 1 μg (one individual from Gateados AD23) to 981 μg (one individual from Gateados AD25). Gateados AD23 was the locality with the wider variation in

the individual alkaloid amount (1 to 947 μg). The individual and geographic variation of alkaloid richness and amount are resumed in Table 2.

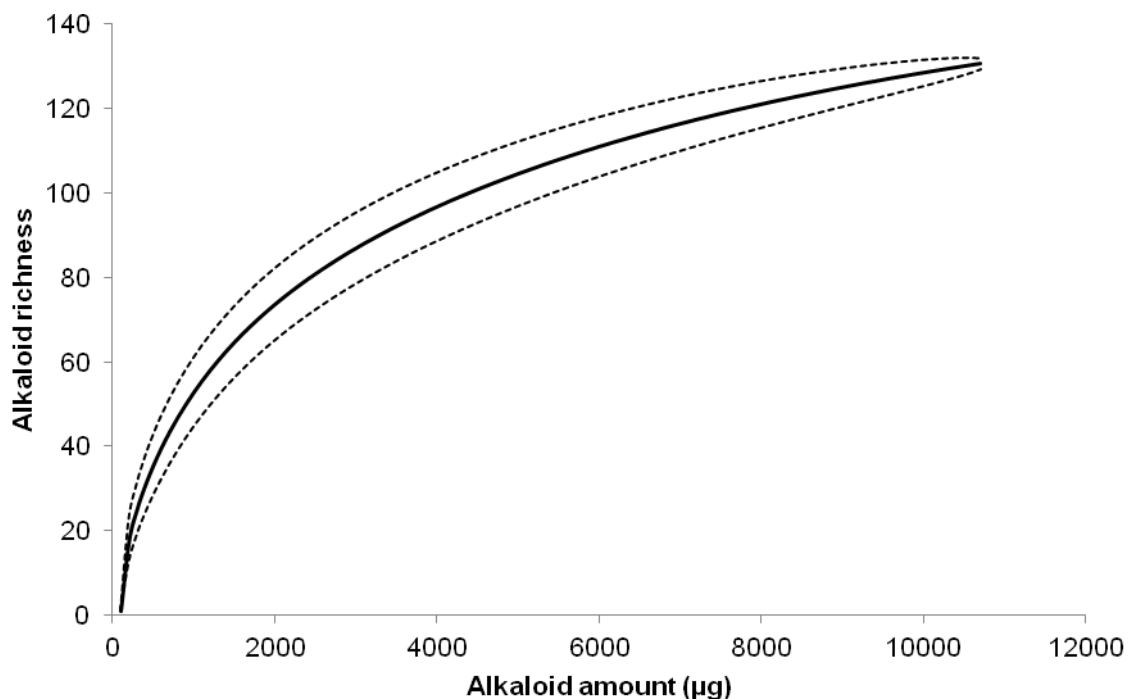


Figure 2 – Cumulative curve of alkaloid richness of the eight populations (assigned in the graph) of *Melanophryniscus simplex* analyzed. The curves were built based on total alkaloid abundance of the eight populations. Doted lines represent the interval of confidence (95%).

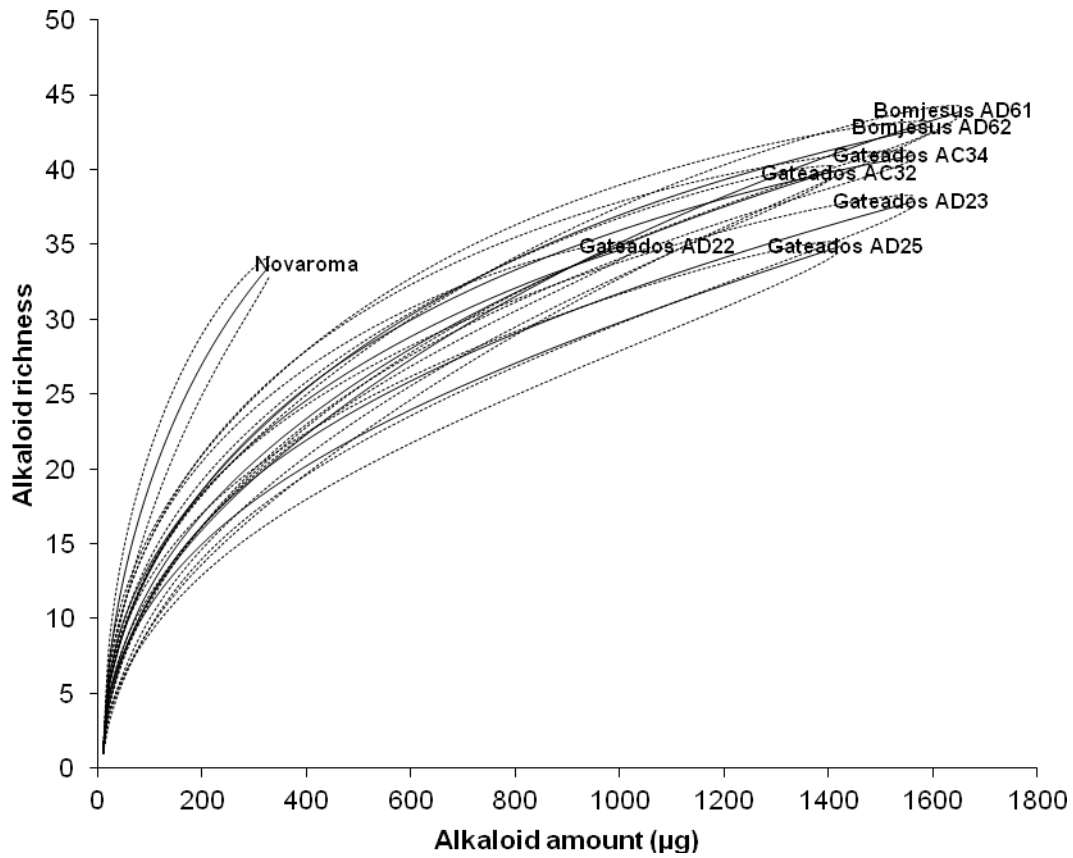


Figure 3 – Rarefaction curves of alkaloid richness of the eight populations (assigned in the graph) of *Melanophryniscus simplex* analyzed. The curves were built based on total alkaloid abundance in each population. Dotted lines represent the interval of confidence (95%).

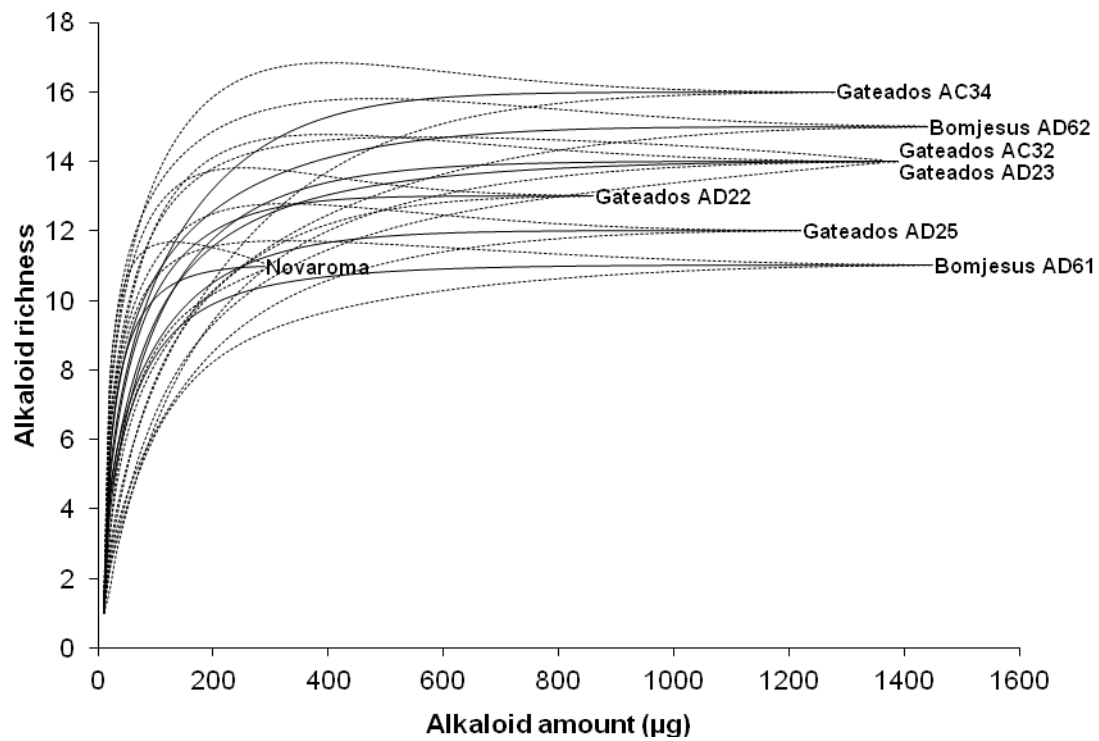


Figure 4 – Rarefaction curves of alkaloid richness of the eight populations (assigned in the graph) of *Melanophryniscus simplex* analyzed. The curves were built based on alkaloid abundance of minor and major alkaloids in each population. Dotted lines represent the interval of confidence (95%).

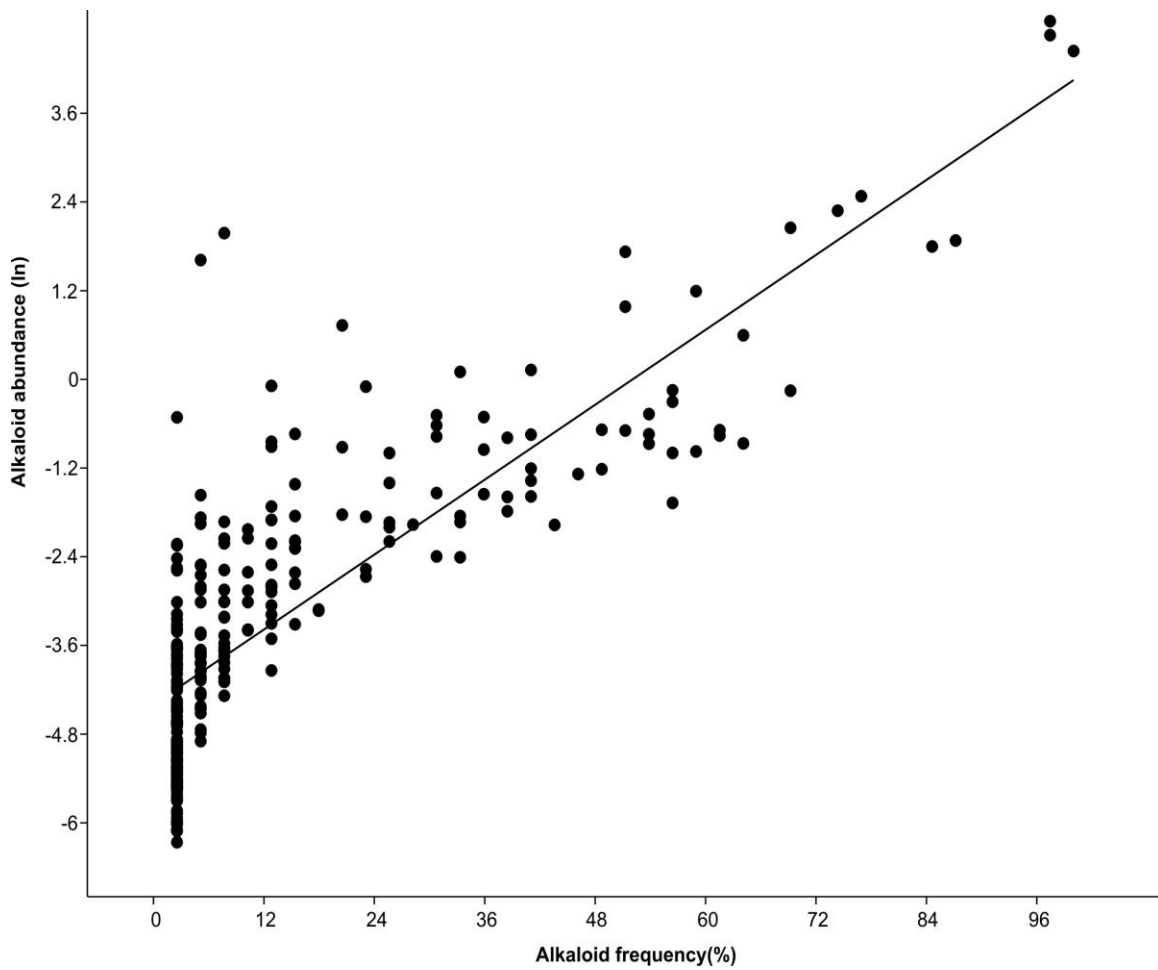


Figure 5 – Linear regression between the percentage of alkaloid frequency and the logarithmized alkaloid abundance.

Table 2 – Summary of the variation on alkaloid richness and amount among the eight sites studied.

Site	Alkaloid richness				Alkaloid amount (μg)			
	Total	Average	Min.	Max.	Total	Average	Min.	Max.
Gateados AC32	86	39	18	59	1446	289	69	612
Gateados AC34	102	42	33	61	1601	320	74	949
Gateados AD23	79	35	6	60	1594	398	1	947
Gateados AD25	85	36	15	59	1454	291	31	981
Gateados AD22	96	39	24	48	1063	213	43	289
Bomjesus AD62	76	48	46	50	1636	327	180	436
Bomjesus AD61	78	44	14	56	1684	337	9	508
Novaroma	76	31	14	52	357	71	4	234

We divided the alkaloids found in the 39 frogs in four quartiles of occurrence, following: rare (present between 0 and 25% of frogs/samples), uncommon (present in more than 25% and less than 50% of frogs/samples), common (present in more than 50% and less than 75% of frogs/samples) and much common (more than 75% of samples) (Fig. 6).

The majority of the alkaloids registered (207 alkaloids, 79% of the frogs/samples) were rare in the frogs and just six alkaloids occurred in more than 75% of all skins analyzed, the 5,8-disubstituted indolizidines (5,8-I) 207A and 223D (Isomer #2), the pumiliotoxins (PTX) 251D and 251(Mel)A, the 3,5-pyrrolizidine (3,5-P) cis 223B and the 5,6,8-indolizine (5,6,8-I) 223X. Only PTX 251(Mel)A occurred in all frog samples. These six alkaloids besides to be the most widespread also contribute with the largest amount (more than 78%) of the total alkaloid amount in frogs of seven populations (excluding Novaroma) (Table 3).

The most abundant alkaloids in the frogs in studied sites were PTX 251D, PTX 251(Mel)A and pyrrolizidine (3,5-P) cis 223B. This is the first report of a pyrrolizidine as a major alkaloid for *Melanophryniscus*.

Alkaloid diversity and composition in each frog were significantly different among the eight sites ($P < 0.05$) (Table 4 and Table 5). The pairwise comparisons of alkaloid composition revealed that only two sites (Gateados AD23 and Novaroma) showed statistical differences (Table 4) from all other sites analysed. All statistical distances on alkaloid diversity and composition within and among sites are graphically displayed with nMDS plots (Fig. 7 and Fig. 8).

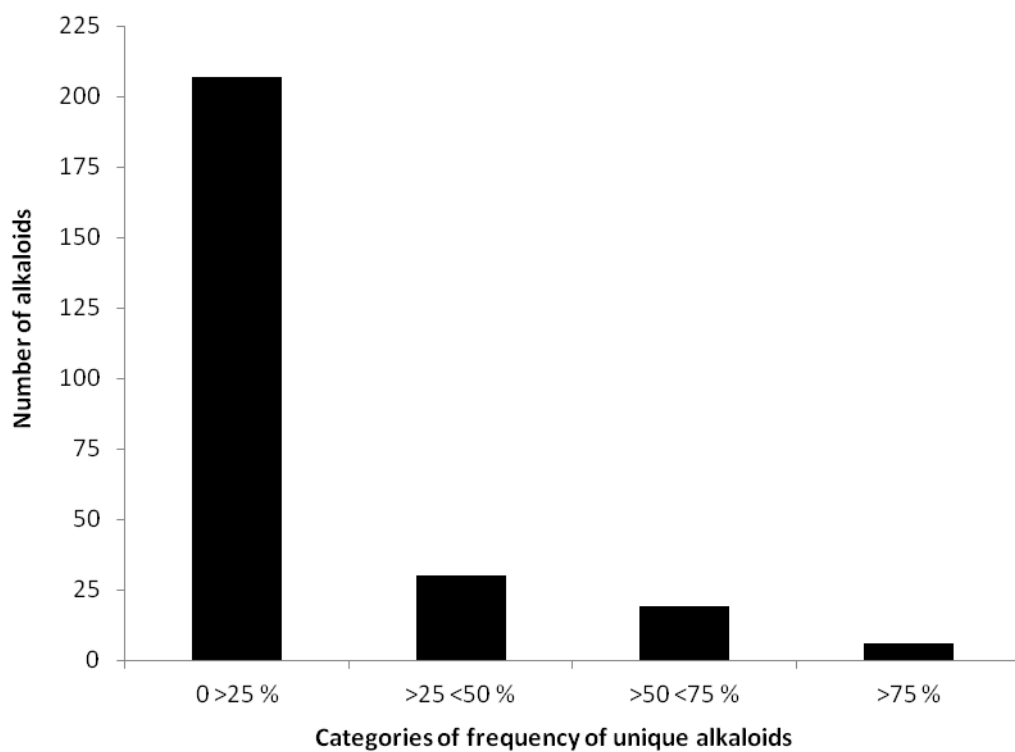


Figure 6 – Categories of frequency of unique alkaloids in the 39 analyzed frogs from the eight collection sites.

Table 3 – Contribution of the most frequent alkaloids in the total alkaloid amount for each studied site, the 5,8-Is 207A and 223D (isomer #2), the 3,5-P cis 223B, the 5,6,8-I 223X and the PTXs 251D and PTX 251(Mel)A.

Site	Contribution in total amount (%)
Gateados AC32	86
Gateados AC34	78
Gateados AD23	79
Gateados AD25	84
Gateados AD22	82
Bomjesus AD62	80
Bomjesus AD61	90
Novaroma	49

Table 4 – Results of pairwise comparisons of the alkaloid composition using a randomization tests between the eight sites localities, where $P < 0.05$ is the level of significance of the test. The two localities in italics (Gateados AD23 and Novaroma) are the only statically different from all others.

Source of variation	Sum of squares (Q)	
Factor "Sites"		
Between groups	8.4625	0.0001
Pairwise comparisons:		
Gateados AC32 X Gateados AC34	0.679	0.055
Gateados AC32 X <i>Gateados AD23</i>	0.982	0.025
Gateados AC32 X Gateados AD25	0.823	0.032
Gateados AC32 X Gateados AD22	0.638	0.201
Gateados AC32 X Bomjesus AD62	0.993	0.006
Gateados AC32 X Bomjesus AD61	0.786	0.039
Gateados AC32 X <i>Novaroma</i>	2.042	0.007
Gateados AC34 X <i>Gateados AD23</i>	1.044	0.017
Gateados AC34 X Gateados AD25	0.610	0.141
Gateados AC34 X Gateados AD22	0.802	0.110
Gateados AC34 X Bomjesus AD62	0.984	0.008
Gateados AC34 X Bomjesus AD61	1.057	0.016
Gateados AC34 X <i>Novaroma</i>	2.079	0.008
<i>Gateados AD23</i> X Gateados AD25	1.263	0.009
<i>Gateados AD23</i> X Gateados AD22	0.935	0.024
<i>Gateados AD23</i> X Bomjesus AD62	1.457	0.007
<i>Gateados AD23</i> X Bomjesus AD61	1.096	0.026
<i>Gateados AD23</i> X <i>Novaroma</i>	1.791	0.008
Gateados AD25 X Gateados AD22	0.829	0.057
Gateados AD25 X Gateados AD62	0.920	0.009
Gateados AD25 X Bomjesus AD61	1.031	0.017
Gateados AD25 X <i>Novaroma</i>	2.002	0.008
Gateados AD22 X Bomjesus AD62	0.976	0.007
Gateados AD22 X Bomjesus AD61	0.717	0.096
Gateados AD22 X <i>Novaroma</i>	1.930	0.008
Bomjesus AD62 X Bomjesus AD61	0.450	0.065
Bomjesus AD62 X <i>Novaroma</i>	2.605	0.008
Bomjesus AD61 X <i>Novaroma</i>	2.338	0.008
Within groups	14.163	
Total	22.625	

Table 5 – Results of pairwise comparisons of the alkaloid profiles using a randomization tests between the eight sites localities. Where $P < 0.05$ is the level of significance of the test.

Source of variation	Sum of squares (Q)	
Factor "Sites"		
Between groups	5.402	0.0008
Pairwise comparisons		
Gateados AC32 X Gateados AC34	0.377	0.258
Gateados AC32 X Gateados AD23	1.402	0.008
Gateados AC32 X Gateados AD25	0.310	0.418
Gateados AC32 X Gateados AD22	0.076	0.816
Gateados AC32 X Bomjesus AD62	0.510	0.090
Gateados AC32 X Bomjesus AD61	0.185	0.583
Gateados AC32 X Novaroma	1.109	0.008
Gateados AC34 X Gateados AD23	1.418	0.049
Gateados AC34 X Gateados AD25	0.198	0.611
Gateados AC34 X Gateados AD22	0.563	0.204
Gateados AC34 X Bomjesus AD62	0.179	0.474
Gateados AC34 X Bomjesus AD61	0.548	0.147
Gateados AC34 X Novaroma	1.611	0.009
Gateados AD23 X Gateados AD25	1.441	0.031
Gateados AD23 X Gateados AD22	1.274	0.033
Gateados AD23 X Bomjesus AD62	1.351	0.026
Gateados AD23 X Bomjesus AD61	0.865	0.055
Gateados AD23 X Novaroma	1.383	0.031
Gateados AD25 X Gateados AD22	0.440	0.289
Gateados AD25 X Gateados AD62	0.221	0.493
Gateados AD25 X Bomjesus AD61	0.467	0.205
Gateados AD25 X Novaroma	1.053	0.069
Gateados AD22 X Bomjesus AD62	0.699	0.079
Gateados AD22 X Bomjesus AD61	0.141	0.777
Gateados AD22 X Novaroma	0.965	0.038
Bomjesus AD62 X Bomjesus AD61	0.502	0.070
Bomjesus AD62 X Novaroma	1.643	0.010
Bomjesus AD61 X Novaroma	1.052	0.029
Within groups	9.551	
Total	14.953	

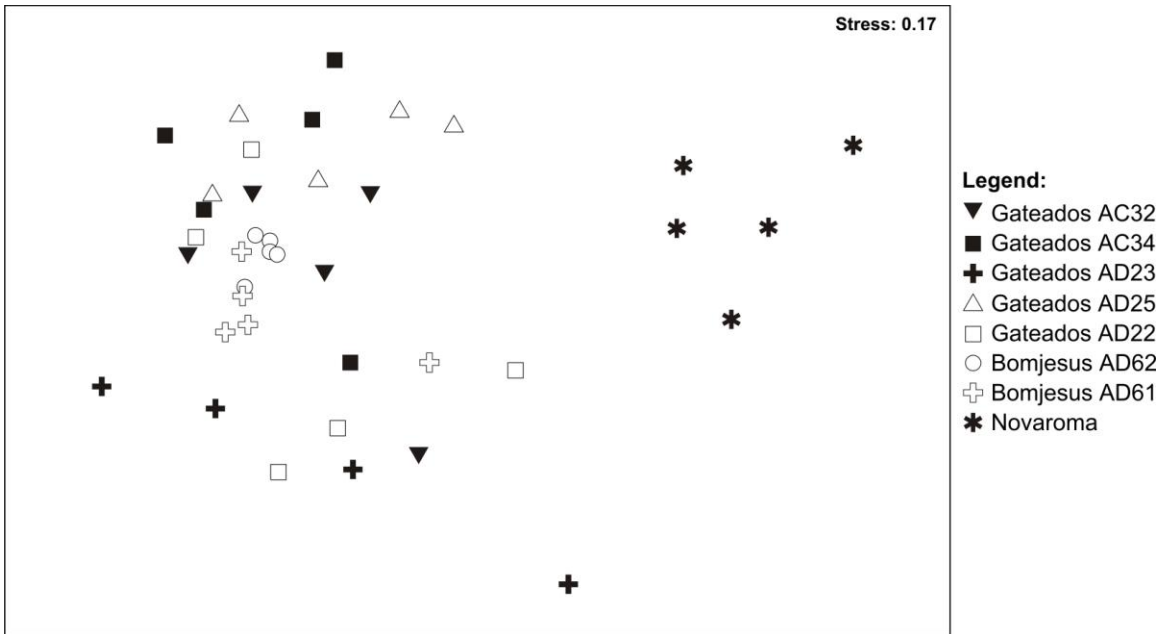


Figure 7 - Nonmetric multidimensional scaling (nMDS) plot of *Melanophryniscus simplex* alkaloid composition among eight sites on southern Brazil. This nMDS plot is based on the presence/absence of alkaloids in each frog sampled. Each symbol represents an individual frog from a specific site. Site symbols correspond to map in Figure 1.

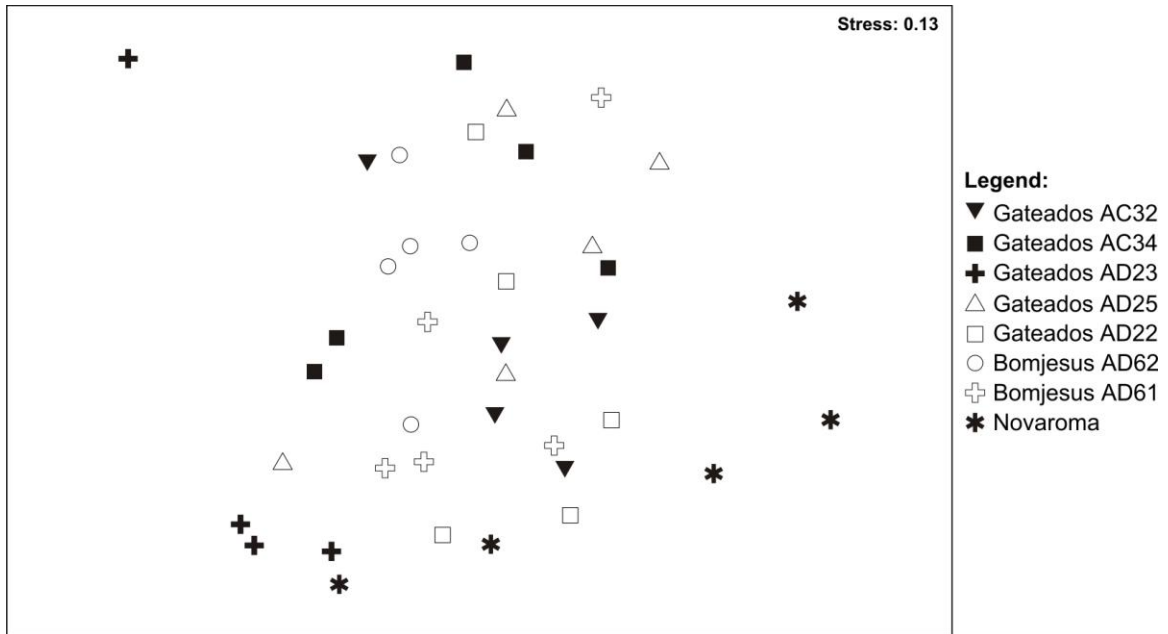


Figure 8 - Nonmetric multidimensional scaling (nMDS) plot of *Melanophryniscus simplex* alkaloid profiles among eight sites on southern Brazil. This nMDS plot is based on the total alkaloid profile of each frog sampled. Each symbol represents an individual frog from a specific site. Site symbols correspond to map in Figure 1.

There was no correlation of alkaloid diversity and composition with geographic distance among all eight sites ($r=-0.12$, $p=0.87$).

DISCUSSION

The pattern of alkaloid diversity and composition detected in individuals of *Melanophryniscus simplex* seems to be similar with the pattern found in other alkaloid containing frogs. This pattern is composed by most of alkaloids in lower abundance and few alkaloids in high abundance (e.g. Saporito et al., 2006, 2007b; Daly et al., 2008a, b) Interestingly we found an exponential positive correlation between the average of alkaloid abundance and the percentage of alkaloid frequency. This is the first report of this pattern of alkaloids in alkaloid-containing frogs. When a determined alkaloid increases frequency it increases abundance exponentially. We are not able to explain exactly this relationship but we believe that could be related to the distribution of alkaloid-containing arthropods.

Excluding the alkaloid class "Unclass", the majority of alkaloid classes found in *Melanophryniscus simplex* were 5,8-I, 5,6,8-I and PTX, including to approximately 30% of all alkaloids. In general those three classes of alkaloids are the most abundant and widespread alkaloid classes detected in alkaloid-containing frogs (e.g. Daly et al., 2005; Clark et al., 2006; Saporito et al., 2007b). The majority of alkaloids found among populations of *O. pumilio* were 5,8-I and 5,6,8-I, which together accounted for approximately 25% of all alkaloids, the next most abundant alkaloids belonged to the pumiliotoxin group 7% of all alkaloids found in *O. pumilio* (Saporito

et al., 2007b). Such alkaloid classes are also present in a wide range of mites and ants species (e.g. Daly et al. 2005; Saporito et al 2006, 2009,). Mites and ants appears to be the most abundant and frequent prey item of the alkaloid-containing frogs (Donnelly, 1991; Bonansea and Vaira, 2007; Woodhead et al., 2007) and this is a reasonable evidence that 5,8-I, 5,6,8-I and PTX were the most widespread and abundant alkaloid classes in those frogs.

Recently Grant et al. (unpublished data) reported for the first time piperidines (Pip) as a new alkaloid class to the genus *Melanophryniscus*. The two piperidines detected in that study was, Pip 223K and 225I, were previously known only in Dendrobatidae (Daly et al., 2005). In the eight populations analyzed here we discovered four new piperidines including Pip 241G, previously reported in a dendrobatid frogs (Daly et al., 2005) and three other new compounds of this class (Table 1). The main dietary sources of piperidines are probably ants (Saporito et al., 2009, 2011).

Three new classes of alkaloids for the genus *Melanophryniscus* were found in the skin extracts of *M. simplex*, polyzonimine (polyzo), octahydroquinolines (OHQ) and cyclopentaquinolizidines (CPQ). We detected trace amount of polyzo 151B in one individual from Gateados AD23, this alkaloid had been previously reported in 1975 from a millipede (Meinwald, 1975). The OHQ occur in certain populations of mantellid frogs, but only in minor or trace amounts (Daly et al., 2005). Recently, the two has been detected in dendrobatids (Daly et al., 2005). Here the OHQ 193D was recorded in trace amount in one sample from Novaroma. The polyzo 151B and OHQ 193D were considered rare alkaloids among the eight populations of *Melanophryniscus simplex* analyzed (present between 0 and 25% of frogs/samples).

The CPQ 249B were considered an uncommon alkaloid in this study reported in seven of the eight populations, but only in trace amounts. Some CPQ like CPQ 251F has been detected only very rarely as a trace alkaloid in dendrobatid frogs (Daly et al., 2005). Only in extracts from the small montane frog *Minyobates bombetes* was it a major alkaloid (Daly et al., 2005).

Six alkaloids were categorized as much common alkaloids in *Melanophryniscus simplex* (present in more than 75% of the samples), the 5,8-I 207A and 223D (Isomer #2), the PTX 251D and 251(Mel)A, the 3,5-pyrrolizidine (3,5-P) cis 223B and 5,6,8-Indolizine (5,6,8-I) 223X. Those six compounds collectively contributed with more than 70% of the total alkaloid amount in more than 74% of the frogs/samples, in some frogs those alkaloids were founded in more 90% of the total amount (Table 3). In one of the sites analyzed (Novaroma) those alkaloids comprises 49% of the total alkaloid amount. The reason of that result remains unclear, but an evidence of this difference is the fact that the population of Novaroma is the only located in a different ecoregion (Fig. 1). The 5,8-I 207A and the PTX 251D is also the most common and widespread alkaloids in *Oophaga pumilio* (Saporito et al., 2007b) and major pumiliotoxins, such as 251D can be present in skin of alkaloid-containing anurans at levels of up to 200 µg per frog (Daly et al., 2005). In *M. simplex* some individuals presents levels of PTX 251D reaching more than 500 µg. It is possible that some of the pumiliotoxins, and related congeners found in extracts of various anurans have a mite origin (Daly et al., 2005). Saporito et al. (2006) founded that oribatid mites are the sources of pumiliotoxins including PTX 251D. Interestingly despite the 5,8-I 207A was recorded frequently

among the samples it do not contribute considerably with the total alkaloid amount in each individual of *Melanophryniscus simplex* reaching only trace and minor amounts never major. The 5,8-I is the largest class of alkaloids found in anuran skin and occurs commonly in dendrobatid (several genera), mantellid (*Mantella*) frogs (Daly et al., 2005) and in some *Melanophryniscus* species (Daly et al., 2008b). Certain 5,8-I, can reach levels of 100 µg per frog, but in most cases they are minor or trace alkaloids (Daly et al., 2005). A dietary source of these compounds has not been identified, but 5,8-I 205A and 235B", were present in extracts of mixed collections of leaf-litter arthropods, most of which contained ants (Daly et al., 2005).

The 5,6,8-I 223X was one of the most abundant and widely distributed alkaloid in *M. simplex* in this study. Grant et al. (unpublished data) report another 5,6,8-I (231B) as the most abundant and widely distributed alkaloid in *M. simplex* collected in a different season. Most of the 5,6,8-I class occur only in minor or trace amounts and such alkaloids are common in *Mantella* frogs, but rather rarely in other *Melanophryniscus* toads (Daly et al., 2005). A 5,6,8-I was detected in an ant (Daly et al., 2005) and in an oribatid mite (Takada et al., 2005) it seems likely that ants/mites are the dietary sources of both 5,6,8-I and 5,8-I.

Here we report for the first time a 3,5-P alkaloid (3,5-P cis 223B) as a major alkaloid in frogs of genus *Melanophryniscus*. The 3,5-P alkaloids occur often in dendrobatids, mantellids, and bufonids anurans, but only in minor or trace amounts (Daly et al., 2005, Garraffo et al., 1993). The dietary source of those compounds is myrmicine ants (Jones et al., 1999; Daly et al., 2000). It seems clear that the possible alkaloid sources to *Melanophryniscus simplex* are mites and ants. These two groups of

arthropods are two of the most abundant and frequent item on diet of some species of *Melanophryniscus* (Bokerman, 1967; Filipello and Crespo, 1994, Bonansea and Vaira, 2007; Daly et al. 2007, 2008b). In a recent study on diet of *Melanophryniscus simplex* (Leonardi et al., unpublished data) we verified that mites and ants also were often found in the stomach contents analyzed.

The alkaloid diversity and composition of *Melanophryniscus simplex* from the eight sites varies considerably, this was also true among individuals. Recently Grant et al. (unpublished data) found a notable variation in alkaloid diversity among individuals and sites of *M. simplex* comparing three localities. The alkaloid diversity and composition from the eight populations was statistically different but just two localities differ significantly of all other localities on alkaloid composition. One of these sites is Novaroma, the frogs analyzed from Novaroma show the most different alkaloid composition of the frogs from other localities, and in this location we can see the highest number of exclusive alkaloids (40). This site is the farther and southernmost site analyzed and it is the only one located in a different ecoregion. It is reasonable expect differences on alkaloid composition from frogs of Novaroma probably because the frogs from this localities might have a diferent alkaloid containing arthropods community avaiable.

The pattern of variation (geographic and individual) in alkaloid diversity of alkaloid-containing frogs is relatively well determined in some species of families Dendrobatidae and Mantelidae (e.g. Saporito et al., 2006, 2007b; Clark et al., 2006; Daly et al., 2008a). In those families the alkaloid diversity are variable in space and in time (Saporito et al., 2006, 2007b; Clark et al., 2006; Daly et al., 2007). In some

cases, alkaloids that were predominant (major amounts) in one frog were completely absent in another frog from the same population that is true among populations/sites, we can find alkaloid composition totally different between some populations of alkaloid-containing frogs, sometimes no matter if those populations are closer or farther (Mebs 2005; Daly et al., 2007; Saporito et al., 2006; 2007b). Our results show that in *Melanophryniscus simplex* the pattern of variation in alkaloid diversity seems to follow this pattern of variation. The differences on alkaloid profiles of alkaloid-containing frogs are often related to the variation of composition and abundance of the alkaloid-containing arthropods (Saporito et al., 2006, 2007a, Daly et al., 2007, 2008a, b). Clark et al. (2006) suggested that individual variation within populations of *Mantella* represents the possibility that some alkaloid-containing arthropods are rare. Based on the degree of individual alkaloid variation observed here we can expect that certain alkaloid-containing arthropods are rare, and suggest that in some cases, as stated by Daly et al. (2002), the distribution of arthropods is confined to small areas and may be the result of localized hatches or migrations. Saporito et al. (2007a, b) suggest that in some areas of Costa Rica and Panama the alkaloid-containing arthropods are uniformly distributed. Differences in alkaloid profiles among *Oophaga pumilio* individuals within a population likely represent local small-scale geographic differences in the availability of certain alkaloid-containing arthropods (Daly et al., 2002), this is can be true to the variation in populations of this frogs closer each other, like the pattern found in *Melanophryniscus simplex*. It is not surprising that we find another pattern of

variation of alkaloid profiles in populations and individuals of *Melanophryniscus simplex* in other locations and in other period of time.

One evidence that the pattern of arthropod-containing frogs vary in a relative small area (less than 1 ha) is some of the alkaloids found in individuals of *Melanophryniscus simplex* can be found in specific microhabitats and not widespread in the ground of forest (Colombo et al., unpublished data).

The sources of alkaloids in *Melanophryniscus* frogs is not well understood, we can find some indirect evidences that some arthropods can be the main sources of this compounds in this frogs, cause the same alkaloids (e.g. indolizidines, pirolizidines, pumiliotoxins) we found in some arthropods species or mixed arthropod collections are the same we can find in individuals of *Melanophryniscus* (Garrafo et al., 1993; Ritter and Persoons, 1975; Jones et al., 1999; Daly et al., 2008b; Colombo et al., unpublished data).

The majority of alkaloids found in *Melanophryniscus simplex* is present in trace amounts and are rare in the populations studied. Probably this compounds drives to differences in alkaloid profiles between some localities. If we compare the ascendance of the rarefaction curves based on alkaloid amount including those compounds with the curves considering just minor and major alkaloids we have evidence that trace and rare alkaloids are an important element in the variation of alkaloid profiles of *Melanophryniscus simplex*. These compounds in small amounts and abundance may be temporary elements in chemical defense of alkaloid-containing frogs probably it are result of an ingestion of a rare arthropod (both in quantity and in abundance) (Saporito personal communication). In the other hand

some compounds are present in trace or minor amounts but were considered much common alkaloids, that is the case of 5,8-I 207A. The role in the chemical defense of the majority of these compounds is unknown. Weldon et al. (2006) show an experiment about the toxicity of the widely distributed alkaloid PTX 251D, the authors found a minimum toxic concentration of 0.1 g/cm² and they estimate the cutaneous abundance of this compound in some frogs, an observation consistent about the function of PTX 251D in anuran chemical defense against ectoparasitic arthropods. Its reasonable that some alkaloids though in small amounts or in small dilutions in the whole skin can contribute significantly in the chemical defense of these frogs, maybe the concentrations of those alkaloids might be enough to deter several small ectoparasites and pathogens, like some microscopic invertebrates (or smaller than *Aedes aegypti*), bacteria, fungus or virus.

The reasons of the remarkable individual variation found in the eight populations of *Melanophryniscus simplex* analyzed are not clear. Individual alkaloid profiles of some alkaloid-containing frogs vary following the age and sex of determined frog (e.g. Daly et al., 2008a; Saporito et al., 2010). However we did not detected differences on alkaloid profiles between sexes of individuals of *M. simplex* (Colombo et al. unpublished data, capítulo III). Up to date the reasonable explanations of the individual variation in alkaloid profiles in *Melanophryniscus* frogs are the individual ability to sequester some alkaloids and/or individual differences on diet of alkaloid-containing arthropods. Recently, A. Jeckel, C. Jared and T. Grant (unpublished data), show the variation in quantity of skin glands between individuals of *Melanophryniscus simplex* and that might be another possible source of the

individual alkaloid-profile variation. Other interesting aspect about the chemical defense of *Melanophryniscus* is that some species of the genus posses have high levels of toxic bufadienolides or bufadienolide-like compounds (Flier et al., 1980), which would protect populations even where alkaloid-containing prey are not available and that might be another source of variation in individual alkaloid profiles.

The pattern of variation of alkaloid profiles of alkaloid-containing frogs show that this system is variable enough to confound our ability to predict changes in alkaloids in this frogs (e.g. Daly et al., 2007; Saporito et al., 2006, 2007b, 2011). In general the geographic variation is well reported in three lineages of alkaloid-containing frogs (dendrobatids, mantelids and bufonids). Now we suggest the studies about chemical defense in alkaloid-containing frogs must be drove to elucidate individual variation (e.g. behavior, diet, natural history) of alkaloid-profiles as well as the study of variation in alkaloid-containing arthropods.

REFERENCES

BALDO, D. and BASSO N. G. 2004. A new species of *Melanophryniscus* Gallardo, 1961 (Anura: Bufonidae), with comments on the species of the genus reported for Misiones, northeastern Argentina. *J. Herpetol.* 38(3):393-403.

BEVINS, C. L. and ZASLOFF, M. 1990. Peptides from frog skin. *Annu. Rev. Biochem.* 59:395–414.

BOKERMAN, W. C. A. 1967. Observações sobre *Melanophryniscus moreirae* (Mir. Rib.) (Amphibia-Brachycephalidae). *An. Acad. Bras. de Cienc.* 39:301-306.

BONANSEA, M. I., and VAIRA, M. 2007. Geographic variation of the diet of *Melanophryniscus rubriventris* (Anura: Bufonidae) in northwestern Argentina. *J. Herpetol.* 41:231-236.

BRODIE, E. D. and TUMBARELLO, M. S. 1978. Antipredator functions of *Dendrobates auratus* (Amphibia, Anura, Dendrobatidae) skin secretion in regard to a snake predator (*Thamnophis*). *J. Herp.* 12:264-265.

CLARK, V. C., RAKOTOMALALA, V., RAMILJAONA, O., ABRELL, L., and FISHER, B. L. 2006. Individual variation in alkaloid content of poison frogs of Madagascar (*Mantella*; Mantellidae). *J. Chem. Ecol.* 32:2219-2233.

DALY, J. W. 1995. The chemistry of poisons in amphibian skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:9-13.

DALY, J. W. and MYERS, C. W. 1967. Toxicity of Panamanian poison frogs (*Dendrobates*): some biological and chemical aspects. *Science* 156:970-973.

DALY, J. W., HIGHET, R. J., and MYERS, C. W. 1984. Occurrence of skin alkaloids in non-dendrobatid frogs from Brazil (Bufonidae), Australia (Myobatrachidae) and Madagascar (Mantellidae). *Toxicon* 22:905–919.

DALY, J. W., GARRAFFO, H. M., PANNELL, L. K., and SPANDE, T. F. 1990. Alkaloids from Australian frogs (Myobatrachidae): Pseudophrynamines and pumiliotoxins. *J. Nat. Prod.* 53:407–421.

DALY, J. W., SHERRIE, I., SECUNDA, S., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F. WISNIESKI, A., NISHIHARA, C., and COVER, J. F. Jr. 1992. Variability in alkaloid profiles in neotropical poison frogs (Dendrobatidae): genetics versus environmental determinants. *Toxicon* 30:887-898.

DALY, J. W., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., JARAMILLO, C., and RAND, S. A. 1994. Dietary source for skin alkaloids of poison frogs (Dendrobatidae)? *J. Chem. Ecol.* 20:943–955.

DALY, J. W., ANDRIAMAHARAVO, N. R., ANDRIANTSIFERANA, M., and MYERS, C. W. 1996. Madagascan poison frogs (Mantella) and their skin alkaloids. *Am. Mus. Nov.* 3177:1–34.

DALY, J. W., GARRAFFO, H. M., HALL, G. S. E., and COVER, J. F. JR. 1997. Absence of skin alkaloids in captive-raised Madagascan mantelline frogs (*Mantella*) and sequestration of dietary alkaloids. *Toxicon* 35:1131–1135.

DALY, J. W., GARRAFFO, H. M., JAIN, P., SPANDE, T. F., SNELLING, R. R., JARAMILLO, C., and RAND, S. A. 2000. Arthropod-frog connection: decahydroquinoline and pyrrolizidine alkaloids common to microsympatric myrmicine ants and dendrobatid frogs. *J. Chem. Ecol.* 26:73–85.

DALY, J. W., KANEKO, T., WILHAM, J., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., ESPINOSA, A., and DONNELLY, M. A. 2002. Bioactive alkaloids of frog skin: combinatorial bioprospecting reveals that pumiliotoxins have an arthropod source. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:13996–14001.

DALY, J. W., SPANDE, T. F., and GARRAFFO, H. M., 2005, Alkaloids from amphibian skin: a tabulation of over eight-hundred compounds. *J. Nat. Prod.* 68:1556-1575.

DALY, J. W., WILHAM, J. M., SPANDE, T. F., GARRAFFO, H. M., GIL, R. R., SILVA, G. L., and VAIRA, M. 2007. Alkaloids in bufonid toads (*Melanophryniscus*): temporal and geographic determinants for two Argentinian species. *J. Chem. Ecol.* 33:871–887.

DALY, J. W., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., GIDDINGS, L. A., SAPORITO, R. A., VIEITES, D. R., and VENCES, M. 2008a. Individual and geographic variation of skin alkaloids in three species of Madagascan poison frogs (*Mantella*). *J. Chem. Ecol.* 34:252–279

DALY, J. W., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., YEH, H. J. C., PELTZER P. M., CACIVIO, P. M., BALDO, J. D. and FAIVOVICH, J. 2008b. Indolizidine 239Q and quinolizidine 275I. Major alkaloids in two Argentinian bufonid toads (*Melanophryniscus*). *Toxicon* 52:858–870.

DONNELLY, M. A. 1991. Feeding patterns of the strawberry poison frog, *Dendrobates pumilio* (Anura: Dendrobatidae). *Copeia* 3:723–730.

DUMBACHER, J. P., BEEHLER, B. M., SPANDE, T. F., GARRAFFO, H. M., and DALY, J. W. 1992. Homobatrachotoxin in the genus *Pitohui*: chemical defense in birds? *Science* 258:799-801.

FERNÁNDEZ, K. 1926. Sobre la biología y reproducción de algunos batracios argentinos (segunda parte). *Bol. Acad. Nac. Cienc. Córdoba* 29:271-320.

FILIPELLO, A. N., and CRESPO, F. A. 1994. Alimentacion en *Melanophryniscus stelzneri* (Anura: Bufonidae). *Cuad. Herpetol.* 8:18–24.

FLIER, J., EDWARDS, M. W., DALY, J. W., and MYERS, C. W. 1980. Widespread occurrence in frogs and toads of skin compounds interacting with the Ouabain site of Na⁺, K⁺-ATPase. *Science* 208:503-505.

FRITZ, G., RAND, S. A., and DEPAMPHILIS, C. W. 1981. The aposematically colored frog, *Dendrobates pumilio*, is distasteful to the large, predatory ant, *Paraponera clavata*. *Biotropica* 13:158-159.

Frost, D. R. 2011. Amphibian species of the world: an online reference. Version 5.5 (31 January 2011). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA

FRY, B. G., VIDAL, N., NORMAN, J. A., VONK F. J., SCHEIB H., RAMJAN, S. F. R., KURUPPU S., FUNG, K., S. HEDGES, B., RICHARDSON M. K., HODGSON, W. C., IGNJATOVIC, V., SUMMERHAYES, R., and KOCHVA, E. 2006. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature*. 439:584-588.

GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., DALY, J. W., BALDESSARI, A., and GROS, E. G. 1993. Alkaloids from bufonid toads (*Melanophryniscus*): decahydroquinolines, pumiliotoxins and homopumiliotoxins, indolizidines, pyrrolizidines, and quinolizidines. *J. Nat. Prod.* 56:357-373.

GRANT, T., FROST, D. R., CALDWELL, J. P., GAGLIARDO, R., HADDAD, C. F. B., KOK, P. J. R., MEANS, B. D., NOONAN, B. P., SCHARGEL, W. E., AND WHEELER, W. C. 2006. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Anura: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 299:1-262.

HAMMER, O., HARPER, D. A. T., AND RYAN, P. D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* 4:1-9.

HUTCHINSON, D. A., SAVITZKY, A. H., MORI, A., BURGHARDT, G. M., MEINWALD, J., and SCHROEDER, F. C. 2011. Chemical investigations of defensive steroid sequestration by the Asian snake *Rhabdophis tigrinus* *Chemoecology* published online 01 May 2011.

JONES, T. H., GORMAN, J. S. T., SNELLING, R. R., DELABIE, J. H. C., BLUM, M. S., GARRAFFO, H. M., JAIN, P., DALY, J. W., and SPANDE, T. F. 1999. Further alkaloids common to ants and frogs: decahydroquinolines and a quinolizidine. *J. Chem. Ecol.* 25:1179–1193.

KINGDON, J., AGWANDA, B., KINNAIRD, M., O'BRIEN, T., HOLLAND, C., GHEYSENS T., BOULET-AUDET, M., and VOLLRATH, F. 2011. A poisonous surprise under the coat of the African crested rat. *Proc. R. Soc. B.* published online 3 August 2011doi: 10.1098/rspb.2011.1169

LANGONE, J. A. 1994. Ranas y sapos del Uruguay (reconocimiento y aspectos biológicos). Museo Damaso Antonio Larrañaga, Montevideo.

MEBS, D., POGODA, W., MANEYRO, R., and KWET, A. 2005. The alkaloid composition of the poisonous skin secretion of the red bellied toad, *Melanophryniscus montevidensis* (Anura, Bufonidae), from Uruguay. *Toxicon* 46:641-650.

MEBS, D., MANEYRO, R., and POGODA, W. 2007a. Further studies on the pumiliotoxin 251D and hydroquinone content of the skin secretion of *Melanophryniscus* species (Anura, Bufonidae) from Uruguay. *Toxicon* 50:166-169.

MEBS, D., WAGNER, M. G., POGODA, W., MANEYRO, R., KWET, A., and KAUERT, G. 2007b. Lack of bufadienolides in the skin secretion of red bellied toads, *Melanophryniscus* spp. (Anura, Bufonidae), from Uruguay. *Comp. Biochem. Physiol.* 144:398-402.

MEINWALD, J., SMOLANOFF, J., MCPHAIL, A. T., MILLER, R. W., EISNER, T., and HICKS, K. 1975. Nitropolyzonamine: a spirocyclic nitro compound from the defensive glands of a millipede (*Polyzonium rosalbum*). *Tetrahedon Lett.* 28:2367-2370.

MYERS, C. W., DALY, J. W., GARRAFFO, H. M., WISNIESKI, A., and COVER, J., Jr 1995. Discovery of the Costa Rican frog *Dendrobates granuliferus* in sympatry with *Dendrobates pumilio*, and comments on taxonomic use of skin alkaloids. *Am. Mus. Nov.* 3144:1-21.

OLSON, D. M., DINERSTEIN, E., WIKRAMANAYAKE, E. D., BURGESS, N. D., POWELL, G. V. N., UNDERWOOD, E. C., D'AMICO, J. A., ITOUA, I., STRAND, H. E., MORRISON, J. C., LOUCKS, C. J., ALLNUTT, T. F., RICKETTS, T. H., KURA, Y., LAMOREUX, J. F., WETTENGEL, W. W., HEDAO, P., and KASSEM, K. R. 2001. Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth. *BioScience* 51:933-938.

Pillar, V. D. 2006. Multiv: software para análise multivariada, auto-reamostragem bootstrap e testes de aleatorização. Porto Alegre, Departamento de Ecologia, UFRGS. disponível em <http://ecoqua.ecologia.ufrgs.br/arquivos/Software/MULTIVMinor/>.

RITTER, F. J., and PERSOONS C. J. 1975 Recent developments in insect pheromone research in particular in The Netherlands. *Neth. J. Zool.* 25:261-275.

RODRÍGUEZ, A., POTH, D., SCHULZ, S., and VENCES, M. 2011. Discovery of skin alkaloids in a miniaturized eleutherodactylid frog from Cuba. *Biol. Lett.* 7:414-418.

SANTOS, R. R. and GRANT, T. 2011. Diel Pattern of Migration in a Poisonous Toad from Brazil and the Evolution of Chemical Defenses in Diurnal Amphibians. *Evol. Ecol.* 25:249-258.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., and DALY, J. W. 2006. Geographic and seasonal variation in alkaloid-based chemical defenses of *Dendrobates pumilio* from Bocas del Toro, Panamá. *J. Chem. Ecol.* 32:795-814.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., NORTON, R., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., and DALY, J. W. 2007a. Oribatid mites as a new and significant source of alkaloids in poison frogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:8885-8890.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., JAIN, P., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., and DALY, J. W. 2007b. Spatial and temporal patterns of alkaloid variation in the poison frog *Oophaga pumilio* in Costa Rica and Panama over 30 years. *Toxicon* 50:757-778.

SAPORITO, R. A., SPANDE, T. F., GARRAFFO, H. M., and DONNELLY, M. A. 2009. Arthropod alkaloids in poison frogs: a review of the “dietary hypothesis”. *Heterocycles* 79:277-297.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., MADDEN, A. A., GARRAFFO, H. M., and SPANDE, T. F. 2010. Sex-related differences in alkaloid defenses of the dendrobatid frog *Oophaga pumilio* from Cayo Nancy, Bocas del Toro, Panama. *J. Nat. Prod.* 73:317–321.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., SPANDE, T. F., and GARRAFFO, H. M. 2011. A review of chemical ecology in poison frogs. *Chemoecology* DOI 10.1007/s00049-011-0088-0

SMITH, B. P., TYLER, M. J., KANEKO, T., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., and DALY, J. W. 2002. Evidence for biosynthesis of pseudophrynamine alkaloids by an Australian myobatrachid frog (*Pseudophryne*) and for sequestration of dietary pumiliotoxins. *J. Nat. Prod.* 65:439–447.

SMITH, W. L., and WHEELER, W. C. 2006. Venom evolution widespread in fishes: a phylogenetic road map for the bioprospecting of piscine venoms. *J. Hered.* 97:206–217.

SZELISTOWSKI, W. A. 1985. Unpalatability of the poison arrow frog *Dendrobates pumilio* to the ctenid spider *Cupiennius coccineus*. *Biotropica* 17:345–346.

TAKADA, W., SAKATA, T., SHIMANO, S., ENAMI, Y., MORI, N., NISHIDA, R., and KUWAHARA, Y. 2005. Scheloribatid mites as the source of pumiliotoxins in dendrobatid frogs. *J. Chem. Ecol.* 31:2403–2415.

WELDON, P. J., KRAMER, M., GORDON, S., SPANDE, T. F., and DALY, J. W. 2006. A common pumiliotoxin from poison frogs exhibits enantioselective toxicity against mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:17818-17821.

WOODHEAD, C., VENCES, M., VIEITES, D. R., GAMBONI, I., FISHER, B. L. and GRIFFITHS, R. A. 2007. Specialist or generalist? Feeding ecology of the Malagasy poison frog *Mantella aurantiaca*. *Herpetol. J.* 17:(4)225-236.

6. CAPÍTULO II

Distribuição de alcalóides do sapo-de-barriga-vermelha *Melanophryniscus simplex*
(Caramaschi e Cruz 2002) (Bufonidae) em quatro diferentes microambientes

Patrick Colombo^{1*}

Ralph Saporito²

Laura Verrastro³

Taran Grant⁴

*1 Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Instituto de Biociências, Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul Avenida Ipiranga 6681, 90619-900, Porto
Alegre, RS, Brazil*

2 John Carroll University, Department of Biology, University Heights, Ohio, 44118, USA

*3 Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, 91540-000,
Porto Alegre, RS, Brazil*

*4 Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, C.P.
11461, 05422-970, São Paulo, SP, Brazil*

* Corresponding author e-mail: patrick_colombo@hotmail.com

Abstract – Brazilian red belly toads of the genus *Melanophryniscus* represent one lineage of anurans with the ability to sequester defensive alkaloids from a diet of alkaloid-containing arthropods. The profiles (type, number and amount) of those alkaloids may vary geographically among populations and among individuals of the same population. This variation appears to be associated with differences in the availability of alkaloid-containing arthropods. Some sources of alkaloids are relatively well known in other alkaloid-containing frogs (families Dendrobatidae and Mantellidae) but less so in *Melanophryniscus*. To determine environmental sources of alkaloids of *Melanophryniscus simplex* we collected 138 samples of soil invertebrates from four different microhabitats and 19 frog skins, both from same four sites. Using gas chromatography and mass spectrometry we accessed the alkaloid composition of methanolic extracts from invertebrate samples and frog skins. We test the similarity in alkaloid composition between the four microhabitats and sites, comparing the variation of alkaloids found in invertebrates and frogs. Twenty eight of the 184 alkaloids detected in *Melanophryniscus simplex* in the four sites were observed in invertebrate samples. Some alkaloids abundant and common in frogs were not found in the environmental samples and some alkaloids frequent in these samples were rare or absent in the frogs. We found differences of similarity between the alkaloid composition from microhabitats and between the areas. Some microhabitats showed more alkaloids than others. The results here are the best evidence of environmental sources of *Melanophryniscus* alkaloids and the importance of some microhabitats in chemical defense of those frogs. **Key words** – Soil invertebrates, leaf litter, araucaria forest, Atlantic forest, Rio Grande do Sul.

INTRODUÇÃO

O sequestro de substâncias para proteção contra predadores e agentes patogênicos parece ser um dos mais complexos sistemas de defesa química em vertebrados, envolvendo uma suposta rede de interações entre diferentes organismos (e.g. Daly, 1995, 2005; Saporito et al., 2011). Dentre estas substâncias estão os alcalóides lipofílicos, conhecidos, em vertebrados, principalmente por serem os principais compostos de defesa de alguns grupos de anfíbios anuros (Daly and Myers 1967; Daly, 1995).

A dieta à base de artrópodes que contém alcalóides, como ácaros, formigas, besouros e milípedes, pode ser a fonte de obtenção destas substâncias para estes grupos de anuros (Meinwald et al., 1975; Moore and Brown, 1978; Daly et al., 1994a,b; Saporito et al., 2003, 2007a). Porém somente um pequeno número de alcalóides detectados na pele de anfíbios está associado a uma fonte alimentar específica (Saporito et al., 2007a).

Em anuros do gênero *Melanophryniscus* a dieta predominantemente composta por ácaros e formigas (Bokerman, 1967; Filipello and Crespo, 1994, Bonansea and Vaira, 2007; Daly et al., 2007, 2008a) pode ser responsável pela presença de alcalóides. Alguns destes invertebrados contém os mesmos alcalóides detectados nas peles destes sapos (Garrafo et al., 1993; Ritter and Persoons, 1975; Jones et al., 1999; Daly et al., 2008a).

As origens de alcalóides são relativamente bem estudadas em rãs da família Dendrobatidae e Mantelidae (Daly et al., 1987, 1996, 2008b, 2009; Clark et al., 2006,

Saporito et al., 2007b) porém pouco se sabe acerca deste aspecto em sapos do gênero *Melanophryniscus*. Tem se relacionado as diferenças no perfil de alcalóides de sapos que contém alcalóides a diferenças na abundância, composição e distribuição de artrópodes que contém alcalóides (Daly et al. 2002, Saporito et al. 2007a, b, 2011).

Até o momento os estudos relacionados ao sequestro da defesa química tem sido direcionados a descobrir essas fontes específicas de alcalóides para anuros que contém alcalóides sendo pouco avaliado como estes alcaloides estão distribuídos em determinados microhabitats ou ecossistemas (Daly et al., 2002, Saporito et al., 2011). A composição e abundância de artropódes de solo e de serapilheira de florestas tropicais podem apresentar diferenças na distribuição espacial e temporal em escalas relativamente pequenas (Lieberman and Dock, 1982; Levings, 1983). Portanto espera-se que artrópodes que contém alcalóides tenham padrões de distribuição não homogêneos em uma determinada área ou habitat (Daly et al., 2002; Saporito et al., 2007a, b).

Abordagens que comparam em diferentes ambientes os alcalóides de artropodes que contém alcalóides, podem ser úteis para visualizar a distribuição de alcalóides entre estes ambientes. Além disso a coleta de amostras combinadas de artrópodes que contém alcalóides pode ser uma importante ferramenta para determinar a presença de alguns alcalóides que não são facilmente detectados em indivíduos de invertebrados que contém alcalóides (Daly et al., 2002). Com essas amostras conjuntas aumentamos a chance de detecção de um determinado composto, facilitando comparações entre áreas com diferentes características ambientais.

Dentro deste contexto os objetivos deste trabalho são: a) determinar se os alcalóides encontrados em *Melanophryniscus simplex* estão presentes em diferentes amostras de invertebrados provenientes de diferentes microambientes e diferentes áreas, b) testar se existem diferenças na composição de alcalóides entre as amostras de invertebrados dos diferentes microambientes e áreas avaliados e c) comparar a composição de alcalóides encontrados em diferentes microambientes com a composição encontrada em indivíduos de *Melanophryniscus simplex*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de invertebrados Para a coleta dos invertebrados do solo demarcamos quatro áreas de 1.000 m² (100 x 100 m) em quatro localidades de ocorrência da espécie no Município de Campo Belo do Sul, Santa Catarina, Brasil, denominadas: Gateados AC32 (coordenadas 27°59'50.4" S e 50°53'59.4" O), Gateados AC34 (coordenadas 27°59'39.9" S e 50°53'31.4" O), Gateados AD23 (coordenadas 28°01'29.7" S e 50°50'33.0" O) e Gateados AD22 (coordenadas 28°02'17.1" S e 50°51'31.3" O) (Fig. 1). A distância entre estes pontos pode ser visualizada na legenda da Fig. 1. As localidades amostradas estão inseridas na ecoregião da floresta úmida de araucária (*Araucaria Moist Forest*) segundo a classificação proposta por Olson et al. (2001). Em cada uma destas áreas coletamos

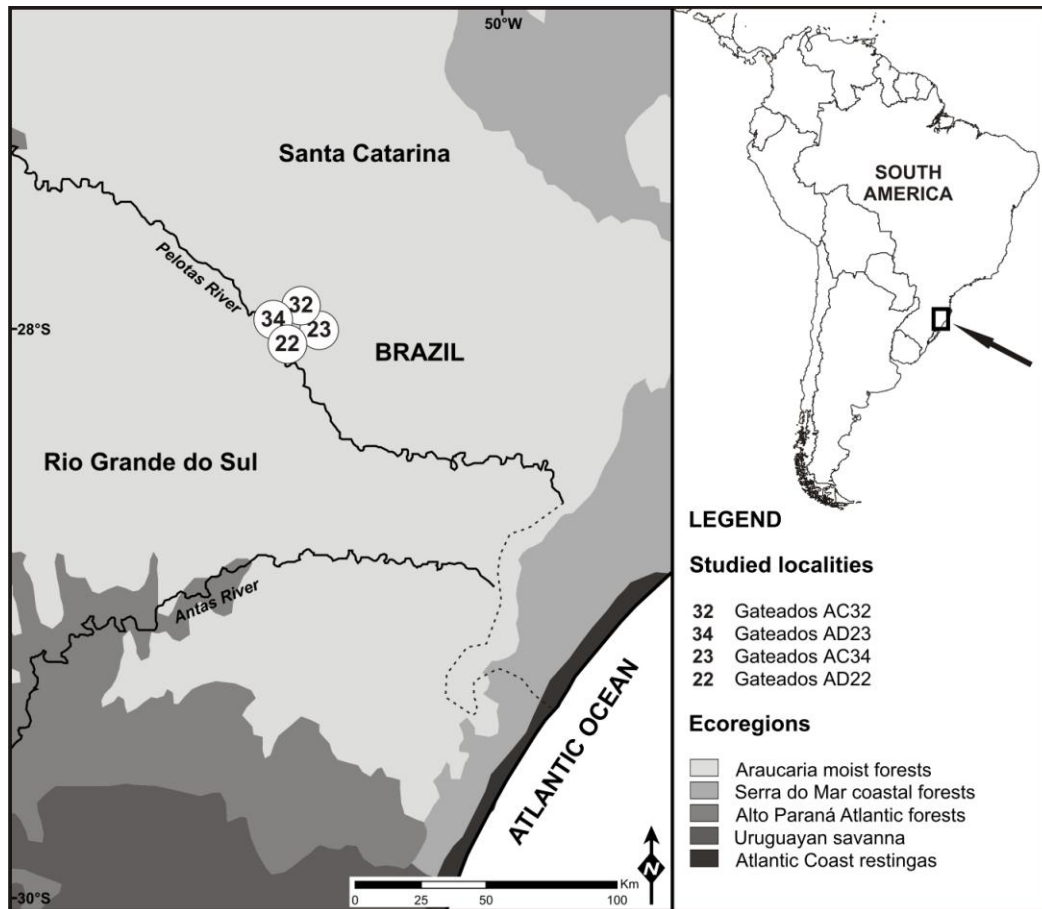


Figura 1 – Mapa com as áreas de onde foram retiradas as amostras de pele de indivíduos de *Melanophryniscus simplex* e de invertebrados de solo. A flecha preta (à direita) indica a área do mapa da América do Sul aumentada (à esquerda). As ecorregiões foram delimitadas segundo Olson et al. (2001). A distância linear entre as áreas de estudo são: Gateados AC32 a Gateados AC34 – 0.83 km; Gateados AC32 a Gateados AD23 – 5.93 km; Gateados AC32 a Gateados AD22 – 5.85 km; Gateados AC34 a Gateados AD23 – 6.41 km; Gateados AC34 a Gateados AD22 – 6.06 km e Gateados AD23 a Gateados AD22 – 2.16 km.

amostras de solo e serapilheira em quatro microambientes distintos: serapilheira (SER), solo sob troncos caídos (TRO), solo sob serapilheira (SOL) e solo sob pedras (PED). Esses ambientes foram selecionados em função de observações prévias sobre a frequência de captura de indivíduos de *M. simplex* nesses ambientes. Detectamos nas áreas amostradas que os sapos eram mais encontrados nestes quatro microambientes. Em cada um dos quatro microambientes retiramos aleatoriamente três conjuntos de amostras com espaçamento de três metros entre cada (12 amostras ao total) dentro das quatro áreas demarcadas (48 amostras por evento). Coletamos as amostras em três eventos: agosto/setembro de 2009, dezembro de 2009 e janeiro de 2010, portanto somamos 144 amostras.

A coleta foi realizada com auxílio de cilindros de metal de 15 cm de diâmetro por 10 cm de profundidade (modificado de Clapperton et al., 2002; Rochefort et al., 2006) de modo que todas amostras tiveram o mesmo volume coletado. Todo o material, solo mais serapilheira foi acondicionado individualmente em sacos plásticos (Duarte, 2004) e levado para laboratório onde os invertebrados eventualmente existentes foram extraídos com auxílio de extratores tipo funil de Berlese ligados, com uma lâmpada incandescente de 25 W, durante sete dias (Duarte, 2004). Os invertebrados de solo presentes nas amostras foram coletados em copos de plástico não contendo fixador, colocados logo abaixo de cada funil. A cada 24 horas o conteúdo destes copos foi retirado acondicionado em recipientes de 4 ml contendo metanol 100%.

Coleta de anfíbios Coletamos 19 indivíduos de *Melanophryniscus simplex* em atividade reprodutiva, após fortes chuvas, nos seus respectivos sítios reprodutivos (riachos temporários de água rasa, aproximadamente 10 cm de profundidade) próximos (cerca de 10 m) nas mesmas áreas onde foram coletados os invertebrados de solo. As coletas destes indivíduos ocorreu em setembro de 2009. Capturamos os sapos manualmente sem auxílio de equipamento. Após a captura os indivíduos foram levados para laboratório onde foram anestesiados, congelados e a pele inteira retirada. Cada pele foi acondicionada individualmente em recipientes de vidro com tampa plástica, revestida por Teflon® (parte interna) e volume de 4 ml contendo metanol 100% . Para reduzir a chance de contaminação cruzada de cada amostra, todo o material utilizado para a retirada das peles era limpo com metanol 100%. Espécimes testemunho (carcaças) foram depositados na Coleção de Anfíbios e Répteis do Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCP) e na Coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Para as análises de alcalóides dos indivíduos de *Melanophryniscus simplex* consideramos os indivíduos dentro de um raio de 120 m do sítio reprodutivo como uma única população, seguindo Santos e Grant (2011).

Análises químicas O método para extração e isolamento dos alcalóides das 19 peles de sapos retiradas seguiu o protocolo elaborado por Daly et al. (1994a) e modificado por Saporito et al. (2010a) como descrito a seguir. Para a extração e isolamento dos alcalóides de 138 amostras (descartamos seis amostras) de invertebrados de solo e

serapilheira utilizamos os mesmos protocolos, porém modificados. Os alcalóides da solução obtida das peles de sapos foram extraídos da seguinte maneira: para cada pele (indivíduo) foi adicionado 10 µL de solução de nicotina a 99% (padrão interno, usado para quantificação dos alcalóides) e 50 µL de HCl 1 N para cada 1 mL da solução de metanol com a pele. Esta solução foi concentrada para o volume de 100 µL com N₂ e logo após diluída com 200 µL de água destilada. Esta solução foi enxaguada quatro vezes, cada vez com 300 µL de hexano. À fração de HCl resultante foi adicionado NaHCO₃ saturado (para tornar a solução básica) e em seguida enxaguada três vezes, cada vez com 300 µL de acetato de etila. A fração com acetato de etila foi secada com sulfato de sódio anidro e evaporada com N₂ até 100 µL.

A extração dos alcalóides das amostras de invertebrados ocorreu como descrito a seguir. As amostras foram filtradas de maneira que foi utilizado para a extração somente a parte líquida da solução de invertebrados, resíduos (solo e material vegetal) e metanol 100%. Esta solução foi concentrada (com N₂), ou, em alguns casos, a quantidade completada, até 250 µL. Logo após foi adicionado 50 µL de HCl 1 N e esta solução foi enxaguada três vezes com 350 µL de hexano. À solução resultante foi adicionado NaHCO₃ saturado e novamente enxaguada três vezes com acetato de etila (300 µL cada vez). Ao final obtivemos uma solução de acetato de etila mais os alcalóides eventualmente presentes em cada amostra de invertebrados. Os extratos obtidos das soluções provenientes das amostras de peles e de invertebrados foram analisados através de cromatografia gasosa conjugada com espectrometria de massa (GC-MS) utilizando-se um cromatógrafo da marca Varian modelo *Saturn 2100T ion trap MS* com uma coluna cromatográfica de sílica marca

Varian modelo 3900 GC Varian Factor Four VF-5ms com 30 m x 0.25 mm (diâmetro interno). A separação dos alcalóides foi alcançada utilizando uma programação de amplitude de temperatura de 100 a 280°C a uma taxa de 10°C por minuto, com gás He como gás carreador (1 mL/min). Analisamos cada fração de alcalóides através de impacto eletrônico e ionização química (metanol como gás reagente da ionização química). Posteriormente os alcalóides foram identificados com base na comparação dos tempos de retenção, dos espectros de massa e da massa molecular, com os dados de mais de 850 alcalóides já conhecidos e identificados em grupos de artrópodes e de sapos que contém alcalóides (e.g. Daly et al., 2005).

Para determinar a composição e a quantidade de alcalóides em cada amostra de invertebrados e de pele de sapos os cromatogramas obtidos foram cuidadosamente varridos em busca de alcalóides. Somente para as amostras de sapos quantificamos a quantidade de cada alcalóide comparando a área de cada pico de cada substância com a área do pico do padrão interno de nicotina (padrão escolhido em razão do tempo de retenção deste não coincidir com o tempo de retenção da maioria dos alcalóides encontrados em anuros). A quantidade do padrão de nicotina em cada solução final corresponde a 10 µg. Nas amostras de pele consideramos somente os compostos presentes em uma quantidade superior a 0.1 µg, pela confiabilidade na identificação destes compostos. Devido a este corte é possível que alguns alcalóides, eventualmente abaixo desta quantidade, sejam descartados. Portanto, como não foi possível a quantificação de alcalóides nas amostras de invertebrados consideramos para as comparações somente alcalóides também presentes nos sapos. Mesmo assim em cinco destas amostras de

invertebrados procuramos pela presença de alcalóides que não foram encontrados em amostra alguma de pele de *Melanophryniscus simplex* (Grant et al dados não publicados, capítulo IV e Colombo et al dados não publicados, capítulo I). Utilizamos o programa computacional Varian *MS Workstation v.6.9 SPI* para as análises dos cromatogramas. Os alcalóides encontrados em sapos que contém alcalóides são identificados por códigos que consistem em um número que corresponde a massa nominal do alcalóide seguido de uma letra, distinguindo alcalóides com a mesma massa (Daly et al., 2005). Para identificar e diferenciar novos alcalóides utilizamos um código contendo primeiro a massa nominal seguido da palavra “Mel” entre parenteses, seguida de uma única letra. Os compostos correspondentes a novos isômeros de alcalóides já conhecidos foram identificados com a palavra “isômero” seguida do símbolo “#” e de um número identificando cada isômero entre parenteses.

Análises estatísticas Comparamos a composição de alcalóides de cada amostra de invertebrados em cada área e cada microhabitat amostrado, bem como a composição e diversidade de alcalóides nos sapos em cada área, utilizando uma análise de variância (ANOVA) via testes de aleatorização entre unidades amostrais, neste caso cada indivíduo de *Melanophryniscus simplex* e cada amostra de invertebrados de solo, seguindo os procedimentos descritos em Pillar (2006). Para esta análise utilizamos 10.000 aleatorizações. Esses testes foram realizados utilizando o programa MULTIV 2.4 (Pillar, 2006). Como medida de similaridade utilizamos a distância de corda. Usamos um nível de significância de $P < 0.05$.

RESULTADOS

Dos 184 alcalóides encontrados em *Melanophryniscus simplex* nas quatro áreas amostradas (Colombo et al. dados não publicados, capítulo I), somente 28 foram detectados nas amostras de invertebrados provenientes de todos os microambientes examinados (Tabela 1). O microambiente onde mais foram encontrados alcalóides foi a SER somando 22 alcalóides, sendo que destes, 10 foram observados exclusivamente neste microambiente (Fig. 2). Porém quando analisamos separadamente a composição de alcalóides entre os quatro microambientes amostrados nas quatro áreas de estudo, observamos que em Gateados AD22 o maior número de alcalóides (sete) está no TRO (Fig. 3). Detectamos alcalóides presentes nos sapos em somente 35% (48) das 138 amostras de invertebrados analisadas. As classes de alcalóides que apresentaram o maior número de compostos foram a 5,8-idolizidina dissubstituída (5,8-I; 10 alcalóides), a classe de alcalóides não classificados (Nãoclass; 8 alcalóides) e a 5,6,8-idolizidina trisubstituída (5,6,8-I; 4 alcalóides; Tabela 1). Dentre os 28 alcalóides detectados, 11 (39%) foram encontrados em menos de 1% das amostras, 13 (46%) entre 1 e 5% das amostras e quatro (14%) alcalóides entre 5 e 10% das amostras. Estes últimos

Tabela 1 – Alcalóides encontrados em cada microambiente nas quatro áreas de estudo. Onde: ANF – amostra de pele de indivíduos de *Melanophryniscus simplex*, SER – invertebrados coletados na serapilheira, PED – invertebrados coletados sob pedra, TRO – invertebrados coletados sob tronco e SOL invertebrados coletados no solo; 5,8-I (5,8-indolizinas dissubstituídas), Nãoclass (alcalóides não classificados), 5,6,8-I (5,6,8-indolizidinas trisubstituídas), Pip. (piperidinas), 3,5-I (3,5-indolizidinas dissubstituídas), 3,5-P (3,5-pirrolizidinas dissubstituídas), I (izidinas) e PTX (pumiliotoxinas). O número (1) indica a presença do alcalóide e o símbolo (-) indica a ausência. Os números entre parênteses correspondem a quantidade total de alcalóides em µg.

Classe	Alcalóide	Localidades																			
		Gateados AC32					Gateados AC34					Gateados AD23					Gateados AD22				
		ANF	SER	TRO	SOL	PED	ANF	SER	TRO	SOL	PED	ANF	SER	TRO	SOL	PED	ANF	SER	TRO	SOL	PED
5,8-I	219F	-	-	-	-	-	1 (0.7)	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	223D (isômero #2)	1 (27.5)	1	-	-	-	1 (2.9)	1	-	-	-	1 (4.4)	-	1	-	-	1 (26.3)	-	-	-	-
	271(Mel)A	1 (3.5)	-	1	-	1	1 (3.8)	-	-	-	-	1 (0.2)	-	-	-	-	1 (6.3)	1	-	-	-
	275(Mel)A	1 (0.1)	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	273(Mel)A	-	-	-	-	1	1 (0.8)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (0.1)	1	-	-	-
	207A	1 (13.3)	1	-	-	-	1 (33.5)	-	-	-	-	1 (1.6)	-	-	-	-	1 (16.2)	-	-	-	-
	239(Mel)A	1 (7.8)	1	-	-	-	1 (7.9)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (8.7)	-	-	-	-
	271(Mel)C	1 (0.6)	1	-	-	-	1 (0.3)	-	-	-	-	1 (0.1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	217B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (0.1)	-	-	-	1
	237(Mel)C	1 (2.0)	-	-	-	-	1 (3.5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (1.8)	1	-	-	-
Nãoclass	253M	1 (0.8)	1	1	1	-	1 (0.2)	-	1	-	1	-	1	-	-	-	1 (1.1)	1	-	1	-
	223L (isômero #2)	1 (0.1)	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	1 (1.3)	-	-	-	-
	223L	1 (0.3)	-	-	-	-	1 (1.8)	1	1	-	-	-	-	1	-	-	1 (0.4)	-	-	-	-
	251(Mel)D	-	1	-	-	1	1 (0.3)	-	-	-	-	1 (1.2)	-	-	-	-	1 (0.8)	-	-	1	-
	249P (isômero #3)	1 (0.4)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	249(Mel)C	1 (0.7)	-	-	-	-	1 (0.9)	-	-	-	1	1 (3.6)	-	-	-	-	1 (1.0)	-	-	-	-
	247(Mel)A	1 (0.4)	-	-	-	-	1 (1.3)	-	-	-	1	1 (0.9)	-	-	-	-	1 (0.7)	-	-	-	-
	249(Mel)A	1 (1.9)	1	-	-	-	1 (3.5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (1.6)	-	-	-	-
5,6,8-I	231K	-	-	-	-	-	1 (2.3)	1	1	-	1	-	-	-	-	-	1 (0.8)	1	-	1	-
	223X	1 (28.6)	-	-	-	-	1 (47.2)	1	-	-	-	1 (18.5)	-	-	1	-	1 (22.4)	-	-	-	-
	231B (isômero #3)	1 (5.5)	1	-	-	-	1 (9.3)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (0.5)	-	-	-	-
	197H	1 (0.1)	1	-	-	-	1 (0.1)	-	-	-	-	1 (0.4)	-	-	-	-	1 (0.7)	-	-	-	-
Pip..	225(Mel)A	1 (1.7)	1	-	-	-	1 (0.9)	1	-	1	-	1 (2.4)	-	-	-	1	1 (0.7)	1	-	-	-
	225I	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-
3,5-I	5Z,9E: 223AB	1 (26.9)	-	-	-	-	1 (9.0)	1	-	-	-	1 (0.3)	-	-	-	-	1 (7.1)	-	-	-	-
3,5-P	cis 223B	1 (580.2)	-	-	-	-	1 (439.4)	-	-	-	-	1 (253.6)	1	-	-	-	1 (365.8)	-	-	-	-
I	211C	1 (1.1)	1	1	1	-	1 (0.6)	-	-	-	-	1 (1.4)	1	-	-	-	1 (7.2)	1	1	-	-
PTX	251D	1 (275.6)	-	-	-	-	1 (232.2)	-	-	1	1	1 (958.2)	-	-	-	-	1 (250.3)	-	-	-	-
TOTAL	28	22 (979.2)	12	4	2	5	23 (802.2)	9	5	2	8	14 (1247.0)	4	3	1	2	23 (721.9)	7	1	3	1

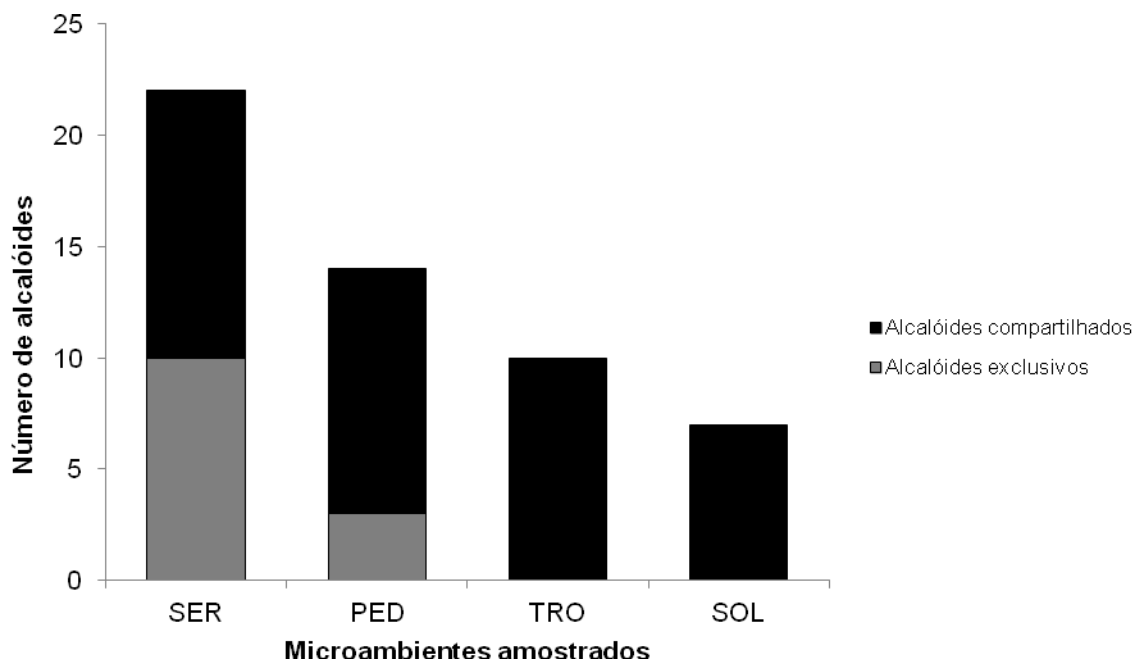


Figura 2 – Número de alcalóides compartilhados e exclusivos entre as amostras de invertebrados de cada microambiente estudado. Onde, SER – invertebrados coletados na serapilheira, PED – invertebrados coletados sob pedra, TRO – invertebrados coletados sob tronco e SOL invertebrados coletados no solo.

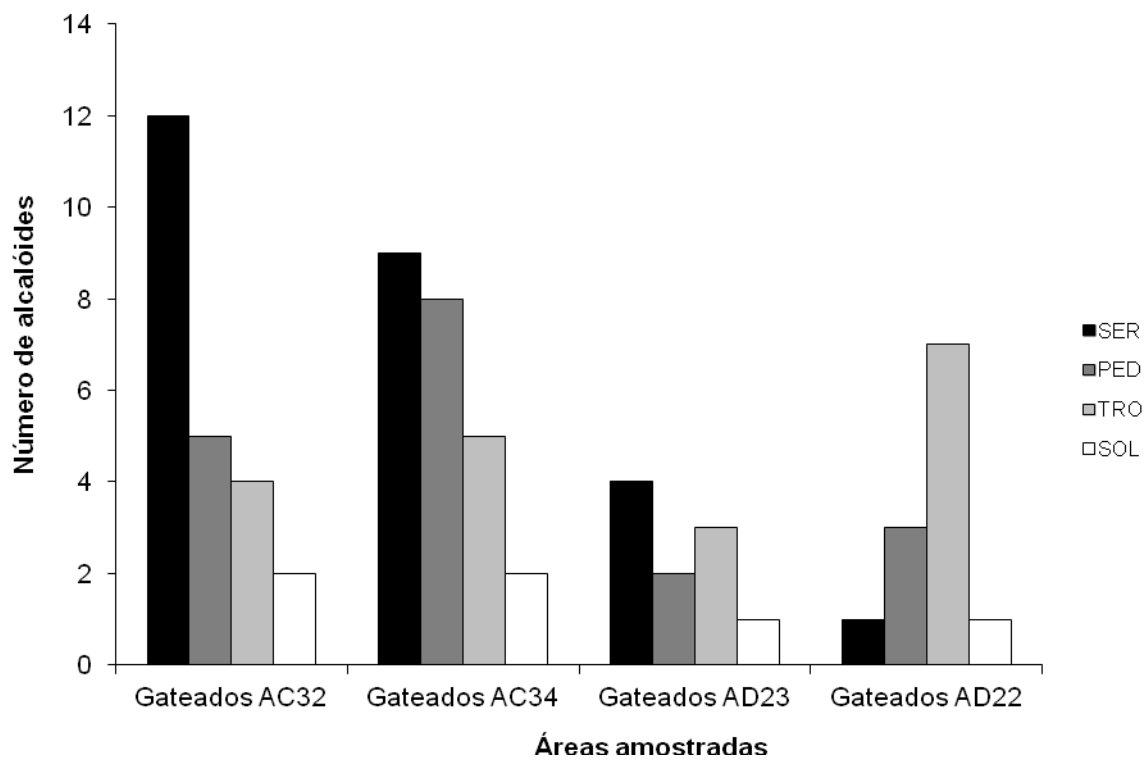


Figura 3 – Número de alcalóides encontrados em cada microambiente e em cada área estudada. Onde, SER – invertebrados coletados na serapilheira, PED – invertebrados coletados sob pedra, TRO – invertebrados coletados sob tronco e SOL invertebrados coletados no solo.

alcalóides são a izidina (I) 211C, observado em 13 amostras (9.4%), a Piperidina (Pip.) 225I, ocorrendo em 10 amostras (7.3%), a Pip. 225(Mel)A e o Nãoclass 253M, ambos encontrados em nove amostras (6.5%) (Fig. 4).

A composição de alcalóides dos invertebrados presentes nos quatro microambientes amostrados foi estatisticamente diferente ($P < 0.05$) sendo que a composição de alcalóides na SER foi diferente da composição de alcalóides de invertebrados do SOL e do PED (Tabela 2). As comparações entre as amostras de invertebrados das quatro áreas estudadas revelam diferenças estatisticamente significantes ($P < 0.05$) entre as mesmas, sendo que Gateados AC32 foi a única diferente entre todas as áreas (Tabela 3). As comparações entre os alcalóides presentes nos sapos nas quatro áreas estudadas também mostram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$) entre as áreas, porém nenhuma delas foi unicamente diferente (Tabela 4).

Comparando o número de alcáloides compartilhados entre anfíbios e microambientes nas quatro áreas amostradas, observamos que as áreas tem padrões diferentes (Fig.5). A área que apresenta o maior número é Gateados AC32, com 14 alcalóides compartilhados entre anfíbios e microambientes (Fig. 4). Estes alcalóides são, os alcalóides Nãoclass 253M, 223L (Isômero #2) e 223L, e a Pip. 225I (Tabela 1). Este último composto não é encontrado em sapo algum de nenhuma das quatro áreas amostradas e é um dos alcalóides mais frequentemente encontrado nas amostras de invertebrados (Fig. 5).

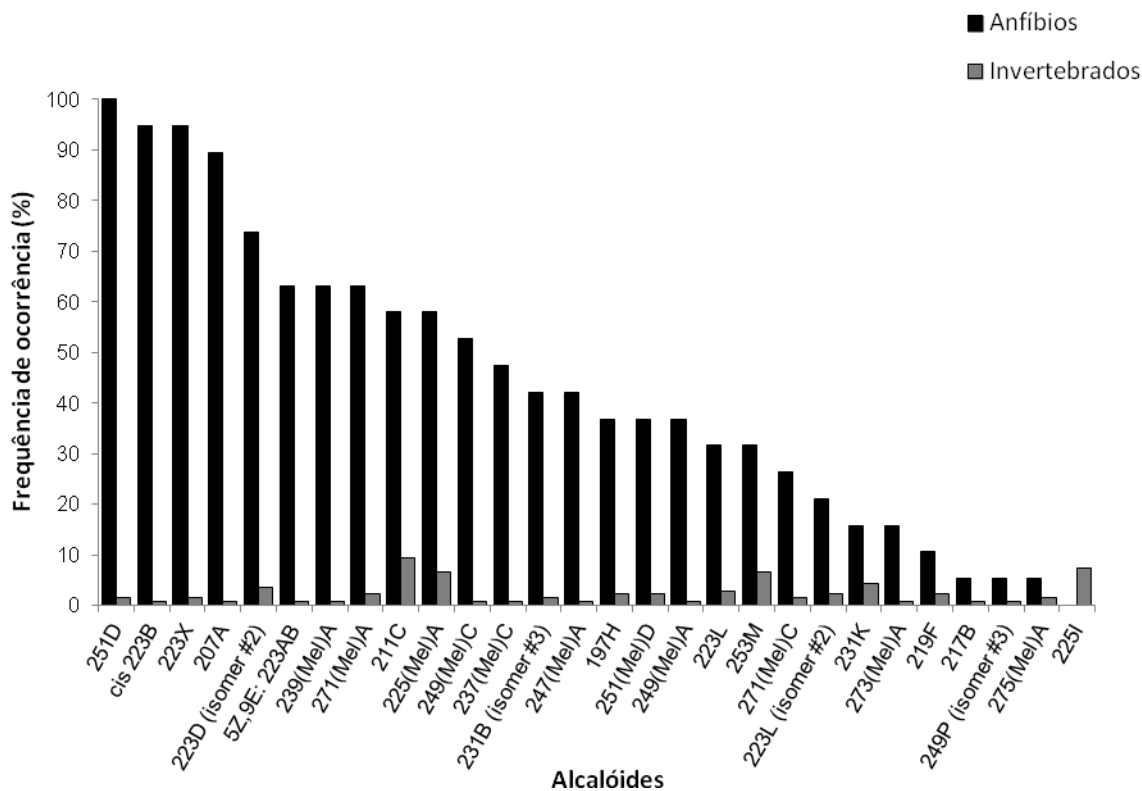


Figura 4 – Distribuição das frequências de alcalóides presentes nas amostras de pele de anfíbios e de invertebrados nos quatro microambientes amostrados e nas quatro áreas estudadas.

Tabela 2 – Resultados das comparações da composição de alcalóides de sapos entre os quatro microhabitats amostrados, considerando somente os alcalóides encontrados nas amostras de invertebrados de solo. Onde SER – serapilheira, TRO – sob troncos, SOL – solo e PED – sob pedra; $P < 0.05$ é o nível de significância

Fonte de variação	Soma de quadrados	
Entre grupos	1.7585	<i>0.0019</i>
Comparações par a par		
SER X TRO	0.94113	<i>0.0047</i>
SER X SOL	0.73151	0.0582
SER X PED	0.99444	<i>0.0027</i>
TRO X SOL	0.22712	0.5342
TRO X PED	0.28281	0.2661
SOL X PED	0.32869	0.1472
Dentro de grupos	44.071	
Total	45.83	

Tabela 3 – Resultados das comparações da composição de alcalóides de sapos entre as quatro áreas amostradas (Gateados AC32, AC34, AD23 e AD22), considerando somente os alcalóides encontrados nas amostras de invertebrados de solo. O nível de significância do teste estatístico é $P < 0.05$.

Fonte de variação	Soma de quadrados	
Entre grupos	2.2447	<i>0.0002</i>
Comparações par a par		
Gateados AC32 X Gateados AC34	1.5256	<i>0.0001</i>
Gateados AC32 X Gateados AD23	0.84717	<i>0.0048</i>
Gateados AC32 X Gateados AD22	0.64015	<i>0.0466</i>
Gateados AC34 X Gateados AD23	0.46728	0.105
Gateados AC34 X Gateados AD22	0.73188	<i>0.0071</i>
Gateadod AD23 X Gateados AD22	0.32296	0.21
Dentro de grupos	43.585	
Total	45.83	

Tabela 4 – Resultados das comparações da composição de alcalóides de sapos entre as quatro áreas amostradas (Gateados AC32, AC34, AD23 e AD22), considerando somente os alcalóides encontrados nas amostras de peles de sapos. O nível de significância do teste estatístico é $P < 0.05$.

Fonte de variação	Soma de quadrados(Q)	
Entre grupos	1.7029	<i>0.0365</i>
Comparações par a par:		
Gateados AC32 X Gateados AC34	0.41848	0.2193
Gateados AC32 X Gateados AD23	0.81398	<i>0.0174</i>
Gateados AC32 X Gateados AD22	0.477	0.2167
Gateados AC34 X Gateados AD23	0.84317	<i>0.0387</i>
Gateados AC34 X Gateados AD22	0.39608	0.3472
Gateados AD23 X Gateados AD22	0.50285	0.2727
Dentro de grupos	5.4754	
Total	7.1784	

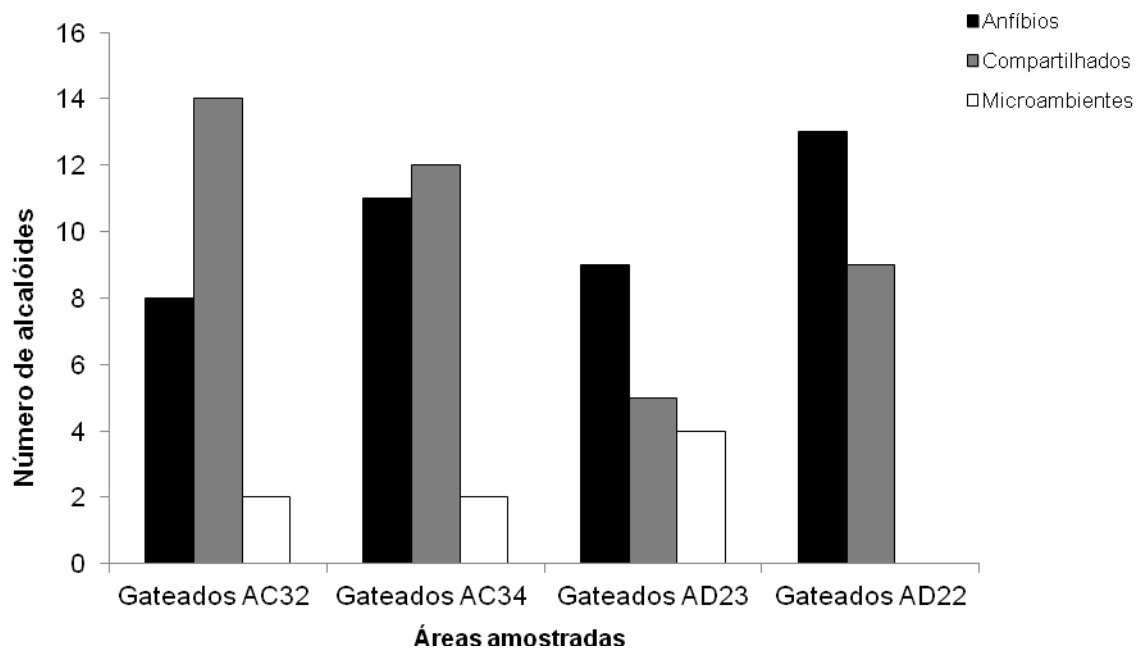


Figura 5 – Número de alcalóides compartilhados e exclusivos entre as amostras de invertebrados, de peles de anfíbios e de cada microambiente estudado.

Dos seis alcalóides citados como de maior, frequência, abundância e que mais contribuem em quantidade na diversidade total de alcalóides de *Melanophryniscus simplex* (Colombo et al., dados não publicados, capítulo I) cinco (5,8-Is 207A e 223D (isômero #2), a 5,6,8-I 223X, a 3,5 pirrolizidinas dissubstituídas (3,5-P) *cis* 223B e a pumiliotoxina (PTX) 251D) ocorreram nas amostras de invertebrados, porém observamos estes alcalóides em somente alguns dos microambientes e áreas amostrados (Tabela 1), além disso em baixas frequências, não coincidentes com as frequências em que são encontrados nos sapos (Fig. 5). Um dos seis compostos citados anteriormente, a PTX 251(Mel)A não foi detectado em amostra alguma de invertebrados, sendo este o único alcalóide encontrado em todas as amostras de pele de indivíduos de *Melanophryniscus simplex* (Colombo et al. dados não publicados, capítulo I). Nas cinco amostras em que buscamos alcalóides não encontrados em *M. simplex* encontramos cinco compostos, as 5,8-Is 237H, 249L, 251N e 273B, e o alcalóide Não class 263J.

DISCUSSÃO

Os resultados aqui encontrados podem ser a melhor evidência de que a composição de alcalóides em invertebrados que contém alcalóides varia ente diferentes microambientes e diferentes áreas influenciando na variação de alcalóides econtrada em anuros que contém alcalóides, particularmente aqui em *Melanophryniscus* (Mebis et al., 2005; Bonansea and Vaira, 2007; Daly et al., 2007, 2008a).

Excetuando-se os alcalóides não classificados, as duas classes com o maior número de alcalóides encontradas nas amostras de invertebrados foram a 5,8-I e a 5,6,8-I. Estas duas classes são as mais amplamente distribuídas entre sapos que contém alcalóides (Saporito et al., 2007b) incluindo *Melanophryniscus simplex* (Grant et al. dados não publicados, capítulo IV, Colombo et al. dados não publicados, capítulo I). Porém, a seguinte classe com mais alcalóides e também amplamente encontrada em sapos que contém alcalóides as PTXs (Saporito et al., 2007b) foram representadas nas amostras de invertebrados por apenas um composto, a PTX 251D, em apenas dois microambientes de uma das áreas amostradas (Tabela 1).

Ácaros e formigas parecem ser as fontes principais de 5,8-Is, 5,6,8-Is e PTXs para sapos que contém alcalóides (Daly et al., 2005; Saporito et al 2007a, 2009,). Ácaros e formigas também são os principais itens alimentares destes anuros (Donnelly, 1991; Bonansea and Vaira, 2007; Woodhead et al., 2007), portanto é esperado que as três classes sejam bem distribuídas e abundantes em sapos que contém alcalóides. Ainda assim é intrigante a baixa frequência, praticamente ausência, das PTXs nas amostras de invertebrados estudadas aqui, dado a abundância e frequência desta substância entre os sapos das quatro populações estudadas.

Este padrão de raridade ocorre também com alcalóides individuais, compostos que são muito abundantes em indivíduos de *Melanophryniscus simplex*, em alguns casos atingindo níveis superiores a 500 µg, como, por exemplo, a própria PTX 251D e a 3,5-P cis 223B, são encontrados em poucas amostras de invertebrados e em poucos dos microambientes amostrados. Ainda podemos observar outros padrões de frequência quando comparamos as amostras de invertebrados e anuros. Um dos

alcalóides encontrados, o Nãooclass 253M, foi relativamente frequente entre as amostras de invertebrados, porém raro nos sapos. Não há informações sobre as fontes deste composto, neste estudo foi detectado em amostras provenientes de invertebrados de todos os microambientes.

Outro caso observado é o de alcalóides relativamente frequentes tanto em sapos quanto em amostras de invertebrados como a I 211C e a Pip. 225(Mel)A. Estas duas substâncias podem ocorrer, em determinadas localidades, em mais de 50% dos indivíduos de *M. simplex* (Grant et al., dados não publicados, capítulo IV e Colombo et al., dados não publicados, capítulo I), nas amostras de invertebrados estes alcalóides foram encontrados em quase 10% das amostras. Não se sabe ao certo a fonte destes compostos, porém a I 211C foi detectada em extratos de formigas (Grant et al., dados não publicados, capítulo IV) e ácaros oribatídeos (Saporito et al., 2009, 2011).

Um último padrão visualizado é o caso da Pip. 225I. Esta substância foi encontrada em cerca de 7% das amostras de invertebrados, porém em anuro algum das quatro áreas amostradas. A Pip. 225I foi observada em outras populações de *M. simplex*, incluindo populações próximas as populações estudadas aqui (Colombo et al., dados não publicados, capítulo I). Este composto já havia sido reportado neste bufonídeo por Grant et al. (dados não publicados, capítulo IV), até então esta piperidina só havia sido detectada em anuros da família Dendrobatidae (Daly et al., 2005). As principais e prováveis fontes de piperidinas apontadas para sapos que contém alcalóides são formigas (Saporito et al., 2009, 2011,). Neste estudo este alcalóide foi registrado em três microambientes em duas das quatro áreas amostradas.

Dos cinco compostos (as 5,8-Is 237H, 249L, 251N e 273B, e o Não class 263]) encontrados nas cinco amostras em que foram prospectados alcalóides não registrados nos anfíbios analisados, somente um deles, a 5,8-I 249L, é registrado para o gênero *Melanophryniscus* (Daly et al., 2008a). Os outros quatro alcalóides são registrados para outras famílias de anuros que contém alcalóides, mas não para *Melanophryniscus* (Daly et al., 2005). A ausência destes compostos (incluindo a Pip. 225I em uma das populações de *M. simplex*) em extratos de pele de *Melanophryniscus* indica que a presença de um alcalóide no ambiente (disponibilidade) não significa que este será necessariamente sequestrado por algum indivíduo desta espécie (neste caso).

A capacidade de sequestro de alguns dos alcalóides disponíveis no ambiente parece estar relacionada a características genéticas de cada espécie e de cada indivíduo (Daly et al., 1994a; Saporito et al., 2011). Porém esta hipótese ainda não foi satisfatoriamente testada. Hipóteses filogenéticas podem também explicar o “não sequestro” de alcalóides em linhagens de sapos que contém alcalóides. Algumas linhagens de anuros dentro da família Dendrobatidae não sequestram substâncias tóxicas, demonstrando que esta capacidade parece evoluir independentemente em alguns grupos (Grant et al., 2006, 2007).

Em pelo menos uma espécie de *Melanophryniscus* foram detectados alcalóides em níveis muito baixos (Colombo et al. dados não publicados), indicando que podem haver espécies, dentro do gênero, com baixa ou nenhuma capacidade de sequestro de alcalóides.

Existe variação na composição de alcalóides das amostras de invertebrados tanto entre diferentes microambientes quanto entre diferentes áreas. As diferenças entre o padrão de ocorrência de alcalóides encontrados nas amostras de invertebrados analisadas indica que estas substâncias não estão distribuídas de maneira homogênea entre os microambientes e áreas amostrados. Mesmo não tendo avaliado o padrão de distribuição espacial dos alcalóides de invertebrados nas quatro áreas de 1 ha amostradas, mas considerando que as amostras foram coletadas com um espaçamento de três metros entre elas, podemos inferir que a distribuição espacial dos alcalóides pode variar em um curto espaço. Este fato é evidenciado pela baixa frequência de ocorrência da maioria dos alcalóides detectados (Fig. 5). Além disso, a ocorrência, a abundância e a distribuição de invertebrados de solo como ácaros, formigas, aranhas, besouros, entre outros, é influenciada por fatores como temperatura, umidade do solo, ph do solo, tipo de vegetação e estação do ano (Lieberman and Dock, 1982; Levings, 1983; Levings and Windsor, 1984; Clapperton et al., 2002; Duarte, 2004; Bedano et al., 2005; Rochefort et al., 2006). A variação na abundância de artrópodes também pode ocorrer em uma escala geográfica relativamente pequena em função da mudança, por exemplo, de umidade em determinados locais no interior de uma floresta tropical (Levings, 1983).

É razoável imaginar que invertebrados que contém alcalóides também respondam a estas variações evidenciado aqui pela distribuição diferenciada dos alcalóides entre as amostras provenientes de diferentes microambientes e/ou áreas. Saporito et al. (2007b) indica que em algumas áreas da Costa Rica e Panamá artrópodes que

contém alcalóides não estão uniformemente distribuídos em determinadas áreas e Daly et al. (2002) sugere que a distribuição destes artrópodes pode estar restrita a pequenas áreas, influenciada por migrações pontuais e localizadas de algumas espécies.

Estas variações na ocorrência e conseqüentemente na disponibilidade de presas que contém alcalóides é uma das explicações mais aceitas para a variação no perfil de alcalóides, tanto espaço quanto temporal, em anuros que contém alcalóides (Saporito et al., 2006, 2007a, b, 2009; Daly et al., 2008b).

A frequência de ocorrência de alcalóides no ambiente, encontrada neste estudo, pode se considerada baixa. Alcalóide algum foi encontrado em mais de 10% das amostras de invertebrados (Fig. 5), indicando a raridade de certos invertebrados que contém alcalóides. Clark et al. (2006) sugere que alguns artrópodes que contem alcalóides sejam raros, podendo determinar variações individuais no perfil destes compostos em populações de sapos que contém alcalóides (neste caso anuros do gênero *Mantella*).

Além das diferenças observadas na distribuição e na frequência de alcalóides nas amostras de invertebrados, existe variação na composição de alcalóides entre as amostras de pele de indivíduos de *M. simplex* das quatro áreas amostradas. Como foi mencionado anteriormente a variação detectada nos anuros pode ser resultado da variação da disponibilidade de artrópodes que contém alcalóides (Clark et al., 2006, Saporito et al., 2006, 2007a, b; Daly et al., 2008b). Porém, neste estudo, o padrão de variação dos alcalóides das amostras de anfíbios não foi coincidente com o padrão de variação dos alcalóides presentes nas amostras de invertebrados.

Em anfíbios que contém alcalóides a retenção destes compostos pode acontecer por um período longo de tempo (4 anos) (Daly et al., 1994b) além disso muitas presas fontes de alcalóides não estão necessariamente presentes todo o ano na dieta de alguns destes anfíbios (Bonansea and Vaira, 2007), portanto um anuro que sequestra alcalóides pode sequestrá-lo de uma presa que contém alcalóides disponível em uma determinada época do ano e permanecer com este alcalóide por um longo período de tempo. O padrão de forrageamento destas espécies de anfíbios também poderia ser uma hipótese razoável para explicar as diferenças de variação encontradas aqui. É fácil imaginarmos sapos alimentando-se de presas distribuídas em aglomerados (como em um formigueiro, por exemplo), certamente se levarmos em consideração que algumas presas que contém alcalóides tenham este padrão de distribuição, os sapos sequestrariam uma quantidade considerável de alcalóides em um curto período de tempo. Variações na dieta, entre indivíduos de diferentes sexos, idades e com distribuição geográfica distinta podem ser observadas em sapos que contém alcalóides (Donnelly, 1991, Hantak et al., dados não publicados). Mesmo com evidências de que existe variação espacial entre invertebrados que contém alcalóides nos microambientes e áreas amostradas há que se considerar outros fatores. Assim como em sapos que contém alcalóides podem ser observadas variações na presença destas substâncias entre indivíduos da mesma espécie de artrópodes que contém alcalóides (Saporito et al., 2004, 2007b) não tornando esses alcalóides disponíveis da mesma maneira entre as amostras de invertebrados. O método de coleta de artrópodes pode ser um limitante para a detectabilidade de muitas potenciais presas de sapos que contém alcalóides e conseqüentemente dos

alcalóides que estas presas possam ter (Daly et al., 1994b). Possivelmente o método empregado neste trabalho não foi efetivo para amostrar a grande maioria dos alcalóides presentes em indivíduos de *M. simplex*. Mesmo assim os dados aqui apresentados são uma importante evidência da relação entre a variação da disponibilidade de alcalóides no ambiente e *M. simplex*, pois parece clara a importância de determinados microambientes para o sequestro da defesa química deste pequeno anuro. Porém existem lacunas no estudo deste aspecto da defesa química de *M. simplex* e das espécies de *Melanophryniscus* em geral. Ainda não foram determinadas as fontes específicas de alcalóides para os sapos deste gênero, portanto não há como estabelecer precisamente as relações destas com o meio. Este é um dos fatores fundamentais para o entendimento de aspectos da história natural de *Melanophryniscus* e outros anuros que dependam em parte ou exclusivamente da ingestão de artrópodes que contem alcalóides para proteção contra predadores e agentes patogênicos.

REFERÊNCIAS

- BEDANO, J. C., CANTÚ, M. P., and DOUCET, M. E. 2005. Abundance of soil mites (Arachnida: Acari) in a natural soil of central Argentina. *Zool. Stud.* 44:505-512.
- BOKERMAN, W. C. A. 1967. Observações sobre *Melanophryniscus moreirae* (Mir. Rib.) (Amphibia-Brachycephalidae). *An. Acad. Bras. de Cienc.* 39:301-306.
- BONANSEA, M. I., and VAIRA, M. 2007. Geographic variation of the diet of *Melanophryniscus rubriventris* (Anura: Bufonidae) in northwestern Argentina. *J. Herpetol.* 41:231-236.
- CLAPPERTON, M. J., KANASHIRO, D. A., and BEHAN-PELLETIER, V. M. 2002 Changes in abundance and diversity of microarthropods associated with Fescue Prairie grazing regimes. *Pedobiologia* 46:496-511.
- CLARK, V. C., RAKOTOMALALA, V., RAMILJAONA, O., ABRELL, L., and FISHER, B. L. 2006. Individual variation in alkaloid content of poison frogs of Madagascar (*Mantella*; Mantellidae). *J. Chem. Ecol.* 32:2219-2233.
- DALY, J. W. 1995. The chemistry of poisons in amphibian skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:9-13.

DALY, J. W. and MYERS, C. W. 1967. Toxicity of Panamanian poison frogs (*Dendrobates*): some biological and chemical aspects. *Science* 156:970–973.

DALY, J. W., MYERS, C. W., and WHITTAKER, N. 1987. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the amphibian. *Toxicon* 25:1023–1095.

DALY, J. W., SECUNDA, S., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., WISNIESKI, A., and COVER, J. F. Jr. 1994a. An uptake system for dietary alkaloids in poison frogs (Dendrobatidae). *Toxicon* 32:657–663.

DALY, J. W., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., JARAMILLO, C., and RAND, S. A. 1994b. Dietary source for skin alkaloids of poison frogs (Dendrobatidae)? *J. Chem. Ecol.* 20:943–955.

DALY, J. W., ANDRIAMAHARAVO, N. R., ANDRIANTSIFERANA, M., and MYERS, C. W. 1996. Madagascan poison frogs (*Mantella*) and their skin alkaloids. *Am. Mus. Novit.* 3177:1–34.

DALY, J. W., KANEKO, T., WILHAM, J., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., ESPINOSA, A., and DONNELLY, M. A. 2002. Bioactive alkaloids of frog skin: combinatorial bioprospecting reveals that pumiliotoxins have an arthropod source. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:13996–14001.

DALY, J. W., SPANDE, T. F., and GARRAFFO, H. M., 2005, Alkaloids from amphibian skin: a tabulation of over eight-hundred compounds. *J. Nat. Prod.* 68:1556-1575.

DALY, J. W., WILHAM, J. M., SPANDE, T. F., GARRAFFO, H. M., GIL, R. R., SILVA, G. L., and VAIRA, M. 2007. Alkaloids in bufonid toads (*Melanophryniscus*): temporal and geographic determinants for two Argentinian species. *J. Chem. Ecol.* 33:871–887.

DALY, J. W., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., YEH, H. J. C., PELTZER P. M., CACIVIO, P. M., BALDO, J. D. and FAIVOVICH, J. 2008a. Indolizidine 239Q and quinolizidine 275I. Major alkaloids in two Argentinian bufonid toads (*Melanophryniscus*). *Toxicon* 52:858–870.

DALY, J. W., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., GIDDINGS, L. A., SAPORITO, R. A., VIEITES, D. R., and VENCES, M. 2008b. Individual and geographic variation of skin alkaloids in three species of Madagascan poison frogs (*Mantella*). *J. Chem. Ecol.* 34:252–279

DALY, J. W., WARE, N., SAPORITO, R. A., SPANDE, H. M., and GARRAFFO, H. M. 2009. N-Methyldecahydroquinolines: an unexpected class of alkaloids from Amazonian poison frogs (Dendrobatidae). *J. Nat. Prod.* 72:1110–1114.

DONNELLY, M. A. 1991. Feeding patterns of the strawberry poison frog, *Dendrobates pumilio* (Anura: Dendrobatidae). *Copeia* 3:723–730.

DUARTE, M. M. 2004. Abundância de microartrópodes do solo em fragmentos de mata com araucária no sul do Brasil. *Iheringia, Zool.* 94:163-169.

FILIPELLO, A. N., and CRESPO, F. A. 1994. Alimentacion en *Melanophryniscus stelzneri* (Anura: Bufonidae). *Cuad. Herpetol.* 8:18-24.

GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., DALY, J. W., BALDESSARI, A., and GROS, E. G. 1993. Alkaloids from bufonid toads (*Melanophryniscus*): decahydroquinolines, pumiliotoxins and homopumiliotoxins, indolizidines, pyrrolizidines, and quinolizidines. *J. Nat. Prod.* 56:357-373.

GRANT, T. 2007. A new, toxic species of *Colostethus* (Anura: Dendrobatidae: Colostethinae) from the Cordillera Central of Colombia. *Zootaxa* 1555:39-51.

GRANT, T., FROST, D. R., CALDWELL, J. P., GAGLIARDO, R., HADDAD, C. F. B., KOK, P. J. R., MEANS, B. D., NOONAN, B. P., SCHARGEL, W. E., AND WHEELER, W. C. 2006. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Anura: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bull Amer Mus Nat Hist* 299:1-262.

HAMMER, O., HARPER, D. A. T., AND RYAN, P. D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* 4:1-9.

JONES, T. H., GORMAN, J. S. T., SNELLING, R. R., DELABIE, J. H. C., BLUM, M. S., GARRAFFO, H. M., JAIN, P., DALY, J. W., and SPANDE, T. F. 1999. Further alkaloids common to ants and frogs: decahydroquinolines and a quinolizidine. *J. Chem. Ecol.* 25:1179–1193.

LEVINGS, S. C., 1983. Seasonal, annual, and among site variation in the ground ant community of a deciduous tropical forest: some causes of patchy species distributions. *Ecol. Monogr.* 53:(4) 435–455.

LEVINGS, S. C., WINDSOR, D. M., 1984. Litter moisture content as a determinant of litter arthropod distribution and abundance during the dry season on Barro Colorado Island, Panama. *Biotropica* 16:(2) 125–131.

LIEBERMAN, S. S. and DOCK, C. F., 1982. Analysis of the leaf litter arthropod fauna of a lowland tropical evergreen forest site (La Selva, Costa Rica). *Rev. Biol. Trop.* 30:27–34.

MEBS, D., POGODA, W., MANEYRO, R., and KWET, A. 2005. The alkaloid composition of the poisonous skin secretion of the red bellied toad, *Melanophryniscus montevidensis* (Anura, Bufonidae), from Uruguay. *Toxicon* 46:641-650.

MEINWALD, J., SMOLANOFF, J., MCPHAIL, A. T., MILLER, R. W., EISNER, T., and HICKS, K. 1975. Nitropolyzonamine: a spirocyclic nitro compound from the defensive glands of a millipede (*Polyzonium rosalbum*). *Tetrahedon Lett.* 28:2367–2370.

MOORE, B. P., and BROWN, W. V. 1978. Precocinelline and related alkaloids in the Australian soldier beetle, *Chauliognathus pulchellus* (Coleoptera: Cantharidae). *Insect Biochem.* 8:393-9.

OLSON, D. M., DINERSTEIN, E., WIKRAMANAYAKE, E. D., BURGESS, N. D., POWELL, G. V. N., UNDERWOOD, E. C., D'AMICO, J. A., ITOUA, I., STRAND, H. E., MORRISON, J. C., LOUCKS, C. J., ALLNUTT, T. F., RICKETTS, T. H., KURA, Y., LAMOREUX, J. F., WETTENGEL, W. W., HEDAO, P., and KASSEM, K. R. 2001. Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth. *BioScience* 51:933-938.

Pillar, V. D. 2006. Multiv: software para análise multivariada, auto-reamostragem bootstrap e testes de aleatorização. Porto Alegre, Departamento de Ecologia, UFRGS. disponível em <<http://ecoqua.ecologia.ufrgs.br/arquivos/Software/MULTIVMinor/>>.

RITTER, F. J., and PERSOONS C. J. 1975 Recent developments in insect pheromone research in particular in The Netherlands. *Neth. J. Zool.* 25:261-275.

ROCHFORT, S., THERRIEN, F., SHETLAR, D. J., and BRODEUR, J. 2006. Species diversity and seasonal abundance of Collembola in turfgrass ecosystems of North America. *Pedobiologia* 50:61-68.

SANTOS, R. R. and GRANT, T. 2011. Diel Pattern of Migration in a Poisonous Toad from Brazil and the Evolution of Chemical Defenses in Diurnal Amphibians. *Evol. Ecol.* 25:249-258.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., HOFFMAN, R. L., GARRAFFO, H. M., and DALY, J. W. 2003. A siphonotid millipede (*Rhinotus*) as the source for the spiropyrrolizidine oximes of dendrobatid frogs. *J. Chem. Ecol.* 9:2781-2786.

SAPORITO, R. A., GARRAFFO, H. M., DONNELLY, M. A., EDWARDS, A. L. LONGINO, J. T., and DALY, J. W. 2004. Formicine ants: an arthropod source for the pumiliotoxin alkaloids of dendrobatid poison frogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:8045-8050.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., and DALY, J. W. 2006. Geographic and seasonal variation in alkaloid-based chemical defenses of *Dendrobates pumilio* from Bocas del Toro, Panamá. *J. Chem. Ecol.* 32:795-814.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., NORTON, R. A., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., and DALY, J. W. 2007a. Oribatid mites as a major dietary source for alkaloids in poison frogs. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 104:8885–8890.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., JAIN, P., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., and DALY, J. W. 2007b. Spatial and temporal patterns of alkaloid variation in the poison frog *Oophaga pumilio* in Costa Rica and Panama over 30 years. *Toxicon* 50:757–778.

SAPORITO, R. A., SPANDE, T. F., GARRAFFO, H. M., and DONNELLY, M. A. 2009. Arthropod alkaloids in poison frogs: a review of the “dietary hypothesis”. *Heterocycles* 79: 277–297.

SAPORITO, R. A., ISOLA, M., MACCACHERO, V. C., CONDON, K., and DONNELLY, M. A. 2010a. Ontogenetic scaling of poison glands in a dendrobatid frog. *J. Zool.* 282:238–245.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., SPANDE, T. F., and GARRAFFO, H. M. 2011. A review of chemical ecology in poison frogs. *Chemoecology* DOI 10.1007/s00049-011-0088-0

WOODHEAD, C., VENCES, M., VIEITES, D. R., GAMBONI, I., FISHER, B. L. and GRIFFITHS, R. A. 2007. Specialist or generalist? Feeding ecology of the Malagasy poison frog *Mantella aurantiaca*. *Herpetol. J.* 17:(4)225-236.

7. CAPÍTULO III

Varição do perfil de alcalóides entre fêmeas e machos do sapo-de-barriga-vermelha
Melanophryniscus simplex (Caramaschi e Cruz, 2002) (Bufonidae)

Patrick Colombo^{1*}

Ralph Saporito²

Laura Verrastro³

Taran Grant⁴

*1 Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Instituto de Biociências, Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul Avenida Ipiranga 6681, 90619-900, Porto
Alegre, RS, Brazil*

2 John Carroll University, Department of Biology, University Heights, Ohio, 44118, USA

*3 Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, 91540-000,
Porto Alegre, RS, Brazil*

*4 Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, C.P.
11461, 05422-970, São Paulo, SP, Brazil*

* Corresponding author e-mail: patrick_colombo@hotmail.com

Abstract - Red bellied toads of the genus *Melanophryniscus* occur in southern South America and represent one of several lineages of anurans with the ability to sequester defensive alkaloids from a diet of alkaloid-containing arthropods and are presumably used as a chemical defense against predators, parasites and pathogens. The alkaloid diversity present in alkaloid-containing frogs may vary geographically among populations as well as among individuals of the same population. This variation appears to be associated with differences in the availability of alkaloid-containing arthropods. Characterizing patterns of variation of alkaloid diversity in alkaloid-containing frogs is fundamental to understanding predator-prey interactions and the use of food resources by these frogs. Sex related variation in alkaloid diversity has been well documented in dendrobatid and mantellid frogs, but not in *Melanophryniscus*. Herein we report on differences in alkaloid diversity and composition among females and males of *M. simplex* from Atlantic Forest in southern Brazil. We analyzed the alkaloid diversity of 11 females and 25 males from eight populations of *M. simplex*. We found 256 alkaloids distributed in 19 structural classes in skin extracts 36 individuals studied. Both sexes not presented differences in alkaloid diversity and composition, this is not the pattern of other alkaloid-containing frogs. Our results suggest that females and males of *M. simplex* have, at least, similar use of food resources.

Key words – Alkaloid-containing, Atlantic forest, Araucaria forest, Rio Grande do Sul, anura.

INTRODUÇÃO

Uma das características mais notáveis de alguns grupos de anfíbios anuros é a capacidade de sequestrar da dieta alcalóides lipofílicos para proteção contra predadores e agentes patogênicos (e.g. Daly et al., 1995, 2005; Saporito et al., 2011). A diversidade de alcalóides (riqueza, composição e abundância) presentes em sapos que contém alcalóides pode variar entre indivíduos de uma mesma população bem como entre populações de uma mesma espécie (e.g. Daly et al., 1992, 2007, 2008a; Mebs et al., 2005; Clark et al., 2006; Saporito et al., 2006, 2007a). Esta variação está associada a diferenças na disponibilidade, tanto no espaço quanto no tempo, de artrópodes que contém alcalóides e que são potenciais presas de sapos que contém alcalóides (Saporito et al., 2006, 2007a, b; Daly et al., 2008a, b). A variação individual no perfil de alcalóides é marcante entre indivíduos de uma mesma população de espécies de anuros que sequestram alcalóides, alguns destes indivíduos podem possuir quantidades relativamente grandes de alguns alcalóides e outros, quantidades pequenas e até mesmo a ausência destes mesmos alcalóides (e.g. Clark et al., 2006; Saporito et al., 2006, 2007a, 2011; Daly et al., 2007). Existem evidências de que estes compostos são acumulados ao longo da vida de um anuro que contém alcalóides, estudos realizados com sapos da família Dendrobatidae demonstram que juvenis possuem quantidades menores de alcalóides quando comparados a indivíduos adultos (Daly et al., 2002; Myers et al., 1978) sugerindo que a idade é um importante fator na variação do perfil de alcalóides em sapos que contém alcalóides (Saporito et al., 2010a, b). Além da diferença no perfil de alcalóides entre idades, também tem sido

demonstrado diferenças no perfil de alcalóides entre indivíduos de sexos diferentes (Saporito et al. 2007a, 2010a; Myers et al. 1995). Estas diferenças foram detectadas em sapos que contém alcalóides das famílias Mantellidae e Dendrobatidae (Daly et al., 2008a; Andriamaharavo et al., 2010; Saporito et al., 2010a). Em outras linhagens de anuros que contém alcalóides, incluindo as espécies do gênero *Melanophryniscus*, este aspecto da variação da defesa química ainda não foi estudado. Daly et al., (2007) demonstraram variação geográfica no perfil de alcalóides em *Melanophryniscus rubriventris*, mas apesar de naquele estudo serem incluídos indivíduos fêmeas e machos nas análises não são testadas eventuais diferenças no perfil de alcalóides entre os sexos. A caracterização do padrão de variação do perfil de alcalóides de sapos que sequestram alcalóides é uma importante ferramenta para o entendimento de aspectos da ecologia/história natural (como por exemplo, interações entre predador e presa, uso de habitat e o uso de recursos alimentares) destes anuros.

Os objetivos deste trabalho são: a) determinar o perfil de alcalóides de fêmeas e machos de *Melanophryniscus simplex* e b) testar se existem diferenças do perfil de alcalóides entre machos e fêmeas de *M. simplex*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de sapos Foram coletados 36 indivíduos adultos de *Melanophryniscus simplex*, 11 fêmeas e 25 machos (PC 0183, 0184, 0186, 0189, 0190, 0191, 0194, 0197, 0198, 0200, 0210, 0212, 0216, 0217, 0222, 0223, 0225, 0227, 0228, 0527, 0532, 0540, 0541, 0516-0518, 0526, 0531, MEL 0006, 0007, 0009, 0010, 0011 e MCP 11929).

Estes indivíduos foram capturados em oito localidades no sul do Brasil, entre os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Fig. 1) como segue: Gateados AC32 (município de Campo Belo do Sul, Santa Catarina, coordenadas 27°59'50.4" S e 50°53'59.4" O), coletados em oito de setembro de 2009; Gateados AC34 (Campo Belo do Sul, Santa Catarina, 27°59'39.9" S e 50°53'31.4" O), coletados em oito de setembro de 2009; Gateados AD23 (Campo Belo do Sul, Santa Catarina, coordenadas 28°01'29.7" S e 50°50'33.0" O), coletados em setembro de 2009; Gateados AD25 (Campo Belo do Sul, Santa Catarina, coordenadas 28°02'05.6" S e 50°51'08.3" O), coletados em 27 de outubro de 2008; Gateados AD22 (Campo Belo do Sul, Santa Catarina coordenadas 28°02'17.1" S e 50°51'31.3" W), coletados em setembro de 2009; Bomjesus AD62 (Município de Bom Jesus, Rio Grande do Sul, coordenadas 28°16'21.4" S e 50°42'29.4" O), coletados em 20 de agosto de 2009; Bomjesus AD61 (Bom Jesus, Rio Grande do Sul, coordenadas 28°16'28.1" S e 50°42' 42.9" O), coletados em 19 de agosto de 2009 e Novaroma (Município de Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul coordenadas 28°59'19.8" S and 51°23'58.1" O) coletados em 07 de fevereiro de 2010. As distâncias entre cada localidade estão incluídas na legenda da Fig. 1. Duas ecorregiões abrangem as localidades de estudo, a Floresta Úmida de Araucária (*Araucaria Moist Forest*) e a Floresta Atlântica do Alto Paraná (*Alto Paraná Atlantic Forest*) seguindo a classificação de Olson et al. (2001). Os anuros foram capturados manualmente sem auxílio de equipamentos nos seus sítios reprodutivos, pequenos e rasos riachos temporários, formados após fortes chuvas. Após a captura os indivíduos foram levados para laboratório onde tiveram seu comprimento rostro-cloacal tomado, com auxílio de um paquímetro com precisão de 0.1 mm, pesados utilizando-se uma

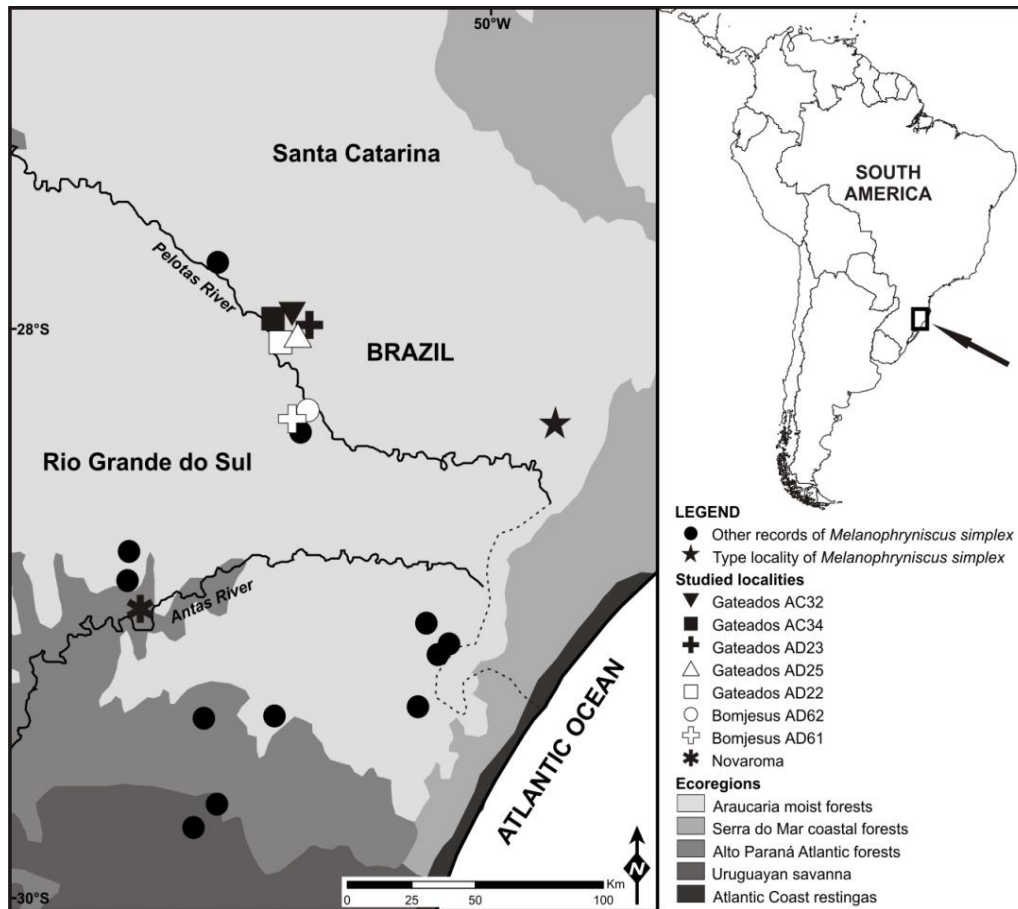


Figura 1 – Mapa com as áreas de onde foram retiradas as amostras de pele de indivíduos fêmeas e machos de *Melanophryniscus simplex*. A flecha preta (à direita) indica a área do mapa da América do Sul aumentada (à esquerda). As ecorregiões foram delimitadas segundo Olson et al. (2001). A distância linear entre as áreas de estudo são: Gateados AC32 a Gateados AC34 – 0.83 km; Gateados AC32 a Gateados AD23 – 5.93 km; Gateados AC32 a Gateados AD25 – 5.92 km; Gateados AC32 a Gateados AD22 – 5.85 km; Gateados AC32 a Bomjesus AD62 – 35.73 km; Gateados AC32 a Bomjesus AD61 – 35.73 km; Gateados AC32 a Novaroma – 120.89 km; Gateados AC34 a Gateados AD23 – 6.41 km; Gateados AC34 a Gateados AD25 – 6.23 km; Gateados AC34 a Gateados AD22 – 6.06 km; Gateados AC34 a Bomjesus AD62 – 35.85 km; Gateados AC34 a Bomjesus AD61 – 35.83 km; Gateados AC34 a Novaroma – 120.28 km; Gateados AD23 a Gateados AD25 – 1.46 km; Gateados AD23 a Gateados AD22 – 2.16 km; Gateados AD23 a Bomjesus AD62 – 30.45 km; Gateados AD23 a Bomjesus AD61 – 30.41 km; Gateados AD23 a Novaroma – 119.94 km; Gateados AD25 a Gateados AD22 – 0.72 km; Gateados AD25 a Bomjesus AD62 – 29.91 km; Gateados AD25 a Bomjesus AD61 – 29.92 km; Gateados AD25 a Novaroma – 118.52 km; Gateados AD22 a Bomjesus AD62 – 29.90 km; Gateados AD22 a Bomjesus AD61 – 29.90 km; Gateados AD22 a Novaroma – 117.92 km; Bomjesus AD62 a Bomjesus AD61 – 0.42 km; Bomjesus AD62 a Novaroma – 104.23 km e Bomjesus AD61 a Novaroma 103.87 km

balança com 0.1 g de precisão e sexados examinando-se caracteres sexuais secundários e gônadas. Logo a seguir os sapos foram anestesiados, congelados e a pele inteira retirada. Cada pele foi acondicionada individualmente em recipientes de vidro com tampa plástica, revestida por Teflon® (parte interna) e volume de 4 ml contendo metanol 100% . Para reduzir a chance de contaminação cruzada de cada amostra, todo o material utilizado para a retirada das peles era limpo com metanol 100%. Espécimes testemunho (carcaças) foram depositados na Coleção de Anfíbios e Répteis do Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCP) e na Coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Análises químicas O método para extração e isolamento dos alcalóides das 36 peles de sapos retiradas seguiu o protocolo elaborado por Daly et al. (1994) e modificado por Saporito et al. (2010b) como descrito a seguir. Os alcalóides da solução obtida das peles de sapos foram extraídos da seguinte maneira: para cada pele (indivíduo) foi adicionado 10 µL de solução de nicotina a 99% (padrão interno, usado para quantificação dos alcalóides) e 50 µL de HCl 1 N para cada 1 mL da solução de metanol com a pele. Esta solução foi concentrada para o volume de 100 µL com N₂ e logo após diluída com 200 µL de água destilada. Esta solução foi enxaguada quatro vezes, cada vez com 300 µL de hexano. À fração de HCl resultante foi adicionado NaHCO₃ saturado (para tornar a solução básica) e em seguida enxaguada três vezes, cada vez com 300 µL de acetato de etila. Os extratos obtidos das soluções provenientes das amostras de peles foram analisados através de cromatografia gasosa conjugada com

espectrometria de massa (GC-MS) utilizando-se um cromatógrafo da marca Varian modelo *Saturn 2100T ion trap MS* com uma coluna cromatográfica de sílica marca Varian modelo *3900 GC Varian Factor Four VF-5ms* com 30 m x 0.25 mm (diâmetro interno). A separação dos alcalóides foi alcançada utilizando uma programação de amplitude de temperatura de 100 a 280°C a uma taxa de 10°C por minuto, com gás He como gás carreador (1 mL/min). Analisamos cada fração de alcalóides através de impacto eletrônico e ionização química (metanol como gás reagente da ionização química). Posteriormente os alcalóides foram identificados com base na comparação dos tempos de retenção, dos espectros de massa e da massa molecular, com os dados de mais de 800 alcalóides já conhecidos e identificados grupos de sapos que contém alcalóides (e.g., Daly et al., 2005). Para determinar a composição e a quantidade de alcalóides em cada amostra de pele de sapos os cromatogramas obtidos foram cuidadosamente varridos em busca de alcalóides. Os compostos foram quantificados comparando a área de cada pico de cada substância com a área do pico do padrão interno de nicotina (padrão escolhido em razão do tempo de retenção deste não coincidir com o tempo de retenção da maioria dos alcalóides encontrados em anuros). A quantidade do padrão nicotina em cada solução final corresponde a 10 µg. Nas amostras de pele consideramos somente os compostos presentes em uma quantidade superior a 0.1 µg. Utilizamos o programa computacional *Varian MS Workstation v.6.9 SPI* para as análises dos cromatogramas. Os alcalóides encontrados em sapos que contém alcalóides são identificados por códigos que consistem em um número que corresponde a massa nominal do alcalóide seguido de uma letra, distinguindo alcalóides com a mesma massa (Daly et al., 2005). Para identificar e diferenciar novos

alcalóides (novos compostos) utilizamos um código contendo primeiro a massa nominal seguido da palavra “Mel” entre parênteses seguida de uma única letra. Os compostos correspondentes a novos isômeros de alcalóides já conhecidos foram identificados com a palavra “Isômero” seguida do símbolo “#” e de um número identificando cada isômero entre parênteses.

Análises estatísticas Para visualizar a frequência de ocorrência de alcalóides entre fêmeas e machos, distribuimos os alcalóides em quatro categorias de ocorrência, como segue: raro (alcalóide presente em mais de 0 e menos de 25% das amostras), incomum (presente em mais de 25 e menos de 50%), comum (presente em mais de 50% e menos de 75%) e muito comum (presente em mais de 75% das amostras). Para a comparação entre os perfis de alcalóides de indivíduos fêmeas e machos de *Melanophryniscus simplex* utilizamos uma análise de variância via testes de aleatorização entre unidades amostrais, neste caso cada indivíduo de *M. simplex*, seguindo os procedimentos descritos em Pillar (2006). Esses testes foram realizados utilizando o programa MULTIV 2.4 (Pillar, 2006). Para visualizar o padrão de variação dos perfis e da composição de alcalóides entre os sexos utilizamos gráficos nMDS (*non-metric multidimensional scaling*) gerados no programa PRIMER-E versão 6. Utilizamos como medida de similaridade a distância de corda para a execução das destas duas análises. Foram também contruídas curvas de rarefação baseadas na quantidade de alcalóides de indivíduos fêmeas e machos para comparação da riqueza de alcalóides entre os dois sexos, utilizando-se o programa PAST (Hammer et al., 2001). Para todos os testes utilizamos um nível de significância estatístico de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Entre os 36 indivíduos (11 fêmeas e 25 machos) analisados foram encontrados 256 alcalóides divididos em 19 classes estruturais (Tabela 1). Nas fêmeas foram detectados 157 alcalóides enquanto que nos machos este número alcançou 218 compostos (Tabela 1). A média do número de alcalóides entre as 11 fêmeas foi de 46, atingindo o mínimo de 36 e o máximo de 56 substâncias. A média do número de alcalóides nos machos foi de 38, o número mínimo de 6 e o máximo de 61. Em relação à abundância de alcalóides as fêmeas apresentaram uma quantidade total de 3304.9 μg e média de 323.7 μg , variando de 73.9 até 508.2 μg . Os machos apresentaram uma abundância total de 7170.6 μg de alcalóides, média de 286.8 μg , mínimo de 1.4 e máximo de 980.9 μg . Todos estes dados podem ser visualizados na Tabela 2. Nas fêmeas encontramos 38 alcalóides exclusivos, nos machos 99 e os 119 compostos restantes são compartilhados entre os sexos (Fig. 2). A abundância dos alcalóides exclusivos de ambos os sexos corresponde a uma fração relativamente pequena da abundância total de alcalóides observados, 0.6% (21.7 μg) nas fêmeas e 5.6% (402.0 μg) nos machos. Ainda em relação à abundância total de alcalóides em ambos os sexos, somente três compostos (o que corresponde a 1.9% nas fêmeas e 1.4% nos machos) contribuem com mais de 75% da abundância total de alcalóides encontrados. Estas substâncias são as pumiliotoxinas (PTX) 251D e 251(Mel)A e a 3,5-pirolizidina disubstituída (3,5-P) *cis* 223D.

Tabela 1 -- Alcalóides encontrados em fêmeas e machos de *Melanophryniscus simplex* coletados em oito localidades. Onde: Nãooclass (alcalóides não classificados); 5,8-I (5,8-

indolizidinas dissustituídas); 5,6,8-I (5,6,8- indolizidinas trissustituídas); PTX (pumiliotoxinas); DHQ (decahidroquinolinas); Dehidro 5,8-I (Dehidro-5,8-indolizidinas); 3,5-P (3,5- pirrolizidinas dissustituídas); Pip (piperidinas); I (izidinas); Tricyclic (tricíclicos); 3,5-I (3,5- indolizidinas dissustituídas); SpiroP (spiropirrolizidinas); aPTX (alopumiliotoxinas); Polyzo (polizonimina); OHQ (octahidroquinolinas); CPQ (ciclopentaquinazolinas); hPTX (homopumiliotoxinas); 4,6-Q (4,6- quinolizidinas dissustituídas) e 1,4-Q (1,4- quinolizidinas dissustituídas). O número entre parenteses após do nome da classe é o número de alcalóides na mesma.

Classe de alcalóides	Alcalóides	Abundância (μg)	
		Fêmeas	Machos
Nãoclass (121)	153(Mel)B	0.0	0.3
	181(Mel)A	7.3	5.5
	124(Mel)A	0.0	0.8
	122(Mel)B	0.1	1.1
	195(Mel)B	0.0	0.2
	153(Mel)A	0.0	0.2
	195(Mel)A	0.6	2.7
	122(Mel)A	1.8	2.9
	197(Mel)A	1.2	2.9
	186(Mel)A	0.1	0.0
	195(Mel)C	2.9	0.2
	199B*	0.0	0.3
	223(Mel)A	1.7	0.9
	191(Mel)A	0.0	0.2
	207(Mel)A	0.8	1.8
	179(Mel)C	0.0	0.4
	223T	3.5	6.6
	179(Mel)B	4.3	7.2
	223L*	2.5	0.9
	223L (isômero novo #2)*	0.9	1.4
253M*	1.2	2.9	
237(Mel)N	0.0	129.1	

continuação Tabela -1

Classe de alcalóides	Alcalóides	Abundância (μg)	
		Fêmeas	Machos
Nãooclass (121)	237(Mel)B	0.0	0.2
	223(Mel)J	0.0	0.1
	196(Mel)B	0.3	0.0
	196(Mel)A	0.0	3.2
	219(Mel)B	0.6	0.6
	227(Mel)B	0.2	0.0
	211(Mel)B	0.3	0.0
	241B*	0.1	0.0
	221(Mel)N	0.1	0.0
	237(Mel)M	0.0	0.2
	249(Mel)D	1.4	0.5
	239(Mel)L	0.0	1.1
	239(Mel)E	0.0	0.3
	247(Mel)B	0.0	0.2
	251(Mel)G	0.0	15.4
	251(Mel)C	0.1	0.0
	223(Mel)K	0.0	0.1
	249(Mel)F	0.2	0.0
	249(Mel)C	2.4	9.5
	239(Mel)M	0.0	0.1
	251(Mel)F	0.1	0.0
	233(Mel)A	1.4	2.2
	247(Mel)D	0.0	0.6
	251(Mel)G	0.1	0.0
	237(Mel)M (isômero #2)	0.0	0.7
	265(Mel)I	0.0	0.3
	205(Mel)A	0.0	0.2
	251(Mel)D	0.7	2.5
	265(Mel)C	0.3	1.7
	251(Mel)D (isômero #2)	0.0	0.7
	221(Mel)L	0.0	0.2
	251(Mel)H	0.0	0.2
	239(Mel)M (isômero #2)	0.0	0.1
	209(Mel)B	0.2	1.4
	237(Mel)H	0.3	1.4
	291(Mel)B	0.2	0.7
	239(Mel)I	0.0	0.2

Classe de alcalóides	Alcalóides	Abundância (μg)	
		Fêmeas	Machos
Nãooclass (121)	239(Mel)L (isômero #2)	0.5	0.1
	249P*	1.4	0.2
	247(Mel)A	1.3	6.1
	249P (isômero #2)*	6.2	5.9
	249P (isômero novo #3)	0.0	0.4
	239(Mel)C	0.0	1.6
	265(Mel)Q	0.0	0.1
	265(Mel)P	0.1	0.0
	249P (isômero novo #4)	0.2	0.0
	255(Mel)A	4.0	0.0
	239(Mel)N	0.0	0.2
	268(Mel)C	0.0	0.2
	234(Mel)A	0.4	1.1
	253(Mel)B	0.0	0.1
	57(Mel)B	0.6	0.0
	249(Mel)K	0.9	0.1
	277(Mel)A	0.0	1.2
	279(Mel)A	0.0	0.1
	265(Mel)H	1.0	1.8
	249(Mel)H	0.4	2.4
	249P (isômero novo #5)	0.0	0.3
	249(Mel)L	0.0	0.1
	239(Mel)O	0.0	0.1
	267(Mel)B	0.0	9.0
	265(Mel)M	0.0	2.8
	249(Mel)A	8.4	7.0
	267(Mel)D	19.3	65.3
	251(Mel)H (isômero #2)	0.8	0.0
	221(Mel)O	0.0	0.5
	251(Mel)H (isômero #3)	0.3	0.0
	265(Mel)F (isômero #2)	0.0	0.1
	267(Mel)D (isômero #2)	0.0	1.9
	265(Mel)F	1.1	2.6
	251(Mel)I	0.2	0.0
	263(Mel)D	0.0	0.1
	282(Mel)A	0.0	0.3
	307J	0.0	0.1
	305J*	1.3	3.5

continuação Tabela -1

Classe de alcalóides	Alcalóides	Abundância (μg)	
		Fêmeas	Machos
Nãooclass (121)	286(Mel)A	0.3	0.1
	309(Mel)A	0.0	0.3
	276(Mel)A	0.3	0.4
	263(Mel)C	0.2	0.0
	259(Mel)A	0.0	0.2
	296(Mel)B	0.9	0.1
	283(Mel)A	0.9	0.0
	296(Mel)A	2.0	0.0
	265(Mel)R	2.1	0.0
	296(Mel)B (isômero #2)	0.0	2.4
	57(Mel)A	3.3	6.1
	57(Mel)A (isômero #2)	0.0	0.3
	298(Mel)A	0.1	0.6
	293(Mel)A	1.2	10.3
	295(Mel)A	0.0	3.0
	305(Mel)B	0.0	0.1
	321(Mel)A	0.1	0.0
	295(Mel)B	0.0	0.4
	289(Mel)B	0.0	0.1
	355(Mel)A	0.7	0.1
	297(Mel)A	0.1	0.5
276(Mel)B	0.1	0.0	
380(Mel)A	0.0	2.7	
380(Mel)A (isômero #2)	0.0	0.6	
5,8-I (27)	207A	63.4	91.1
	209S*	3.7	5.7
	223D	0.0	0.1
	221A (isômero novo #3)	6.2	6.7
	223D (isômero #2)*	157.2	148.1
	221A(isômero novo)	4.9	4.6
	223D (isômero #3)*	0.0	185.1
	237D	2.0	1.6
	223D (isômero novo #4)	0.0	0.7
	219F*	0.4	0.7
	217B*	0.0	0.1
	237(Mel)L	11.5	2.3
	237(Mel)L (isômero #2)	1.6	3.7

continuação Tabela -1

Classe de alcalóides	Alcalóides	Abundância (μg)	
		Fêmeas	Machos
5,8-I (27)	249L*	0.2	0.2
	239(Mel)A	17.6	28.8
	239(Mel)A (isômero #2)	0.9	0.9
	268(Mel)B	0.1	0.0
	239G (isômero novo #2)	0.0	0.2
	275(Mel)C	0.0	2.3
	275(Mel)A	0.0	0.1
	273(Mel)C	0.0	0.2
	271(Mel)D	0.0	1.2
	271(Mel)A	4.6	18.6
	271(Mel)C	0.2	0.8
	271(Mel)A (isômero #2)	0.0	1.4
	273(Mel)A	0.6	4.1
	277(Mel)B	0.0	0.2
5,6,8-I (27)	197H	1.0	1.4
	197H (isômero #2)*	0.1	0.2
	223X	44.5	118.8
	237S	2.9	9.2
	237C*	0.0	0.5
	235E	0.0	3.7
	231B	6.8	22.4
	237S (isômero novo #2)	0.0	1.9
	235E (isômero #2)	1.7	1.2
	237D*	0.0	0.4
	231B (isômero #2)*	0.0	1.3
	231B (isômero novo #3)	27.1	41.6
	231B (isômero novo #4)	4.7	8.2
	237(Mel)K	0.0	0.2
	233G	2.4	4.1
	231B (isômero novo #5)	3.3	3.0
	249U*	0.0	0.4
	231K*	1.0	2.9
	245G*	4.6	48.7
	245G (isômero novo #2)	0.2	2.8
237(Mel)C	6.4	9.7	
239Z*	0.1	0.0	
2650*	0.0	0.2	

Classe de alcalóides	Alcalóides	Abundância (μg)	
		Fêmeas	Machos
5,6,8-I (27)	239Z (isômero novo #2)	0.3	0.5
	239Z (isômero novo #3)	0.2	0.0
	281M*	0.2	0.0
	281M (isômero novo #2)	0.4	1.1
PTX (25)	251D	634.5	2533.0
	251(Mel)A	864.9	1310.3
	251(Mel)B	49.4	143.2
	253F*	0.3	3.3
	265G	0.7	1.6
	253F (isômero #2)	0.3	1.8
	253F (isômero novo #3)	0.0	0.5
	265(Mel)L	0.0	0.1
	265D	2.0	2.1
	267C (isômero #2)*	0.3	0.2
	267C	4.2	5.5
	265D (isômero #2)*	0.0	0.6
	303(Mel)A	0.0	0.1
	321A*	0.1	0.0
	307G	0.0	0.1
	305B*	0.0	0.6
	307(Mel)B	0.0	0.3
	305B (isômero novo #2)	0.0	1.1
	309A	0.6	0.6
	319C*	0.1	0.3
	379(Mel)A	7.3	11.6
	321F*	0.0	0.4
	323F*	60.8	83.2
323F (isômero novo #2)	0.7	0.0	
323F (isômero novo #3)	0.3	0.0	
DHQ (13)	<i>cis</i> -223F	2.1	1.0
	<i>trans</i> -223F	14.6	8.2
	5- <i>epi-trans</i> -223F*	1.8	0.3
	223F (isômero novo #4)	15.8	5.3
	223F (isômero novo #5)	4.9	0.9
	223F (isômero novo #6)	26.5	15.0
	<i>trans</i> -249E	1.9	0.7
	249E (isômero novo #2)	5.9	3.2

continuação Tabela -1

Classe de alcalóides	Alcalóides	Abundância (μg)	
		Fêmeas	Machos
DHQ (13)	275B (isômero novo #3)	0.0	0.9
	<i>cis</i> -275B	0.5	0.0
	2- <i>epi-cis</i> -275B*	2.3	0.6
	<i>cis</i> -269AB	0.0	0.5
	<i>trans</i> -269AB	0.2	0.1
Dehidro 5,8-I (7)	221J*	2.0	2.7
	233(Mel)D	0.0	0.2
	233(Mel)F	0.0	0.5
	2210*	0.7	0.2
	249K*	3.7	3.4
	265Y*	13.1	16.1
	265Y (isômero #2)*	0.1	0.0
3,5-P (6)	<i>cis</i> -223B	958.4	1609.9
	<i>trans</i> -223B	0.7	1.2
	<i>cis</i> -251K	0.0	1.3
	2510*	0.6	0.0
	239Y*	0.0	1.5
Pip (5)	223(Mel)I	1.7	3.7
	223(Mel)I (isômero #2)	0.0	0.2
	225I	0.6	0.3
	225(Mel)A	3.3	6.8
	241G*	0.9	1.2
I (5)	211C	4.0	21.4
	223I	0.1	0.0
	211C (isômero novo #2)	0.0	0.2
	229(Mel)A	4.9	10.8
	229(Mel)A (isômero #2)	3.5	6.7
Tricíclicos (5)	221S	0.0	0.2
	193C	0.0	1.3
	221S (isômero novo #2)	0.0	0.1
	221W	0.1	1.0
	237Q*	0.1	0.0
3,5-I (4)	223R	0.3	1.5
	5Z,9E-223AB	109.5	150.9
	223R (isômero novo #2)	1.5	22.0
	239Q	0.1	0.5
SpiroP (3)	222(Mel)B	0.0	1.3

continuação Tabela -1

Classe de alcalóides	Alcalóides	Abundância (μg)	
		Fêmeas	Machos
SpiroP (3)	265(Mel)K	0.0	0.4
	252B	0.0	4.3
aPTX (3)	323J*	0.2	0.0
	325A*	0.1	0.0
	325A (isômero #2)*	0.4	0.2
Polizo (1)**	151B	0.0	0.2
OHQ (1)**	193D	1.0	0.2
CPQ (1)**	249B	2.5	4.8
hPTX (1)	265(Mel)J	1.2	5.0
4,6-Q (1)	275I	4.7	0.0
1,4-Q (1)	293L*	0.1	0.3
TOTAL riqueza	256	157	218
TOTAL exclusivos		38	99

* Alcalóides novos para o gênero *Melanophryniscus* encontrados previamente em outros sapos que contém alcalóides.

** Novas classes de alcalóides para *Melanophryniscus*.

- A consulta para determinar quais eram os compostos novos para o gênero foi realizada em Grant et al. (unpublished data); Daly et al. (1984); Garraffo et al. (1993); Mebs et al. (2005, 2007a, b); Daly et al. (2007, 2008b).

Tabela 2 – Resumo da variação na riqueza e na abundância de alcalóides entre fêmeas e machos de *Melanophryniscus simplex* nas oito populações estudadas

Sexo	Número indivíduos	Riqueza de alcalóides				Abundância de alcalóides (μg)			
		Total	Média	Máximo	Mínimo	Total	Média	Máximo	Mínimo
Fêmeas	11	157	46	56	36	3304.9	323.7	508.2	73.9
Machos	25	217	38	61	6	7170.6	286.8	980.9	1.4

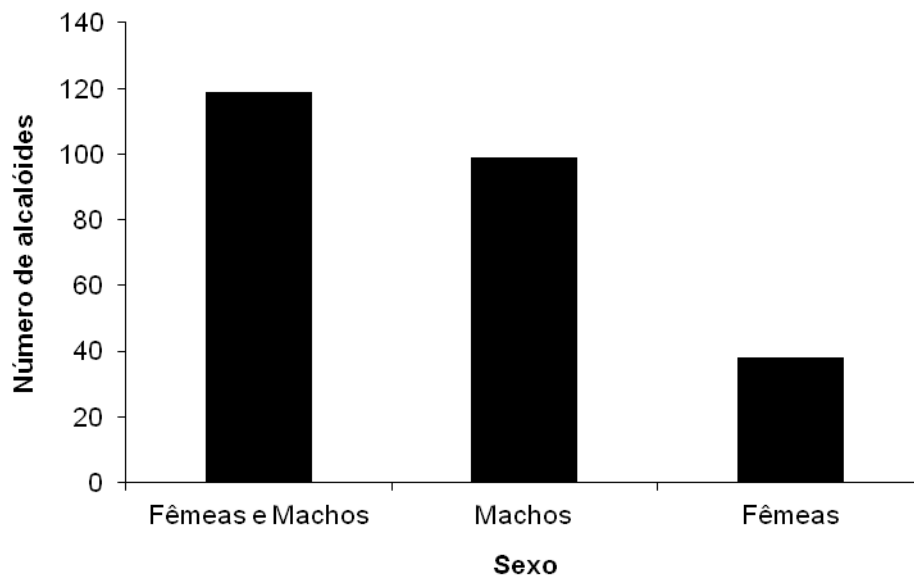


Figura 2 – Número de alcalóides compartilhados e exclusivos entre fêmeas e machos de *Melanophryniscus simplex*.

Fêmeas e machos apresentaram praticamente o mesmo padrão na distribuição de frequências de alcalóides, sendo que em ambos os sexos a maioria (60% nas fêmeas e 78% machos) dos alcalóides pode ser considerada rara, ocorrendo entre zero e 25% das amostras (Fig. 3). Destes alcalóides Nas fêmeas, somente 14 alcalóides foram considerados muito comuns, o Não classificado (Nãoclass) 249P (isômero #2), as 5,8-indolizidinas dissubstituídas (5,8-I) 207A, 209S, 223D (isômero #2), 271(Mel)A e 239(Mel)A, as 5,6,8-indolizidinas trisubstituídas (5,6,8-I) 237(Mel)C, 231B (isômero novo #4) e 223X, as PTXs 267C, 251(Mel)A e 251D, as 3,5-indolizidinas (3,5-I) 5Z,9E-

223AB e a 3,5-P cis 223B. Nos machos seis alcalóides foram assinalados como muito comuns, as 5,8-Is 207A e 223D (isômero #2), as PTXs 251D e 251(Mel), a 3,5-P (3,5-P) cis 223B A e a 5,6,8-I 223X. Outro

A análise de variância via testes de aleatorização revelou que não existem diferenças estatisticamente significantes (considerando $P < 0.05$) na diversidade e composição de alcalóides entre os sexos (Tabelas 3 e 4). As curvas de rarefação entre a riqueza e a abundância de alcalóides também ilustram que não há diferenças nestes parâmetros entre machos e fêmeas (notada pela sobreposição das curvas dos intervalos de confiança)(Fig. 6).

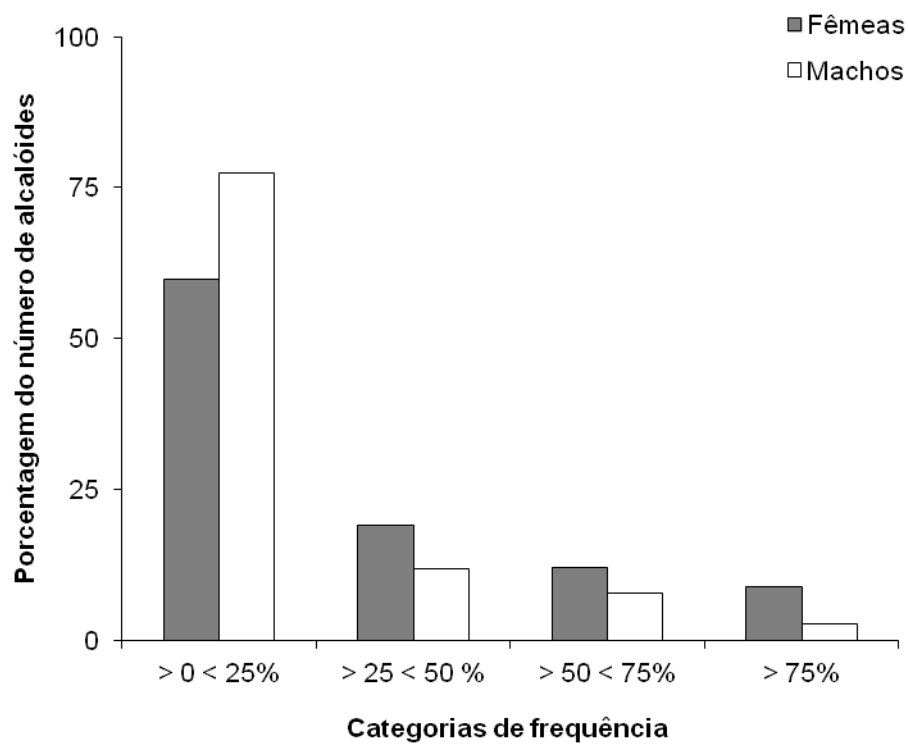


Figura 3 – Categorias de frequência de alcalóides entre fêmeas e machos de *Melanophryniscus simplex* das oito localidades amostradas.

Tabela 3 – Resultados das comparações da composição e abundância de alcalóides entre indivíduos fêmeas e machos de *Melanophryniscus simplex*, onde $P(Q_{bNULL} > = Q_b)$ é o nível de significância do teste estatístico

Fonte de variação	Soma de quadrados (Q)	P(Q_{bNULL} > = Q_b)
Fator sexo:		
Entre grupos	0.269	0.595
Contrastes:		
Fêmeas X Machos	0.269	0.586
Dentro de grupos	13.122	
Total	13.391	

Tabela 4 – Resultados das comparações da riqueza de alcalóides entre indivíduos fêmeas e machos de *Melanophryniscus simplex*, onde $P(Q_{bNULL} > = Q_b)$ é o nível de significância do teste estatístico.

Fonte de variação	Soma de quadrados(Q)	P(Q_{bNULL} > = Q_b)
Fator sexo:		
Entre grupos	0.572	0.430
Contrastes:		
Fêmeas X Machos	0.572	0.422
Dentro de grupos	19.628	
Total	20.200	

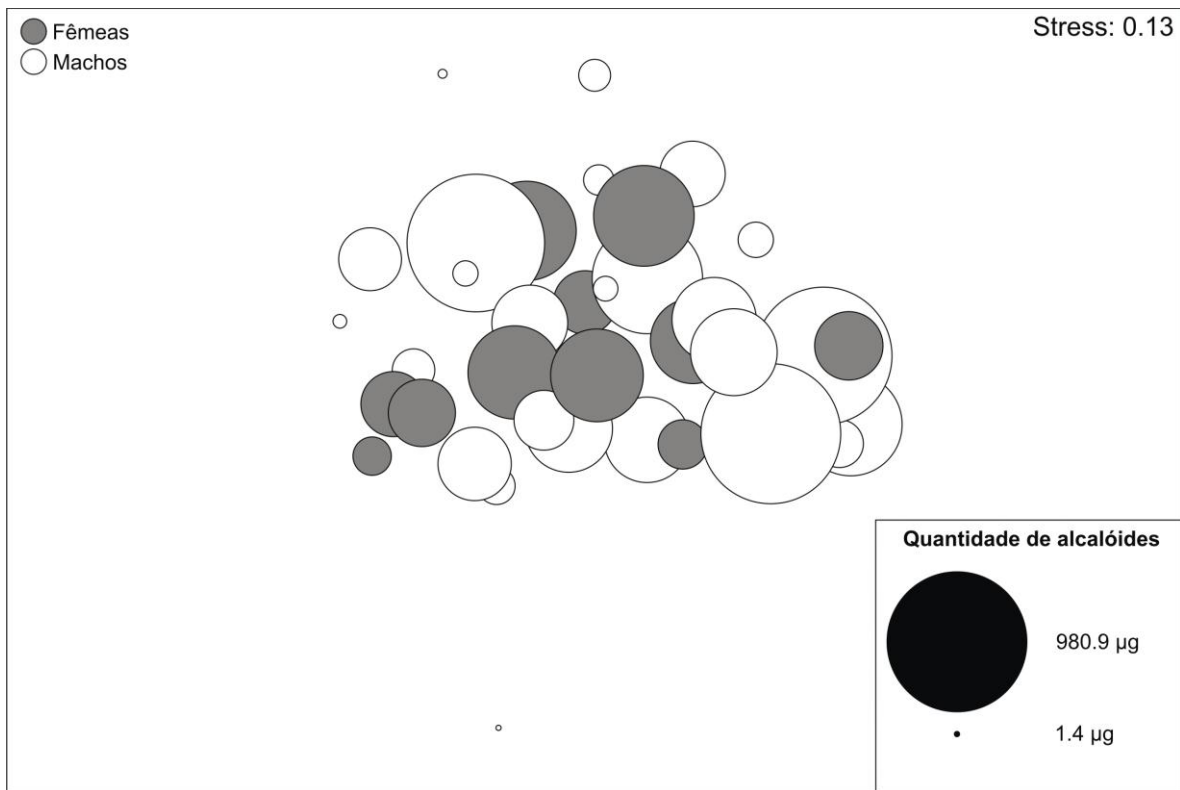


Figura 4 – Gráfico nMDS (*nonmetric multidimensional scaling*) da comparação da diversidade de alcalóides entre fêmeas e machos de *Melanophryniscus simplex* das oito localidades estudadas no sul do Brasil. Cada círculo representa um indivíduo e o tamanho de cada círculo representa a abundância de alcalóides, conforme a legenda inserida no gráfico. A distância entre cada símbolo representa a relação de similaridade da diversidade de alcalóides entre os indivíduos.

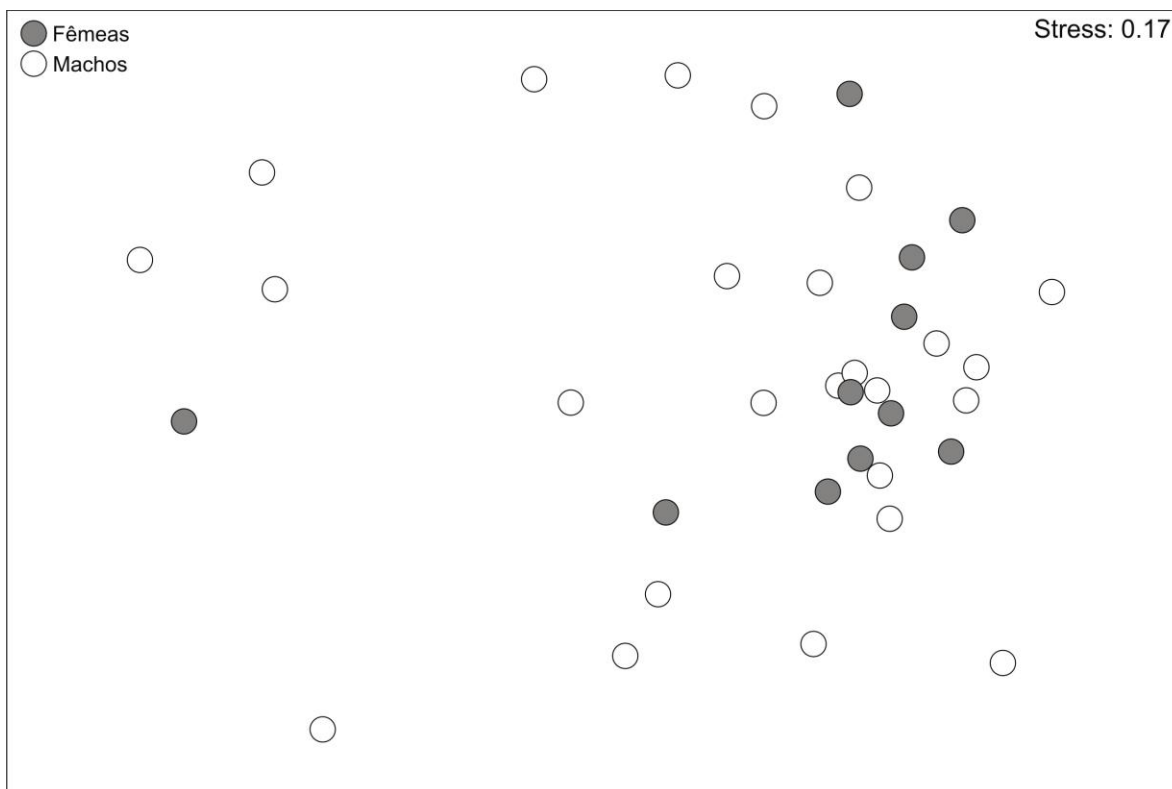


Figura 5 – Gráfico nMDS (*nonmetric multidimensional scaling*) da comparação da composição de alcalóides entre fêmeas e machos de *Melanophryniscus simplex* das oito localidades estudadas no sul do Brasil. Cada círculo representa um indivíduo e a distância entre cada símbolo representa a relação de similaridade da composição de alcalóides entre os indivíduos.

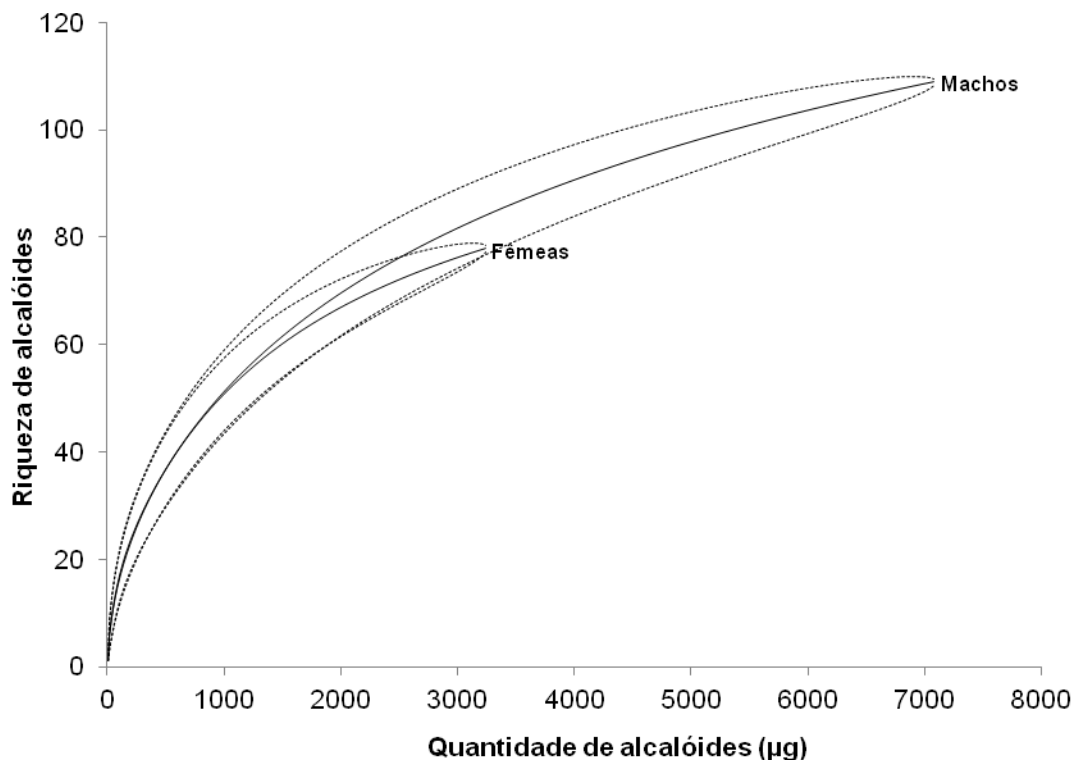


Figura 6 – Curvas de rarefação da riqueza de alcalóides em função da abundância, entre fêmeas e machos de *Melanophryniscus simplex*. As linhas pontilhadas representam o intervalo de confiança de 95%.

DISCUSSÃO

Os padrões de diversidade e composição de alcalóides detectados em fêmeas e machos de *Melanophryniscus simplex* parecem ser coincidentes com os padrões encontrados em outros anuros que contém alcalóides. As classes de alcalóides (excluindo a classe Nãooclass) mais abundantes, encontradas nos indivíduos analisados foram a 5,8-I; 5,6,8-I e a PTX. Estas classes de alcalóides também são as mais abundantes entre outras espécies de sapos que contém alcalóides (Daly et al., 2005; Clark et al., 2006; Saporito et al., 2007a). Ácaros e formigas parecem ser as principais fontes destas três classes de alcalóides para estes vertebrados (Daly et al. 2005; Saporito et al., 2006, 2009a). Com relação aos 14 alcalóides muito comuns encontrados nas fêmeas, seis destes foram compartilhados com os machos, as 5,8-Is 207A e 223D (isômero #2), as PTXs 251(Mel)A e PTX 251D, a 3,5-I 5Z,9E-223AB e a 3,5-P cis 223B onde também foram categorizados como muito comuns.

A 5,8-I 207A e a PTX 251D também são os alcalóides mais comuns em *Oophaga pumilio* (Saporito et al., 2007a), a PTX 251D pode estar presente em peles de sapos que contém alcalóides em quantidades superiores a 200 μg (Daly et al., 2005). Dois machos analisados neste estudo apresentaram níveis deste composto acima de 500 μg . As fontes de PTXs para sapos que contém alcalóides são ácaros (Daly et al., 2005, Saporito et al. 2006). Apesar da 5,8-I 207A ter sido encontrada frequentemente entre as amostras analisadas este alcalóide não foi abundante, não ultrapassando 19 μg , tanto em machos quanto em fêmeas. Não se conhecem as fontes da 5,8-I 207A, nem tampouco da outra 5,8-I encontrada (223D (isômero #2)), porém acredita-se que

algumas 5,8-I possam ter como fontes formigas e ácaros (Daly et al., 2005). As 3,5-I e as 3,5-P ocorrem em sapos que contém alcalóides das famílias Dendrobatidae, Mantellidae e Bufonidae, geralmente em baixas abundâncias (Daly et al 2005, Garraffo et al., 1993). As fontes destes alcalóides são formigas da subfamília Myrmicinae (Jones et al 1999; Daly et al., 2000), possivelmente estas formigas sejam as fontes de 5-I 5Z,9E-223AB e de 3,5-P cis 223B. Outros alcalóides que foram encontrados nos indivíduos analisados neste estudo e que merecem destaque são as piperidinas (Pip), a polizonimina (Polizo), a octahidroquinolina (OHQ) e a ciclopentaquinolizidina (CPQ). As piperidinas foram recentemente registradas em *Melanophryniscus* (Grant et al, dados não publicados, capítulo IV), neste estudo encontramos quatro piperidinas sendo que somente uma delas não foi comum aos dois sexos (223(Mel)I (isômero #2)). As piperidinas até então só haviam sido reportadas para anuros da família Dendrobatidae (Daly et al., 2005) e formigas podem ser as principais fontes destes alcalóides (Saporito et al., 2009a, 2011).

As outras três classes de alcalóides mencionadas Polizo, OHQ e CPQ também foram registradas para o gênero *Melanophryniscus* recentemente (Grant et al. dados não publicados, capítulo IV). Detectamos uma Polizo (151B) em somente um indivíduo macho e em baixa abundância (0.2 μg). Este alcalóide foi previamente encontrado em milípedes (Meinwald, 1975) e possivelmente estes artrópodes sejam a fonte de Polizoniminas. As OHQs podem ocorrerem em mantelídeos, em baixas abundâncias, e dendrobatídeos (Daly et al., 2005). A OHQ 193D foi encontrada em fêmeas e machos, porém em baixas abundâncias e frequência, sendo considerado um alcalóide raro (presente entre 0 e 25% dos sapos analisados). Já a CPQ foi representada pelo

alcalóide CPQ 249B e considerada como um alcalóide incomum. Detectado tanto em fêmeas quanto em machos sempre em baixa abundância. Algumas CPQs podem ser observadas raramente e pouco abundante em dendrobatídeos, porém em uma espécie desta família, *Minyobates bombetes*, este alcalóide pode é considerado abundante (Daly et al., 2005).

Parece claro que as possíveis fontes de alcalóides para fêmeas e machos de *Melanophryniscus simplex* sejam principalmente ácaros e formigas, observando que boa parte dos compostos encontrados tem origem nestes grupos e artrópodes (Daly et al., 2005, Saporito et al., 2007b, 2011). Além disso estes invertebrados estão entre os itens mais abundantes na dieta de outras espécies de *Melanophryniscus* (incluindo *M. simplex*) que também contém alcalóides (Bokerman, 1967; Filipello e Crespo, 1994, Bonansea e Vaira, 2007; Daly et al. 2007, 2008b; Leonardi et al., dados não publicados).

O padrão de variação, tanto espacial quanto temporal, da diversidade e da composição de alcalóides em anuros que contém alcalóides está associado ao padrão de variação de artrópodes que contém alcalóides (e.g. Saporito et al., 2006, 2007a; Clark et al., 2006; Daly et al. 2008a). O padrão encontrado em fêmeas e machos, onde observamos uma quantidade expressiva de alcalóides raros (presentes em menos de 25% das amostras) e uma baixa frequência de alcalóides abundantes, parece ser reflexo da natureza de variação das presas que contém alcalóides (Daly et al., 2007, Daly et al., 2008a). Por exemplo, alcalóides raros podem ter origem de artrópodes também raros (Daly et al., 2002; Clark et al., 2006). Ainda assim as fontes de alcalóides para *Melanophryniscus* são pouco estudadas e conseqüentemente pouco entendidas, sabe-

se, porém que as supostas fontes de alcalóides para estes sapos varia entre diferentes microambientes e áreas (Colombo et al. dados não publicados, capítulo II).

O que chama a atenção neste estudo é que não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas na diversidade e composição de alcalóides entre fêmeas e machos de *Melanophryniscus simplex*. O que indica que para esta espécie o sexo parece não explicar as variações individuais encontradas (Colombo et al., dados não publicados, capítulo I). Tanto fêmeas quanto machos possuem, por exemplo, alcalóides abundantes e frequentes, abundantes e raros e pouco abundantes e frequentes. Este padrão de variação individual, como já foi mencionado é coincidente com o que é observado em outras linhagens de anuros que contém alcalóides. A diferença é que em pelo menos duas famílias das outras linhagens de anuros que contém alcalóides (Dendrobatidae e Mantellidae) podemos observar que fêmeas e machos diferem na diversidade e composição de alcalóides (Daly et al.. 2008b; Andriamaharavo et al.. 2010; Saporito et al.. 2010a). Em dendrobatídeos, as diferenças na diversidade de alcalóides parecem estar relacionadas a diferenças na dieta de artrópodes que contém alcalóides entre indivíduos de sexos distintos (Saporito et al., 2010a). Em *Oophaga pumilio* diferenças na dieta são observadas em pelo menos uma população desta espécie na Costa Rica, fêmeas consomem mais artrópodes do que machos (Donnelly, 1991). Uma das hipóteses apontadas para as diferenças na dieta entre fêmeas e machos desta espécie esta relacionada ao comportamento dos indivíduos (Donnelly, 1991). Machos de *O. pumilio* são territoriais e tem áreas de vida menores em relação as fêmeas (Bunnell, 1973; Donnelly, 1989), portanto os machos teriam uma amplitude de disponibilidade de atrópodes que contém alcalóides menor

do que as fêmeas que possuem áreas de vida maiores (Saporito et al., 2010a). Outra hipótese é a de que os machos desta espécie de dendrobatídeo podem estar mais expostos (devido ao comportamento de volcalização) à predação do que fêmeas, sendo assim seriam mais predados e poderiam secretar (perder) mais alcalóides do que as fêmeas (Saporito et al., 2010a).

Em relação a *Melanophryniscus* não há informações precisas que permitam relacionar as não diferenças encontradas na diversidade e composição de alcalóides entre fêmeas e machos. Uma das hipóteses que elencamos está relacionada à diversidade de presas que contém alcalóides disponíveis para *Melanophryniscus simplex*. As espécies do gênero *Melanophryniscus* ocorrem no sul da América do Sul, onde a diversidade biológica é alta, porém não é maior quando comparada com diversidade das florestas tropicais onde ocorrem dendrobatídeos e mantelídeos. Assim esperaríamos que a diversidade de artrópodes que contém alcalóides e conseqüentemente as suas disponibilidades fossem menores nas regiões onde *M. simplex* ocorre. Outro aspecto importante é que a dieta entre os sexos de pelo menos uma espécie do gênero (*Melanophryniscus stelzneri*) é diferente (Filipello e Crespo, 1994). Porém não sabemos como é a variação levando em consideração somente os artrópodes que contém alcalóides e não todos os itens que podem ser predados por *Melanophryniscus*. Aqui ressaltasse a escassez de estudos básicos sobre a história natural/ecologia das espécies de *Melanophryniscus*, principalmente relacionados à dieta destas espécies de sapos. Sabe-se que estas informações são primordiais para o entendimento dos padrões que direcionam e influenciam a defesa química de anuros que contém alcalóides.

REFERÊNCIAS

ANDRIAMAHARAVO, N. R., GARRAFFO, H. M., SAPORITO, R. A., DALY, J. W., RAZAFINDRAKOTO, C. R., ANDRIANTSIFERANA, and M., SPANDE, T. F. 2010. Roughing it: a mantellid poison frog shows greater alkaloid diversity in some disturbed habitats. *J. Nat. Prod.* 73:322–330.

BOKERMAN, W. C. A. 1967. Observações sobre *Melanophryniscus moreirae* (Mir. Rib.) (Amphibia-Brachycephalidae). *An. Acad. Bras. de Cienc.* 39:301-306.

BONANSEA, M. I., and VAIRA, M. 2007. Geographic variation of the diet of *Melanophryniscus rubriventris* (Anura: Bufonidae) in northwestern Argentina. *J. Herpetol.* 41:231-236.

BUNNELL, P. 1973. Vocalizations in the territorial behavior of the frog *Dendrobates pumilio*. *Copeia* 1973:277-284.

CLARK, V. C., RAKOTOMALALA, V., RAMILIJONA, O., ABRELL, L., and FISHER, B. L. 2006. Individual variation in alkaloid content of poison frogs of Madagascar (*Mantella*; Mantellidae). *J. Chem. Ecol.* 32:2219–2233.

DALY, J. W. 1995. The chemistry of poisons in amphibian skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:9-13.

DALY, J. W., SHERRIE, I., SECUNDA, S., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F. WISNIESKI, A., NISHIHARA, C., and COVER, J. F. Jr. 1992. Variability in alkaloid profiles in neotropical poison frogs (Dendrobatidae): genetics versus environmental determinants. *Toxicon* 30:887-898.

DALY, J. W., SECUNDA, S., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., WISNIESKI, A., and COVER, J. F. Jr. 1994. An uptake system for dietary alkaloids in poison frogs (Dendrobatidae). *Toxicon* 32:657-663.

DALY, J. W., GARRAFFO, H. M., JAIN, P., SPANDE, T. F., SNELLING, R. R., JARAMILLO, C., and RAND, S. A. 2000. Arthropod-frog connection: decahydroquinoline and pyrrolizidine alkaloids common to microsympatric myrmicine ants and dendrobatid frogs. *J. Chem. Ecol.* 26:73-85.

DALY, J. W., KANEKO, T., WILHAM, J., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., ESPINOSA, A., and DONNELLY, M. A. 2002. Bioactive alkaloids of frog skin: combinatorial bioprospecting reveals that pumiliotoxins have an arthropod source. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:13996-14001.

DALY, J. W., SPANDE, T. F., and GARRAFFO, H. M., 2005, Alkaloids from amphibian skin: a tabulation of over eight-hundred compounds. *J. Nat. Prod.* 68:1556-1575.

DALY, J. W., WILHAM, J. M., SPANDE, T. F., GARRAFFO, H. M., GIL, R. R., SILVA, G. L., and VAIRA, M. 2007. Alkaloids in bufonid toads (*Melanophryniscus*): temporal and geographic determinants for two Argentinian species. *J. Chem. Ecol.* 33:871–887.

DALY, J. W., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., GIDDINGS, L. A., SAPORITO, R. A., VIEITES, D. R., and VENCES, M. 2008a. Individual and geographic variation of skin alkaloids in three species of Madagascan poison frogs (*Mantella*). *J. Chem. Ecol.* 34:252–279.

DALY, J. W., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., YEH, H. J. C., PELTZER P. M., CACIVIO, P. M., BALDO, J. D. and FAIVOVICH, J. 2008b. Indolizidine 239Q and quinolizidine 275I. Major alkaloids in two Argentinian bufonid toads (*Melanophryniscus*). *Toxicon* 52:858–870.

DONNELLY, M. A. 1991. Feeding patterns of the strawberry poison frog, *Dendrobates pumilio* (Anura: Dendrobatidae). *Copeia* 3:723–730.

DONNELLY, M. A. 1989. Effects of reproductive resource supplementation on space-use patterns in *Dendrobates pumilio*. *Oecologia*. 81: 212-218.

FILIPELLO, A. N., and CRESPO, F. A. 1994. Alimentacion en *Melanophryniscus stelzneri* (Anura: Bufonidae). *Cuad. Herpetol.* 8:18–24.

GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., DALY, J. W., BALDESSARI, A., and GROS, E. G. 1993. Alkaloids from bufonid toads (*Melanophryniscus*): decahydroquinolines, pumiliotoxins and homopumiliotoxins, indolizidines, pyrrolizidines, and quinolizidines. *J. Nat. Prod.* 56:357–373.

HAMMER, O., HARPER, D. A. T., AND RYAN, P. D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* 4:1-9.

JONES, T. H., GORMAN, J. S. T., SNELLING, R. R., DELABIE, J. H. C., BLUM, M. S., GARRAFFO, H. M., JAIN, P., DALY, J. W., and SPANDE, T. F. 1999. Further alkaloids common to ants and frogs: decahydroquinolines and a quinolizidine. *J. Chem. Ecol.* 25:1179–1193.

MEBS, D., POGODA, W., MANEYRO, R., and KWET, A. 2005. The alkaloid composition of the poisonous skin secretion of the red bellied toad, *Melanophryniscus montevidensis* (Anura, Bufonidae), from Uruguay. *Toxicon* 46:641-650.

MYERS, C. W., DALY, J. W., and MALKIN, B. 1978. A dangerously toxic new frog (*Phyllobates*) used by Embera Indians of western Colombia, with discussion of blowgun fabrication and dart poisoning. *Am. Mus. Novit.* 161:307–366.

MYERS, C. W., DALY, J. W., GARRAFFO, H. M., WISNIESKI, A., and COVER, J., Jr 1995. Discovery of the Costa Rican frog *Dendrobates granuliferus* in sympatry with *Dendrobates pumilio*, and comments on taxonomic use of skin alkaloids. *Am. Mus. Novit.* 3144:1-21.

OLSON, D. M., DINERSTEIN, E., WIKRAMANAYAKE, E. D., BURGESS, N. D., POWELL, G. V. N., UNDERWOOD, E. C., D'AMICO, J. A., ITOUA, I., STRAND, H. E., MORRISON, J. C., LOUCKS, C. J., ALLNUTT, T. F., RICKETTS, T. H., KURA, Y., LAMOREUX, J. F., WETTENGEL, W. W., HEDAO, P., and KASSEM, K. R. 2001. Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth. *BioScience* 51:933-938.

Pillar, V. D. 2006. Multiv: software para análise multivariada, auto-reamostragem bootstrap e testes de aleatorização. Porto Alegre, Departamento de Ecologia, UFRGS. disponível em <<http://ecoqua.ecologia.ufrgs.br/arquivos/Software/MULTIVMinor/>>.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., and DALY, J. W. 2006. Geographic and seasonal variation in alkaloid-based chemical defenses of *Dendrobates pumilio* from Bocas del Toro, Panamá. *J. Chem. Ecol.* 32:795-814.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., JAIN, P., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., and DALY, J. W. 2007a. Spatial and temporal patterns of alkaloid variation in the poison frog *Oophaga pumilio* in Costa Rica and Panama over 30 years. *Toxicon* 50:757-778.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., NORTON, R. A., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., and DALY, J. W. 2007b. Oribatid mites as a major dietary source for alkaloids in poison frogs. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 104:8885–8890.

SAPORITO, R. A., SPANDE, T. F., GARRAFFO, H. M., and DONNELLY, M. A. 2009a. Arthropod alkaloids in poison frogs: a review of the “dietary hypothesis”. *Heterocycles* 79: 277–297.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., MADDEN, A. A., GARRAFFO, H. M., and SPANDE, T. F. 2010a. Sex-related differences in alkaloid defenses of the dendrobatid frog *Oophaga pumilio* from Cayo Nancy, Bocas Del Toro, Panama. *J. Nat. Prod.* 73:317–321.

SAPORITO, R. A., ISOLA, M., MACCACHERO, V. C., CONDON, K., and DONNELLY, M. A. 2010b. Ontogenetic scaling of poison glands in a dendrobatid frog. *J. Zool.* 282:238–245.

SAPORITO, R. A., DONNELLY, M. A., SPANDE, T. F., and GARRAFFO, H. M. 2011. A review of chemical ecology in poison frogs. *Chemoecology* DOI 10.1007/s00049-011-0088-0

8. CAPÍTULO IV

CHEMOECOLOGY – SPECIAL ISSUE

SEQUESTERED CHEMICAL DEFENSES IN VERTEBRATES, DEDICATED TO J.W. DALY

The occurrence of defensive alkaloids in non-integumentary tissues of the Brazilian red-belly toad *Melanophryniscus simplex* (Bufonidae)

Taran Grant¹, Patrick Colombo², Laura Verrastro³, Ralph A. Saporito^{4,*}

¹ Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, C.P. 11461, 05422-970, São Paulo, SP, Brazil

² Laboratório de Sistemática de Vertebrados, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

³ Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ John Carroll University, Department of Biology, University Heights, Ohio, 44118, USA

* Corresponding author. E-mail: ralph.saporito@gmail.com; Ph: 216.397.4492.

Abstract

The red-belly toads (*Melanophryniscus*) of southern South America secrete defensive alkaloids from dermal granular glands. To date, all information on *Melanophryniscus* alkaloids has been obtained by extraction from either skins or whole organisms;

however, in other amphibians, tetrodotoxins, samandarines, and bufadienolides have been detected in both skin and other organs, which raises the possibility that lipophilic alkaloids may occur in non-integumentary tissues in *Melanophryniscus* as well. To test this hypothesis, we studied the distribution of alkaloids in the skin, skeletal muscle, liver, and mature oocytes of the red-belly toad *M. simplex* from three localities in southern Brazil. Gas chromatography and mass spectrometry of skin extracts from 11 individuals of *M. simplex* resulted in the detection of 47 alkaloids (including isomers), 9 unclassified and 38 from 12 known structural classes. Each alkaloid that was present in the skin of an individual was also present in the same relative proportion in that individual's skeletal muscle, liver, and oocytes. The most abundant and widely distributed alkaloids were the pumiliotoxins **251D**, **267C**, and **323A**, 5,8-disubstituted indolizidines **207A** and **223D**, 5,6,8-trisubstituted indolizidine **231B**, 3,5-disubstituted pyrrolizidines *cis*-**223B** and *cis*- and *trans*-**251K**, and izidine **211C**. We report the first record of piperidines in *Melanophryniscus*, bringing the total number of alkaloid classes detected in this genus to 16. Alkaloid composition differed significantly among the three study sites. The functional significance of defensive chemicals in non-integumentary tissues is unknown.

Keywords

Anura, Amphibia, chemical defense, sequestration

Introduction

Amphibians secrete a diverse arsenal of defensive chemicals from granular glands in the skin, including amines, alkaloids, bufadienolides, and peptides and proteins (Daly

1995). These secretions are believed to function as an important component of the innate immune system in defending against pathogens and parasites (Rivas et al. 2009; Conlon 2011) and are also involved in complex antipredator mechanisms (Brodie et al. 1991). All amphibians possess granular glands (Toledo and Jared 1995) and presumably secrete some sort of defensive chemical, but only approximately 150 species divided among eight lineages in five anuran families secrete lipophilic alkaloids (Daly et al. 2005; Grant et al. 2006; Rodríguez et al. 2010), including Bufonidae (*Melanophryniscus*), Dendrobatidae (independently derived in *Epipedobates*, *Ameerega*, and Dendrobatinae), Eleutherodactylidae (*Eleutherodactylus*), Mantellidae (*Mantella*), and Myobatrachidae (*Pseudophryne*). Feeding experiments have demonstrated that dendrobatids, mantellids, and myobatrachids obtain lipophilic alkaloids by consuming alkaloid-containing arthropods, especially brachypiline mites and myrmicine ants (Saporito et al. 2009, 2011; Raspotnig et al. 2011). The bufonids and eleutherodactylids that secrete these alkaloids have diets that are rich in mites and ants and presumably also obtain their defensive alkaloids through sequestration (Saporito et al. 2009, 2011; Rodríguez et al. 2010).

Melanophryniscus includes 26 species in southeastern South America, extending from the Brazilian state of Minas Gerais to Uruguay (Frost 2011). Most of these small (<3.5 cm snout-vent length) toads are characterized by their diurnal activity (Santos and Grant 2011), bright orange or red ventral coloration that they expose by arching the back and raising the limbs in the unken reflex (e.g., Fernández 1926; Fig. 1). Of the 26 known species, the defensive alkaloids of eight species have

been studied, yielding 113 alkaloids (including isomers) of 15 structural classes and another 22 unclassified alkaloids (Table 1).

To date, all information on *Melanophryniscus* alkaloids has been obtained by extraction from either skins (Daly et al. 1984, 2007, 2008; Garraffo et al. 1993) or whole organisms (Mebs et al. 2005, 2007). However, the defensive chemical tetrodotoxin occurs in skin and other organs in several amphibians and other vertebrates (e.g. Noguchi and Arakawa 2008; Mebs et al. 2010), as do samandarine alkaloids in the salamandrid *Salamandra salamandra* (Mebs and Pogoda 2005) and bufadienolides in the bufonid toad *Rhinella marina* (Flier et al. 1979). Although these defensive chemicals are synthesized by the organisms that contain them, it raises the possibility that lipophilic alkaloids of *Melanophryniscus*, which are derived from diet, may occur in non-integumentary tissues as well. To test this hypothesis, we studied the distribution of alkaloids in the skin, muscle, liver, and mature oocytes of the Brazilian red-belly toad *M. simplex* from three localities in southern Brazil.

Materials and methods

Frog collections

We collected 11 adult *Melanophryniscus simplex* from three localities in southern Brazil (Fig. 2): (1) Aratinga (São Francisco de Paula, RS; GPS coordinates 29°19'12.6"S, 50°12'13.3"W, ca. 775 m), 5 frogs (MCT 11922–26) collected 5 April 2008, (2) Gateados AC3 (Campo Belo do Sul, SC; GPS coordinates 27°59'42.19"S, 50°53'27.92"W), 3 frogs (UFRGS 5680 and two uncatalogued specimens) collected 16

July 2008, and (3) Gateados AD2 (Campo Belo do Sul, SC; GPS coordinates 28°1'30.14"S, 50°50'33.04"W), 3 frogs (UFRGS 5681–5682 and one uncatalogued specimen) collected 15 May 2008. The linear distance between the Aratinga and Gateados localities is approximately 156 km and between the two Gateados localities is approximately 6 km. We deposited specimens in the Coleção de Anfíbios e Répteis, Museu de Ciências e Tecnologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCT) and the Coleção Herpetológica, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

To determine the distribution of alkaloids in frogs, we removed whole skins, mature oocytes, and small sections of skeletal muscle (thigh) and liver from individual frogs. To prevent cross-contamination we removed only a small section of skeletal muscle and liver and thoroughly cleaned instruments by wiping and soaking in methanol between organs and individuals. We stored samples of skin, skeletal muscle, liver, and oocytes separately in 100% methanol in glass vials with Teflon-lined caps.

General experimental procedures

We performed gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis on a Varian Saturn 2100T ion trap MS instrument coupled to a Varian 3900 GC with a 30 m x 0.25 mm i.d. Varian Factor Four VF-5ms fused silica column. We achieved GC separation of alkaloids using a temperature program from 100 to 280°C at a rate of 10°C per minute with He as the carrier gas (1 mL/min). We analyzed each alkaloid fraction with both electron impact MS and chemical ionization MS with methanol as the CI reagent.

We prepared individual alkaloid fractions from methanol extracts of skin, skeletal muscle, liver, and oocytes for each specimen of *Melanophryniscus simplex*. For all samples from Gateados AC3 and Gateados AD2 we added 10 μg of nicotine ((-)-nicotine $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wisconsin) in a methanol solution (internal standard) and 50 μL of 1N HCl to 1 mL of the original MeOH extract. We used the same procedure for the samples from Aratinga, except that we did not include the nicotine standard. We concentrated this combined MeOH extract with N_2 to 100 μL and then diluted it with 200 μL of water. We then extracted this solution 4 times, each time with 300 μL of hexane. We basified the HCl fraction with saturated NaHCO_3 , followed by extraction 3 times, each time with 300 μL of ethyl acetate. We then dried the combined ethyl acetate fractions with anhydrous Na_2SO_4 and evaporated them to 100 μL .

We identified individual alkaloids by comparing the observed MS properties and GC retention times with those of previously reported anuran alkaloids (Daly et al. 2005). Anuran alkaloids have been assigned code names that consist of a bold-faced number corresponding to the nominal mass and a bold-faced letter to distinguish alkaloids of the same nominal mass (Daly et al. 2005). To determine the quantity of alkaloids in frog skins from Gateados AC3 and Gateados AD2, we compared the observed alkaloid peak area to the peak area of the nicotine internal standard, using a Varian MS Workstation v.6.9 SPI. We chose nicotine as an internal standard because its retention time is outside of the chromatographic range of most frog alkaloids.

Statistical analysis

We used non-metric multidimensional scaling to visualize patterns of alkaloid richness in *Melanophryniscus simplex* among the three localities. To assess the significance of the differences in alkaloid composition among localities we used a one-way analysis of similarity. For both analyses we used Bray-Curtis dissimilarity matrices. We ran all multivariate statistical analyses using PRIMER-E version 6. Given the close proximity of Gateados AC3 and Gateados AD2, we report the total quantity of alkaloid per skin (mean \pm standard error) and tested for differences between localities using a *t*-test in SPSS version 17.0 for Mac (SPSS, Inc., Chicago, IL).

Results

GC-MS analyses of extracts from 11 individuals of *Melanophryniscus simplex* resulted in the detection of 47 alkaloids (including isomers), including 9 unclassified alkaloids and 38 alkaloids from 12 known structural classes (Table 2). Five alkaloids and two isomers are new (for chemical properties see Supplementary Information). The composition (type, number, and quantity) of alkaloids varied among individual frogs at each locality (see below); however, each alkaloid that was present in the skin of an individual was also present in that individual's skeletal muscle, liver, and, in one case, oocytes. Furthermore, alkaloids occurred in the same relative proportions in these organs as in the skin (Fig. 3; Table 3).

The most abundant and widely distributed alkaloids detected in *Melanophryniscus simplex* were the pumiliotoxins (PTX) **251D**, **267C**, and **323A**, 5,8-disubstituted indolizidines (5,8-I) **207A** and **223D**, 5,6,8-trisubstituted indolizidine

(5,6,8-I) **231B**, 3,5-disubstituted pyrrolizidines (3,5-P) *cis*-**223B** and *cis*- and *trans*-**251K**, and izidine **211C**. The PTXs, 5,8-Is, and 5,6,8-I all have branched carbon skeletons (Fig. 4) and are likely derived from a diet of oribatid mites, whereas the 3,5-Ps have unbranched carbon skeletons and are presumably obtained from dietary ants (Saporito et al. 2009, 2011). Although the chemical structure of izidine **211C** has not yet been determined, it was recently detected in an oribatid mite (Saporito et al. 2009, 2011).

Alkaloid richness differed significantly among the three study sites (Fig. 5; Global $R = 0.99$; $P \leq 0.001$). Alkaloid quantity per skin was more variable among specimens from Gateados AC3 (490–2524 μg , $\bar{x}=1577 \pm 591 \mu\text{g}$) than those from Gateados AD2 (200–492 μg , $\bar{x}=374 \pm 89 \mu\text{g}$). Due to small number of samples and large variance of the Gateados AC3 sample, the difference in the mean quantity of alkaloid per skin at Gateados AC3 and Gateados AD2 was not significant ($t_4 = 2.01$; $P = 0.110$).

Discussion

Lipophilic alkaloids are anatomically widespread in *Melanophryniscus simplex*. Although the quantity of alkaloids appears to be greatest in skin, where defensive chemicals are secreted from granular glands, all of the alkaloids found in the skin of a given toad also occur in the same relative proportions in muscle, liver, and oocytes of that toad (Fig. 3; Table 3). Sequestered alkaloids are accumulated over the lifetime of an organism from multiple dietary sources that vary in both space and time. The amount of alkaloid in non-integumentary tissue and the fact that the alkaloids occur in

the same relative proportions as in the skin suggests that they are not simply in the process of being transported to the granular glands but instead accumulate in those organs as well.

This is the first record of lipophilic alkaloids in organs other than the skin in amphibians. Few data have been published on the anatomical distribution of these defensive chemicals, so it is unclear if their occurrence in multiple organs is common or limited to a subset of lineages or species. Daly et al. (1994:660) reported that no alkaloids were detected in “muscle or internal organs” of wild-caught specimens of the dendrobatid *Dendrobates auratus* or in liver or muscle of captive specimens of the same species fed decahydroquinoline **195A** for two months; however, recent experiments indicate that at least some dendrobatids also possess detectable amounts of alkaloids in muscle and liver tissue (Saporito, Donnelly, Garraffo, Spande, pers. comm.). Similarly, tetrodotoxins (TTX) occur in skin, egg, ovary, muscle, liver, and blood in amphibians and other vertebrates (Noguchi and Arakawa 2008; Mebs et al. 2010), samandarine and samandarone occur in skin, liver, testes, and ovaries in the salamandrid *Salamandra salamandra terrestris* (Mebs and Pogoda 2005), and bufadienolides circulate in the plasma of the bufonid *Rhinella marina* (Flier et al. 1979). Sequestered batrachotoxins occur in the feathers, skin, heart, skeletal muscle, and liver of birds of the genus *Pitohui* (Dumbacher et al. 2009).

The functional significance of defensive chemicals in organs other than the skin is unclear. Williams et al. (2004) suggested that some populations of the non-venomous garter snake *Thamnophis sirtalis* might employ TTX accumulated in the

liver following consumption of TTX-containing salamanders as an anti-predator mechanism. Also, the proliferation of defensive chemicals in other organs might help prevent or suppress infection by non-skin-penetrating parasites, such as ingested platyhelminths and nematodes. The occurrence of alkaloids in oocytes raises the possibility that mothers might transmit defensive chemicals to offspring, as occurs in the salamander *Taricha granulosa*. In that species, the TTX in eggs appears to be maternally derived (Hanifin et al. 2003). However, although ovaries of *Salamandra salamandra terrestris* were found to contain samandarine alkaloids, intrauterine larvae lacked any trace of alkaloids (Mebis and Pogoda 2005). Mebis et al. (2007) found that post-ovipositional eggs and larvae of *Melanophryniscus devincenzii* lacked alkaloids, and further study is required to determine if post-ovipositional eggs and larvae of *M. simplex* possess alkaloids or if alkaloids are lost following oviposition.

The alkaloids found in *Melanophryniscus simplex* disrupt ion-channel activity or neurotransmitter-receptor binding in nerve and muscle cell (Daly et al. 1999). Although autotoxicity might be prevented or reduced by compartmentalizing toxins in dermal granular glands (Daly et al. 1980; Saporito et al. 2011), the occurrence of alkaloids in non-integumentary tissues suggests that physiological resistance evolved in these toads. Physiological resistance to batrachotoxin in the dendrobatid *Phyllobates terribilis* appears to be due to modification of the regulatory site controlling sodium-channel activation and permeability, thus preventing binding by batrachotoxin (Daly et al. 1980). Similarly, physiological resistance to TTX evolved multiple times in garter snakes (*Thamnophis*) through specific mutations in an important functional region of a TTX-sensitive sodium channel gene (tsNa_v1.4) that

alter the channel pore and significantly reduce TTX binding affinity (Geffeney et al. 2005; Geffeney and Ruben 2006; Feldman et al. 2009). It is likely that physiological resistance in *M. simplex* arose through similar modifications.

Previous studies of *Melanophryniscus* detected approximately 140 alkaloids (including isomers) in eight species based on extractions of multiple individuals and localities (Table 1). We detected 47 alkaloids in 11 specimens of *M. simplex* from three localities. Over half of these alkaloids are unknown in other bufonids, including seven novel alkaloids and isomers and 17 previously known alkaloids that had not been detected in *Melanophryniscus*. The new discoveries include the first record of 2,6-disubstituted piperidines (Pip) in *Melanophryniscus*, bringing the number of alkaloid classes in *Melanophryniscus* to 16. The two piperidines we detected, Pip **223K** and **225I**, were previously known only in Dendrobatidae (Daly et al. 2005) and are probably obtained from ants (Saporito et al. 2009, 2011). Among species of *Melanophryniscus*, a spiropyrrrolizidine (Spiro) was previously known only in *M. stelzneri*; we detected the same alkaloid, Spiro **236**, and also Spiro **252B**, which was previously known only in *Mantella* from Madagascar and *Pseudophryne* from Australia (Daly et al. 2005). Spiro **236** is probably obtained from dietary mites, but it also occurs in a siphonotid millipede (Saporito et al. 2009, 2011); Spiro **252B** has not been detected in any arthropods but is likely obtained from mites. Likewise, 1,4-quinolizidines (1,4-Q) were previously known only in *M. cupreuscapularis*, in which 1,4-Q **259E** was reported by Daly et al. (2008). We did not detect that alkaloid but instead identified the mite alkaloid (Saporito et al. 2009, 2011) 1,4-Q **231A**, previously known in dendrobatids and *Mantella* (Daly et al. 2005).

Our observation of variation in alkaloid composition among individuals and populations of *Melanophryniscus simplex* is consistent with previous findings for other alkaloid-sequestering anurans, including species of *Melanophryniscus* (Mebs et al. 2005; Daly et al. 2007, 2008). The causes and consequences of alkaloid variation among species, populations, and individuals are not well understood. Differences among species are due, at least in part, to heritable differences in the ability to uptake different classes of alkaloids (Grant et al. 2006), although the extent that this holds true can be obscured by other causes of variation. The primary cause of intraspecific variation appears to be differences in the availability of alkaloid-containing arthropods and the kinds and amounts of alkaloids they contain (Saporito et al. 2009), which suggests that the three localities we studied differ markedly in their arthropod fauna. Alkaloid composition is known to vary ontogenetically (Myers et al. 1978; Daly et al. 2002) and sexually (Saporito et al. 2010), which could be due to intrinsic (e.g. developmental, genetic) differences but is more likely due to variation in habitat use and arthropod availability at finer scales than have been investigated to date.

We are unable to explain the difference in alkaloid quantity between specimens from Gateados AC3 and AD2 or the unexpectedly large variation in alkaloid quantity among specimens from Gateados AC3. Although not statistically significant, the quantities were markedly different, with the lowest quantity at Gateados AC3 (490 μg) being barely less than the greatest quantity of alkaloid at Gateados AD2 (492 μg). Moreover, the maximum quantity at Gateados AC3 (2524 μg) was five times greater

than the maximum quantity at AD3. Further data are required to understand the basis of variation in alkaloid composition in *Melanophryniscus simplex*.

Acknowledgments. Fieldwork was authorized by the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis under license 13173-1 and contract B-MA-06-016 (BAESA - Energética Barra Grande S/A and Fundação de Apoio da Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Florestal Gateados granted access to conduct fieldwork and provided logistic support. This study was supported by grants from the Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível superior (doctoral fellowship to P. Colombo), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico to (CNPq Procs. 305473/2008-5, 476789/2009-5, and 201405/2010), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Proc. 2008/50928-1), and a Kresge Challenge Grant awarded to John Carroll University. We thank M. A. Nichols for his invaluable assistance and training in operating and maintaining the GC-MS. We thank H.M. Garraffo and T. Spande for comments and suggestions that improved this manuscript. We thank I. Borel-Amaral, M. Borges-Martins, C. Haddad, R. Santos, A. Savitzky, M. Schossler, and C. Zank for logistic support, field assistance, and discussion. This work is derived from a presentation in the symposium “Sequestered Defensive Compounds in Tetrapod Vertebrates: A Symposium in Memory of John W. Daly,” held at the Sixth World Congress of Herpetology in Manaus, Brazil, on 21 August 2008 and supported by NSF IOS-0813842.

References

- Brodie Jr ED, Formanowicz Jr DR, Brodie III ED (1991) Predator avoidance and antipredator mechanisms: distinct pathways to survival. *Ethol Ecol Evol* 3:73-77.
- Conlon, JM (2011) The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anurans. *Cell Tissue Res* 343:201-12. doi:10.1007/s00441-010-1014-4
- Daly JW (1995) The chemistry of poisons in amphibian skin. *Proc Nat Acad Sci USA* 92:9-13
- Daly JW, Garraffo HM, Spande TF (1999) Alkaloids from amphibian skins. Pp 1-161 in Pelletier SW (ed) *Alkaloids: Chemical and biological perspectives* Volume 13. New York: Pergamon
- Daly JW, Hight RJ, Myers CW (1984) Occurrence of skin alkaloids in non-dendrobatid frogs from Brazil (Bufonidae), Australia (Myobatrachidae) and Madagascar (Mantellinae). *Toxicon* 22:905-19. doi:10.1016/0041-0101(84)90182-X
- Daly JW, Kaneko T, Wilham JM, Garraffo HM, Spande TF, Espinosa A, Donnelly MA (2002) Bioactive alkaloids of frog skin: combinatorial bioprospecting reveals that pumiliotoxins have an arthropod source. *Proc Nat Acad Sci USA* 99:13996-14001. DOI:10.1073/pnas.222551599
- Daly JW, Myers CW, Warnick JE, Albuquerque EX (1980) Levels of batrachotoxin and lack of sensitivity to its action in poison-dart frogs (*Phylllobates*). *Science* 208:1383-1385.

- Daly JW, Secunda SI, Garraffo HM, Spande TF, Wisnieski A, Cover Jr JF (1994) An uptake system for dietary alkaloids in poison frogs (Dendrobatidae). *Toxicon* 32:657-663. doi:10.1016/0041-0101(94)90335-2
- Daly JW, Spande TF, Garraffo HM (2005) Alkaloids from amphibian skin: a tabulation of over eight-hundred compounds. *J Nat Prod* 68:1556-1575. doi:10.1021/np0580560
- Daly JW, Wilham JM, Spande TF, Garraffo HM, Gil R, Silva G, Vaira M (2007) Alkaloids in bufonid toads (*Melanophryniscus*): Temporal and geographic determinants for two Argentinian species. *J Chem Ecol* 33:871-887. doi:10.1007/s10886-007-9261-x
- Daly JW, Garraffo HM, Spande TF, Yeh HJC, Peltzer PM, Cacivio PM, Baldo JD, Faivovich J (2008) Indolizidine 239Q and quinolizidine 275I. Major alkaloids in two Argentinian bufonid toads (*Melanophryniscus*). *Toxicon* 52:858-870. doi:10.1016/j.toxicon.2008.08.016
- Dumbacher JP, Menon GK, Daly JW (2009) Skin as a toxin storage organ in the endemic New Guinean genus *Pitohui*. *Auk* 126:520-530. doi:10.1525/auk.2009.08230
- Feldman CR, Brodie Jr ED, Brodie III ED, Pfrender ME (2009) The evolutionary origins of beneficial alleles during the repeated adaptation of garter snakes to deadly prey. *Proc Nat Acad Sci USA* 106:13415-13420. doi:10.1073/pnas.0901224106

- Fernández K (1926) Sobre la biología y reproducción de algunos batracios argentinos (segunda parte). Bol Acad Nac Cienc Córdoba 29:271-320
- Flier J, Edwards MW, Daly JW, Myers CW (1980) Widespread occurrence in frogs and toads of skin compounds interacting with the Ouabain site of Na⁺, K⁺-ATPase. Science 208:503-505
- Frost DR (2011) Amphibian species of the world: an online reference. Version 5.5 (31 January 2011). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA
- Garraffo HM, Spande TF, Daly JW, Baldessari A, Gros EG (1993) Alkaloids from bufonid toads (*Melanophryniscus*): decahydroquinolines, pumiliotoxins and homopumiliotoxins, indolizidines, pyrrolizidines, and quinolizidines. J Nat Prod 56:357-373. doi:10.1021/np50093a008
- Geffeney SL, Fujimoto E, Brodie III ED, Brodie Jr ED, Ruben PC (2005) Evolutionary diversification of TTX-resistant sodium channels in a predator-prey interaction. Nature 434:759-763. doi:10.1038/nature03392
- Geffeney SL, Ruben PC (2006) The structural basis and functional consequences of interactions between tetrodotoxin and voltage-gated sodium channels. Mar Drugs 4:143-156. doi:10.3390/md403143
- Grant T, Frost DR, Caldwell JP, Gagliardo R, Haddad CFB, Kok PJR, Means BD, Noonan BP, Schargel WE, Wheeler WC (2006) Phylogenetic systematics of dart-poison

frogs and their relatives (Anura: Athesphatanura: Dendrobatidae). Bull Amer Mus Nat Hist 299:1-262. URI:hdl.handle.net/2246/5803

Hanifin CT, Brodie III ED, Brodie Jr ED (2003) Tetrodotoxin levels in eggs of the rough-skinned newt, *Taricha granulosa*, are correlated with female toxicity. J Chem Ecol 29:1729-1739. doi:10.1023/A:1024885824823

Mebis D, Pogoda W, Maneyro R, Kwet A (2005) Studies on the poisonous skin secretion of individual red bellied toads, *Melanophryniscus montevidensis* (Anura, Bufonidae), from Uruguay. Toxicon 46:641-650. doi:10.1016/j.toxicon.2005.07.004

Mebis D, Maneyro R, Pogoda W (2007) Further studies on pumiliotoxin 251D and hydroquinone content of the skin secretion of *Melanophryniscus* species (Anura, Bufonidae) from Uruguay. Toxicon 50:166-169. doi:10.1016/j.toxicon.2007.02.017

Mebis D, Arakawa O, Yotsu-Yamashita M (2010) Tissue distribution of tetrodotoxin in the red-spotted newt *Notophthalmus viridescens*. Toxicon 55:1353-1357. doi:10.1016/j.toxicon.2010.02.009

Myers CW, Daly JW, Malkin B (1978) A dangerously toxic new frog (*Phyllobates*) used by Emberá indians of western Colombia, with discussion of blowgun fabrication and dart poisoning. Bull Amer Mus Nat Hist 161:307-366. URI:hdl.handle.net/2246/1286

- Noguchi T, Arakawa O (2008) Tetrodotoxin–distribution and accumulation in aquatic organisms, and Cases of Human Intoxication. *Mar Drugs* 6:220-242.
doi:10.3390/md20080011
- Raspotnig G, Norton RA, Heethoff M (2011) Oribatid mites and skin alkaloids in poison frogs oribatid mites and skin alkaloids in poison frogs. *Biol Lett* 7:555-556.
doi:10.1098/rsbl.2010.1113
- Rivas L, Luque-Ortega JR, Andreu D (2009) Amphibian antimicrobial peptides and Protozoa: lessons from parasites. *BBA-Biomembranes* 1788:1570-81.
doi:10.1016/j.bbamem.2008.11.002
- Rodríguez A, Poth D, Schulz S, Vences M (2010) Discovery of skin alkaloids in a miniaturized eleutherodactylid frog from Cuba. *Biol Lett* 7:414-418.
doi:10.1098/rsbl.2010.0844
- Santos RR, Grant T (2010) Diel pattern of migration in a poisonous toad from Brazil and the evolution of chemical defenses in diurnal amphibians. *Evol Ecol* 25:249-258. doi:10.1007/s10682-010-9407-0
- Saporito RA, Donnelly MA, Madden AA, Garraffo HM, Spande TF (2010) Sex-related differences in alkaloid chemical defenses of the dendrobatid frog *Oophaga pumilio* from Cayo Nancy, Bocas del Toro, Panama. *J Nat Prod* 73:317-21.
doi:10.1021/np900702d
- Saporito RA, Donnelly MA, Spande TF, Garraffo, HM (2011) A review of chemical ecology in poison frogs. *Chemoecology* THIS ISSUE.

Saporito RA, Spande TF, Garraffo HM, Donnelly MA (2009) Arthropod alkaloids in poison frogs: a review of the 'dietary hypothesis'. *Heterocycles* 79: 277-297. doi:10.1002/chin.200934267

Toledo RC, Jared C (1995) Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 111:1-29. doi:10.1016/0300-9629(95)98515-I

Williams BL, Brodie Jr ED, Brodie III ED (2004) A resistant predator and its toxic prey: persistence of newt toxin leads to poisonous (not venomous) snakes. *J Chem Ecol* 30: 1901-19. doi:10.1023/B:JOEC.0000045585.77875.09.

Table 1 Alkaloids detected previously in species of *Melanophryniscus*. Abbreviations for alkaloid classes: 3,5-P, 3,5-disubstituted pyrrolizidine; 3,5-I, 3,5-disubstituted indolizidine; 5,8-I, 5,8-disubstituted indolizidine; De-5,8-I, dehydro-5,8-disubstituted indolizidine; 5,6,8-I, 5,6,8-trisubstituted indolizidine; 4,6-Q, 4,6-disubstituted quinolizidine; 1,4-Q, 1,4-disubstituted quinolizidine; Izi, izidine; PTX, pumiliotoxin; aPTX, allopumiliotoxin; hPTX, homopumiliotoxin; Do-PTX, deoxyhomopumiliotoxin; Spiro, spiropyrrolizidine; DHQ, decahydroquinoline; Tri, Tricyclic; Unclass, unclassified.

Table 2 Alkaloids detected in *Melanophryniscus simplex* and their likely dietary arthropod sources.

Fig. 1 The defensive, anti-predator posture of *Melanophryniscus simplex*. When threatened, individuals expose red or orange ventral coloration by arching the back and raising the limbs. Adult male, 26.4 mm snout-vent length, MCT 11922

Fig. 2 Map of *Melanophryniscus simplex* collecting localities in southern Brazil. 1 = Aratinga. 2 = Gateados AD2. 3 = Gateados AC3

Fig. 3 Chromatograms illustrating the major alkaloids present in different organs of *Melanophryniscus simplex* from Gateados AD2 (individual 2; see Table 3). All alkaloids are present in each tissue type, and the relative proportion of alkaloids is similar among all tissue types. a Skin, b Muscle, and c Liver. The asterisk (*) indicates the nicotine standard. The double asterisk (**) indicates a peak that is not an alkaloid

Fig. 4 Structures of four of the major alkaloids detected in *Melanophryniscus simplex*. The unbranched 3,5-disubstituted pyrrolizidine (3,5-P) cis-251K and piperidine (Pip) 225I (the first record of this class detected in *Melanophryniscus*) are likely obtained from dietary ants, whereas the branched pumiliotoxin (PTX) 251D and 5,8-disubstituted indolizidine (5,8-I) 223D are probably obtained from dietary mites

Fig. 5 Non-metric multidimensional scaling plot of alkaloid richness in *Melanophryniscus simplex* at three localities. Alkaloid richness is significantly different among locations (Global $R = 0.99$; $P \leq 0.001$). Each symbol represents an individual

toad from one location. The distance between symbols corresponds to differences in alkaloid richness between frogs

Figure 1



Figure 2

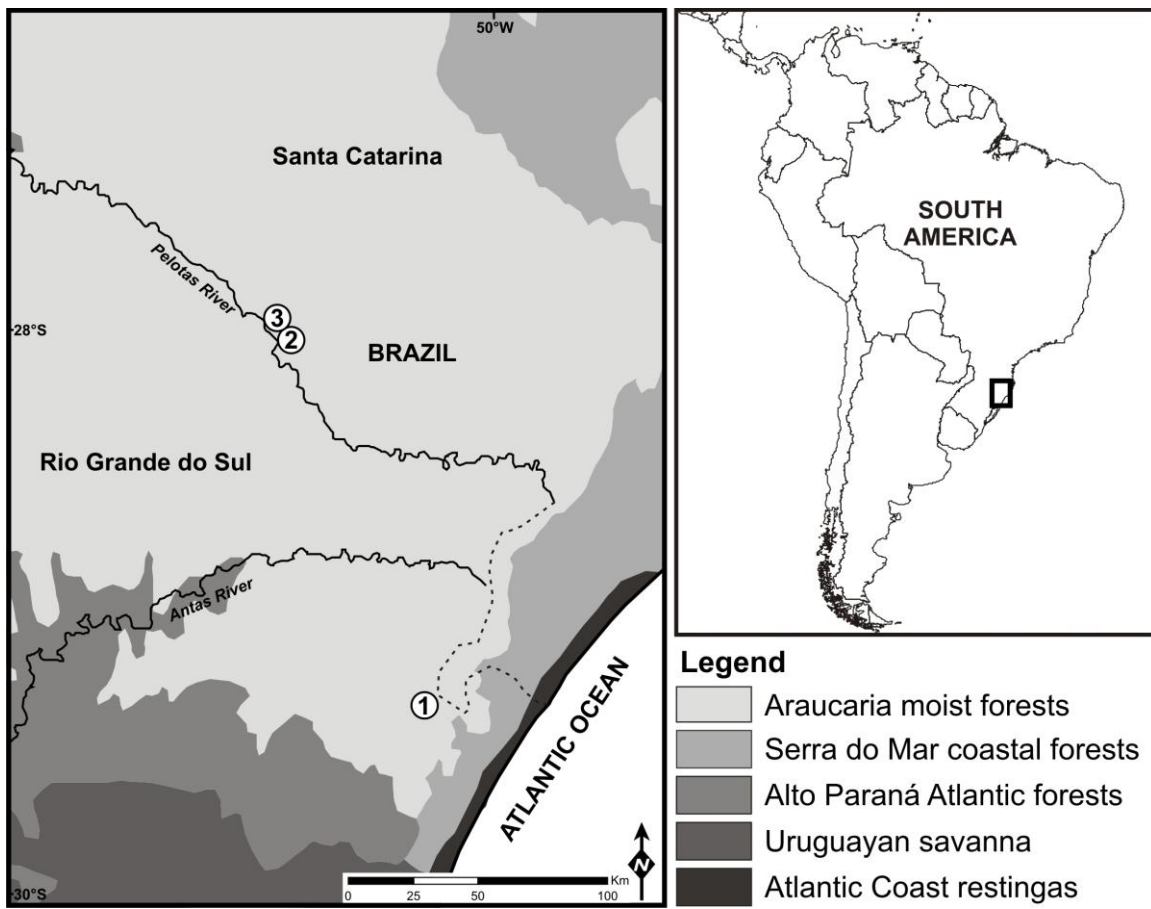


Figure 3

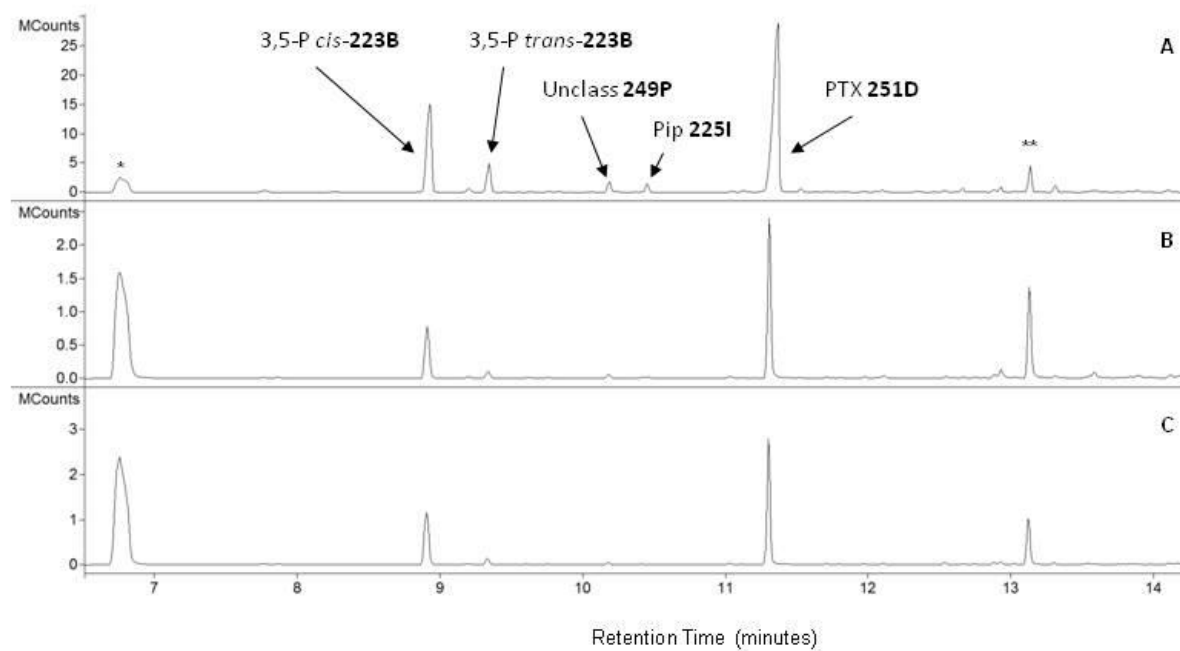


Figure 4

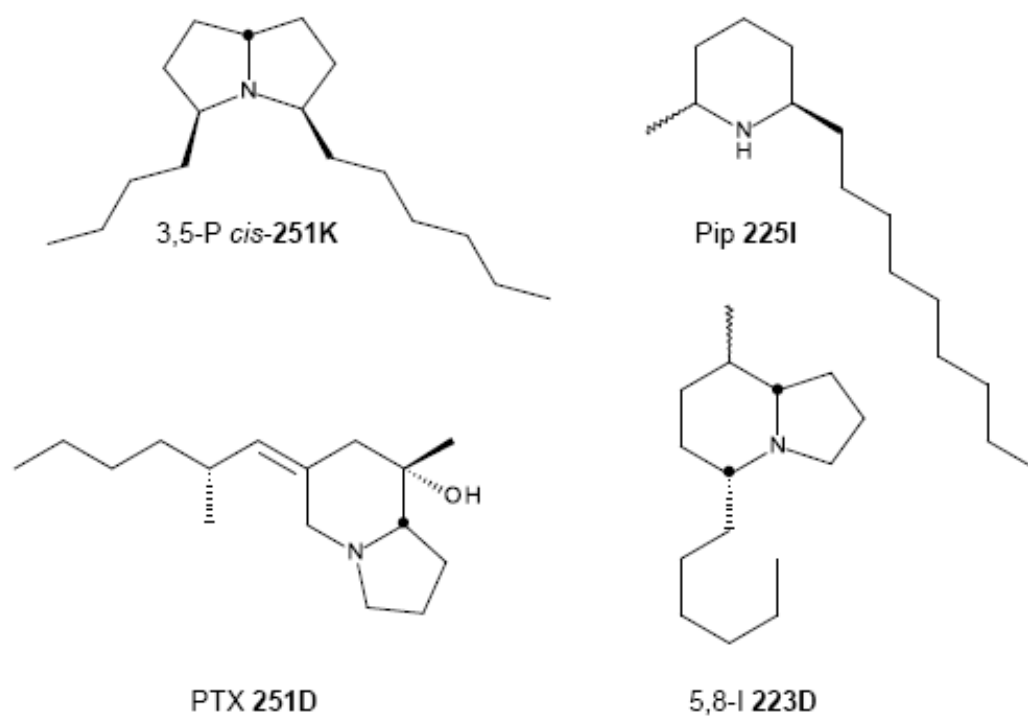


Figure 5

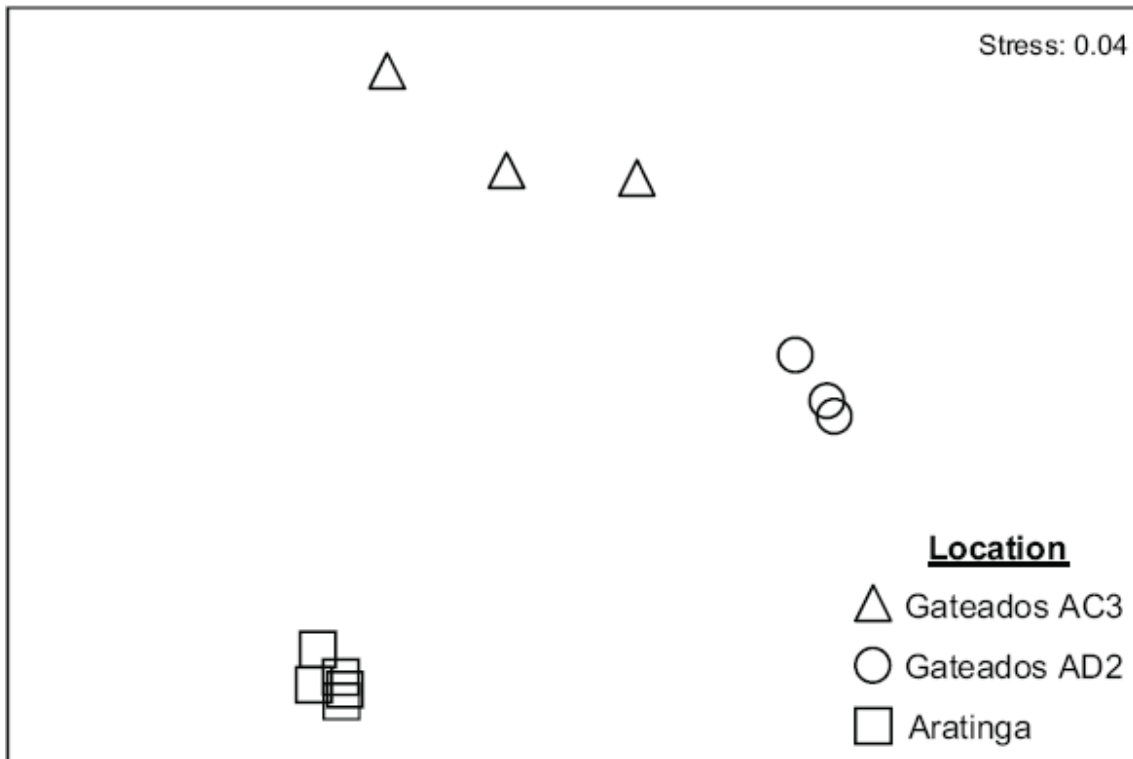


Table 1. Alkaloids detected previously in species of *Melanophryniscus*. The number of isomers detected is indicated in parentheses following the code designations. In some cases, prime symbols are used with alkaloid codes to indicate the specific isomer (see Daly et al., 2005). Abbreviations for alkaloid classes: 3,5-P, 3,5-disubstituted pyrrolizidine; 3,5-I, 3,5-disubstituted indolizidine; 5,8-I, 5,8-disubstituted indolizidine; de-5,8-I, dehydro-5,8-disubstituted indolizidine; 5,6,8-I, 5,6,8-trisubstituted indolizidine; 4,6-Q, 4,6-disubstituted quinolizidine; 1,4-Q, 1,4-disubstituted quinolizidine; Izi, izidine; PTX, pumiliotoxin; aPTX, allopumiliotoxin; hPTX, homopumiliotoxin; Do-PTX, deoxyhomopumiliotoxin; Spiro, spiropyrrolizidine; DHQ, decahydroquinoline; TRI, tricyclic; Unclass, unclassified.

Species	3,5-P	3,5-I	5,8-I	de-5,8-I	5,6,8-I	4,6-Q	1,4-Q	Izi	PTX	aPTX	hPTX	Do-hPTX	Spiro	DHQ	TRI	Unclass
<i>M. atroluteus</i> ¹									237A, 251D, 265D, 267C, 307A, 309A, 323A,							
<i>M. cupreuscapularis</i> ¹		5Z,9Z- 223AB, 239Q	259B (1)			275I, 279 H	259E	211C	277B, 307F (1), 307G		249F (2)			269AB	193C, 205H, 205I, 235M	193K, 207S, 209R, 223T, 235S, 293H, 305H
<i>M. devincenzii</i> ¹									237A, 251D, 265D, 267C, 307A, 309A, 323A,							

<i>M. klappenbachi</i> ²		195B, 5Z,9Z- 223AB, 239Q	207A , 223 D, 259B	219G, 249L		275I			251D, 323A		249F (1), 265N			223F (1), 269AB , 269B, 271D	205I	207S, 223EE, 223T, 235S, 307J
<i>M. montevidensis</i> ^{1,2,3}	<i>cis-</i> 223H, 237G	<i>5E,9Z-</i> 195B, <i>5Z,9E-</i> 195B							237A, 251D, 265D, 267C, 307B, 309A, 323A		319A , 319B , 321B					
<i>M. moreirae</i> ¹									267C	323B						
<i>M. rubriventris</i> ⁵		<i>5Z,9Z-</i> 223AB	261 D, 261 D', 273C		195G, 207C, 221Q			191D, 191E, 205F, 205G, 207T, 207T', 209N, 221R	219G, 237A, 251D, 275H, 277B, 277G, 289C, 291G, 307A, 307G, 309A, 319F, 323A	267A		207 0			193C, 193C', 203B, 205H, 205H', 207U, 221S, 221W, 237O (2)	183C, 195L, 209M(2) , 223T(2) , 267R
<i>M. stelzneri</i> ^{3,5}	<i>cis-</i> 223B, <i>trans-</i> 223B, <i>cis-</i> 223H, <i>cis-</i> 251K, <i>trans-</i> 251K	195B, <i>5Z,9E-</i> 195B, <i>5E,9Z-</i> 195B, <i>5Z,9Z-</i> 195B, <i>5E,9E-</i> 195B, <i>5Z9Z-</i>	193 M, 207A 207A ", 259B	219G	207C, 223X, 235E, 235E', 237S, 251EE (2)			193I, 207S	251D				236	<i>cis-</i> 223F, <i>trans-</i> 223F, <i>cis-</i> 249D, <i>trans-</i> 249D, <i>trans-</i> 249E,	193A, 193C, 235I	223W, 231J, 233K, 247L, 247M, 249P (2), 255F, 265BB, 267Y

		223AB, <i>5E,9Z-</i> 223AB												<i>cis-</i> 275B		
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----------------------------	--	--

Mebis et al., 2007

² Daly et al., 2008

³Garraffo et al., 1993

⁴ Mebis et al., 2005

⁵ Daly et al., 2007

⁶ Daly et al., 1984

Table 2. Occurrence of alkaloids in skin extracts of *Melanophryniscus simplex* and their likely dietary arthropod source. Additional alkaloids present in trace amounts were detected, but data were not sufficient to assign a code number and letter. New alkaloids and new isomers of previously known alkaloids are underlined.

Alkaloids	Dietary Source
<i>Pumiliotoxins</i>	
237A, 251D, 265G, 267C, 277B, 305I, 323A¹	Mites
<i>Homopumiliotoxins</i>	
265N	Mites
<i>5,8-Disubstituted indolizidines</i>	
207A, <u>221A</u>,² 209B, 219L, 223D, 237D, 239G, <u>239G</u>,³ <u>267CC</u>, <u>271G</u>	Mites
<i>5,6,8-Trisubstituted indolizidines</i>	
197H, 223X, 231B, 235E, 263A	Mites
<i>1,4-Disubstituted quinolizidines</i>	
231A	Mites
<i>3,5-Disubstituted indolizidines</i>	
5Z,9Z-223AB, 223R	Ants
<i>3,5-Disubstituted pyrrolizidines</i>	
cis-223B, trans-223B, 239Y, cis-251K, trans-251K	Ants
<i>4,6-Disubstituted quinolizidines</i>	
275I	Ants
<i>Piperidines</i>	
223K, 225I	Ants
<i>Izidines</i>	
211C	Ants
<i>Spiropyrrrolizidines</i>	
236, 252B	Millipedes/Mites
<i>Tricyclics</i>	
193C	Beetles/Mites
<i>Unclassified</i>	
<u>223DD, 235S, 235X, 235FE, 249P, 253M, 267Y, 305I, 307N</u>	Unknown ⁴

¹ A dimethylsilanate derivative of **323A** (MW 379) generally accompanied the presence of PTX **323A**.

² New diastereomer of a previously reported alkaloid 5,8-I **221A**; see Supplemental Information (Table 1) for chemical properties.

³ New diastereomer of a previously reported alkaloid 5,8-I **239G**; see Supplemental Information (Table 1) for chemical properties.

⁴ Some unclassified alkaloids have recently been identified in oribatid mites (Saporito et al., 2009).

Table 3. Relative proportion of the five most abundant alkaloids in tissue types among individuals of *Melanophryniscus simplex* from Gateados AC3 and AD2.

Location					
Individual	Major Alkaloids	Skin	Muscle	Liver	
Gateados AC3					
1	PTX 251D	0.41	0.41	0.38	
	PTX 237A	0.20	0.19	0.20	
	3,5-P <i>trans</i> - 251K	0.20	0.16	0.14	
	3,5-P <i>cis</i> - 223B	0.11	0.12	0.15	
	3,5-I 223AB (5Z,9Z)	0.07	0.10	0.14	
2	PTX 251D	0.37	0.32	0.33	
	3,5-P <i>cis</i> - 223B	0.28	0.34	0.33	
	3,5-P <i>trans</i> - 251K	0.22	0.18	0.17	
	5,8-I 223D	0.10	0.13	0.13	
	5,8-I 207A	0.03	0.04	0.05	
3	PTX 251D	0.64	0.63	0.74	
	3,5-P <i>trans</i> - 251K	0.20	0.27	0.12	
	3,5-P <i>cis</i> - 223B	0.10	0.06	0.07	
	3,5-I 223AB (5Z,9Z)	0.04	0.03	0.04	
	5,8-I 207A	0.02	0.01	0.02	
Gateados AD2					
1	PTX 251D	0.64	0.70	0.61	
	Spiro 252B	0.23	0.19	0.30	
	Izi 211C	0.06	0.07	0.07	
	5,6,8-I 235E	0.04	0.02	0.01	
	3,5-P <i>trans</i> - 251K	0.03	0.02	0.02	
2	PTX 251D	0.61	0.65	0.61	
	3,5-P <i>cis</i> - 223B	0.27	0.29	0.34	
	3,5-P <i>trans</i> - 223B	0.07	0.04	0.04	
	Unclass 249P	0.03	0.02	0.01	
	Pip 225I	0.02	0.01	0.00	
3	3,5-P <i>cis</i> - 223B	0.40	0.46	0.42	
	PTX 251D	0.38	0.37	0.25	
	3,5-P <i>trans</i> - 251K	0.09	0.09	0.22	
	3,5-P <i>cis</i> - 251K	0.09	0.03	0.03	
	5,6,8-I 197H	0.04	0.06	0.07	

Supplementary Information

The chemical properties of *new alkaloids* and *new isomers of previously reported alkaloids* are given in Supplementary Table 1 and follow the format of Daly et al. (2005). The reported gas chromatographic retention times are corrected so that they are directly comparable to the retention times listed in the library of more than 800 alkaloids present by Daly et al. (2005). Retention times were corrected by comparing the retention times for known alkaloids in the present study with their corresponding retention times in the 2005 tabulation of alkaloids. We used linear regression to plot the observed retention times (present study) versus the retention times from the tabulation (Daly et al. 2005), and corrected the retention times of the new alkaloids and isomers by using the resulting regression equation. The empirical formulae are not based on High Resolution Mass Spectrometry and should be considered tentative.

Supplementary Table 1. Chemical data on new alkaloids and isomers of previously detected alkaloids in *Melanophryniscus simplex*.

221A	5,8-I. 'C ₁₅ H ₂₇ N'. (New Isomer) Rt 9.72. 221(<1), 138(100), 96(21).
235FF	Unclass. 'C ₁₆ H ₂₉ N'. Rt 12.06. 235(35), 206(100), 188(20), 70(18).
239G	5,8-I. 'C ₁₅ H ₂₉ NO'. (New Isomer) Rt 11.93. 239(<1), 238(3), 138(100), 96(10).
267CC	5,8-I. 'C ₁₇ H ₃₃ NO'. Rt 11.39. 267(<1), 138(100), 96(30).
271G	5,8-I. 'C ₁₉ H ₂₉ N'. Rt 12.29. 271(<1), 138(100), 96(55).
305J	Unclass. 'C ₁₉ H ₃₁ NO ₂ '. Rt 13.83. 305(75), 304(44), 290(40), 262(62), 234(35), 220(55), 206(65), 178(89), 152(100), 150(30), 136(60), 110(65), 108(25), 70(34).
307N	Unclass. 'C ₁₉ H ₃₃ NO ₂ '. Rt 14.05. 307(48), 306(29), 292(48), 236(44), 220(80), 206(68), 178(84), 152(100), 150(30), 136(58), 110(75), 108(15), 70(44).

9. CONCLUSÕES GERAIS

Sem dúvida alguma o estudo da defesa química de uma espécie “florestal” de *Melanophryniscus* incrementou consideravelmente o conhecimento a respeito da diversidade de alcalóides neste gênero, fato este ilustrado pelos mais de 250 compostos novos encontrados. Este número é expressivo e relativamente inesperado, se levarmos em consideração que até o momento se conheciam pouco mais de 150 compostos em oito espécies de *Melanophryniscus*.

Confirmamos com este trabalho que esta diversidade varia consideravelmente tanto geograficamente quanto individualmente, sendo consistente com o que é encontrado em outras espécies de sapos que contém alcalóides. Porém há um aspecto novo (ou não verificado ainda) com relação à frequência e a abundância de alcalóides. Alcalóides que são muito frequentes são exponencialmente mais abundantes. Não sabemos ao certo a explicação para esta relação, mas certamente está associada ao padrão de distribuição de presas que contém alcalóides. Verificamos também que estas supostas fontes de alcalóides não estão distribuídas de maneira igual em um determinado microambiente e/ou área. Porém esperaríamos que esta variação fosse coincidente com a variação encontrada nos anuros, o que não foi observado. Este padrão ilustra o que já é amplamente discutido na literatura, que este sistema de defesa química (sequestro) é suficientemente variável para confundir a nossa habilidade de prever mudanças tanto na diversidade quanto na composição de alcalóides em sapos que contem alcalóides. Para complementar esta “confusão” descobrimos ainda que em

Melanophryniscus simplex, não existem diferenças na diversidade e na composição de alcalóides entre fêmeas e machos, contrariando com o que é observado em pelo menos dois grupos de sapos que contém alcalóides amplamente estudados (dendrobatídeos e mantelídeos). Outra novidade trazida é que *Melanophryniscus simplex* é capaz de pelo menos estocar (ainda que por algum tempo) alcalóides em outros tecidos que não seja a pele.

Obviamente que os dados relativamente novos que trazemos aqui ajudam a entender um pouco melhor a respeito da defesa química de *Melanophryniscus*. Mas como sempre, ainda é preciso continuar a estudar (utilizando também outras técnicas de análise química) para que possamos um dia juntar todas as peças deste quebra cabeça e compreender melhor ainda este sistema.