

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



TÍTULO:

Estudo Químico e Biológico da Secreção Cutânea de *Hypsiboas cinerascens* e *H. geographicus*.

RICHARDSON ALVES DE ALMEIDA

ORIENTADOR

AFONSO DUARTE LEÃO DE SOUZA

CO-ORIENTADOR

TÚLIO DE ORLEANS GADELHA COSTA

COLABORADOR

CARLOS BLOCH Jr.

MANAUS, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TÍTULO

Estudo Químico e Biológico da Secreção Cutânea de *Hypsiboas cinerascens* e *H. geographicus*.

RICHARDSON ALVES DE ALMEIDA

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do Título de Doutor.

MANAUS, 2015

A4 'e Almeida, Richardson Alves de
Estudo Químico e Biológico da Secreção Cutânea de *Hypsiboas cinerascens* e *H. geographicus*. / Richardson Alves de Almeida.
2015
213 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Afonso Duarte Leão de Souza
Orientador: Túlio de Orleans Gadelha Costa
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

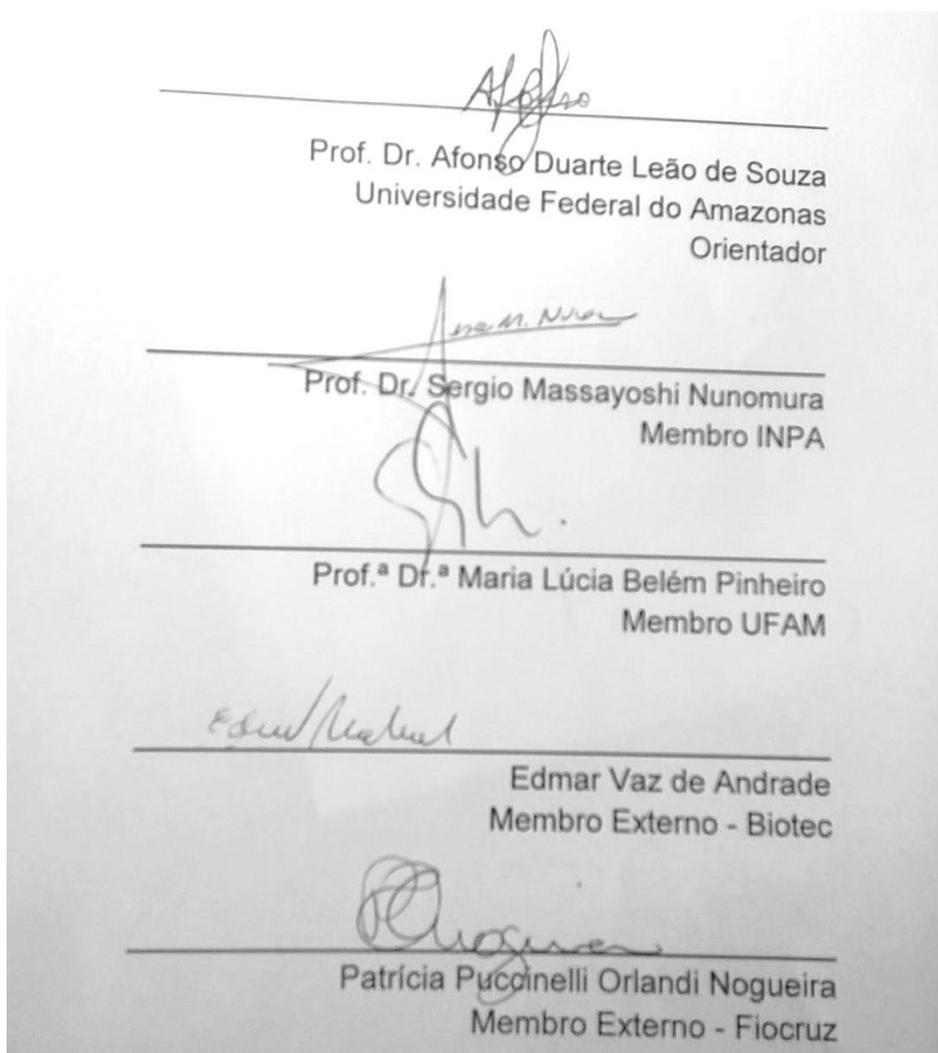
1. Anuros. 2. Anfíbios. 3. Secreção da pele. 4. PAMs. I. Souza, Afonso Duarte Leão de II. Universidade Federal do Amazonas III.
Título

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Esta tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Amazonas, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição de quem interessar.

RICHARDSON ALVES DE ALMEIDA

Banca Examinadora



Dedico esse trabalho a Deus, minha Mãe Maria Zuleide, aos meus Irmãos, minha noiva Elzalina Ribeiro e todos aqueles que sempre estiveram do meu lado e me deram apoio.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, pela minha vida e por ter sempre me dado saúde e coragem para vencer meus desafios. Obrigado, Senhor!

De forma mais que especial, agradeço minha mãe, Maria Zuleide Alves do Nascimento, que sempre cuidou de mim, me educou e me ensinou os valores da vida como: simplicidade, honestidade, esforço e respeito. Obrigado, minha mãe, eu amo muito você! Agradeço, também, a toda a minha família, em especial aos meus irmãos, aqueles que sempre me ajudaram e que nunca negaram demonstrações de amor e carinho por minha pessoa.

Ao meu amor Elzalina que sempre esteve, e espero que sempre esteja ao meu lado nas próximas etapas da minha vida, que atualmente é minha noiva será minha esposa e mãe dos meus filhos.

Aos amigos, parte importantíssima em qualquer etapa na vida.

Obrigado aos amigos e companheiros de laboratório de espectrometria de massa (LEM) da EMBRAPA-BRASILIA, por tornarem a execução desse projeto uma atividade tão prazerosa e fazerem do ambiente de pesquisa um lugar no qual o tempo não importa, em especial a um grande amigo que me ajudou bastante, José de Lima Cardozo (Zé) que teve muita paciência comigo e sempre me apoiou até nas madrugadas de estudo. Obrigado a todos pelo auxílio intelectual, vocês todos fazem parte da minha formação.

Obrigado, Sebastião, André, João Vitor, Professor Túlio e novamente a Elzalina que é e sempre será minha companheira em todas as horas, pela companhia nas saídas de campo realizadas, por tornarem essas obrigações mais um momento prazeroso desse projeto. Um obrigado muito justo e necessário aos meus orientadores e amigos, Túlio de

Orleans Gadelha Costa e Afonso Duarte Leão de Souza por toda a convivência, aprendizagem e por me aceitarem como aluno. Obrigado mais do que justo e especial aos professores Carlos Bloch Junior e Marcelo Porto Bemquerer por acreditarem em meu potencial e me aceitarem em seu laboratório me ensinando os valores da ciência. Com vocês tenho aprendido que a pesquisa é uma atividade séria, a qual requer muita responsabilidade, mas que deve ser realizada de forma prazerosa. Obrigado pelo exemplo singular de vida acadêmica e por apoiarem o projeto aqui apresentado.

Ao Departamento de Pós-graduação em Química da Universidade de Federal do Amazonas por me aceitar em seu corpo docente. Ao CAPES e FAPEAM pela bolsa de estudos propiciando o suporte necessário ao desenvolvimento desse projeto.

Por fim, obrigado a todos aqueles que de uma maneira ou de outra me apoiaram no desenvolvimento desse projeto.

I – ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição de espécies de anfíbios no mundo (AMPHIBIAWEB 2014)...	24
Figura 2 - Número de espécies ameaçadas (AMPHIBIAWEB 2014).....	25
Figura 3 - Estrutura do alcaloide Batracotoxina (BTX).	26
Figura 4 - Corte histológico da derme de <i>Rhinela schneideri</i>	26
Figura 5 - Formação da ligação peptídica.	28
Figura 6 – Estrutura química geral da fragmentação de um peptídeo de acordo com a nomenclatura de ROESPSTORFF e FOHLMAN.	31
Figura 7 - <i>Hypsiboas cinerascens</i>	45
Figura 8 - <i>Hypsiboas geographicus</i>	46
Figura 9 - Obtenção da secreção por estimulação elétrica.	54
Figura 10 - Reação de Redução e Alquilação.....	58
Figura 11 - Pele seca de <i>H. cinerascens</i> fixada em uma placa de MALDI.	59
Figura 12 - Produtos usados na síntese.....	63
Figura 13 - Mecanismo para desproteção da resina.	64
Figura 14 - Mecanismo da reação de ativação do aminoácido.....	64
Figura 15 - Mecanismo do acoplamento do primeiro resíduo de aminoácido.	65
Figura 16 - Reação geral de síntese.	65
Figura 17 - Purificação do ETHC por CLAE.	68
Figura 18 - Cromatograma analítico da fração 8.....	71
Figura 19 – Espectro de Massas da fração 2-8 de H.C.....	72
Figura 20 - Sequência obtida da fragmentação do íon m/z 2.718,7 u.....	73
Figura 21 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 2-8.....	75
Figura 22 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 2-8.	75
Figura 23 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 2-8 de H.C.....	76

Figura 24 - Cromatograma analítico da fração 13 de H.C.....	78
Figura 25 - Espectro de Massa da Fração 4-13 antes e depois da reação.....	79
Figura 26 - Sequência obtida da fragmentação do íon m/z 1.269,7 u.....	80
Figura 27 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 4-13.....	81
Figura 28 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 4-13	82
Figura 29 - Espectro de Massa da Fração 5-13 antes e depois da reação.....	83
Figura 30 - Sequência obtida da fragmentação do íon m/z 1.653,9 u.....	84
Figura 31 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 5-13 de H.C.	85
Figura 32 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 5-13 de H.C.....	86
Figura 33 – Cromatograma analítico da fração 15 de H.C.	87
Figura 34 - Espectro de Massas da fração 5-15.....	88
Figura 35 - Sequência obtida da fragmentação do íon m/z 2.490,5 u.....	89
Figura 36 - Sequência obtida da fragmentação do íon m/z 2.052,2 u.....	90
Figura 37 - Predição da estrutura secundária do peptídeo com m/z 2.490,5 u da fração 5-15 de H.C.....	92
Figura 38 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo com m/z 2.490,5 u da fração 5-15 de H.C.....	92
Figura 39 - Conformação em 3D do peptídeo com m/z 2.490,5 u da fração 5-15 de H.C.	93
Figura 40 - Predição da estrutura secundária do peptídeo com m/z 2.052,2 u da fração 5-15 de H.C.....	94
Figura 41 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo com m/z de da 2.052,2 u da fração 5-15 de H.C.....	95
Figura 42 - Conformação em 3D do peptídeo com m/z 2.052,2 u da fração 5-15 de H.C.	96
Figura 43 - Cromatograma analítico da fração 16.....	97
Figura 44 - Espectro de Massas da fração 4-16 de H.C.	98
Figura 45 - Sequência obtida da fragmentação do íon m/z 1.861,0 u.....	99

Figura 46 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 4-16 de H.C.	100
Figura 47 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 4-16 de H.C.	101
Figura 48 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 4-16 de H.C.	102
Figura 49 - Espectro de Massas da fração 5-16.	103
Figura 50 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 2.603,2 u.	104
Figura 51 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 5-16 H.C.	105
Figura 52 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 5-16 de H.C.	106
Figura 53 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 5-16 de H.C.	107
Figura 54 - Cromatograma analítico da fração 17 de H.C.	108
Figura 55 - Espectro de Massas no modo MS da fração 4-17 de H.C.	109
Figura 56 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 1.993,3 u.	110
Figura 57 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 4-17.	112
Figura 58 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 4-17 de H.C.	112
Figura 59 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 4-17 de H.C.	113
Figura 60 - Espectro de massas dos íons totais da fração 6-17 de H.C.	114
Figura 61 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 2.243,3 u.	115
Figura 62 - Predição da estrutura secundária do peptídeo com m/z 2.243,3 u da fração 6-17.	117
Figura 63 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo com m/z 2.243,3 u.	117
Figura 64 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 6-17 de H.C.	118
Figura 65 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 2.950,6 u.	120
Figura 66 - Predição da estrutura secundária do peptídeo de m/z 2.950,6 u da fração 6-17.	122
Figura 67 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo de m/z 2.950,6 u da fração 6-17	122
Figura 68 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 6-17 de H.C.	123
Figura 69 - Espectro de Massas da fração 7-17 de H.C.	124

Figura 70 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 2.393,4.....	125
Figura 71 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 7-17.....	126
Figura 72 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 7-17 de <i>H.C.</i>	127
Figura 73 - Conformação 3D do peptídeo da fração da fração 7-17 de <i>H.C.</i>	128
Figura 74 - Cromatograma analítico da fração 18 de <i>H.C.</i>	129
Figura 75 - Espectro de Massas da fração 7-18 de <i>H.C.</i>	130
Figura 76 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 2.165,3 u.	131
Figura 77 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 7-18 de <i>H.C.</i>	132
Figura 78 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 7-18 de <i>H.C.</i>	133
Figura 79 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 7-18 de <i>H.C.</i>	134
Figura 80 - Cromatograma analítico da fração 19 de <i>H.C.</i>	135
Figura 81 - Espectro de Massas no modo MS da fração 4-19 de <i>H.C.</i>	136
Figura 82 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 2.395,3 u.	137
Figura 83 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 4-19 de <i>H.C.</i>	138
Figura 84 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 4-19.	139
Figura 85 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 4-19 de <i>H.C.</i>	140
Figura 86 - Cromatograma analítico da fração 20 de <i>H.C.</i>	141
Figura 87 - Espectro de Massas da fração 2-20.....	142
Figura 88 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 2.386,4 u.	143
Figura 89 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 2-20.....	144
Figura 90 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 2-20 de <i>H.C.</i>	145
Figura 91 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 2-20 de <i>H.C.</i>	146
Figura 92 - Sequência peptídica com massa teórica 1.725,1 u.....	152
Figura 93 - Projeção Schiffer-Edmundson dos peptídeos do grupo LLE codificados no gene de <i>H.C.</i>	153
Figura 94 - Sequência codificada no gene confirmando o peptídeo da fração 2-20. ...	155

Figura 95 - Projeção Schiffer-Edmundson dos peptídeos do grupo hylaseptina codificados no gene.	157
Figura 96 - Sequência codificada no gene confirmando o peptídeo da fração 4-13. ...	159
Figura 97 - Sequência codificada com massa teórica 1.463,6 u.....	160
Figura 98 - Projeção Schiffer-Edmundson dos peptídeos do grupo GCW codificados no gene de H.C.	162
Figura 99 - Região onde foi realizada a varredura por MALDI-imaging.	163
Figura 100 - Representação pictórica do peptídeo sequenciado com m/z 2.386,5 u. ...	164
Figura 101 – Representação pictórica do peptídeo sequenciado com m/z 2.718,7 u ...	164
Figura 102 – Representação pictórica do peptídeo sequenciado com m/z 2.603,2 u. ...	165
Figura 103 - Purificação do ETHG por CLAE.....	166
Figura 104 - Cromatograma analítico da fração 5 de <i>H.G.</i>	168
Figura 105 - Espectro de Massa da fração 3-5 de <i>H.G.</i>	169
Figura 106 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 1.449,9 u.	170
Figura 107 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 3-5 de <i>H.G.</i>	172
Figura 108 - Cromatograma analítico da fração 6 de <i>H.G.</i>	173
Figura 109 - Espectro de Massa da fração 5-6 de <i>H.G.</i>	174
Figura 110 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 1.860,9 u.	175
Figura 111 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 5-6 de <i>H.G.</i>	176
Figura 112 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 5-6 de <i>H.G.</i>	177
Figura 113 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 5-6 de <i>H.G.</i>	178
Figura 114 - Espectro de Massas da fração 6-6 de <i>H.G.</i>	179
Figura 115 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 1.731,0 u.	180
Figura 116 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 6-6 de <i>H.G.</i>	181
Figura 117 - Cromatograma analítico da fração 7 de <i>H.G.</i>	182
Figura 118 - Espectro de Massas da fração 1-7 de <i>H.G.</i>	183

Figura 119 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 2.594,4 u.....	184
Figura 120 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 1-7 de H.G.	185
Figura 121 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 1-7 de H.G.....	186
Figura 122 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 1-7 de H.G.	187
Figura 123 - Espectro de massa cinerascetina sintético.	189
Figura 124 - Sequência de cinerascetina sintético.....	190
Figura 125 - Cromatograma analítico da fração 11 de H.C.....	206
Figura 126 - Espectro de massa no modo MS da fração 2-11 de H.C.	206
Figura 127 - Espectro de massa no modo MS ² do peptídeo de m/z 1364.85 u de H.C.	207
Figura 128 - Cromatograma analítico da fração 12 de H.C.....	208
Figura 129 - Espectro de massa no modo MS da fração 4-12 de H.C.	208
Figura 130 - Espectro de massa no modo MS ² do peptídeo com m/z 1.348,6 u de H.C.	209
Figura 131 - Cromatograma analítico da fração 14 de H.C.....	210
Figura 132 - Espectro de massa no modo MS da fração 9-14 de H.C.	210
Figura 133 - Espectro de massa no modo MS ² do peptídeo com m/z 924,6 u de H.C.	211

II – ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclatura dos 20 aminoácidos essenciais.....	29
Tabela 2 - Lista dos 20 aminoácidos mais comuns e seus íons fragmentos.....	33
Tabela 3 – Exemplos de massas de possíveis dipeptídeos.	34
Tabela 4 - Exemplos de famílias de PAMs.	37
Tabela 5. Continuação das Famílias de PAMs.	38
Tabela 6 - Peptídeos identificados no gênero <i>Hypsiboas</i>	43
Tabela 7 - Grupo das hylaseptinas.....	147
Tabela 8 - Grupo das raniseptinas.	148
Tabela 9 – Grupo dos GLF.	149
Tabela 10 - Grupo dos peptídeos cíclicos alquilados.	150
Tabela 11 - Grupo das fenilseptina.....	150
Tabela 12 - Grupo dos peptídeos LLE.....	153
Tabela 13 - Grupo das hylaseptinas 2.....	156
Tabela 14 - Grupo dos peptídeos RIC2.	159
Tabela 15 - Grupo dos peptídeos GCW.....	161
Tabela 16 – Grupo da brevinina.	188
Tabela 17 - Grupo das bombesinas.....	188
Tabela 18 - Atividade antimicrobiana de C-01.	191

III – ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Frações e Subfrações do ETHC.....	69
Esquema 2 - Frações e Subfrações do ETHG	167

IV - LISTA DE ABREVIACOES

PAMs	-----	Peptídeos antimicrobianos.
RFAD	-----	Reserva Florestal Adolpho Ducke
LPS	-----	Lipopolissacarídeo.
mRNA	-----	cido Ribonucleico mensageiro.
CEEA	-----	Comitê de tica em Experimentação Animal
IBAMA	-----	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
TFA	-----	cido Trifluoroacético
CLAE	-----	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
MS	-----	Espectrometria de Massa
(LIFT) LID	-----	Dissociação induzida por Laser.
u	-----	Unidade de Massa Unificada
ESI	-----	Electrospray ionization
SOPMA	-----	Self-optimizeid prediction method amino acids.
Blasp	-----	Basic Local Alignment Search Tool Protein
I-TASSER	-----	Iterative Threading ASSEMBly Refinement
kDa	-----	Quilo Dalton
IMS	-----	Imagem por espectrometria de massa.
MALDI-TOF-TOF	-----	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight - Time of Flight</i>
HBTU	-----	Hexafluorofosfato de O-benzotriazola- <i>N,N,N,N</i> - tetrametilurnio.
MBHA	-----	Methylbenzhydrylamine
DMF	-----	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DIPEA	-----	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
ACN	-----	Acetonitrila
CIM	-----	Concentração Inibitria mínima

N-Terminal-----Amino – Terminal
C-Terminal-----Carboxi – Terminal
ETHG -----Extrato total da secreção de *hypsiboas geographicus*
ETHC----- Extrato total da secreção de *hypsiboas cinerascens*
NCCLS-----National Committee for Clinical Laboratory Standards
CLSI----- Clinical & Laboratory Standards Institute.
DS01-----Dermaseptina 01
E. coli ----- *Escherichia coli*
P. aeruginosa ----- *Pseudomonas aeruginosa*
S. aureus ----- *Staphylococcus aureus*
C. albicans ----- *Candida albicans*
E. faecalis ----- *Enterococcus faecalis*
B. subtilis ----- *Bacillus subtilis*
C. parapsilosis ----- *Candida parapsilosis*
C. neoformans ----- *Cryptococcus neoformans*
B. cereus ----- *Bacillus cereus*
L. monocytogenes ----- *Listeria monocytogenes*

V – RESUMO

Peptídeos identificados em anuros exibem diversas atividades biológicas sendo a principal delas a atividade antimicrobiana (bactérias e/ou fungos patogênicos). Peptídeos antimicrobianos conhecidos com PAMs representam uma promissora fonte de compostos ativos para superar o problema do aumento de cepas resistentes aos antibióticos utilizados. A identificação de PAMs requer a utilização de técnicas analíticas sensíveis uma vez que a quantidade de material é limitada. Neste sentido, espectrometria de massa (MS) acoplada a técnicas cromatográficas desempenham um papel importante para identificação de peptídeos. Técnicas modernas de MS tais como imagem por espectrometria de massa e ferramentas de biologia molecular como o sequenciamento do ácido desoxirribonucleico também são utilizados em combinação para proporcionar a rápida identificação/sequenciamento de novos peptídeos. Neste trabalho foi realizado o estudo da secreção cutânea de duas espécies de anuros, *Hypsiboas cinerascens* e *H. geographicus*. Até o momento da espécie *H. geographicus* foi possível identificar 4 novos peptídeos, que apresentaram identidade significativa com peptídeos biologicamente ativos de anfíbios, sendo que 3 deles apresentaram-se com homólogos a fragmentos da proteína bombesina. Em relação a espécie *H. cinerascens* foi possível identificar 36 novos peptídeos, que foram organizados em grupos distintos de acordo com a similaridade de suas sequências, sendo que alguns apresentaram identidade significativa com os depositados em banco de dados. Desses 36 peptídeos 3 tiveram suas sequências confirmadas por MS e c-DNA, sendo que um deles foi sintetizado tendo atividade contra fungos e bactérias.

Palavras Chave: anuros, anfíbios, secreção da pele, *Hypsiboas*, PAMs.

VI – ABSTRACT

Peptides identified in frogs exhibit various biological activities the main one being the antimicrobial activity (bacteria and/or pathogenic fungi). Antimicrobial peptides known to AMPs represent a promising source of active compounds to overcome the problem of the increase in resistant strains to antibiotics used. AMPs Identification requires the use of sensitive analytical techniques since the amount of material is limited. In this regard, mass spectrometry (MS) coupled chromatographic techniques play an important role in identification peptides. MS modern techniques such as image by mass spectrometry and molecular biology tools such as deoxyribonucleic acid sequencing are also used in combination to provide quick identification / sequencing novel peptides. In this work the study of skin secretion of two species of frogs, *Hypsiboas cinerascens* and *H. geographicus*. At the time of *H. geographicus* species were identified 4 new peptides, which showed significant identity with biologically active peptides of amphibians, and 3 of them presented with homologous fragments of the protein bombesin. For *H. cinerascens* species was identified 36 new peptides, which were organized in distinct groups according to the similarity of their sequences, some of which showed significant identity with deposited in the database. These 36 peptides only 3 were had their sequences confirmed by MS and c-DNA and one of them was synthesized having activity against fungi and bacteria.

Keywords: anura, amphibiam, skin secretion, *Hypsiboas*, AMPs.

SUMÁRIO

I – ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
II – ÍNDICE DE TABELAS	xiv
III – ÍNDICE DE ESQUEMAS	xv
IV - LISTA DE ABREVIACÕES.....	xvi
V – RESUMO	xviii
VI – ABSTRACT.....	xix
1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Peptídeos.	27
1.1.1 Peptidômica.....	29
1.1.2 Peptídeos Antimicrobianos de Anfíbios.	35
1.2 Anuros Hylidae	41
1.2.1 Gênero <i>Hypsiboas</i>	42
1.2.1.1 <i>Hypsiboas cinerascens</i>	44
1.2.1.2 <i>Hypsiboas geographicus</i>	45
2. JUSTIFICATIVA.....	47
3. OBJETIVOS	50
3.1 Objetivo Geral:	51
3.2 Objetivos Específicos:	51
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1. Coleta do Material	53
4.2. Obtenção das Amostras	53
4.2.1. Estimulação Elétrica.	53
4.3. Isolamento e purificação dos constituintes.	55
4.4. Dissecção da pele.	55
4.4. Espectrometria de Massa.	56
4.4.1. Espectrometria de Massa de Sistema MALDI-TOF-TOF.	56
4.4.1.1. <i>Estudo dos peptídeos contendo ponte de dissulfeto</i>	57
4.4.1.2. <i>Análise da imagem por MALDI</i>	58
4.5. Identificações das sequências peptídicas por c-DNA.	60
4.6. Métodos Computacionais	61
4.7. Síntese peptídica em fase sólida.	62
4.8. Testes antimicrobianos.	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	67
5.1. Purificação do ETHC.	68
5.2. Espectros de Massas e estudos computacionais dos peptídeos de <i>H. cinerascens</i>.	70
5.2.1. Identificação do peptídeo da fração 8 de <i>H.C.</i>	71
5.2.2. Identificação dos peptídeos da fração 13 de <i>H.C.</i>	78

5.2.2. Identificação do peptídeo da fração 4-13 de <i>H.C.</i>	79
5.2.2. Identificação do peptídeo da fração 5-13 de <i>H.C.</i>	83
5.2.3. Identificação dos peptídeos da fração 15.	87
5.2.3.1. Identificação dos peptídeos a fração 5-15 de <i>H.C.</i>	88
5.2.4. Identificação dos peptídeos da fração 16 de <i>H.C.</i>	97
5.2.4.1 Identificação do peptídeo da fração 4-16 de <i>H.C.</i>	97
5.2.4.2 Identificação do peptídeo da fração 5-16 de <i>H.C.</i>	103
5.2.5. Identificação dos peptídeos da fração 17 de <i>H.C.</i>	108
5.2.5.1 Identificação do peptídeo da fração 4-17.	109
5.2.5.2 Identificação do peptídeo da fração 6-17 de <i>H.C.</i>	114
5.2.5.2 Identificação do peptídeo da fração 7-17 de <i>H.C.</i>	124
5.2.6. Identificação do peptídeo da fração 18.	129
5.2.7. Identificação do peptídeo da fração 19.	135
5.2.8. Identificação do peptídeo da fração 20.	141
5.3. Estudo do c-DNA de <i>H. cinerascens.</i>	151
5.3.1 Confirmação da sequência proposta obtida da fração 9-14 de <i>H.C.</i>	151
5.3.2. Confirmação da sequência proposta obtida da fração 2-20 de <i>H.C.</i>	155
5.3.3. Confirmação da sequência proposta obtida da fração 4-13 de <i>H.C.</i>	158
5.3.4. Identificação de sequências codificadas no gene de <i>H.C.</i>	160
5.4. Imagem por Espectrometria de Massas de <i>H. cinerascens.</i>	163
5.4. Purificação do ETHG.	166
5.5 Espectros de Massas e estudos computacionais dos peptídeos de <i>H. geographicus.</i> 168	
5.5.1 Identificação dos peptídeos da fração 5 de <i>H. geographicus.</i>	168
5.5.2 Identificação dos peptídeos da fração 6 de <i>H. geographicus.</i>	173
5.5.2.1 Identificação do peptídeo da fração 5-6 de <i>H. geographicus.</i>	174
5.5.2.2 Identificação dos peptídeos da fração 6-6 de <i>H. geographicus.</i>	179
5.5.3 Identificação dos peptídeos da fração 7 de <i>H. geographicus.</i>	182
5.6. Síntese peptídica em fase sólida.	189
5.7. Ensaios de atividade antimicrobiana.	191
6. CONCLUSÕES	193
7. REFERÊNCIAS	196
ANEXO	205

1. INTRODUÇÃO



Desde o início dos tempos o homem sempre se apoiou na natureza para obter recursos e desenvolver-se, sem se preocupar com que podia acontecer com os recursos naturais. Essa ação indiscriminada faz com que a flora seja eliminada com ritmo assustador, o que leva milhares de espécies de todos os reinos a desaparecer, algumas que nem chegaram a serem estudadas causando prejuízos incalculáveis para o mundo (CÂMARA, 2001; FEARNSSIDE, 2006; GODAR, et al., 2014).

A Amazônia é a maior floresta tropical do mundo possuindo uma extensão total de 5.500.000 Km², destes cerca de 60% estão em território brasileiro conhecido como Amazônia Legal, juntamente com a Mata Atlântica, Pantanal, Cerrado, Caatinga, Campos e Florestas Meridionais contribuem para que o Brasil seja detentor de um dos maiores bancos genético do planeta (CAPOBIANCO, et al., 2002). O país abriga aproximadamente 20% de todas as espécies animais do planeta. A variedade da flora também é impressionante, possuindo cerca de 20% das 1,5 milhões de espécies já catalogadas. São 56.000 espécies de plantas, 524 de mamíferos, 1.677 de aves, 3.000 de peixes e, isso representa respectivamente 22%, 10,8%, 17,2% e 10,7% das espécies existentes no mundo (TORRESI et al., 2012).

Em relação aos anfíbios, os números também são extraordinários. São 982 espécies que equivale a 13,3% das 7.351 espécies estimadas no mundo (Figura 1), sendo agrupadas em três ordens: Anura (sapos, rãs e pererecas), Caudata ou Urodela (salamandras) e Gymnophiona (cecílias ou cobras-cegas) correspondendo a respectivamente 88%, 9% e 3% das espécies de anfíbios (AMPHIBIAWEB, 2014).

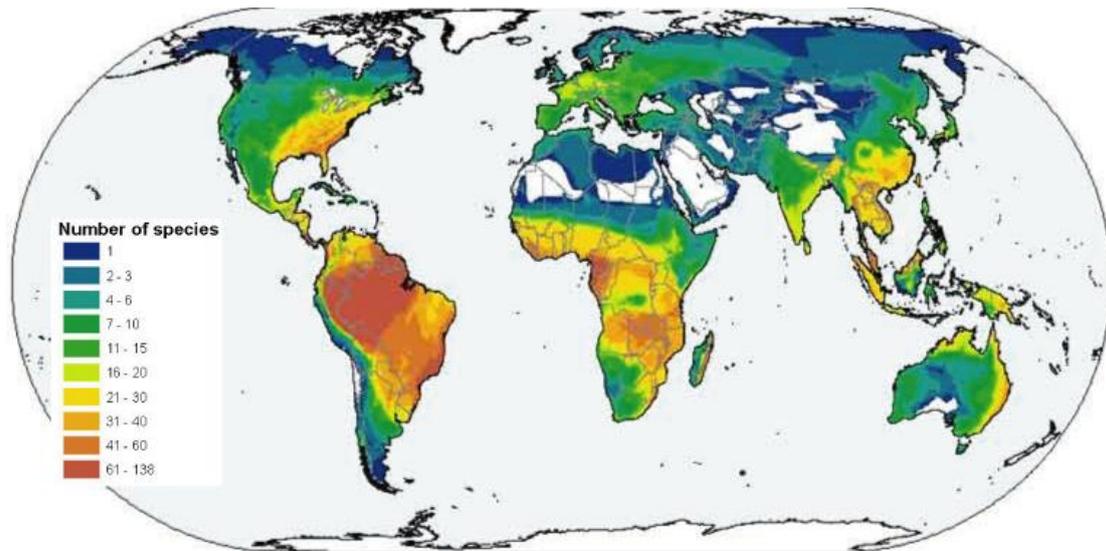


Figura 1 – Distribuição de espécies de anfíbios no mundo (AMPHIBIAWEB 2014). A variação do azul ao vermelho intenso indica a maior concentração de espécies de anuros.

Os anfíbios constituem um elo importante na teia alimentar do ecossistema são animais que passam parte da vida no meio aquático e meio terrestre, ou seja, dependem dos dois ambientes para sobreviver, essa característica os torna extremamente sensíveis a mudanças causadas em seu habitat natural tendo como exemplo às atividades humanas. São animais de pele extremamente sensível, sendo que este é um órgão de grande importância que possui diversas funções como: respiração cutânea transporte de água e solutos, regulação da temperatura entre outras (SEBBEN et al., 1993).

Essa sensibilidade os torna grandes indicadores biológicos, são os primeiros a sofrerem com as mudanças climáticas, predação, radiação ultravioleta, doenças, entre outros fatores que atuam isoladamente ou em conjunto provocando a redução do número de desovas e o aumento da mortalidade de embriões (VERDADE et al., 2010).

Por essas e outras razões, suas populações estão desaparecendo em diversos pontos do planeta (Figura 2) levando a um grave desequilíbrio da natureza com consequências desastrosas para o homem.

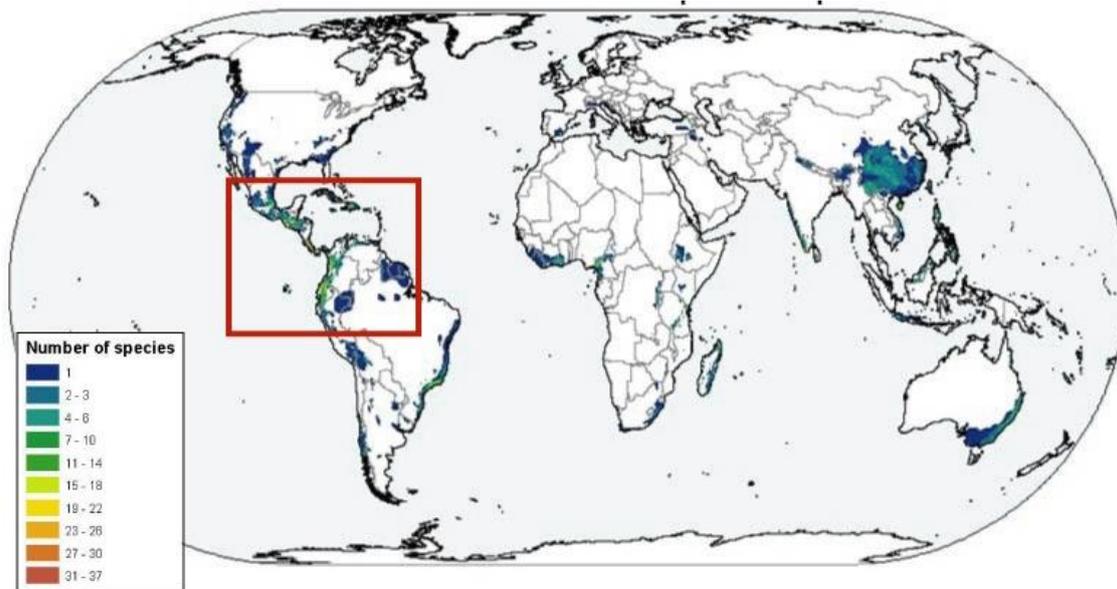


Figura 2 - Número de espécies ameaçadas (AMPHIBIAWEB 2014).
A variação do azul ao vermelho intenso indica a maior concentração de espécies de anuros ameaçadas.

Outro aspecto, importante sobre os anfíbios é o aspecto farmacológico espécies pertencentes a essa classe, produzem, armazenam e secretam substâncias que podem trazer benefícios diretos ao homem quando utilizados de maneira correta (CARDOSO et al., 2014).

As populações indígenas fazem grande uso das secreções dos anfíbios como por exemplo: os índios da região do Chocó (Colombia) que utilizam o veneno de *Phyllobates terribilis* (Dendrobatidae) para envenenar as pontas de dardos para serem lançados em zarabatanas durante caçadas (MYERS et al., 1978). Hoje em dia sabe-se que o principal componente do veneno de *P. terribilis*, é o alcaloide batracotoxina X (Figura 4) que possui toxicidade na faixa de 2 µg por kg de mamífero (PELLETIER, 1986).

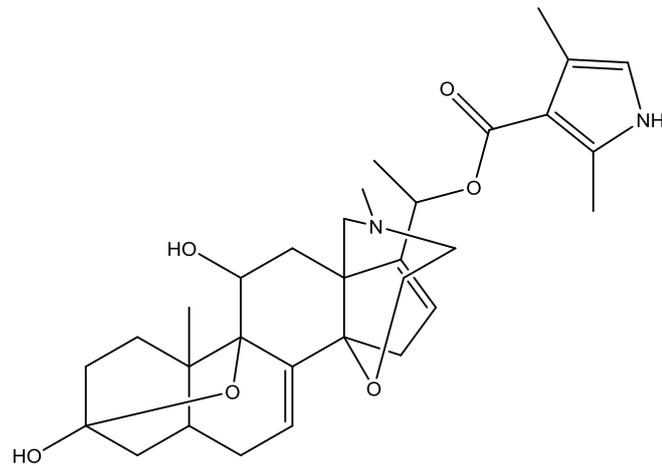


Figura 3 - Estrutura do alcaloide Batracotoxina (BTX).

Na pele dos anuros são encontrados dois sistemas de glândulas totalmente distintas, as glândulas mucosas e as glândulas serosas (Figura 4). As glândulas mucosas são menores e distribuem-se por todo o corpo. São responsáveis por manter a pele úmida, propiciando a respiração cutânea. As glândulas serosas são maiores e são responsáveis pelo armazenamento de substâncias biologicamente ativas, como: amins biogênicas, alcaloides, esteroides, peptídeos, além de proteínas e glicoproteínas (ERSPAMER & MELCHIORRI, 1973; 1980; TOLEDO & JARED, 1995).

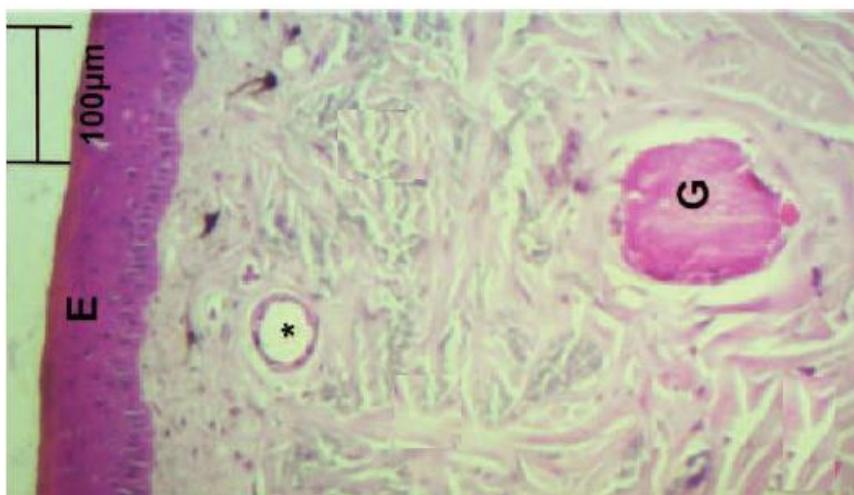


Figura 4 - Corte histológico da derme de *Rhinela schneideri*. Evidenciando (E) epiderme, (*) glândulas mucosas e (G) glândulas serosas (SOUZA et al., 2015).

Nos últimos anos, ficou evidenciado que algumas moléculas presentes nas secreções cutâneas dos anuros possuem extraordinários efeitos biológicos como por exemplo: irritantes locais, cardiotoxinas, neurotoxinas, alucinogênicos, agentes citotóxicos e antimicrobianos (KONIG et al., 2015).

Essas substâncias são usadas pelos anfíbios essencialmente para defesa contra predadores.

1.1 Peptídeos.

Existem três tipos de macromoléculas que são essenciais aos processos vitais das células: os polissacarídeos, os ácidos nucleicos e as proteínas. As proteínas são encontradas em todas as células vivas, constituindo-se em cerca de $\frac{3}{4}$ do peso seco dos tecidos animais possuem várias funções: estrutural, catalítica, reguladora e imunológica. Os peptídeos são proteínas de baixo peso molecular que são em sua maioria formadas a partir da reação entre os grupos amina e carboxila dos 20 principais aminoácidos (Tabela 1). Duas moléculas de aminoácidos podem ser unidas covalentemente por meio de uma ligação amida substituída, chamada de ligação peptídica (Figura 5) (LEHNINGER, 2002).

Essa reação ocorre quando a hidroxila no C-terminal de um aminoácido reage com o hidrogênio do N-terminal de outro aminoácido, ocasionando a perda de uma molécula de água.

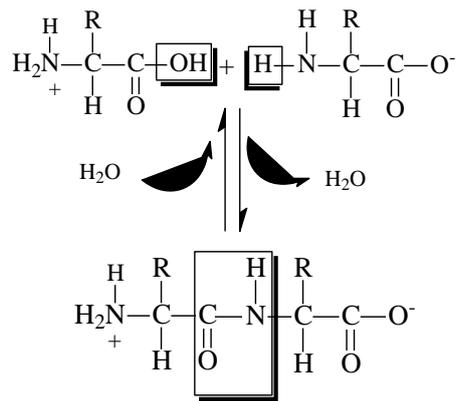
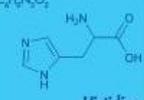
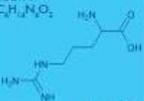
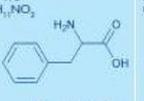
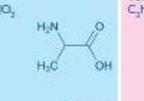
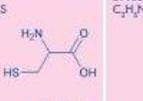
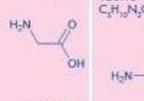
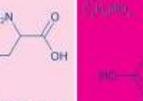
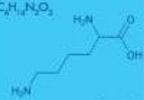
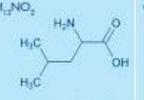
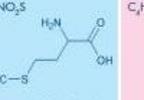
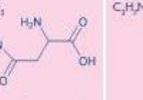
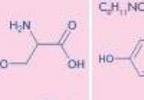
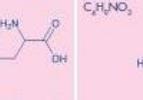
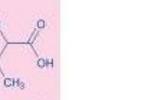
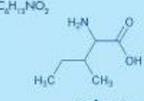
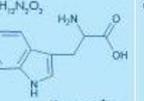
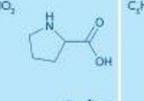
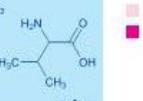
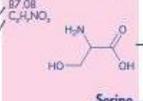


Figura 5 - Formação da ligação peptídica.

Os peptídeos possuem propriedades biológicas bastante significativas. Contudo, o real modo de ação desses peptídeos ainda continua de certa forma desconhecido, já que existem apenas modelos para explicar essa ação (RANG et al., 2000; HOSKIN & RAMAMOORTHY, 2008). Esses peptídeos apresentaram, por meio de bio-ensaios, in vitro e in vivo espectro amplo de atividades, das quais se destacam as seguintes: atividades hemolítica, bactericida, antifúngica e hormonal. Alguns trabalhos estão destacando o potencial antimicrobiano, especialmente contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos patogênicos (ZASLOFF, 2002; BOMAN, 1991), a qual apresenta um grande potencial terapêutico e farmacológico.

Tabela 1. Nomenclatura dos 20 aminoácidos essenciais.

Periodic Chart of Amino Acids
www.bachem.com

H 155.16 137.14 C ₆ H ₉ N ₃ O ₂  Histidine											D 133.10 119.09 C ₇ H ₉ NO ₄  Aspartic Acid
R 174.20 156.19 C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₂  Arginine	F 165.19 147.18 C ₉ H ₉ NO ₂  Phenylalanine	A 89.09 71.08 C ₃ H ₇ NO ₂  Alanine	C 121.16 103.14 C ₃ H ₇ NO ₂ S  Cysteine	G 75.07 57.05 C ₂ H ₅ NO ₂  Glycine	Q 146.15 128.13 C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₃  Glutamine	E 146.15 133.10 C ₇ H ₉ NO ₄  Glutamic Acid					
K 146.19 128.17 C ₆ H ₁₁ N ₃ O ₂  Lysine	L 131.18 113.16 C ₆ H ₁₃ NO ₂  Leucine	M 149.21 131.20 C ₄ H ₉ NO ₂ S  Methionine	N 132.12 114.10 C ₄ H ₈ N ₂ O ₃  Asparagine	S 105.09 87.08 C ₃ H ₇ NO ₃  Serine	Y 181.19 163.17 C ₉ H ₉ NO ₃  Tyrosine	T 119.12 101.10 C ₄ H ₉ NO ₂  Threonine					
I 131.18 113.16 C ₆ H ₁₃ NO ₂  Isoleucine	W 204.23 186.21 C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂  Tryptophan	P 115.13 97.12 C ₅ H ₉ NO ₂  Proline	V 117.15 99.13 C ₆ H ₁₁ NO ₂  Valine	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> <p>■ Basic</p> <p>■ Nonpolar (hydrophobic)</p> <p>■ Polar, uncharged</p> <p>■ Acidic</p> </div> <div> <p>1-Letter Amino Acid Code: S</p> <p>2-Letter Amino Acid Code: Ser</p> <p>Relative Molecular Mass: 105.09</p> <p>M_r - H₂O: 87.08</p> <p>Molecular Formula: C₃H₇NO₃</p> <p>Chemical Structure: </p> <p>Chemical Name: Serine</p> </div> </div>							

Aminoácidos básicos são mostrados em azul, hidrofóbicos em azul claro, polares em rosa e ácidos em vermelho

1.1.1. Peptidômica.

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica que consiste na medida de massa de íons na fase gasosa (SILVA et al., 2014). Desde o princípio a MS vem sendo empregada na determinação da assinatura isotópica e determinação elementar de moléculas orgânicas e inorgânicas, como uma ferramenta indispensável na elucidação estrutural. Um dos principais desafios da MS envolvia transferir moléculas altamente polares de até dezenas ou centenas de kDa à fase gasosa sem destruí-las.

Tal obstáculo foi superado por meio do desenvolvimento de técnicas de ionização branda tais como a eletronebulização (*electrospray ionization* – ESI) e a

ionização e dessorção por laser assistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption ionization* – MALDI) (FENN et al., 1989; TANAKA, et al., 1988) que ocorreu no final da década de 80.

Na técnica de MALDI, a amostra é ressuspendida com um ácido aromático de fácil cristalização que possui a capacidade de absorver luz ultravioleta. Ao irradiar um feixe de laser com comprimento de onda apropriado sobre a mistura cristalizada, as moléculas de matriz em excesso sublimam-se transportando a amostra com ele (STULTS 1995).

Nesse processo a matriz desempenha um importante papel absorvendo fortemente a energia do laser, causando indiretamente a vaporização da amostra e funcionando como doador de prótons ou receptor de prótons, assim ionizando a amostra alvo em modo positivo ou negativo.

Embora a marca registrada das análises por MALDI seja biomoléculas com massa elevada, essa técnica é excelente para pequenas moléculas como os peptídeos em particular (HILLENKAMP et al., 1991).

A extrema sensibilidade e a simplicidade são características fundamentais para esta aplicação. Peptídeos obtidos após a digestão trípica de proteínas podem ser prontamente analisadas sem a necessidade de separação. Sendo que peptídeos com a mesma massa molecular podem facilmente serem separadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (LEWIS et al., 2000).

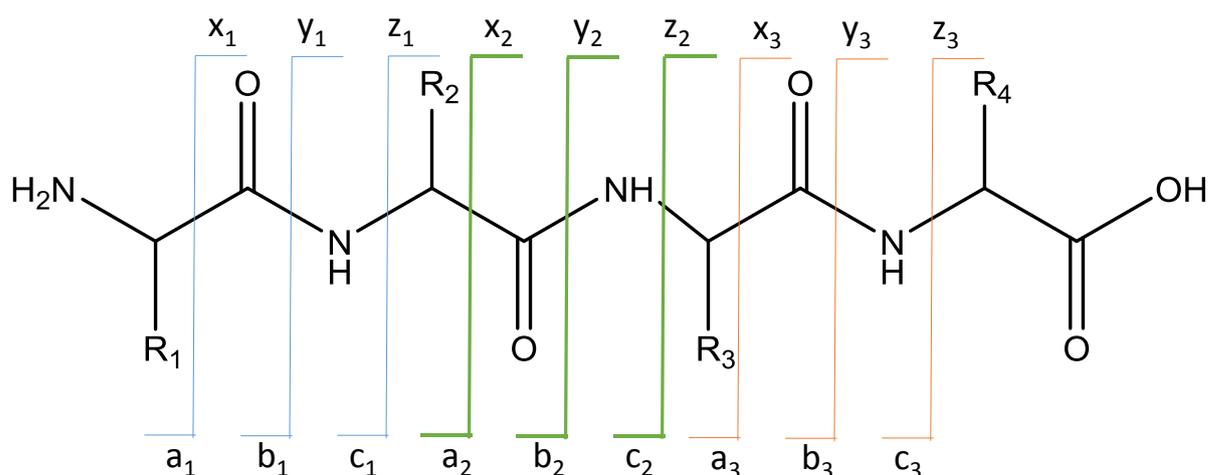
Para o estudo de MS de peptídeos provenientes de anuros a técnica de MALDI se torna indispensável, já que a quantidade de material obtida de algumas espécies é limitada e de fácil degradação, tornando necessário o uso de uma técnica que seja eficiente com pouca quantidade de material e ao mesmo tempo seja suave afim de evitar

a degradação do material biológico. Sendo que estas são duas características principais da técnica de MALDI (KAUFMANN et al., 1995).

Uma das características da técnica de MALDI aplicada no estudo de peptídeos de anuros e a capacidade de a técnica identificar modificações Pós-traducionais (fosforilação, sulfonação, glicosilação, modificações no N-terminal e outros) (LEWIS et al., 2000).

A MS para peptídeos também pode ser aplicada *in tandem*, conhecida como MS/MS, que envolve a fragmentação dos peptídeos selecionados. Para esse tipo de estudo a técnica de MALDI usa o analisador do tipo Time of Flight (TOF) que é traduzido para o português como tempo de voo, quando é usado para fragmentação o sistema é do tipo MALDI-TOF/TOF.

No analisador TOF/TOF o peptídeo é fragmentado por meio de dissociação induzida por laser (LID). Após obtidos fragmentos o peptídeo é sequenciado manualmente de acordo com os íons fragmentos obtidos que são denominados -a, -b e -c se a quebra for no C-terminal e, denominados -x, -y e -z se a quebra for no N-terminal



(ROEPSTORFF & FOHLMAN, 1984) (Figura 5).

Figura 6 – Estrutura química geral da fragmentação de um peptídeo de acordo com a nomenclatura de ROESPSTORFF e FOHLMAN.

Vale ressaltar que os pares de íons a/x , b/y e c/z serão sempre íons correspondentes e complementares entre si. Considerando que a ligação amida é a menos energética é de se esperar que a formação do par $-b/-y$ seja mais evidente, facilitando a interpretação dos espectros. A diferença entre os valores de m/z entre dois íons consecutivos da series do mesmo tipo pode revelar a identidade do resíduo de aminoácido em questão (CANTÚ, et al., 2008).

Quando a fragmentação ocorre simultaneamente nas posições N e C-terminal do mesmo resíduo de aminoácido, sendo possível identificar as series $-b$ e $-y$ referentes a tal aminoácidos, os íons imônio também são produzidos (Tabela 2). Os íons imônio servem como indicativo da presença ou ausência de certos aminoácidos, como por exemplo os aminoácidos aromáticos triptofano (W), tirosina (Y) e fenilalanina (F) que são os mais raros a serem encontrados na sequencia peptídica, possuem como íons imônio m/z 159, 136 e 120 respectivamente (LEWIS et al., 2000).

Tabela 2 - Lista dos 20 aminoácidos mais comuns e seus íons fragmentos.

Aminoácido			Massa média	Íon imônio	Íons Observados
Alanina	Ala	A	71.08	<i>44.05</i>	
Arginina	Arg	R	156.19	<i>129.11</i>	59,70,73,87
Asparagina	Asn	N	114.10	<i>87.05</i>	70
Ácido Aspártico	Asp	D	115.09	<i>88.04</i>	70
Cisteína	Cys	C	103.14	<i>76.02</i>	
Ácido Glutâmico	Glu	E	129.12	<i>102.05</i>	
Glutamina	Gln	Q	128.13	<i>101.07</i>	56,84,129
Glicina	Gly	G	57.05	<i>30.03</i>	
Histidina	His	H	137.14	<i>110.07</i>	82,121,123
Isoleucina	Ile	I	113.16	<i>86.09</i>	44,72
Leucina	Leu	L	113.16	<i>86.09</i>	44,72
Lisina	Lys	K	128.17	<i>101.10</i>	70,84,112,129
Metionina	Met	M	131.19	<i>104.05</i>	61
Fenilalanina	Phe	F	147.18	<i>120.08</i>	91
Prolina	Pro	P	97.12	<i>70.06</i>	
Serina	Ser	S	87.08	<i>60.04</i>	
Treonina	Thr	T	101.10	<i>74.06</i>	
Triptofano	Trp	W	186.21	<i>159.09</i>	77,117,130
Tirosina	Tyr	Y	163.18	<i>136.07</i>	91,107
Valina	Val	V	99.13	<i>72.08</i>	41,55,69

Se em uma das series $-b$ ou $-y$ de a diferença entre resíduos referente ao aminoácido W, e não for encontrado o íon de m/z 159, esse resíduo não pode ser triptofano. Uma possível interpretação para essa situação seria a possibilidade de identificar resíduos de dipeptídeos (CANTÚ, et al., 2008).

Isso ocorre quando dois aminoácidos em uma sequência peptídica fragmentam juntos gerando apenas um íon sendo este referente aos dois resíduos de aminoácidos, algumas dessas combinações são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Exemplos de massas de possíveis dipeptídeos.

	G	A	S	P	V	T	C	L/I	N	D	Q/ K	E	M	H	
	57	71	87	97	99	101	103	113	114	115	128	129	131	137	
G	57	11													
		5													
A	71	12	14												
		9	3												
S	87	14	15	17											
		5	9	5											
P	97	15	16	18	19										
		5	9	5	5										
V	99	15	17	18	19	19									
		7	1	7	7	9									
T	101	15	17	18	19	20	20								
		9	3	9	9	1	3								
C	103	16	17	19	20	20	20	20							
		1	5	1	1	3	5	7							
L/I	113	17	18	20	21	21	21	21	22						
		1	5	1	1	3	5	7	7						
N	114	17	18	20	21	21	21	21	22	22					
		2	6	2	2	4	6	8	8	9					
D	115	17	18	20	21	21	21	21	22	23	23				
		3	7	3	3	5	7	9	9	0	1				
Q/ K	128	18	20	21	22	22	23	23	24	24	24	257			
		6	0	6	6	8	0	2	2	3	4				
E	129	18	20	21	22	22	23	23	24	24	24	258	25		
		7	1	7	7	9	1	3	3	4	5		9		
M	131	18	20	21	22	23	23	23	24	24	24	260	26	26	
		9	3	9	9	1	3	5	5	6	7		1	3	
H	137	19	20	22	23	23	23	24	25	25	25	266	26	26	27
		5	9	5	5	7	9	1	1	2	3		7	9	5
F	147	20	21	23	24	24	24	25	26	26	26	276	27	27	28
		5	9	5	5	7	9	1	1	2	3		7	9	5
R	156	21	22	24	25	25	25	26	27	27	27	285	28	28	29
		4	8	4	4	6	8	0	0	1	2		6	8	4
Y	163	22	23	25	26	26	26	26	27	27	27	292	29	29	30
		1	5	1	1	3	5	7	7	8	9		3	5	1
W	186	24	25	27	28	28	28	29	30	30	30	315	31	31	32
		4	8	4	4	6	8	0	0	1	2		6	8	4

Os valores correspondem à soma das massas dos resíduos dos aminoácidos acrescidos de uma unidade de massa

Um outro problema que ocorre no sequenciamento de peptídeos é a existência de pontes dissulfeto no peptídeo. As pontes dissulfeto existentes em uma cadeia

polipeptídica ligando dois resíduos de cisteínas. Essas pontes podem ser identificadas, quando o peptídeo é submetido a fragmentação, onde se observa a não fragmentação do peptídeo ou fragmentação de apenas uma parte do peptídeo. Porém essas pontes podem ser quantificadas e localizadas, através da diferença de massa após reação simples de Redução e Alquilação das mesmas, onde o resíduo de cisteína com massa molecular de 103.0 u aparece no sequenciamento com massa 160 u, devido a alquilação da ponte de dissulfeto (PIRES et al., 2014).

1.1.2 Peptídeos Antimicrobianos de Anfíbios.

Antibióticos naturais são produzidos por organismos de diversos reinos e normalmente estocados em tecidos que estão constantemente em contato com patógenos.

Estas moléculas são em sua maioria de natureza peptídica, e constituem um sistema de defesa inato que funciona como barreira química contra a invasão de microrganismos patogênicos e complementa o sistema imune adaptativo mediado por células altamente específicas, funcionando assim como um sistema secundário de defesa de rápida ação (SHAI, 1999).

Dentre todos os organismos produtores de peptídeos antimicrobianos, os anfíbios pertencentes à ordem anura constituem provavelmente a mais rica fonte de moléculas bioativas dentre os vertebrados.

Erspamer (1994) agrupou esses peptídeos extraídos de secreção cutânea de anfíbios levando com base em sua estrutura química, afinidades por certos receptores e atividades biológicas. Os grupos principais: taquicinina, bradicinina, ceruleína, bombesina, sauvagina, opióides (Dermorfina, Deltorfinas), tireotropina (TRH), xenopsina, triptofilina, angiotensina, adenoregulina e peptídeos Antimicrobianos

(magaininas, bombininas, dermaseptinas, brevininas, caerinas, esculentinas, dicetopiperazinas). Nos anos seguintes, novas classes de peptídeos antimicrobianos foram surgindo como as temporinas (SIMMACO et al., 1996) e phylloseptinas (LEITE et al., 2005).

Sendo que a cada ano, vários novos PAMs são identificados a partir de espécies de anuros. Alguns desses novos peptídeos apresentam pouca ou nenhuma homologia com os já existentes, conseqüentemente novas famílias estão surgindo, sendo que atualmente esses peptídeos estão agrupados em pelo menos, 28 famílias distintas, alguns exemplos desses peptídeos são apresentados na Tabela 4 e Tabela 5.

Tabela 4 - Exemplos de famílias de PAMs.

Família	Peptídeos	Estrutura	Espécie	Referência
Medusins	Medusin-AC	LGMIPLAISAISLSKLG	<i>Agalychnis callidryas</i>	XINPING et al., 2013
Alyteserinas	Alyteserins-1a	GLKDIFKAGLGLSVKGS�VKGIA-AHVAN	<i>Alytes obstetricans</i>	CONLON et al., 2009d
Esculentinas-2-AL	Esculentin-2-Ala	GIFALIKTAAKFVGVGNLLKQA-GKAGLEHLACKANNQC	<i>Amolops loloensis</i>	WANG et al., 2010
Buforins	Buforin II	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	<i>Bufo bufo gargarizans.</i>	CHO et al., 2009
Brevininas-1	Brevinin-1LT1	FMGSALRIAARKVLPALCQIFKKC	<i>Hylarana latouchii</i>	WANG et al., 2009
Temporinas	Temporin-LT1	FLPGLIAGIAKML	<i>Hylarana latouchii</i>	WANG et al., 2009
Esculentinas-2	Esculentin – 2ERb	GILNTLKNVGLGVKGVKAGKGA-NAVLCCKMNNNC	<i>Hylarana erythraea</i>	AL-GHAFFERI et al., 2010
Temporins	Temporin-PTa	FFGSVLKLPKIL	<i>Hylarana picturata</i>	CONLON et al., 2008
Nigrocinas-2	Nigrocin-2HSa	GLLGSFLGAGKKVACALSGLC	<i>Hylarana picturata</i>	CONLON et al., 2008
Phylloseptinas	Phylloseptin-L2	FLSLIPHVISALSSL	<i>Hylomantis lemur</i>	ABDEL-WAHAB et al., 2008
Raniseptinas	RNSP 1	KVALGVAQNYLNPQQ	<i>Hypsiboas raniceps</i>	MAGALHÃES et al., 2008
Plasticinas	Plasticin-L1	GLVNGLLSSVLGGGQGGGGLLG-GIL	<i>Leptodactylus laticeps</i>	CONLON et al., 2009a
Ocellatinas	Ocellatin-L2	GVVDILKGAACKDLAGHLATKVM-DKLL	<i>Leptodactylus laticeps</i>	CONLON et al., 2009a
Brevininas-1	Brevinin-1BLc	FLPIIAGIAAKFLPKIFCTISKKC	<i>Lithobates blairi</i>	CONLON et al., 2009b

Tabela 5. Continuação das Famílias de PAMs.

Temporinas	Temporin-CPa	IPPFIKKVLTTVF	<i>Lithobates capito</i>	CONLON et al., 2009c
Ranatueringinas-2	Ranatueringin-2CPa	GIMDTIKDTAKTVAVGLLDKIKC-KITGC	<i>Lithobates capito</i>	CONLON et al., 2009c
Aurein	Aurein 2.2	GLFDIVKKVVGALGSL	<i>Litoria aurea</i>	WENZEL et al., 2015
Nigrocinas -2	Nigrocin-2HSb	GLLSIFGAGKKIACALSGLC	<i>Odorrana hosii</i>	CONLON et al., 2008
Frenatins	Frenatin 2.1s	GLVGTLLGHIGKAILG	<i>Orinoco lime</i>	COLON et al., 2014
Dermatoxinas	DRT-J1	SLGGFLKGVGKALAGVGVKVVAD-QFGNLLQAGQ	<i>Phasmahyla jandaia</i>	RATES et al., 2010
Brevininas-1	Brevinin-1CDYb	FFPLALLCKVFKKC	<i>Rana dybowskii</i>	JIN et al., 2009
Japocinas-1	Japocin-1CDYa	FFPLALLCKVFKKC	<i>Rana dybowskii</i>	JIN et al., 2009
Palustrinas-2	Palustrin-2Oa	GLWDNIKNFVKTFALNAIEKLKC-KITGGCPP	<i>Rana ornativentris</i>	OHNUMA et al., 2010
Pleurainas-As	Pleurain-A1	SIITMTKEAKLPOLWKOIACRL-YNTC	<i>Rana pleuraden</i>	WANG et al., 2007
Shuchinas	Shuchin1	NALSMPRNKCNRALMCFG	<i>Rana shuchinae</i>	ZHENG et al., 2010

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) encontrados na secreção cutânea de anuros (sapos, rãs e pererecas), são sintetizados e processados a partir de uma única família de polipeptídios precursores, sendo estes expressos na tradução de um RNA mensageiro característico, com regiões altamente conservadas entre os pertencentes às famílias Hylidae e Ranidae, o que sugere que espécies pertencentes a essas famílias possuem um ancestral em comum (NICOLAS et al., 2003).

Os peptídeos sintetizados e secretados por esses animais fazem parte de seu sistema imune inato de defesa, são potencialmente ativos contra um espectro largo de microrganismos patogênicos e alguns predadores, sendo que na maioria das vezes não apresentam toxicidade em células normais de mamíferos (BOMAN, 1991; ZASLOFF, 1992; PRATES et al., 2004; BRAND et al., 2006).

A diversidade de PAMs é tão grande que se torna difícil categorizá-los, principalmente em relação à sua estrutura primária, mas a maioria desses peptídeos possui características físico-químicas semelhantes, como: carga líquida positiva, devida à presença de resíduos catiônicos em sua estrutura primária. Todavia a principal delas consiste na habilidade do PAMs de dotar uma forma nos quais grupamentos de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos fiquem espacialmente organizadas, adquirindo uma estrutura secundária em forma de α -hélice anfipática em meio apolar (ZASLOFF, 2002; NICOLAS et al., 2003).

Esses peptídeos apresentaram, por meio de bio-ensaios, *in vitro* e *in vivo* amplo espectro de atividades, contra fungos patogênicos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BOMAN, 1991; MOR, et al., 1991; ABDEL-WAHAB, et al., 2008). Estima-se que esses efeitos estão inteiramente relacionados à suas características físico-químicas, comuns aos peptídeos antimicrobianos (CHOU et al., 2010; CARDOSO, et al., 2014).

Não se sabe ao certo o real modo de ação do PAMs, mas sabe-se que o seu principal alvo parecem ser as membranas plasmáticas, sendo que a desestabilização dessas membranas ocasionando a morte celular a partir da sua quebra, tem sido considerada o principal mecanismo pelo qual os PAMs exercem sua função. A diferença da estrutura e composição da membrana está diretamente relacionada com o modo de interação desses peptídeos. Estes são atraídos pelas superfícies das membranas das bactérias, através de ligações eletrostáticas, sendo este o ponto principal pelo qual os PAMs até agora caracterizados conseguem discriminar células procarióticas e eucarióticas (BROGDEN, 2005; ZASLOFF, 2002).

A membrana plasmática de organismos procariontes e eucariontes difere em sua composição química, tanto no conteúdo dos fosfolipídios como na presença de outros componentes tais como esteroides (LEHNINGER, 2002).

As membranas bacterianas caracterizam-se por serem organizadas de tal forma que as regiões periféricas da bicamada lipídica voltada para o meio extracelular, possuem conteúdo elevado de fosfolipídios carregados negativamente. Nas bactérias Gram-negativas, essa interação ocorre por meio dos lipopolissacarídeo (LPS) que são moléculas formadas de cadeias lipídicas e duas cadeias de oligossacarídeos, o oligossacarídeo central e a outra um oligossacarídeo específico (O-específica) o qual é o principal determinante do sorotipo da bactéria, sendo este carregado negativamente (HOSKIN& RAMAMOORTHY, 2008). Nas bactérias Gram-positivas essa interação ocorre com os ácidos teicóicos, que são polímeros de glicerol ou ribitol que não se apresentam entre as bactérias Gram-negativas. As unidades combinadas de ácidos teicóicos e lipídios denominam-se ácidos lipoteicóicos. Esses ácidos são carregados negativamente e, portanto, contribuem para a interação dos PAMs com a membrana das bactérias Gram-positiva (BROGDEN, 2005; HOSKIN& RAMAMOORTHY, 2008).

Em contraste a mesma face das membranas de animais é composta majoritariamente por fosfolipídios neutros (fosfatidilcolina e esfingomiéline), estando os fosfolipídios carregados negativamente (fosfatidilserina e fosfatidilglicerol) voltados para o interior da célula, de frente para o citoplasma (BROGDEN, 2005). A presença de colesterol na membrana animal, também reduz a atividade de alguns PAMs, sendo que este efeito é causado pelo colesterol tornar a bicamada lipídica mais rígida, ocasionando uma maior estabilização, e dificultando assim interações possíveis entre o colesterol e os PAMs (ZASLOFF, 2002; EPAND & VOGEL, 1999).

Existem alguns modelos que tentam descrever como ocorre a interação dos PAMs com as membranas, os mais citados são: ação de detergentes (detergent-like), formação de poros do tipo barril (barrel stave) e formação de poros toroidais (toroidal pore).

1.2 Anuros Hylidae.

As espécies pertencentes a família Hylidae estão distribuídas na América do Sul e do Norte, Índia Ocidental, Eurásia temperada, extremo norte da África e no arquipélago japonês (AMPHIBIAN SPECIES OF THE WORLD 5.4 2014). Os animais variam de pequenos a grande e geralmente têm discos adesivos na ponta dos dedos, distinguem-se pelo dedo do pé que contém uma pequena cartilagem da falange terminal, que pode ajudar na escalada (AMPHIBIAN SPECIES OF THE WORLD 5.4). Destaca-se entre as outras famílias por quantidade e diversidade de moléculas principalmente os PAMs (NICOLAS et al., 2003).

Esta família foi taxonomicamente revista por FAIVOVICH et al., 2005. É constituída por 950 espécies agrupadas em três subfamílias, sendo a *Hylinae* com 683 espécies, a *Pelodyadinae* com 207 e a *Phyllomedusinae* com 54 espécies e dois gêneros

distintos que não se agrupam a nenhuma subfamília, são eles, o gênero *Dryaderces* com 2 espécies e gênero *Lysapsus* com 4 espécies (AMPHIBIAWEB, 2015).

1.2.1 Gênero *Hypsiboas*.

O gênero *Hypsiboas* pertencente à família Hylidae possui 91 espécies, são encontradas na América do Sul desde a Nicarágua até a Argentina, e em Trinidad e Tobago (AMPHIBIAWEB) sendo que poucas foram estudadas no ponto de vista químico ou farmacológico. Até o momento das espécies de *Hypsiboas* que foram estudadas, foi possível identificar uma nova família de peptídeos antimicrobianos denominada raniseptina (MAGALHÃES et al., 2008) de *H. raniceps*, e nove novos peptídeos antimicrobianos hylina a1, a2 e CTx-Ha de *H. albopunctatus* (CASTRO et al., 2009; CESPEDES et al., 2012), hylaseptina P1 e fenilseptinas (D e L aminoácidos) de *H. punctata* (PRATES et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2013), hylinas b1 e b2 de *H. lundii* (CASTRO et al., 2005), P1-Hp-1971, P2-Hp-1935 e P3-Hp-1891 de *H. pulchelus* (SIANO et al., 2014) e Hs-1 de *H. semilineatus* (NACIF-MARÇAL et al., 2015) Tabela 6.

Tabela 6 - Peptídeos identificados no gênero *Hypsiboas*.

Peptídeo	Estrutura	Atividade frente	Isolado de	Referência
Hylaseptina P1	GILDAIKAIKAAG	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>C. albicans</i>	<i>Hypsiboas punctata</i>	PRATES et al., 2004
Fenilseptina	FFFDLTKNLAGKVIGALT	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>X. axonopodis</i> <i>pv glycines</i>	<i>Hypsiboas punctata</i>	MAGALHÃES et al., 2013
Hylins b1	FIGAILPAIAGLVHGLINR	Hemolítica	<i>Hypsiboas lundii</i>	CASTRO et al., 2005
RSP-1	KVALGVAQNYLNPQQ	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	<i>Hypsiboas raniceps</i>	MAGALHÃES et al., 2008
Hylin a1	IFGAILPLALGALKNLIK	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. faecalis</i> <i>B. subtilis</i> <i>C. albicans</i> , <i>K. parapsilosis</i> <i>C. neoformans</i> Hemolítica	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	CASTRO et al., 2009
P1-Hp-1971	TKPTLLGLPLGAGPAAGPGKR	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	<i>Hypsiboas pulchelus</i>	SIANO et al., 2014
Hs-1	FLPLILPSIVTALSSFLKQG	<i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. cereus</i> <i>L. monocytogenes</i>	<i>Hypsiboas semilineatus</i>	NACIF-MARÇAL et al., 2015

1.2.1.1 *Hypsiboas cinerascens*.

Hypsiboas cinerascens (Figura 6) é uma espécie que ocorre na Bacia Amazônica, Guiana, Suriname, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Guiana Francesa. O anuro é comum em áreas encharcadas próximas aos igarapés (LIMA et al., 2006).

Os machos medem cerca de 30-35 mm, e as fêmeas 33-37 mm. O seu dorso é verde-transparente, com pequenas manchas amarelas e manchas vermelhas diminutas. A região anterior do ventre é azulada e a posterior é verde-amarela. A íris é laranja ou prateada, e existe uma membrana azul escura acima do olho (AMPHIBIAWEB, 2014).

Hypsiboas cinerascens possui hábitos noturnos e é encontrada nas folhas e nos galhos das árvores com altura máxima de 1,50 cm, são encontrados frequentemente em áreas pantanosas próximas a igarapés em floresta primária e em borda de floresta (LIMA et al., 2006). Os anfíbios reproduzem-se durante o ano inteiro, com pico na estação chuvosa, de novembro a maio (AMPHIBIAWEB, 2014). Os machos vocalizam escondidos sob folhas. As fêmeas depositam cerca de 400 ovos em pequenas poças, normalmente ao lado de igarapés. Os girinos ficam dispersos e escondidos na liteira nas poças (AMPHIBIAN SPECIES OF THE WORLD 5.4).

Como na maioria das espécies desse gênero, não há estudos na literatura sobre seu perfil químico ou farmacêutico e nem em seu sinônimo *Hyla granosa*.



Fonte: Eder A. Barbosa

Figura 7 - *Hypsiboas cinerascens*.

1.2.1.2 Hypsiboas geographicus

Hypsiboas geographicus (Figura 7) é uma espécie que ocorre nas áreas tropicais da América do Sul a leste dos Andes. O organismo é comum em áreas próximas a igarapés (LIMA et al., 2006).

Os machos medem cerca de 42-60 mm, e as fêmeas 53-63 mm. A coloração do dorso é marrom-alaranjada a marrom. Na parte superior das pernas há listras claras e escuras. O ventre é amarelo-claro a alaranjado na parte posterior e branco na parte anterior. A íris é dourada alaranjada e existe uma membrana de cor azul acima do olho (AMPHIBIAWEB, 2014).

Hypsiboas geographicus possui hábitos noturnos e é encontrada nas folhas e nos galhos das árvores com altura máxima de 1,50 cm, são encontrados no interior e na

borda da floresta, frequentemente na proximidade de igarapés e poças com renovação de água.

A reprodução ocorre durante todo o ano (AMPHIBIAWEB, 2014). Os machos vocalizam na vegetação acima ou perto do corpo d'água. As fêmeas depositam em torno de 2500 pequenos ovos pretos na água de poças próximas a igarapés ou remansos de igarapés. Os girinos são pretos e ficam agregados na coluna d'água, em grupos, formando grandes massas negras que se deslocam na água (AMPHIBIAN SPECIES OF THE WORLD 5.4).

Como na maioria das espécies desse gênero, não há estudos na literatura sobre seu perfil químico ou farmacêutico e nem em seu sinônimo *Hyla geographica*.



Fonte: AMPHIBIAWEB

Figura 8 - *Hypsiboas geographicus*.

2. JUSTIFICATIVA



Em virtude de realizarem trocas gasosas através da pele e dependerem dos meios aquáticos e terrestres para sua sobrevivência, os anfíbios são considerados bioindicadores, são os primeiros a sofrerem com as mudanças climáticas e ambientais causadas pelo homem. Essas características os colocam no topo da lista de animais em extinção (VERDADE et al., 2010).

A secreção cutânea dos anuros é uma fonte rica de novas moléculas biologicamente ativas, sendo que essas substâncias são distribuídas por todo o seu corpo, e são usadas predominantemente em sua defesa, tanto contra predadores e como agentes patogênicos (ERSPAMER & MELCHIORRI, 1973; TOLEDO & JARED, 1995; DALY et al., 2008).

Além de atividades antimicrobianas também se destacam atividade antitumoral, como as magaininas e melittinas, atividade leishmanicida como as dermaseptina-S1 e dermaseptina-O1 e atividade contra *Trypanossoma cruzi*, como as dermaseptina DI1 e DI2 (BAKER et al., 1993; CRUCIANE et al., 1991; OHSAKI et al., 1992; HOSKIN, D. W. & RAMAMOORTHY, A., 2008; CARDOSO et al., 2014). Portanto, a identificação de moléculas presentes na secreção cutânea de tais animais ajuda a esclarecer como funciona, o complexo mecanismo de defesa baseado na secreção de substâncias biologicamente ativas (PRATES et al., 2004; BRAND et al., 2006). Outro aspecto importante é que esse grupo de animais evoluiu e adaptou-se às diferentes pressões seletivas existentes no meio onde se encontram, já que em estudos genéticos de espécies das mesmas famílias, principalmente a Hylidae e Ranidae, foram encontrados polipeptídios precursores com regiões altamente conservadas, indicando assim que as espécies pertencentes a essas famílias possuem um ancestral em comum (NICOLAS et al., 2003).

As espécies *Hypsiboas cinerascens* e *geographicus* foram escolhidas para serem estudadas por serem espécies endêmicas da nossa região, sendo assim de fácil acesso, já que as espécies foram capturadas na mata da UFAM e na Reserva Florestal Adolpho Ducke e por não serem espécies em extinção, e por possuir um grande potencial biológico, já que foi possível obter substâncias biologicamente ativas das espécies do gênero que foram estudadas.

3. OBJETIVOS



3.1 Objetivo Geral:

O presente trabalho tem como objetivo estudar os peptídeos presentes nas secreções cutâneas de *Hypsiboas cinerascens* e *H. geographicus*.

3.2 Objetivos Específicos:

Isolar, purificar, identificar os peptídeos da secreção cutânea de *Hypsiboas cinerascens* e *H. geographicus*.

Comparar as estruturas primárias dos peptídeos encontrados com outras já depositadas em banco de dados.

Sintetizar os peptídeos que tiverem sua sequência confirmada no gene.

Avaliar a atividade biológica dos peptídeos sintetizados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS



4.1. Coleta do Material

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas com N° 007/2010-CEEA. Os animais necessários à condução deste projeto foram capturados conforme permissão legal (Licença número: 36742-2) cedida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) após submissão e aprovação do projeto de pesquisa.

Os espécimes foram capturados manualmente durante o período noturno, tendo sido localizados por meio dos sons emitidos durante a vocalização. A coleta foi realizada no Campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e na Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD), situado na periferia da cidade de Manaus/AM e na estrada AM-010 Km 22 Manaus-Itacoatiara. Os espécimes foram identificados pelo Prof. MSc. Marcelo Gordo do Departamento de Ecologia da UFAM.

4.2. Obtenção das Amostras

Os espécimes após capturados vivos foram cuidadosamente lavados em água corrente e em seguida água Ultrapura. As suas secreções cutâneas foram obtidas por estimulação elétrica.

4.2.1. Estimulação Elétrica.

Depois de lavados, os espécimes vivos foram submetidos à estimulação elétrica (Figura 8) com aproximadamente corrente elétrica próxima a 8v, os eletrodos foram colocados em contato diretamente sobre a superfície dorsal por um tempo de cinco a oito segundos por três a cinco vezes com intervalo de dois a quatro segundos, produzindo contração muscular involuntária, que resulta na compressão das glândulas granulares (PRATES et al., 2004). Após o estímulo elétrico os espécimes foram lavados

com água Ultrapura com ajuda de um Pisseta, essa água foi coletada em tubos Falcon de 50 mL através de um funil.

As secreções cutâneas obtidas de *H. cinerascens* (ETHC) e *geographicus* (ETHG) foram congeladas com nitrogênio líquido, evitando-se a degradação das substâncias. As frações foram secas em Liofilizador Alpha 1-2 LDplus no laboratório da Dr^a. Prof^a. Claudia Cândida Silva, situado na Faculdade de Tecnologia do Estado do Amazonas (EST-UEA) e posteriormente armazenadas a -25 °C.

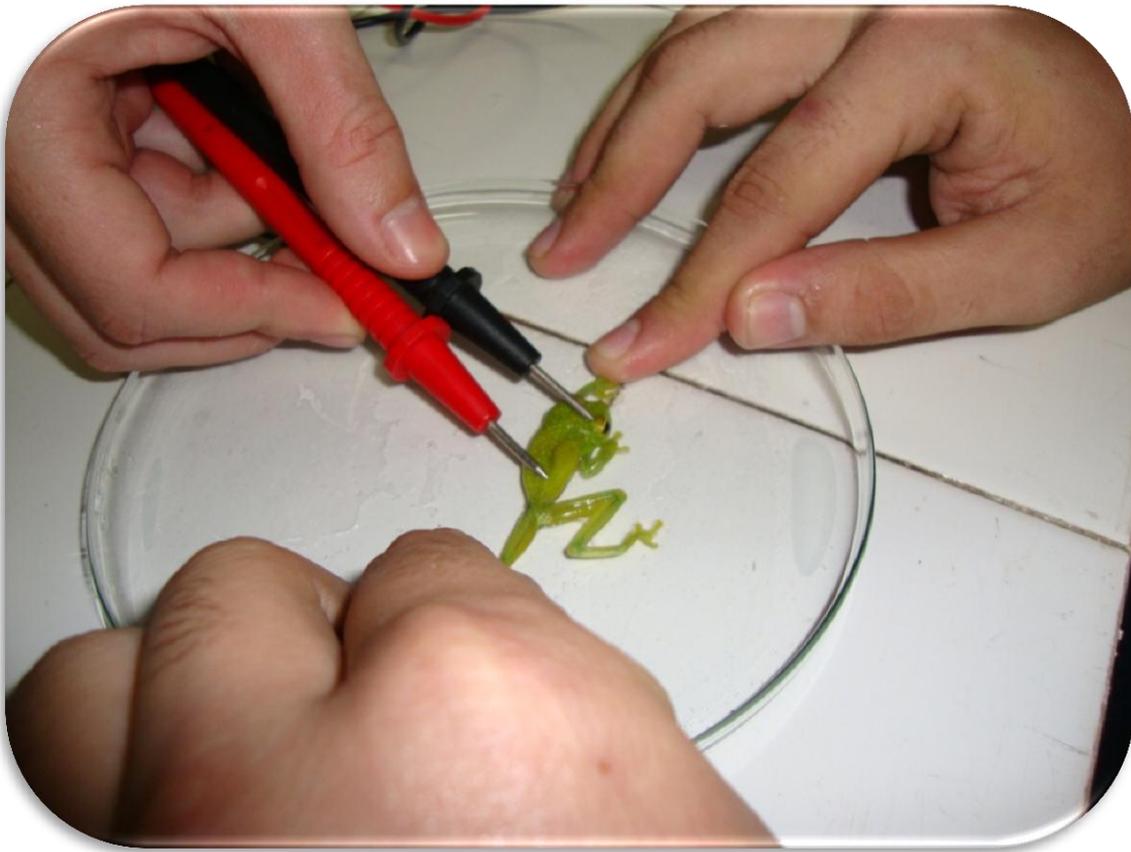


Figura 9 - Obtenção da secreção por estimulação elétrica.

4.3. Isolamento e purificação dos constituintes.

O isolamento e purificação da secreção foi realizada na Embrapa em Brasília-DF.

A secreção após processo de liofilização foi dissolvida em 600 μL de água Ultra Pura contendo TFA 0,1% (v/v).

As fases usadas foram: solvente A (H_2O Ultra Pura com 0,1% de TFA) e solvente B (CH_3CN grau HPLC com 0,1% de TFA).

Alíquotas de 500 μL foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (SHIMADZU, Classe LC10 AD-VP). A coluna utilizada foi de fase reversa, semipreparativa Grace C_{18} , 5 μ (10 X 250 mm) da Vydac, que foi previamente equilibrada em solução aquosa de TFA a 0,1% (em volume). Utilizando-se um fluxo de 2,5 mL min^{-1} , as frações foram coletadas manualmente.

O experimento foi monitorado simultaneamente em a 216 e 280 nm (216 nm se refere a absorbância da ligação amida e 280 nm referente a resíduos de aminoácidos aromáticos). sob um gradiente linear de solução de 5 a 95 % de solvente B durante 75 min.

As frações obtidas foram liofilizadas, e os picos majoritários foram reunidos e repurificadas em sistema analítico com coluna C_{18} , 5 μ (5 X 150 mm) da Kromasil com fluxo de 1 mL min^{-1} com mesmo gradiente da corrida semipreparativo.

4.4. Dissecção da pele.

Dois indivíduos de cada espécie foram eutanasiados por injeção de xilocaína, ocasionando morte cerebral. Os tecidos cutâneos dorsais foram retirados com o auxílio de pinças e tesouras. Os tecidos cutâneos usados para o isolamento de RNA foram

imediatamente congelados em nitrogênio líquido e em seguida armazenados em freezer a -80° C.

Os tecidos visando aos experimentos de imagem por espectrometria de massa (IMS) foram esticados em uma lâmina de vidro para secagem à temperatura ambiente por 72 horas. Após a secagem, os tecidos foram fixados em placa de MALDI utilizando fita adesiva dupla-face. Uma camada fina de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) para a ionização de peptídeos e proteínas foi aplicada sobre os tecidos de maneira uniforme com o auxílio de pipeta (BRAND et al., 2006).

4.4. Espectrometria de Massa.

4.4.1. Espectrometria de Massa de Sistema MALDI-TOF-TOF.

As frações coletadas foram submetidas à espectrometria de massas usando o equipamento UltraFlex III MALDI-TOF-TOF, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight - Time of Flight (Bruker Daltonics, Billerica, MA).

As análises foram realizadas no LEM (Laboratório de Espectrometria de Massa) da Embrapa Cenargen localizado na cidade de Brasília.

As frações oriundas da cromatografia analítica foram também, submetidas à mesma técnica para avaliar o grau de pureza. Após liofilizadas as amostras foram dissolvidas em alíquotas de 30 μ L de água Milli-Q, e dessas amostras foram retiradas alíquotas de 3 μ L que foram misturadas com 9 μ L de uma solução de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (5 mg) dissolvida em água (200 μ L), acetonitrila (250 μ L) e solução aquosa de TFA a 3% (50 μ L), na proporção de 1 de amostra para 3 de matriz. A mistura foi agitada vigorosamente por cerca de um minuto em agitador. Um volume de

2 μ L das misturas foi aplicado sobre a placa do sistema MALDI em triplicata, e deixada em repouso à temperatura ambiente para cristalização. O equipamento foi operado no modo refletido para análise de MS e para análise MS² foi realizado em modo LIFT (LID), ambas com calibração externa com mistura de peptídeos de acordo com a especificação do fabricante (*Peptide Calibration Standard I*, Bruker Daltonics, Alemanha).

Para a obtenção dos dados, as amostras foram bombardeadas com duzentos disparos de laser com pulso de 30 a 50% e detecção de faixa de massa de 100 a 4000 u.

4.4.1.1. Estudo dos peptídeos contendo ponte de dissulfeto.

Para sequenciamento dos peptídeos contendo pontes de sulfeto, ou seja, resíduos de cisteínas em sua sequência peptídica foi realizado reações de redução da ponte. Onde o material proteico foi solubilizado em solução de bicarbonato de amônio 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0) e a ele adicionou-se solução recém preparada solução do reagente redutor diethiltriteiol (DTT) 1,0 mol L⁻¹, resultando em uma concentração final de 10 mmol L⁻¹ em bicarbonato de amônia 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0). O material foi incubado por 15 minutos a 37 °C. Para alquilação das cisteínas, o material proteico foi solubilizado em solução de cloridrato de guanidina 6,0 mol L⁻¹ e em bicarbonato de amônio 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0), e deixado reagir com DTT (concentração final de 10 mmol L⁻¹) por 30 min. a 37 °C. Após este período, adicionou-se solução de iodoacetamida com concentração final igual a 50 vezes a concentração de cisteína da solução, e deixou-se o material reagir por 15 minutos a 37 °C, na ausência de luz a dessalinização e a purificação dos materiais foram feitas por cromatografia em fase reversa. Na figura 9 é evidenciado o mecanismo completo da reação de redução e alquilação de cisteínas.

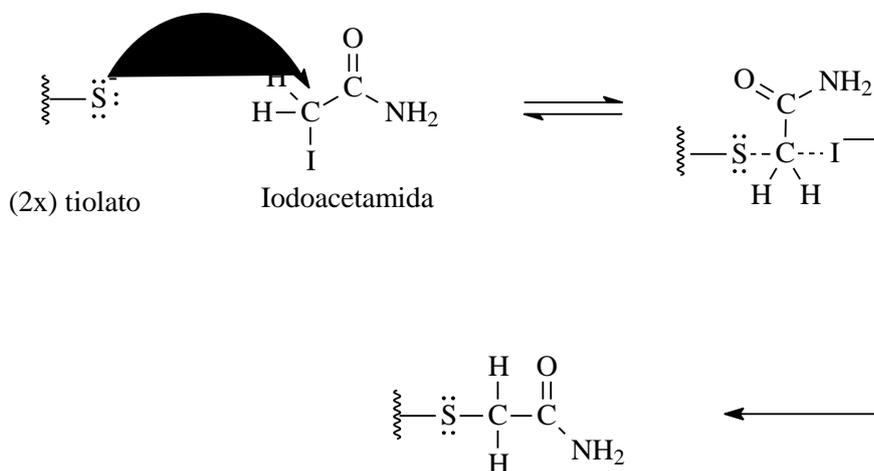
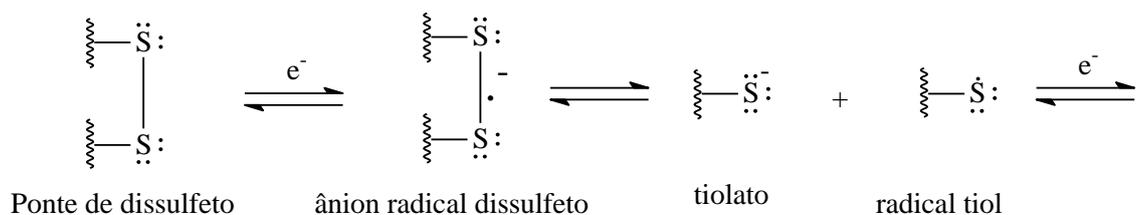


Figura 10 - Reação de Redução e Alquilação.

4.4.1.2. Análise da imagem por MALDI.

A análise de IMS foi realizada no LEM sendo seguida a metodologia de BRAND e colaboradores 2006. A pele foi posta em uma lâmina de vidro e deixada para secar ao ar livre durante três dias.

Após os três dias o tecido seco foi fixado em placa de MALDI utilizando fita adesiva dupla-face (Figura 10). Uma camada fina de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico para a ionização de peptídeos e proteínas foi adicionada sobre os tecidos de maneira uniforme com o auxílio de pipeta, e deixado para secar por três horas.

A análise foi realizada em espectrômetro de massa Ultra Flex III MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA) no modo refletido. A varredura automática das

amostras e a aquisição dos dados foram controladas com o programa computacional *Flex Imaging* (Bruker Daltonics, Billerica, MA) ajustado para rastrear pontos de 200 μm em uma área pré-determinada, com cinquenta tiros sendo disparados em cada posição e laser com intensidade igual, ou aproximada, a 30%. O mapeamento foi ajustado para a detecção dos componentes com razão m/z entre 600 e 5000. A calibração do espectrômetro foi realizada utilizando-se um calibrante com peptídeos com massa conhecida, do qual foi depositada uma alíquota sobre o tecido a ser analisado.

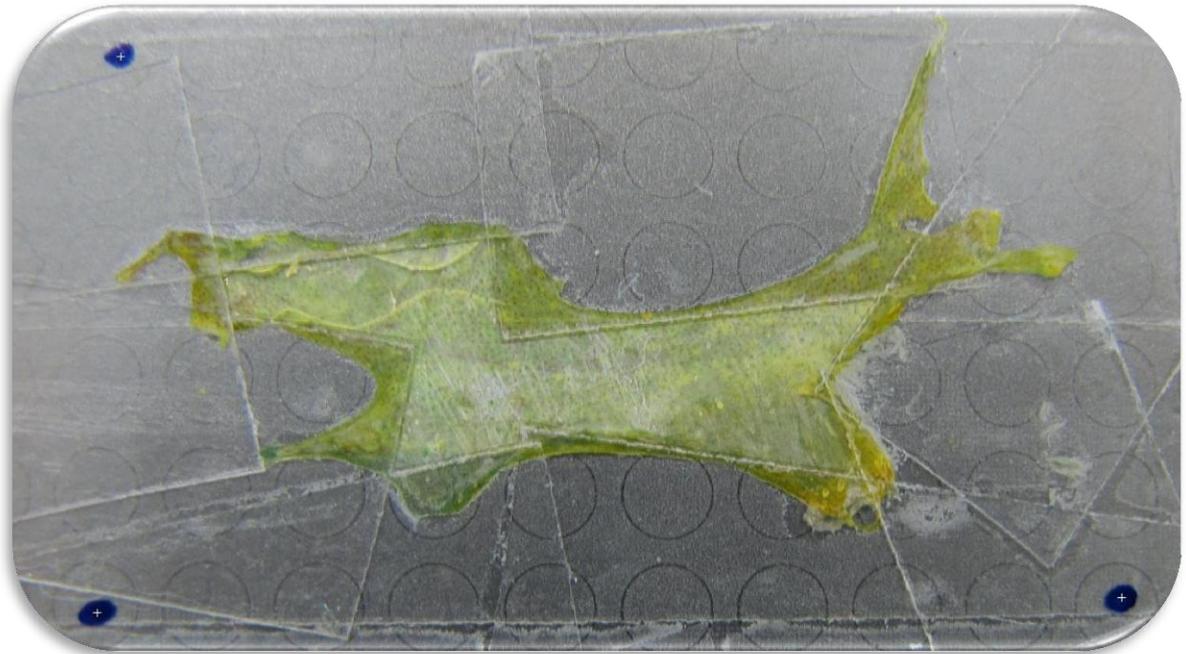


Figura 11 - Pele seca de *H. cinerascens* fixada em uma placa de MALDI.

4.5. Identificações das sequências peptídicas por c-DNA.

O sequenciamento genético foi realizado pelo Doutor Eder Barbosa no laboratório de genética da Embrapa Brasília-DF

Um indivíduo de cada espécie (*H. cinerascens* e *H. geographicus*) foi sacrificado através da inserção de 0,1 mL do anestésico lidocaína diretamente no cérebro ocasionando morte instantânea. Rapidamente a pele dorsal foi retirada com auxílio de pinça e tesoura cirúrgica e colocada em tubo Eppendorf sendo congelada em nitrogênio líquido (N_{2(l)}) para rápida conservação sendo armazenada em freezer -80. A pele congelada foi pulverizada em N_{2(l)} com auxílio de almofariz e pistilo, sendo posteriormente separada em alíquotas de 100 mg para extração do RNA total com reagente Trizol (Invitrogen). Para síntese da primeira fita de c-DNA foi usada o kit Superscript Reverse Transcriptase (Invitrogen), e para síntese da segunda fita foi usado primers específicos. Após os processos de PCR e purificação dos fragmentos das fitas, tais fragmentos foram ligados no vetor pGEM-T easy e inseridos em *Escherichia coli* (DH5α) para replicação. O protocolo completo para clonagem do gene foi de acordo a metodologia descrita em BRAND e colaboradores 2006.

4.6. Métodos Computacionais

Para alinhamento da estrutura primária dos peptídeos sequenciados, foi usado a ferramenta de bioinformática Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Que tem como finalidade comparar a sequência obtida com sequências depositadas no banco de dados (UniProtKB/Swiss-Prot) e mostrar o grau de identidade das sequências obtidas.

Para simular a possível estrutura secundária foi usada a ferramenta de bioinformática SOPMA (<https://npsa-prabi.ibcp.fr>) que avalia o alinhamento dos resíduos de aminoácidos no peptídeo. E verifica quais os possíveis estados conformacionais que o peptídeo adotaria.

Para avaliar a estrutura bidimensional dos peptídeos foi usado o método computacional de Schiffer-Edmundson (<http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>). Que organiza os resíduos de aminoácidos na forma de helicoidal. Avalia a hidrofobicidade dos resíduos que são representados como diamantes sendo codificados por cores o resíduo mais hidrofóbico e codificado pela cor verde, a cor verde diminui proporcional a diminuição da hidrofobicidade até chegar ao amarelo que indica zero de hidrofobicidade.

Os resíduos hidrofílicos são representados como círculos e codificados em vermelho que vai diminuindo proporcionalmente com a hidrofobicidade. Os resíduos potencialmente positivos (básicos) como pentágonos e potencialmente negativos (ácidos) como triângulos ambos são mostrados na cor lilás.

Para avaliar a estrutura tridimensional dos peptídeos identificados foi usado o programa On-line I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Que usa algoritmos para simular a possível estrutura 3D.

4.7. Síntese peptídica em fase sólida.

A síntese foi realizada manualmente no LEM da Embrapa Brasília-DF.

Os peptídeos de interesse foram sintetizados manualmente pelo método da fase sólida, com a utilização de estratégia Fmoc. Para a síntese do peptídeo com grupamento C-terminal aminado a resina usada foi Rink-Amide-MBHA (NovaBiochem).

A metodologia aplicada para síntese foi dividida em três partes (CHAN, et al., 2000):

Acoplamento do primeiro derivado de aminoácido na resina.

Acoplamento e desproteção dos Fmoc-aminoácidos da sequência peptídica.

Por último é realizado a clivagem da ligação peptídica-resina e desproteção das cadeias laterais.

É necessário colocar um grupo ativador no aminoácido a ser acoplado para diminuir a diferença de energia entre os reagentes e o complexo ativado que seja um bom grupo de saída. Os reagentes ganharão energia e ficarão com uma energia mais próxima ao complexo ativado, havendo assim um favorecimento cinético da reação de formação da ligação amida.

O processo de síntese é realizado da seguinte forma, primeiro é feito a desproteção da resina, pesa-se uma determinada quantidade da resina (referente a quantidade de peptídeo a ser sintetizado) que é adicionada em uma seringa de 3 mL com um pequeno filtro, nessa seringa adiciona-se aproximadamente 2 mL de piperidina, que sofre agitação constante durante 15 min, depois retira-se a piperidina por sistema a vácuo, esse processo deve ser repetido, ou seja, a desproteção ocorre em duas etapas.

Após a desproteção realiza-se o teste de Kaiser (ninidrina), para confirmação da desproteção, que é observada através da cor escura dos cristais da resina.

Após a confirmação do teste é adicionado uma determinada quantidade de resíduo do aminoácido com HBTU, DIPEA e DMF, é levado à agitação constante por uma hora e meia, depois essa mistura é lavada com metanol e DMF em sistema a vácuo, e em seguida é realizado novamente o teste de Kaiser, para confirmação do acoplamento que é verificada através da falta de cor dos cristais da resina. Esse processo de desproteção e acoplamento é repetido para cada resíduo de aminoácido.

Os produtos usados na síntese são Hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N,N-tetrametilurônio (HBTU), piperidina, dimetilformamida (DMF), N,N-Diisopropiletilamina (DIPEA), aminoácidos ligados ao grupo F-moc e a resina (Figura 11).

Mecanismo para desproteção da Resina (Figura 12).

Mecanismo da reação de ativação do aminoácido (Figura 13).

Mecanismo do acoplamento do primeiro resíduo de aminoácido (Figura 14).

Reação geral de síntese (Figura 15).

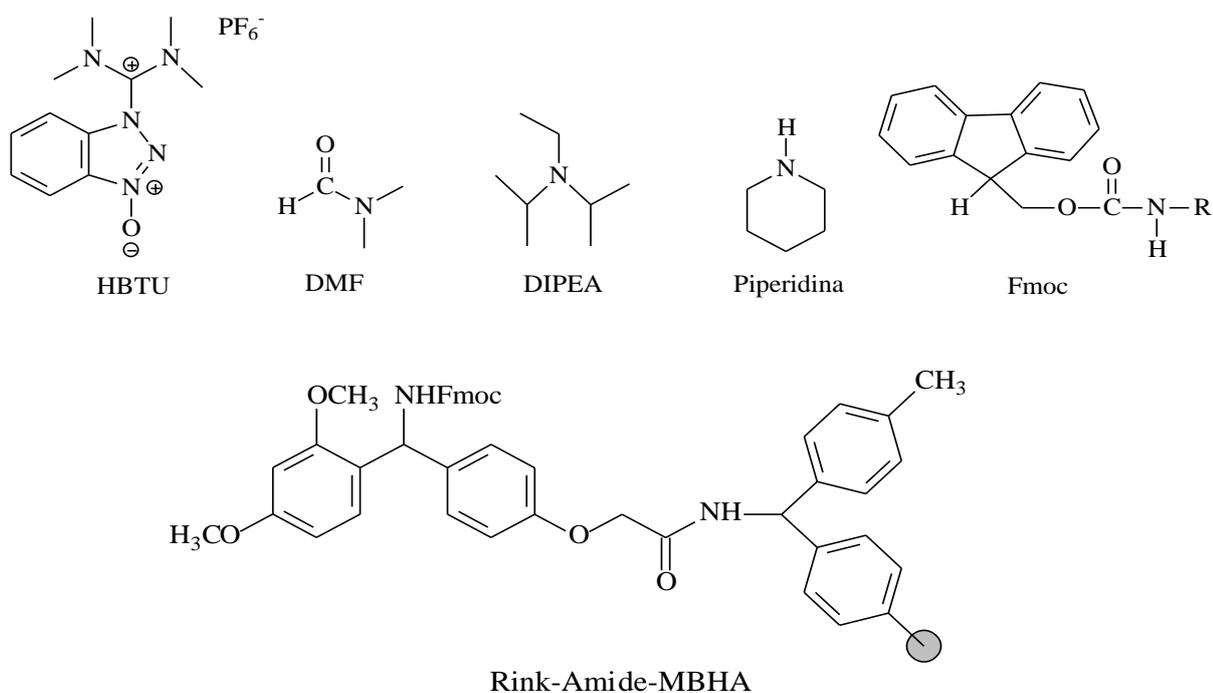


Figura 12 - Produtos usados na síntese.

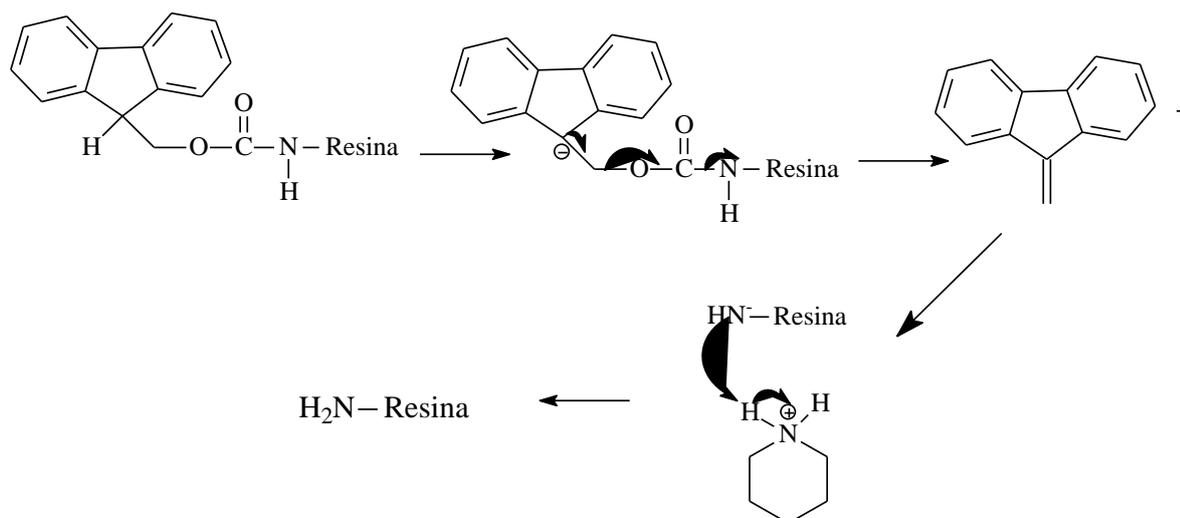


Figura 13 - Mecanismo para desproteção da resina.

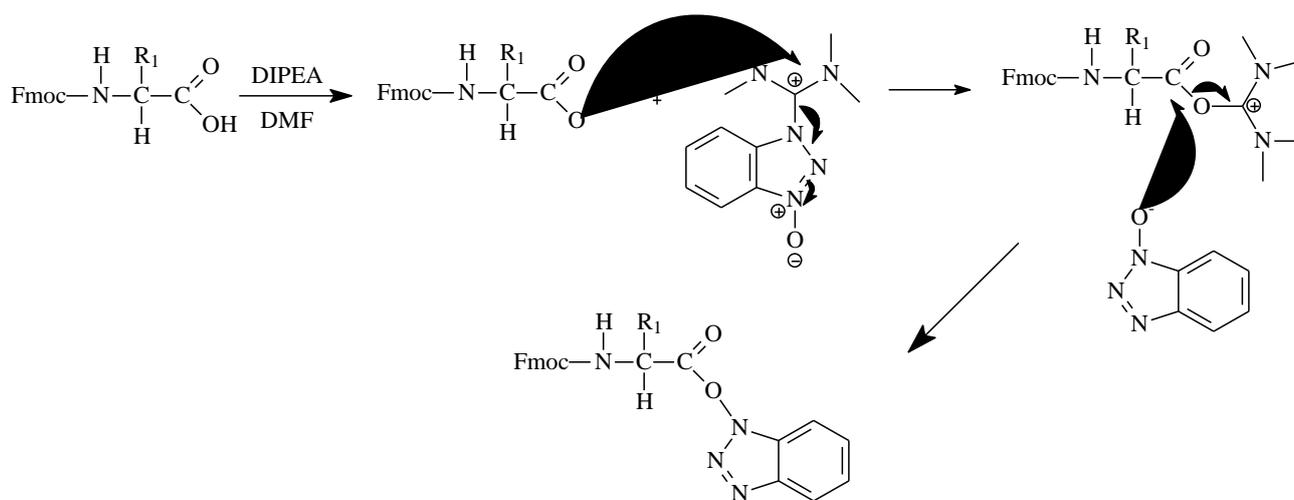


Figura 14 - Mecanismo da reação de ativação do aminoácido.

4.8. Testes antimicrobianos.

Os testes antimicrobianos foram realizados no Laboratório do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás.

Onde as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de peptídeos serão avaliadas pelo teste de micro diluição de acordo com protocolos clínicos e Laboratory Standards Institute (CLSI). Para as leveduras, foi utilizado o protocolo NCCLS M27-A3. Resumidamente, a suspensão de células de levedura a partir de ágar Sabouraud Dextrose (SDA) foram preparadas em 0,85% (v/v) de NaCl e foram diluídas apropriadamente em caldo RPMI 1640 (com L-glutamina, sem bicarbonato, pH 7,0).

Um total de 1×10^3 células de levedura foi misturado com concentração de diferentes dos peptídeos que vão desde 256 μM - 0,5 μM em um volume final de 100 μl .

Para bactérias, foi utilizado o protocolo M07-A08. Antes do teste, as bactérias foram transferidas para recipientes em meio Casoy e incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Células de bactérias serão preparados em suspensão a 0,85% (v/v) de NaCl, e serão diluídas até se ajustarem a concentração de 0,5 Mc Farland (1×10^8 UFC ml^{-1}). Caldo Muller Hinton foi usado para teste antibacteriano. O volume final de 100 μl , contendo diferentes concentrações de peptídeos e 5 μl de inóculo de bactérias serão incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada e todos os testes foram realizados em triplicada.

Para controle negativo foi usado água, já que esse é o solvente em que o peptídeo foi diluído. E para controle positivo foi usado o peptídeo DS01 (GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGQAALGAL), sendo este peptídeo com forte atividade antimicrobiana comprovada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.



5.1. Purificação do ETHC.

As purificações do extrato total da secreção de *H. cinerascens* (ETHC) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por sistema semipreparativo apresentaram perfis cromatográficos, onde foi possível observar a não degradação do material biológico, que é evidenciada no cromatograma por apresentar picos definidos (Figura 17).

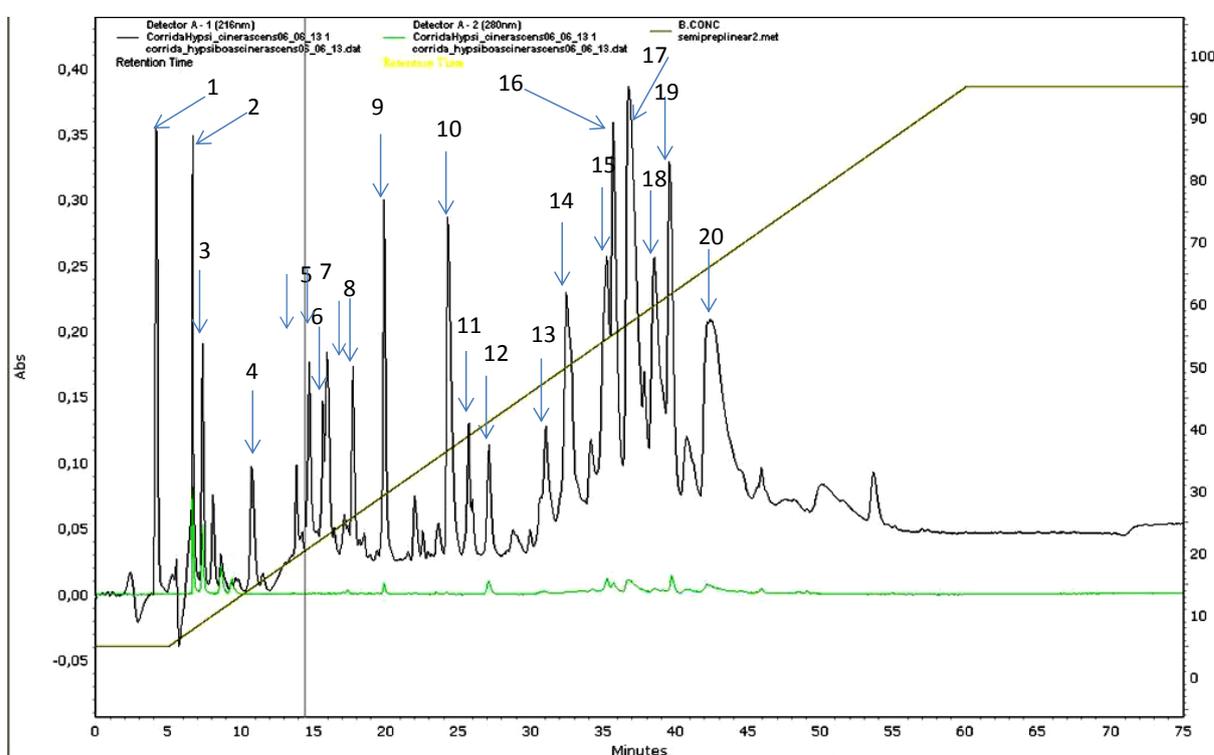


Figura 17 - Purificação do ETHC por CLAE.

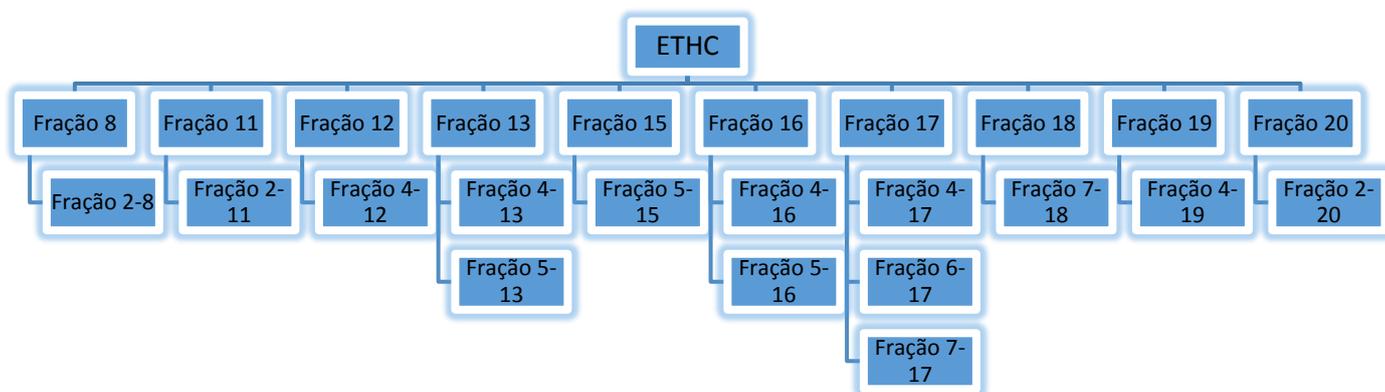
Perfil cromatográfico do ETHC. Linha verde Abs. em 280 nm e linha preta 216 nm. Linha marrom gradiente de 5 a 95% de ACN 0,1 TFA em 75 min. As setas indicam quais frações foram coletadas manualmente, sendo identificadas de 1 a 20.

Foram realizadas sete purificações do ETHC, onde se coletou manualmente as 20 frações majoritárias (Figura 16) que foram reunidas em tubos Falcon (15 mL) separados, essas frações foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas para identificação das substâncias por espectrometria de massa.

Ao analisar o cromatograma do ETHC, foi possível observar uma elevada quantidade de frações sendo essas bem distribuídas entre 25 a 75% de ACN. O que nos leva a crer que a maioria das substâncias presentes na secreção de *H. cinerascens* possui media a baixa polaridade. Também foi possível observar a pequena intensidade dos picos com Abs. em 280 nm, o que indica que a maiorias destas substâncias possui pouca ou nenhuma aromaticidade, ou seja, quando se trata de peptídeos, significa que eles não possuem resíduos do aminoácido triptofano e possuem pouco ou nenhum resíduo dos aminoácidos fenilalanina e tirosina.

Cada uma das 20 frações foram recromatografadas em sistema analítico, coletadas, liofilizadas e analisadas por espectrometria de massas, porém só algumas subfrações apresentaram fragmentação adequada para posterior sequenciamento manual pelo método *De novo* (Esquema 1).

Esquema 1 - Frações e Subfrações do ETHC.



5.2. Espectros de Massas e estudos computacionais dos peptídeos de *H. cinerascens*.

Todas as subfrações dos ETHC foram submetidas à análise por MS, MS² e sequenciamento pelo método *De novo*.

As sequências foram comparadas com peptídeos depositados no banco de dados, através da análise com ferramentas de bioinformática usando o programa BLASTp do National Center for Biotechnological Information (NCBI).

Todas as sequências foram submetidas a análise de bioinformática pelas ferramentas SOPMA, Schiffer-Edmundson e I-TSSER.

5.2.1. Identificação do peptídeo da fração 8 de *H.C.*

A fração 8 após purificação em sistema analítico resultou em 2 subfrações que são evidenciadas no cromatograma apresentado na figura 18.

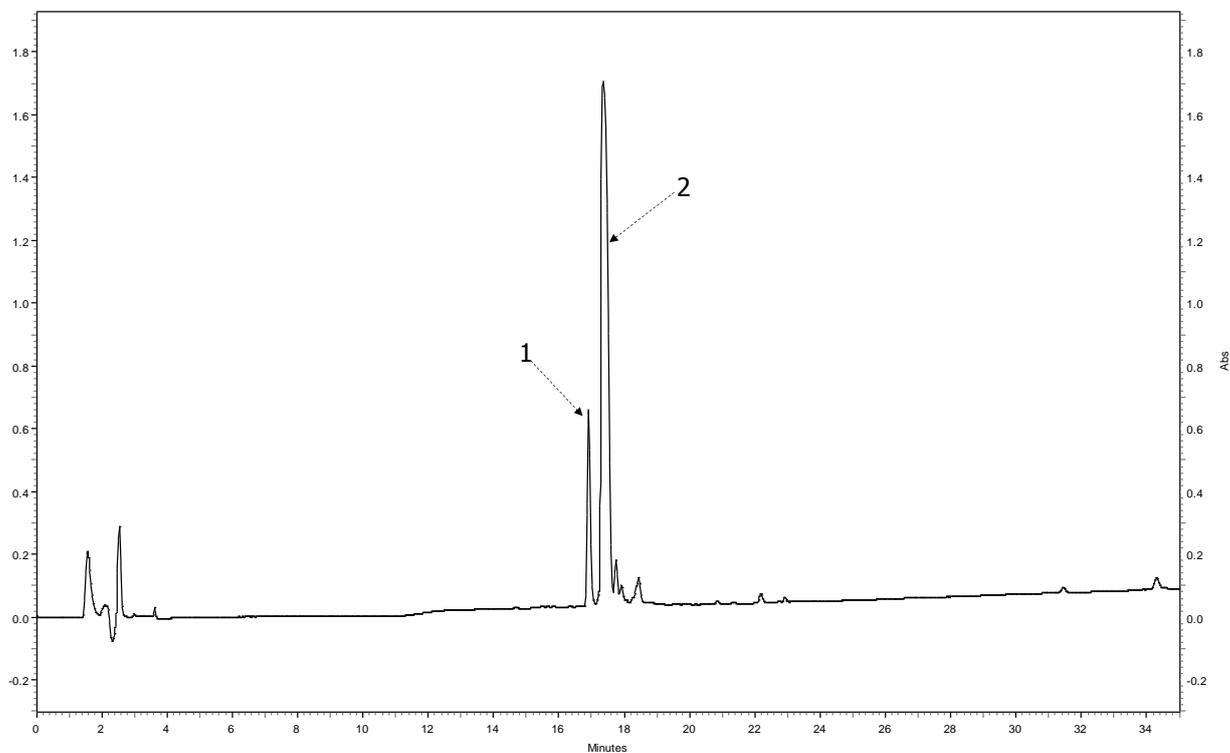


Figura 18 - Cromatograma analítico da fração 8.

Linha preta indica o comprimento de onda em 216 nm. As setas indicam quais frações foram coletadas manualmente

Sendo que apenas a subfração 2 apresentou espectro de MS^2 adequado para ser sequenciado, sendo possível confirmar as séries y que é referente a porção N-terminal e b que é referente a porção C-terminal.

No espectro de massas da fração 2-8 foi observado o íon majoritário de m/z 2.718,2 u (Figura 19) com uma alta intensidade de sinal (5×10^5), sendo este em seguida submetido à fragmentação por MS^2 (Figura 20).

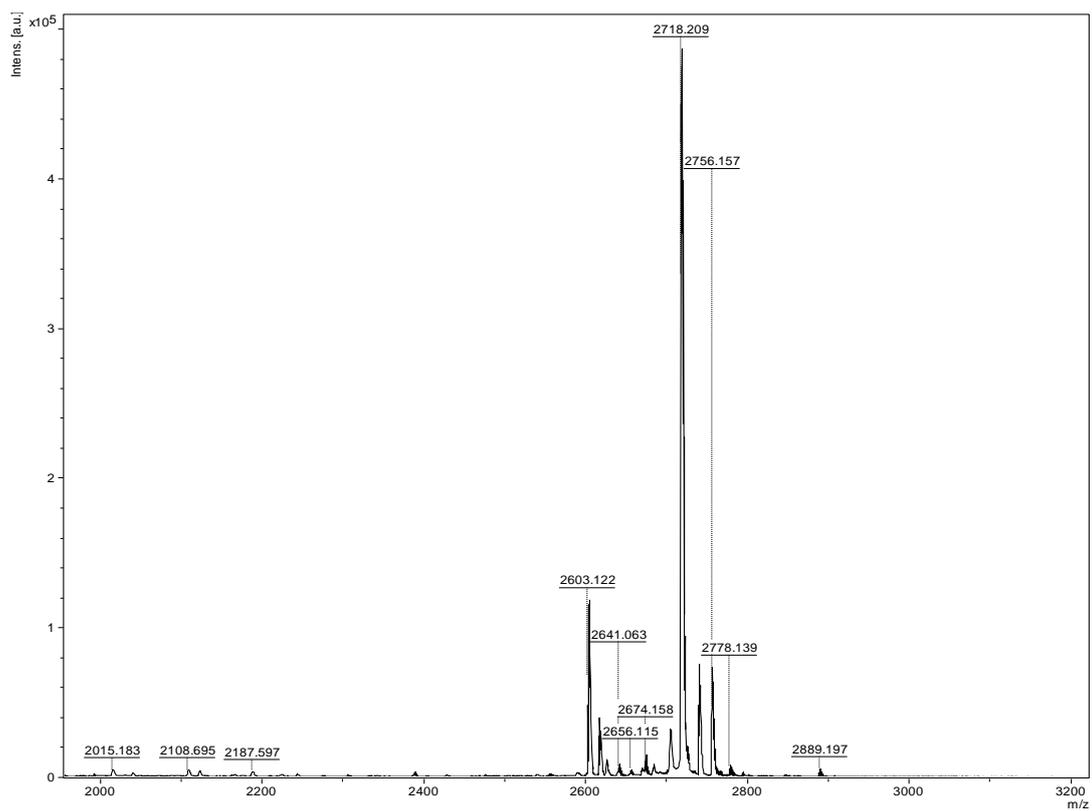


Figura 19 – Espectro de Massas da fração 2-8 de H.C.

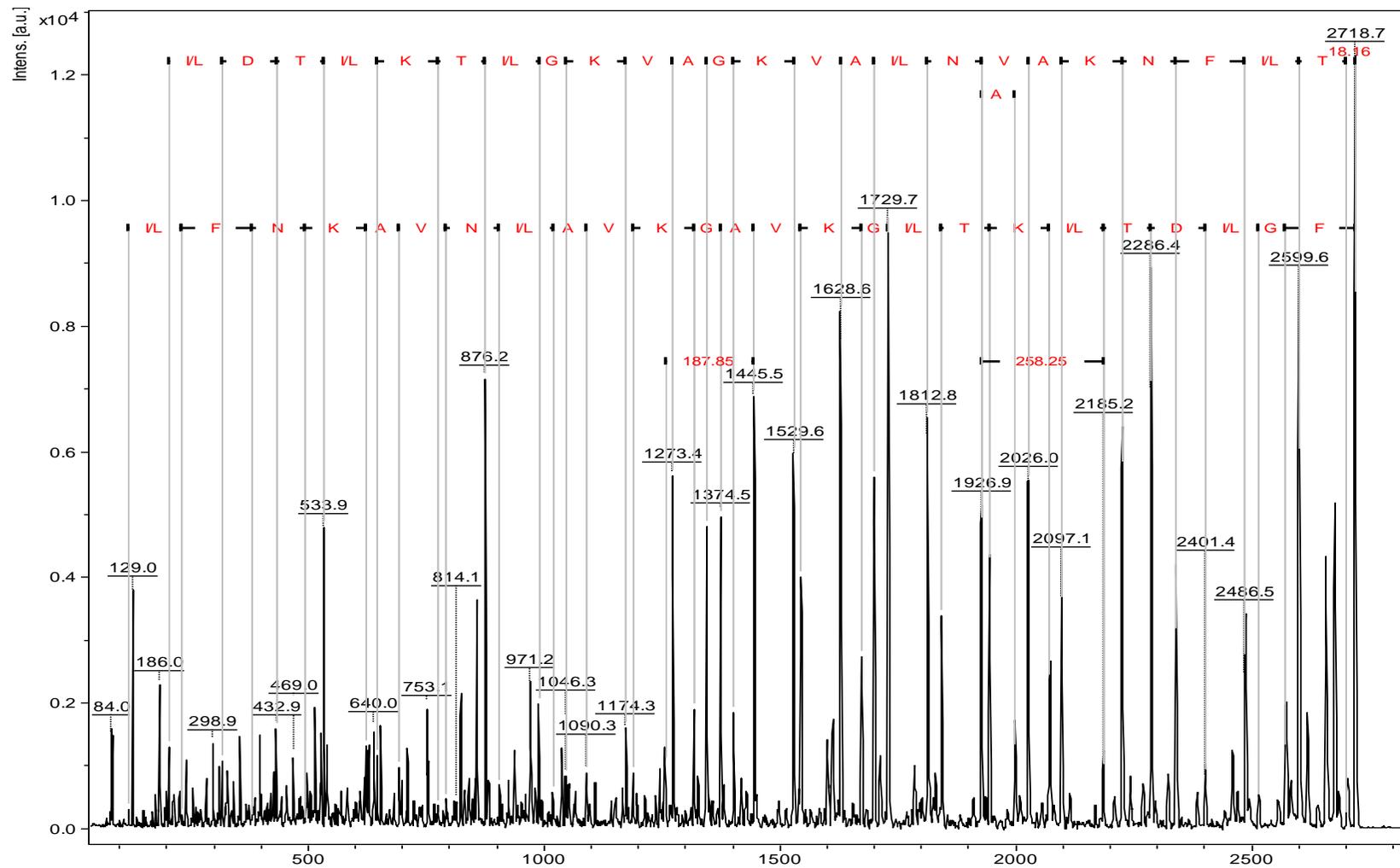


Figura 20 - Sequência obtida da fragmentação do íon m/z 2.718,7 u.

Na sequência proposta a porção C-terminal é indicada pelo resíduo T (treonina) na parte superior da figura no canto direito, e a porção N-terminal é indicada pelo resíduo F (fenilalanina) um pouquinho abaixo de T.

O peptídeo da fração 2-8 com 26 resíduos de aminoácidos e sequência proposta **FGI/LDTKTI/LGKVAGKVAI/LNVAQNFI/LT** com C-terminal carboxilado foi submetida à ferramenta de bioinformática BLASTp usando a base de dados UniProtKB/Swiss-Prot. Apesar que os resíduos isoméricos L/I não terem sido diferenciados por espectrometria de massas. O peptídeo obteve 74% de identidade com o peptídeo **raniseptina – 1** (AWLDKLLKSLGKVVVGKVALGVAQNYLNPQQ) identificado na secreção cutânea da espécie *H. raniceps*, sendo esta espécie pertencente ao mesmo gênero da em estudo. Tal peptídeo possui atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *X. citri* (MAGALHÃES et al., 2008).

A sequência proposta foi submetida a ferramenta de bioinformática SOPMA apresentou estrutura secundária em 4 estados: conformação de 50% em forma de α -hélice (Hh) do quarto ao décimo segundo e vigésimo ao vigésimo segundo resíduo de aminoácido, 23% em cadeia estendida (Ee) do décimo sexto ao décimo nono e vigésimo quinto ao vigésimo sexto resíduo, 11.54% em ângulo β (Tt) do décimo terceiro, décimo quarto e vigésimo terceiro resíduos e 15.38% em espiral aleatória (Cc) nos três primeiros e no antepenúltimo resíduo (Figura 20).

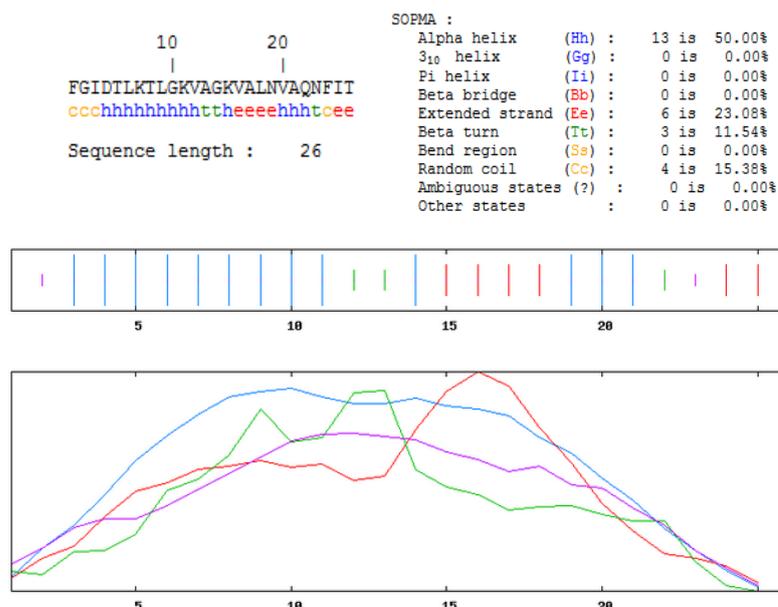


Figura 21 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 2-8. Linha em Azul indica a conformação em α -hélice, vermelha indica conformação em cadeia estendida, verde em ângulo β e rosa em conformação de espiral aleatória.

Foi usado o método computacional de Schiffer-Edmundson para projeção bidimensional da estrutura secundária do peptídeo sequenciado (Figura 21).

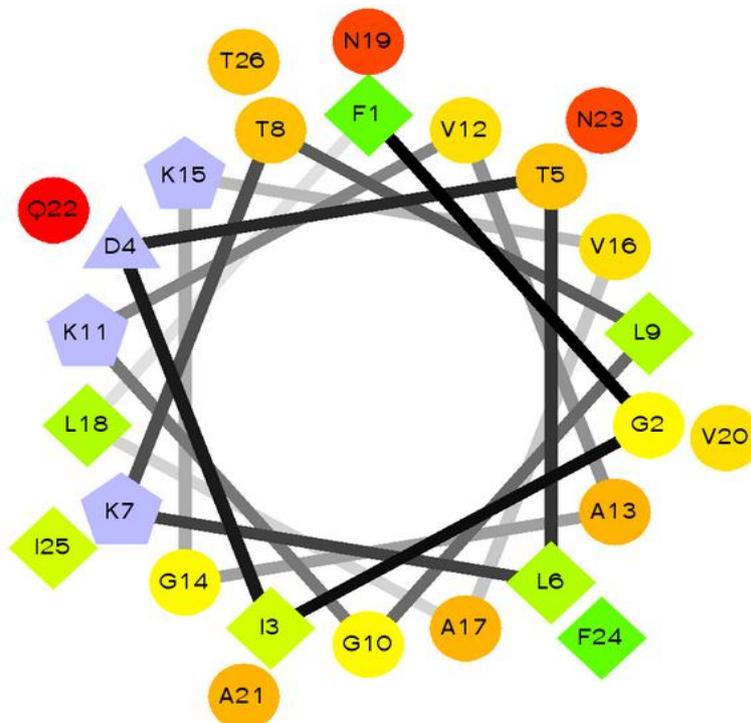


Figura 22 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 2-8. Resíduos hidrofóbicos em forma de diamante que variam da cor verde ao verde claro, resíduos hidrofílicos em forma de círculo em vermelho intenso ao amarelo, resíduos potencialmente positivamente em forma de pentágono e os potencialmente negativos em forma de triângulo sendo esses últimos na cor lilás.

Através da projeção de Schiffer-Edmundson, pode-se observar que o peptídeo é constituído em sua maioria de resíduos hidrofílicos que são representados em forma de círculo, variando do vermelho intenso ao alaranjado. Esses resíduos estão organizados predominantemente em um lado do peptídeo, os resíduos mais hidrofílicos glutamina e asparagina (Q e N) representados pelo vermelho intenso também estão bem organizados em apenas um lado. O peptídeo possui apenas 7 resíduos hidrofóbicos que são representados em diamante variando do verde escuro ao verde, esses resíduos estão totalmente distribuídos por todo os lados do peptídeo. Os resíduos potencialmente positivos e negativos na cor lilás juntamente com dois resíduos hidrofóbicos estão agrupados na face oposta aos resíduos hidrofílicos.

Para visualizar a estrutura em 3D do peptídeo sequenciado foi usado a ferramenta I-TASSER (Figura 22).

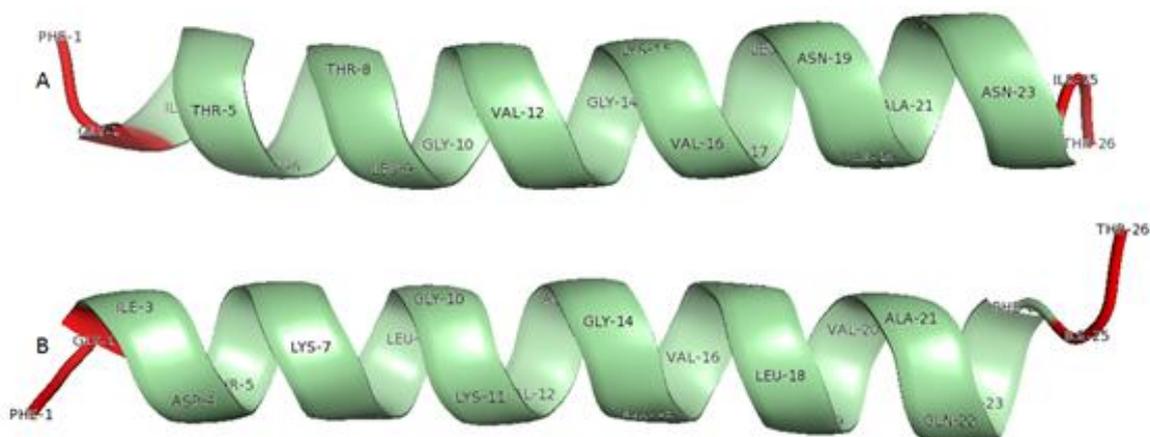


Figura 23 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 2-8 de H.C. Parte A da figura e mostrada uma face do peptídeo e na parte B é mostrada a face oposta

Através da conformação em 3D pode confirmar que o peptídeo adota conformação principal em α -hélice, com uma pequena região aleatória nas extremidades da sequência.

Observa-se que os resíduos nas posições 2, 5, 8, 9, 12, 15, 16, 19 e 23 mostradas na figura 23A é referente aos aminoácidos glicina (2), treonina (5 e 8), leucina (9), valina (12 e 16) lisina (15) e asparagina (19 e 23), estão preferencialmente agrupados na mesma face, sendo que a maioria desses resíduos são hidrofóbicos (treonina e leucina).

Em relação a figura 20B pode observar que os resíduos nas posições 3, 6, 7 10, 14, 17, 18, 21, 24 e 25 são referentes isoleucina (3 e 25), leucina (6 e 18), lisina (7), glicina (10 e 14) alanina (17 e 21) e fenilalanina (24) estão preferencialmente agrupados na mesma face, sendo que a maioria desses resíduos são hidrofílicos.

5.2.2. Identificação dos peptídeos da fração 13 de H.C.

A fração 13 após purificação em sistema analítico resultou em 5 subfrações (Figura 23)

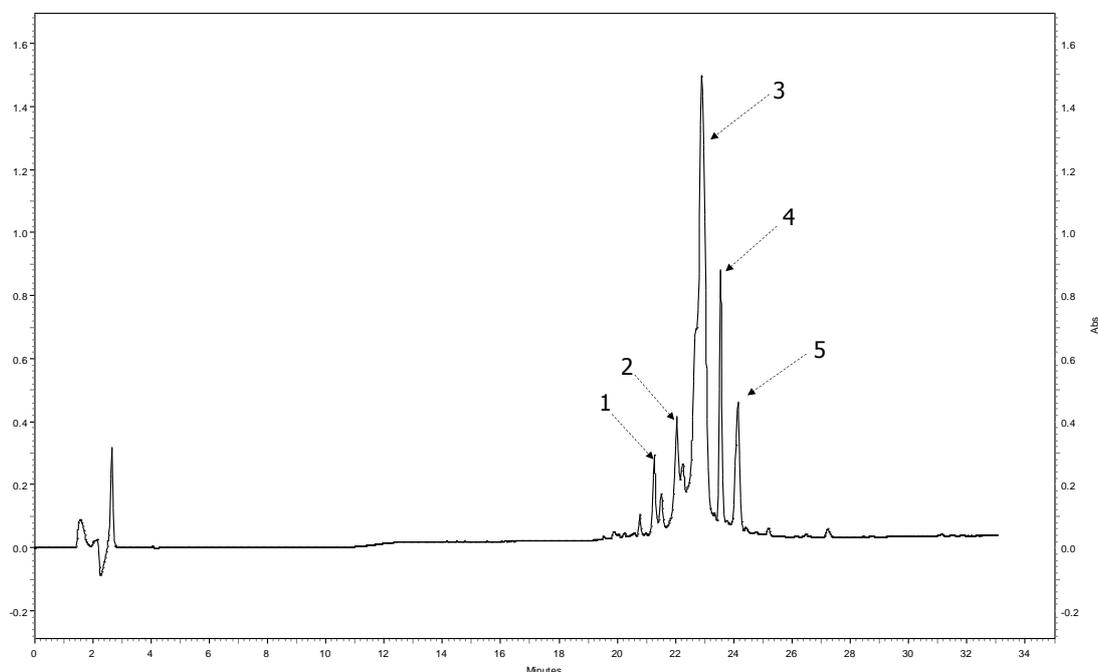


Figura 24 - Cromatograma analítico da fração 13 de H.C.

Linha preta representa comprimento de onda em 216 nm. As setas indicam quais frações foram coletadas manualmente

Sendo que estas subfrações ao serem fragmentadas, demonstraram perfis de peptídeos com pontes de dissulfeto, que é observado quando uma parte da sequência peptídica não fragmenta.

Esses peptídeos foram submetidos à reação de redução e alquilação, e somente as subfrações 1, 4 e 5 apresentaram perfil de fragmentação adequado para ser sequenciado.

Porém apenas as subfrações 4 e 5 apresentaram sequências primárias comparáveis com as sequências já depositadas em banco de dados.

5.2.2. Identificação do peptídeo da fração 4-13 de H.C.

No espectro de massas da fração 4-13 foi observado o íon majoritário de m/z 1.285,5 u antes da reação e os íons majoritários m/z 1.269,7 e 1.401,7 u depois da reação, sendo que apenas o último íon é referente a alquilação do íon observado com aumento de 116 u, o que indica a alquilação de duas cisteínas que se apresentavam oxidadas (Figura 25).

Uma possível explicação para a presença do íon com m/z 1.269,7 u, seria que o peptídeo referente a tal íon seria de difícil ionização na forma cíclica, o que mudaria com a abertura das pontes.

Dos dois íons observados, apenas o íon m/z 1.269,7 u após submetido a fragmentação apresentou sequência comparável com peptídeos depositados em banco de dados (Figura 26).

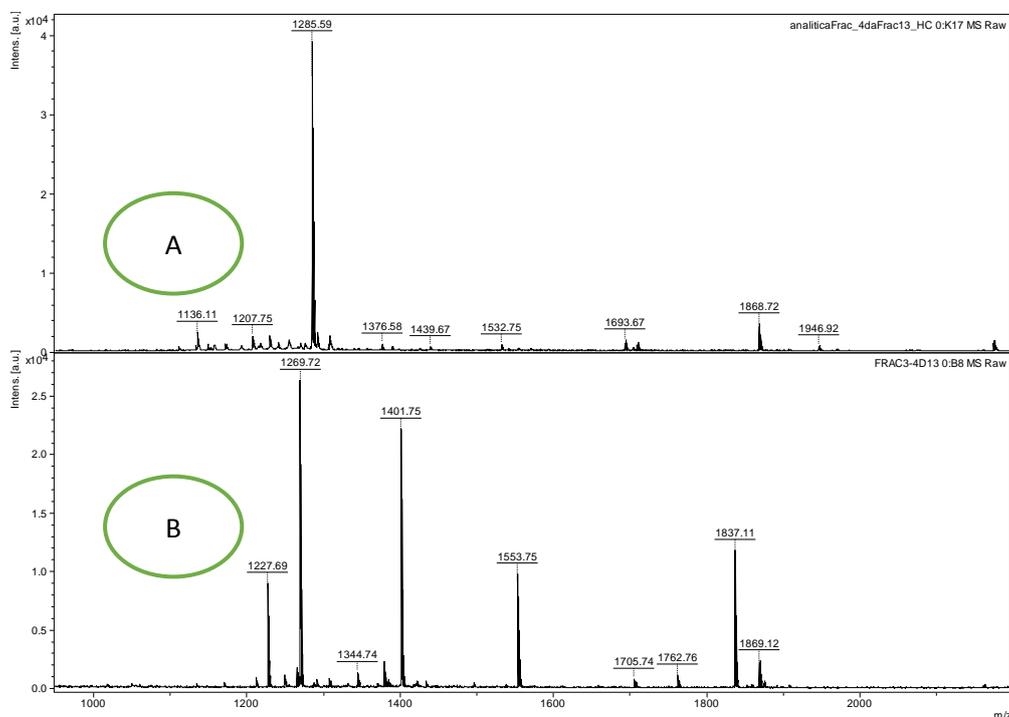


Figura 25 - Espectro de Massa da Fração 4-13 antes e depois da reação. Parte A da figura indica a fração 4-13 antes da reação de redução e alquilação. Parte B indica a fração 4-13 depois da reação.

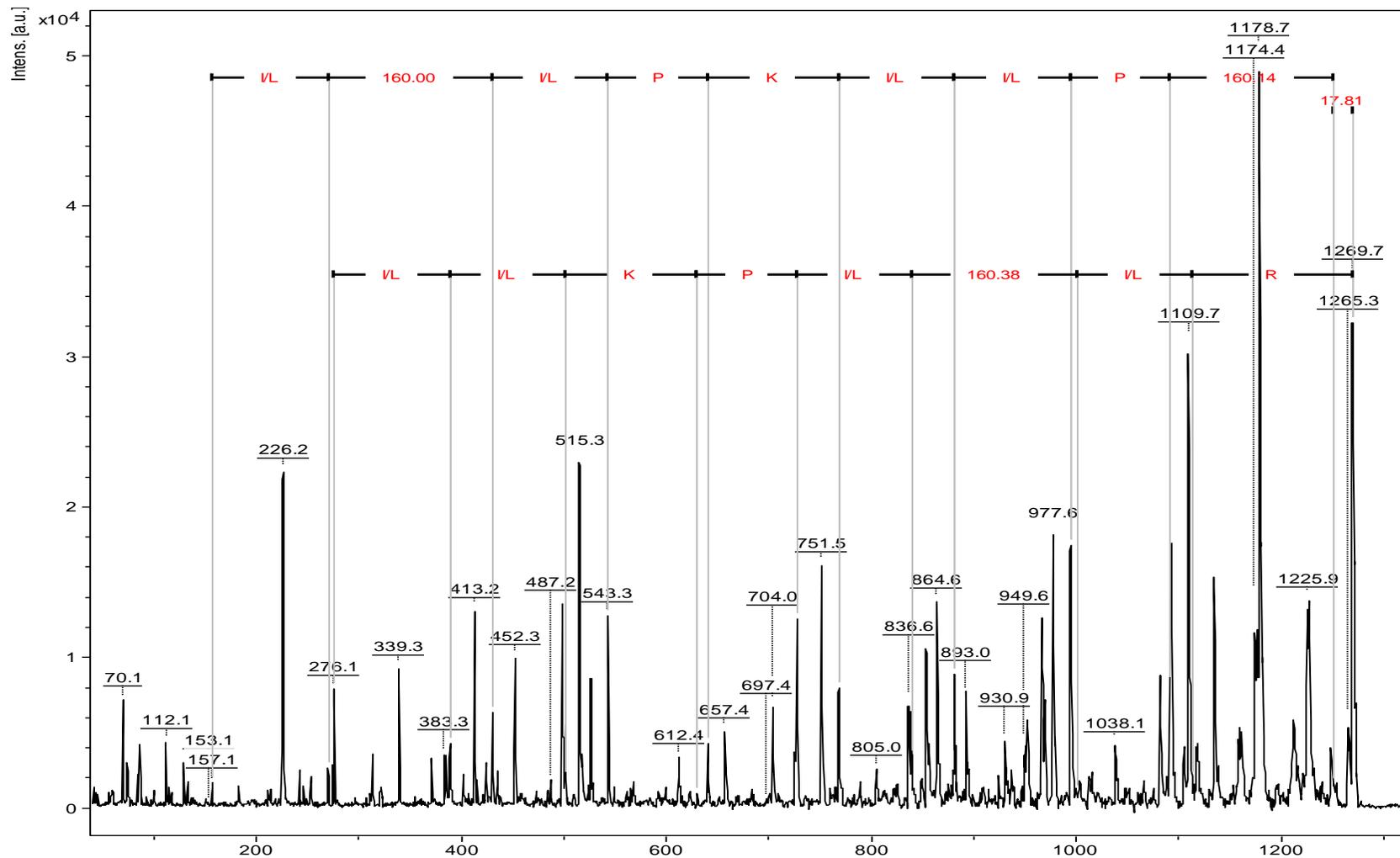


Figura 26 - Sequência obtida da fragmentação do íon m/z 1.269,7 u.

Na sequência proposta a porção C-terminal é indicada pela perda de 160 u (cisteína alquilada) na parte superior da figura no canto direito, e a porção N-terminal é indicada pelo resíduo R (arginina) um pouco abaixo de 160.

O peptídeo da fração 4-13 com 10 resíduos de aminoácidos e sequência proposta **RI/LCI/LPKI/LI/LPC** com C-terminal carboxilado foi submetida à ferramenta de bioinformática BLASTp. Obtendo 70% de identidade com o peptídeo signiferin – 1 (**RLCIPYIIPC**) identificado na secreção cutânea da espécie *Crinia deserticola*, sendo que essa espécie pertence a família Myobatranchidae. Tal peptídeo possui atividade de contração muscular na concentração de 10^{-6} M e efeito de aumento dos linfócitos na concentração de 10^{-9} M (JACKWAY et al., 2008).

De acordo com a ferramenta SOPMA o peptídeo possui apenas um estado conformacional em 100% em espiral aleatória (Cc) (Figura 27). Esse fato pode ser explicado por o peptídeo por ter apenas 10 resíduos de aminoácidos e possuir pontes de dissulfeto, ligando suas extremidades.

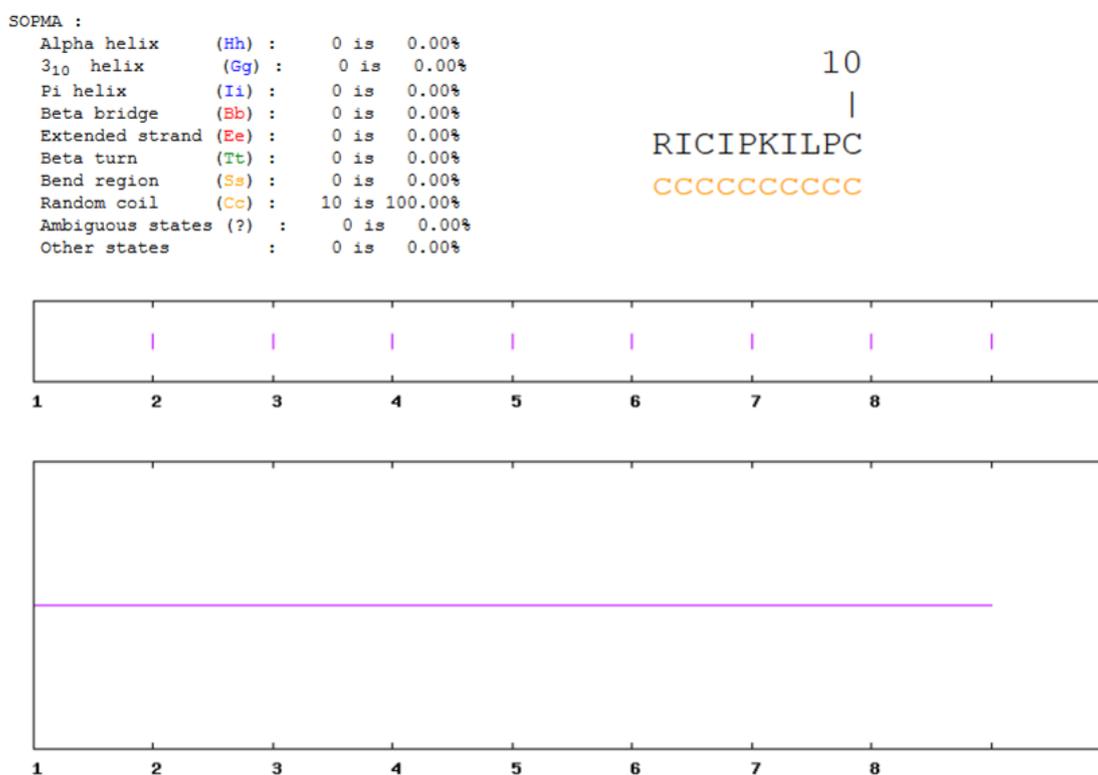


Figura 27 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 4-13. Linha rosa constante indica que o peptídeo tem apenas a conformação de espiral aleatória

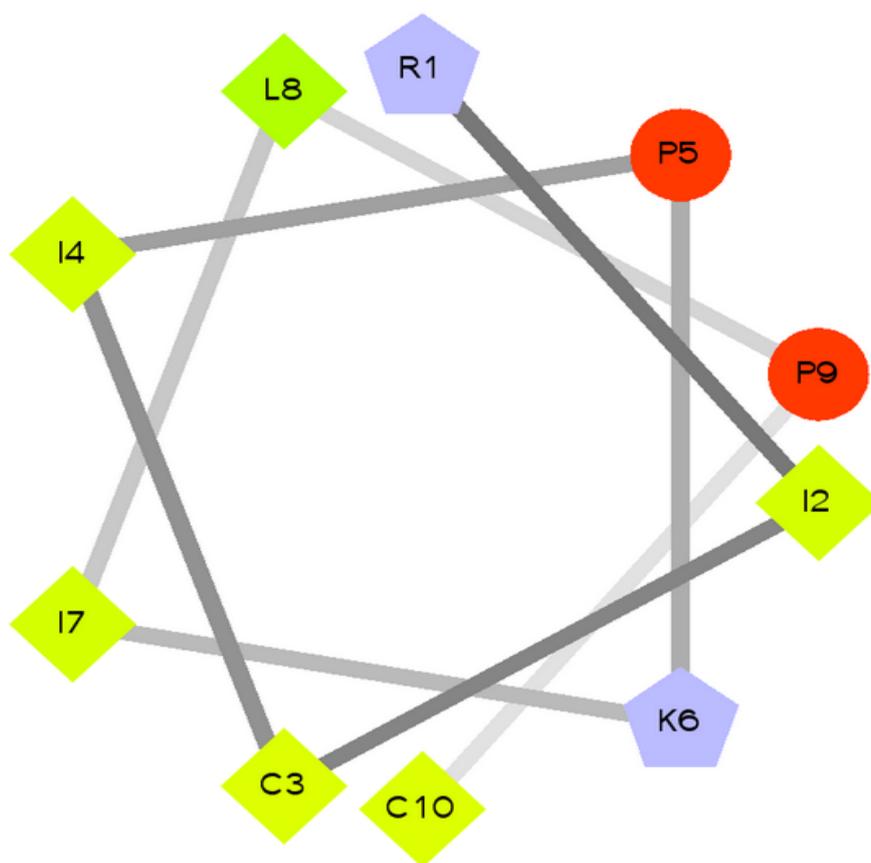


Figura 28 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 4-13.

Resíduos hidrofóbicos em forma de diamante que variam da cor verde ao verde claro, resíduos hidrofílicos em forma de círculo em vermelho intenso ao amarelo, resíduos potencialmente positivamente em forma de pentágono e os potencialmente negativos em forma de triângulo sendo esses últimos na cor lilás.

Através da projeção de Schiffer –Edmundson (Figura 28), observar-se que o peptídeo é constituído principalmente de resíduos hidrofóbicos que são representados em forma de diamante que estão distribuídos em um lado do peptídeo. Vale ressaltar que essa estrutura bidimensional confirma a ponte dissulfeto, já que os dois resíduos de cisteínas ficaram lado a lado proporcionado a formação da ponte. Os dois resíduos de P (prolina) hidrofílicos representados pelo círculo também ficaram organizados lado a lado. Os resíduos potencialmente positivos de lisina (K) e arginina (R) (em forma de pentágono) ficaram agrupados nas extremidades da sequência dos resíduos hidrofóbicos.

5.2.2. Identificação do peptídeo da fração 5-13 de H.C.

No espectro de massas da fração 5-13 é observado o íon de m/z 1.537,7 u antes da reação e o íon m/z 1.653,7 u depois da reação, indicando a alquilação de duas cisteínas (Figura 29).

A fração 5-13 após a reação apresentou uma alta intensidade de sinal (2×10^4) sendo esse íon em seguida submetido à técnica de fragmentação (Figura 30).

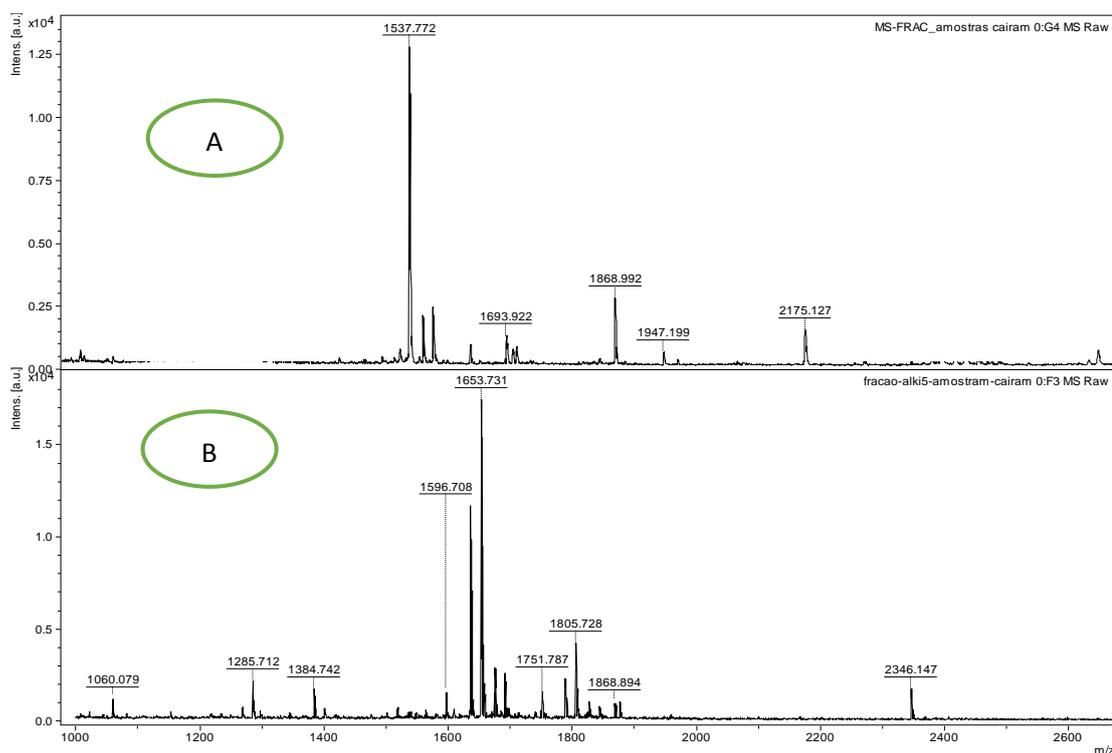


Figura 29 - Espectro de Massa da Fração 5-13 antes e depois da reação. Parte A da figura indica a fração 5-13 antes da reação de redução e alquilação. Parte B indica a fração 5-13 depois da reação.

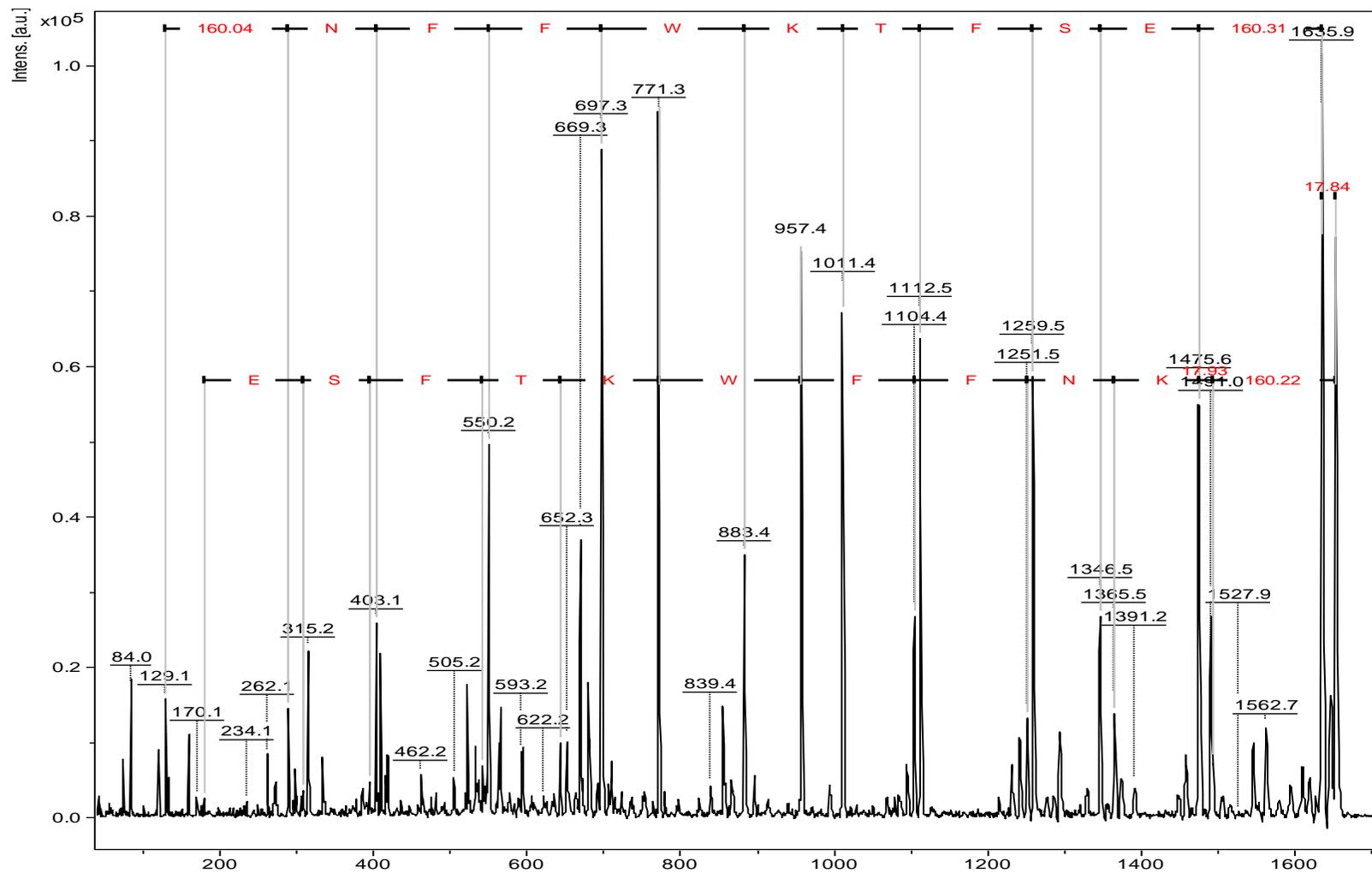


Figura 30 - Sequência obtida da fragmentação do íon m/z 1.653,9 u.

Na sequência proposta a porção C-terminal é indicada pelo valor 160 evidenciando que um resíduo de cisteína foi alquilado, seguido por E (parte superior da figura no canto direito), e a porção N-terminal também é indicada pelo valor 160 (evidenciando que o outro resíduo de cisteína foi alquilado) seguido por K.

O peptídeo da fração 5-13 com 12 resíduos de aminoácidos e sequência proposta **CKNFFWKTFSEC**, com C-terminal carboxilado foi submetida à ferramenta de bioinformática BLASTp usando a base de dados UniProtKB/Swiss-Prot. Apresentando 83% de identidade com o hormônio proteico **somatostatina (CKNFFWKTFSTSC)**. Esse hormônio possui ação predominantemente inibitória, tanto para a secreção de GH (hormônio do crescimento ou somatotrofina) quanto para a secreção de TSH (hormônio estimulante da tireoide). Sendo que está é segunda vez que a variação desse hormônio é identificada na secreção cutânea de um anfíbio, pertencente ao mesmo gênero da espécie em estudo (dados não publicados).

De acordo com SOPMA o peptídeo não apresenta estrutura secundária definida, apresentando apenas um estado conformacional de 100% em espiral aleatória (Cc) (Figura 31). Esse fato é semelhante ao observado no peptídeo da fração 4-13.



Figura 31 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 5-13 de H.C. Linha rosa constante indica que o peptídeo tem apenas a conformação de espiral aleatória

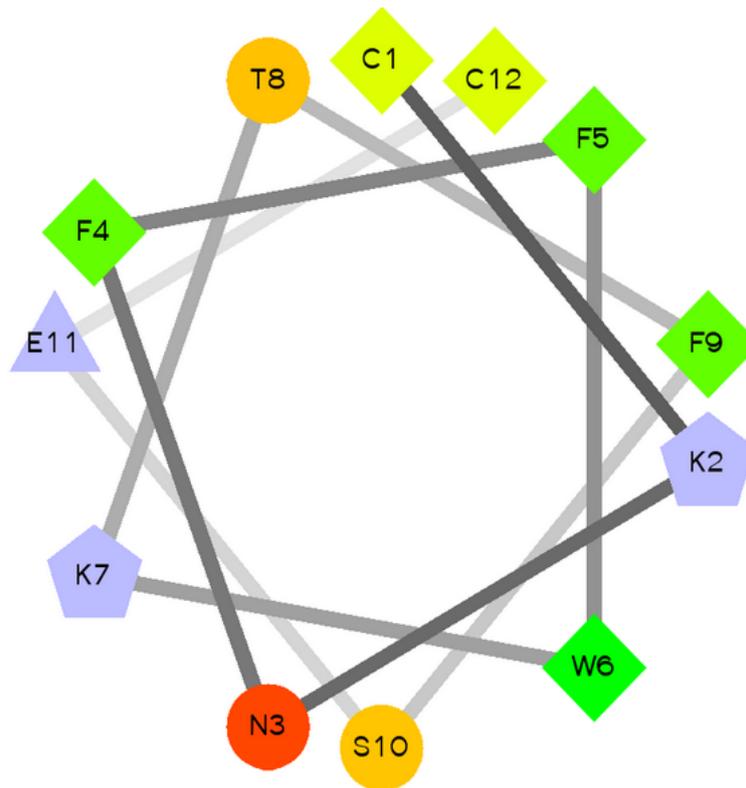


Figura 32 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 5-13 de H.C. Resíduos hidrofóbicos em forma de diamante que variam da cor verde ao verde claro, resíduos hidrofílicos em forma de círculo em vermelho intenso ao amarelo, resíduos potencialmente positivamente em forma de pentágono e os potencialmente negativos em forma de triângulo sendo esses últimos na cor lilás.

Através da projeção de Schiffer-Edmundson (figura 32), pode-se observar que o peptídeo é constituído em grande parte de resíduos hidrofóbicos, esses resíduos estão distribuídos redor de quase todo o peptídeo. Vale ressaltar que essa estrutura bidimensional confirma a ponte dissulfeto já que os dois resíduos de cisteínas ficaram lado a lado proporcionando a formação da ponte (1 e 12). Os resíduos hidrofílicos também ficaram organizados já que 2 dos 3 resíduos ficaram lado a lado (N e S).

5.2.3. Identificação dos peptídeos da fração 15.

A fração 15 após purificação em sistema analítico resultou em 5 subfrações (Figura 33).

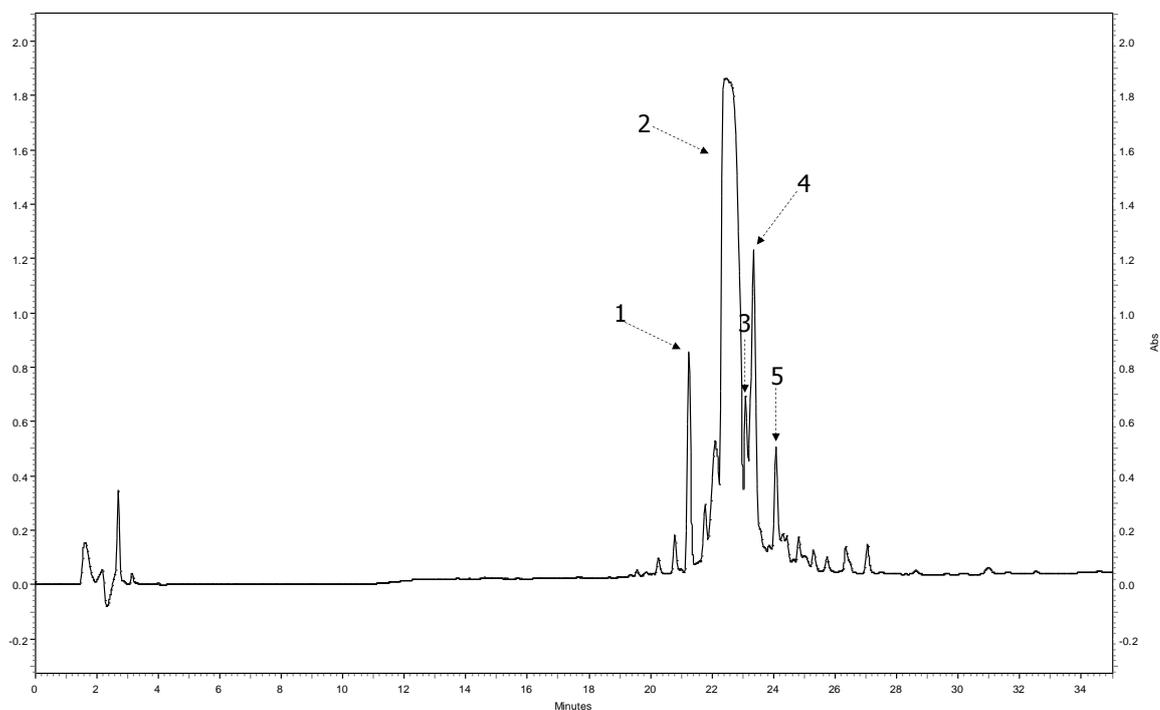


Figura 33 – Cromatograma analítico da fração 15 de H.C. Linha preta representa comprimento de onda em 216 nm. As setas indicam quais frações foram coletadas manualmente

Porém apenas a subfração 5 apresentou espectro de MS^2 adequado para ser sequenciado. Sendo possível confirmar as séries y e b.

5.2.3.1. Identificação dos peptídeos a fração 5-15 de H.C.

No espectro de massas da fração 5-15 foram observados dois íons majoritários de m/z 2.490,5 u e m/z 2.052,2 u (Figura 34), sendo em seguida submetidos à fragmentação (Figura 35 e 36) respectivamente.

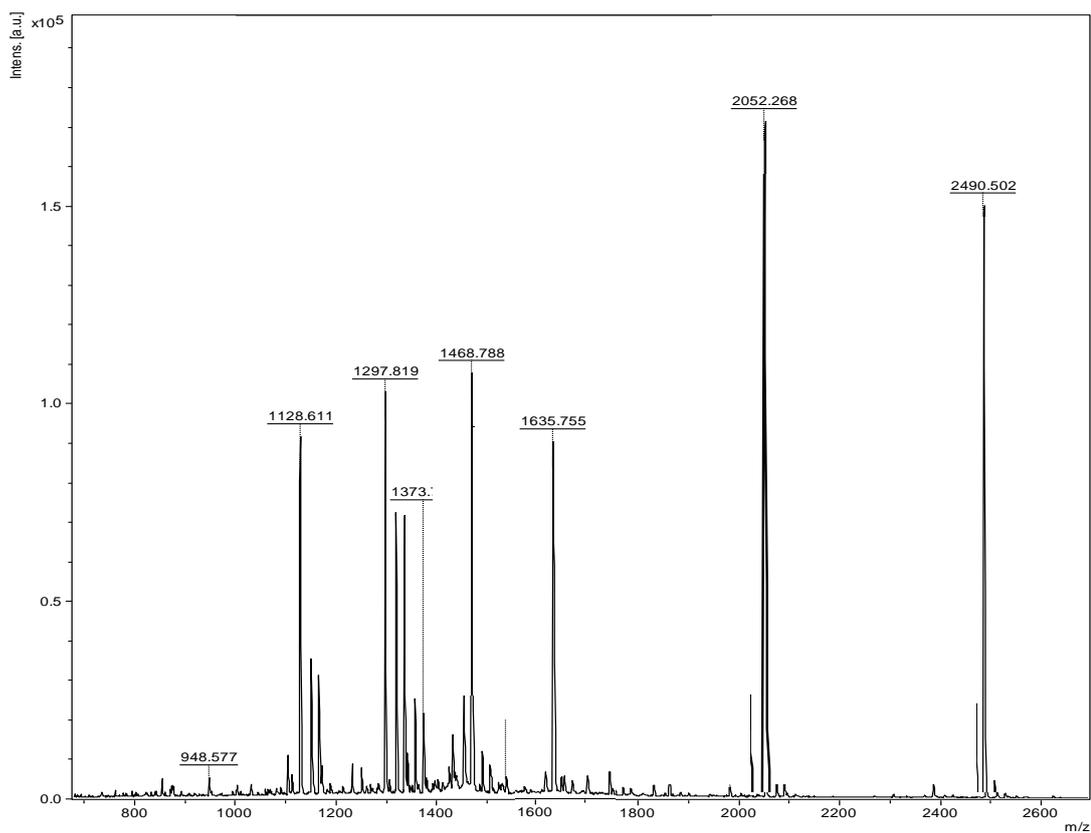


Figura 34 - Espectro de Massas da fração 5-15.

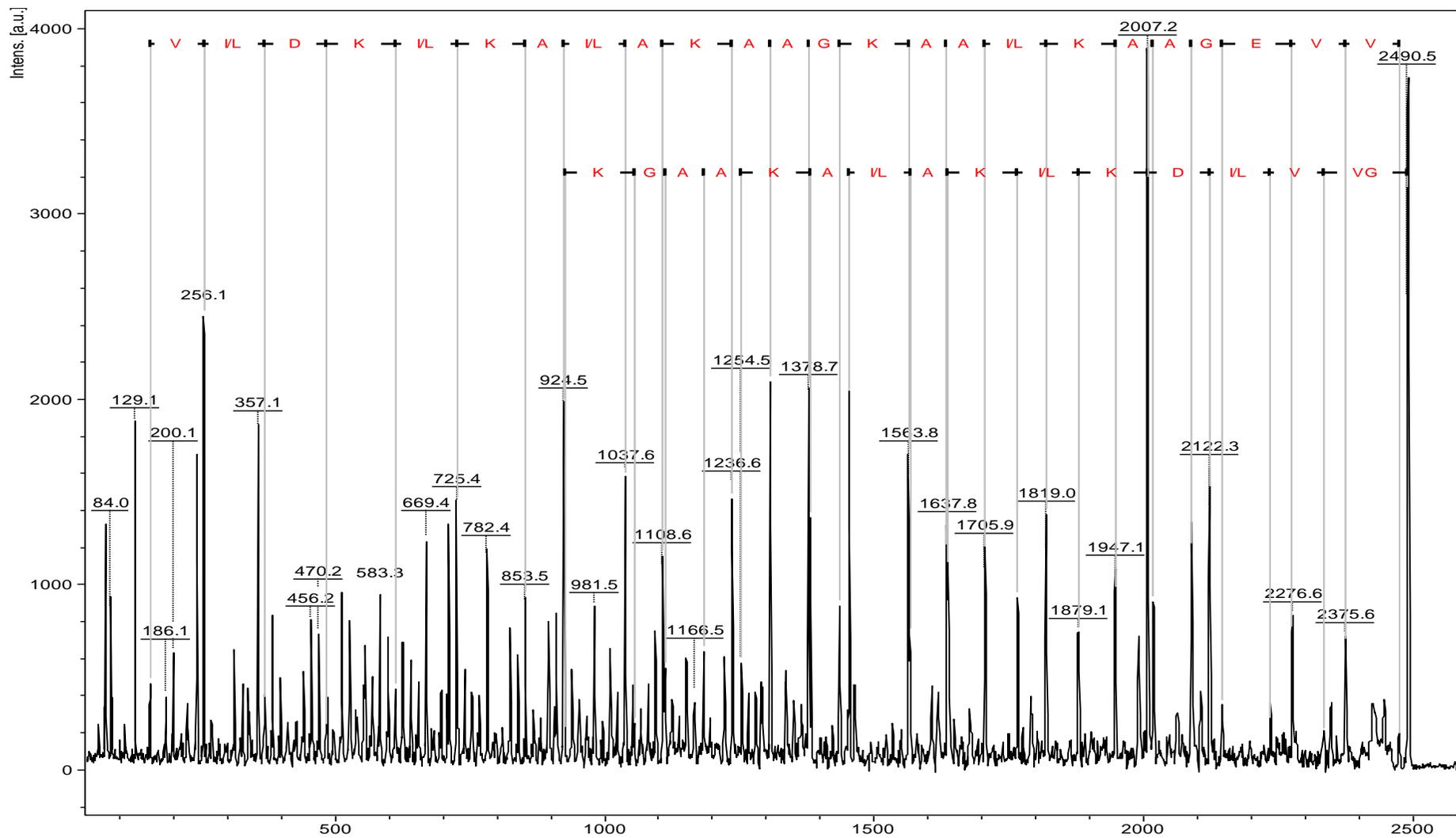


Figura 35 - Sequência obtida da fragmentação do íon m/z 2.490,5 u.

Na sequência proposta a porção C-terminal é indicada pelo resíduo V (valina) (parte superior da figura no canto direito), e a porção N-terminal é indicada resíduo G (glicina).

Os peptídeos da fração 5-15 com 26 (m/z 2.490,5) e 22 (m/z 2.052,2) resíduos de aminoácidos e sequências propostas **GVVI/LDKI/LKAI/LAKAAGKAAI/LQAAGE-VV** e **AVI/LDGAI/LKTI/LAKAAGKAAI/LQAA** ambas com C-terminais amidados, sendo que essa modificação pós-traducional pode ser confirmada através da comparação das massas obtidas experimentalmente com as massas teóricas calculadas apresentando a diferença de aproximadamente 1 u a menos.

As sequências obtidas foram submetidas à ferramenta de bioinformática BLASTp mostrando 69% e 67% de identidade com o peptídeo **hylaseptina-P1** (**GILDAIKAIKAAG**) encontrado na secreção cutânea da espécie *H. punctatus*, sendo esta pertencente ao mesmo gênero da espécie em estudo possuindo a capacidade de inibir o crescimento de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* (PRATES et al., 2004).

A sequência proposta com 26 resíduos e m/z 2.490,5 u foi submetida a ferramenta de bioinformática SOPMA para avaliar o alinhamento e a possível conformação de sua estrutura secundária. Sendo que o peptídeo apresenta uma possível estrutura em 2 estados: a conformação principal e em forma de α -hélice com 96,15% (Hh) do primeiro ao vigésimo quinto resíduo de aminoácido e 3,85% em cadeia estendida (Ee) no último resíduo (Figura 37).

SOPMA :

Alpha helix (Hh) :	25 is	96.15%		10	20
3 ₁₀ helix (Gg) :	0 is	0.00%			
Pi helix (Ii) :	0 is	0.00%			
Beta bridge (Bb) :	0 is	0.00%			
Extended strand (Ee) :	1 is	3.85%			
Beta turn (Tt) :	0 is	0.00%			
Bend region (Ss) :	0 is	0.00%			
Random coil (Cc) :	0 is	0.00%			
Ambiguous states (?) :	0 is	0.00%			
Other states :	0 is	0.00%			

Sequence length : 26

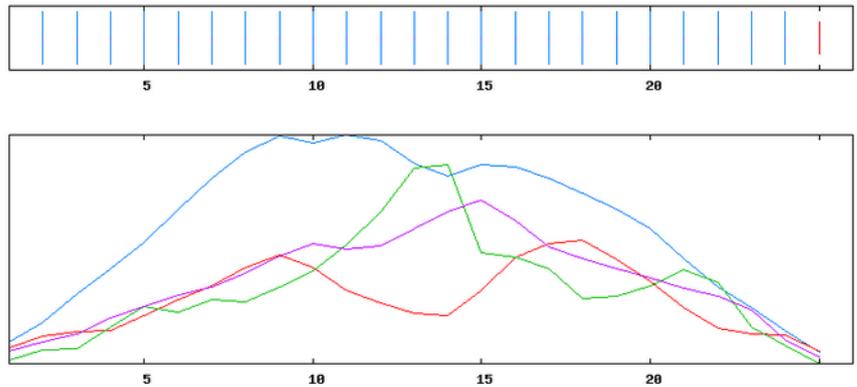


Figura 37 - Predição da estrutura secundária do peptídeo com m/z 2.490,5 u da fração 5-15 de H.C.

Linha em azul indica a conformação em α -hélice, vermelha indica conformação em cadeia estendida, verde em ângulo β e rosa em conformação de espiral aleatória.

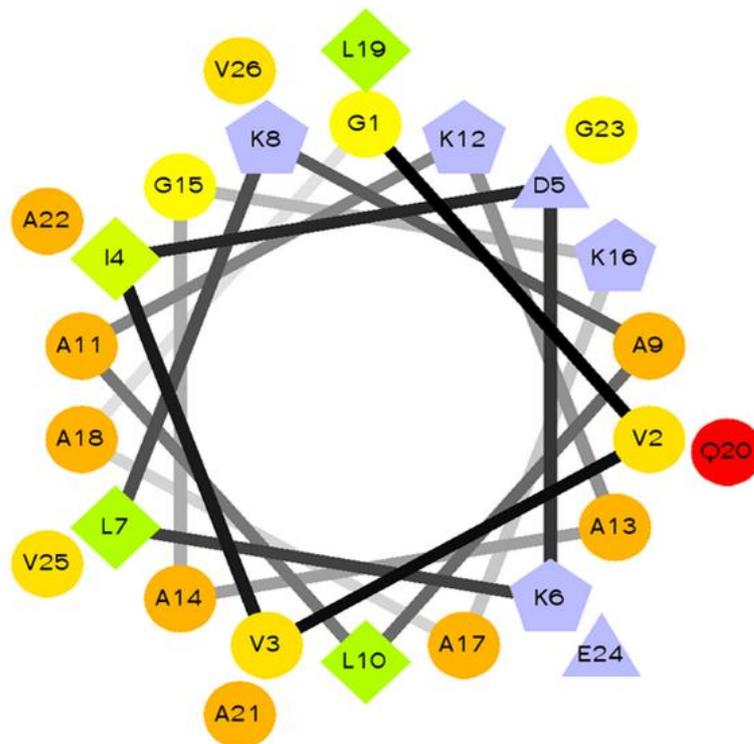


Figura 38 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo com m/z 2.490,5 u da fração 5-15 de H.C.

Resíduos hidrofóbicos em forma de diamante que variam da cor verde ao verde claro, resíduos hidrofílicos em forma de círculo em vermelho intenso ao amarelo, resíduos potencialmente positivamente em forma de pentágono e os potencialmente negativos em forma de triângulo sendo esses últimos na cor lilás.

Através da projeção de Schiffer-Edmundson (Figura 38), pode-se observar que o peptídeo é constituído em sua maioria de resíduos hidrofílicos. Esses resíduos estão totalmente distribuídos em toda a α -hélice. Os 4 resíduos hidrofóbicos estão distribuídos ao longo da α -hélice separados por dois resíduos hidrofílicos, causando uma estabilidade para o peptídeo. Os resíduos potencialmente positivos e negativos estão organizados em praticamente em uma face do peptídeo dando uma maior estabilidade a carga efetiva do peptídeo.

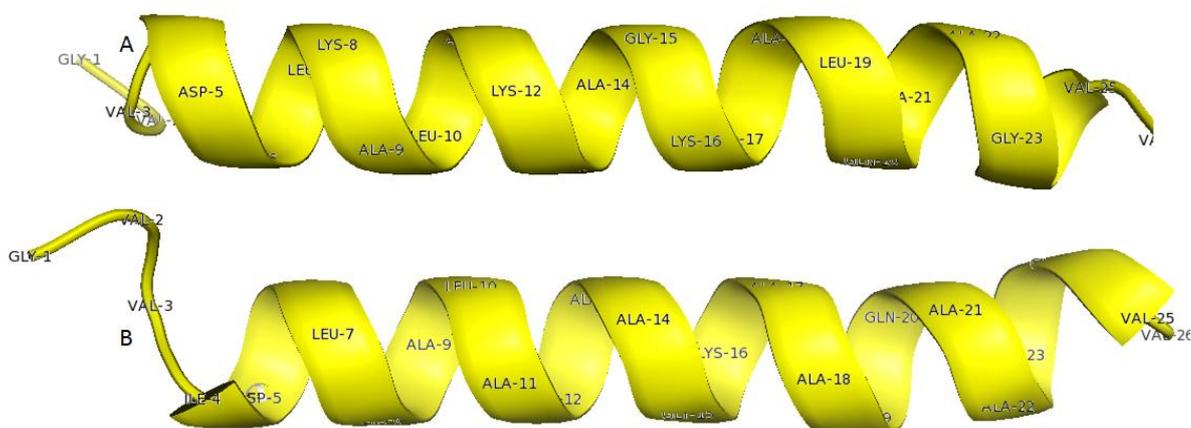


Figura 39 - Conformação em 3D do peptídeo com m/z 2.490,5 u da fração 5-15 de H.C. Parte A da figura e mostrada uma face do peptídeo e na parte B é mostrada a face oposta.

Através da conformação em 3D pode confirmar que o peptídeo adota conformação principal em α -hélice, com uma pequena região aleatória nas extremidades da sequência.

Na figura 39A observar-se os resíduos nas posições 5, 8, 12, 19 e 23 que são referentes aos resíduos ácido aspártico (5), lisina (8, 12), leucina (19) e glicina (23).

Na figura 34B é evidenciado os resíduos nas posições 7, 11, 14, 18, 21 e 25 que são referentes aos resíduos leucina (7), alanina (11, 14, 18 e 21) e valina (25).

Essa distribuição espacial faz com que a face apresentada na parte A seja predominantemente catiônica devido os resíduos de lisina e pouco hidrofílica devido a

um único resíduo de leucina. Porém a face apresentada na parte B seja inteiramente hidrofóbica devido aos resíduos de alanina e valina.

O peptídeo com m/z 2.052,2 u apresenta uma possível estrutura em apenas 2 estados: com conformação principal em forma de α -hélice com 90,91% (Hh) do primeiro ao décimo terceiro resíduo e do décimo sexto ao vigésimo segundo resíduo de aminoácido e 9,09% em ângulo β (Tt) (Figura 40).

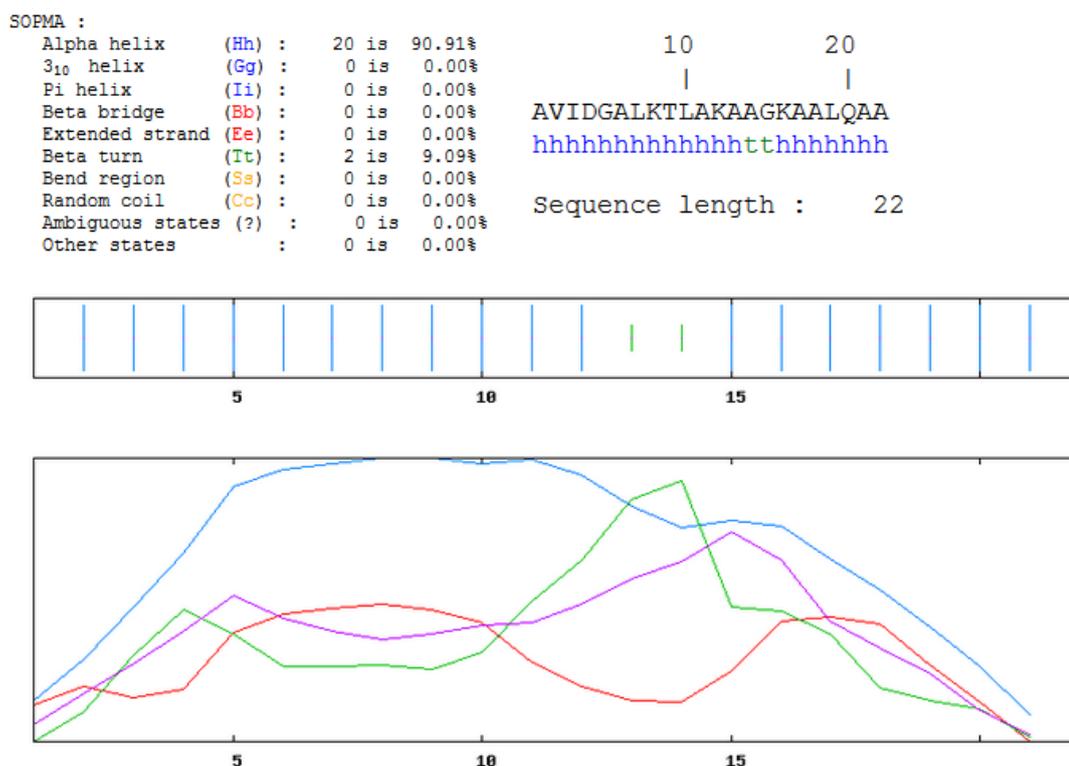


Figura 40 - Predição da estrutura secundária do peptídeo com m/z 2.052,2 u da fração 5-15 de H.C.

Linha em Azul indica a conformação em α -hélice, vermelha indica conformação em cadeia estendida, verde em ângulo β e rosa em conformação de espiral aleatória.

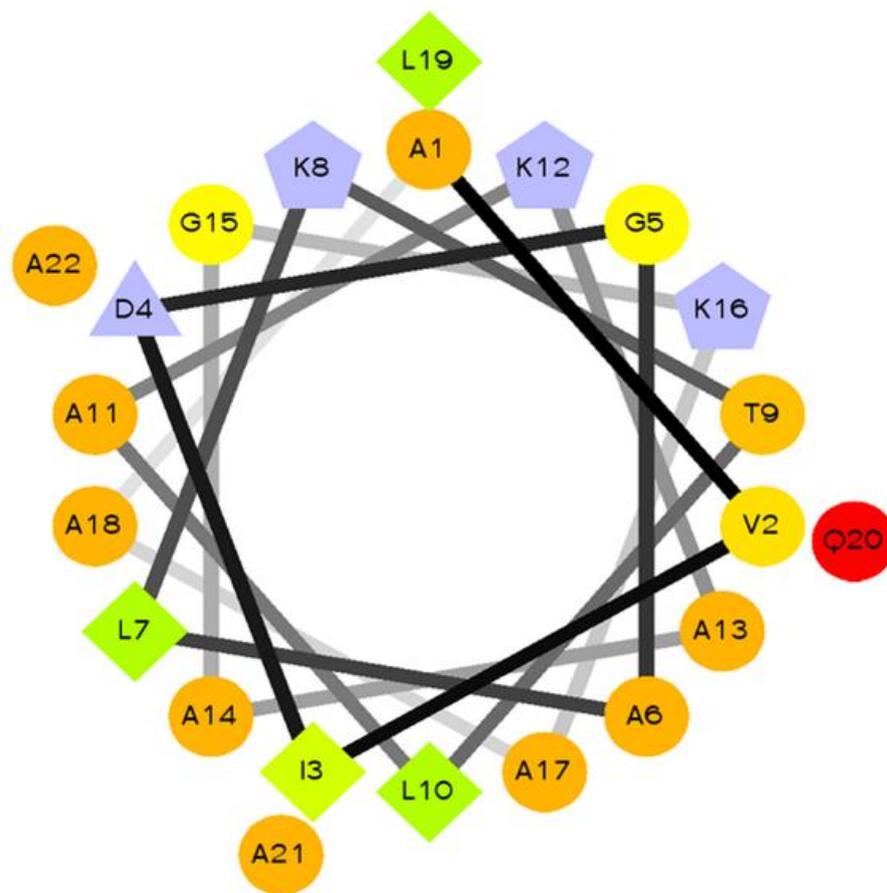


Figura 41 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo com m/z de da 2.052,2 u da fração 5-15 de H.C.

Resíduos hidrofóbicos em forma de diamante que variam da cor verde ao verde claro, resíduos hidrofílicos em forma de círculo em vermelho intenso ao amarelo, resíduos potencialmente positivamente em forma de pentágono e os potencialmente negativos em forma de triângulo sendo esses últimos na cor lilás.

Através da projeção de Schiffer-Edmundson (Figura 41), pode-se observar que o peptídeo é constituído em sua maioria de resíduos hidrofílicos. Esses resíduos estão organizados predominantemente em um lado do peptídeo juntamente com resíduo mais hidrofílico (Q) representado pelo vermelho intenso.

O peptídeo possui apenas quatro resíduos hidrofóbicos, três desses quatro resíduos estão agrupados em uma face do peptídeo estando separados por apenas um resíduo hidrofílico.

Os três resíduos potencialmente positivos e um potencialmente negativo estão dispostos em sequência na estrutura secundária peptídica estando separados por um resíduo hidrofílico.

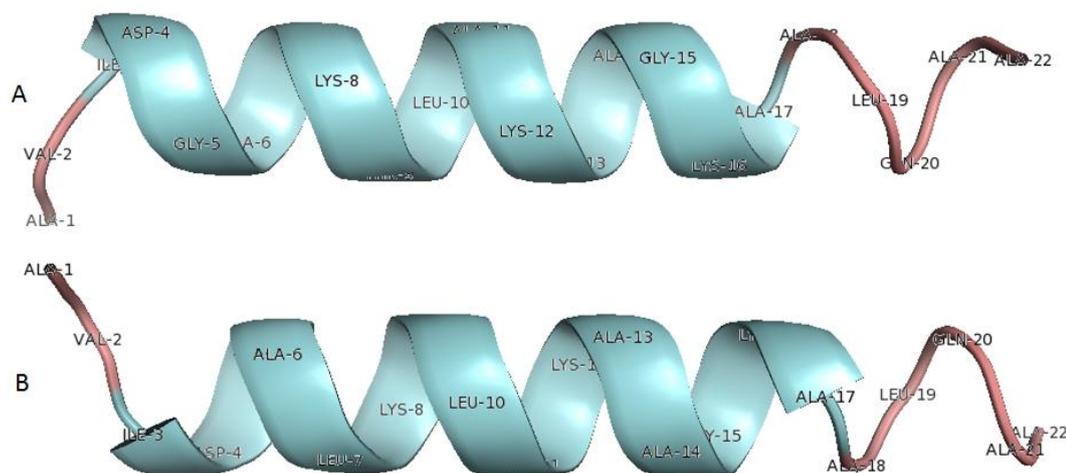


Figura 42 - Conformação em 3D do peptídeo com m/z 2.052,2 u da fração 5-15 de H.C. Parte A da figura é mostrada uma face do peptídeo e na parte B e mostrada a face oposta

A estrutura tridimensional (Figura 42) confirmar que o peptídeo adota conformação principal em α -hélice, com uma pequena região aleatória na porção N-Terminal e uma segunda região com cinco resíduos porção C-Terminal.

Observa-se que os resíduos referentes a face do peptídeo demonstrada na parte A da figura 42 mostra dois resíduos de lisina (LYS) nas posições 8 e 12 e um resíduo de glicina (GLY) na posição 15. O que faz com que essa face seja predominantemente catiônica.

Na parte B da figura 42 mostra um resíduo de isoleucina (ILE) na posição 3, quatro resíduos de alanina (ALA) nas posições 6, 13, 14 e 17 e um resíduo de leucina na posição 10. O que faz com que essa face seja predominantemente hidrofílica.

5.2.4. Identificação dos peptídeos da fração 16 de H.C.

A fração 16 após purificação em sistema analítico resultou em 5 subfrações (Figura 43).

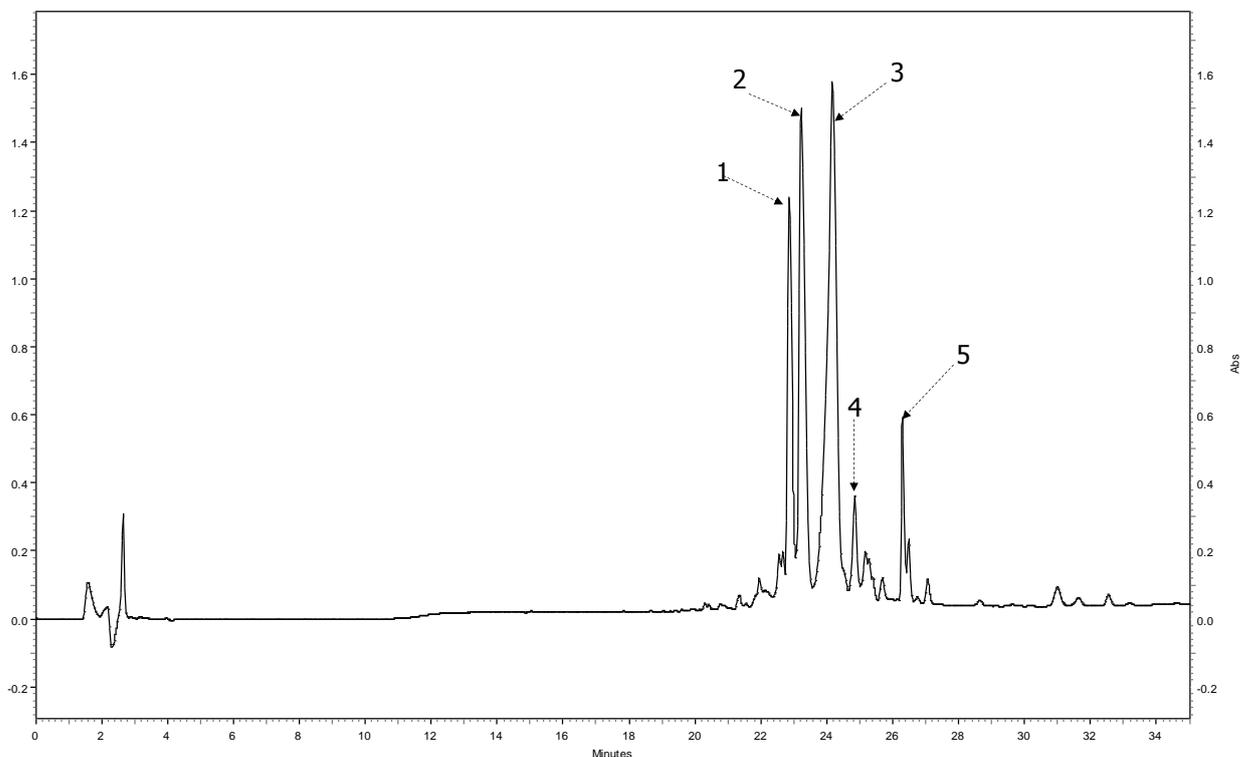


Figura 43 - Cromatograma analítico da fração 16.

Linha preta representa comprimento de onda em 216 nm. As setas indicam quais frações foram coletadas manualmente

Porém apenas as subfrações 4 e 5 apresentaram espectro de MS^2 adequado para ser sequenciado, sendo possível confirmar as séries y e b.

5.2.4.1 Identificação do peptídeo da fração 4-16 de H.C.

No espectro de massas da fração 4-16 foi observado o íon majoritário de m/z 1.861,0 u (Figura 44) com uma alta intensidade de sinal (6×10^4), sendo este em seguida submetido à fragmentação (Figura 45).

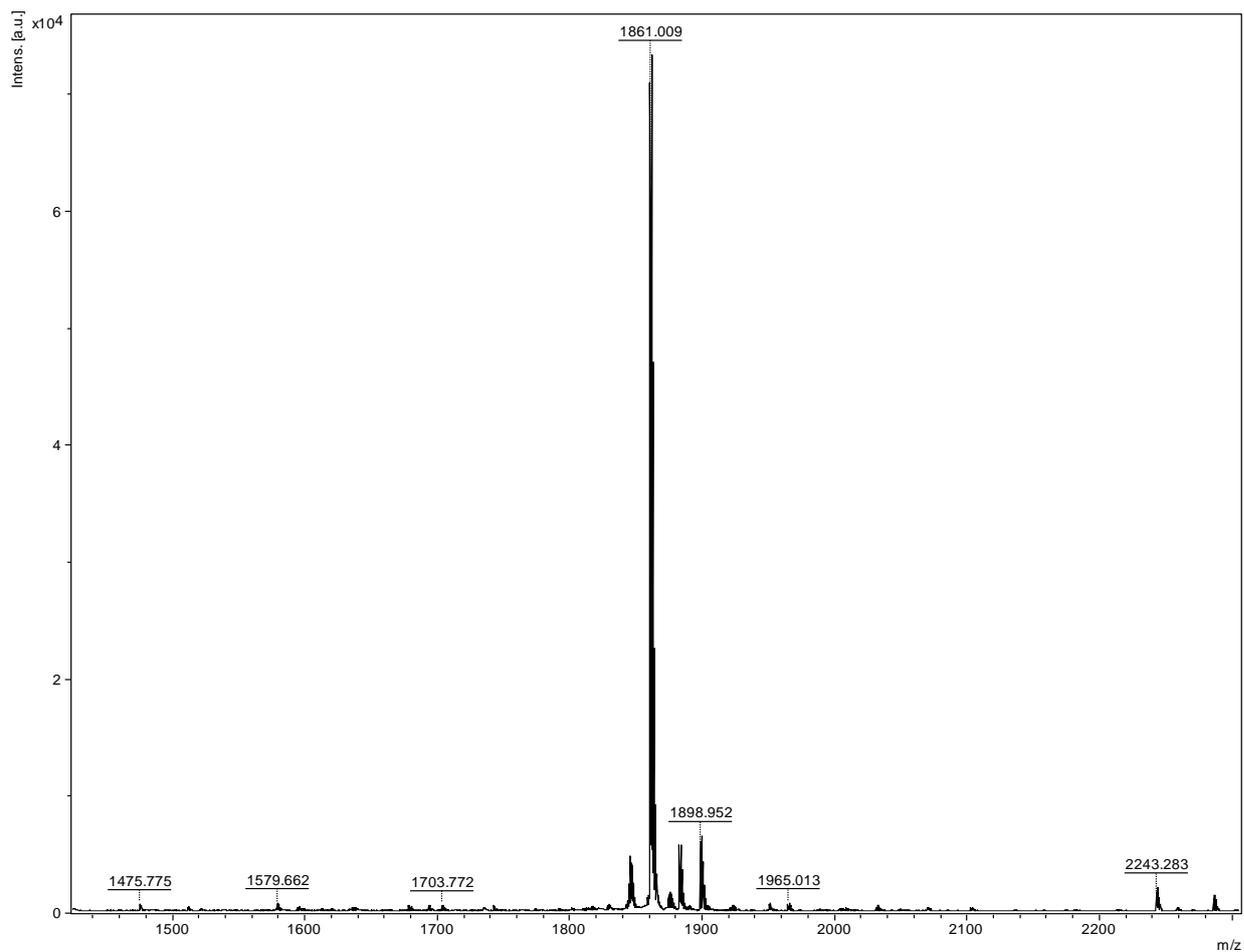


Figura 44 - Espectro de Massas da fração 4-16 de H.C.

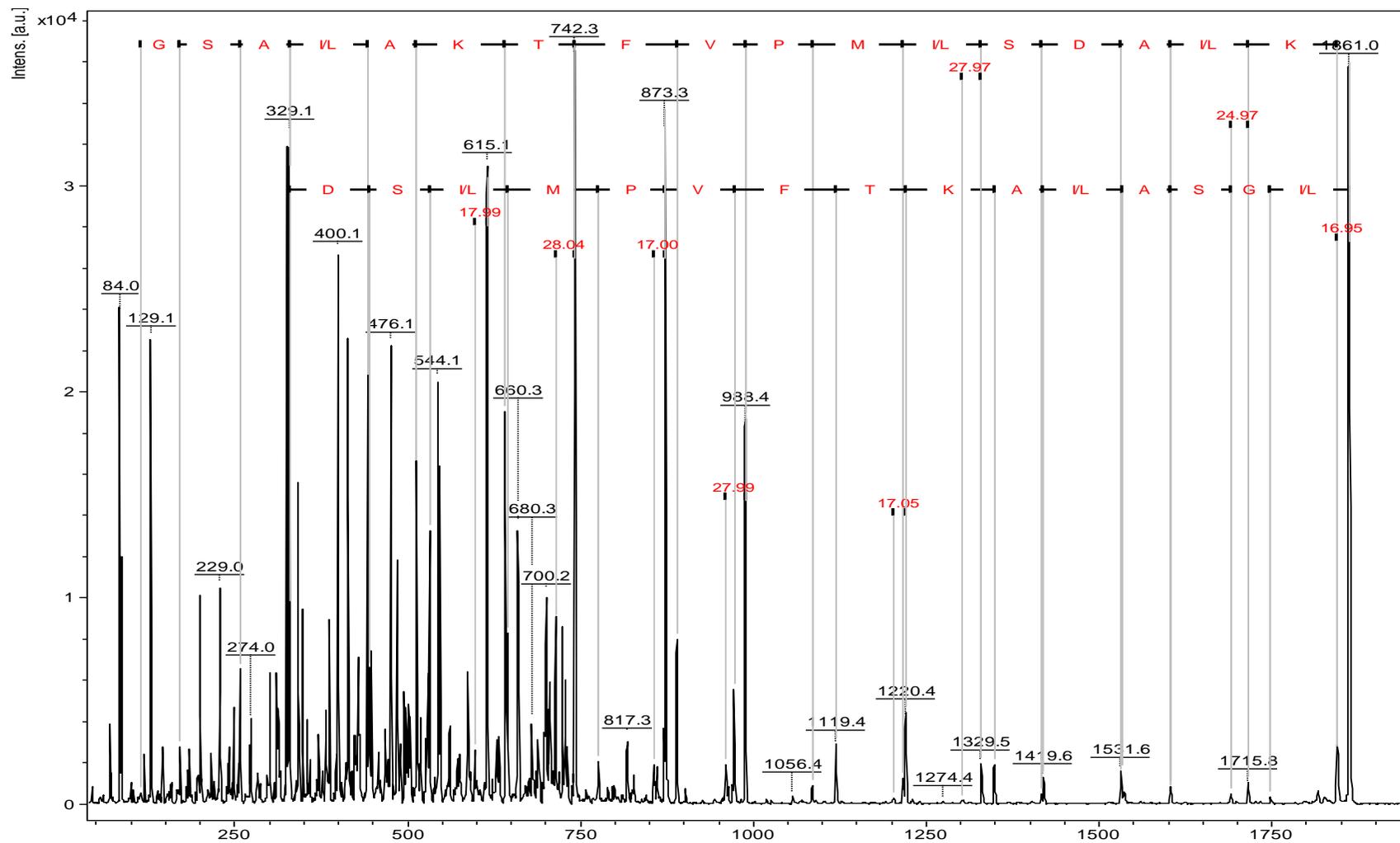


Figura 45 - Sequência obtida da fragmentação do íon m/z 1.861,0 u.

Porção C-terminal é indicada pelo resíduo K (lisina) na parte superior da figura no canto direito, e a porção N-terminal é indicada pelo resíduo LV (leucina-valina) um pouco abaixo de K.

O peptídeo da fração 4-16 com 18 resíduos de aminoácidos e sequência proposta **I/LGSAI/LAK/QTFVPMI/LSDAI/LK/Q** com C-terminal amidado foi submetida à ferramenta de bioinformática BLASTp usando a base de dados UniProtKB/Swiss-Prot. Tendo nenhuma identidade com outras sequências depositadas.

A sequência proposta foi submetida a ferramenta de bioinformática SOPMA para avaliar o alinhamento e a possível conformação de sua estrutura secundária. Sendo que o peptídeo apresenta uma possível estrutura secundária em 2 estados: conformação de 77,78% em forma de α -hélice (Hh) do terceiro ao oitavo e décimo primeiro ao décimo oitavo resíduo de aminoácido e 22,22% em espiral aleatória (Cc) nos dois primeiros, no nono e no décimo resíduo (Figura 46).

```

SOPMA :
Alpha helix      (Hh) :   14 is  77.78%
310 helix       (Gg) :    0 is   0.00%
Pi helix         (Ii) :    0 is   0.00%
Beta bridge      (Bb) :    0 is   0.00%
Extended strand (Ee) :    0 is   0.00%
Beta turn        (It) :    0 is   0.00%
Bend region      (Ss) :    0 is   0.00%
Random coil      (Cc) :    4 is  22.22%
Ambiguous states (?) :  0 is   0.00%
Other states     :    0 is   0.00%

```

10
|
IGSAIAKTFVPMISDAIK
cchhhhhcchhhhhh
Sequence length : 18

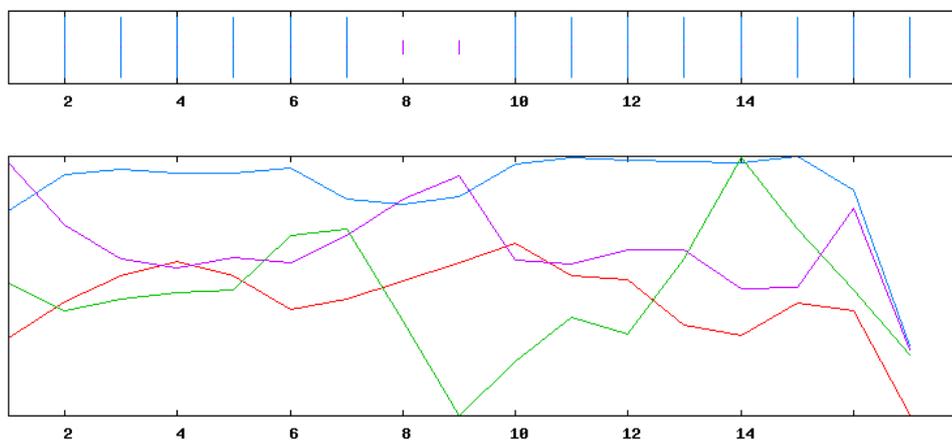


Figura 46 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 4-16 de H.C. Linha em azul indica a conformação em α -hélice, vermelha indica conformação em cadeia estendida, verde em ângulo β e rosa em conformação de espiral aleatória.

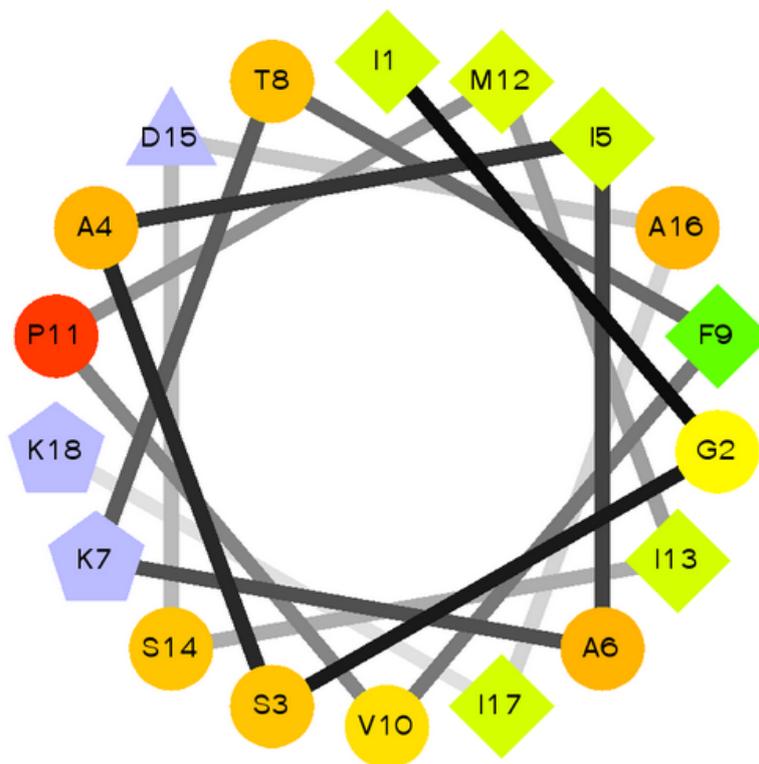


Figura 47 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 4-16 de H.C. Resíduos hidrofóbicos em forma de diamante que variam da cor verde ao verde claro, resíduos hidrofílicos em forma de círculo em vermelho intenso ao amarelo, resíduos potencialmente positivos em forma de pentágono e os potencialmente negativos em forma de triângulo sendo esses últimos na cor lilás.

De acordo com a projeção de Schiffer-Edmundson (Figura 47), pode-se observar que a um equilíbrio entre os resíduos hidrofílicos em formar de círculo e os hidrofóbicos em forma de diamante. Esses resíduos estão bem organizados na estrutura peptídica, onde pode-se observar que a região hidrofílica predomina em uma face do peptídeo e a região hidrofóbica predominam na face oposta.

Na estrutura existem apenas três resíduos potencialmente carregados (dois positivos e um negativo) que também estão organizados em uma face do peptídeo entre resíduos hidrofóbicos.

Para visualizar a estrutura em 3D do peptídeo sequenciado foi usado a ferramenta I-TASSER (Figura 48).

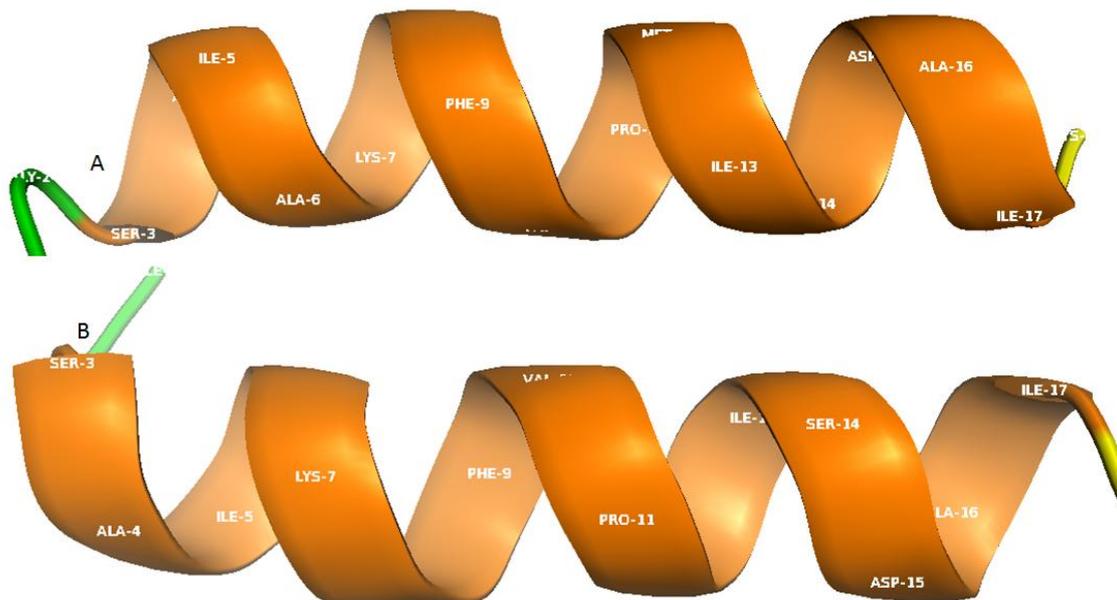


Figura 48 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 4-16 de H.C. Parte A da figura e mostrada uma face do peptídeo e na parte b e mostrada a face oposta

Através da conformação em 3D pode confirmar que o peptídeo adota conformação principal em α -hélice, com duas pequenas regiões aleatórias com apenas um resíduo cada, nas extremidades da sequência.

Observa-se que os resíduos nas posições 5, 9, 13 e 16 são mostradas na figura 46A são referentes aos aminoácidos isoleucina (5 e 13), fenilalanina (9) e alanina (16), estão preferencialmente agrupados na mesma face, sendo que a maioria desses resíduos são hidrofóbicos (ILE e PHE).

Em relação a figura 46B pode observar que os resíduos nas posições 3, 7, 11 e 14 são referentes a serina (3 e 14), lisina (7) e prolina (11) estão preferencialmente agrupados na mesma face, sendo esta oposta a face descrita anteriormente, o que faz com que esta face seja predominantemente hidrofílica e levemente catiônica.

5.2.4.2 Identificação do peptídeo da fração 5-16 de H.C.

No espectro de massas da fração 5-16 foi observado o íon majoritário de m/z 2.603,2 u (Figura 49), em seguida submetido à fragmentação (Figura 50).

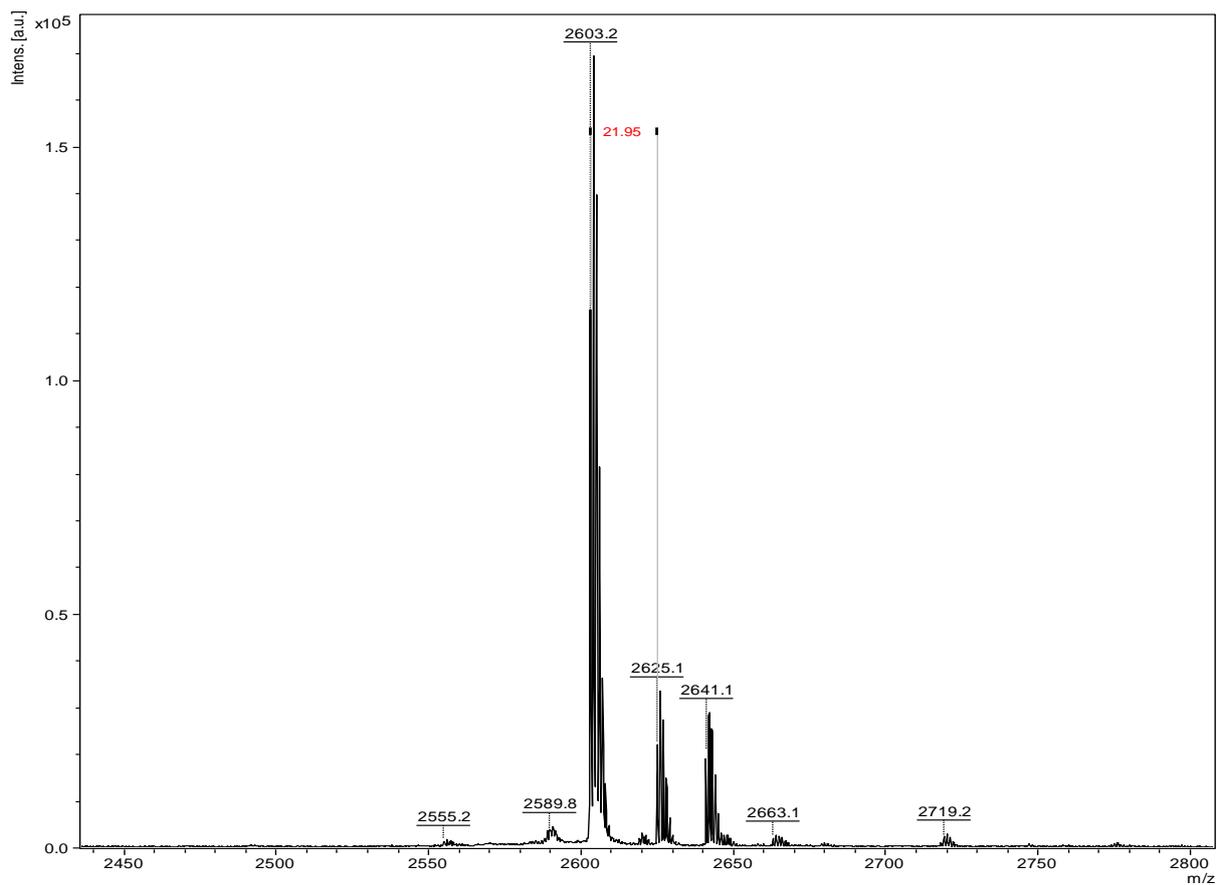


Figura 49 - Espectro de Massas da fração 5-16.

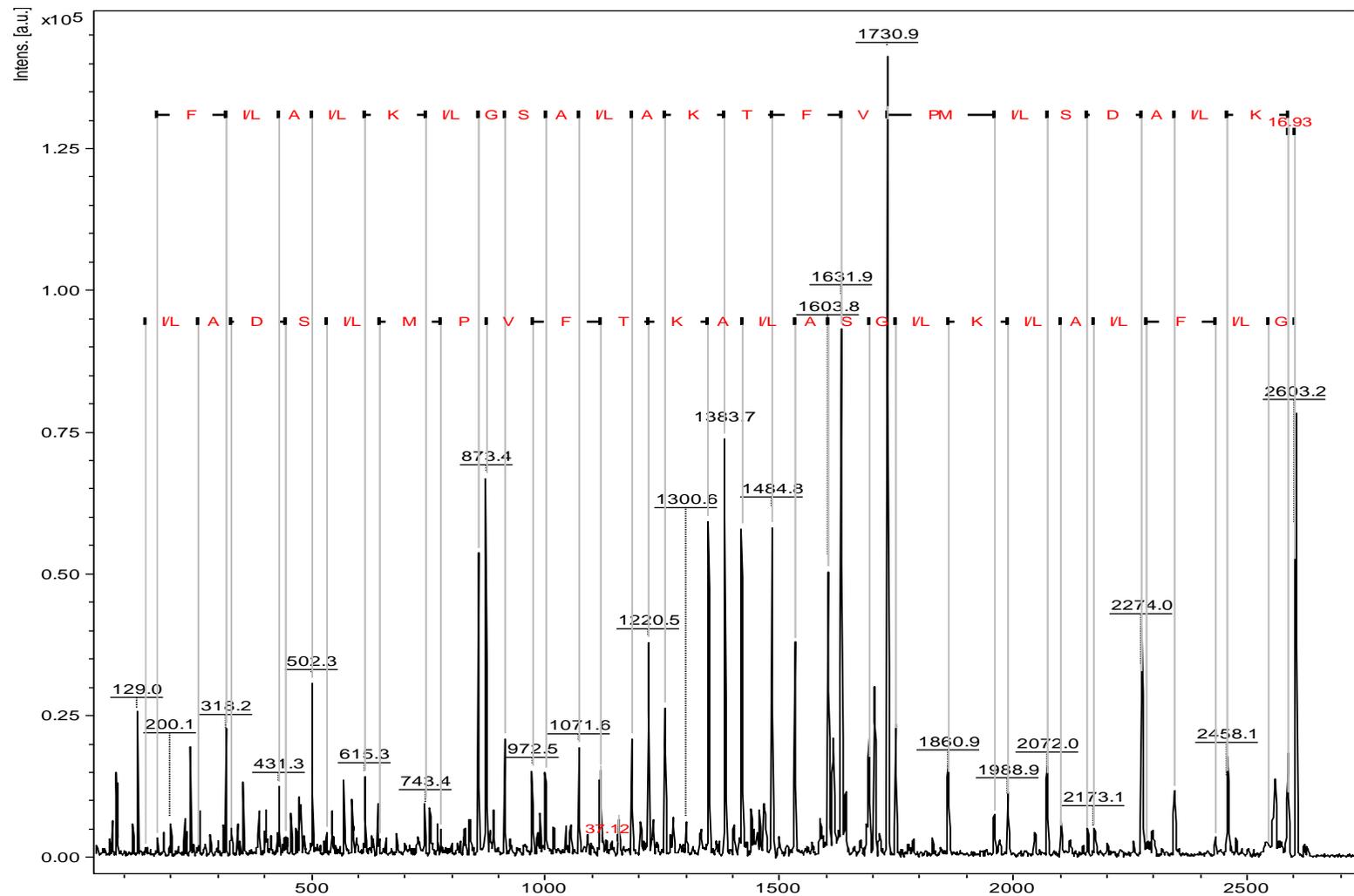


Figura 50 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 2.603,2 u.

Na sequência proposta a porção C-terminal é indicada pelo resíduo K (lisina) na parte superior da figura no canto direito, e a porção N-terminal é indicada pelo resíduo G (glicina) um pouco abaixo de K.

O peptídeo da fração 5-16 com 25 resíduos de aminoácidos e sequência proposta **GI/LFI/LAI/LKI/LGSAI/LAKTFVPMI/LSDAI/LK** com C-terminal amidado após ser submetido a ferramenta BLASTp, também não apresentou identidade significativa com peptídeos depositados em banco de dados. Porém se assemelha a sequência proposta na fração 4-16, com acréscimo de mais sete resíduos de aminoácidos na porção N-terminal (GI/LFI/LAI/LK).

```

SOPMA :
Alpha helix      (Hh) :    18 is  72.00%
310 helix      (Gg) :     0 is   0.00%
Pi helix        (Ii) :     0 is   0.00%
Beta bridge     (Bb) :     0 is   0.00%
Extended strand (Ee) :     5 is  20.00%
Beta turn       (Tt) :     0 is   0.00%
Bend region     (Ss) :     0 is   0.00%
Random coil     (Cc) :     2 is   8.00%
Ambiguous states (?) :    0 is   0.00%
Other states    :     0 is   0.00%

```

10
20
|
|
GLFLALKIGSAIAKTFVPMISDAIK
heeee hhhhhhhhhhh cce hhhhhhh
Sequence length : 25

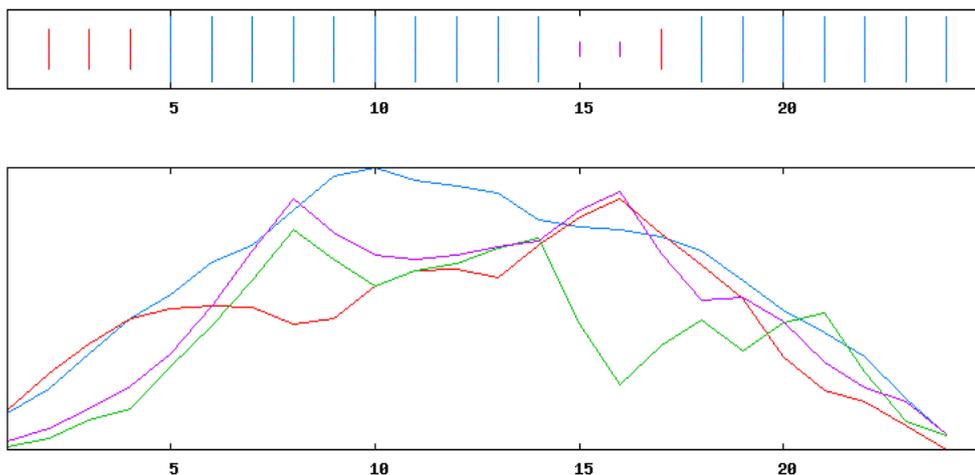


Figura 51 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 5-16 H.C. Linha em Azul indica a conformação em α -hélice, vermelha indica conformação em cadeia estendida, verde em ângulo β e rosa em conformação de espiral aleatória.

Através de SOPMA (Figura 51) é possível observar que o peptídeo adota estrutura secundária em 3 estados: conformação de 72% em forma de α -hélice (Hh) no primeiro resíduo, no sexto ao décimo sexto resíduo e no décimo nono ao vigésimo quinto resíduo. Com 20% em cadeia estendida (Ee) do segundo ao quinto e no décimo

oitavo resíduo e 8.00% em espiral aleatória (Cc) no décimo sexto e décimo sétimo resíduo.

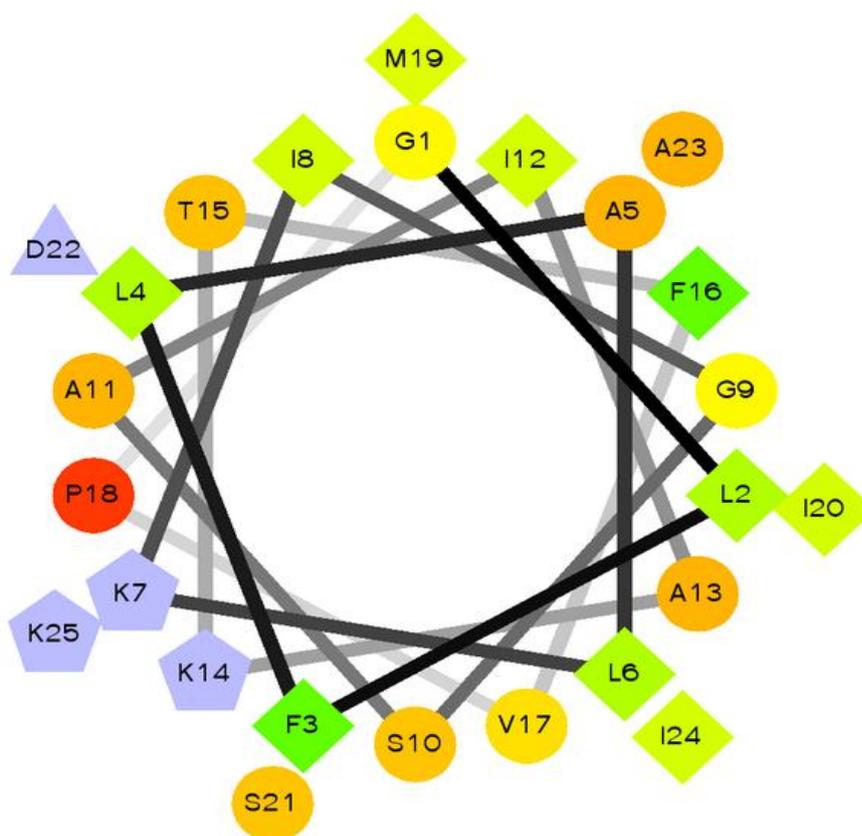


Figura 52 - Projção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 5-16 de H.C. Resíduos hidrofóbicos em forma de diamante que variam da cor verde ao verde claro, resíduos hidrofílicos em forma de círculo em vermelho intenso ao amarelo, resíduos potencialmente positivos em forma de pentágono e os potencialmente negativos em forma de triângulo sendo esses últimos na cor lilás.

Através da projeção de Schiffer-Edmundson (Figura 52), pode-se observar que a um equilíbrio entre os resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos no peptídeo, com a diferença de apenas um resíduo. Esses resíduos estão organizados de tal forma que os resíduos hidrofóbicos fiquem individualmente ou em pares separados por um ou dois resíduos hidrofílicos.

Existem apenas um resíduo potencialmente negativo e três resíduos de lisina (K) potencialmente positivos, que apesar de estarem distantes na estrutura primária (sétima, décima quarta e vigésima quinta posição) ficam especialmente unidos na estrutura

secundária, ocasionando uma maior concentração da carga positiva no peptídeo o que aumenta o caráter catiônico possibilitando interações com membranas bacterias.

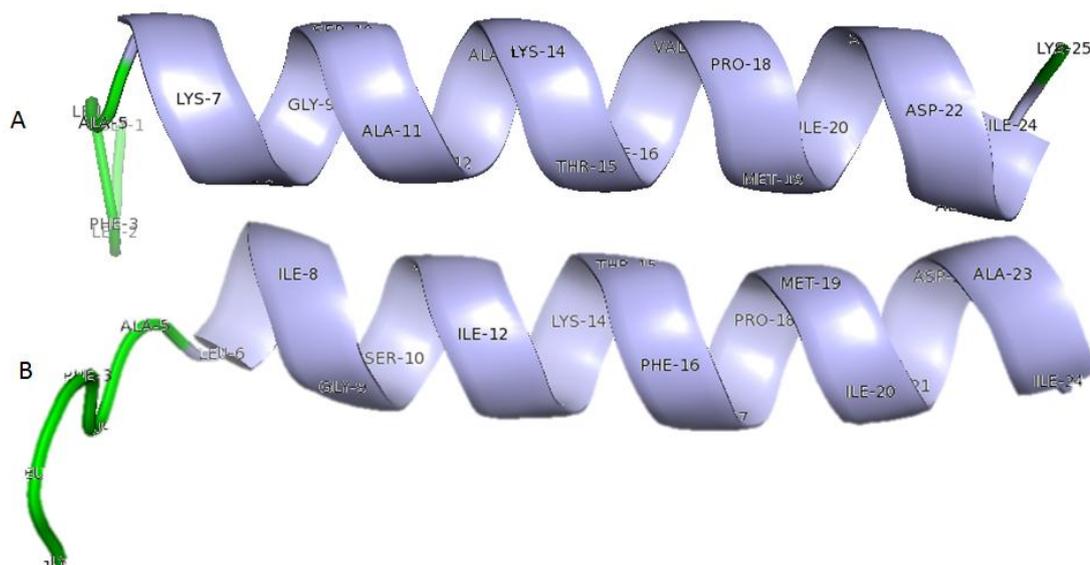


Figura 53 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 5-16 de H.C. Parte A da figura é mostrada uma face do peptídeo e na parte B e mostrada a face oposta

Na parte A da figura 53 é evidenciada a face hidrofílica e catiônica do peptídeo, já que é possível visualizar os resíduos alanina (ALA) na posição 11, treonina (THR) na posição 15 e prolina (PRO) na posição 18, sendo esses resíduos responsáveis pela característica hidrofílica e dois resíduos de lisina (LYS) nas posições 7 e 14 são responsáveis pelo caráter catiônico.

Na parte B é evidenciada a face hidrofóbica, devido aos resíduos de isoleucina (ILE) nas posições 8, 12, 20 e 24, fenilalanina (PHE) e metionina (MET) nas posições 16 e 19 respectivamente.

Esses dados são um indicativo de uma característica catiônica e anfipática, sendo que a sequência proposta é totalmente nova, com semelhança ao peptídeo da fração 4-16 podendo caracterizar dois novos peptídeos com potencial biológico.

5.2.5. Identificação dos peptídeos da fração 17 de H.C.

A fração 17 após purificação em sistema analítico resultou em 8 subfrações (Figura 54).

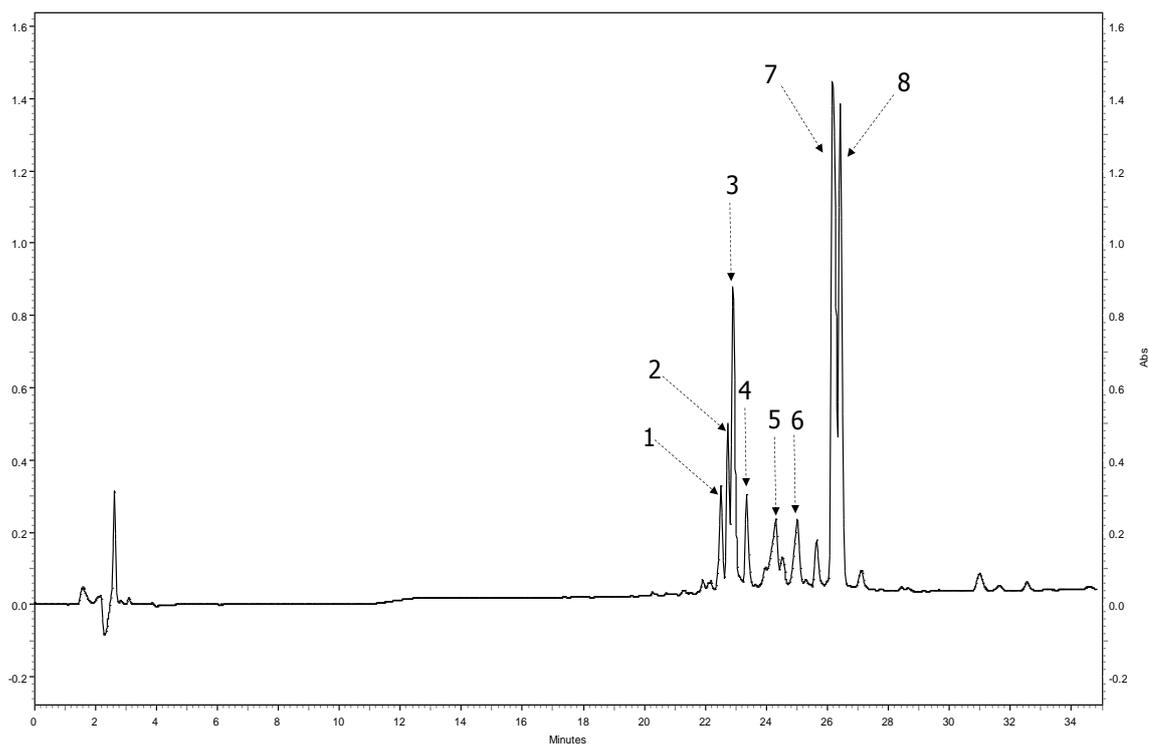


Figura 54 - Cromatograma analítico da fração 17 de H.C.

Linha preta representa comprimento de onda em 216 nm. As setas indicam quais frações foram coletadas manualmente

Porém apenas as subfrações 4, 6 e 7 apresentaram espectro de MS^2 adequado para ser sequenciado, sendo possível confirmar as séries b e y.

5.2.5.1 Identificação do peptídeo da fração 4-17.

No espectro de massas da fração 4-17 foi observado o íon majoritário de m/z 1.993,3 u (Figura 55), com alta intensidade de sinal (1.2×10^4), sendo em seguida submetido a fragmentação (Figura 56).

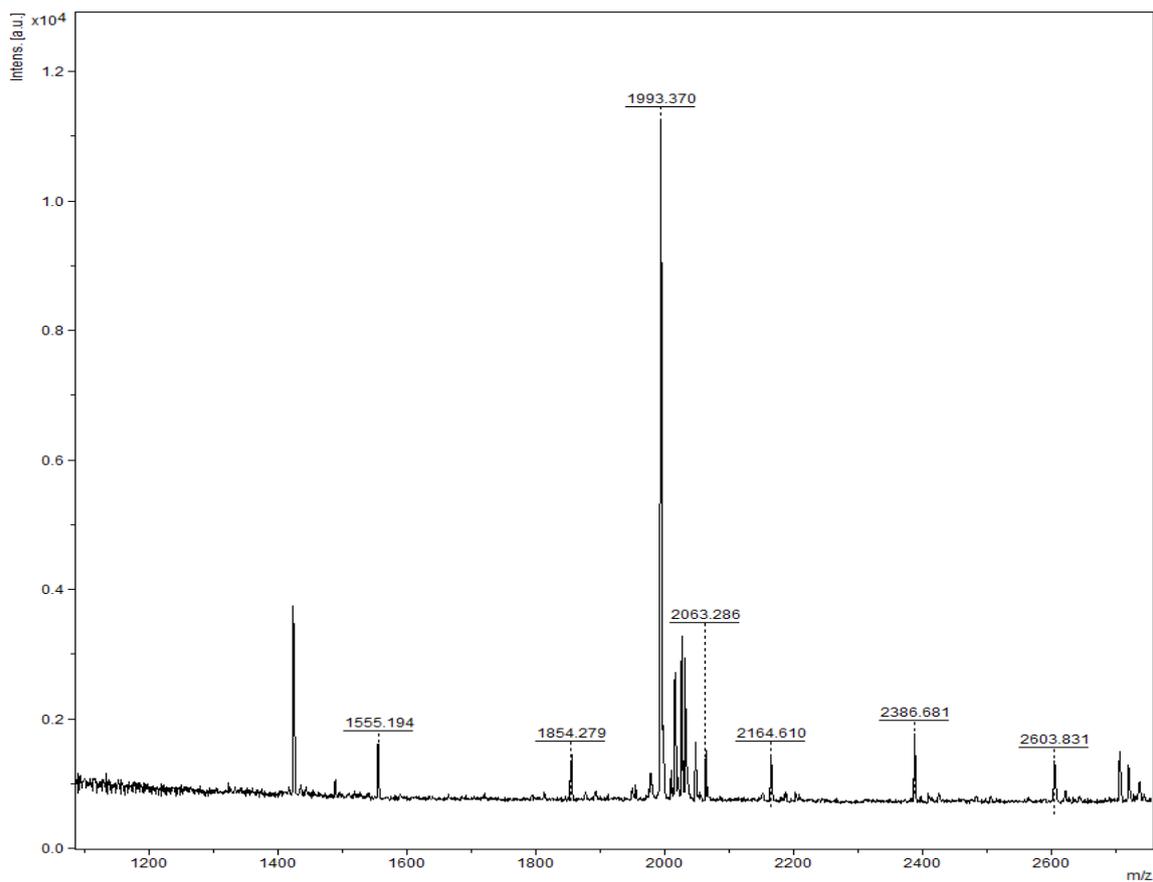


Figura 55 - Espectro de Massas no modo MS da fração 4-17 de H.C.

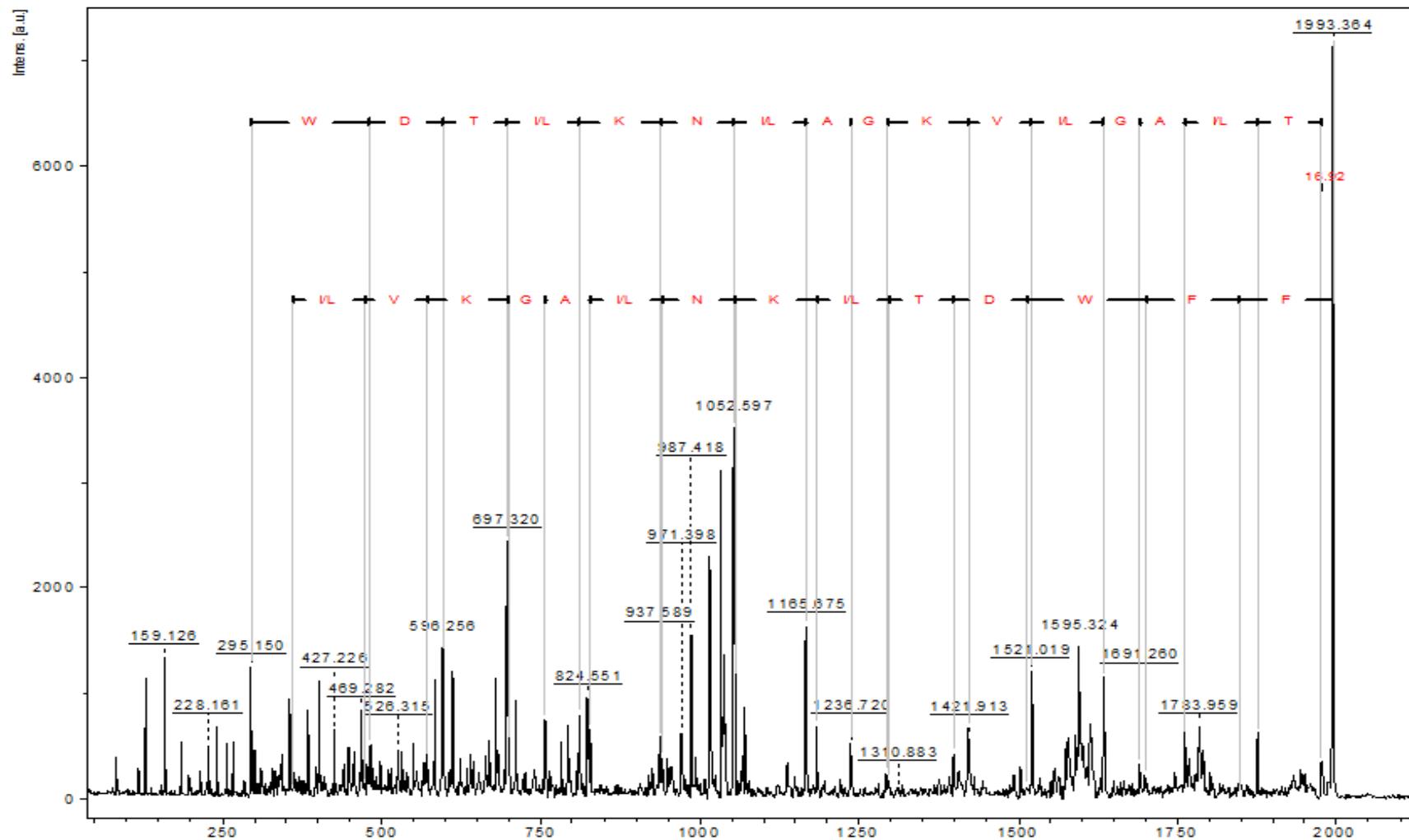


Figura 56 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 1.993,3 u. Na sequência proposta a porção C-terminal é indicada pelo resíduo T (treonina) na parte superior da figura no canto direito, e a porção N-terminal é indicada pelo resíduo F (fenilalanina) um pouco abaixo de T.

O peptídeo da fração 4-17 com 19 resíduos de aminoácidos e sequência proposta **FFWDTI/LKNI/LAGKVI/LGAI/LT** com C-terminal amidado foi submetida à ferramenta BLASTp, mas não apresentou identidade significativa com peptídeos depositados em banco de dados, porém apresentou-se como homólogo ao peptídeo **fenilseptina (FFFDTLKLNLAGKIGALT)** com a diferença de apenas um resíduo de aminoácido na terceira posição, onde ocorreu a conversão de fenilalanina para tryptofano (F para W) que são dois resíduos aromáticos. Esse peptídeo foi identificado na secreção cutânea da espécie *H. punctatus* e se apresenta com resíduo da segunda fenilalanina nas formas D e L. Possui atividade de inibição do crescimento das cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *X. a. pv. Glycines* (MAGALHÃES et al., 2013).

A sequência proposta foi submetida a SOPMA para avaliar o alinhamento e a possível conformação de sua estrutura secundária. Sendo que o peptídeo apresenta uma possível estrutura secundária em 4 estados: conformação de 66,67% em forma de α -hélice (Hh) do segundo ao décimo e décimo quinto ao décimo sétimo resíduo de aminoácido, 11,11% em cadeia estendida (Ee) no primeiro e no último resíduo, 11,11% em ângulo β (Tt) no décimo primeiro e décimo segundo e 11,11% em espiral aleatória (Cc) no décimo terceiro e décimo quarto resíduo (Figura 57).

SOPMA :

Alpha helix (Hh) :	12 is	66.67%	
3 ₁₀ helix (Gg) :	0 is	0.00%	
Pi helix (Ii) :	0 is	0.00%	
Beta bridge (Bb) :	0 is	0.00%	
Extended strand (Ee) :	2 is	11.11%	
Beta turn (Tt) :	2 is	11.11%	
Bend region (Ss) :	0 is	0.00%	
Random coil (Cc) :	2 is	11.11%	
Ambiguous states (?) :	0 is	0.00%	
Other states :	0 is	0.00%	

10
|
FFWDTLKLNL LAGKIGALT
ehhhhhhhhhhttcchhhe
Sequence length : 18

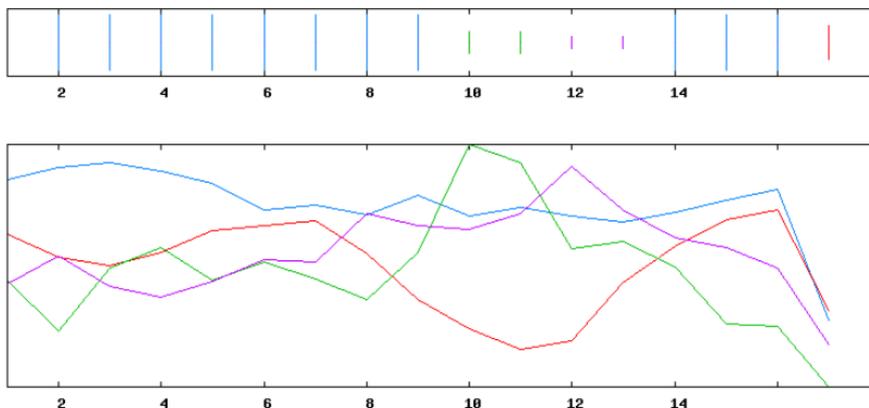


Figura 57 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 4-17. Linha em Azul indica a conformação em α -hélice, vermelha indica conformação em cadeia estendida, verde em ângulo β e rosa em conformação de espiral aleatória.

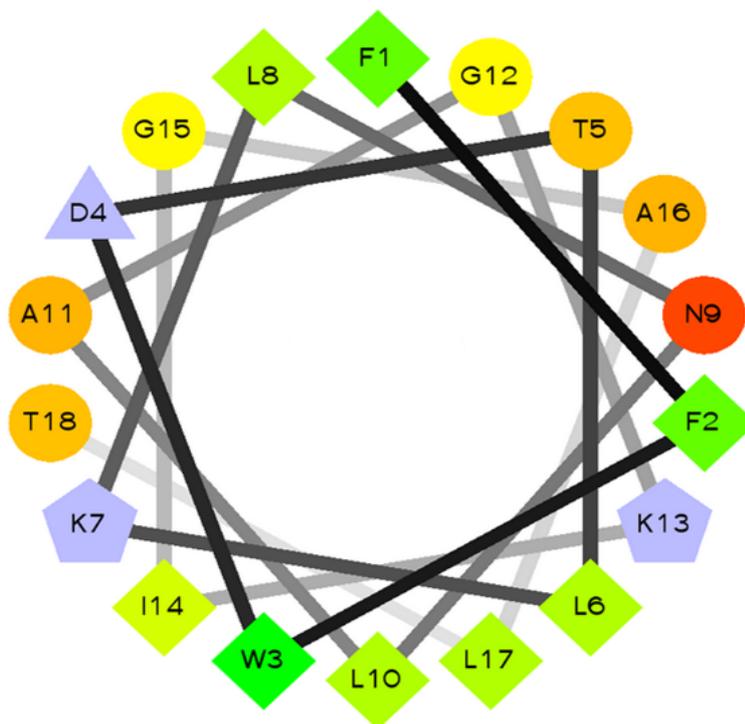


Figura 58 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 4-17 de H.C. Resíduos hidrofóbicos em forma de diamante, resíduos hidrofílicos em forma de círculo em vermelho intenso ao amarelo, resíduos potencialmente positivos em forma de pentágono e os potencialmente negativos em forma de triângulo sendo esses últimos na cor lilás.

Através da projeção de Schiffer-Edmundson (Figura 58), pode-se observar que a um equilíbrio entre os resíduos hidrofóbicos (oito em forma de diamante) e resíduos hidrofílicos (sete em forma de círculo). Esses resíduos estão organizados de tal forma que os resíduos hidrofílicos fiquem agrupados em uma face do peptídeo e os hidrofóbicos em outra face, ocasionando um elevado grau de anfipaticidade.

Existe um resíduo de ácido aspártico potencialmente negativo (em forma de triângulo) que está localizado entre dois resíduos hidrofílicos, e dois resíduos de lisina potencialmente positivos (em forma de pentágono) que ficam especialmente agrupados entre cinco resíduos hidrofílicos, o que aumenta ainda mais a anfipaticidade e o caráter catiônico.

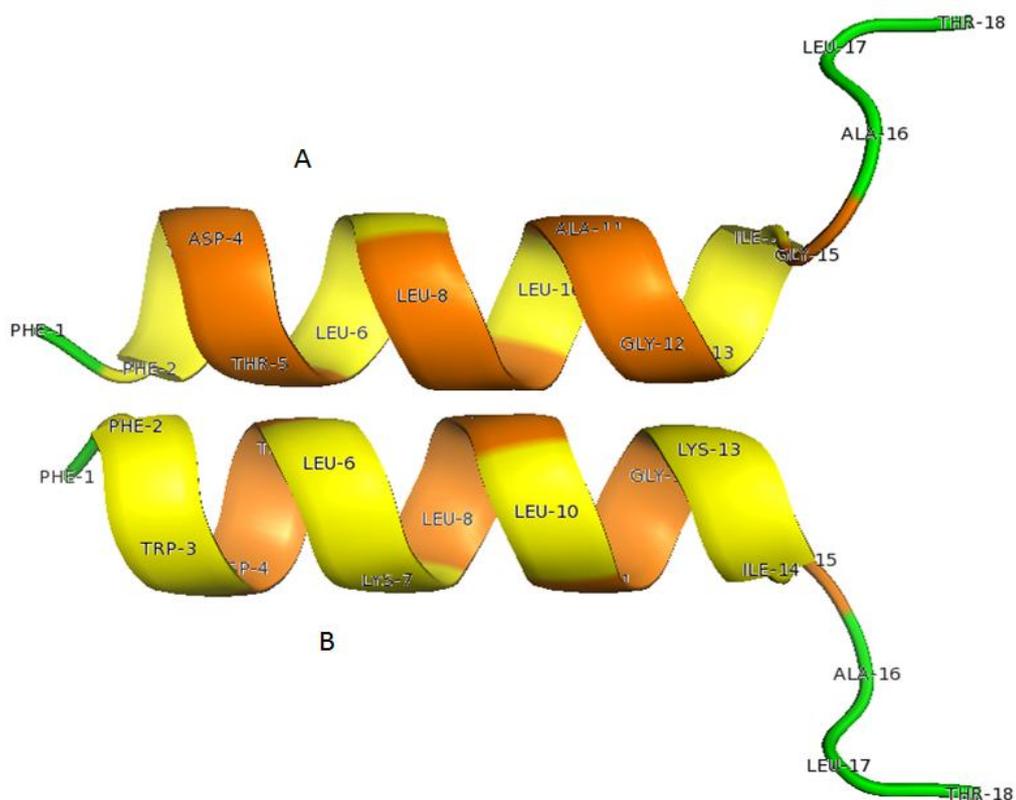


Figura 59 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 4-17 de H.C. Parte A da figura é mostrada uma face do peptídeo e na parte B é mostrada a face oposta

Na parte A da figura 59 evidenciada na cor laranja é possível observar a presença dos resíduos treonina (THR) na posição 5, alanina (ALA) na posição 11 e glicina (GLY) na posição 12, o que caracteriza uma face hidrofílica.

Na parte B na cor amarela é possível observar a presença dos resíduos fenilalanina (PHE) na posição 2, leucina (LEU) nas posições 6 e 10, lisina (LYS) na posição 13 e isoleucina na posição 14, o que caracteriza uma face hidrofóbica e catiônica.

5.2.5.2 Identificação do peptídeo da fração 6-17 de H.C.

No espectro de massas da subfração 6-17 foi observado os íons m/z 2.243,2, 2.346,1 e 2.950,6 u (Figura 59) com uma alta intensidade de sinal (1.2×10^5), sendo este em seguida submetidos à fragmentação, porém apenas os íons 2.243,3 e 2.950,6 u apresentaram sequência comparáveis com as depositadas em banco de dados.

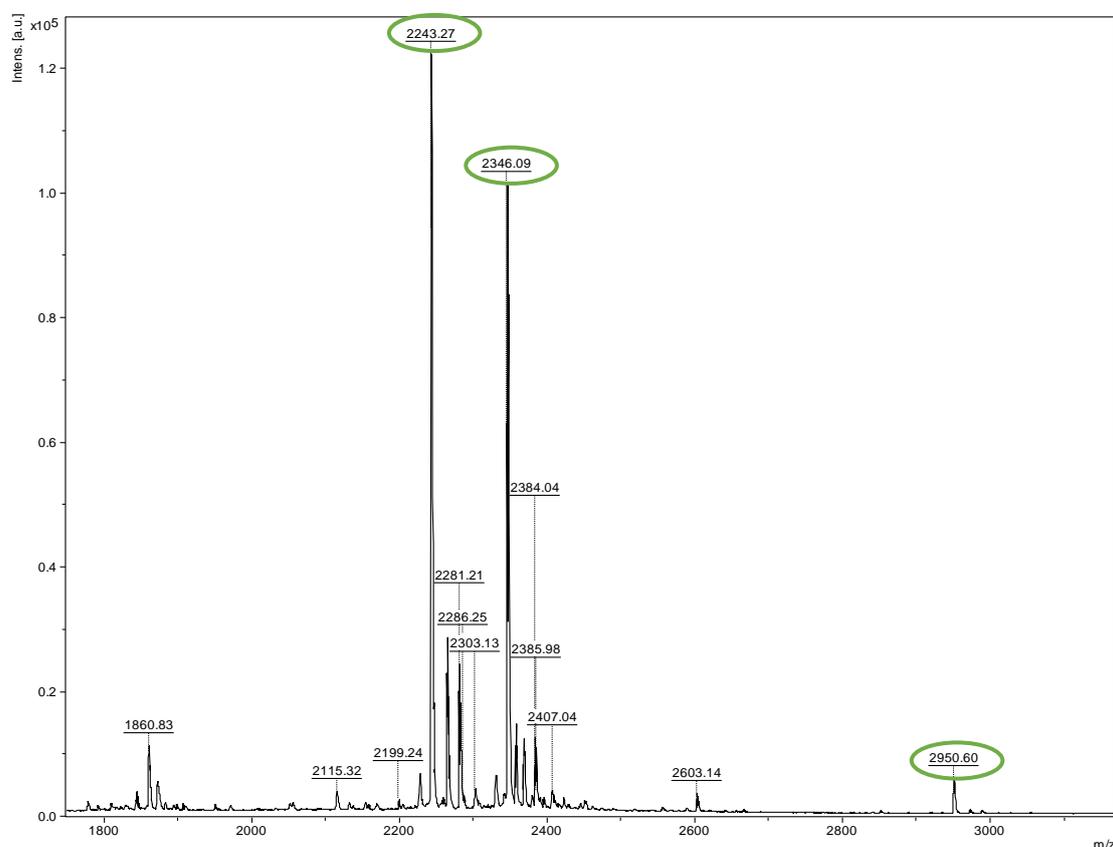


Figura 60 - Espectro de massas dos íons totais da fração 6-17 de H.C.

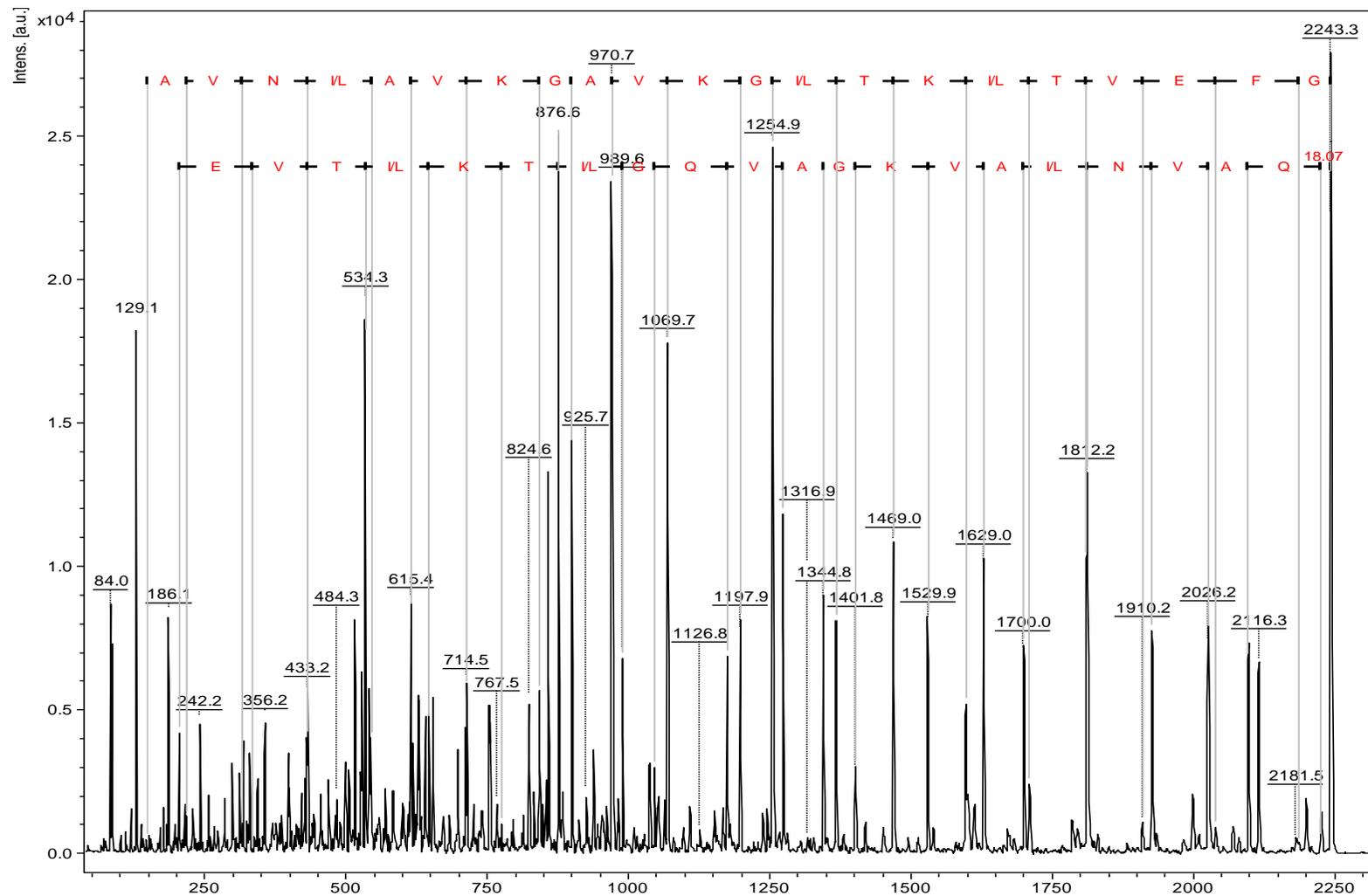


Figura 61 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 2.243,3 u.

Na sequência proposta a porção N-terminal é indicada pelo resíduo G (glicina) na parte superior da figura no canto direito, e a porção C-terminal é indicada pelo resíduo Q (glutamina) um pouco abaixo de G.

O peptídeo com m/z 2.243,3 u da fração 6-17 com 22 resíduos de aminoácidos e sequência proposta **GFEVTI/LKTI/LGKVAGKVAI/LNVAQ** com C-terminal carboxilado (Figura 61). Foi submetida à ferramenta BLASTp usando a base de dados UniProtKB/Swiss-Prot, obtendo 82% de identidade com o peptídeo **raniseptina – 1** (**AWLDKLLKSLGKVVVGKVALGVAQNYLNPPQ**) identificado na secreção cutânea da espécie *H. raniceps*, sendo esta espécie pertencente ao mesmo gênero da em estudo. Tal peptídeo possui atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *X. citri* (MAGALHÃES et al., 2008).

De acordo com a ferramenta SOPMA o peptídeo apresenta uma possível estrutura secundária em 3 estados: conformação de 54.55% em forma de α -hélice (Hh) no segundo e terceiro resíduo, do sexto ao décimo segundo resíduo, no décimo quinto, vigésimo segundo e vigésimo terceiro resíduo. Conformação de 31.82% em cadeia estendida (Ee) no quarto e quinto resíduo, do décimo sexto ao vigésimo resíduo e conformação de 13.64% em ângulo β (Tt) no primeiro, décimo terceiro e décimo quarto resíduo (Figura 62).

SOPMA :

Alpha helix	(Hh) :	12 is	54.55%	
3 ₁₀ helix	(Gg) :	0 is	0.00%	10 20
Pi helix	(Ii) :	0 is	0.00%	
Beta bridge	(Bb) :	0 is	0.00%	
Extended strand	(Ee) :	7 is	31.82%	
Beta turn	(Tt) :	3 is	13.64%	
Bend region	(Ss) :	0 is	0.00%	
Random coil	(Cc) :	0 is	0.00%	
Ambiguous states (?)	:	0 is	0.00%	
Other states	:	0 is	0.00%	

GFEVTLKTLGKVVAGKVAINVAQ
 thheehhhhhhhhttheeeehh

Sequence length : 22

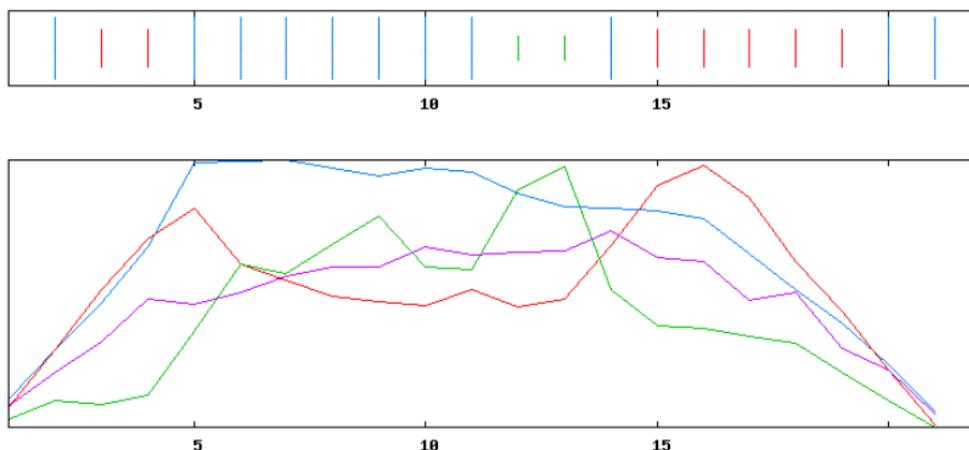


Figura 62 - Predição da estrutura secundária do peptídeo com m/z 2.243,3 u da fração 6-17.

Linha em azul indica a conformação em α -hélice, vermelha indica conformação em cadeia estendida, verde em ângulo β e rosa em conformação de espiral aleatória.

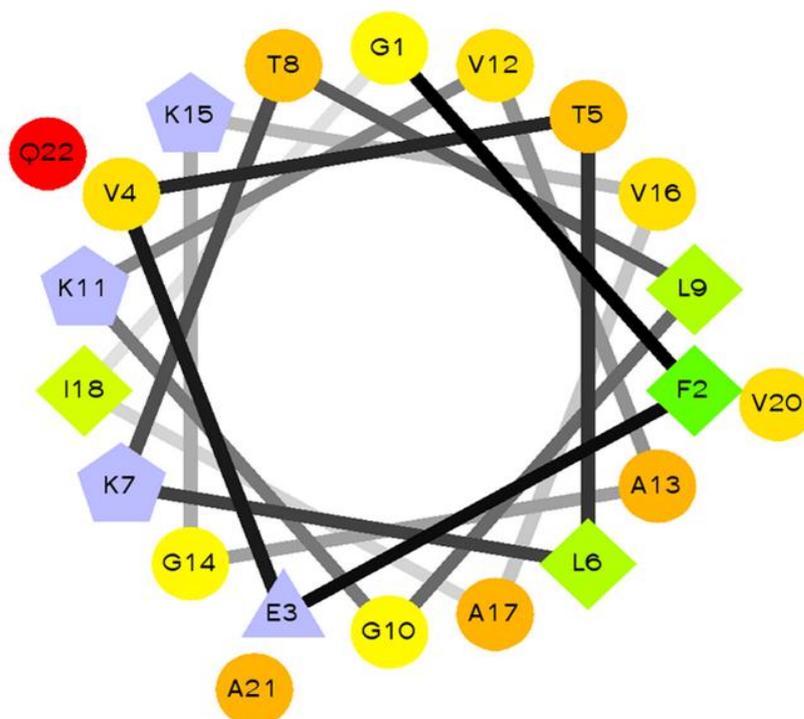


Figura 63 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo com m/z 2.243,3 u.

Resíduos hidrofóbicos em forma de diamante, resíduos hidrofílicos em forma de círculo, resíduos potencialmente positivos em forma de pentágono e os potencialmente negativos em forma de triângulo sendo esses últimos na cor lilás.

Através da projeção de Schiffer-Edmundson (Figura 63), pode-se observar que o peptídeo é constituído em sua maioria de resíduos hidrofílicos que são representados em forma de círculo, variando do vermelho intenso ao alaranjado. Dos treze resíduos hidrofílicos existem cinco que ficaram agrupados lado-lado, os outros ficaram organizados na α -hélice entre os quatro resíduos hidrofóbicos e quatro resíduos potencialmente carregados (três positivos e um negativo).

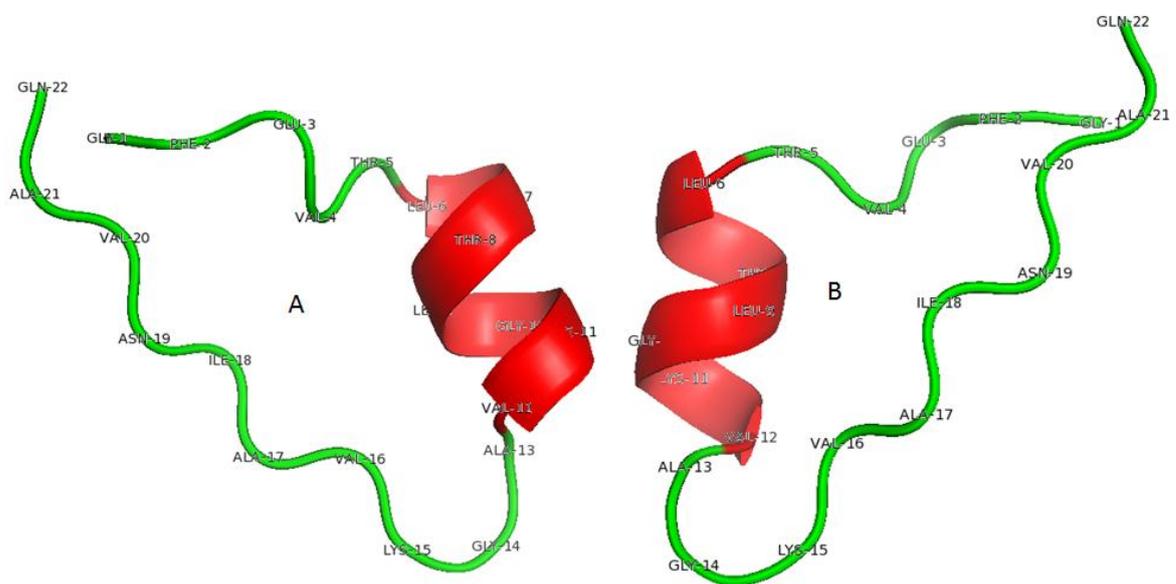


Figura 64 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 6-17 de H.C. Parte A da figura é mostrada uma face do peptídeo e na parte B é mostrada a face oposta.

De acordo com a estrutura em 3D (Figura 64) verifica-se que o peptídeo adota uma pequena região em α -hélice que vai do sexto ao décimo segundo resíduo. Sendo que a face mostrada na parte A da figura tende a ser hidrofílica devido aos resíduos de treonina (THR) e valina (VAL) nas posições 8 e 12.

Da mesma forma que a face mostrada na parte B da figura tende a ser hidrofóbica devido aos resíduos de leucina (LEU) nas posições 6 e 9.

Existe duas regiões aleatórias a primeira região que vai do primeiro resíduo ao sexto e outra região que vai do decimo terceiro ao vigésimo segundo resíduo. Essas duas regiões possuem resíduos hidrofóbicos, hidrofílicos, potencialmente positivos e potencialmente negativos. Essas regiões juntamente com a região em conformação de α -hélice, faça com que o peptídeo se insira na membrana bacteriana com maior facilidade.

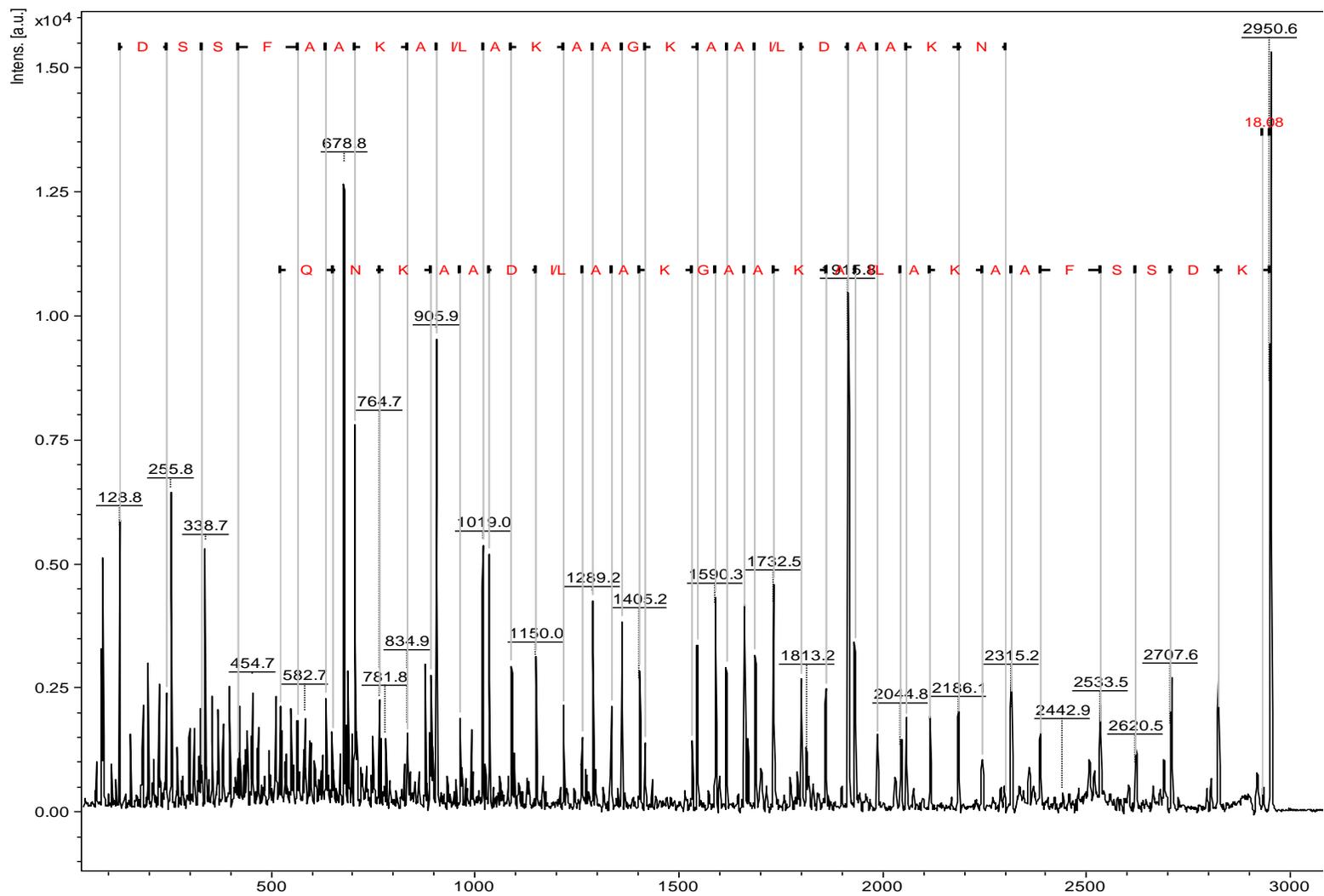


Figura 65 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 2.950,6 u. Na sequência proposta não foi possível identificar a porção C-terminal, mas a porção N-terminal é indicada pelo resíduo K (lisina) no canto direito.

O peptídeo com m/z 2.950,6 u da fração 6-17 obteve sequência parcialmente proposta **KDSSFAAKAI/LAKAAGKAAI/LDAAKN** com 24 resíduos identificados, sendo possível apenas a identificação da sua porção N-terminal (Figura 64). Essa sequência parcial foi submetida à ferramenta BLASTp.

Apesar da sequência estar incompleta, o peptídeo obteve 88% de identidade com peptídeo **dermadistinctin-K** (sendo este sintético homólogo a DS01) identificado na secreção cutânea da espécie *P. distinta* que possui capacidade de inibir o crescimento de *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *T. cruzi*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. albicans* (BATISTA et al., 1999).

A sequência foi submetida a SOPMA, sendo que o peptídeo apresenta estrutura secundária em conformação de 91.67% em forma de α -hélice (Hh) do terceiro ao vigésimo quarto resíduo e 8.33% em espiral aleatória (Cc) nos dois primeiros resíduos (Figura 66).

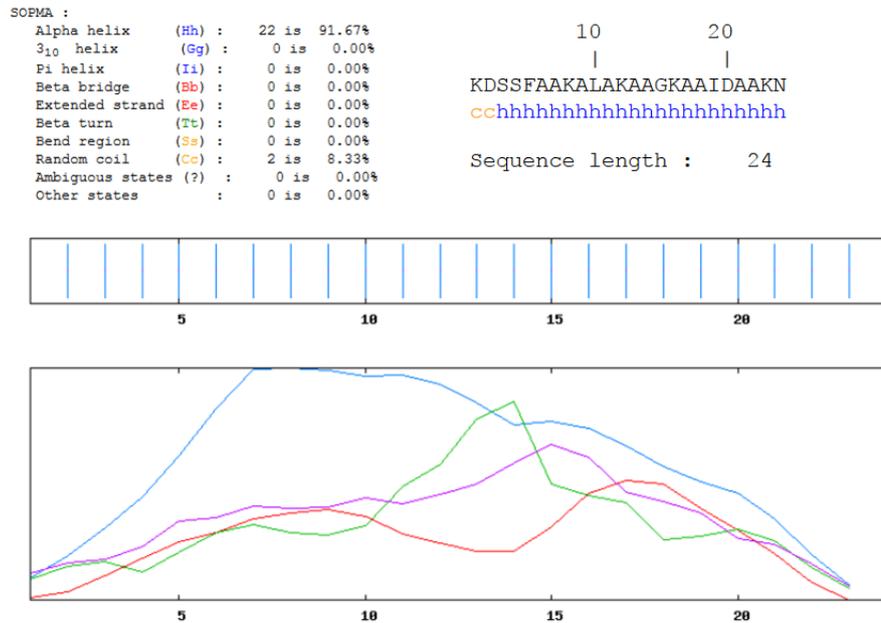


Figura 66 - Predição da estrutura secundária do peptídeo de m/z 2.950,6 u da fração 6-17.

Linha em azul indica a conformação em α -hélice, vermelha indica conformação em cadeia estendida, verde em ângulo β e rosa em conformação de espiral aleatória.

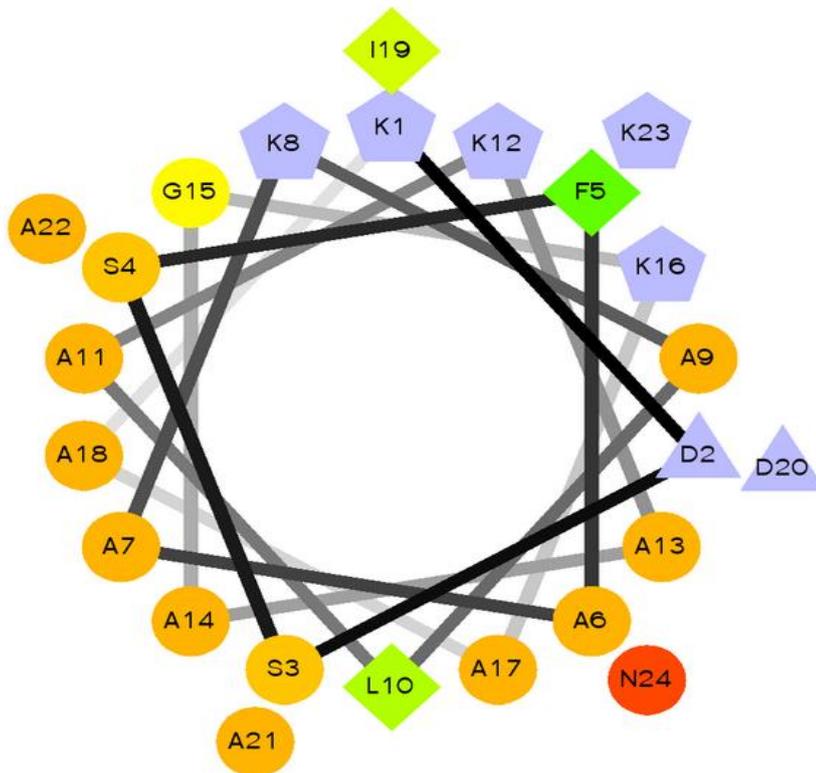


Figura 67 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo de m/z 2.950,6 u da fração 6-17. Resíduos hidrofóbicos em forma de diamante, resíduos hidrofílicos em forma de círculo, resíduos potencialmente positivos em forma de pentágono e os potencialmente negativos em forma de triângulo sendo esses últimos na cor lilás.

Através da projeção de Schiffer-Edmundson (Figura 67), pode-se observar que o peptídeo é praticamente constituído de resíduos hidrofílicos, sendo estes organizados predominantemente em uma face do peptídeo.

Dois resíduos hidrofóbicos (F e I), juntamente com cinco resíduos de K (lisina) em forma de pentágono e dois resíduos de D (ácido aspártico) em forma de triângulo estão agrupados na face oposta aos resíduos hidrofílicos.

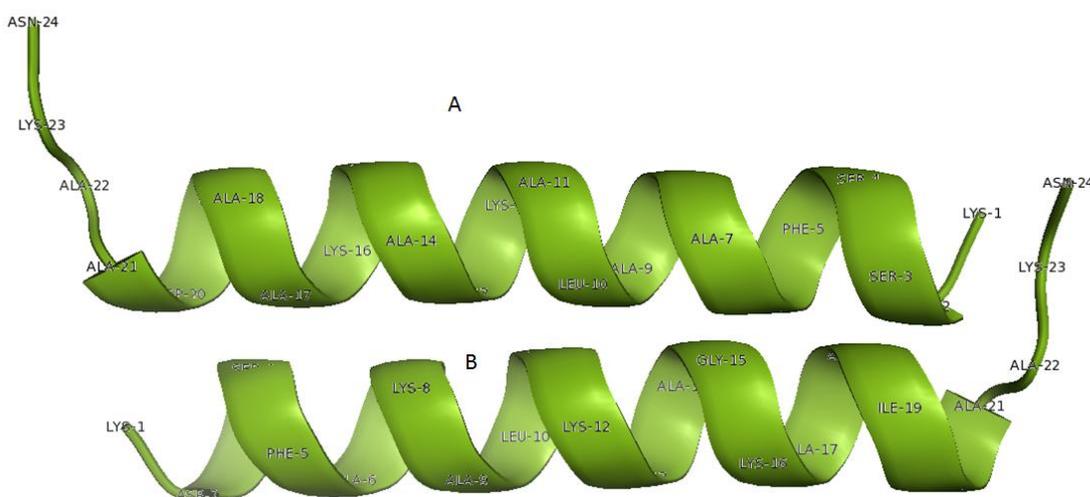


Figura 68 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 6-17 de H.C. Na parte A da figura é mostrada uma face do peptídeo e na parte B é mostrada a face oposta

Apesar não estar completamente elucidado o peptídeo apresenta característica catiônica e anfipática. Tais características são evidenciadas ao observar a estrutura tridimensional que o peptídeo pode adotar (Figura 68). Na parte A estão agrupados seis resíduos do aminoácido alanina (7, 11, 14, 17 e 21) e dois resíduos de serina (3 e 4), caracterizando uma face hidrofílica.

Na parte B estão agrupados um resíduo de fenilalanina (5), um de isoleucina (19) e três resíduos de lisina (8, 12 e 16), caracterizando uma face hidrofóbica e catiônica. Ou seja, o peptídeo possui uma face hidrofóbica e outra face hidrofílica, que caracteriza a anfipaticidade.

5.2.5.2 Identificação do peptídeo da fração 7-17 de H.C.

No espectro de massas da subfração 7-17 foi observado o íon m/z 2.393,4 u (Figura 69) com uma alta intensidade de sinal (6×10^4), sendo em seguida submetido à fragmentação (Figura 70).

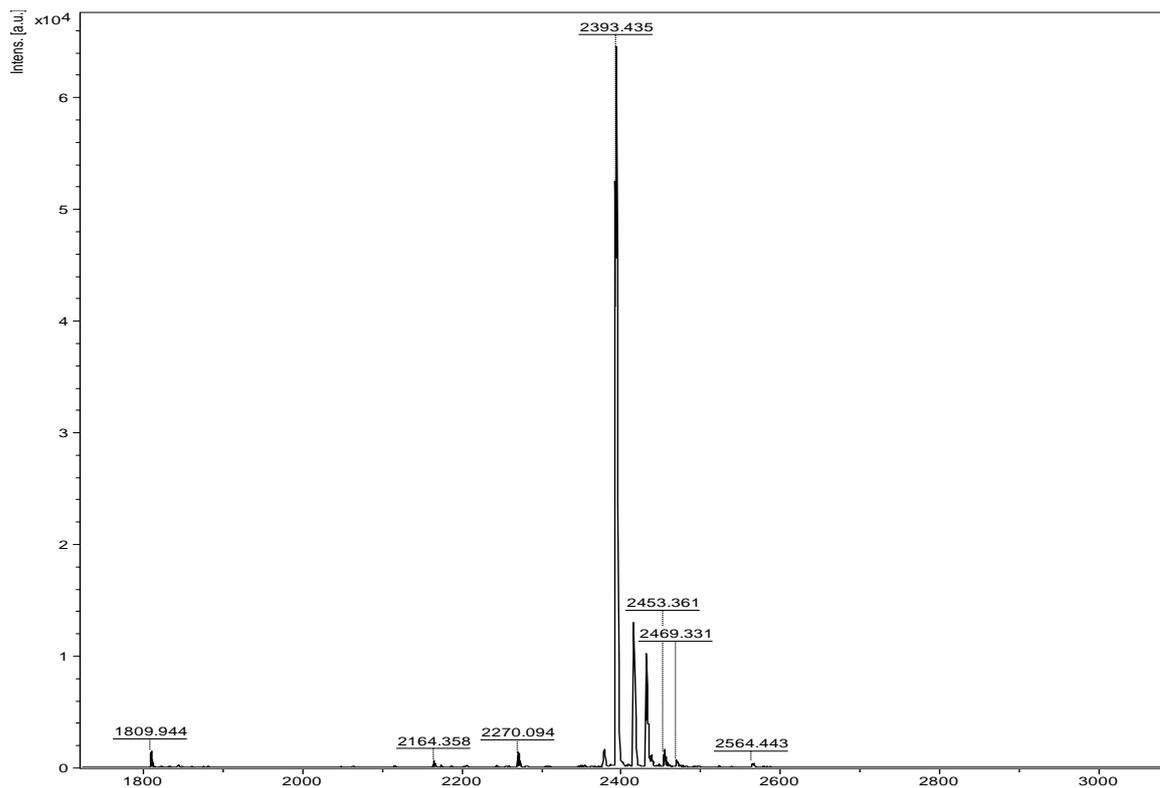


Figura 69 - Espectro de Massas da fração 7-17 de H.C.

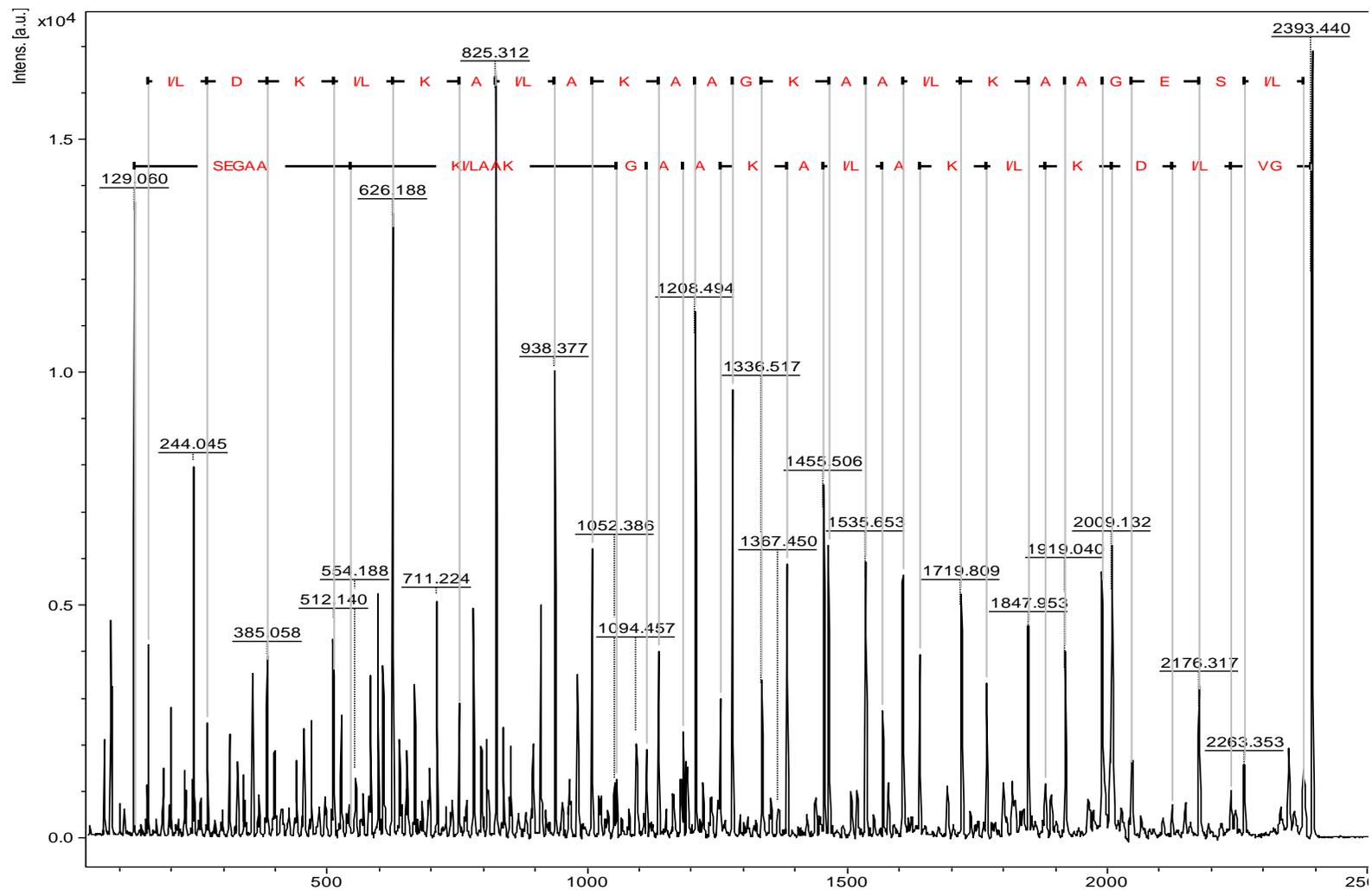


Figura 70 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 2.393,4.

Na sequência proposta a porção C-terminal é indicada pelo resíduo L (leucina) na parte superior da figura no canto direito, e a porção N-terminal é indicada pelo resíduo G (glicina) um pouco abaixo de T.

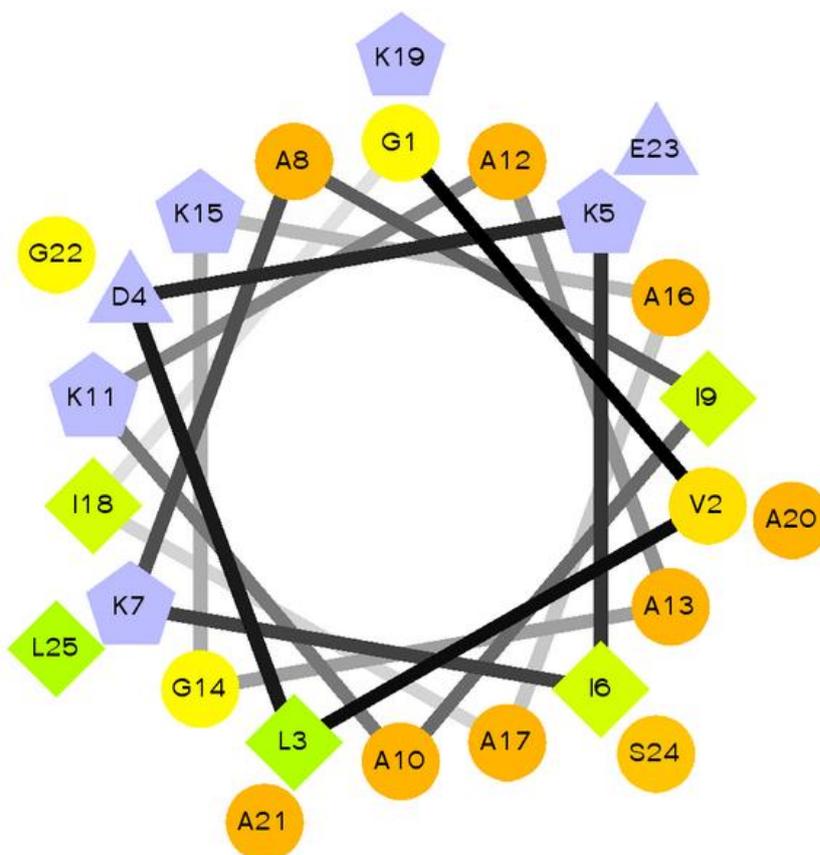


Figura 72 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 7-17 de H.C. Resíduos hidrofóbicos em forma de diamante que variam da cor verde ao verde claro, resíduos hidrofílicos em forma de círculo do alaranjado ao amarelo, resíduos potencialmente positivos em forma de pentágono e os potencialmente negativos em forma de triângulo sendo esses últimos na cor lilás.

Através da projeção de Schiffer-Edmundson (Figura 72), pode-se observar que o peptídeo é constituído em sua maioria de resíduos hidrofílicos, esses resíduos estão organizados predominantemente em uma face do peptídeo. Existe cinco resíduos hidrofóbicos (em forma de diamante) sendo que três deles estão inseridos na região hidrofílica, estando cada um deles separados por dois resíduos hidrofílicos.

Na face oposta a região hidrofílica existe dois resíduos hidrofóbicos e três potencialmente positivos (em forma de pentágono).

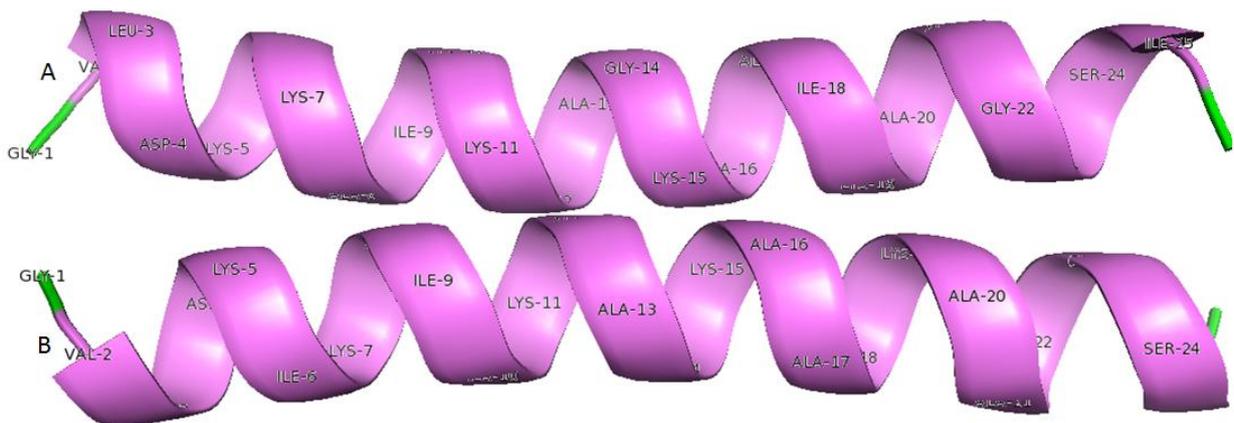


Figura 73 - Conformação 3D do peptídeo da fração da fração 7-17 de H.C. Parte A da figura é mostrada uma face do peptídeo e na parte B e mostrada a face oposta.

Através da conformação em 3D (Figura 73) pode confirmar que o peptídeo adota conformação principal em α -hélice. Observa-se que os resíduos nas posições 3, 7, 11, 18 e 25 mostradas na parte A da figura que são referentes aos aminoácidos leucina (3), isoleucina (25) e lisina (7, 11 e 15), estão agrupados no mesmo lado, caracterizando uma face hidrofóbica e catiônica.

Na parte B da figura estão posicionados um resíduo de lisina (5), um de serina (24) e quatro resíduos de alanina (13, 16, 17 e 20), caracterizando uma face hidrofílica e levemente catiônica.

5.2.6. Identificação do peptídeo da fração 18.

A fração 18 após purificação em sistema analítico resultou em 8 subfrações (Figura 74).

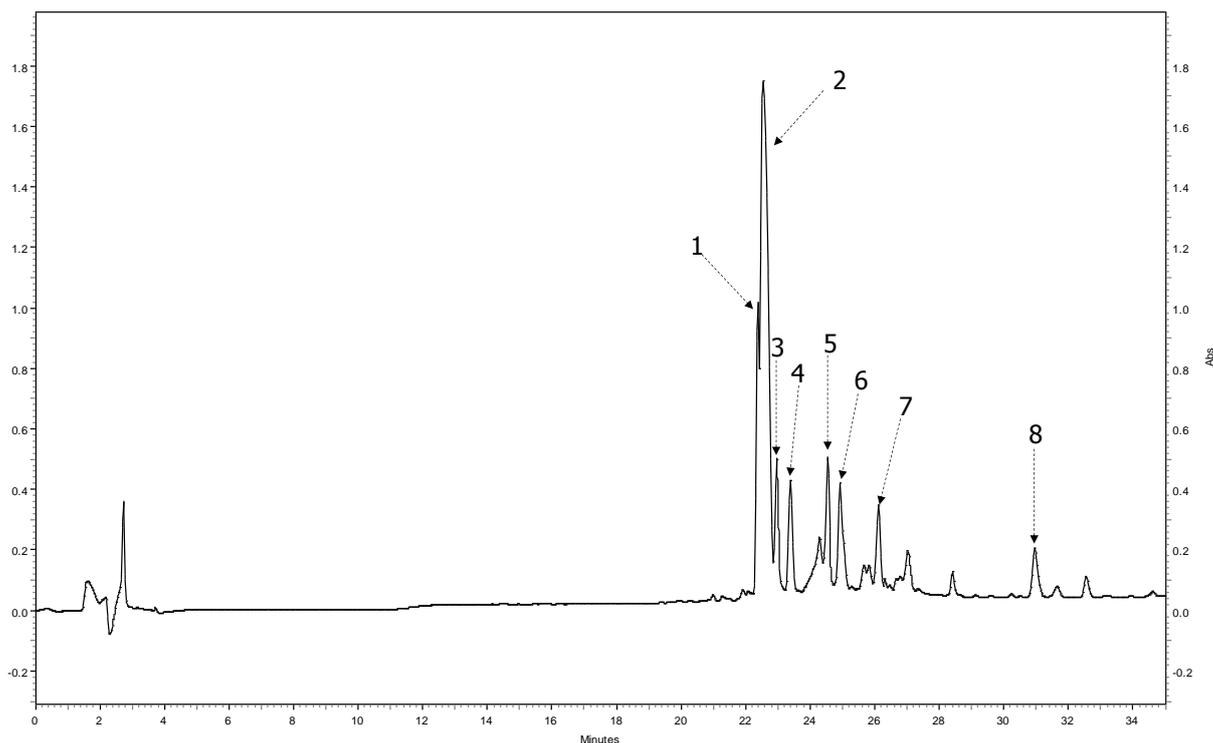


Figura 74 - Cromatograma analítico da fração 18 de H.C.

Linha preta representa o comprimento de onda em 216 nm. As setas indicam quais frações foram coletadas manualmente

Sendo que apenas a subfração 7 apresentou espectro de MS² adequado para ser sequenciado, sendo possível confirmar as séries e b.

No espectro de massas da fração 7-18 foram observados os íons majoritários de m/z 1.843,2 e 2.165,7 u (Figura 75) com uma alta intensidade de sinal (4×10^4), sendo em seguida submetidos a fragmentação.

O íon de m/z 1.843,2 u apresentou perfil de sequência peptídica contendo cisteínas (ponte de dissulfeto) após a reação de redução e alquilação foi confirmado a existências de duas cisteínas, a sequência proposta foi submetida a comparação com sequências depositadas em banco de dados, mas não apresentou identidade significativa.

O íon de m/z 2.165,7 u teve sua porção C-terminal totalmente sequenciada e sua porção N-terminal parcialmente sequenciada, porém a porção N-terminal pode ser confirmada após comparação com o final da porção C-terminal, já que as porções C e N terminal se completam (Figura 76)

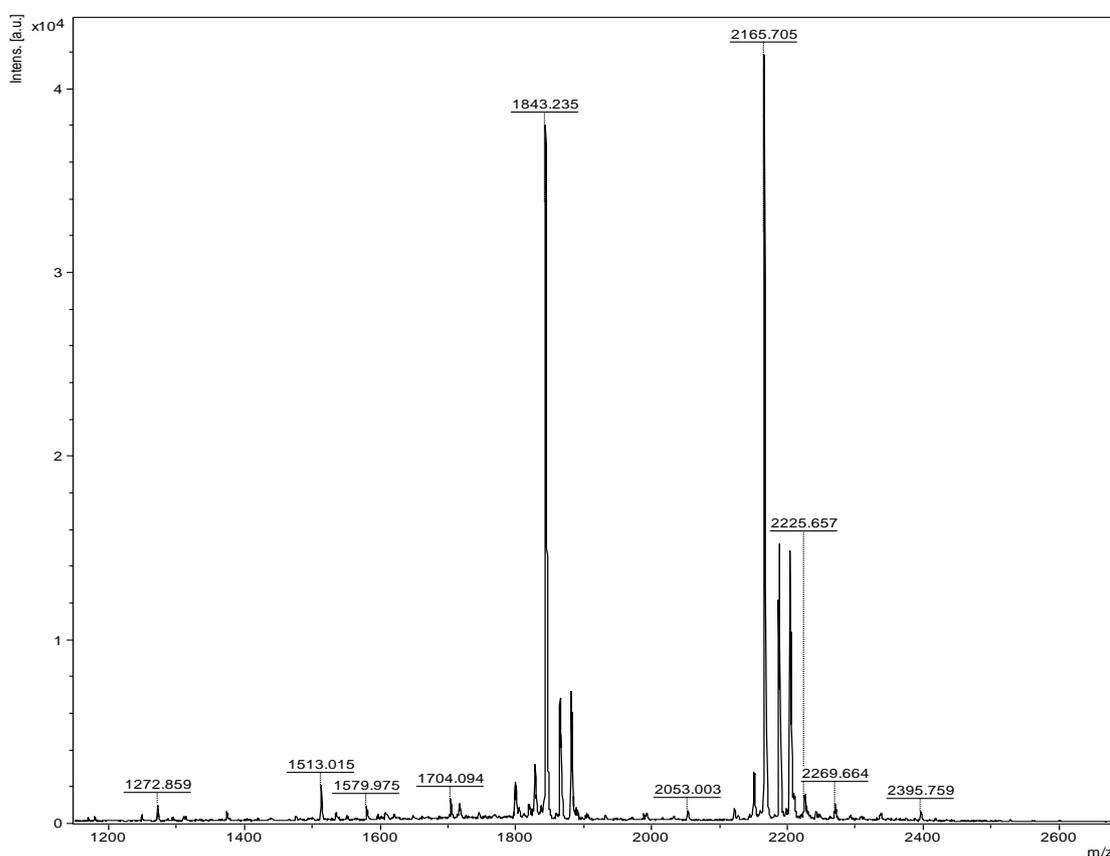


Figura 75 - Espectro de Massas da fração 7-18 de H.C.

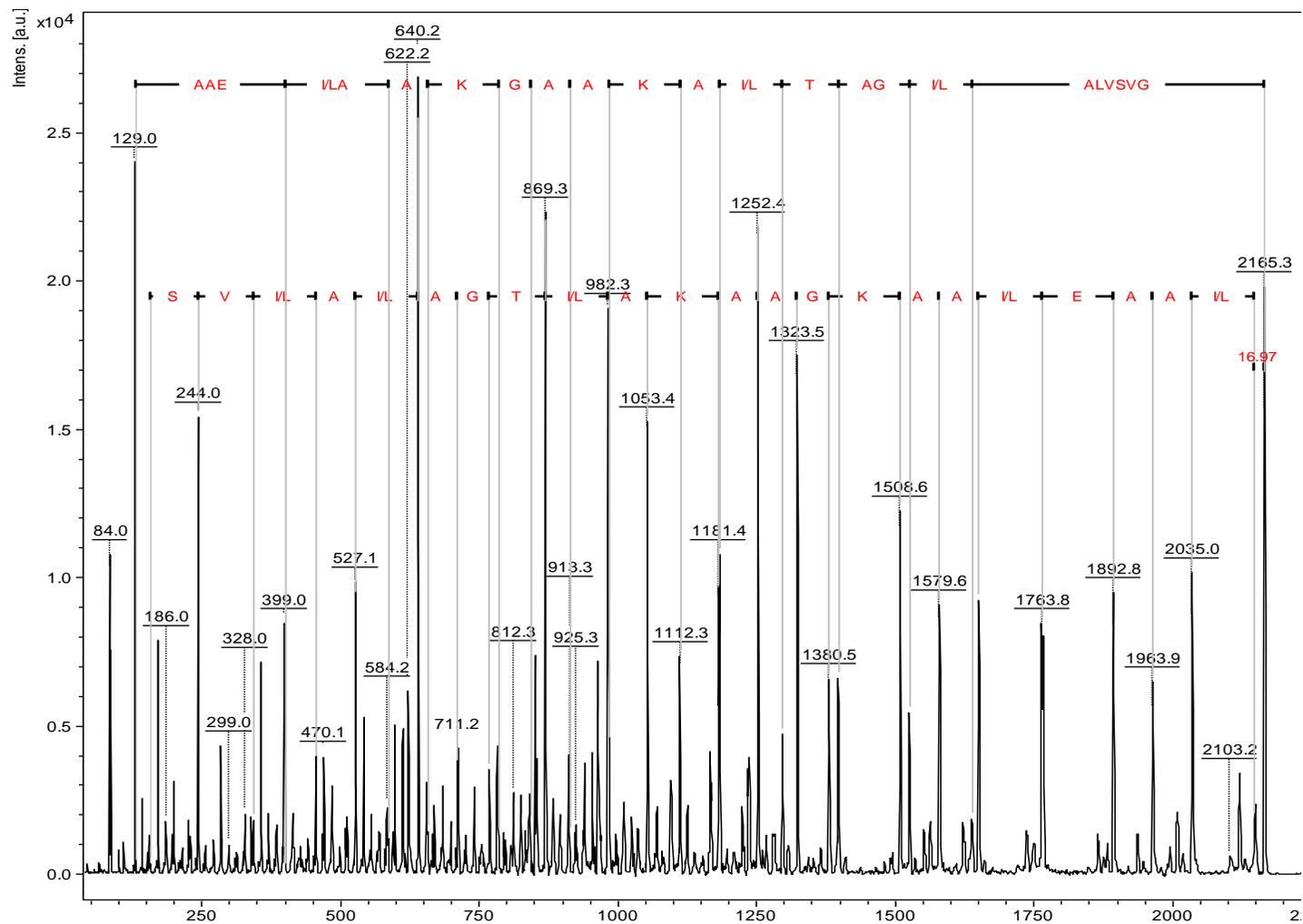


Figura 76 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 2.165,3 u.

Na sequência proposta a porção C-terminal é indicada pelo resíduo I/L (isoleucina/leucina) no canto direito da figura, e a porção N-terminal é indicado pelo resíduo G (glicina) acima de I/L.

O peptídeo da fração 7-18 com 24 resíduos de aminoácidos e sequência proposta **GVSVI/LAI/LAGTI/LAKAAGKAAI/LEAAI/L** com C-terminal amidado foi submetida à ferramenta de bioinformática apresentando 71% de identidade com o peptídeo **hylaseptina-P1 (GILDAIKAIKAAG)** (PRATES et al., 2004).

A sequência proposta foi submetida a ferramenta de bioinformática SOPMA para avaliar o alinhamento e a possível conformação de sua estrutura secundária. Sendo que o peptídeo apresenta uma possível estrutura secundária em 2 estados: conformação de 95.83% em forma de α -hélice (Hh) do segundo ao vigésimo quarto (último) resíduo de aminoácido e 4.17% em ângulo β (Tt) no primeiro resíduo (Figura 77).

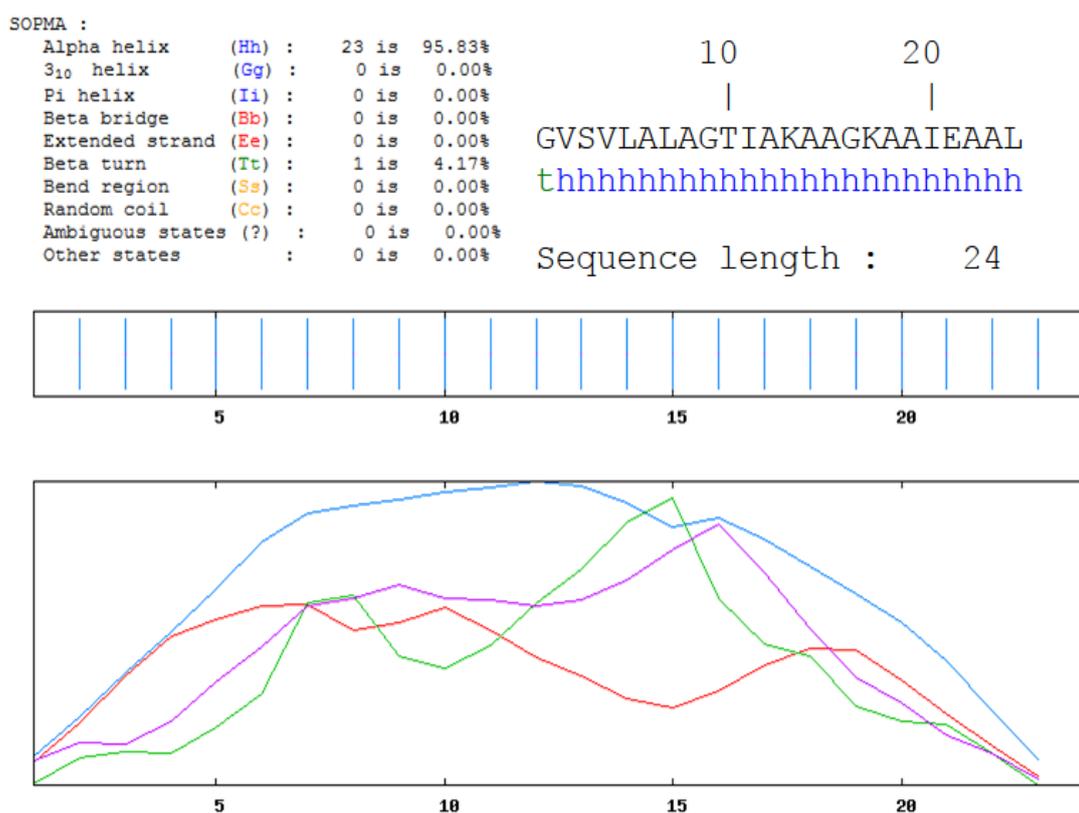


Figura 77 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 7-18 de H.C. Linha em azul indica a conformação em α -hélice, vermelha indica conformação em cadeia estendida, verde em ângulo β e rosa em conformação de espiral aleatória.

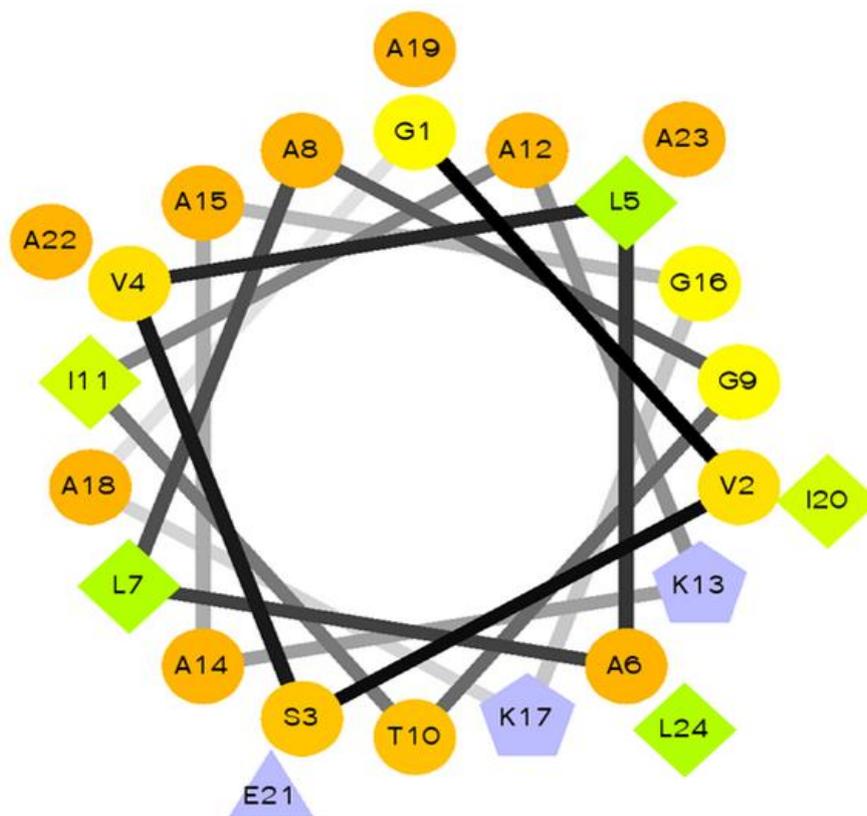


Figura 78 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 7-18 de H.C. Resíduos hidrofóbicos em forma de diamante que variam da cor verde ao verde claro, resíduos hidrofílicos em forma de círculo do alaranjado ao amarelo, resíduos potencialmente positivos em forma de pentágono e os potencialmente negativos em forma de triângulo sendo esses últimos na cor lilás.

Através da projeção de Schiffer-Edmundson, pode-se observar que o peptídeo é constituído em sua maioria de resíduos hidrofílicos que são representados em forma de círculo, variando do alaranjado ao amarelo. Esses resíduos estão distribuídos em todas as faces do peptídeo, os resíduos hidrofóbicos também estão distribuídos ao longo de toda a α -hélice do peptídeo. Os três resíduos potencialmente carregados ficaram próximos um dos outros, sendo separados por um resíduo hidrofílico.

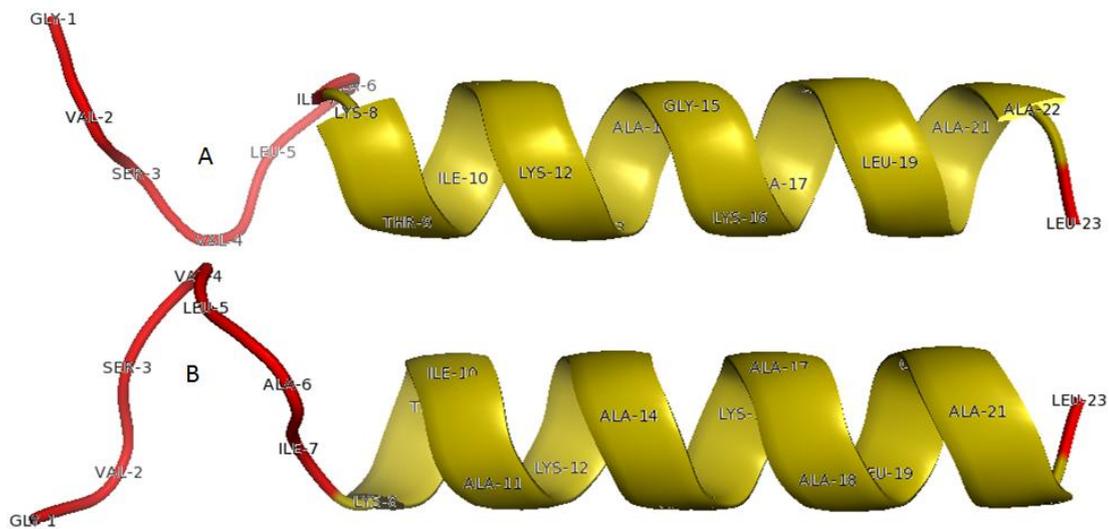


Figura 79 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 7-18 de H.C. Parte A da figura é mostrada uma face do peptídeo e na parte B é mostrada a face oposta

De acordo com a estrutura em 3D (Figura 79) observa-se que o peptídeo adota a conformação de α -hélice, com uma grande região aleatória do primeiro ao sétimo resíduo.

Na α -hélice fica evidenciada na parte A da figura uma face parcialmente catiônica devido ao resíduo de lisina (LYS) nas posições 8, 12 e 16.

Em contrapartida na face oposta evidenciada na parte B é praticamente hidrofílica, devido aos cinco resíduos do aminoácido alanina (ALA) que estão localizados nas posições 11, 14, 17, 18 e 21.

Fazendo com que o peptídeo seja hidrofílico e catiônico ao se referir a região da α -hélice.

5.2.7. Identificação do peptídeo da fração 19.

A fração 19 após purificação em sistema analítico resultou em 5 subfrações (Figura 80).

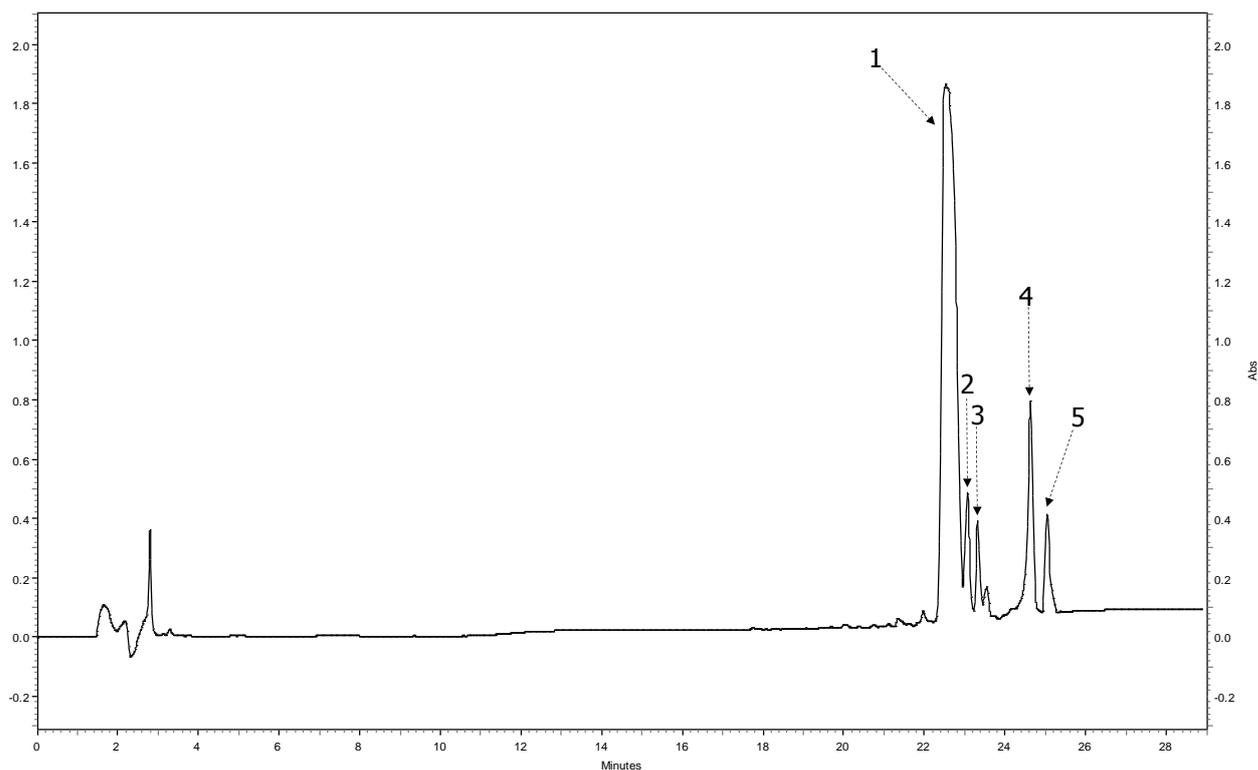


Figura 80 - Cromatograma analítico da fração 19 de H.C. Linha preta corresponde ao comprimento de onda em 216 nm. As setas indicam quais frações foram coletadas manualmente.

Apesar do componente majoritário ser o da subfração 1 apenas a subfração 4 que é o segundo majoritário apresentou espectro de MS^2 adequado para ser sequenciado, sendo possível confirmar as séries b e y.

No espectro de massas da fração 4-19 foi observado o íon majoritário de m/z 2.395,3 u (Figura 81) com uma alta intensidade de sinal (5×10^5), sendo este em seguida submetido à fragmentação (Figura 82).

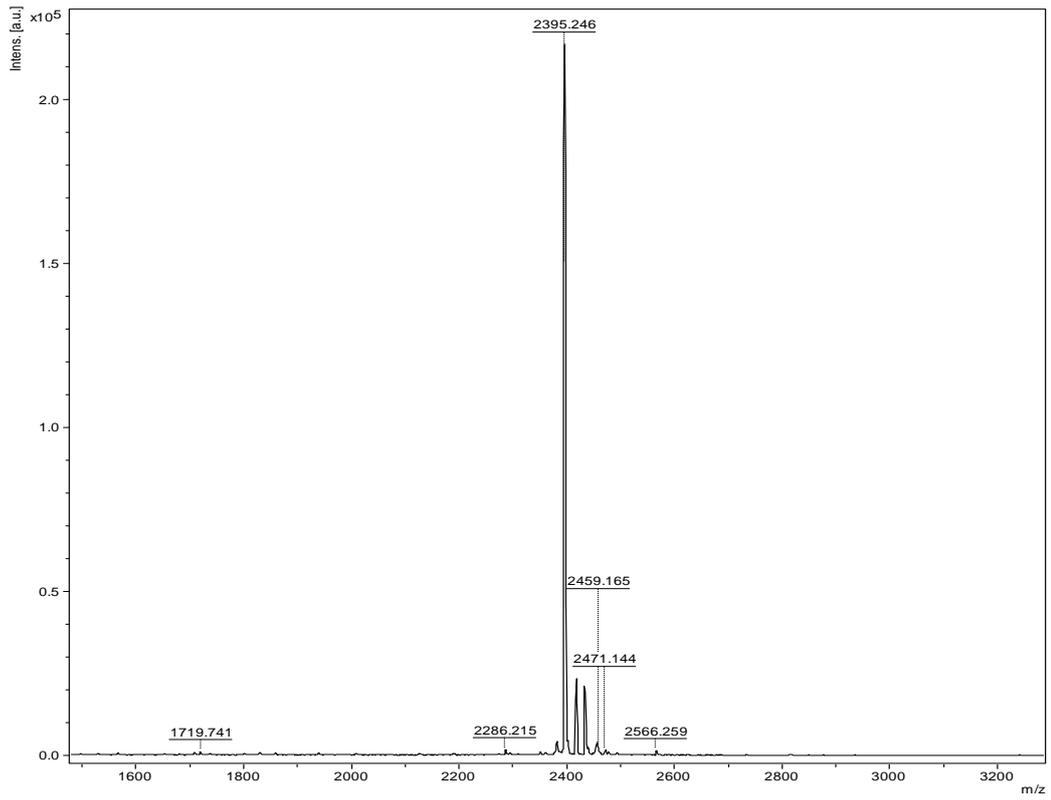


Figura 81 - Espectro de Massas no modo MS da fração 4-19 de H.C.

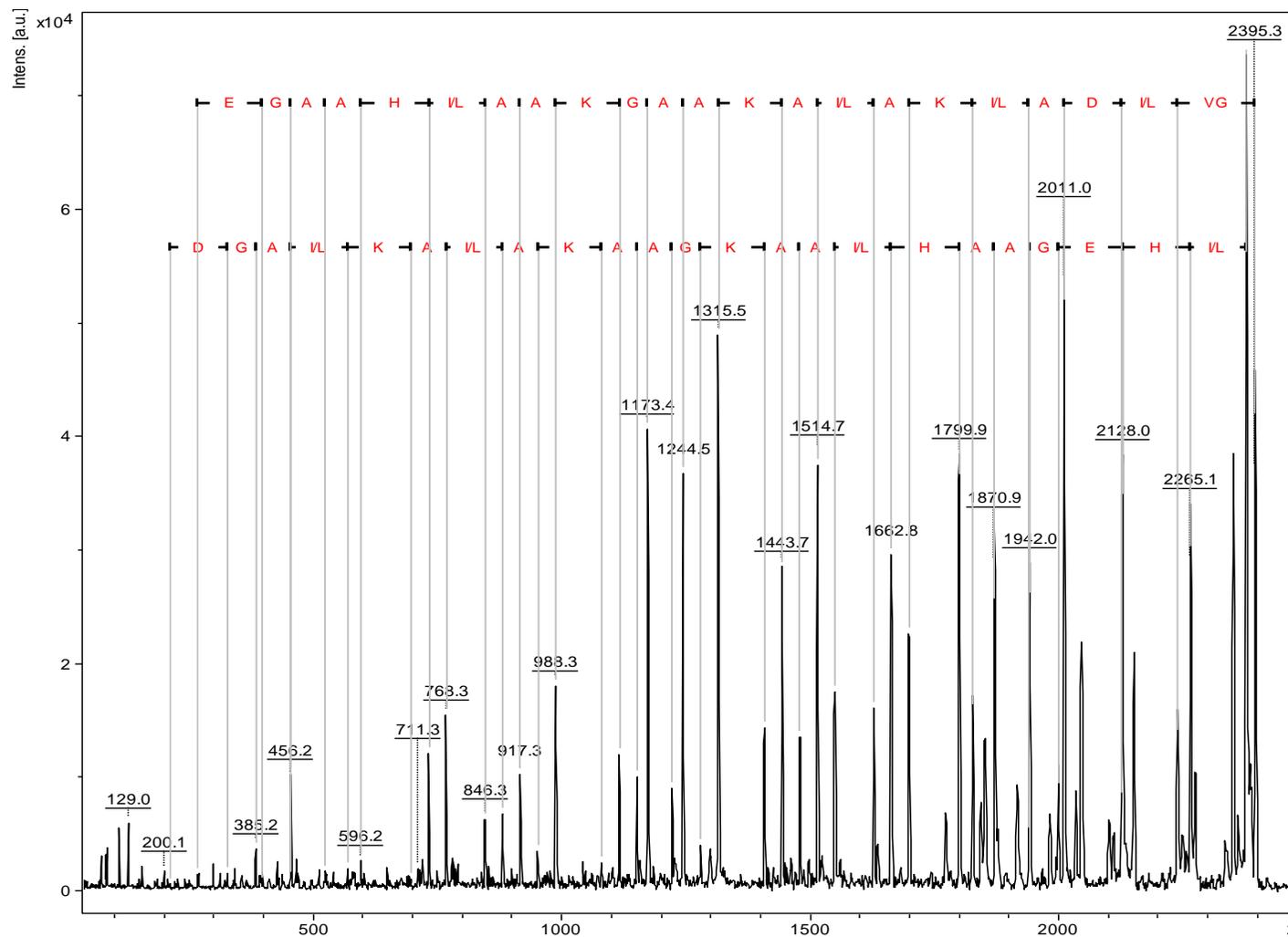


Figura 82 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 2.395,3 u no modo MS²

Na sequência proposta a porção C-terminal é indicada pelo resíduo I/L (isoleucina/leucina) no canto direito da figura, e a porção N-terminal é indicada pelo resíduo G (glicina) acima de I/L.

O peptídeo da fração 4-19 com 25 resíduos de aminoácidos e sequência proposta **GVI/LDAI/LKAI/LAKAAGKAAI/LHAAGEHI/L** com C-terminal amidado foi submetida à ferramenta BLASTp obtendo 93% de identidade com o peptídeo **hylaseptina-P1 (GILDAIKAIKAAG)** (PRATES et al., 2004).

A sequência proposta foi submetida a ferramenta de bioinformática SOPMA para avaliar o alinhamento e a possível conformação de sua estrutura secundária. Sendo que o peptídeo apresenta uma possível estrutura secundária em 3 estados: conformação de 84.00% em forma de α -hélice (Hh) do primeiro ao décimo segundo resíduo, do décimo quinto ao vigésimo primeiro e nos dois últimos, 12.00% em ângulo β (Tt) no décimo terceiro, décimo quarto e vigésimo segundo resíduo e 4.00% em espiral aleatória (Cc) no vigésimo segundo (antepenúltimo) resíduo (Figura 83).

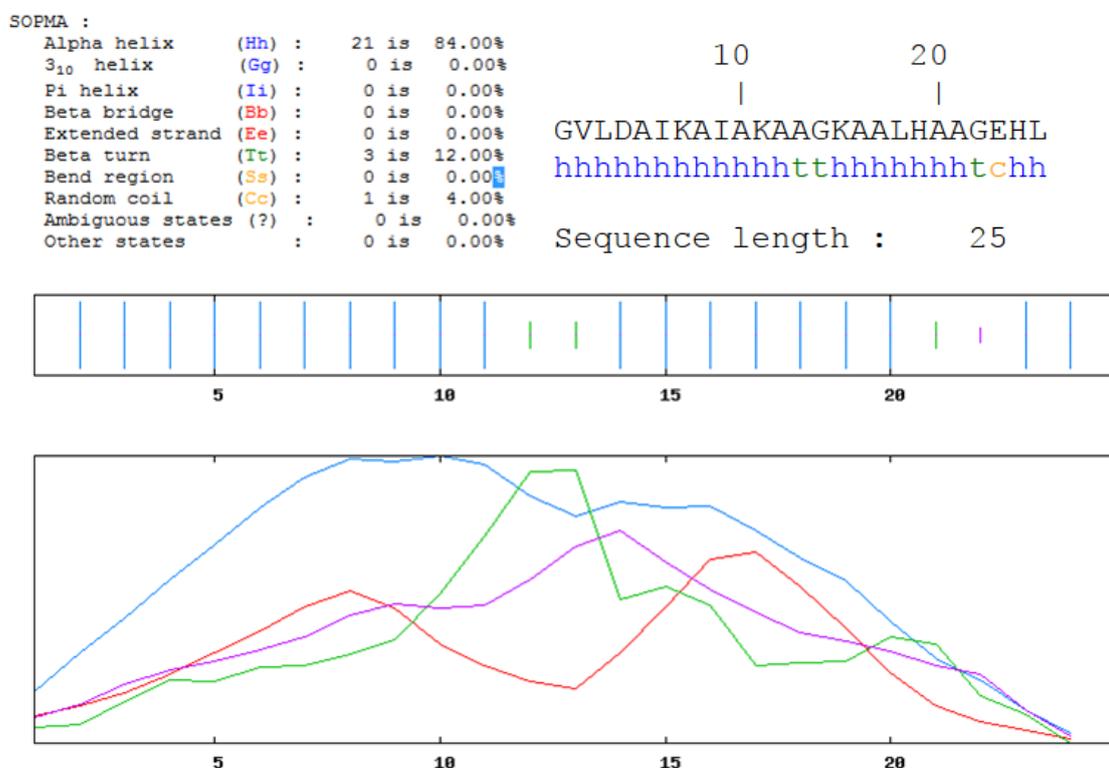


Figura 83 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 4-19 de H.C. Linha em azul indica a conformação em α -hélice, vermelha indica conformação em cadeia estendida, verde em ângulo β e rosa em conformação de espiral aleatória

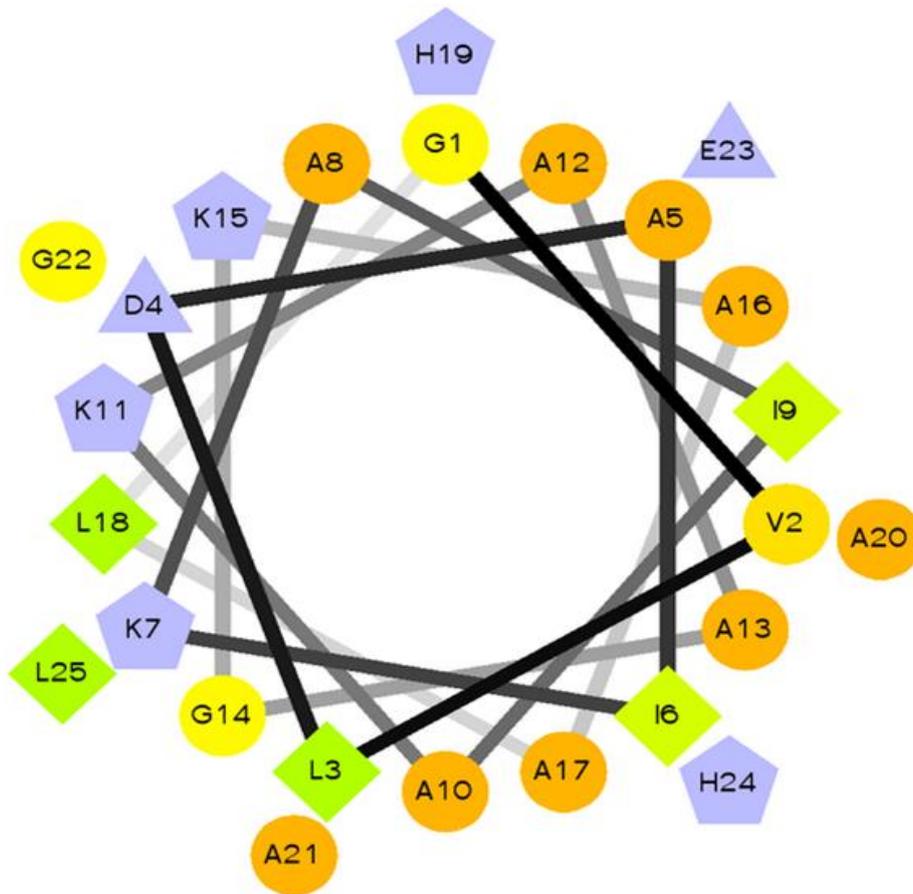


Figura 84 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 4-19.

Resíduos hidrofóbicos em forma de diamante que variam da cor verde ao verde claro, resíduos hidrofílicos em forma de círculo em alaranjado ao amarelo, resíduos potencialmente positivos em forma de pentágono e os potencialmente negativos em forma de triângulo sendo esses últimos na cor lilás.

Através da projeção de Schiffer-Edmundson, (Figura 84) pode-se observar que o peptídeo é constituído em sua maioria de resíduos hidrofílicos que são representados em forma de círculo, variando do alaranjado ao amarelo. Esses resíduos estão organizados predominantemente em uma face peptídeo,

Três resíduos hidrofóbicos em forma de diamante, juntamente com três resíduos de K (lisina) potencialmente positivos (básicos) em forma de pentágono e um resíduo de D (ácido aspártico) potencialmente negativos (ácidos) em forma de triângulo estão agrupados na face oposta aos resíduos hidrofílicos.

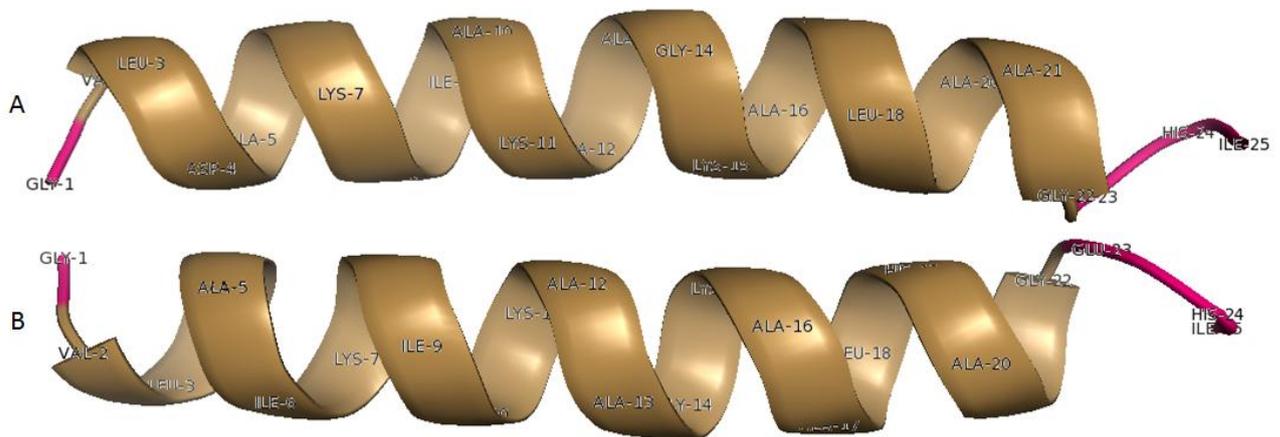


Figura 85 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 4-19 de H.C. Parte A da figura é mostrada uma face do peptídeo e na parte B e mostrada a face oposta

Como descrito anteriormente é possível observar que o peptídeo adota preferencialmente a conformação em α -hélice.

Na parte A da figura 85 é evidenciada uma face catiônica e parcialmente hidrofóbica, devido aos resíduos de lisina (7 e 11) e leucina (3 e 18).

Na parte B da figura é evidenciada uma face completamente hidrofílica, devido a cinco resíduos de alanina (5, 12, 13, 16 e 20) e um resíduo de valina na posição 2.

A partir desses dados é possível supor que o peptídeo possui característica anfipática e catiônica. Mas essas informações só poderão ser confirmadas após estudos de RMN e dicroísmo circular do peptídeo sintético, mas esses dados são um indicativo de mais um novo peptídeo da família das **hylaptinas**.

5.2.8. Identificação do peptídeo da fração 20.

A fração 20 após purificação em sistema analítico resultou em 3 subfrações (Figura 86).

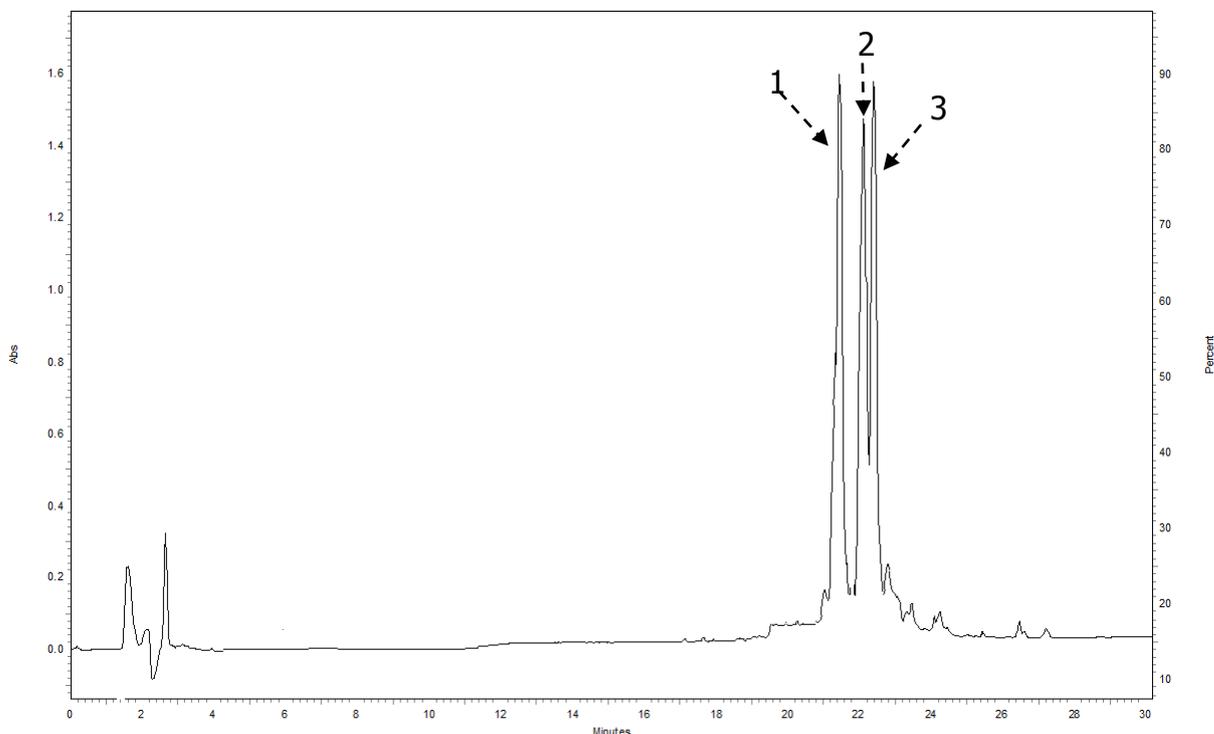


Figura 86 - Cromatograma analítico da fração 20 de H.C.

Linha preta corresponde ao comprimento de onda em 216 nm. As setas indicam quais frações foram coletadas manualmente.

Porém apenas a subfração 2 apresentou espectro de MS^2 adequado para ser sequenciado, sendo possível confirmar as séries b e y.

No espectro de massas da fração 2-20 foi observado o íon majoritário de m/z 2.386,5 u (Figura 87) com uma alta intensidade de sinal (6×10^4), sendo este em seguida submetido à fragmentação (Figura 88).

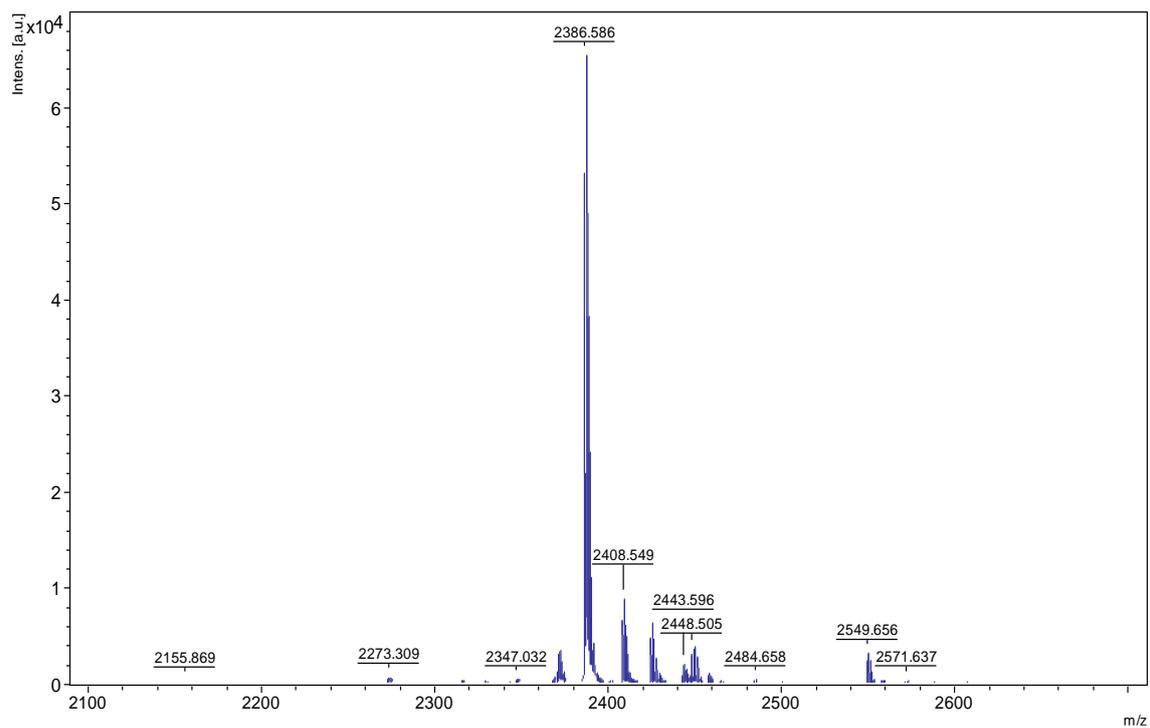


Figura 87 - Espectro de Massas da fração 2-20.

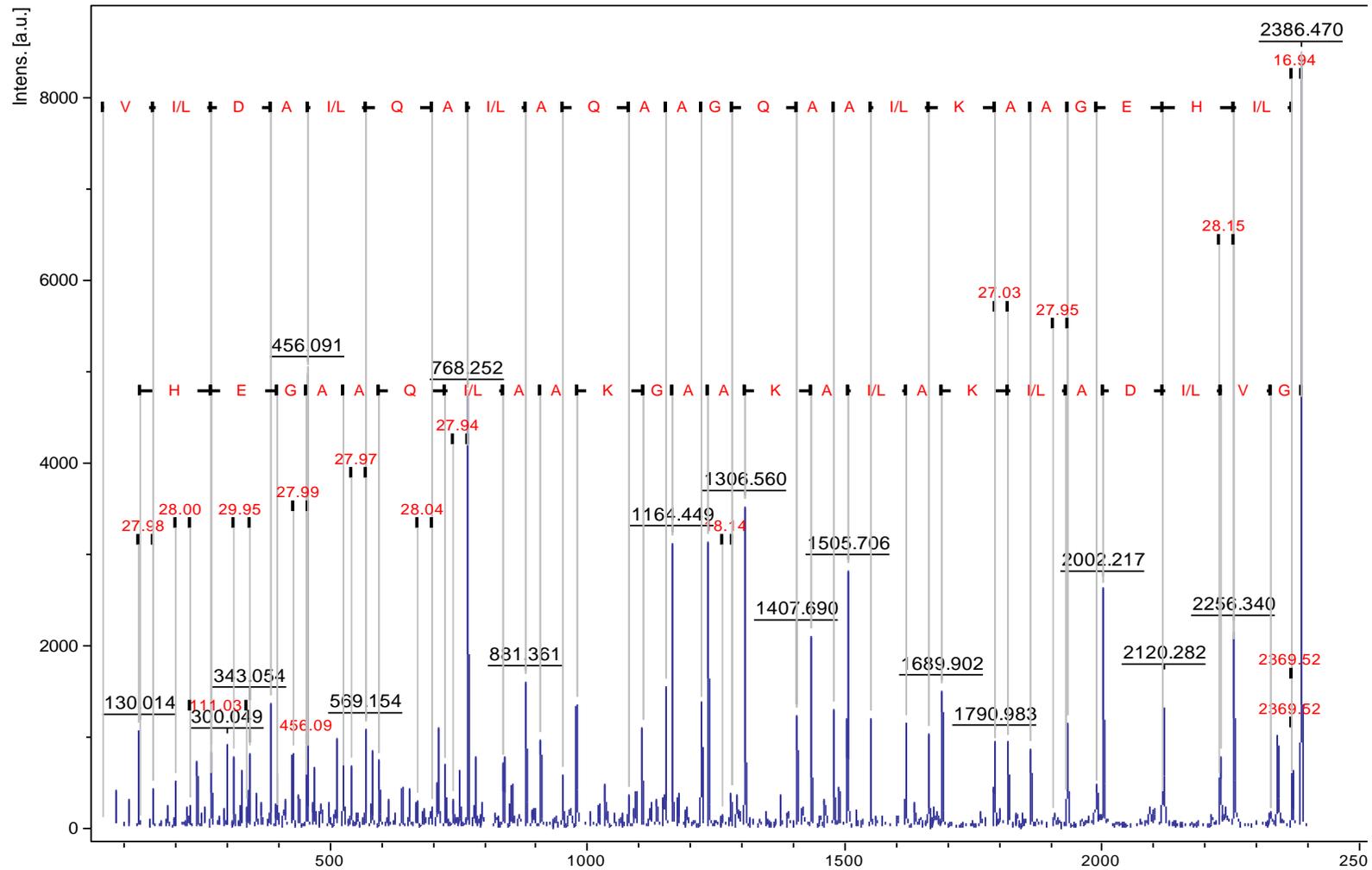


Figura 88 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 2.386,4 u.

Na sequência proposta a porção C-terminal é indicada pelo resíduo I/L (isoleucina/leucina) na parte superior da figura no canto direito, e a porção N-terminal é indicada pelo resíduo G (glicina) um pouco abaixo de I/L.

O peptídeo da fração 2-20 com 25 resíduos de aminoácidos e sequência proposta **GVI/LDAI/LKAI/LAKAAGKAAI/LQAAGEHI/L** com C-terminal amidado foi submetida à ferramenta BLASTp obtendo 93% de identidade com o peptídeo **hylaseptina-P1 (GILDAIKAIKAAG)** (PRATES et al., 2004).

A sequência proposta foi submetida a ferramenta de bioinformática SOPMA para avaliar o alinhamento e a possível conformação de sua estrutura secundária. Sendo que o peptídeo apresenta uma possível estrutura secundária em 3 estados: conformação de 80,00% em forma de α -hélice (Hh) do primeiro ao décimo segundo resíduo, do décimo quinto ao vigésimo primeiro e no último resíduo. Conformação de 12,00% em ângulo β (Tt) no décimo terceiro, décimo quarto e vigésimo segundo resíduo e 8,00% em espiral aleatória (Cc) no vigésimo terceiro e vigésimo quarto resíduo (Figura 89).

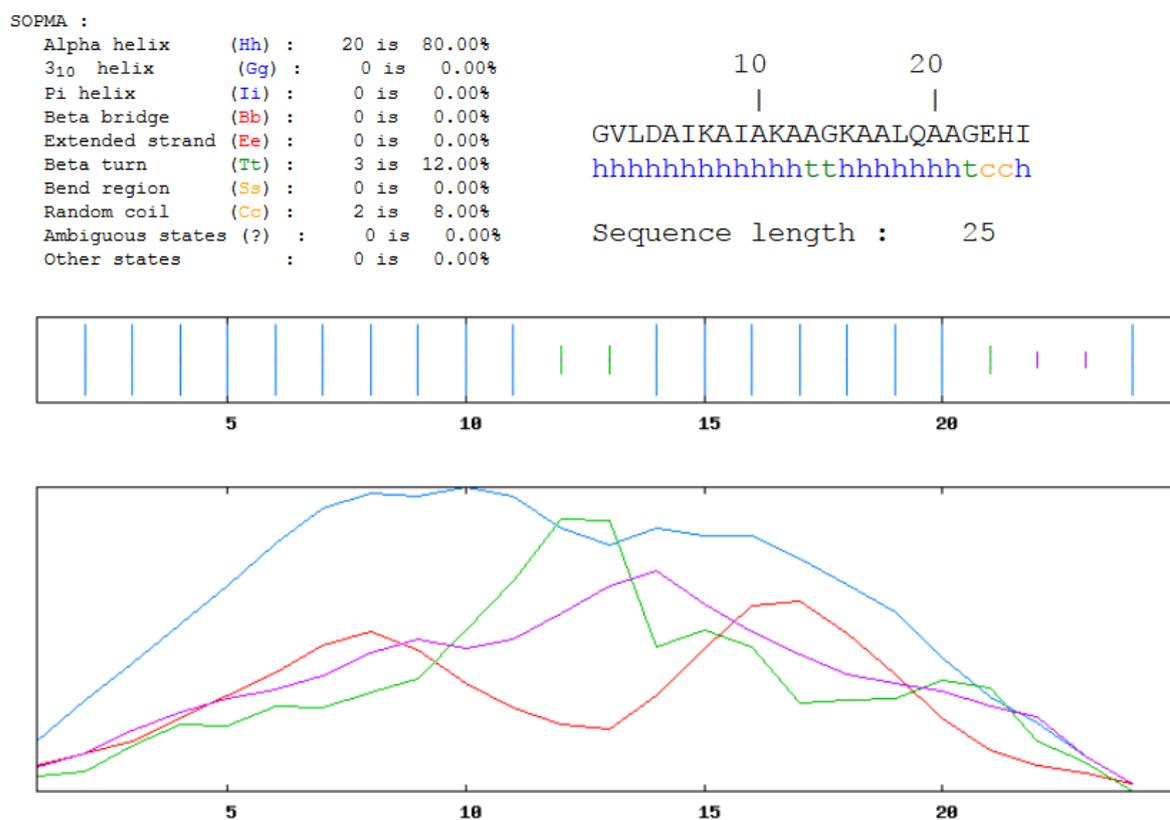


Figura 89 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 2-20. Linha em azul indica a conformação em α -hélice, vermelha indica conformação em cadeia estendida, verde em ângulo β e rosa em conformação de espiral aleatória.

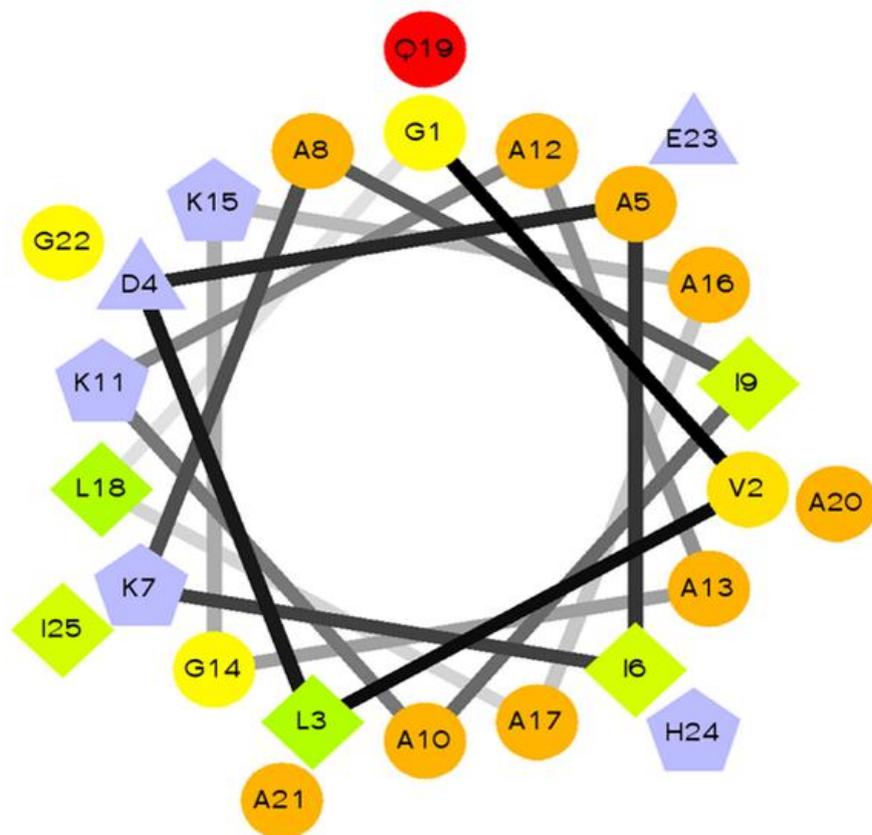


Figura 90 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 2-20 de H.C. Resíduos hidrofóbicos em forma de diamante que variam da cor verde ao verde claro, resíduos hidrofílicos em forma de círculo em vermelho intenso ao amarelo, resíduos potencialmente positivos em forma de pentágono e os potencialmente negativos em forma de triângulo sendo esses na cor lilás.

Através da projeção de Schiffer-Edmundson, (Figura 90) pode-se observar que o peptídeo é constituído em sua maioria de resíduos hidrofílicos que são representados em forma de círculo, variando do vermelho intenso ao amarelo. Seis desses resíduos incluindo o mais hidrofílico estão agrupados em sequência na α -hélice, a também outros cinco resíduos hidrofílicos organizados na mesma face, sendo separados por dois resíduos hidrofóbicos, formando uma face hidrofílica. Na face oposta estão agrupados três resíduos hidrofóbicos, três resíduos potencialmente positivos e um negativo, formando uma face catiônica e parcialmente hidrofóbica.

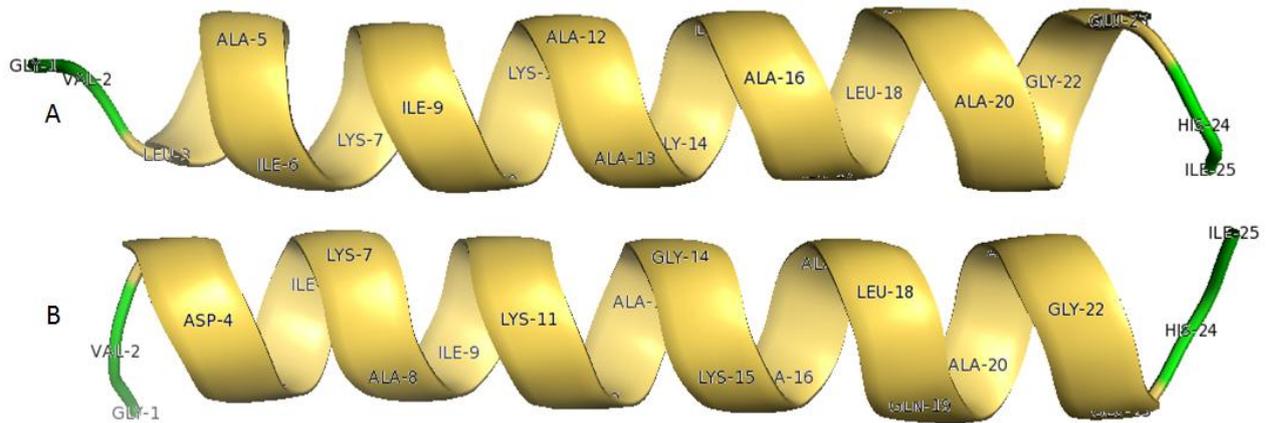


Figura 91 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 2-20 de H.C. Parte A da figura é mostrada uma face do peptídeo e na parte B é mostrada a face oposta.

Os dados apresentados na conformação tridimensional do peptídeo confirmam resultados descritos anteriormente.

Confirma a conformação preferencial em α -hélice do terceiro ao vigésimo terceiro resíduo. Na parte A da figura 81 se observa os resíduos nas posições 5, 12, 13, 16 e 20 que é referente ao aminoácido alanina (ALA), confirmando a face hidrofílica.

Na parte B é evidenciado os resíduos nas posições 7, 11 e 15 que é referente ao aminoácido lisina (LYS) e o aminoácido leucina (LEU) na posição 18 confirmando a face catiônica e parcialmente hidrofóbica.

As sequências peptídicas propostas juntamente com sequências depositados em banco de dados foram alinhadas pela ferramenta de bioinformática CLUSTALW (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/align_clustalw.pl) para avaliar o grau de identidade, sendo estas organizadas em 5 grupos apresentados nas tabelas 7, 8, 9, 10 e 11.

No grupo das hylaseptinas (Tabela 7) foi possível identificar seis novas sequências peptídicas e mais uma sequência que apesar de ter se caracterizado como homólogo a **dermadistinctin-K**, foi adicionado no grupo das hylaseptinas devido a semelhança dos seus resíduos. Essas sequências possuem uma região conservada mostrada em vermelho do nono ou décimo ao décimo quinto resíduo (7 resíduos)

quando comparado a hylaseptina, ocasionado um total de 20.00% de identidade entre as sequências propostas e o peptídeo hylaseptina.

No entanto se a comparação for feita apenas com as sequências propostas, estas possuem uma grande região conservada mostrado em vermelho e em verde que fica entre o nono ou décimo ao décimo nono resíduo, ou seja doze resíduos de aminoácidos. Os peptídeos sequenciados com exceção do identificado na fração 6/17 possuem entre 22 e 26 resíduos, isso significa que os peptídeos identificados possuem entorno de 50.00% de identidade entre si. Esses peptídeos após terem suas sequências confirmadas serão sintetizados e terão atividades biológicas testadas, podendo caracterizar uma possível nova família baseado no peptídeo **hylaseptina**.

Tabela 7 - Grupo das hylaseptinas.

Fração	Sequências	Massa (u)
5/15	AVIDGAIKT IAKAAGKAALQAA-----	2.052,2
7/18	GVSVLAIKT IAKAAGKAAL E AAL---	2.165,3
2/20	G-VLDAIKA IAKAAGKAALQAAGEHI	2.386,5
4/19	G-VLDAIKA IAKAAGKAALHAAGEHI	2.395,3
hylaseptina P1	G-ILDAIKAIKAAG-----	1.311,8
7/17	G-VLDKIKA IAKAAGKAALKAAGESI	2.393,4
5/15	GVVLDKIKA IAKAAGKAALQAAGEVV	2.490,5
6/17	KDSSF AAKAIKAAGKAALDAAKN--	2.950,6

Resíduos em vermelho indicam a região conservada das sequências propostas em comparação com peptídeos depositados em banco de dados. Resíduos em verde indicam a região conservada das sequências propostas.

Em relação ao grupo das raniseptinas (Tabela 8) foi possível identificar duas novas sequências peptídicas, essas sequências possuem quatro pequenas regiões conservadas que são mostrados em vermelho.

Porém se a comparação for feita apenas com as duas sequências identificadas na secreção, estas possuem apenas uma grande região conservada evidenciada pelas cores vermelho, verde e azul que fica entre o quinto e vigésimo segundo resíduo, ou seja 18

resíduos de aminoácidos, isso significa que os peptídeos identificados possuem entorno de 74,00% de identidade entre si. Esses peptídeos após terem suas sequências confirmadas serão sintetizados e terão atividades biológicas testadas, podendo caracterizar novos peptídeos da família raniseptinas.

Tabela 8 - Grupo das raniseptinas.

Fração	Sequências	Massa (u)
2/8	FGLD-TLKT LGKVAGKVALNVAQN FLT---	2.718,7
6/17	-GFEVTLKT LGKVAGKVALNVAQ -----	2.243,3
raniseptina 1	AWLD-KLK SLGKVVGKVALGVAQ NYLNPQQ	3.136,7

Resíduos em vermelho indicam a região conservada das sequências propostas em comparação com peptídeos depositados em banco de dados. Resíduos em verde e azul indicam a região conservada em apenas algumas sequências.

As sequências presentes na tabela 9, que apesar de não terem tido identidade significativa com peptídeos depositados em banco de dados, apresentaram grande similaridade entre si. Além de terem sido identificados mais duas sequências que se apresentaram em uma possível formada truncada (cromatograma analítico da fração, espectros de MS e MS² são apresentados em anexo nas Figuras 125 a 130). Esses peptídeos apresentaram três pequenas regiões conservadas evidenciadas em vermelho ocasionando 36,00% de identidade entre as sequências.

Após esses quatro peptídeos tiverem suas sequências completadas e/ou confirmadas por estudo de c-DNA, poderão ser sintetizados e testados biologicamente, e se tiverem atividade biológica poderão caracterizar uma nova família de peptídeos.

Tabela 9 – Grupo dos GLF.

Fração	Sequências	Massa (u)
5/16	GLFLALKLGSALAKTFVPMLSDALK	2.603,2
4/16	-----LGSALAKTFVPMLSDALK	1.860,9
2/11	-----KTFVPFLSDALK	1.364,8
4/12	-----KTFVPMLSEGLK	1.348,6

Resíduos em vermelho indicam a região conservada das sequências propostas em comparação com peptídeos depositados em banco de dados. Resíduos em verde e azul indicam a região conservada em apenas algumas sequências.

Na tabela 10 são mostradas as sequências propostas para os peptídeos cíclicos. A sequência proposta para fração 4-13 apresentou duas regiões altamente conservadas que são evidenciadas em vermelho ao serem comparadas com o peptídeo **signiferin 1**.

Pôr a sequência proposta possuir 90,00% de identidade com **signiferin 1**, sendo que a única diferença entre essas sequências está no quinto resíduo onde ocorreu a troca do aminoácido tirosina (Y) no **signiferin 1** pelo aminoácido lisina (K) da fração 4-13. O peptídeo após a confirmação de sua sequência será sintetizado e testado biologicamente caracterizando-se um novo peptídeo da classe **signiferin**.

A sequência proposta para o peptídeo da fração 5-13 (Tabela 10) apresentou 83,00% de identidade com o peptídeo **somatostatina** com uma região altamente conservada evidenciada em vermelho, com diferença apenas no décimo e décimo primeiro resíduo. A somatostatina não possui função determinada na secreção de anuros, mas após a confirmação de sua sequência por c-DNA, o peptídeo poderá ser sintetizado e testado biologicamente para identificar sua função na secreção.

Tabela 10 - Grupo dos peptídeos cíclicos alquilados.

Fração	Sequências	Massa + (u)
somatostatina	CKNFFWKTF ^T SC	ND
5/13	CKNFFWKTF ^S EC	1.653,9 ^a
signiferin 1	RLCIPY ^I IIPC	1.187,2
4/13	RLCIPK ^I IIPC	1.269,7 ^a

Resíduos em vermelho indicam a região conservada das sequências propostas em comparação com peptídeos depositados em banco de dados. ND. Massa não determinada.^a Massa do peptídeo + 116 u, referente a alquilação de duas cisteínas.

A sequência proposta para o peptídeo da fração 4-17 (Tabela 11) apresentou 94,44% de identidade com o peptídeo **fenilseptina** com duas regiões altamente conservadas evidenciada em vermelho, com diferença apenas no terceiro resíduo. Onde ocorreu a troca entre dois resíduos aromáticos e hidrofóbicos, o aminoácido fenilalanina (F) em **fenilseptina** pelo tryptofano (W) na fração 4-17. O peptídeo após a confirmação de sua sequência será sintetizado e testado biologicamente caracterizando-se um novo peptídeo da classe **fenilseptina**.

Tabela 11 - Grupo das fenilseptina.

Fração	Sequências	Massa (u)
fenilseptina	FF ^F DTLKNLAGKVLGALT	1.954,5
4/17	FF ^W DTLKNLAGKVLGALT	1.993,3

Resíduos em vermelho indicam a região conservada da sequência proposta em comparação com peptídeos depositados em banco de dados.

5.3. Estudo do c-DNA de *H. cinerascens*.

Por meio de isolamento do RNA total e síntese do c-DNA, foi possível confirmar três sequências propostas anteriormente identificadas através da análise por espectrometria de massas.

A confirmação foi realizada por meio de comparação com as sequências peptídicas propostas com as codificadas no gene.

5.3.1 Confirmação da sequência proposta obtida da fração 9-14 de *H.C.*

A fração 9-14 (cromatograma analítico, espectro de MS e MS² são apresentados em anexo nas figuras 131 a 133) foi sequenciada na forma truncada e teve confirmação de sua sequência completa codificada no gene (Figura 92). Onde é possível identificar o peptídeo sinal em azul, peça acídica em verde e peptídeo ativo em vermelho, apesar que o peptídeo não ter sido identificado por massas pode observar que a sequência termina em GRT, sendo que R (arginina) é sítio de clivagem e G (glicina) causando a aminação do C-terminal, a massa teórica de 1.725,1 u, foi obtida com C-terminal aminado.

ATGGCTTTCCTGAAAAAATTTCTTGTCCTTGTATTTTTNTCGGAT
TAGTTTCCCTGTCCATCTGTAAGAAGAGAAAAGAGAAGATGAG
GAGAATGAAGAGGAAGAAAAGGAAGAGGAAAGTGAGGAAAACA
GACAAAAGAGACTTTTGGAACCTATATTAATCTAGTTAAAAGCCT
TCTTGGTGGTTTTGGGCGTTGATAAAATGTAATGTTTTATCAGAAA
GGAGCACGATCATTAGTGTCAGACATATAATAAAGGATATGAATTG
AAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCGACATCATTCCGCGGGGTCA

MAFLKKFLVLVFLGLVLSICKEEKREDEENEEEXEESEENRQK
RLL**EPILNLVKSLLGGF**GRT

Peptídeo sinal: Azul

Peça Ácida: Verde

Peptídeo ativo: Vermelho

Sítio de clivagem: GRT

LLEPILNLVKSLLGGF-NH₂

Figura 92 - Sequência peptídica com massa teórica 1.725,1 u.

O peptídeo da fração 9-14 apresentou homologia a outros 6 peptídeos codificados no gene que tiveram suas massas medias calculadas e suas sequências foram submetidas à ferramenta de bioinformática BLASTp e CLUSTALW (Tabela 12).

As sequências identificadas apresentaram três regiões conservadas que são evidenciadas em vermelho e apresentaram 67,00% a 70,35% de identidade com peptídeo antimicrobiano maximin H48 identificado no cérebro de *Bombina microdeladigitora* (LIU et al., 2011) (Tabela 12).

Tabela 12 - Grupo dos peptídeos LLE

Fração	Sequências	Massa (u)
maximim H48	I L G P V L G L V G S A L G G L I	1.547,9
Gene1	L L E P I L N P V K S L L G G L -	1.675,0
Gene2	L L E P I L N L V K S L L G G L -	1.691,1
Gene3	L L E P I L N L V K G L L G G L -	1.661,0
Gene4	L L E P I L K L V K G L L G G L -	1.675,1
Gene5	L L E P I L N L V N S L L G G L -	1.677,0
Gene6	L L E P I L N L V K S L L G G F -	1.725,1
Gene7	L L E L I L N L V K S L L G G F -	1.741,2
9/14	L L E P I L N L - - - - - - - -	924,6

Resíduos em vermelho indicam a região conservada das sequências codificadas.

Foi usado o método computacional de Schiffer-Edmundson para projeção bidimensional das estruturas secundárias dos peptídeos codificados no gene (Figura 93).

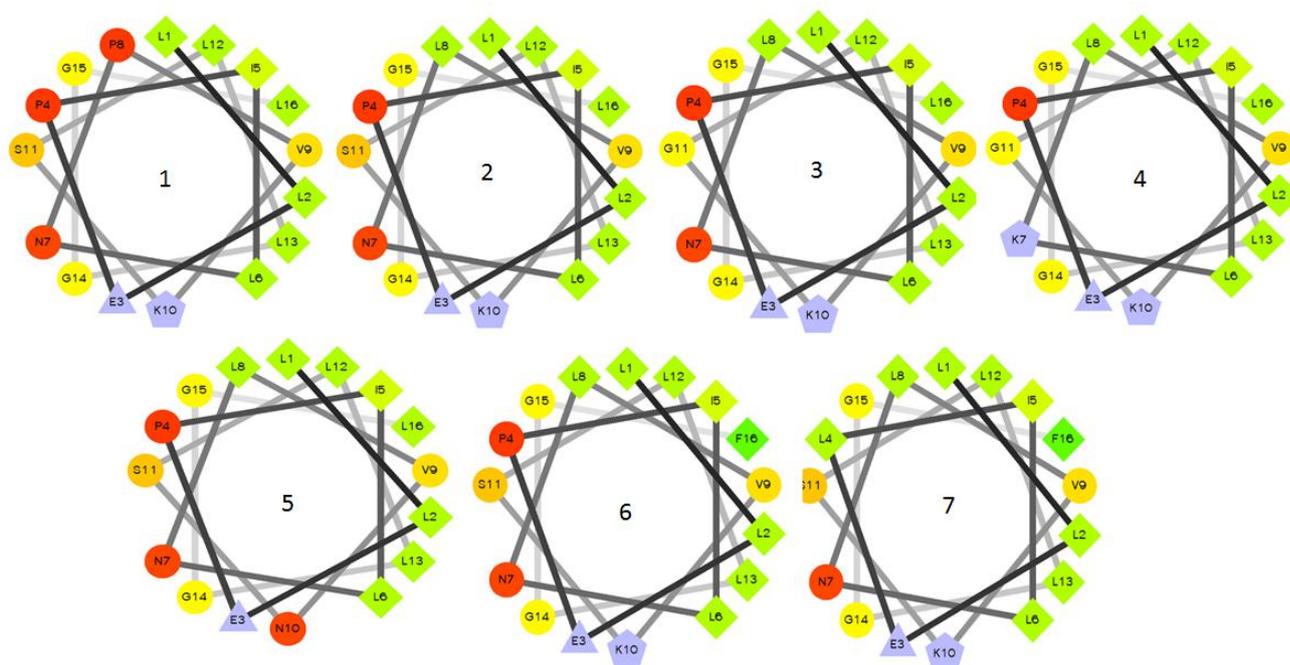


Figura 93 - Projeção Schiffer-Edmundson dos peptídeos do grupo LLE codificados no gene de *H.C.*

Resíduos hidrofóbicos em forma de diamante que variam da cor verde ao verde claro, resíduos hidrofílicos em forma de círculo em vermelho intenso ao amarelo, resíduos potencialmente positivos em forma de pentágono e os potencialmente negativos em forma de triângulo sendo esses últimos na cor lilás.

Através da projeção de Schiffer-Edmundson, pode-se observar que todas as sequências codificadas no gene do grupo LLE possuem características anfipáticas já que os resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos estão organizados em faces opostas. Essa organização estrutural só poderá ser confirmada após estudos de RMN e dicroísmo circular dos peptídeos sintéticos, e após a confirmação do potencial biológico e identificação na secreção o grupo LLE pode indicar uma nova família de peptídeos antimicrobianos.

5.3.2. Confirmação da sequência proposta obtida da fração 2-20 de H.C.

O peptídeo da fração 2-20 teve sua sequência confirmada no gene (Figura 94). Onde é possível identificar o peptídeo sinal em azul, peça acídica em verde e peptídeo ativo em vermelho, também pode observar que a sequência termina em GSR, sendo que a sequência GSR (glicina, serina e arginina) pode ser considerada sítio de clivagem causando a aminação do C-terminal, sendo esta evidência confirmada no estudo de MS.

```
ATGGCTTTCCTGAAAAAGTCGCTTTTTCTTGACTATTCCTTGGGAATAG
TTTCTCTGTCCATCTGTCAAGATGAGAAAAGAGAGGGAGACGAGCAG
TATGAAGAGGAAGAAAATGAAGAGGCAAGTGAGGAAAAGAGAGGAGT
ACTCGATGCAATTAAGCCATAGCGAAAGCAGCTGGTAAAGCCGCTC
TTCAAGCTGCTGGTGAACACATAGGTTACGTTAATGATTCATCTCTAT
GGAACATAACTGTTAGTTGTGTCAGACATATAATAAAGCATATTATCTGA
AAAAAAAAAAAAAAAAACTCGACATCGATACGCGTGGTCA
```

```
MAFLKKSFLVLFLGIVLSICQDEKREGDEQYEEEEENEASEEKRGVLD
AIKAIKAAGKAALQAAGEHIGSR
```

Peptídeo sinal: Azul

Peça acídica: Verde

Peptídeo ativo: Vermelho

Sítio de clivagem: GSR

GVLDAIKAIKAAGKAALQAAGEHI-NH₂

Figura 94 - Sequência codificada no gene confirmando o peptídeo da fração 2-20.

Foram codificadas 4 novas sequências que foram adicionadas ao grupo das hylaseptinas, que tiveram suas massas médias teóricas calculadas com C-terminais aminados, já que todas as sequências codificadas possuíam a sequência GSR como sítio de clivagem, caracterizando uma possível aminação (Tabela 13).

Os peptídeos codificados no gene possuem grande similaridade em relação a sequência primária com diferenças em poucos resíduos, proporcionando a mesma região conservada mostrada anteriormente na tabela 5 ou seja, todas as sequências possuem acima de 60.00% de identidade com a forma truncada do peptídeo hylaseptina.

No entanto se a comparação for feita com as sequências propostas e as codificadas no gene, estas possuem uma grande região conservada mostrado em vermelho e em verde, ocasionando 75,00% de identidade entre suas sequências.

Tabela 13 - Grupo das hylaseptinas 2.

Fração	Sequências	Massa (u)
5/15	AVIDGAIKT IAKAAGKAALQAA----	2.052,2
7/18	GVSVLAIKT IAKAAGKAAL E AAL---	2.165,3
2/20^a	G-VLDAIKA IAKAAGKAALQAAGEHI	2.386,5
4/19	G-VLDAIKA IAKAAGKAALHAAGEHI	2.395,3
hylaseptina P1	G-ILDAIKAIKAAG-----	1.311,8
7/17	G-VLDKIKA IAKAAGKAALKAAGESI	2.393,4
5/15	GVVLDKIKA IAKAAGKAALQAAGEVV	2.490,5
6/17	KDSSF AAKAIKAAGKAALDAAKN--	2.950,6
Gene1	G-VLDAIRA IAKAAGKAALQAAGEHI	2.448,8
Gene2	G-VLDAIKA IAKAAGKAALQAAGEHI	2.420,8
Gene3	G-VFDAIKAIKAAGKAALHAAGDSI	2.365,7
Gene4	G-IGDILKNIKAAGKAALHAVGESI	2.416,8

Resíduos em vermelho indicam a região conservada das sequências propostas em comparação com peptídeo depositado em banco de dados. Resíduos em verde indicam a região conservada das sequências propostas e codificadas no gene. ^aSequência proposta confirmada pelo gene.

Foi usado o método computacional de Schiffer-Edmundson para projeção bidimensional das estruturas secundárias dos quatro peptídeos codificados no gene (Figura 95).

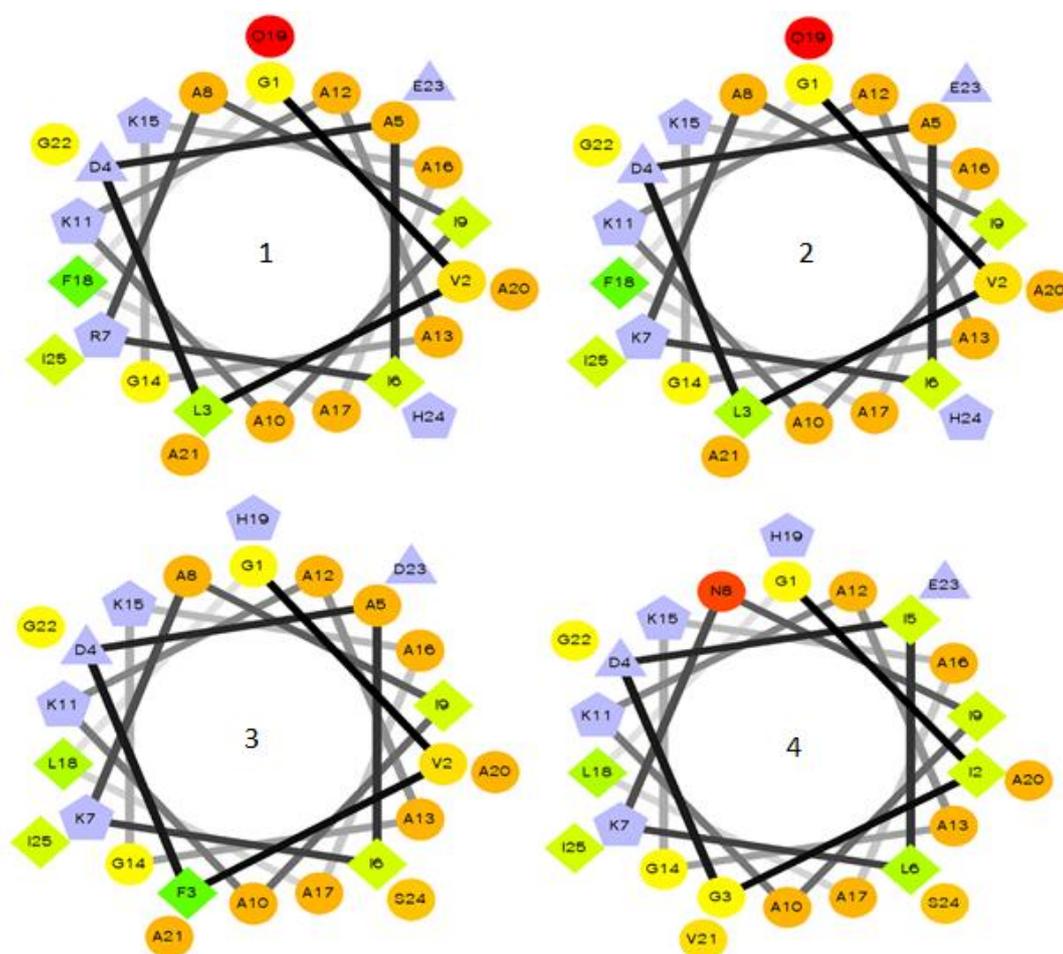


Figura 95 - Projeção Schiffer-Edmundson dos peptídeos do grupo hylaseptina codificados no gene. Resíduos hidrofóbicos em forma de diamante que variam da cor verde ao verde claro, resíduos hidrofílicos em forma de círculo em vermelho intenso ao amarelo, resíduos potencialmente positivos em forma de pentágono e os potencialmente negativos em forma de triângulo sendo esses últimos na cor lilás.

Através da projeção de Schiffer-Edmundson, pode-se observar que todas as sequências codificadas no gene do grupo hylaseptina possuem características anfipáticas

e catiônicas já que os resíduos hidrofóbicos estão organizados na face oposta a três resíduos hidrofílicos e três resíduos potencialmente positivos.

5.3.3. Confirmação da sequência proposta obtida da fração 4-13 de H.C.

O peptídeo da fração 4-13 teve confirmação de sua sequência completa codificada no gene (Figura 95). Onde é possível identificar o peptídeo sinal em azul, peça acídica em verde e peptídeo ativo em vermelho, sendo que esta sequência se apresenta no gene sem sítio de clivagem definido o que pode confirmar a não aminação do seu C-terminal.

Também foi possível observar outra sequência codificada no gene que apresentou 88,00% de identidade com o peptídeo da fração 4-13, esse peptídeo codificado também se apresenta com duas cisteínas nas mesmas posições, o que caracteriza outro peptídeo cíclico, ao alinhamento das sequências e apresentada na tabela 14.

ATGGCTTTCCTGAAAAAGTCGCTTTTTCTTGACTATTCCTTGGAT
 TCGTTTCCTTGTCCATCTGTGAAGAAGAGAAAAGGGAAGAAAGG
 GAGGAGGACGAGGCGGAGGAATACGAGCAATATCAAGAGGAAAA
 AAGGGAGGAGAACGAGCCGGAGGAATACGAGGAAAATGAAGAG
 GAAAATGAGGAGAATAAAGAAAGGAAAAAGCGCAGAATTTGTATA
 CCTAAAATACTTCCTTGTTAAAATCTTCAGTTTCCTCCCTAAGCAG
 CACAATTGTTATTAGCTGTGCAGACATATAATAAAGCATATTGAACT
 GAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCGACATCGATACGCGTGGTCA

MAFLKKSFLVFLVFLGFVLSICEEEKREEEREDEAEYEYQYQEEKR
 EENEPEEYEENEENEENKERKKR**RICIPKILPC**

Peptídeo sinal = Azul

Peça Ácida = Verde

Peptídeo ativo = Vermelho

RICIPKILPC

Figura 96 - Sequência codificada no gene confirmando o peptídeo da fração 4-13.

Tabela 14 - Grupo dos peptídeos RIC2.

Fração	Sequências	Massa (u)
Signiferin 1	RLCIPYIIPC	1.187,2
4-13	RLCIPKILPC	1.269,7 ^a
Gene	RICIPYFIPC	1.222,5

Resíduos em vermelho indicam a região conservada das sequências apresentadas.^a Massa do peptídeo alquilada (+116).

5.3.4. Identificação de sequências codificadas no gene de H.C.

Além das sequências já identificadas foram codificadas mais cinco sequências peptídicas com treze resíduos de aminoácidos cada, na figura 96 se evidencia como a sequência é codificada no gene. Onde é possível identificar o peptídeo sinal em azul, peça acídica em verde e peptídeo ativo em vermelho, apesar que o peptídeo não ter sido identificado por massas pode observar que as sequências terminam em glicina (G) o que pode indicar uma possível aminação do C-terminal.

```
ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTTTTCCTTGACTATTCCTTGGAT
TCGTTTCCCTGTCCATCTGTGAAGAAGAGAAAAGAGAGGAAGAA
ANGGAGGAGAACGAGCCGGAGGAAAGTGAGGAGGAAGAGGAG
GAAAATGAAGAGGAAAATGAAGAGGAAAATGAGGAAAAGAGAAA
GCGCAGGGGATATTGGCATTCTGCAGATAAAAACAAGGGGGTTT
GTGGTTAAAATCTCCAGTTTCCTCCCTAAGCGGCACAATTGTTAT
TAGCTGTGCAGACATATAATAAANNNNATTGAACTGAAAAAAAAA
AAAAAA
```

```
MAFLKKSFLVLFLGFLVLSICEEEKREEEXEENEPEESEEEEEENE
EENEENEKRRKRRGYWHSADKNKGVC
```

Peptídeo sinal: Azul

Peça Ácida: Verde

Peptídeo ativo: Vermelho

GYWHSADKNKGVC-NH₂

Figura 97 - Sequência codificada com massa teórica 1.463,6 u.

Esses peptídeos não foram encontrados no estudo por espectrometria de massas e não apresentaram identidade com peptídeos depositados em banco de dados.

As cinco sequências codificadas foram submetidas a ferramenta de alinhamento CLUSTALW, sendo que tais sequências apresentaram 76,92% de identidade (Tabela 15).

Tabela 15 - Grupo dos peptídeos GCW.

Nome	Sequências	Massa (u)
Gene1	GCWHSADKNKGVC	1.401,5
Gene2	GCWHSADKNEGVC	1.402,5
Gene3	GYWHSADKNKGVC	1.463,6
Gene4	GCWHSADKNKGVY	1.463,6
Gene5	GCWHSADKNKGV R	1.456,6

Resíduos em vermelho indicam a região conservada das sequências codificadas.

As sequências nomeadas gene1 e gene2 foram codificadas com duas cisteínas cada, o que caracteriza peptídeos cíclicos as outras três sequências codificadas apresentam apenas um resíduo de cisteína cada, o que é incomum já que em grande parte de peptídeos as cisteínas se apresentam em pares na sequência peptídica. As sequências gene3 e gene4 são isômeras constitucionais, já que possuem a mesma massa teórica 1.463,6 com diferença no segundo e no último resíduo, onde ocorre a troca dos resíduos tirosina por cisteína em gene3 (Y e C) e gene4 (C e Y). A sequência gene 5 possui a mesma sequência do gene 4 com diferença no último resíduo onde ocorre a troca de tirosina (Y) por arginina (R).

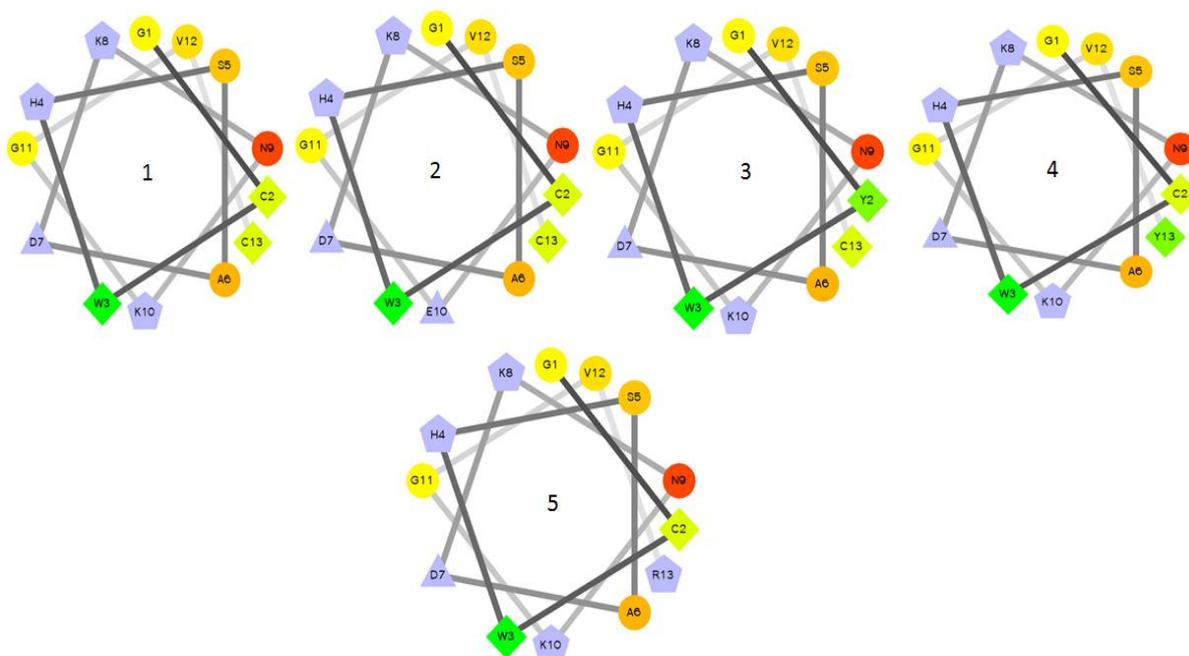


Figura 98 - Projeção Schiffer-Edmundson dos peptídeos do grupo GCW codificados no gene de H.C.

Resíduos hidrofóbicos em forma de diamante que variam da cor verde ao verde claro, resíduos hidrofílicos em forma de círculo em vermelho intenso ao amarelo, resíduos potencialmente positivos em forma de pentágono e os potencialmente negativos em forma de triângulo sendo esses últimos na cor lilás.

Através da projeção de Schiffer-Edmundson, (Figura 98) pode-se observar que as sequências codificadas gene1, gene3, gene4 e gene5 possuem características catiônicas já que a mais resíduos potencialmente positivos do que negativos, sendo que esses resíduos estão agrupados em uma face do peptídeo.

As sequências gene1 e gene2 possuem seus resíduos de cisteínas próximos o que pode confirmar a formação da ponte de dissulfeto. As cinco sequências possuem um resíduo hidrofílico agrupado com os resíduos potencialmente positivos que estão na face oposta a cinco resíduos hidrofóbicos, o que pode causar uma pequena característica anfipática. Essa organização estrutural só poderá ser confirmada após estudos de RMN e dicroísmo circular dos peptídeos sintéticos, e após a confirmação do potencial biológico e identificação na secreção o grupo GCW pode indicar uma nova família de peptídeos biologicamente ativos.

5.4. Imagem por Espectrometria de Massas de *H. cinerascens*.

Nem todos os peptídeos sequenciados por espectrometria de massas foram observados na pele do indivíduo, uma justificativa para tal resultado é que alguns peptídeos são pouco ionizáveis o que dificultaria a análise por Imaging.

Os peptídeos codificados apenas no gene não tiveram suas massas teóricas co-localizadas na pele por não ter certeza de suas massas corretas.

Na figura 99 é mostrada a região que foi feita a varredura pela de MALDI imaging.



Figura 99 - Região onde foi realizada a varredura por MALDI-imaging.

Foi escolhido um peptídeo de cada um dos grupos principais para ser apresentado como exemplo do estudo de Imagem.

Do grupo das hylaseptinas foi escolhido o peptídeo da fração 2-20 que teve sua sequência confirmada no gene GVLDAIKAIKAAGKAALQAAGEHI-NH₂ com m/z 2.386,5 u (Figura 100).

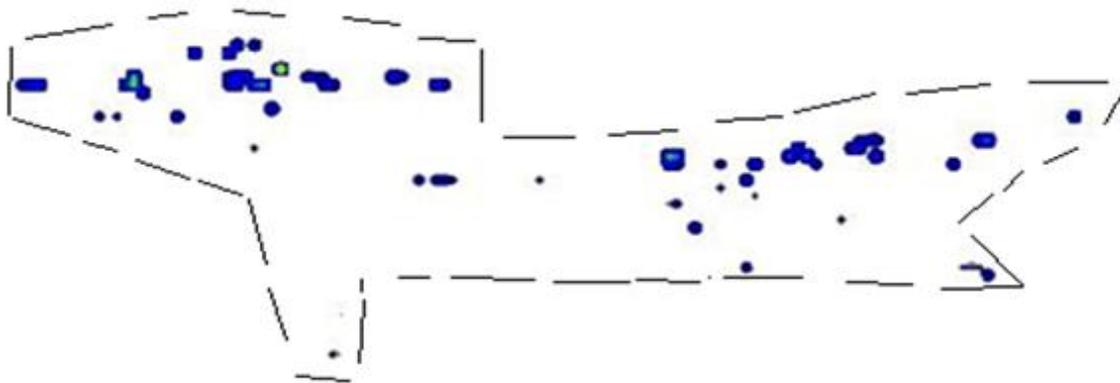


Figura 100 - Representação pictórica do peptídeo sequenciado com m/z 2.386,5 u. Os pontos coloridos indicam a localização que o peptídeo é armazenado, as cores que variam do azul claro, azul escuro e verde claro indicam a intensidade de ionização do peptídeo. Quanto mais intenso a cor maior a ionização.

Do grupo das raniseptinas foi escolhido o peptídeo sequenciado da fração 2-8 FGLDTLKTGKVALNVAQNFLT com m/z 2.718,7 u (Figura 101).



Figura 101 – Representação pictórica do peptídeo sequenciado com m/z 2.718,7 u. Os pontos coloridos indicam a localização que o peptídeo é armazenado, as cores que variam do azul claro, azul escuro e verde claro indicam a intensidade de ionização do peptídeo. Quanto mais intenso a cor maior a ionização.

Do grupo do GLF foi escolhido o peptídeo sequenciado da fração 5-16 GLFLALKLGSALAKTFVPMLSDALK com m/z 2.603,2 u (Figura 102).



Figura 102 – Representação pictórica do peptídeo sequenciado com m/z 2.603,2 u. Os pontos coloridos indicam a localização que o peptídeo é armazenado, as cores que variam do azul claro, azul escuro e verde claro indicam a intensidade de ionização do peptídeo. Quanto mais intenso a cor maior a ionização.

Ao analisar as imagens obtidas dos peptídeos com m/z 2.386,5 u, 2.718,7 u e 2.603,2 u verifica-se que esses peptídeos são de fácil ionização sendo essa característica observada no estudo por massas e estão bastantes distribuídos ao longo da pele dorsal analisada do espécime. O que pode indicar que tais peptídeos são de uma certa importância para o espécime estudado.

Como as duas primeiras sequências possuem identidade significativa com peptídeos biologicamente ativos (antimicrobianos) e de se esperar que eles tenham função parecida.

Não foi possível observar pela técnica de MALDI-imaging o peptídeo cíclico RICIPKILPC identificado na fração 4-13 que teve sua sequência confirmada no gene, sendo que esse resultado também foi observado no estudo por espectrometria de massas da secreção, já que tal peptídeo só pode ser identificado e sequenciado após reação de redução e alquilação das cisteínas.

5.4. Purificação do ETHG.

A purificação do ETHG por CLAE em sistema semipreparativo apresentou perfil cromatográfico distinto, onde foi possível observar a não degradação do material biológico, que é evidenciada através do cromatograma apresentar picos (frações) bem definidos (Figura 103).

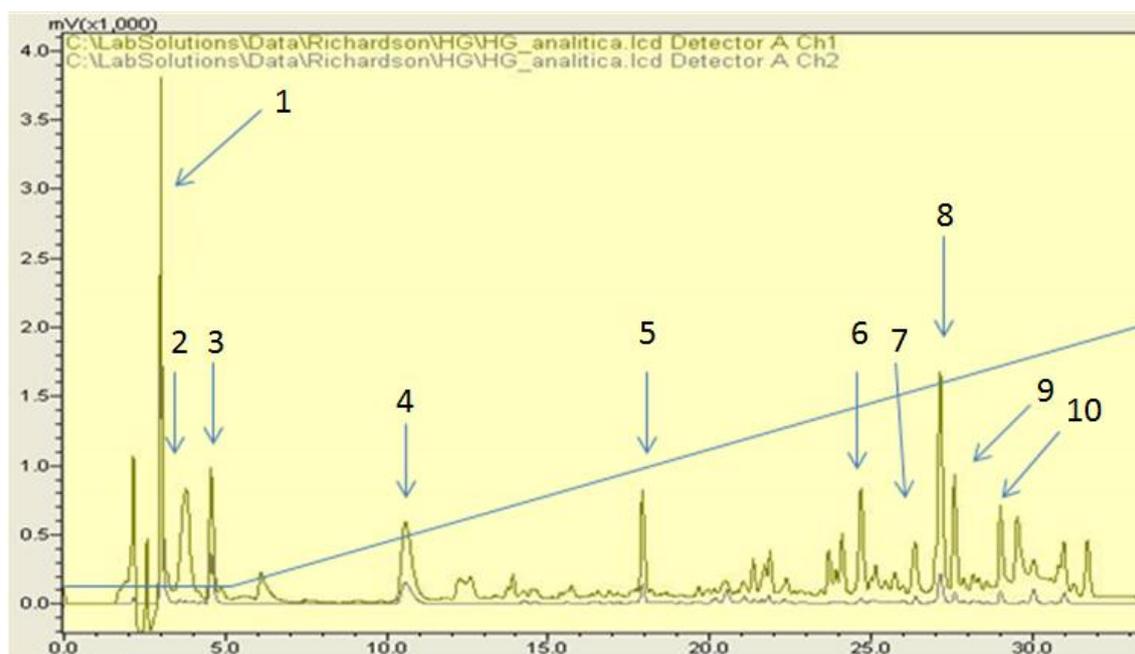


Figura 103 - Purificação do ETHG por CLAE.

Perfil cromatográfico do ETHG. Linha preta absorvância em 280 nm e linha verde 216 nm. Linha azul gradiente de 5 a 95% de ACN 0,1 TFA em 75 min. As setas indicam quais frações foram coletadas manualmente, sendo identificadas de 1 a 10.

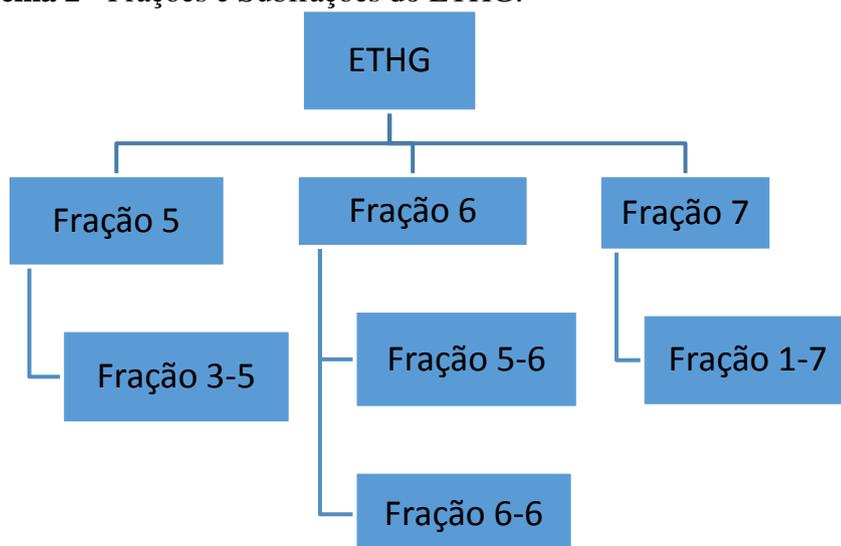
Do ETHG foram realizadas sete purificações, onde se coletou manualmente as 10 frações majoritárias (Figura 101) que foram reunidas em tubos Falcon (15 mL) separados, essas frações foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas para identificação das substâncias por espectrometria de massa.

Ao analisar o cromatograma do ETHG, foi possível observar uma baixa quantidade de frações quando comparado ao ETHC, sendo estas bem distribuídas entre 25 a 55% de ACN. O que nos leva a crer que a maioria das substâncias presentes na

secreção de *H. geographicus* possui media polaridade. Também foi possível observar uma maior intensidade dos picos com abs em 280 nm quando comparado ao ETHC, o que indica que a maioria destas substâncias possui elevada aromaticidade, ou seja, tais substâncias são ricas em resíduos do aminoácido triptofano, fenilalanina e tirosina. Pode-se se observar também um pico majoritário com abs em 280 nm, com tempo de retenção de 3 min e concentração de 5% ACN, ou seja, uma substância com alta polaridade e elevada aromaticidade o que descaracteriza um peptídeo, já que tais resíduos aromáticos são apolares. Uma suposição é que tal substância seria um metabólico secundário, esse fato também seria comprovado devido à pouca quantidade e baixa intensidade das frações observado no cromatograma do ETHG, ou seja, a espécie *H. geographicus* produz tanto metabólicos secundários e primários o que é bastante raro quando se trata de espécies arborícolas (pererecas).

Cada uma das 10 frações foram recromatografadas em sistema analítico, coletadas, liofilizadas e analisadas por espectrometria de massas (Esquema 2).

Esquema 2 - Frações e Subfrações do ETHG.



5.5 Espectros de Massas e estudos computacionais dos peptídeos de *H. geographicus*.

Todas as subfrações dos ETHC foram submetidas à análise por MS, MS² e sequenciamento pelo método *De novo*.

As sequências foram submetidas aos mesmos estudos computacionais já descritos anteriormente.

5.5.1 Identificação dos peptídeos da fração 5 de *H. geographicus*.

A fração 5 após purificação em sistema analítico resultou em 5 subfrações (Figura 104).

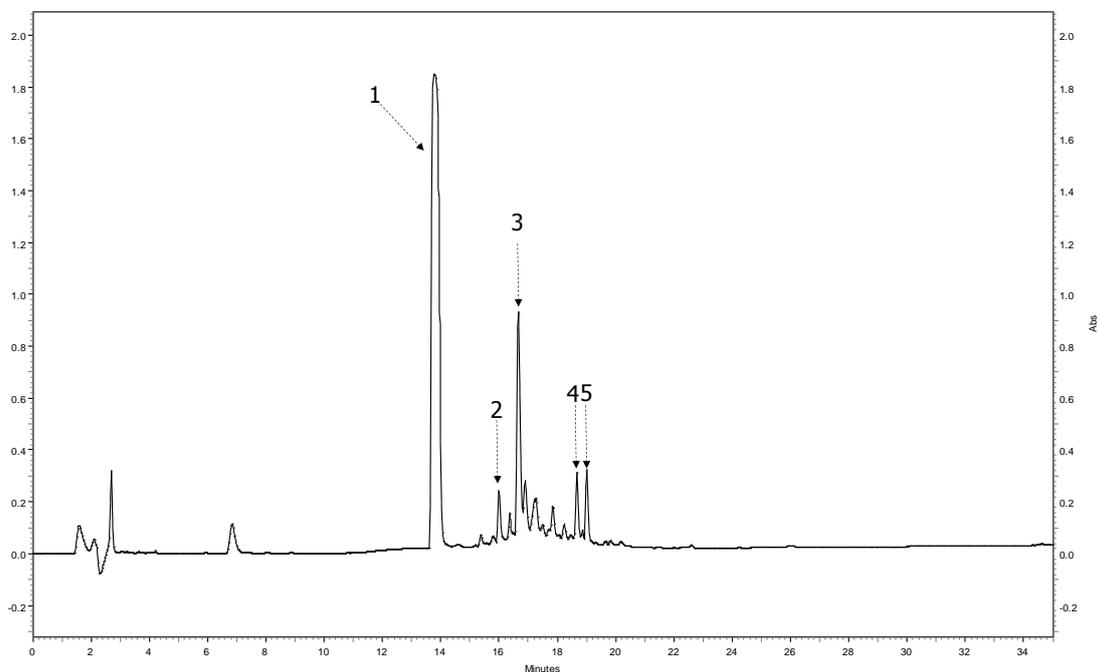


Figura 104 - Cromatograma analítico da fração 5 de H.G. Linha preta corresponde ao comprimento de onda em 216 nm. As setas indicam quais frações foram coletadas manualmente.

Porém apenas a subfração 3 apresentou espectro de MS² adequado para ser sequenciado, sendo possível confirmar as séries b e y.

No espectro de massas da fração 3-5 foi observado o íon majoritário de m/z 1.444,9 u (Figura 105), com alta intensidade de sinal (1.2×10^5), sendo este em seguida submetido à fragmentação (Figura 106).

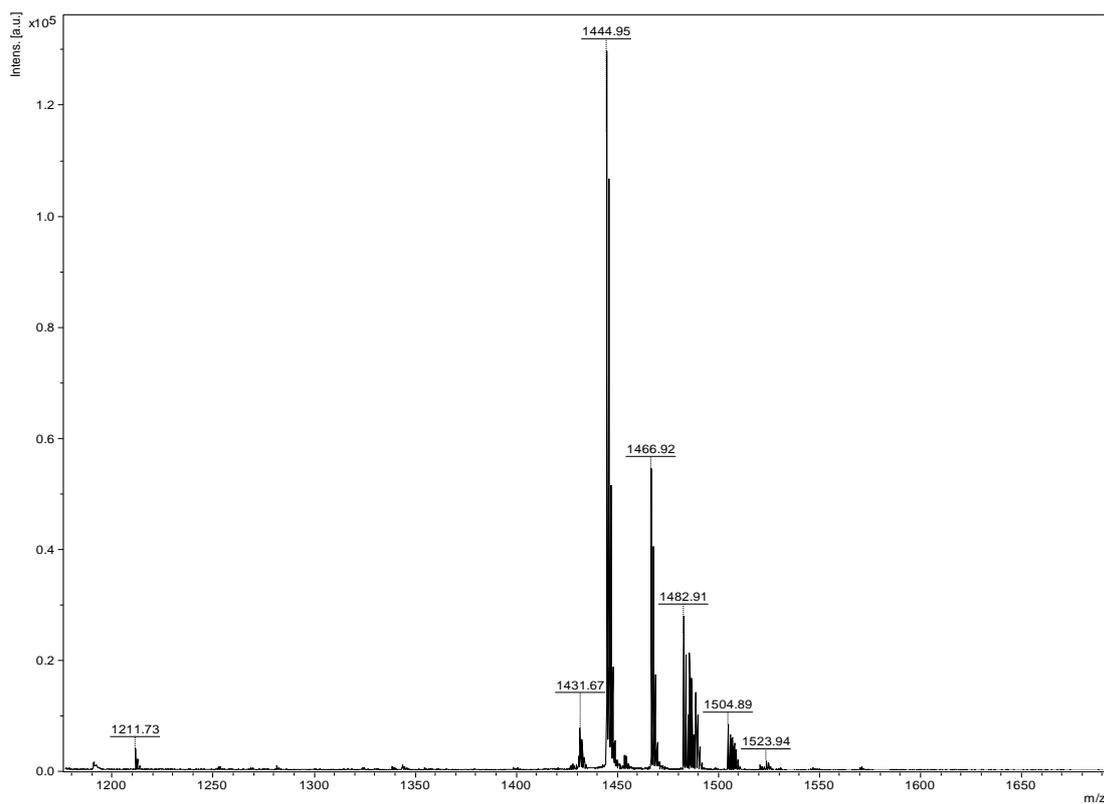


Figura 105 - Espectro de Massa da fração 3-5 de H.G.

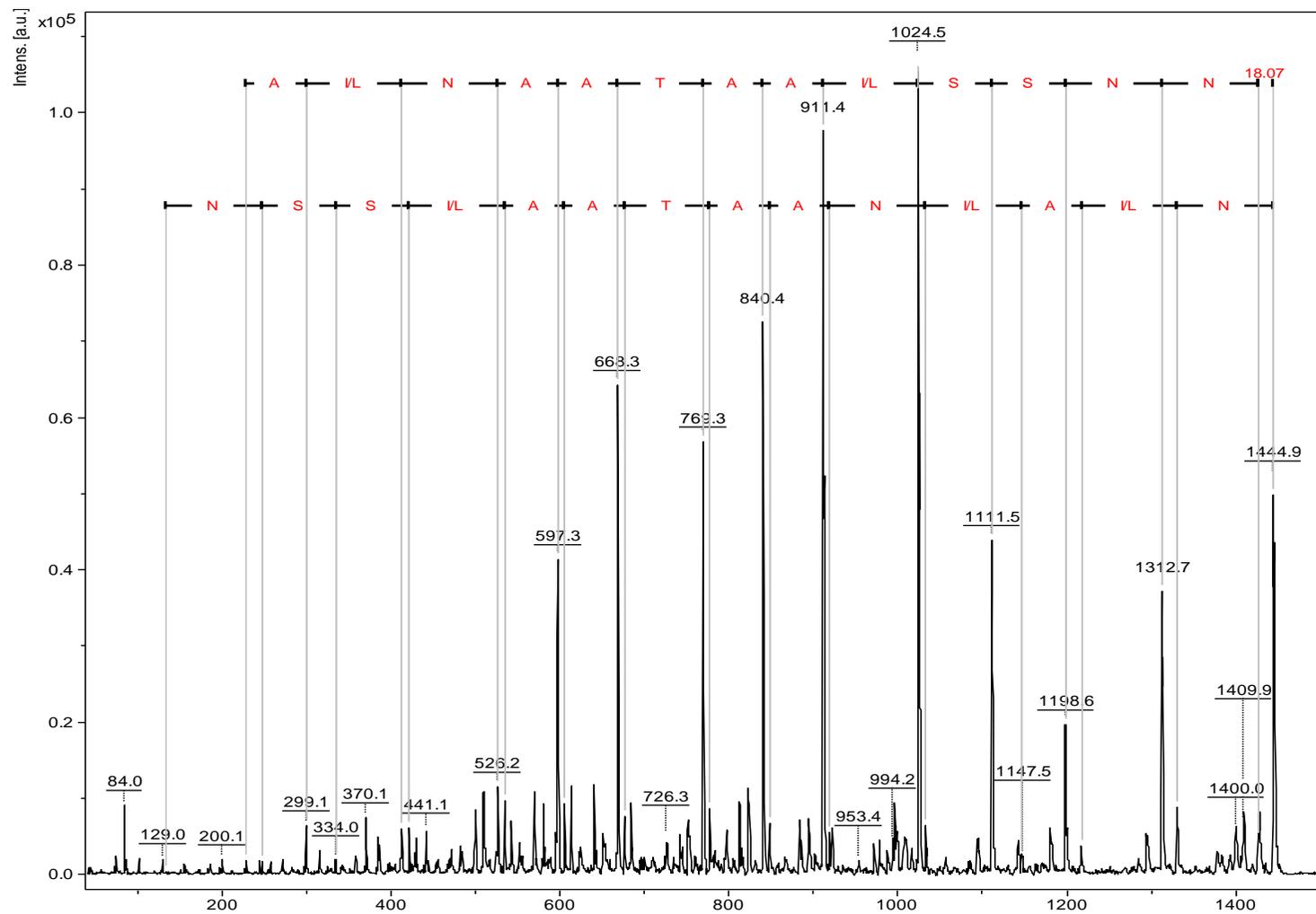


Figura 106 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 1.449,9 u.

Na sequência proposta a porção C-terminal é indicada pelo resíduo N (Asparagina) na parte superior da figura no canto direito, e a porção N-terminal também é indicada pelo resíduo N.

O peptídeo da fração 3-5 com 15 resíduos de aminoácidos e sequência proposta **NI/LAI/LNAATAAI/LSSNN** com C-terminal carboxilado foi submetida à ferramenta de bioinformática BLASTp usando a base de dados UniProtKB/Swiss-Prot. Apesar que os resíduos isoméricos L/I não terem sido diferenciados por espectrometria de massas. O peptídeo apresentou 80,00% de identidade com peptídeo **brevinin-2JD** identificado na secreção cutânea da espécie *Odorrana jingdongensis*, que possui atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* e fraca atividade hemolítica. (LIU et al., 2012). Sendo esta espécie pertence à família Ranidae diferente da espécie em estudo (Hylidae).

A sequência proposta foi submetida a ferramenta SOPMA para avaliar a possível conformação de sua estrutura secundária. Sendo que o peptídeo apresenta uma possível estrutura secundária não definida em apenas um estado: 100,00% em espiral aleatória (Cc) o caracteriza uma estrutura secundária desordenada (Figura 107).

```

SOPM :
Alpha helix (Hh) : 0 is 0.00%
310 helix (Gg) : 0 is 0.00%
Pi helix (Ii) : 0 is 0.00%
Beta bridge (Bb) : 0 is 0.00%
Extended strand (Ee) : 0 is 0.00%
Beta turn (Tt) : 0 is 0.00%
Bend region (Ss) : 0 is 0.00%
Random coil (Cc) : 15 is 100.00%
Ambiguous states (?) : 0 is 0.00%
Other states : 0 is 0.00%

```

10
|
NLALNAATAALSSNN
CCCCCCCCCCCCCCCC

Sequence length : 15

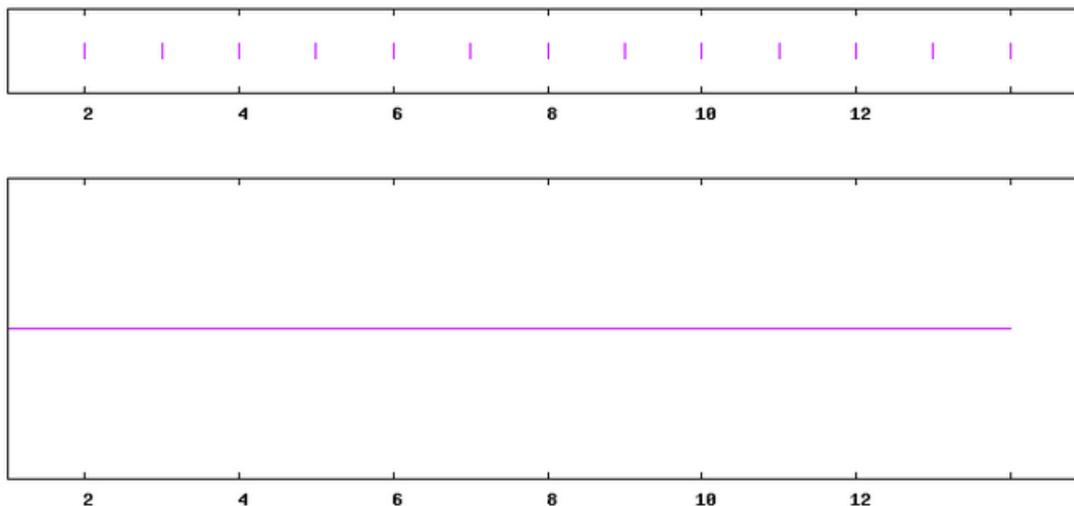


Figura 107 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 3-5 de H.G. Linha contínua em rosa indica conformação de 100.00% em espiral aleatória.

Sendo que o peptídeo apresenta uma estrutura aleatória não foi usado o método computacional de Schiffer-Edmundson para projeção bidimensional e nem a ferramenta I-TASSER para avaliar a estrutura 3D. Mas não é descartado seu potencial biológico já que o peptídeo pode ter sido sequenciado na forma truncada, mas essa afirmação só poderá ser confirmada através do sequenciamento genético.

5.5.2 Identificação dos peptídeos da fração 6 de *H. geographicus*.

A fração 6 após purificação em sistema analítico resultou em 6 subfrações (Figura 108).

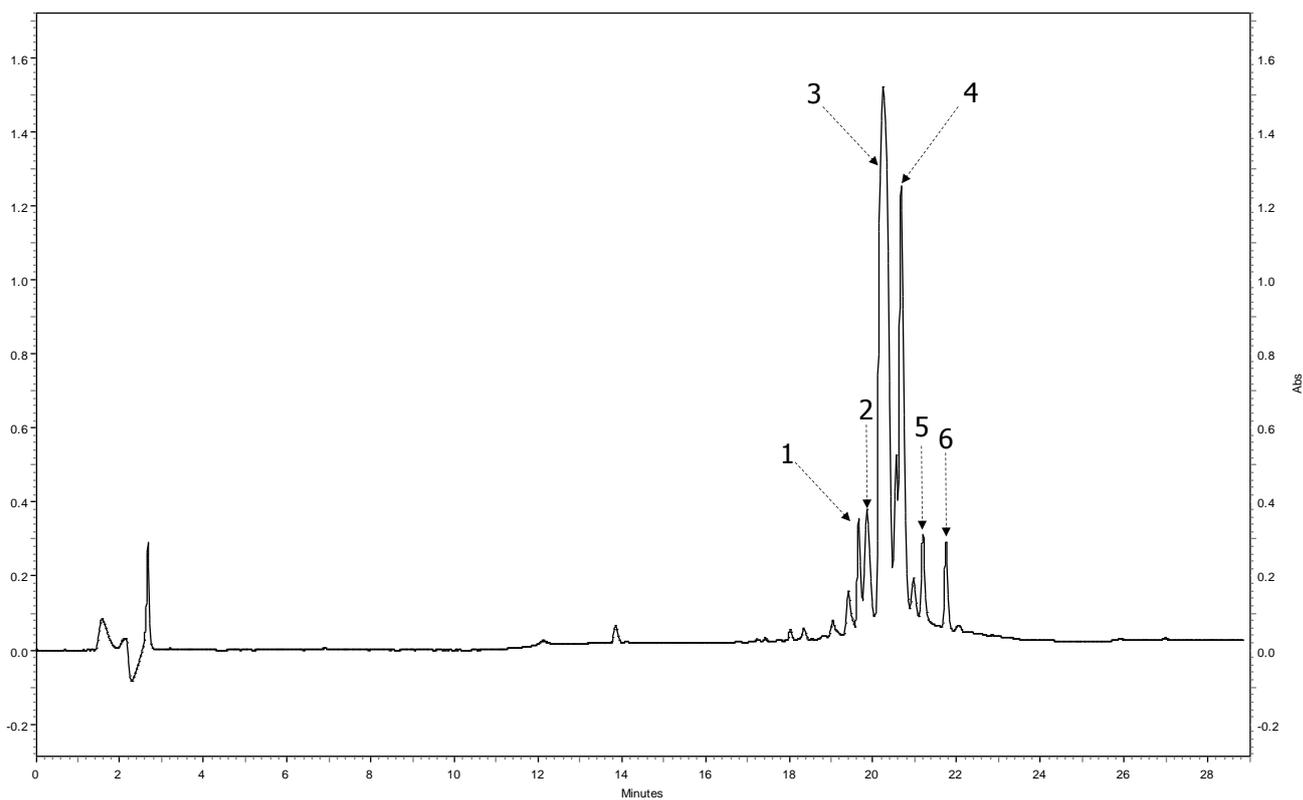


Figura 108 - Cromatograma analítico da fração 6 de H.G.

Linha preta corresponde ao comprimento de onda em 216 nm. As setas indicam quais frações foram coletadas manualmente.

Sendo que apenas as subfrações 5 e 6 apresentaram espectros de MS² adequados para serem sequenciados, sendo possível confirmar as séries b e y.

5.5.2.1 Identificação do peptídeo da fração 5-6 de *H. geographicus*.

No espectro de massas da fração 5-6 foi observado o íon majoritário de m/z 1.860,9 u (Figura 108) com uma alta intensidade de sinal (2.5×10^5), sendo este em seguida submetido à fragmentação (Figura 109).

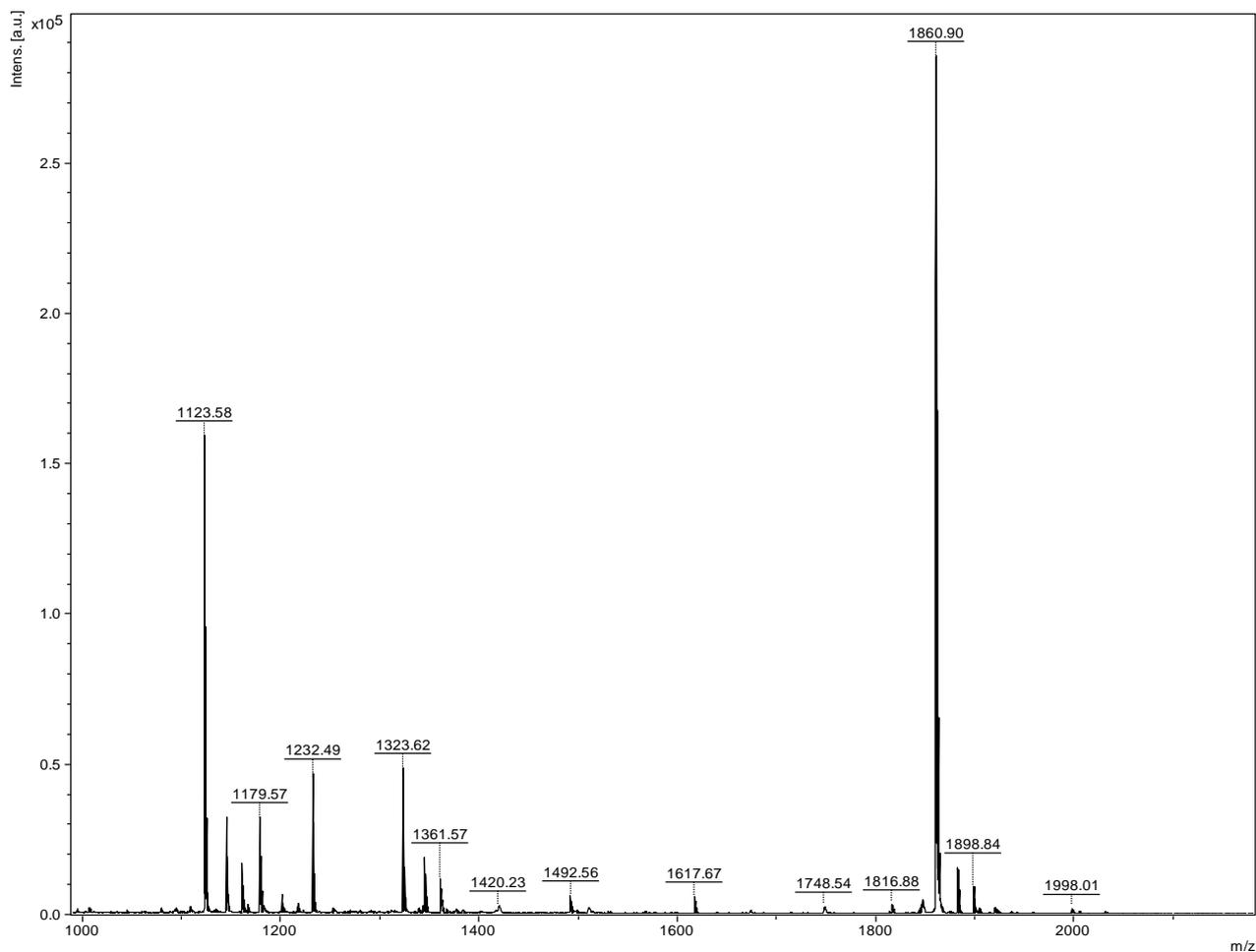


Figura 109 - Espectro de Massa da fração 5-6 de H.G.

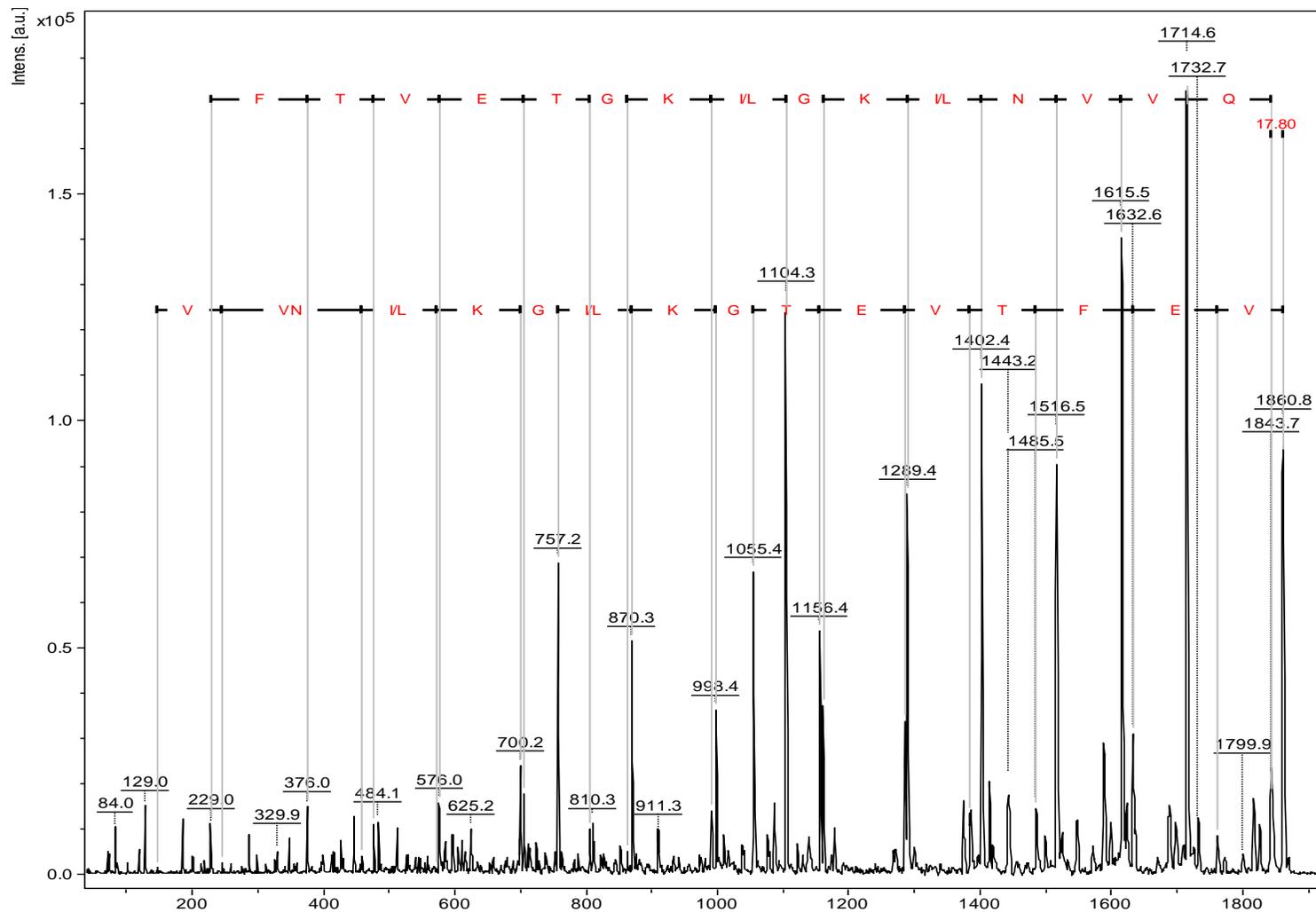


Figura 110 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 1.860,9 u.

Na sequência proposta a porção C-terminal é indicada pelo resíduo Q (glutamina) na parte superior da figura no canto direito, e a porção N-terminal é indicada pelo resíduo V (valina) um pouco abaixo de Q.

O peptídeo da fração 5-6 com 17 resíduos de aminoácidos e sequência proposta **VEFTVETGKI/LGKI/LNVVQ** com C-terminal carboxilado foi submetida à ferramenta de bioinformática BLASTp, apresentando 88,00% de identidade com a região 30 a 46 da proteína **bombesina** identificado no gene da espécie *Rana catesbeiana* (dados não publicados). Sendo esta espécie pertence à família Ranidae diferente da espécie em estudo (Hylidae).

A sequência proposta foi submetida a ferramenta de bioinformática SOPMA, sendo que o peptídeo apresenta uma possível estrutura secundária em 3 estados: conformação de 70,59% em forma de cadeia estendida (Ee) do primeiro ao sexto resíduo e décimo segundo ao decimo sétimo resíduo, 11,76% em ângulo β (Tt) do sétimo ao oitavo resíduo e 17,65% em espiral aleatória (Cc) no nono, décimo e décimo terceiro resíduo (Figura 111).

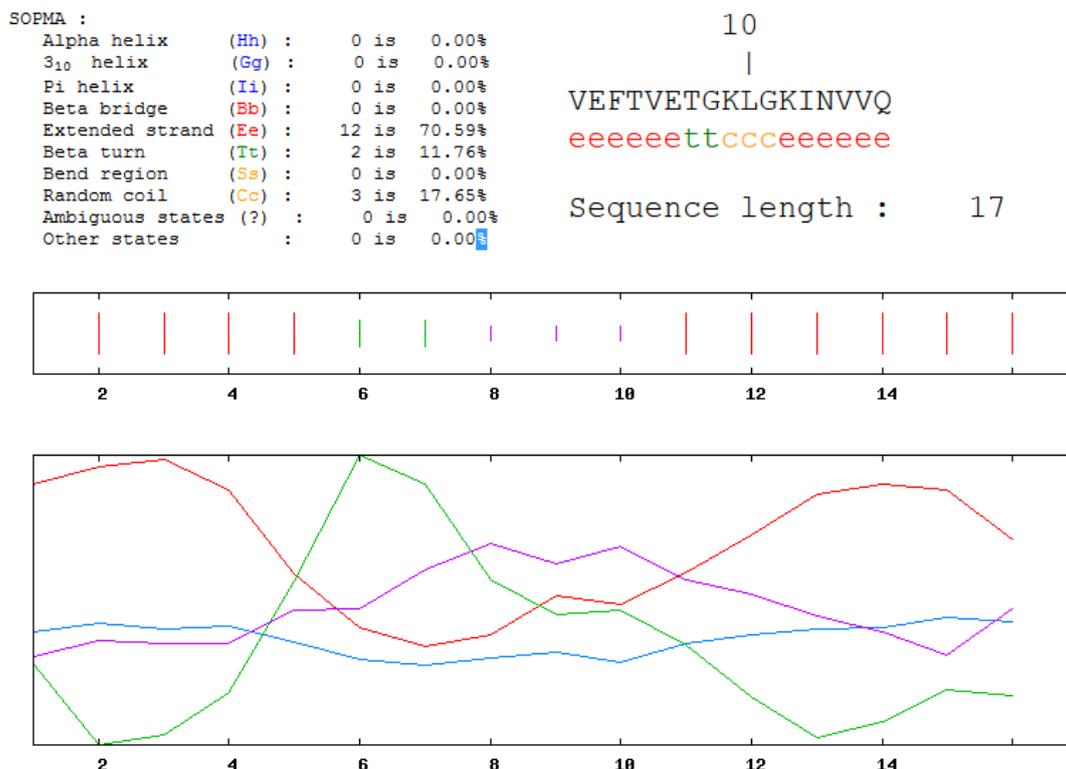


Figura 111 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 5-6 de H.G. Linha em azul indica a conformação em α -hélice, vermelha indica conformação em cadeia estendida, verde em ângulo β e rosa em conformação de espiral aleatória.

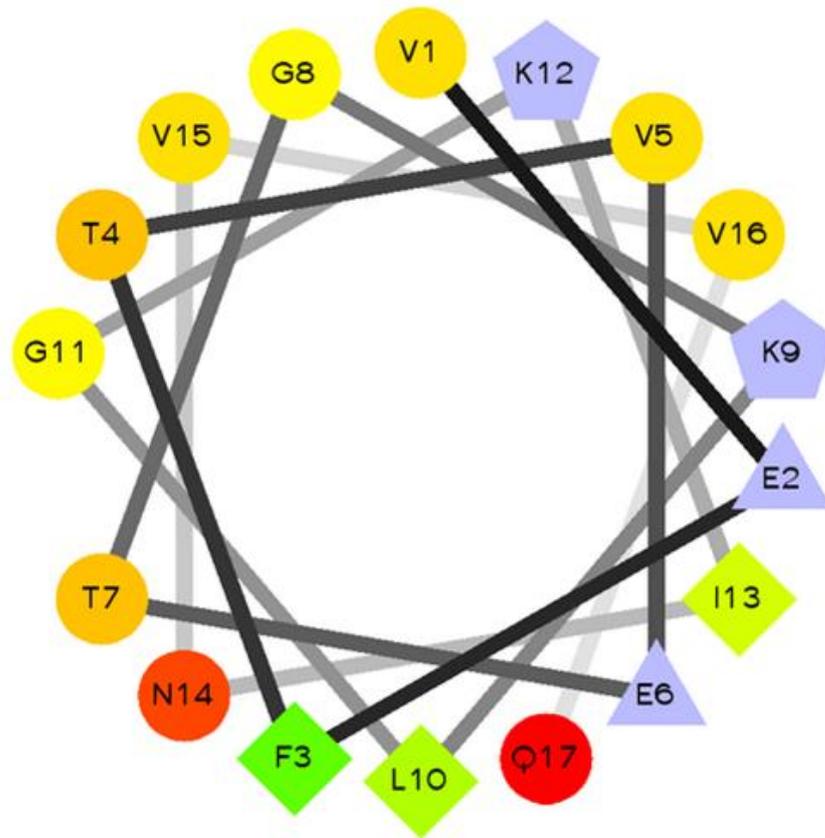


Figura 112 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 5-6 de H.G. Resíduos hidrofóbicos em forma de diamante que variam da cor verde ao verde claro, resíduos hidrofílicos em forma de círculo em vermelho intenso ao amarelo, resíduos potencialmente positivos em forma de pentágono e os potencialmente negativos em forma de triângulo sendo esses últimos na cor lilás.

Através da projeção de Schiffer-Edmundson, (Figura 112) pode-se observar que o peptídeo é constituído em sua maioria de resíduos hidrofílicos, esses resíduos estão organizados em praticamente em todas as faces do peptídeo com exceção de uma pequena região que está concentrada um resíduo hidrofóbico, dois potencialmente negativos e um potencialmente positivo.

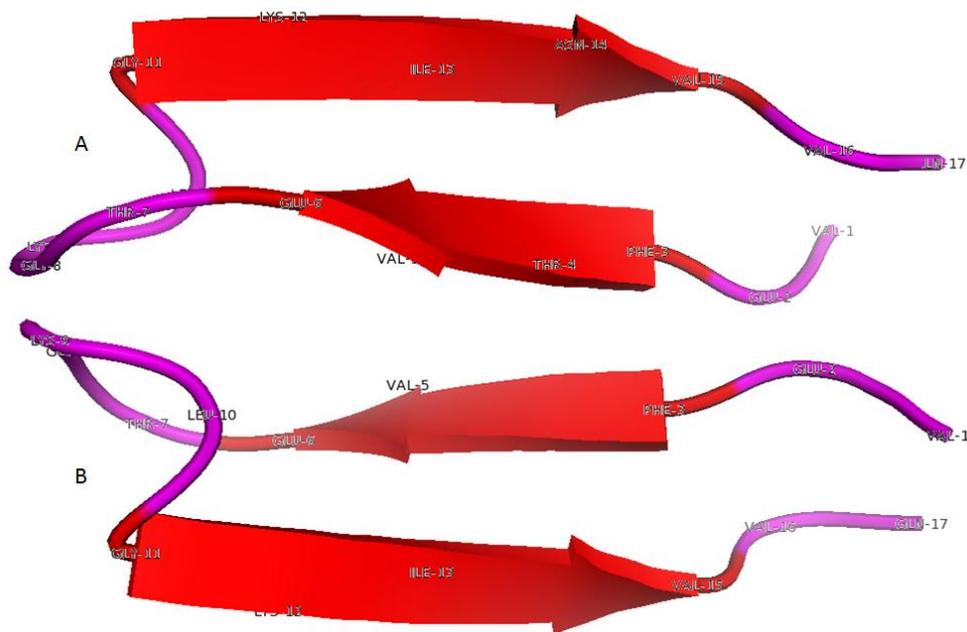


Figura 113 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 5-6 de H.G. Parte A da figura é mostrada uma face do peptídeo e na parte B é mostrada a face oposta.

Através da conformação em 3D pôde confirmar que o peptídeo não adota conformação em α -hélice, mas sim conformação com dois estados principais, duas regiões em forma de cadeia estendida e três regiões aleatórias.

As duas regiões estendidas vão do resíduo fenilalanina (PHE) na posição 3 ao resíduo de ácido glutâmico (GLU) na posição 6 e do resíduo glicina (GLY) na posição 11 ao resíduo valina (VAL) na posição 15.

As três regiões aleatórias estão dispostas nos dois primeiros resíduos (VAL e GLU), nos dois últimos (VAL e GLN) e uma região interna que vai do resíduo de treonina (THR) na posição 7 ao resíduo de leucina (LEU) na posição 10.

5.5.2.2 Identificação dos peptídeos da fração 6-6 de *H. geographicus*.

No espectro de massas da fração 6-6 foram observados os íons majoritários de m/z 1.250,8 u, 1.394,9 u e 1.731,0 u (Figura 114) sendo estes em seguida submetidos à fragmentação. Porém apenas o peptídeo com m/z 1.731,0 u obteve sequência primária comparável com sequências depositadas em banco de dados (Figura 115).

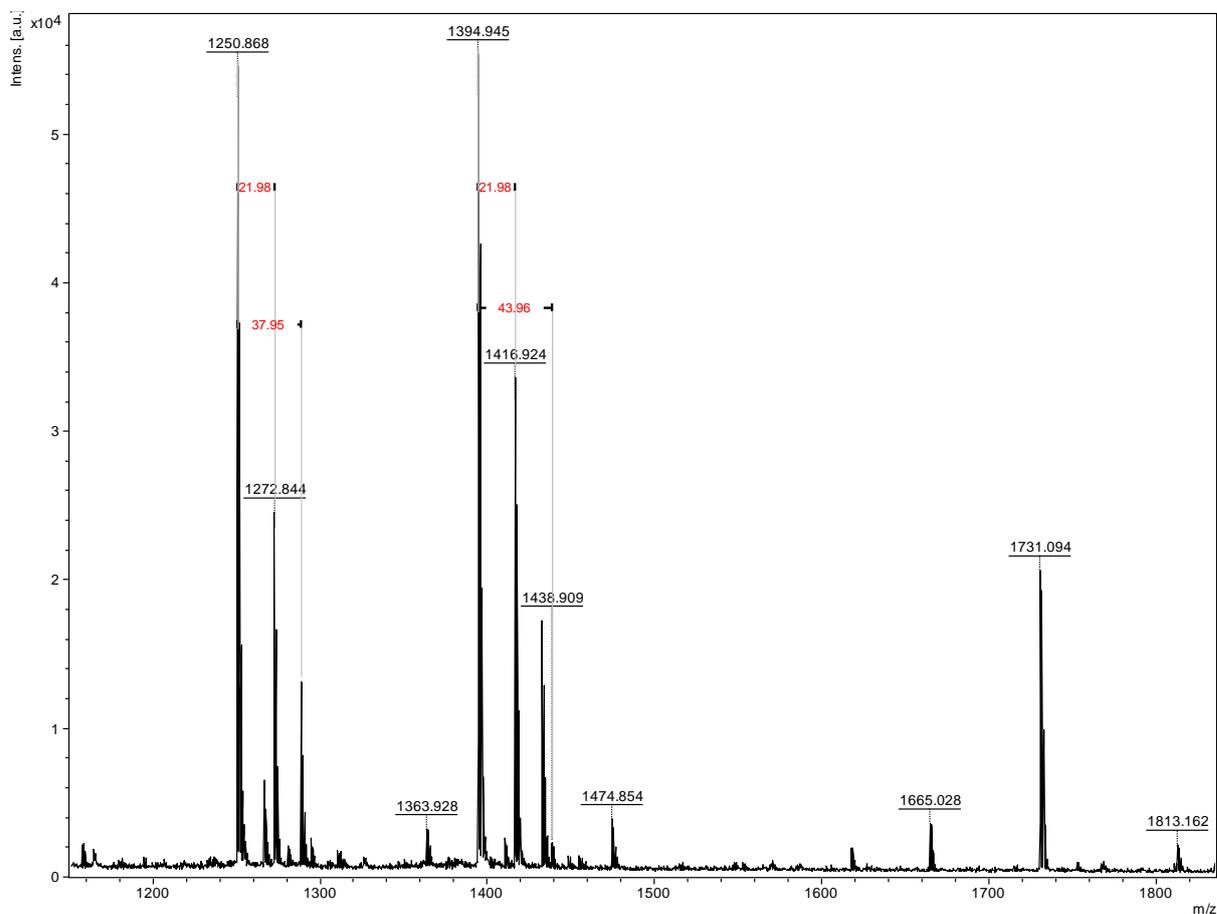


Figura 114 - Espectro de Massas da fração 6-6 de H.G.

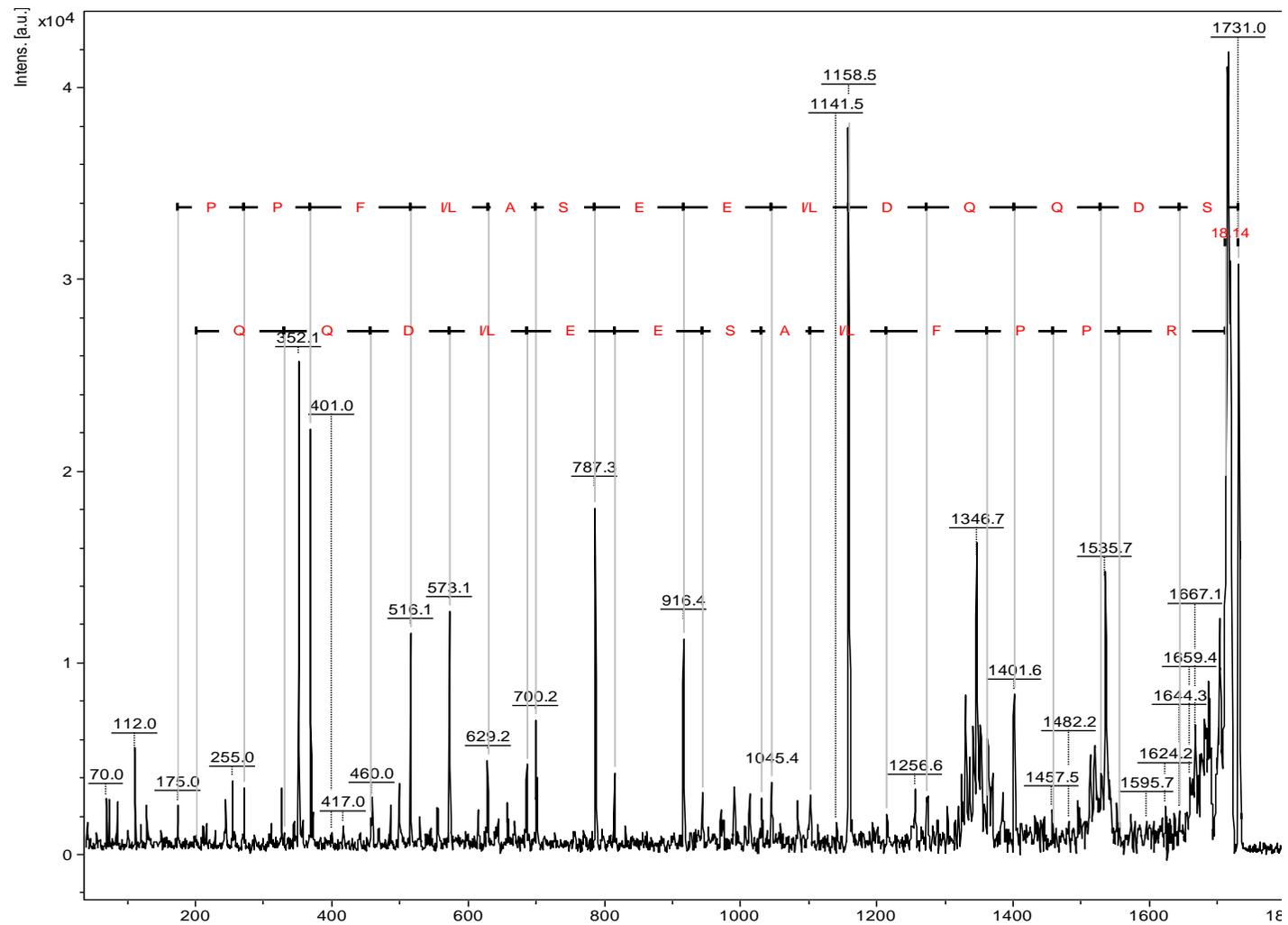


Figura 115 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 1.731,0 u.

Na sequência proposta a porção C-terminal é indicada pelo resíduo R (arginina) na parte superior da figura no canto direito e a porção N-terminal é indicada pelo resíduo S (serina) um pouco acima de R.

O peptídeo da fração 6-6 com 15 resíduos e sequência proposta **SDQQDI/LEESAI/LFPPR** com C-terminal carboxilado foi submetida à ferramenta de bioinformática BLASTp, obtendo 77% de identidade com peptídeo **bombesina** identificado no gene da espécie *Rana catesbeiana* (dados não publicados). Sendo esta espécie pertence à família Ranidae diferente da espécie em estudo (Hylidae).

A sequência proposta foi submetida a ferramenta de bioinformática SOPMA para avaliar o alinhamento e a possível conformação de sua estrutura secundária. Sendo que o peptídeo apresenta 100.00% de conformação de espiral aleatória (Cc), ou seja, não possui estrutura definida (Figura 116).

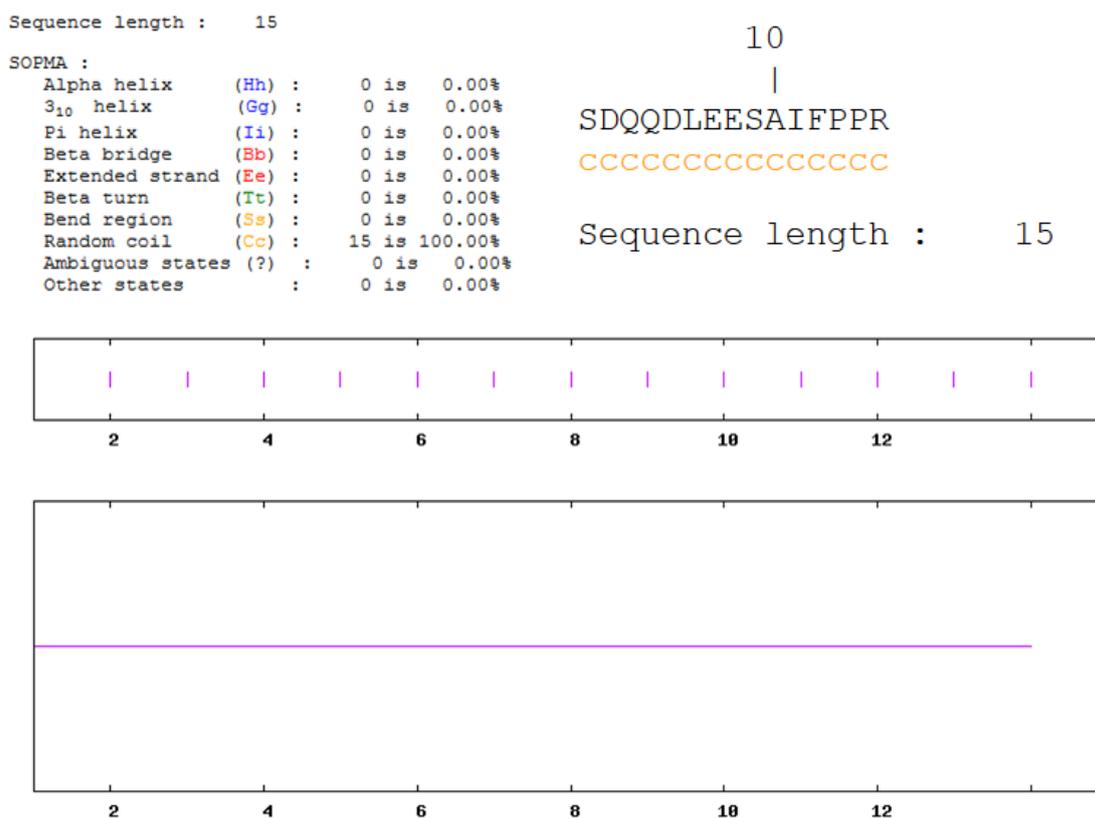


Figura 116 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 6-6 de H.G. Linha contínua em rosa indica conformação de 100.00% em espiral aleatória.

Como o peptídeo apresenta uma estrutura aleatória não foram usados os métodos computacionais de Schiffer-Edmundson e I-TASSER.

5.5.3 Identificação dos peptídeos da fração 7 de *H. geographicus*.

A fração 7 após purificação em sistema analítico resultou em 2 subfrações (Figura 117).

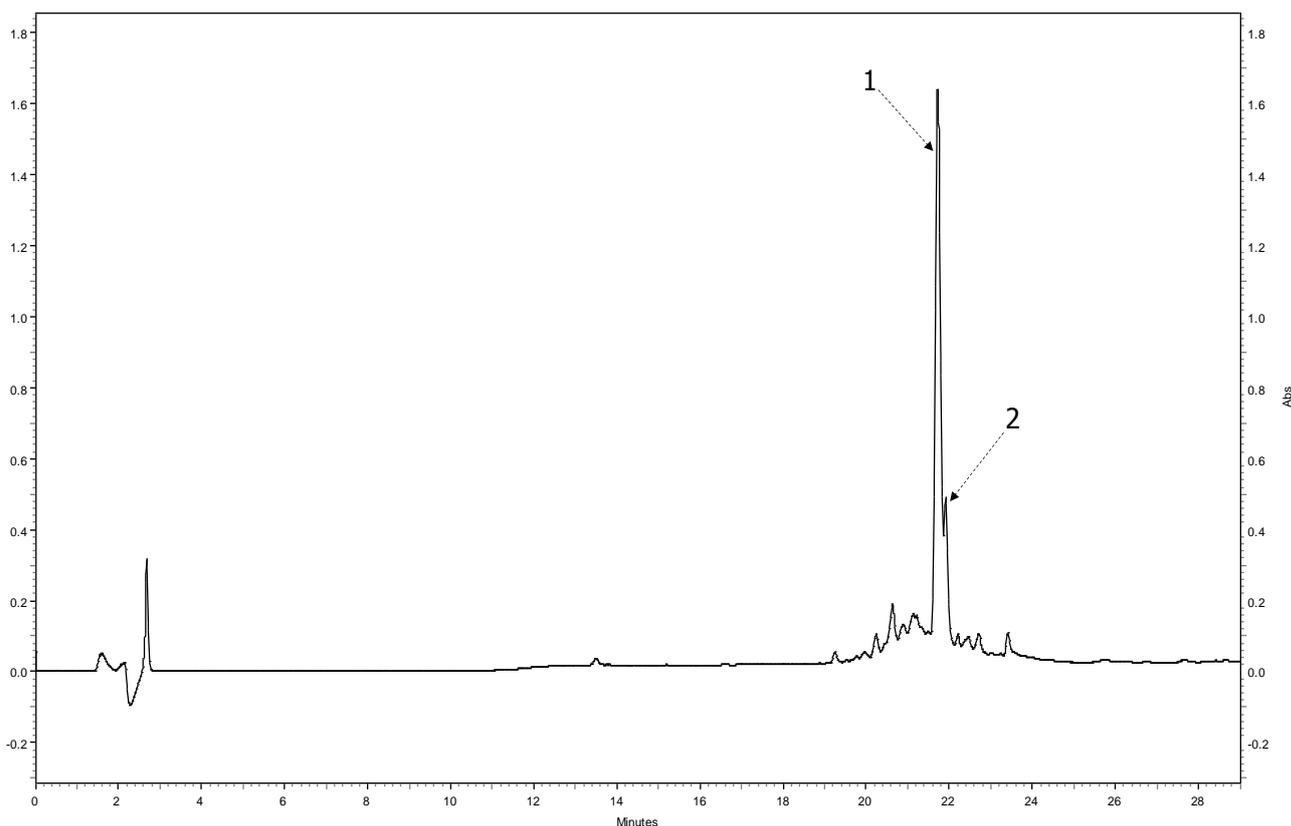


Figura 117 - Cromatograma analítico da fração 7 de H.G.

Linha preta corresponde ao comprimento de onda em 216 nm. As setas indicam quais frações foram coletadas manualmente.

Porém apenas a subfração 1 apresentou espectro de MS^2 adequado para ser sequenciado, sendo possível confirmar as séries b e y.

No espectro de massas da fração 1-7 foi observado o íon majoritário de m/z 2.594,4 u (Figura 118) com alta intensidade de sinal (2.5×10^5), sendo este em seguida submetido à fragmentação (Figura 119).

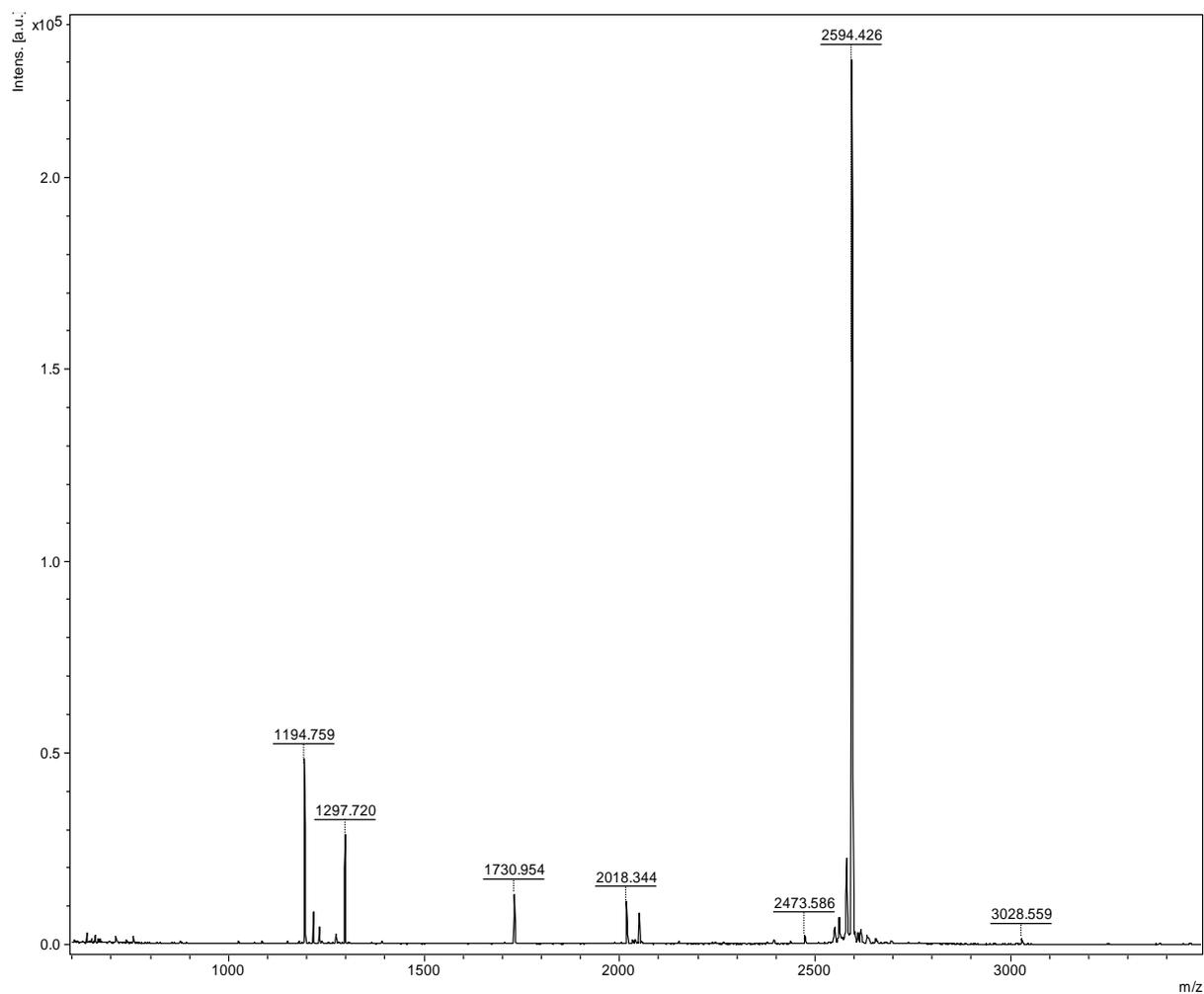


Figura 118 - Espectro de Massas da fração 1-7 de H.G.

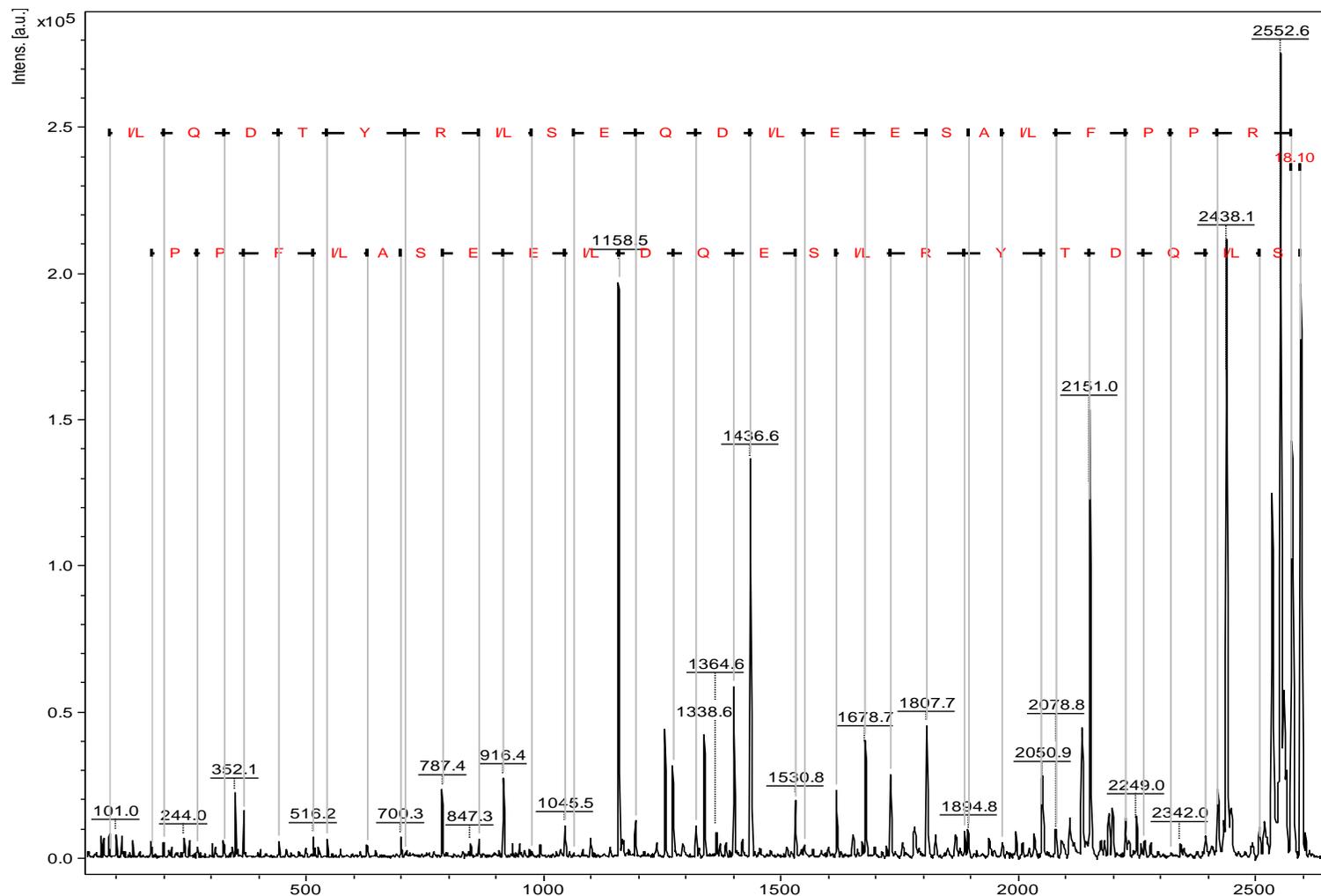


Figura 119 - Sequência obtida da fragmentação do íon de m/z 2.594,4 u.

Na sequência proposta a porção C-terminal é indicada pelo resíduo R (arginina) na parte superior da figura no canto direito, e a porção N-terminal é indicada pelo resíduo S (serina) um pouco abaixo de S.

O peptídeo da fração 1-7 com 22 resíduos e sequência proposta **SI/LQDTYRI/LSEQDI/LEESAI/LFPPR** carboxilado, foi submetida à ferramenta de bioinformática BLASTp usando a base de dados UniProtKB/Swiss-Prot. Apesar que os resíduos isoméricos L/I não terem sido diferenciados por espectrometria de massas. O peptídeo apresentou 77.00% de identidade com o peptídeo **bombesina** identificado no gene da espécie *Rana catesbeiana* (dados não publicados).

De acordo com SOPMA o peptídeo apresenta uma possível estrutura secundária em 3 estados: conformação de 72.73% em forma de α -hélice (Hh) do primeiro ao sétimo resíduo e décimo ao décimo oitavo resíduo, 22.73% em espiral aleatória (Cc) no oitavo, nono e do décimo nono ao vigésimo primeiro resíduo e 4.55% em ângulo β (Tt) no último resíduo (Figura 120).

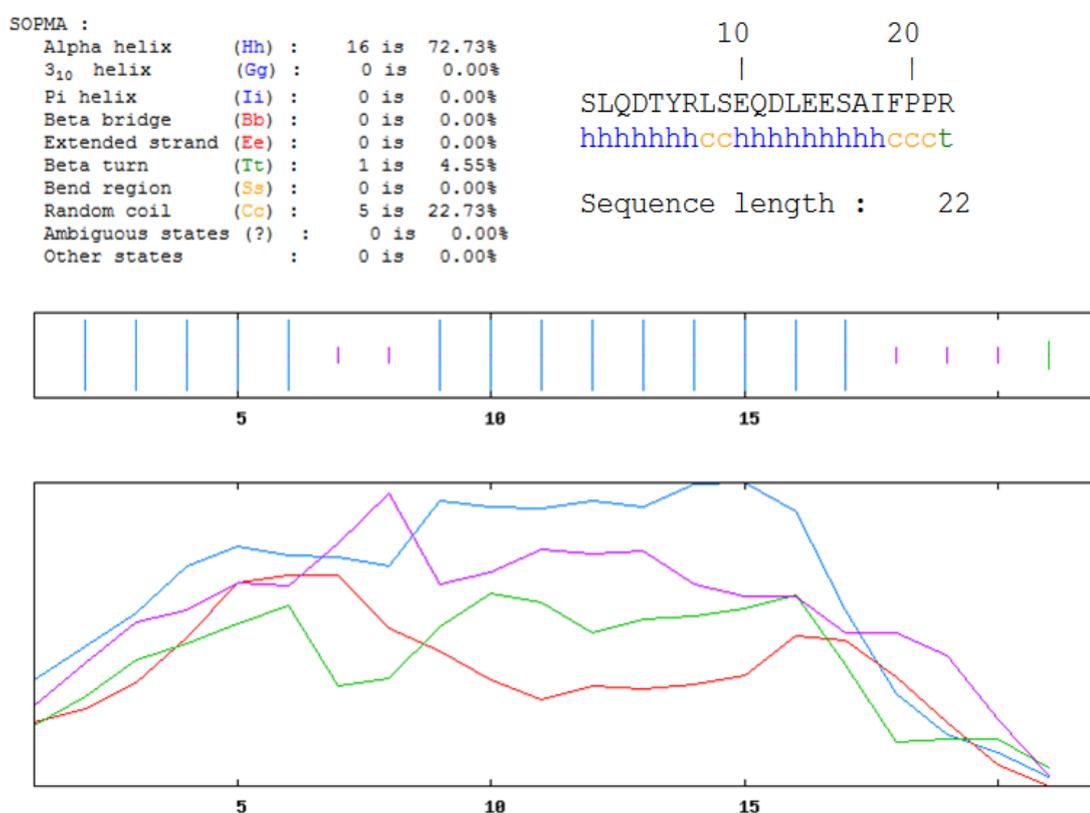


Figura 120 - Predição da estrutura secundária do peptídeo da fração 1-7 de H.G. Linha em azul indica a conformação em α -hélice, vermelha indica conformação em cadeia estendida, verde em ângulo β e rosa em conformação de espiral aleatória.

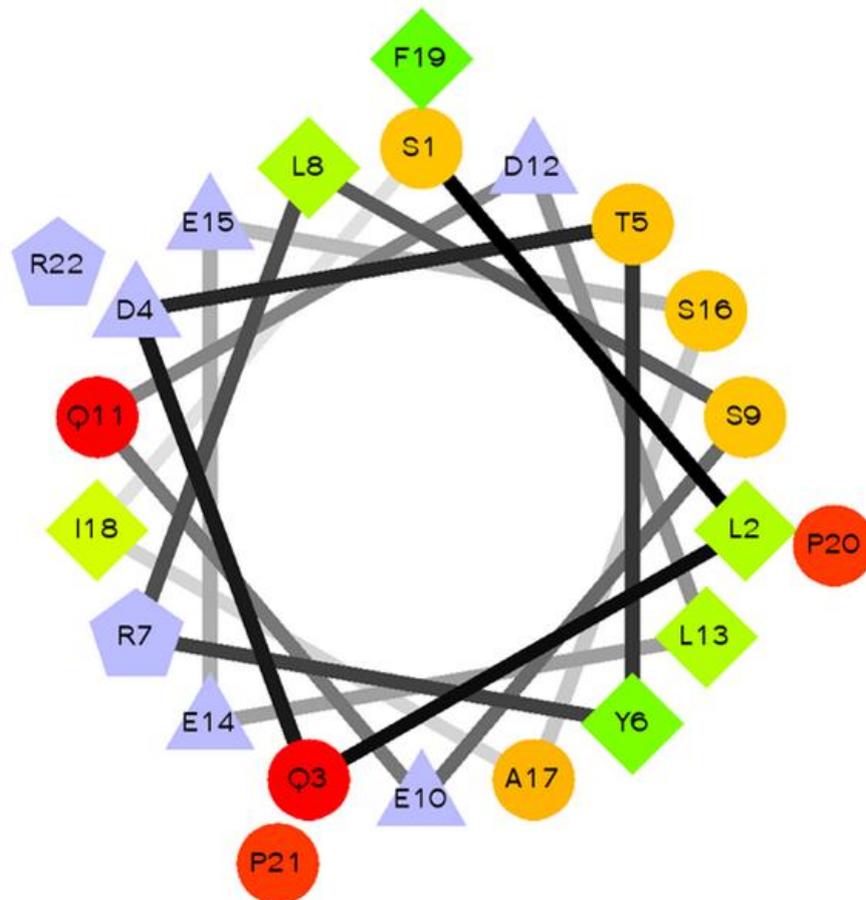


Figura 121 - Projeção Schiffer-Edmundson do peptídeo da fração 1-7 de H.G. Resíduos hidrofóbicos em forma de diamante que variam da cor verde ao verde claro, resíduos hidrofílicos em forma de círculo em vermelho intenso ao amarelo, resíduos potencialmente positivos em forma de pentágono e os potencialmente negativos em forma de triângulo sendo esses últimos na cor lilás.

Através da projeção de Schiffer-Edmundson, (Figura 121) pode-se observar que o peptídeo é constituído em sua maioria de resíduos hidrofílicos esses resíduos estão distribuídos em toda as faces do peptídeo, os resíduos hidrofóbicos também estão distribuídos por toda estrutura helicoidal. Os quatro resíduos potencialmente negativos juntamente com dois resíduos potencialmente positivos estão agrupados em uma face do peptídeo.

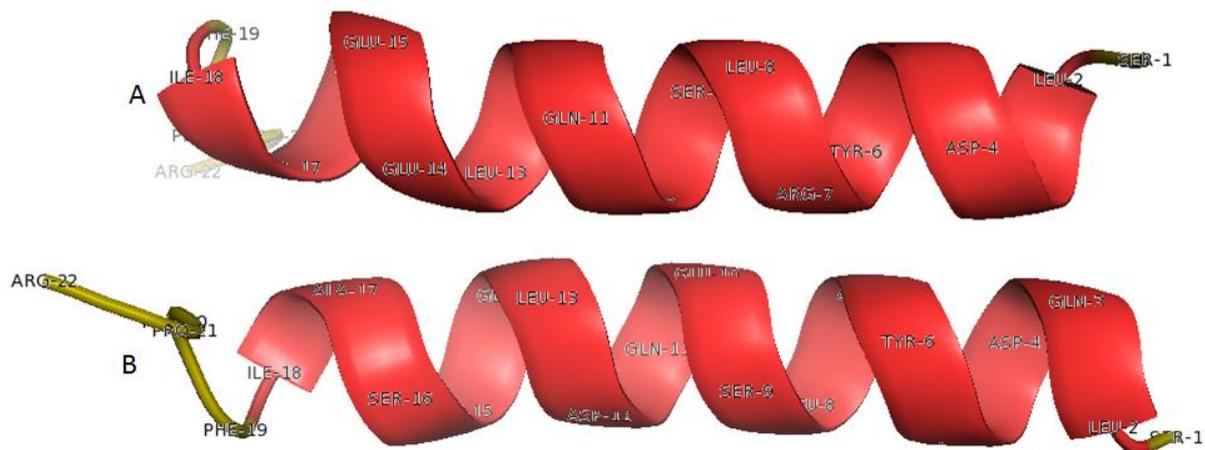


Figura 122 - Conformação em 3D do peptídeo da fração 1-7 de H.G.
 Parte A da figura é mostrada uma face do peptídeo e na parte B é mostrada a face oposta

Os resultados obtidos ao analisar a estrutura tridimensional do peptídeo corroboram com os descritos anteriormente. Onde o peptídeo adota conformação em α -hélice com uma região aleatória nos últimos cinco resíduos da cadeia peptídica.

Na parte A da figura 109 fica evidenciada uma face aniônica devida a dois resíduos de ácido glutâmico (14 e 15) e um resíduo de ácido aspártico (4). Na mesma face existe dois resíduos hidrofóbicos isoleucina (ILE) e leucina (LEU) nas posições 18 e 8 respectivamente e um resíduo de glutamina (GLN) na posição 11. Ocasionalmente uma face aniônica e anfipática.

Na parte B também fica evidenciada uma face anfipática já que existe três resíduos hidrofóbicos que são tirosina (TYR) na posição 6 e leucina (LEU) nas posições 2 e 13. Existe quatro resíduos hidrofílicos que são serina (SER) nas posições 16 e 9, alanina (ALA) na posição 17 e glutamina (GLN) na posição 3.

Essa organização estrutural acaba ocasionando um caráter pouco anfipático e aniônico. O que indica um potencial não antimicrobiano, mas sabe-se que as bombesinas até agora identificadas possuem atividade neurotóxica e possuem a capacidade de inibir o crescimento de células tumorais.

As sequências peptídicas propostas juntamente com sequências depositados em banco de dados foram alinhadas pela ferramenta de bioinformática CLUSTALW para avaliar o grau de identidade, sendo estas organizadas em 2 grupos apresentados nas tabelas 16 e 17.

Tabela 16 – Grupo da brevinina.

Fração	Sequências	Massa (u)
brevinin-2JD	GLLDTFK NLALNAAKS AGVSVLNSLSCKLSKTC	3.364,8
3-5	----- NLALNAATA ALS S NN-----	1.444,9

Resíduos em vermelho indicam a região conservada das sequências.

Tabela 17 - Grupo das bombesinas.

Fração	Sequências	Massa (u)
bombesina 62-83	SLQDTYRLGQ QDMEEAD IFPPR	2.608,2
1-7	SLQDTYRLSE QD LEESAIFPPR	2.594,4
6-6	-- S D----- QDLEESAIFPPR	1.731,0
bombesina 30-46	VEFTEETGKLGKINVLQ	1.904,0
5-6	VEFTVETGKLGKINVVQ	1.860,9

Resíduos em vermelho indicam a região conservada das sequências.

Ao analisar as sequências peptídicas obtidas do ETHG, foi possível identificar uma possível forma truncada de um peptídeo com identidade significativa com brevinin-2JD. Além de três novos peptídeos, sendo esses homólogos a partes diferentes da proteína bombesina, o que pode significar que a espécie *H. geographicus* expressa uma proteína homologa a bombesina, a após a secreção a proteína é clivada naturalmente em pequenos peptídeos. Mas essas premissas só poderão ser confirmadas após sequenciamento genético por c-DNA, e síntese para avaliar o potencial biológico.

5.6. Síntese peptídica em fase sólida.

Após confirmação da sequência peptídica obtida por meio da análise dos peptídeos codificados pelo gene da espécie, o peptídeo identificado na fração 2-20 foi escolhido GVLDAIKAIKAAGKAALQAAGEHI-NH₂ para ser sintetizado sendo nomeado cinerascetina (C-01).

A síntese completa do peptídeo durou aproximadamente 55 horas, após o termino da síntese, e clivagem entre o peptídeo e a resina que ocorreu concomitantemente com a desproteção das cadeias laterais, obteve-se aproximadamente 40 mg de peptídeo sintético bruto. O peptídeo sintético foi submetido à técnica de espectrometria de massa no modo MS e MS-MS para confirmação da síntese (figura 123 e 124).

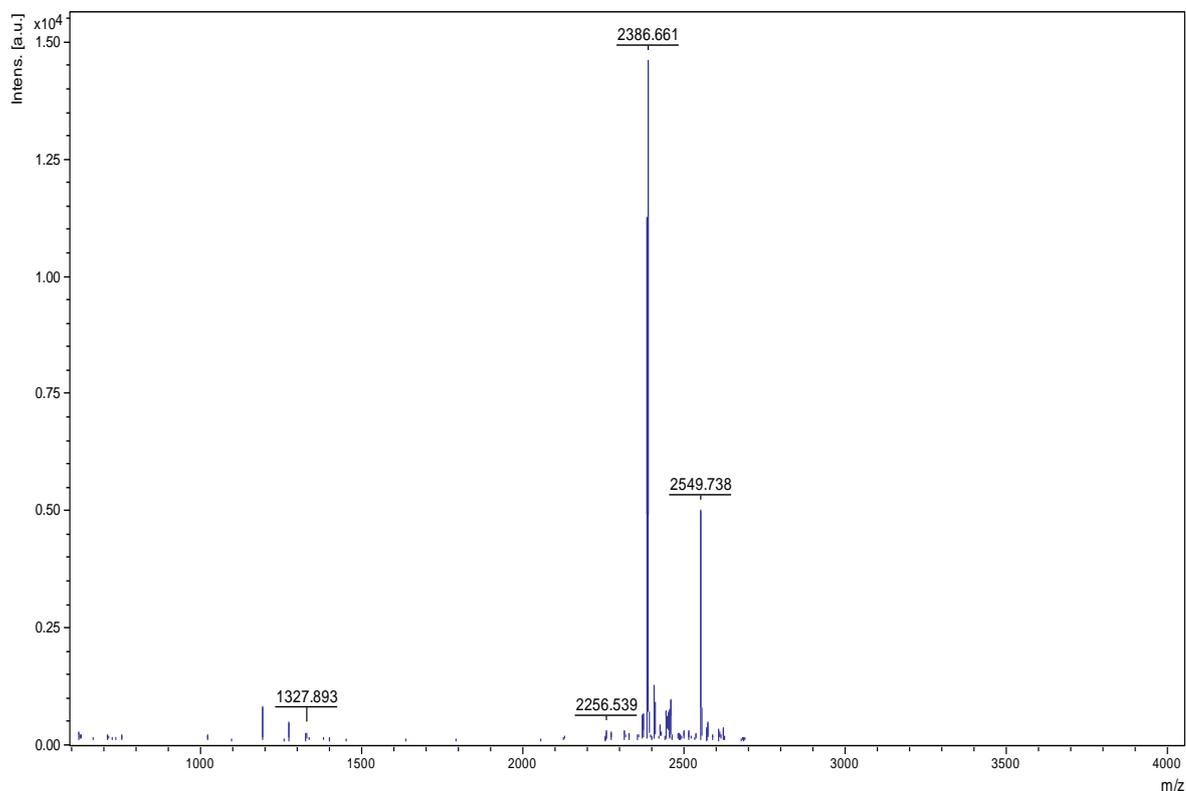


Figura 123 - Espectro de massa cinerascetina sintético.

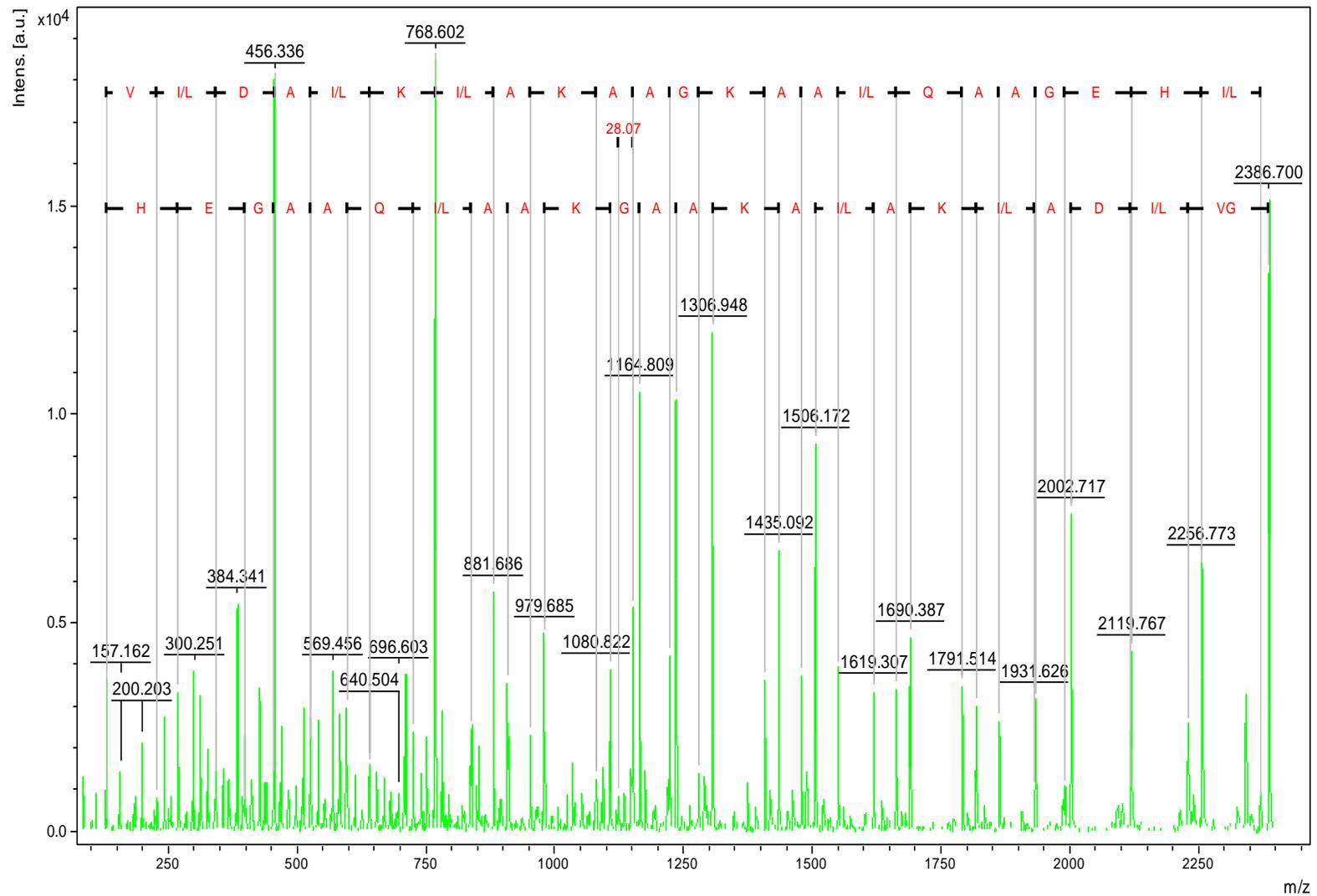


Figura 124 - Sequência de cinerasetina sintético.

Após a confirmação da síntese por espectrometria de massa, foi realizada a purificação por cromatografia semipreparativa em fase reversa. A concentração de acetonitrila em que o peptídeo eluiu na secreção foi empregado como parâmetro para a construção do gradiente utilizado para purificação.

5.7. Ensaios de atividade antimicrobiana.

Na tabela 18 são mostrados os valores de CIM do peptídeo cinerascetina (C-01) contra a bactéria gram-negativa *Escherichia Coli* e bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*.

Também são mostrados os valores de inibição contra os fungos *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, e de uma bactéria filogenética *xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*.

Tabela 18 - Atividade antimicrobiana de C-01.

Cepas testadas	CIM / μM ,		
	C-01	DS01	Água
<i>Candida albicans</i>	10,00	7,64	n.d.
<i>Cryptococcus neoformans</i>	16,00	8,00	n.d.
<i>Escherichia coli</i>	16,00	1,00	n.d.
<i>Staphylococcus aureus</i>	10,00	8,00	n.d.
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	<4,00	n.d.	n.d.

CIM (μM): concentração inibitória mínima necessária para inibição total do crescimento da cepas em meio líquido. C-01: peptídeo sintético. DS01: controle positivo. Água: controle negativo. n.d.: não determinada.

O peptídeo sintético C-01 foi capaz de inibir o crescimento das cepas testadas tendo atividade inibitória em concentrações baixas contra bactérias (Gram negativas e positivas), fungos patogênicos e uma cepa filogenética. O que é incomum já que são raros os PAMs que possuem atividade de inibidores de crescimento para fungos e bactérias em baixas concentrações. Ao comparar o CIM de C-01 com os peptídeos antimicrobianos identificados em espécie do mesmo gênero relacionando as cepas testadas, verificou-se o grau de eficiência do peptídeo, pois foi o que obteve as menores concentrações. O real modo de ação do peptídeo C-01 não foi avaliado nesse trabalho, mas a características que devem ser levadas em consideração como ser catiônico fazendo com que o peptídeo interaja com a superfície negativa das membranas bacterianas, aminação que diminui a possibilidade de degradação por carboxipeptidases e ocasiona mudança no momento de dipolo, anfipaticidade e conformação em 76% em forma de α -hélice (resíduos 1-20 dos 25) (SOPMA prediction) que auxilia na inserção na membrana bacteriana, ocasionando a desestruturação seguida da quebra da mesma.

6. CONCLUSÕES



Até o momento já foi possível identificar 36 novos peptídeos da espécie *H. cinerascens* sendo 19 foram encontrados no gene, ou seja, possuem suas sequências peptídicas corretas. Esses peptídeos foram organizados em grupos de acordo com a similaridade de suas sequências, sendo que alguns deles apresentaram identidade significativa com peptídeos depositados em banco de dados.

Os outros 17 peptídeos sequenciados a partir da secreção cutânea também foram organizados em grupos de acordo com sua similaridade e tiveram suas sequências comparadas com as encontradas em banco de dados, sendo que 13 apresentaram identidade significativa com peptídeos antimicrobianos de anfíbios. Sendo que três desses obtiveram suas sequências confirmadas pela técnica de sequenciamento genético.

As quatro sequências que não apresentaram identidade com nenhum peptídeo depositado em banco de dados, mas não é descartado seu potencial biológico. Podendo caracterizar uma nova classe de peptídeos biologicamente ativos.

Dos três peptídeos de *H. cinerascens* que tiveram suas sequências confirmadas, um deles que foi escolhido para ser sintetizado e testado biologicamente. Tendo uma alta atividade de inibição do crescimento de bactérias patogênicas (gram-positiva e negativas), bactérias fitogênicas e fungos.

Já da espécie *H. geographicus* foi identificar apenas 4 novos peptídeos, que apresentaram identidade significativa com peptídeos biologicamente ativos de anfíbios.

Sendo que três deles apresentaram-se com homólogos a fragmentos da proteína bombesina, e um apresentou homólogo ao peptídeo brevinina.

Ao analisar os resultados obtidos no estudo da secreção cutânea das duas espécies, reforça a ideia que as espécies pertencentes a esse gênero são grandes promissoras de substâncias biologicamente ativas. Já que elas possuem peptídeos com identidade significativa a peptídeos encontrados na secreção de espécies pertencentes as

famílias Ranidae e Hylidae, sendo estas as principais famílias produtoras de peptídeos e proteínas biologicamente ativas.

7. REFERÊNCIAS



ABDEL-WAHAB, Y. H. A.; POWER, G. J.; FLATT, P. R.; WOODHAMS, D. C.; ROLLINS-SMITH, L. A.; CONLON, J. M. 2008. A peptide of the phylloseptin family from the skin of the frog *Hylomantis lemur* (Phyllomedusinae) with potent in vitro and in vivo insulin-releasing activity. *Peptides*, 29: 2136 – 2143.

AL-GHAFFERI, N.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N.; COQUET, L.; JOUENNE, T.; LEPRINCE, J.; VAUDRY, H.; KING, J. D.; CONLON, J. M. 2010. Antimicrobial peptides from the skin secretions of the South-East Asian frog *Hylarana erythraea* (Ranidae). *Peptides*, 31: 548 – 554.

AMPHIBIAN SPECIES OF THE WORLD 5.4, Disponível em <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.php>> acesso: 25/11/2014

AMPHIBIAWEB. Disponível em <www.amphibiaweb.org> acesso: 25/11/2014.

BAKER, M.A.; MALOY, W.L.; ZASLOFF, M.; JACOB, L.S.1993. Anticancer of magainina 2 and analogue peptides. *Cancer Research*, 53:3052-3057.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S.2009. Biodiversidade: Fonte potencial para descoberta de novos fármacos. *Química Nova*. 32: 679-688.

BATISTA, C. V. F.; SILVA, L. R.; SEBEN, A.; SCALONI A.; FERRARA, L.; PAIVA, G. R.; OLAMENDI-PORTGAL, T.; POSSANI, L. D.; BLOCH, C. Jr. 1999. Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. *Peptides*, 20: 679-686.

BERNARDE, P. S.; SANTOS, R. A.; 2009. Utilização medicinal da secreção (“vacinado-sapo”) do anfíbio kambô (*Phyllomedusa bicolor*) (Anura: Hylidae) por população não-indígena em Espigão do Oeste, Rondônia, Brasil. *Revista Biotemas*, 22: 213 – 220.

BECHINGER, B. & LOHNER. 2006. Detergent-like actions of linear amphipatic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica Biophysica Acta*, 1758: 1529 – 1539.

BOMAN, H.G. 1991. Antibacterial peptides: Key components needed in immunity. *Cell*, 65: 205-207.

BRAND, G.D.; LEITE, J.R.S.A.; SILVA, L.P.; ALBUQUERQUE, S.; PRATES, M.V.; AZEVEDO, R.B.; CARREGARO, V.; SILVA, J.S.; SÁ, V.C.L.; BRANDÃO, R.A.; BLOCH JUNIOR, C. 2002. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:49332-49340.

BRAND, D. G.; LEITE, J.R. S. A.; MANDEL, S. M. S.; MESQUITA, D. A.; SILVA, L. P.; PRATES, M. V.; BARBOSA, E. A.; VINECKY, F.; MARTINS, G. R.; GALASSO, J. H.; KUCKELHAUS, S. A. S.; SAMPAIO, R. N. R.; JUNIOR, J. R.; ANDRADE, A. C.; JUNIOR, C. B. 2006. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347: 739–746.

BROGDEN, K. A. 2005. Antimicrobial Peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews*, 3: 238-250.

- CÂMARA, I. G. 2001. Megabiodiversidade Brasil. Editora sextante Artes (GMT Editores Ltda). 206p.
- CANTÚ, D. M.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. 2008. Sequenciamento de Peptídeos usando Espectrometria de Massas: um guia prático. *Química nova*, 31: 669 – 675.
- CAPOBIANCO, J. P. R.; VERÍSSIMO, A.; MOREIRA, A.; SAWYER, D.; SANTOS, I.; PINTO, L. P. 2002. Biodiversidade na Amazônia Brasileira. Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil. 540p.
- CARDOSO, M. H.; COBACHO, N. B.; CHEROBIM, M. D.; PINTO, M. F. S.; SANTOS, C.; MAXIMIANO, M. R.; BARROS, E. G.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. 2014. Insights into the Antimicrobial Activities of Unusual Antimicrobial Peptide Families from Amphibian Skin. *Clinical Toxicology*, 4: 1 – 10.
- CASTRO, M. S.; MATSUSHITA, R. H.; SEBBEN, A.; SOUSA, M.V.; FONTES, W. 2005. Hylins: bombinins H structurally related peptides from the skin secretion of the Brazilian tree frog *Hyla biobeba*. *Protein Peptide Letters*, 12: 89 – 93.
- CASTRO, M. S.; FERREIRA, T. C.; CILLI, E. M.; JUNIOR, E. C.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; SEBBEN, A.; RICART, C. A. O.; SOUSA, M. V.; FONTES, W. 2009. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* (“spotted treefrog”). *Peptides*, 30: 291-296
- CESPEDES, G. F.; LORENZON, E. N.; VICENTE, E. F.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.; CILLI, E. M. 2012. Mechanism of Action and Relationship Between Structure and Biological Activity of Ctx-Ha: A New Ceratotoxin-like Peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. *Protein Peptide Letters*, 19(6): 596-603.
- CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard-Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2008.
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Testing for Bacteria That grow Aerobically: Approved Standard-Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2012.
- CONLON, J. M.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N.; LEPRINCE, J.; VAUDRY, H.; COQUET, L.; JOUENNE, T.; KING, J. D. 2008. Characterization of antimicrobial peptides from the skin secretions of the Malaysian frogs, *Odorrana hosii* and *Hylarana picturata* (Anura:Ranidae). *Toxicon*, 52: 465 – 473.
- CONLON, J. M.; ABDEL-WAHAB, Y. H.; FLATT, P. R.; LEPRINCE, J.; HUBERT, V.; JOUENNE, T.; CONDAMINE, E. 2009a. A glycine-leucine-rich peptide structurally related to the plasticins from skin secretions of the frog *Leptodactylus laticeps* (Leptodactylidae). *Peptides*, 30: 888 – 892.

CONLON, J. M.; AHMEDA, E.; COQUET, L.; JOUENNE, T.; LEPRINCE, J.; VAUDRY, H.; KING, J. D. 2009b. Peptides with potent cytolytic activity from the skin secretions of the North American leopard frogs, *Lithobates blairi* and *Lithobates yavapaiensis*. *Toxicon*, 53: 699 – 705.

CONLON, J. M.; MEETANI, M. A.; COQUET, L.; JOUENNE, T.; LEPRINCE, J.; VAUDRY, H.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N.; KING, J. D. 2009c. Antimicrobial peptides from the skin secretions of the New World frogs *Lithobates capito* and *Lithobates warszewitschii* (Ranidae). *Peptides*, 30: 1775 – 1781.

CONLON, J. M.; DEMAND, A.; NIELSEN, P. F.; LEPRINCE, J.; VAUDRY, H.; WOODHAMS, D. C. 2009d. The alyteserins: Two families of antimicrobial peptides from the skin secretions of the midwife toad *Alytes obstetricans* (Alytidae). *Peptides*, 30: 1069 – 1073.

CONLON, J. M.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N. 2009e. Review Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1788: 1556 – 1563.

CONLON, J. M.; MECHKARSKA, M.; RADOSAVLJEVIC, G.; ATTOUB, S.; KING, J. D.; LUKIC, M. L.; MCCLEAN, S. 2014. A family of antimicrobial and immunomodulatory peptides related to the frenatins from skin secretions of the *Orinoco lime* frog *Sphaenorhynchus lacteus* (Hylidae). *Peptides*. 56: 132-140.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. 2000. Fmoc solid phase peptide synthesis. A practical approach. Oxford University Press, Oxford.

CHO, J. H.; SUNG, B. H.; KIM, S. C. 2009. Buforins: Histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1788: 1564 – 1569.

CHOU, H. T.; WEN, H. W.; KUO, T. Y.; LIN, C. C.; CHEN, W. J. 2010. Interaction of cationic antimicrobial peptides with phospholipid vesicles and their antibacterial activity. *Peptides*, 31: 1811–1820.

CRUCIANI, R. A.; BARKER, J. L.; ZASLOFF, M.; CHEN, H. C. 1991. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. *Proceeding of the National Academy Sciences USA*, 88:3792-3796.

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

ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P. 1973. Active polypeptides of amphibian skin and their synthetic analogues. *Pure and applied Chemistry*, 35: 463-494.

ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P. 1980. Active polypeptides: from amphibian skin to gastrointestinal tract and brain of mammals. *Trends Pharmacology Sciences*, 1: 391 – 395.

ERSPAMER, V. Bioactive secretions of the amphibian integument. In: Heatwole, H., Bartholomew GT, editors. *Amphibian Biology. The Integument*, Vol. 1. Chipping Norton, Australia: Ed Surrey Beatty & Sons, pp.178-350, 1994.

EPAND, R. M.; VOGEL, H. J. 1999. Review Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462: 11-28.

FAIVOVICH, J.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. A.; FROST, D. R.; CAMPBELL, J. A.; WHEELER, W. C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: a phylogenetic analysis and taxonomic revision. 294: 1-240.

FEARNSIDE, P. M. 2006. Desmatamento na Amazônia: dinâmica, impactos e controle. *Acta Amazônica*, 36: 395 – 400.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246: 64-71.

GENCO, C. A.; MALOY, W. L.; KARI, U. P.; MOTLEY, M. 2003. Antimicrobial activity of magainin analogues against anaerobic oral pathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21:75-78.

GODAR, J.; GARDNER, T. A.; TIZADO, E. J.; PACHECO, P. 2014. Actor – specific Contributions to the Deforestation Slowdown in the Brazilian Amazon. *PNAS*, 16:1-6.

HILLENKAMP, F.; KARAS, M.; BEAVIS, R. C.; CHAIT, B.T. 1991. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Analytical Chemistry*, 63: 1193-1203.

HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. 2008. Review Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778: 357 – 375.

JACKWAY, R. J.; PUKALA, T. L.; MASELLI, V. M.; MUSGRAVE, I. F.; BOWIE, J. H.; LIU, Y.; SURINYA-JOHNSON, K. H.; DONNELLAN, S. C.; DOYLE, J. R.; LLEWELLYN, L. E.; TYLER, M. J. 2008. Disulfide de-containing peptides from the glandular skin secretions of frog lets of the genus *Crinia*: Structure, activity and evolutionary trends. *Regulatory Peptides*, 151: 80-87.

JIN, L. L.; LI, Q.; SONG, S. S.; FENG, K.; ZHANG, D. B.; WANG, Q. Y.; CHEN, Y. H. 2009. Characterization of antimicrobial peptides isolated from the skin of the Chinese frog, *Rana dybowskii*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 174 – 178.

KAUFMANN, R. 1995. Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 41: 155 – 175.

KONIG, E.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; SHAW, C. 2015. The diversity and evolution of anuran skin peptides. *Peptides*, 63: 96-117.

LAI, R.; LIU, H.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. 2002. A novel proline rich bombesin-related peptide (PR-bombesina) from toad *Bombina maxima*. *Peptides*, 23: 437-442.

LEITE, J.R.S.A. ; SILVA, L.P. ; RODRIGUES, M.I.S. ; PRATES, M.V. ; BRAND, G.D. ; LACAVAL, B.M.; AZEVEDO, R.B. ; BOCCA, A.L. ; ALBUQUERQUE, S. ; BLOCH Jr., C. 2005. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the Phyllomedusa genus. *Peptides*, USA, v. 26 (4), p. 565-573

LEITE, J. R. S. A.; BARBOSA, E. A.; NORONHA, S. E. 2006. Levantamento de anuros (amphibia) na região do projeto Formoso-Araguaia e Arredores, Formoso do Araguaia, Tocantins, Brasil. *Sitientibus Série Ciências Biológicas*, 6: 56-63.

LEHNINGER, A. L.; UVID L. Nelson; MICHAEL M. Cox 1917-1986. Lehninger Princípios de Bioquímica. Traduzido por Arnaldo Antonio Simões, Wilson Roberto Navega Lodi. 3 ed. São Paulo. Sarvier, 2002.

LEWIS, K. J.; WEI, J.; SIUZDAK, G.; Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis, in Encyclopedia of Analytical Chemistry R. A. Meyers, pp. 5880 – 5894, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000.

LIU, R.; LIU, H.; MA, Y.; WU, J.; YANG, H.; YE, H.; LAI, R. 2011. There are Abundant Antimicrobial Peptides in Brains of Two Kinds of *Bombina* Toads. *Journal of Proteome Research* 10(4) 1806-1815.

LIU, J.; JIANG, J.; WU, Z.; XIE, F. 2012. Antimicrobial peptides from the skin of the Asian frog, *Odorrana jingdongensis*: De novo sequencing and analysis of tandem mass spectrometry data. *Journal Proteomics*, 75: 5807-5821.

LIMA, A. P.; MAGNUSSON, W. E.; MENIN, M.; ERDTMAN, L. K.; RODRIGUES, D. J.; KELLER, C.; HODI, W. 2006. Guia de sapos da Reserva Adolpho Ducke, Amazônia Central. *Áttema Design Editorial*, 168p.

MALOY, W.I.; KARI, U.P. 1995. Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers*, 37:105-122.

MAGALHÃES, B. S.; MELO, J. A. T.; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. P.; PRATES, M. V.; VINECKY, F.; BARBOSA, E. A.; VERLY, R. M.; MEHTA, A.; NICOLI, J. R.; BEMQUERER, M. P.; ANDRADE, A. C.; JUNIOR, C. B. 2008. Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377: 1057–1061.

MAGALHÃES, M. T. Q.; BARBOSA, E. A.; PRATES, M. V.; VERLY, R. M.; MUNHOZ, V. H. O.; ARAÚJO, I. E.; BLOCH JR., C. 2013. Conformational and Functional Effects Induced by D-and L-Amino Acid Epimerization on a Single Gene Encoded Peptide from the Skin Secretion of *Hypsiboas punctatus*. *Plos One*, 8(4), e59255, 1-14.

MIELE, R.; PONTI, D.; BOMAN, H.G.; BARRA, D.; SIMMACO, M. 1998. Molecular cloning of a bombinin gene from *Bombina orientalis*: detection of NF- κ B and NF-IL6 binding sites in its promoter. *FEBS Letters*, 431:23-28.

MYERS, C. W.; DALY, J. W.; MALKIN, B. 1978. A dangerously toxic new frog (Phyllobates) used by Embera Indians of western Colombia, with discussion of blowgun fabrication and dart poisoning. *Bulletin American Museum of Natural History*, 161: 307-366.

NACIF-MARÇAL, L.; PEREIRA, G. R.; ABRANCHES, M. V.; COSTA, N. C. S.; CARDOSO, S. A.; HONDA, E. R.; de PAULA, S. O.; FEIO, R. N.; OLIVEIRA, L. L. 2015. Identification and characterization of an antimicrobial peptide of *Hypsiboas semilineatus* (Spix, 1824) (Amphibia, Hylidae). *Toxicon*, 99: 16-22.

NCBI disponível em <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>> acesso em 10/03/2015.

NICOLAS, P.; VANHOYE, D.; AMICHE, M. 2003. Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides. *Peptides*, 24: 1669 – 1680.

NICOLAS, P.; AMIRI, C. E. 2009. Review The dermaseptin superfamily: A gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788: 1537 – 1550.

OHNUMA, A.; CONLON, J. M.; IWAMURO, S. 2010. Differential expression of genes encoding preprobrevinin-2, preproalustrin-2, and preproanatuerin-2 in developing larvae and adult tissues of the mountain Brown frog *Rana ornativentris*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 151:122 – 130.

OHSAKI, Y.; GAZDAR, A.F.; CHEN, H.C.; JOHNSON, B.E. 1992. Antitumor activity of magainin analogues against human lung cancer cell lines. *Cancer Research*, 52:3534-3538.

PELLETIER, S.W. Alkaloids: Chemical and Biological perspectives. Copyright[©] by John Wiley & Sons, Inc. 1986.

P.M.C. disponível em <<http://www.peptidesynthetics.co.uk/tools/>> acesso em 10/03/2015.

PRATES, M. V.; FORÇA, M. L. S.; REGIS, W. C. B.; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. P.; PERTINHEZ, T. A.; ARAÚJO, A. L. T.; AZEVEDO, R. B.; SPISNI, A.; AND BLOCH, JR, C. 2004. The NMR-derived Solution Structure of a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Skin Secretion of the Anuran *Hyla punctata*. *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (13): 13018 – 13026

PIRES, D. A. T.; BEMQUERER, M. P.; NASCIMENTO, C. J. 2014. Some Mechanistic Aspects on Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics (Print)*, 20:53-69.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Pharmacology. Churchill Livingstone, a division of Copyright Harcourt Publishers Limited, 2000.

- RATES, B.; SILVA, L. P.; IRENO, I. C.; LEITE, F. S. F.; BORGES, M. H.; BLOCH, C.; LIMA, M. E. ; PIMENTA, A. M. C. 2011. Peptidomic dissection of the skin secretion of *Phasmahyla jandaia* (Bokermann and Sazima, 1978) (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae). *Toxicon*, 57(1): 35 – 52.
- ROLLINS-SMITH, L. A.; CONLON, J. M. 2005. Review Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations. *Developmental and Comparative Immunology*.29: 589 – 598.
- ROLLINS-SMITH, L. A. 2009. The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. *Biochimica Biophysica Acta*, 1788(8): 1593-1599.
- ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J. 1984. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass-spectra of peptides. *Journal Biomedical Mass Spectrometer*, 11: 601
- SEBBEN, A.; SCHWARTZ, C.A.; CRUZ, J.S. 1993. A defesa química dos anfíbios. *Ciência Hoje*, 15: 25-33.
- SIANO, A.; HÚMPOLA, M. V.; OLIVEIRA, E.; ALBERICIO, F.; SIMONETTA, A. C.; LAJMANOVICH, R.; TONARELLI, G. 2014. Antimicrobial Peptides from Skin Secretions of *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae). *Journal Natural Products*, 77(4): 831-841.
- SILVA, F. M. A.; SOUZA, A. D. L.; KOOLEN, H. H. F.; BARISON, A.; VENDRAMIN, M. E.; COSTA, E. V.; FERREIRA, A. G.; PINHEIRO, M. L. B. 2014. Phytochemical Study of the Alkaloidal Fractions of *Unonopsis duckei* R. E. Fr. Guided by Electrospray Ionisation Ion-trap Tandem Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 25: 45-49.
- SIMMACO, M.; MIGNOGNA, G.; CANOFENI, S.; MIELE, R.; MARGONI, M.L.; BARRA, D. 1996. Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *European Journal Biochemical*. 242: 788-792.
- SOUSA, J. C.; SILVA, R. L. S.; SOUSA, R. Á.; LIMA, M. S. C. S.; FERREIRA, G. J. B. C. 2015. Histologia da glândula parotoide de anuros da espécie *Rhinella schneideri* (Amphibia: Bufonidae). *Biotemas*, 28(2): 111-118.
- SHAI, Y. 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipids bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462: 55-70.
- STULTS, J. T. 1995. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS). *Current Opinion in Structural Biology*, 5: 691-698.
- TOLEDO, R. C.; JARED, C. 1995. Review Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry Physiology* Vol. IIIA, No. I, pp. 1 – 29.

- TORRESI, S. I. C.; PARDINI, V. L.; FERREIRA, V. F. 2012. Diálogos da sociedade sobre a biodiversidade brasileira na Rio+20. *Química Nova*, 35: No. 6, 1073-1074.
- VERDADE, V. K.; DIXO, M.; CURCIO, F. F. 2010. Risks of extinction of Frogs and toads as a Result of environmental Changes. *Estudos Avançados*, 24: 161 – 172.
- WANG, X.; SONG, Y.; LI, J.; LIU, H.; XU, X.; LAI, R.; ZHANG, K. 2007. A new family of antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana pleuraden*. *Peptides*, 28: 2069 – 2074.
- WANG, H.; YAN, X.; YU, H.; HU, Y.; YU, Z.; ZHENG, H.; CHEN, Z.; ZHANG, Z.; LIU, J. 2009. Isolation, characterization and molecular cloning of new antimicrobial peptides belonging to the brevinin-1 and temporin families from the skin of *Hylarana latouchii* (Anura: Ranidae). *Biochimie*, 91: 540 – 547.
- WANG, M.; WANG, Y.; WANG, A.; SONG, Y.; MA, D.; YANG, H.; MA, Y.; LAI, R. 2010. Five novel antimicrobial peptides from skin secretions of the frog, *Amolops loloensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 155: 72 – 76.
- WENZEL, M.; SENEGES, C.H.; ZHANG, J.; SULEMAN, S.; NQUYEN, M.; KUMAR, P.; CHIRIAC, A. I.; STEPANEK, J. J.; RAATSHEN, N.; MAY, C.; KRAMER, U.; SAHI, H. G.; STRAUS, S. K; BANDOW, J. E. 2015. Antimicrobial Peptides from the Aurein Family Form Ion-Selective Pores in *Bacillus subtilis*. *ChemBiochem*, 27: 1 – 9.
- XINPING, X.; RENJIE, L.; YINGCHUN, J.; YAN, L.; YUXIN, W.; MEI, Z.; LEI, W.; TIANBAO, C.; CHRIS, S. 2013. Medusins: A new class of antimicrobial peptides from the skin secretions of phyllomedusine frogs. *Biochimie* 95(6): 1288-1296
- ZASLOFF, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415: 383-395.
- ZHENG, R.; YAO, B.; YU, H.; WANG, H.; BIAN, J.; FENG, F. 2010. Novel family of antimicrobial peptides from the skin of *Rana shuchinae*. *Peptides*, 31: 1674 – 1677.

ANEXO



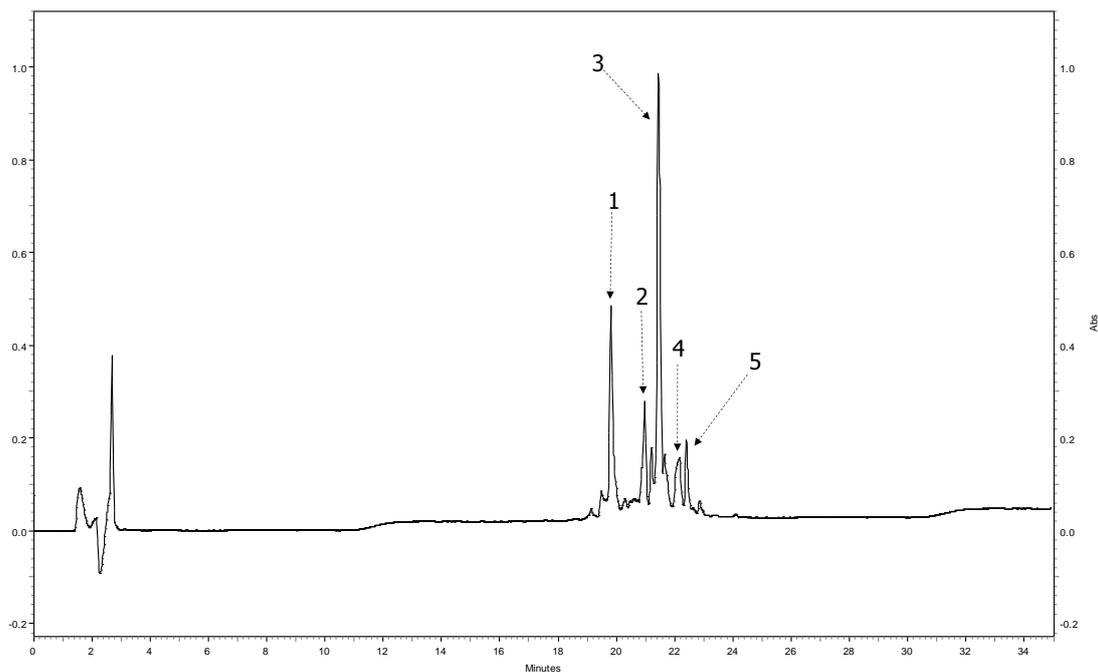


Figura 125 - Cromatograma analítico da fração 11 de H.C. Linha preta 216 nm. Linha rosa gradiente de 5 a 95% de ACN 0,1 TFA em 75 min. As setas indicam quais frações foram coletadas manualmente.

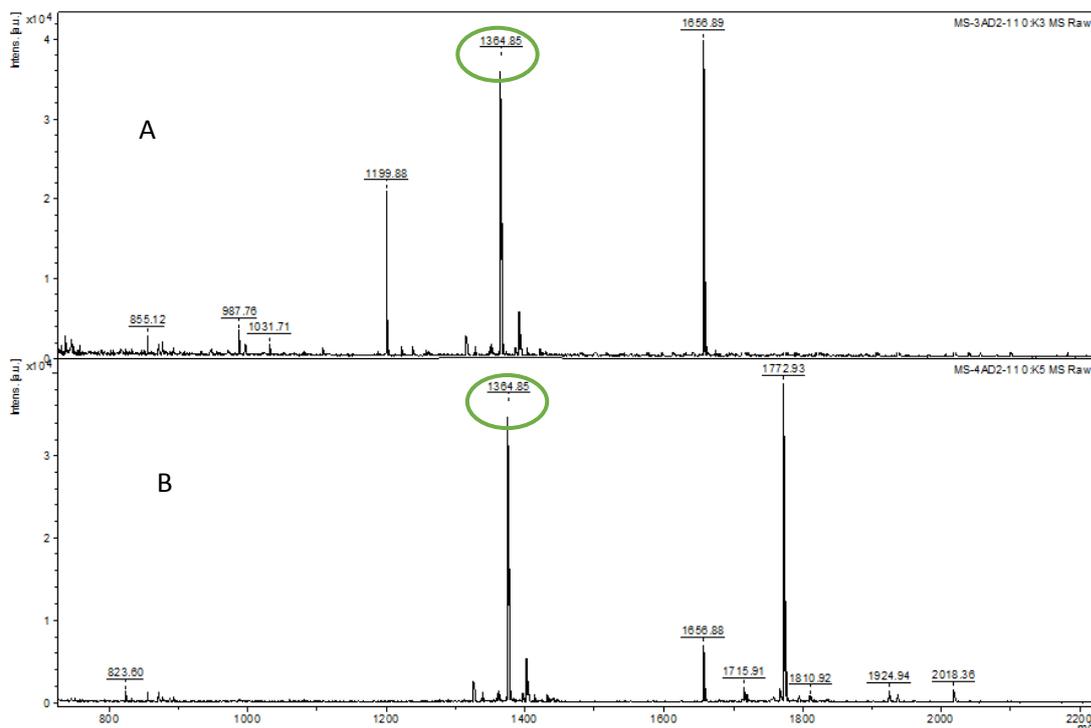


Figura 126 - Espectro de massa no modo MS da fração 2-11 de H.C. Na parte A da figura fração antes da alquilação. Na parte B depois da reação. Observa-se que o íon de m/z 1.364.8 e conservado após a reação, o que indica que esse íon não possui ponte de dissulfeto.

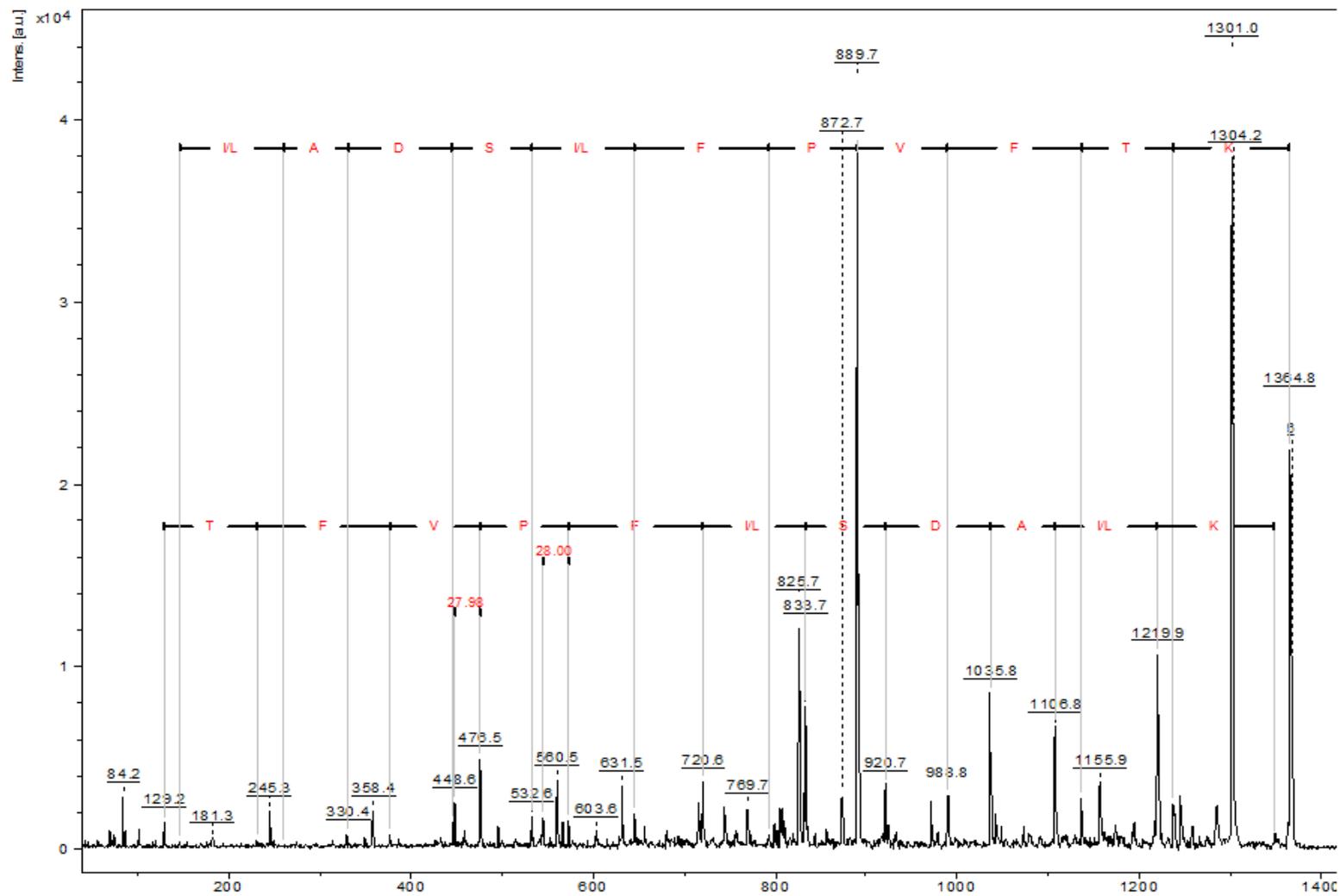


Figura 127 - Espectro de MS² do peptídeo de m/z 1364.85 u de H.C. Sequência proposta KTFVPFLSDALK, possivelmente na forma truncada.

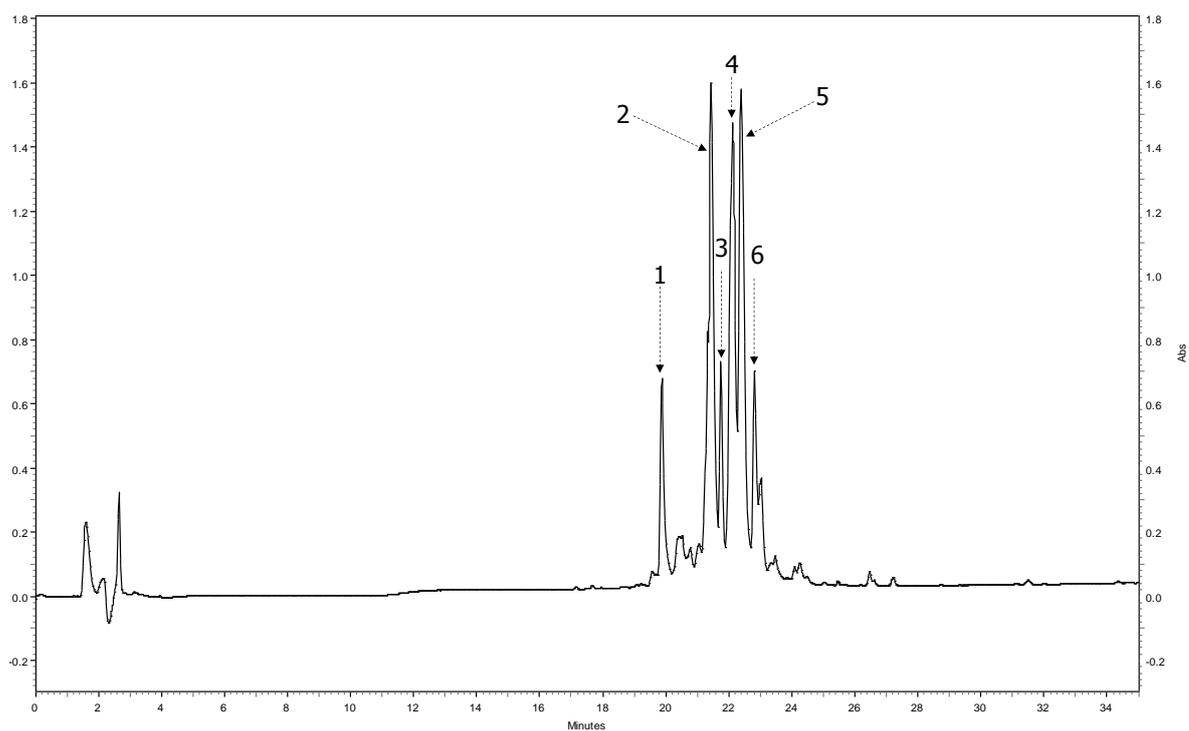


Figura 128 - Cromatograma analítico da fração 12 de H.C.
 Linha preta indica o comprimento de onda em 216 nm. As setas indicam quais frações foram coletadas manualmente.

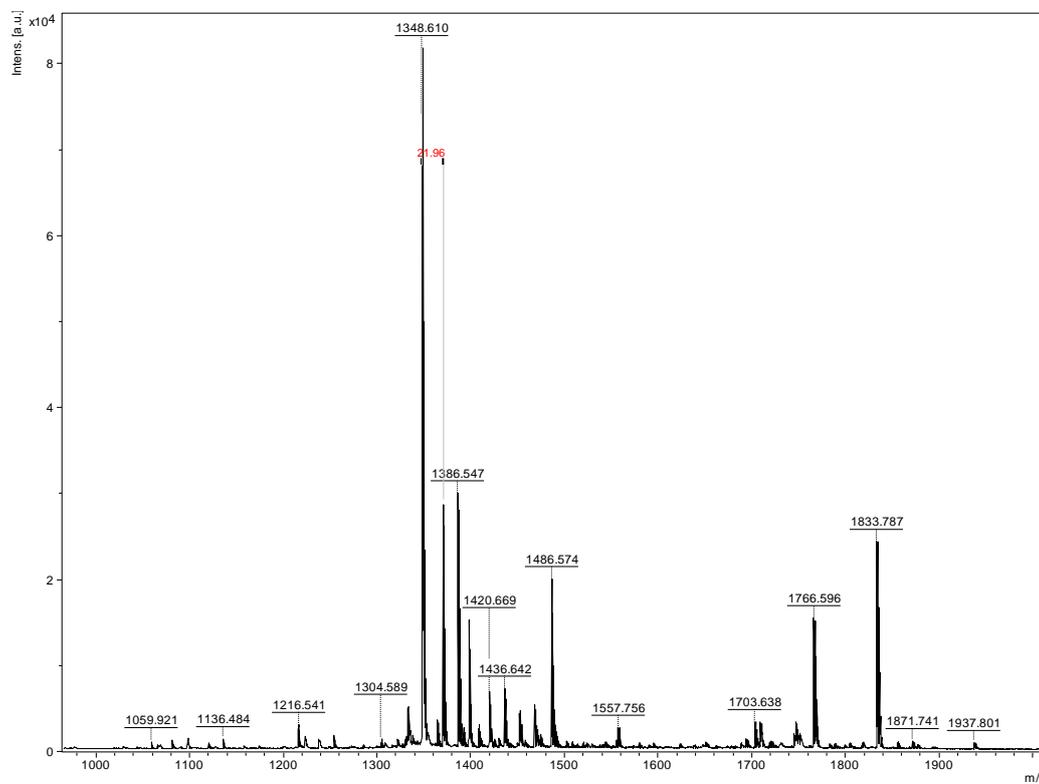


Figura 129 - Espectro de massa da fração 4-12 de H.C.

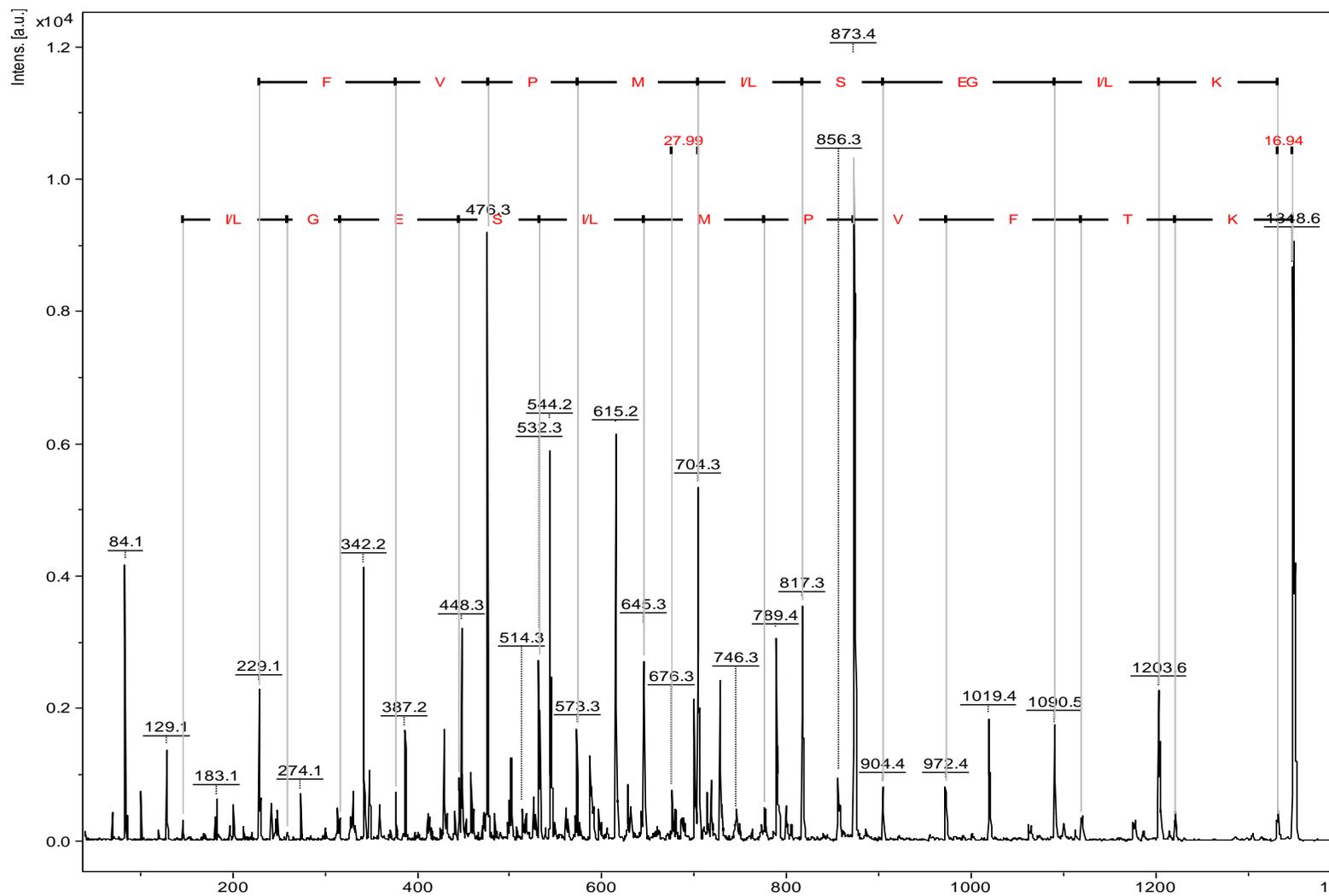


Figura 130 - Espectro de MS² do peptídeo com m/z 1.348,6 u de H.C.
 Sequência proposta KTFVPMLSEGLK, possivelmente na forma truncada.

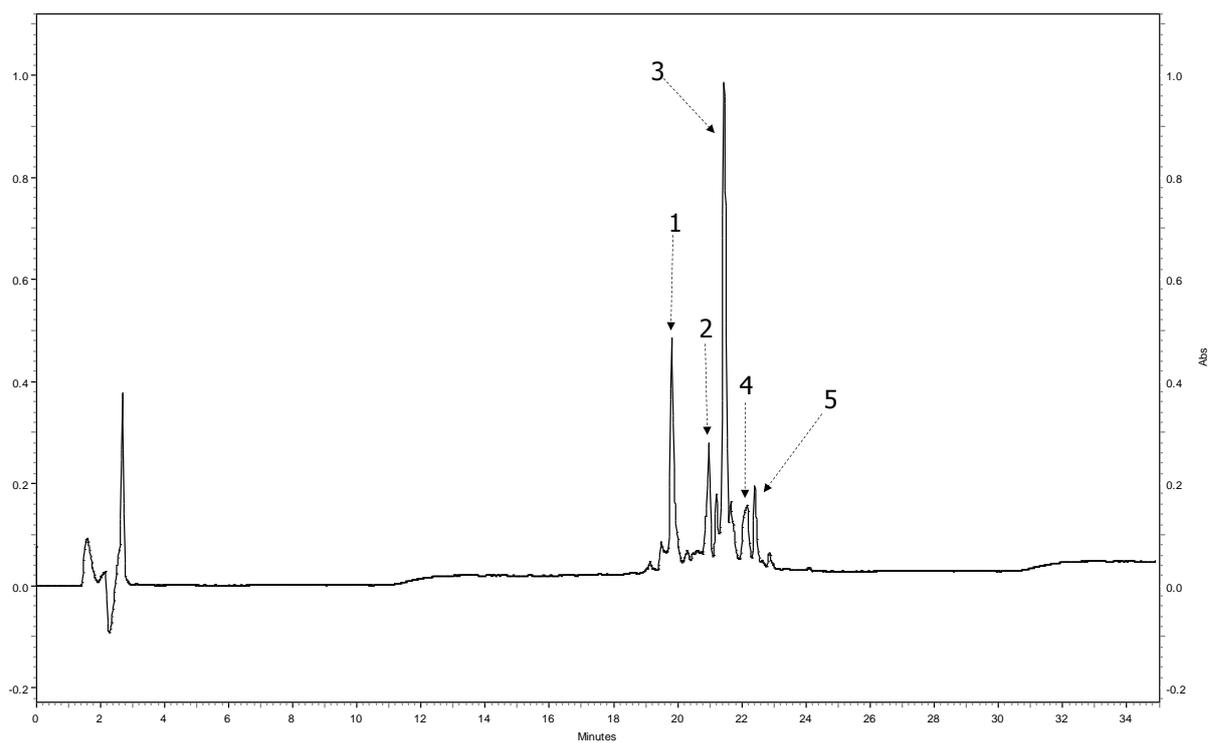


Figura 131 - Cromatograma analítico da fração 14 de H.C.
 Linha preta indica o comprimento de onda em 216 nm. As setas indicam quais frações foram coletadas manualmente.

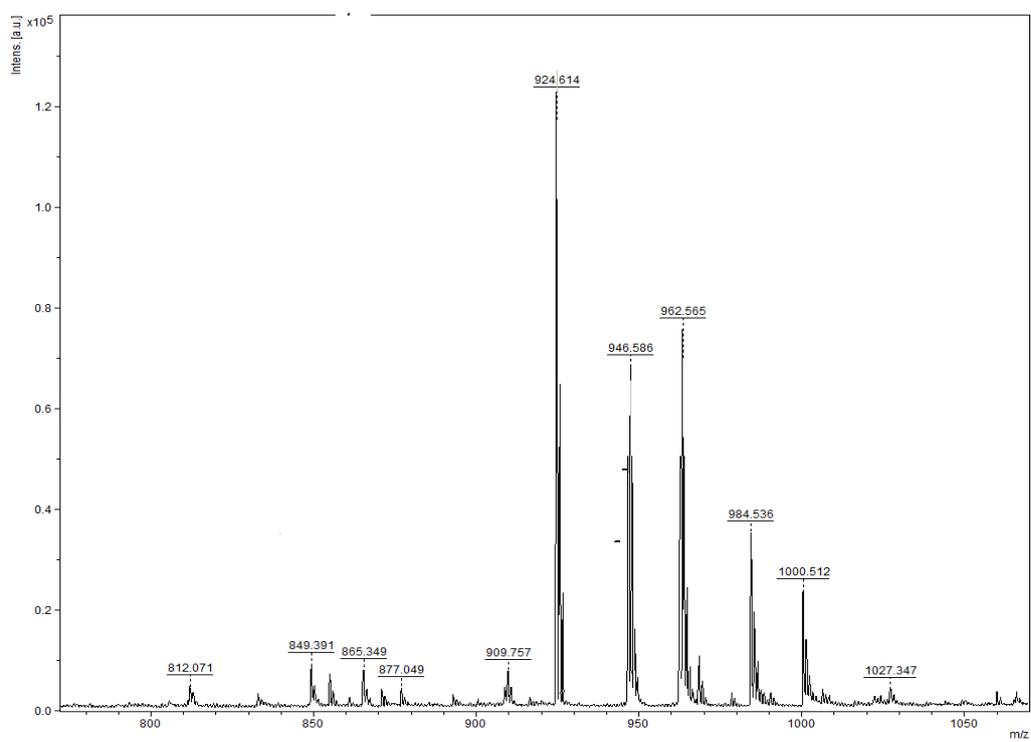


Figura 132 - Espectro de massa da fração 9-14 de H.C.

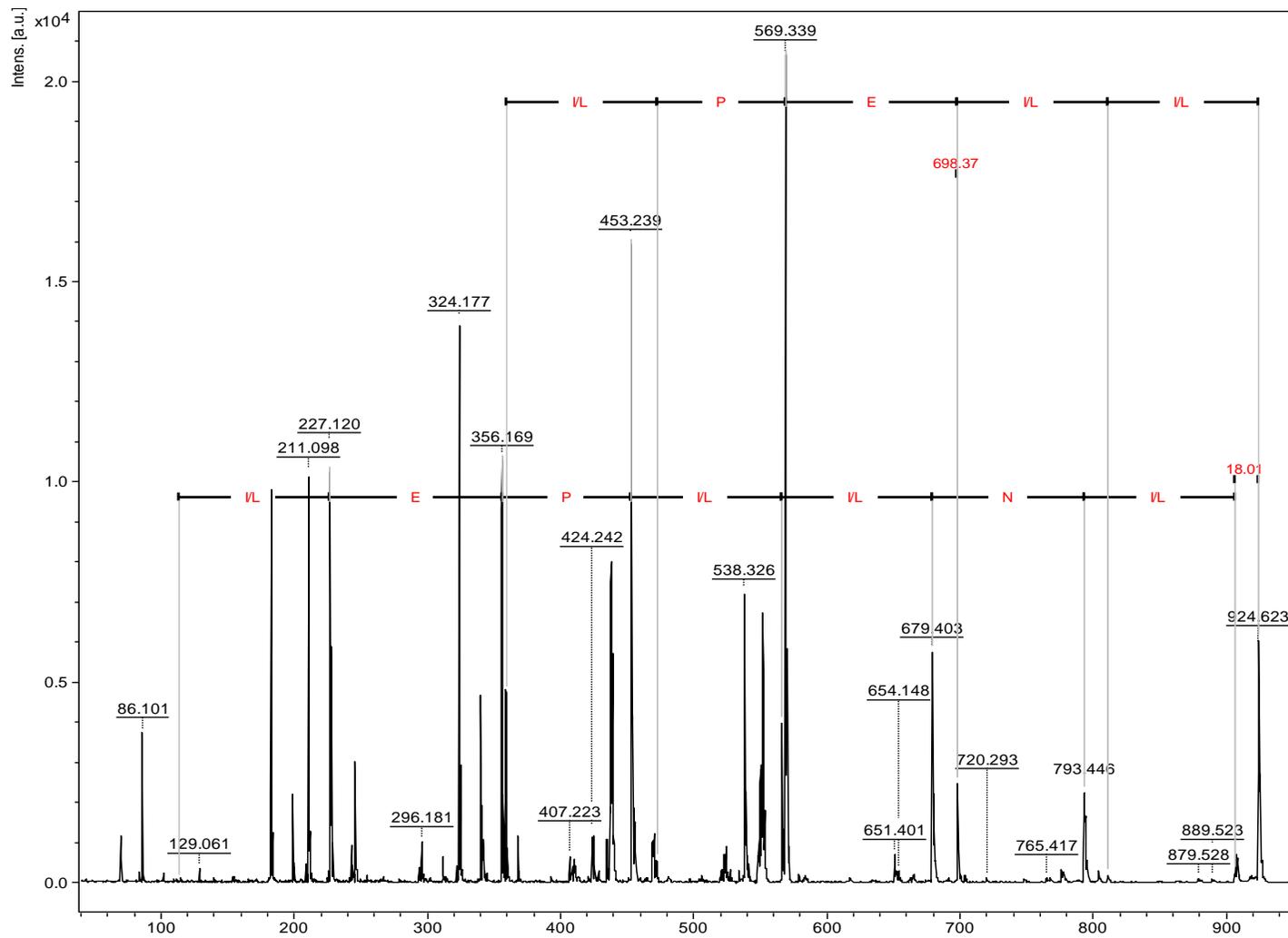


Figura 133 - Espectro de massa do peptídeo com m/z 924,6 u de H.C.
 Sequência proposta LLEPILNL, na forma truncada, mas foi confirmada no gene.

**Cinerascetins, New Peptides from *Hypsiboas cinerascens*:
MALDI LIFT-TOF-MS/MS *de novo* Sequence and Imaging Analysis**

**Richardson A. Almeida,^{*,a,b} Marcelo Gordo,^c Felipe M. A. da Silva,^{a,d}
Rafael C. de Araújo,^a Marcelo H. S. Ramada,^e Fernando Y. Abrão,^f Túlio O. G. Costa,^a
Hector H. F. Koolen,^{a,d} Afonso D. L. de Souza^a and Carlos Bloch Jr.^b**

^aDepartamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, 69077-000 Manaus-AM, Brazil

^bLaboratório de Espectrometria de Massa, Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia,
70700-900 Brasília-DF, Brazil

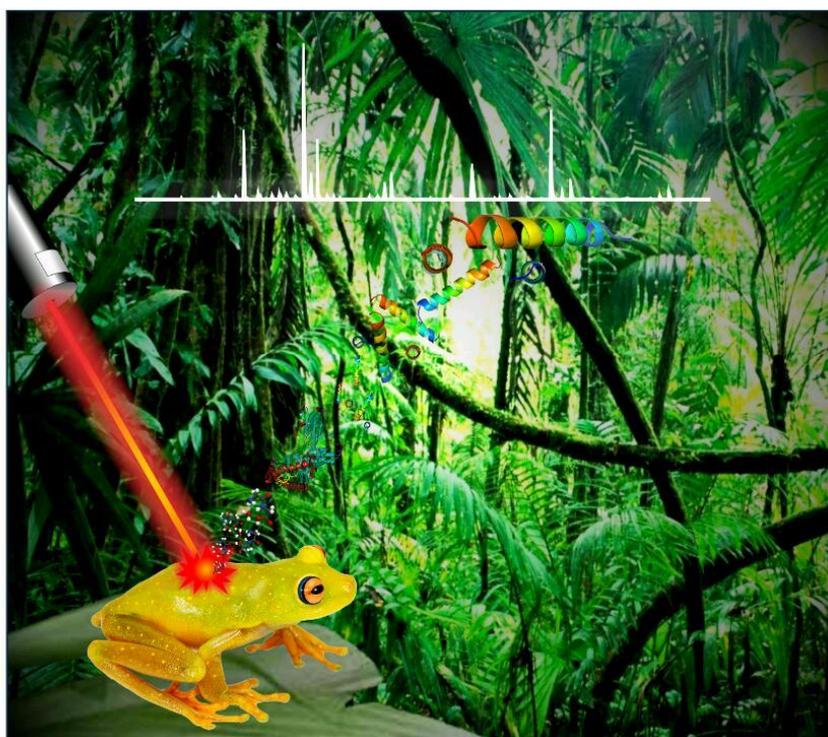
^cDepartamento de Biologia and ^dGrupo DeMpSter de Espectrometria de Massas, Universidade
Federal do Amazonas, 69077-000 Manaus-AM, Brazil

^eDepartamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, 70910-900 Brasília-DF, Brazil

^fInstituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás,
74605-050 Goiânia-GO, Brazil

The continuous search for antimicrobial candidates pushes the pursuit of compounds in the most diverse organisms. Amphibians are known as a prolific source of antibacterial peptides. Based on the rich biodiversity of the Amazon region the unexplored green-tree frog (*Hypsiboas cinerascens*) was studied for its skin secretion peptide content. Chromatographic separations and established tandem mass spectrometry (MS/MS) methods were used for sequencing the primary structures of the purified compounds. *De novo* sequencing lead to the identification of five new peptides related to hylaseptin P1, displaying an aminated C-terminal. Sequencing of the complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) analysis allowed the disambiguation of isobaric amino-acids for C-01. Matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) was carried out, demonstrating the *in situ* co-occurrence of the identified peptides in the dorsal skin. The major peptide C-01 was synthesized and assayed against a selection of microorganisms displaying minimal inhibitory concentrations (MICs) ranging from 4 to 16 μ M.

Keywords: anuran, antimicrobial peptide, *Hypsiboas cinerascens*, skin secretion



Cover Picture



Cinerascetins, New Peptides from *Hypsiboas cinerascens*: MALDI LIFT-TOF-MS/MS *de novo* Sequence and Imaging Analysis

Richardson A. Almeida, Marcelo Gordo, Felipe M. A. da Silva, Rafael C. de Araújo, Marcelo H. S. Ramada, Fernando Y. Abrão, Túlio O. G. Costa, Hector H. F. Koolen, Afonso D. L. de Souza and Carlos Bloch Jr.