

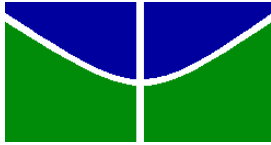
Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-graduação em Biologia Molecular

Caracterização Estrutural e Funcional de Fenilseptinas:

**Peptídeos com atividades antimicrobiana e químico-sensorial
presentes na secreção cutânea de *Hypsiboas punctatus***

Mariana Torquato Quezado de Magalhães.

Brasília, 13 de setembro de 2011.



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-graduação em Biologia Molecular

Caracterização Estrutural e Funcional de Fenilseptinas:

Peptídeos com atividades antimicrobiana e químico-sensorial presentes na secreção cutânea de *Hypsiboas punctatus*

Tese de doutorado apresentada ao
Departamento de Biologia Celular
como parte dos requisitos
obrigatórios para obtenção do título
de Doutor em Biologia Molecular.

Candidata: Mariana Torquato Quezado de Magalhães.
Doutoranda em Biologia Molecular PGCEL/ IB/ UnB, Brasília-DF.

Orientador: Dr. Carlos Bloch Jr.
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

Brasília, 13 de setembro de 2011.



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-graduação em Biologia Molecular

Caracterização Estrutural e Funcional de Fenilseptinas:

**Peptídeos com atividades antimicrobiana e químico-sensorial
presentes na secreção cutânea de *Hypsiboas punctatus***

Banca Examinadora:

Membros Externos:

Dra. Débora Foguel – Professora Associada da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) – Departamento de Bioquímica Médica – ICB – CCS – Laboratório de Agregação de Proteínas e Amiloidoses (LAPA).

Dr. Elíbio Leopoldo Rech Filho – Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília/DF.

Membros Internos:

Dr. Waldenor Barbosa da Cruz – Professor emérito da Universidade de Brasília (UnB), Instituto de Biologia.

Dra. Maria Sueli Soares Felipe – Professora Associada da Universidade de Brasília (UnB) – Departamento de Biologia Celular – IB – Laboratório de Biologia Molecular.

Membro Suplente:

Dr. Guilherme Dotto Brand – Bioquímico Analítico da Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação, Brasília/DF.

Brasília, 13 de setembro de 2011.

Este trabalho foi desenvolvido no **Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM)** da **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF)**. Teve apoio do **Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos** e do **Laboratório de Ressonância Magnética**, ambos localizados na **Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG (Belo Horizonte, MG)**, do **Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (CNRMN)**, localizado na **Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ (Rio de Janeiro, RJ)**, e do *Neuroscience of Feeding Laboratory*, localizado na *Yale School of Medicine (New Haven, CT, EUA)*. Os **auxílios financeiros** foram provenientes do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/BR) e do J.B. Pierce Foundation (Yale/EUA).

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ACN	Acetonitrila
Amp	Ampicilina
AMP	Peptídeos antimicrobianos, <i>do inglês Antimicrobial Peptides</i>
ATG	Códon de iniciação da transcrição: adenina, timina, guanina.
CD	Dicroísmo circular, <i>do inglês circular dichroism</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
C-terminal	Região carboxi terminal de uma proteína
δ	Deslocamento químico
DIC	N.N'- diisopropilcarbodiimida
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Ribonucleotídeos trifosfato
DSS	2,2-dimetil-silapentano-2-5-sulfonato
EDTA	Ácido etileno diamino-tetra-acético
ESI	Ionização por eletrospray, <i>do inglês electron spray ionization</i>
FID	<i>Free induction decay</i>
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonila
FT	Transformada de Fourier
g	Unidade de força centrífuga
GCG	Genetics computer group
HOBT	1- hidroxibenzotriazola
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, <i>do inglês high performance liquid chromatography.</i>
HSQC	Coerência heteronuclear de simples-quantum, <i>do inglês Heteronuclear single quantum coherence</i>
IPTG	Isopropil-beta-D-thiogalactopiranosídeo
LB	Meio de cultura Luria-Bertani

MALDI	Dessorção/ionização de matriz assistida por laser, <i>do inglês matrix assisted laser desorption/ionization</i>
MIC	Concentração inibitória mínima, <i>do inglês minimal inhibitory concentration</i>
MMe	Massa molecular experimental
MMt	Massa molecular teórica
MS	<i>Espectrometria de massa, do inglês mass spectrometry</i>
NOE	Efeito Overhauser nuclear, <i>do inglês Nuclear Overhauser effect.</i>
NOESY	Espectroscopia bidimensional por efeito de Overhauser, <i>do inglês Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
PTM	Modificação pós-traducional, <i>do inglês post translational modification</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMSD	Raiz Quadrada dos desvios médios quadrados, <i>do inglês root of mean square deviation</i>
RP-HPLC	Cromatografia de fase reversa, <i>do inglês reverse phase chromatography</i>
RP-UFLC	Cromatografia de fase reversa ultra rápida, <i>do inglês ultra fast reverse phase chromatography</i>
TFA	Ácido trifluoroacético, <i>do inglês trifluoroacetic acid</i>
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TOCSY	Espectroscopia de correlação total, <i>do inglês Total correlation spectroscopy</i>
TOF	<i>Tempo de vôo, do inglês time of flight</i>

À **EMBRAPA**, pela oportunidade de realizar este projeto em sua estrutura física e compartilhando a vivência com seus pesquisadores.

À **Universidade de Brasília – UnB**

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular (PGCEL) do Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular– IB/UnB

À **Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ**. Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (CNRMN), localizado no Centro de Ciências da Saúde.

À **Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG**. Laboratório de Ressonância Magnética e Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos.

À **Fundação John B. Pierce – Yale School of Medicine** (New Haven, CT, EUA). Laboratório de *Neurobiology of Feeding*.

Às fontes financiadoras **EMBRAPA, CNPq e J.B. Pierce**.

Gostaria de começar agradecendo ao meu orientador, **Carlos Bloch Júnior**, por ter me **proporcionado** estar dentro disso, com alegria e contentamento. Apesar de saber da minha **formação acadêmica**, e dos meus interesses por vezes distantes daqueles comuns, sempre me **apoiou**, **confiou** no meu trabalho, e mais importante, jamais me obrigou ou forçou a tomar um **rumo diferente** daquele que escolhi para mim mesma. Espero ter comigo a sua visão crítica **em relação** à ciência, mesmo neste mundo de pressões para uma produção de conhecimento **desenfreado**, tradicionalista e repetitivo. Agradeço enormemente pelos momentos dentro e **fora do laboratório**, pelo dia-a-dia, e por transformar a nossa relação em algo muito maior do **que aquela** de orientador-orientado, e sim numa relação de respeito e amizade. Obrigada pela **paciência** em todos os meus momentos de tristeza, desânimo e por ter entendido o meu ritmo e **minha hora** de terminar cada uma das etapas.

Gostaria de agradecer ao meu amado pai, **Sylvio Quezado**, pelo apoio diário, por **compartilhar** comigo os momentos difíceis e felizes. Por me inspirar, e deixar ser inspirado **pela minha** juventude exagerada. Pelos conselhos científicos, pessoais, e por me apoiar em **todas as decisões**, mesmo quando estas me levam para longe. Pela ajuda moral, financeira, e **amor incondicional**.

Também gostaria de agradecer aos meus comparsas científicos, com quem troquei **ideias a respeito** de ciência ou qualquer outro tipo de amenidades, em especial, a minha **amiga e co-orientadora** desta tese **Maura Vianna Prates**. Aos meus amigos do LEM, **Daniel Sifuentes, Guilherme Brand, Flavio Dourado, Ana Carolina, Lindomar Silva, Beatriz Simas, Jorge Taquita, Luísa Mayumi, Diego Arantes, Sophia Lobo, Nathália Carolina, Eduardo Fernandes, Zé Lima, Zé Roberto, Eder Barbosa, Vladimir Costa**, cada um de **um modo especial** contribuiu para que esta tese acontecesse: desde tirar 100 tubos da “*speed-vac*”, **até uma saída de campo** em busca de anfíbios. Aos membros do ACA, LIMPP, e os **outros laboratórios** da Embrapa que de modo direto, ou indireto, ajudaram no **desenvolvimento** da tese. Ao **Dr. Luciano Paulino Silva**, pelos ensinamentos preciosos e **pela amizade** durante todo o processo. E, um agradecimento especial, vai para o **Dr. Marcelo Bemquerer**, por ter me ensinado a sintetizar peptídeos, e principalmente, por ter confiado na **minha empolgação** desenfreada, e termos juntos, sintetizado manualmente o primeiro **peptídeo** do laboratório no ano de 2007. Obrigada pelas discussões científicas, literárias, **pelas ideias**, e por ter participado ativamente desta fase tão importante em minha vida.

Agradeço muito ao **Dr. Ivan Araújo**, meu orientador “americano”, por ter me **ensinado** sobre os “behaviors”, “bitter”, “micro diálise”, “taste” e todas as outras coisas que **chamamos** erroneamente de “neurociência”. Tenho orgulho em dizer que aprendi muito, tanto **dentro, quanto** fora do “basement”. Todas as nossas conversas filosóficas foram de extrema **importância** durante os gélidos dias de inverno em New Haven. Obrigada por exigir de mim **qualidade**, precisão e capricho. E, mais do que tudo isso obrigada pela amizade que **construímos**. E, agradeço ao **Renato Malcher** por ter sido, indiretamente, o responsável pela **minha ida** aos EUA, por me apresentar ao Ivan, e pelas conversas viagens e não-viagens.

Sou imensamente grata, a minha amiga chinesa, **Xueying Ren**, pela ajuda no **laboratório**, experimentos, apoio ao estrangeiro, amizade, companheirismo, passeios **fotográficos**, e conversas extremamente importantes sobre o fabuloso mundo da China. **Aproveitando**, queria agradecer aos amigos que fiz nos EUA, aos brasileiros **Maria Amélia Oliva**, e o **Marcelo Caetano**, os amigos do Pierce **Sarah Nolan** e **Derek Lautard**. E, a Patty **por ser uma** pessoa única, incrível, e me ajudar em todas as burocracias americanas, dos dias **antes da minha chegada**, ate o dia da minha ida. Valeu Patty!

Agradeço aos meus amigos da UFMG, **Thiago Braga**, **Marcela**, **Breno Rates**, **Isabella Sander**, **Jennifer**, **William Régis**, em especial, ao **Felipe Bambirra** pela ajuda no **Laboratório** de Microbiologia. Mais especialmente ainda, agradeço ao meu amigo e **companheiro** científico, **Rodrigo Verly** pela paciência para me ensinar quase-tudo sobre **RMN**. Agradeço também ao **Victor Munhoz**, pelas ajudas com os cálculos e discussões **sobre o nosso trabalho**.

Aproveitando que estamos falando de RMN, fica o meu agradecimento ao **Prof. Fabio Almeida** e à **Profa. Ana Paula Valente**, por me receber no CNMRN-RJ, e me ajudar na **condução** dos experimentos. E, ao pessoal do laboratório, em especial, a **Luciana** pela ajuda e **amizade**.

E claro, agradeço enormemente a minha família, por ter me apoiado e incentivado **diariamente**, em todos os momentos, e sem exceção. A minha mãe **Célia Torquato**, ao meu **irmão Cláudio Quezado**, minha madrastra **Marina**, minha madrinha **Hebe Quezado**, minhas **tias Helane e Zilah Quezado**, e meu primo **André Teixeira**.

Gostaria de agradecer as minhas amigas-irmãs, **Karla Grazyella**, e **Raquel Sampaio**. **Raquel**, um obrigado especial, por cuidar de mim, por levar sanduiche quando eu esquecia de **comer**, e **quando** eu mais precisei, você estava ao meu lado apoiando e participando, sem **pedir nada** em troca, por isso eu digo, Matt Ridley, você esta “meio-errado”, as vezes somos **altruístas sim**, e não precisamos de nada em troca. E, a **Karlinha** por me tirar do laboratório

nos momentos em que eu estava pirando, por ter me levado embora da paranoia, quando eu estava **afundando**, e por ser a amiga dos momentos de silêncio mais importantes.

Agradeço ao **Prof. Cirano Ulhoa** e aos meus colegas e amigos da UFG, **Saulo Siqueira, Rogério Troian, Vanessa Leitão, Andrei Stecca, Fabyano Lopes e Amanda Rafaela**, principalmente ao **Marcelo Ramada**, pela amizade, ajuda e apoio na minha fase **Goiana**. E, claro aos meus amigos goianos **Nicali Bleyer, Inez Janaína, Camilo Amaral, Lenir Miguel, Bruno Campos e Vânia Maria** pelo carinho e apoio.

Aos meus amigos nada científicos, e científicos, que há cinco anos me perguntam, “e aí, defendeu?!” **Fabiano Cardoso, Santiago Fortes, Maria Fernanda, Léo Souza, Elisa Rocha, Lemos Daniel, Fabio Oliveira, Ludmila Carvalho, Karina Freire, Cláudio Henrique, Antônio Américo, Paulinha, Luís Henrique, Luigi Soares, Daniel Vieira, Livia Pavarino, Bernardo Brasil, Adriana Telles, Adriana Cerqueira, Carine Pessoa, Kennedy Pedroso, Chico Prosdocimi e a quem eu estiver esquecendo.**

Fica o meu agradecimento à beleza do mundo, a poesia da musica, e a imensidão do **olhar**. Esta magia, e o mistério do mundo que me impulsionam. E, gostaria de agradecer a **razão**, que nunca deixou a minha curiosidade morrer, e levou minha alma humana a olhar este **trabalho** como algo maior e além de mim mesma.

ABREVIATURAS E SIGLAS	5
AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS.....	7
AGRADECIMENTOS PESSOAIS	8
SUMÁRIO	11
ÍNDICE DE FIGURAS.....	13
ÍNDICE DE TABELAS.....	15
AVANT-PROPOS.....	16
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
INTRODUÇÃO – AS TOXINAS DE ORIGEM NATURAL	20
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
PEPTÍDEOS BIOATIVOS PRESENTES NA SECREÇÃO CUTÂNEA DE ANUROS.....	23
O Anuro <i>Hypsiboas punctatus</i>	23
Os anfíbios, sua pele e suas biomoléculas.....	24
Os peptídeos antimicrobianos de anuros.....	26
Modificações pós-traducionais em peptídeos de anfíbios	28
Estrutura e modo de ação dos peptídeos antimicrobianos de anfíbios.....	30
Estudos estruturais de peptídeos antimicrobianos de anfíbios.....	34
AS PERCEPÇÕES QUÍMICO-SENSORIAIS DOS ANIMAIS	35
Estrutura de peptídeos relacionados com amargor.....	38
O amargor como estratégia de defesa em anfíbios.....	40
JUSTIFICATIVA	42
OBJETIVOS.....	43
Objetivos específicos e estratégias adotadas.....	43
MATERIAL E MÉTODOS	45
Coleta dos animais	46
Extração do tecido granular.....	47
Extração da secreção cutânea.....	47
Construção de bibliotecas de cDNAs codificadores de peptídeos antimicrobianos.....	47

Extração do RNA total e síntese da cDNA	47
Amplificação dos cDNAs por PCR.....	47
Clonagem dos produtos de PCR, transformação dos clones e purificação dos plasmídeos.	48
Análise e alinhamento de sequências nucleotídicas e peptídicas.	49
Separação e purificação dos peptídeos	50
Análise por espectrometria de massa (MS) e sequenciamento de novo	50
Degradação de EDMAN	51
Síntese do peptídeo Fenilseptina - L-Phes e D-Phes	51
Estudos estruturais por mobilidade iônica e espectrometria de massa (IM-MS)	54
Dados estruturais obtidos por RMN.....	54
Análise da atividade antimicrobiana.	56
Caracterização das propriedades gustatórias.....	57
Preparação dos estímulos Metilxantinas: Cafeína, Teofilina e Teobromina	57
Peptídeos: L-Phes e D-Phes	57
Avaliação comportamental da resposta gustativa em camundongos.....	58
Câmaras comportamentais	59
Testes de Preferência com dois recipientes	59
Análise de dados comportamentais	59

RESULTADOS61

Purificação e identificação dos componentes presentes na secreção cutânea de <i>H. punctatus</i>	62
Hilaseptinas (Hsp) – Purificação, identificação e caracterização.....	64
Análise dos cDNAs codificadores de hilaseptinas	71
Determinação da atividade antimicrobiana de hilaseptinas.....	73
Fenilseptinas (Phes) – Identificação, purificação e caracterização.	74
Um único gene codificador da família Fenilseptina.....	79
D- fenilalanina está presente no peptídeo natural D- Phes ('b').....	81
L- Phes e D- Phes tem atividade antimicrobiana distinta.....	85
Estudos conformacionais dos análogos de fenilseptina por Mobilidade iônica acoplada a espectrometria de massa (IM-MS).	86
Estruturas de Fenilseptinas obtidas por RMN.....	88
Estrutura primária relacionado com amargor em fenilseptinas	98
Caracterização das propriedades gustativas	99
Preferências gustativas em camundongos <i>Trpm5</i> KO e WT envolvendo alcalóides tipicamente amargos.	99
Preferências gustativas em camundongos <i>Trpm5</i> KO e WT envolvendo fenilseptinas de <i>H. punctatus</i>	100
Importância da estrutura primária dos peptídeos para a percepção gustatória.	101

DISCUSSÃO.....103

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....109

ANEXOS.....124

Tabela de aminoácidos	124
Purificação e espectros MS e MS/MS das hilaseptinas identificadas.	127

Figura 1. Estrutura geral do cDNA codificador de peptídeos antimicrobianos.	27
Figura 2. Exemplos de estruturas de peptídeos de defesa encontrados em diferentes espécies.....	31
Figura 3. Exemplos de modelos para mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos.	33
Figura 4. Célula gustativa.	35
Figura 5. Esquema representativo dos receptores de gostos umami, doce, amargo e azedo.....	37
Figura 6. Mapa de alguns biomas do Brasil mostrando a localização dos representantes da espécie de anfíbio investigadas..	46
Figura 7. Suporte sólido utilizado para a síntese de peptídeos..	52
Figura 8. Reação de ninhidrina para detecção de amina primária. Teste de Kaiser, Troll e Cannan, 1953.	53
Figura 9. Cromatograma do extrato bruto fracionado de <i>H. punctatus</i>	62
Figura 10. Purificação e caracterização de Hilaseptinas de <i>H. punctatus</i>	69
Figura 11. Localização das hilaseptinas pertencentes ao grupo 02..	70
Figura 12. Identificação dos cDNAs codificadores de Hilaseptinas (Hsp).....	72
Figura 13. Identificação e purificação de fenilseptinas presentes na secreção cutânea de <i>H. punctatus</i>	75
Figura 14. Determinação da massa molecular e tempo de retenção de fenilseptinas.....	76
Figura 15. Assinalamento do espectro de MS/MS para os fragmentos dos peptídeos L/D- Phes.	77
Figura 16. Um único gene codificador de fenilseptinas (A) Sequência nucleotídica do gene codificador de fenilseptina.....	80
Figura 17. Análises por UFLC e espectrometria de massa da digestão enzimática dos peptídeos naturais L/D- Phes.	82
Figura 18. Purificação do peptídeo sintético L-Phes.	83
Figura 19. Purificação do peptídeo sintético D-Phes.	84
Figura 20. Análise da mobilidade iônica dos peptídeos L- e D- Phes.....	87
Figura 21. Mapa de contornos parcial TOCSY (800 MHz) de (A) L-Phes e (B) D-Phes em solução de TFE/H ₂ O 40:60 v/v da região de interação das fenilalaninas..	90
Figura 22. Mapa de contornos parciais NOESY (800 MHz) de D-Phes da região do $\alpha\text{N}_{(i,i+1)}$ mostrando a interação entre Phe2 e Leu6, Phe3 e Phe1.....	91
Figura 23. Número de constraints de eNOEs para cada resíduo de aminoácido utilizado no cálculo da estrutura em 60% TFE para os dois peptídeos L-/D-Phes..	92
Figura 24. Deslocamento químico dos prótons de αCH dos peptídeos L- Phes e D- Phes 2 mmol mL ⁻¹ em TFE/H ₂ O (40:60).....	93
Figura 25. Estruturas calculadas de L/D- Phes em TFE/ H ₂ O (40/60, v/v) a partir de dados de RMN.....	95

Figura 26. Estruturas calculadas de D-Phes (A)-(C) e L-Phes (B)-(D).	96
Figura 27. Estruturas calculadas de D-Phes e L-Phes com destaque para as fenilalaninas.....	97
Figura 28. As fenilseptinas apresentam o típico motivo de amargor phe-phe-phe.....	98
Figura 29. A estrutura primária nos peptídeos é fundamental para as percepções gustatórias das fenilseptinas.	102

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados nas ampliações de PCR	48
Tabela 2. Mistura peptídica utilizada para calibração do espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics).....	51
Tabela 3. Lista das massas moleculares encontradas na secreção do anuro <i>H. punctatus</i> adquiridas por MALDI-TOF/TOF em modo de aquisição refletido e linear.	63
Tabela 4. Sequências de aminoácidos dos peptídeos da família das Hilaseptinas (Hsp) identificadas no anuro <i>H. punctatus</i>.	64
Tabela 5. Sequências de aminoácidos dos fragmentos de peptídeos da família Hsp.	69
Tabela 6. Determinação da atividade antibacteriana das Hilaseptinas oriundas de <i>H. punctatus</i>.	73
Tabela 7. Íons preditos de fenilseptina que corroboram com aqueles observados experimentalmente.....	78
Tabela 8. Fragmentos trípticos teóricos gerados pela fragmentação com a enzima tripsina	81
Tabela 9. Determinação da atividade antibacteriana das Fenilseptinas oriundas de <i>H. punctatus</i>.	85
Tabela 10. Dados e estatísticos obtidos das análises das estruturas de L/D- Phes em 60% TFE/H₂O.....	94

No ano de 2006, iniciei a jornada “*o meu doutorado*”, sob a orientação do Dr. Carlos Bloch. A partir daquele ponto, minha postura diante ciência tornar-se-ia mais crítica, e severa. E, sinceramente, esta foi uma jornada de autoconhecimento e de compreensão sobre o que seria pensar *verdades e ciência*. Parafraseando Rudolf Flesh, no livro *The Art of Clear Thinking* (1951), compreendi que:

“A coisa mais importante, a saber, com respeito à ciência é a seguinte: não é uma busca da verdade, mas uma busca do erro. Um cientista vive num mundo onde a verdade é inatingível, mas onde é sempre possível encontrar erros no que foi pensamente estabelecido ou no óbvio. Se você quiser saber se alguma teoria é realmente científica experimente o seguinte teste: se o texto está truncado com ‘talvez’ e ‘possivelmente’, qualificações, justificativas, então provavelmente é científico; quando se afirma ser a verdade final, não é científico.”

Na maior parte de nossa existência somos alheios a diversos assuntos, o que nos leva à ânsia em busca de novos conhecimentos e a caminhos, os quais permitem uma ampliação da visão crítica, neste caso, em relação à ciência. A compreensão de questões básicas sobre “*o que são verdades em ciência?*” incomoda, levando a busca pela compreensão do grande contrassenso presente na ciência moderna, no qual a soberba e a negligência, criadas pelo saber determinante, são capazes de reduzir a diversidade do mundo a ele mesmo. Fato esse que aprisiona *um saber*, nos tornando iludidos ao falso fato de estarmos sozinhos no universo.

Entretanto, para nós que estamos absorvidos com o desenvolvimento de um conhecimento crítico a mais sobre as moléculas presentes na secreção de anfíbios, entendemos que precisamos observar a ciência destas moléculas, como organismos que necessitam de uma perspectiva que integre a sua morfologia, sua fisiologia, sua bioquímica, seu comportamento e sua ecologia.

Acreditamos que toda esta informação deve ser colocada dentro de um contexto evolutivo com o intuito de compreender o que cada uma destas informações está carregando e contribuindo para a fantástica escola destes encantadores animais, que representam tão bem a transição para a vida terrestre dos vertebrados.

E foi dentro desta escola que aprendemos a observar estas moléculas sob uma nova perspectiva, na qual as características únicas na estrutura primária nos guiaram a uma nova ideia. Esta ideia foi desenvolvida e consolidada no período de doutorado sanduíche na *Yale*

University, sob a orientação do Dr. Ivan Eid de Araújo. Mais importante que aprender neurociência, foi aprender a dialogar ciência. Como diria Marcel Proust:

“A verdadeira origem da descoberta consiste não em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”

Este estudo é um enriquecimento sobre o ‘re-pensar’ o saber categórico, entendendo o nosso conhecimento sobre uma nova miragem. Entendemos, aqui, que as moléculas presentes nos anfíbios são capazes de carregar informações sobre as mais distintas histórias, as quais os seres vivos travaram ao longo da história de sua existência.

Contudo, esta tese é o fruto de uma breve vida fascinada pelos mistérios do mundo, e de seus habitantes. A busca pela compreensão microscópica daquilo que nos torna, hoje, capazes de sobreviver em um mundo ilógico, e pouco reflexivo.

As toxinas de origem vegetal, animal e microbiana há muito despertam o interesse do homem. Assim, a busca por moléculas bioativas que permitam uma ampla biblioteca informativa surge como alternativa na busca de soluções de problemas agrícolas e farmacológicos. A pele dos anfíbios é uma rica fonte destas moléculas, as quais são produzidas pelas glândulas serosas holócrinas do tegumento, as quais estão localizadas nos grânulos do lúmen, e são liberadas sob a presença de estímulos apropriados. Suas funções são variadas, atuando tanto na regulação das funções fisiológicas da pele, como na defesa contra predadores e microrganismos. As moléculas mais estudadas são os peptídeos antimicrobianos (PAM), os quais atuam diretamente na defesa química contra patógenos. Neste trabalho, foi estudada uma nova classe de PAM presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas punctatus*, as fenilseptinas (Phes). Estas são peptídeos antimicrobianos de 18 resíduos de aminoácido (FFFDTLKNLAGKVIGALT-NH₂), com massa molecular $M+H^+=1954.2$, as quais ocorrem naturalmente na forma de uma mistura racêmica (L-/D-Phes), e apresentam propriedades sensoriais. A enantiomerização do resíduo de aminoácido Phe₂ e a amidação C-terminal foram estudadas e confirmadas por uma combinação de técnicas incluindo RP-UFLC, espectrometria de massa combinada com mobilidade iônica, experimentos de MS/MS de alta resolução, sequenciamento de cDNA, síntese de peptídeos em fase sólida e sequenciamento N-terminal por degradação de Edman. Os estudos detalhados das 20 estruturas de menor energia obtidas por experimentos de ¹H RMN demonstram que os peptídeos assumem uma conformação de α -hélice dos resíduos 5-18 (RMSD 0.22 ± 0.09), e existe em D-Phes uma mudança de 90° na orientação da porção N-terminal 1-3. Os peptídeos foram ativos contra bactérias gram-positivas e gram-negativas em ensaios de determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* (e.x. *S. aureus* -65,5 e 32,7 μ M, L-Phes e D-Phes, respectivamente). E, as mesmas moléculas foram testadas em camundongos às propriedades gustativas, em um sistema de animais KO para um canal iônico essencial para a transdução do sabor amargo e doce (*Trpm5*). Os camundongos WT rejeitaram os peptídeos ($p < 0,05$), enquanto que os camundongos KO foram indiferentes aos mesmos ($p > 0,3$). Provavelmente, as divergências estruturais são mais relacionadas com as diferenças observadas em relação às atividades antimicrobianas diferenciadas entre as duas moléculas, do que com as propriedades sensoriais. Fenilseptinas representam o primeiro relato de moléculas antimicrobianas, com propriedades sensoriais e enorme plasticidade estrutural.

Toxins from plant, animal and microorganism long light the interest of man. Thus, the search for bioactive molecules that allow a large databank appears as an alternative looking for solutions to agricultural problems and pharmacological. Amphibian skin secretions is a rich source of these molecules, which are produced by serous holocrine glands, which are located in the lumen of the granules and are released in the presence of appropriate stimuli. Their functions are diverse, acting both in the regulation of physiological functions of the skin, as in defense against predators and microorganisms. The molecules most studied are the naturally occurring antimicrobial peptides (AMP), which act directly on the chemical defense against pathogens. Here we report a new class of AMP present in the skin secretions of anuran *Hypsiboas punctatus*, the fenilseptina (Phes). These are antimicrobial peptides of 18 amino acid residues (FFFDTLKKNLAGKVIGALT-NH₂), with a molecular mass of M+H⁺ = 1954.2, that was purified as two naturally occurring D- and L-Phe analogs, with sensorial properties. The amino acid epimerazition and C-terminal amidation for both molecules (in short, D-Phes and L-Phes) were confirmed by a combination of techniques including reverse-phase UPLC, ion mobility mass spectrometry, high resolution MS/MS experiments, Edman degradation, cDNA sequencing and solid-phase peptide synthesis. RMSD analysis of the twenty best ¹H NMR structures of each peptide revealed that the peptides assume an α -helical conformation of residues 5-18 (RMSD 0:22 \pm 0.09), and there is D-Phes has a major 90° difference between the two backbones at the first four N-terminal residues and substantial orientation changes of the respective side chains. The peptides were active against gram-positive and gram-negative *in vitro* assays (*S. aureus* -65.5 and 32.7 mM, L- and D-Phes Phes, respectively). And the same molecules were tested in mice to evaluate the properties in a system of KO animals to a ion channel essential for transduction of bitter and sweet (*Trpm5*). The mice rejected the WT peptide ($p < 0.05$), while the KO mice were indifferent to them ($p > 0.3$). These structural divergences are most likely linked to the quantified differences in antimicrobial potencies determined for both molecules, but produced no detectable change in the gustatory aversive behavior. Perhaps the Phenylseptins are early examples of the amazing plasticity of small biomolecules yet to be understood.

Existe nos seres vivos um empenho contínuo para maximizar seu potencial de sobrevivência. Desde os primórdios da existência, os organismos desenvolveram mecanismos de proteção aos perigos existentes, respondendo às mudanças que ocorrem em seu *habitat*. As constantes pressões do ambiente e a luta pela sobrevivência iniciaram uma história biológica, a qual permitiu a incorporação e o desenvolvimento de diferentes estratégias, sejam elas químicas ou biológicas (Futuyma, 2002).

Os exemplos de estratégias químicas de defesa na natureza são encontrados desde os gambás (*Didelphis* sp), que liberam tióis em resposta ao perigo, até as plantas trepadeiras (i.e. *Acacia catechu*), que produzem catecóis para se proteger de seus invasores. Essas moléculas são conhecidas como toxinas, e encontram-se amplamente distribuídas na natureza (Clement, 1998; Wood et al., 2002).

Qualquer que seja o repositório biológico das toxinas, estas se caracterizam por sua origem natural e pela sua habilidade em tornar as funções vitais dos outros organismos fracas e debilitadas, podendo levar a morte. Esta habilidade garantiu, no curso da evolução, a sobrevivência de muitas espécies, criando uma íntima relação molecular entre uma toxina e o seu mecanismo fisiológico específico de envenenamento¹ (Duellman, 1986; Kordis e Gubensek, 2000).

Uma estratégia de defesa comumente adotada, tanto por plantas quanto por animais, é a produção de substâncias capazes de provê-los de gostos e de odores repelentes, criando um sistema de alerta aos seus invasores. Em plantas, um exemplo clássico, são as substâncias alcalóides, como as metilxantinas, presentes em sementes, frutos e folhas de espécies, como o café, o chá e o cacau, na forma de cafeína, teofilina e teobromina, respectivamente (Poe e Johnson, 1953; Gurney, 1971). Estas moléculas, conhecidamente amargas e aversivas, atuam como inseticidas naturais protegendo as plantas contra o ataque de predadores (Kim et al., 2010).

Exemplos de estratégias de defesa utilizando o amargor também são descritas em anfíbios da Ordem Anura. A secreção cutânea destes animais possui papel diversificado sobre as funções fisiológicas da pele (i.e. respiração), e é rica em diferentes substâncias (i.e. alcaloides, amins biogênicas, peptídeos e proteínas), as quais são capazes de prover os

¹ Ato ou efeito de envenenar (-se); Intoxicação, que por extensão é o ato de ingerir ou absorver droga, ou qualquer substância nociva ao organismo (Dicionário Aurélio Eletrônico, XXI, Versão III).

animais de gosto, de odor repelente e de propriedades adesivas que interferem nos processos de ingestão pelo predador, além de causarem náuseas, perda de coordenação e de consciência ou eventual morte (Neuwirth et al., 1979; Duellman, 1986; Prates, 2003). Esta impalatabilidade², ou aversão, é interpretada por mamíferos e alguns peixes como sinais naturais de perigo (Darst e Cummings, 2006; Darst et al., 2006).

Isso ocorre porque, para os seres vivos em geral, o sentido do paladar desempenha um papel fundamental na distinção entre presas/alimentos seguros daqueles potencialmente tóxicos, os quais podem ser danosos ou até mesmo fatais (Amrein e Bray, 2003; Boughter e Bachmanov, 2007). Estas informações são detectadas por sensores periféricos, e posteriormente enviadas ao Sistema Nervoso Central, de onde respostas comportamentais de aproximação/ingestão ou rejeição são geradas. Desse modo, grande parte dos animais possui uma instintiva aversão a substâncias amargas, sendo esta uma percepção muito mais sutil, que caminha além do caráter hedônico do paladar (Duellman, 1986; Scott, 2005).

Em anfíbios, a busca por moléculas com funções diversas, relacionadas com estratégias de defesa como a mencionada acima, ainda é escassa, apesar de pesquisas que demonstram a rejeição destes animais por predadores (Scott, 2005). Isso destaca a importância do desenvolvimento de pesquisas sobre a identificação e a caracterização de moléculas presentes nas suas secreções, buscando-se novas funções capazes de fornecer dados que auxiliem os estudos sobre a biologia destas moléculas.

No presente estudo, prospectamos peptídeos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas punctatus*, e caracterizamos duas classes: as hilaseptinas, descritas anteriormente por Prates, et al., 2004, e uma nova classe de moléculas, as fenilseptinas. Esta última classe foi caracterizada bioquímica e estruturalmente, e, a partir das informações obtidas, hipotetizamos: *Teriam também as fenilseptinas propriedades químico-sensoriais?*

Desta forma, criamos um novo cenário para observar estas moléculas e fundamentar nossas ideias a respeito de moléculas com múltiplas funções.

² O termo *impalatabilidade* descreve algo que provoca sensação de desagrado; desprazer; ao ser comido e/ou ingerido.

Revisão bibliográfica

O Anuro *Hypsiboas punctatus*.

H. punctatus (*Hyla punctata* - Schneider 1799) é um anfíbio pertencente à família Hylidae. Em 2004, Faivovich e colaboradores revisaram esta espécie, e em 2006 incluíram-na no gênero *Hypsiboas* (Faivovich et al., 2004; Frost, 2004).

A coloração desta espécie é extremamente variável, sendo de característica noturna, com predominância verde e de manchas marrom-avermelhadas fortes. Durante o dia, estas manchas tornam-se dispersas e menores, podendo ser quase inexistentes, mantendo desta forma uma coloração verde-amarelada intensa (Duellman, 1986). De acordo com Frost (2004), a espécie ocorre nas regiões amazônicas do Equador, Peru, Bolívia e Brasil, podendo ocorrer também no Brasil Central, Paraguai e Argentina, Guianas, Guiana Francesa, Suriname, Nordeste da Colômbia, Trinidad e Tobago e Venezuela.

Espécimes de *H. punctatus* foram identificados em florestas primárias e secundárias (Duellman, 1986), mas são predominantemente encontrados em matas rasteiras e arbustos (entre as folhas), em áreas inundadas, pântanos sazonais, fossos ou rios. A presença desta espécie também é muitas vezes associada a uma planta denominada *Montrichardia arborescens*. Os ovos e girinos desenvolvem-se na água, em áreas degradadas, jardins de características rurais e até mesmo no entorno das cidades (Lopez et al., 2009).

Os componentes da secreção desta espécie foram pouco estudados e, até o momento, existem: uma publicação na revista *Journal of Biological Chemistry*, realizada por Prates e colaboradores, em 2004; uma tese de doutorado apresentada pela mesma autora, em 2003; e uma dissertação de mestrado apresentada por Ribeiro (2011).

O primeiro trabalho descreve o peptídeo Hylaseptina P1, o qual foi classificado como antimicrobiano, com base em ensaios realizados *in vitro* contra bactérias e fungos patogênicos humanos. Este trabalho estabeleceu o primeiro relato dessa classe de peptídeos na secreção da pele de anfíbios. Os dois últimos trabalhos descrevem um neuropeptídeo classificado como Hp-somatostatina, devido à alta similaridade com o hormônio somatostatina, classicamente encontrado no cérebro e no sistema digestivo de vertebrados superiores, inclusive em humanos (Prates, 2003; Ribeiro, 2011).

Os anfíbios, sua pele e suas biomoléculas.

A palavra *amphibia*, de origem latina, é traduzida para o português como ‘duas vidas’. Ela descreve, assim, a característica mais importante destes animais: viver pelo menos uma fase da vida em ambiente aquático, e outra fase em ambiente terrestre³ (Duellman, 1986; Clarke, 1997).

Estes animais (grupo Amphibia) são descendentes dos primeiros vertebrados a conquistar o ambiente terrestre. O estudo de fósseis relativos a animais existentes há 350 milhões de anos (Período Devoniano) evidenciam que os anfíbios compartilham um ancestral comum com o crossopterigianos. Os anfíbios primitivos possuíam características muito distintas daqueles que conhecemos hoje, os anfíbios modernos, os quais surgiram cerca de 250 milhões de anos (Gee, 1989; Strother et al., 2011).

O fóssil mais antigo de um anfíbio com a forma atual dos anuros é conhecido como *Triadobatrachus* e foi encontrado em Madagascar, em uma decomposição de sedimentos datada do Período Triássico (220-230 milhões de anos atrás). Apesar de estes animais serem intermediários entre os peixes completamente aquáticos e os amniotas terrestres, não podemos defini-los simplesmente como elementos transicionais em questões como morfologia, vida, história, ecologia e comportamento (Gee, 1989). Estes animais contam uma das histórias de maior sucesso da vida na Terra, e por milhões de anos, adaptaram-se a ambientes distintos, gerando diversidade desde as formas de locomoção até as estratégias de defesa. A partir disso, surgiram morfologias especializadas que, possivelmente, garantiram tal sucesso evolutivo (Trueb, 1973; Clarke, 1997).

O tegumento (ou pele) destes animais - um exemplo de morfologia especializada - o qual é desprovido de escamas externas - é altamente permeável à água e encoberto por glândulas. As glândulas mucosas presentes são em geral coloridas, com padrões e cores tão confrontantes quanto aqueles presentes em aves coloridas (Noonan e Comeault, 2009; Schempp et al., 2009). A estas características, utilizadas como estratégia de camuflagem das espécies ou alerta de toxicidade, somam-se os padrões de comportamento (i.e mimetismo), e a sua exposição constante a predadores, o que culminou no surgimento de diversificadas adaptações para evitar situações de perigo. Tanto a coloração, o caráter granular, quanto a

³ Salientando que alguns anfíbios são unicamente aquáticos (i.e. *Pipa pipa*, *Xenopus laevis* e algumas salamandras), enquanto outros são adaptados ao ambiente terrestre (i.e. *Bufo sp.*).

permeabilidade da pele têm importância fundamental na modelagem da evolução e ecologia dos anfíbios (Duellman, 1986; Daly, 1995).

As glândulas mucosas presentes em toda a superfície da pele dos anuros produzem uma secreção rica em compostos mucopolissacarídicos biologicamente ativos, que se espalha por todo o corpo mantendo a pele úmida, permeável à água e aos gases (oxigênio) e regulando a temperatura corpórea dentro de limites estáveis. Nos sistemas biológicos, a permeabilidade à água é inseparável da permeabilidade aos gases, e os anfíbios são animais dependentes da respiração cutânea, sendo esta responsável por uma parcela significativa de suas trocas gasosas (Duellman, 1986).

Em espécimes de anfíbios terrestres, a pele permite o movimento passivo de água e de gases, controlando o movimento de outros compostos, regulando o equilíbrio osmótico e a entrada de água (Clarke, 1997). Deste modo, é formado, na superfície da pele, um microambiente propício para o desenvolvimento de microrganismos oportunistas (vírus, bactérias, fungos e protozoários), os quais acompanham os anfíbios em todas as fases da vida (Clarke, 1997; Peschel e Sahl, 2006).

Esta susceptibilidade obrigou a estes animais desenvolverem um eficiente sistema de defesa formado pela secreção presente na pele e seus compostos bioativos, os quais podem ser tóxicos como os alcalóides, as aminas biogênicas, as proteínas e os peptídeos. Os peptídeos podem ser neuroativos (i.e. somatostatina⁴), sinalizadores químicos (i.e. feromônios), inibidores de proteases (i.e. FTKI em *Phyllomedusa* sp.), proteger contra predadores de pequeno e médio porte (i.e. batracotoxinas) e atuar como agentes antimicrobianos (i.e. dermaseptinas, filoseptinas, bombesinas, aureinas). Entretanto, a grande maioria não possui função conhecida (Daly, 1995; Brand et al., 2002; Nascimento et al., 2003; Leite et al., 2005; Conlon et al., 2009; Conlon e Sonnevend, 2010).

⁴ Relembrando: Somatostatina é um neuropeptídeo, classicamente encontrado no cérebro e no sistema digestivo de vertebrados superiores, inclusive em humano, e um análogo classificado como Hp-somatostatina, foi encontrado no espécime *Hypsiboas punctatus*. Ver introdução da tese.

Os peptídeos antimicrobianos de anuros.

A caracterização funcional e estrutural de um grande número de moléculas bioativas presentes em anuros foi realizada pelo farmacologista italiano Vittorio Erspamer e pelo biólogo americano John W. Daly (Erspamer et al., 1985). No início da década de 70, Erspamer realizou estudos sistemáticos que levaram a descoberta de diferentes funções farmacológicas para estas moléculas (i.e. hipotensoras, hormônios, antimicrobianas) (Erspamer et al., 1967; Anastasi e Erspamer, 1970; Erspamer, 1971; Erspamer et al., 1993). Na mesma época os pesquisadores austríacos Csordas e Michl descreveram a bombinina, um peptídeo contendo 24 resíduos de aminoácido, presente na secreção do anuro europeu *Bombina variegata* (Csordas e Michl, 1969).

Os primeiros registros de peptídeo oriundos de anfíbios com ação antimicrobiana datam de mais de 20 anos, quando Zasloff, em 1987, isolou da secreção da pele do sapo africano *Xenopus laevis* (Pipidae) uma molécula conhecida como magainina (Zasloff, 1987). Posteriormente, descobriu-se que os genes codificam peptídeos que são expressos na forma de pré-pró-peptídeo, os quais apresentam um padrão de duas regiões conservadas (peptídeo sinal e região acídica) e uma hipermutável (peptídeo maduro), podendo sofrer diferentes tipos de modificações pós-traducionais (i.e. clivagens enzimáticas, amidação, acetilação, sulfonação, enantiomerização de aminoácidos) (Conlon, Abraham et al., 2005; Conlon, Jouenne et al., 2005).

Quando secretados, os pré-pró-peptídeos são clivados enzimaticamente, em sítios específicos liberando o peptídeo biologicamente ativo (Figura 1 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Os peptídeos maduros possuem de 10 a 50 resíduos de aminoácidos, sendo que uma quantidade elevada destes possui caráter hidrofóbico (hidrofobicidade), uma carga residual positiva (cationicidade), bem como a conformação em α -hélice anfifílica (uma face apolar em contraste com uma face polar e separação de cargas), e podem compartilhar identidade em sua estrutura primária (Haney et al., 2009; Mangoni et al., 2011). Especificamente, em secreções de algumas espécies, alguns peptídeos podem ser agrupados em famílias a partir de semelhanças na sequência de aminoácidos, porém membros de uma mesma família podem ter graus de potência e seletividade diferenciados (Conlon et al., 2004; Nicolas e El Amri, 2009).

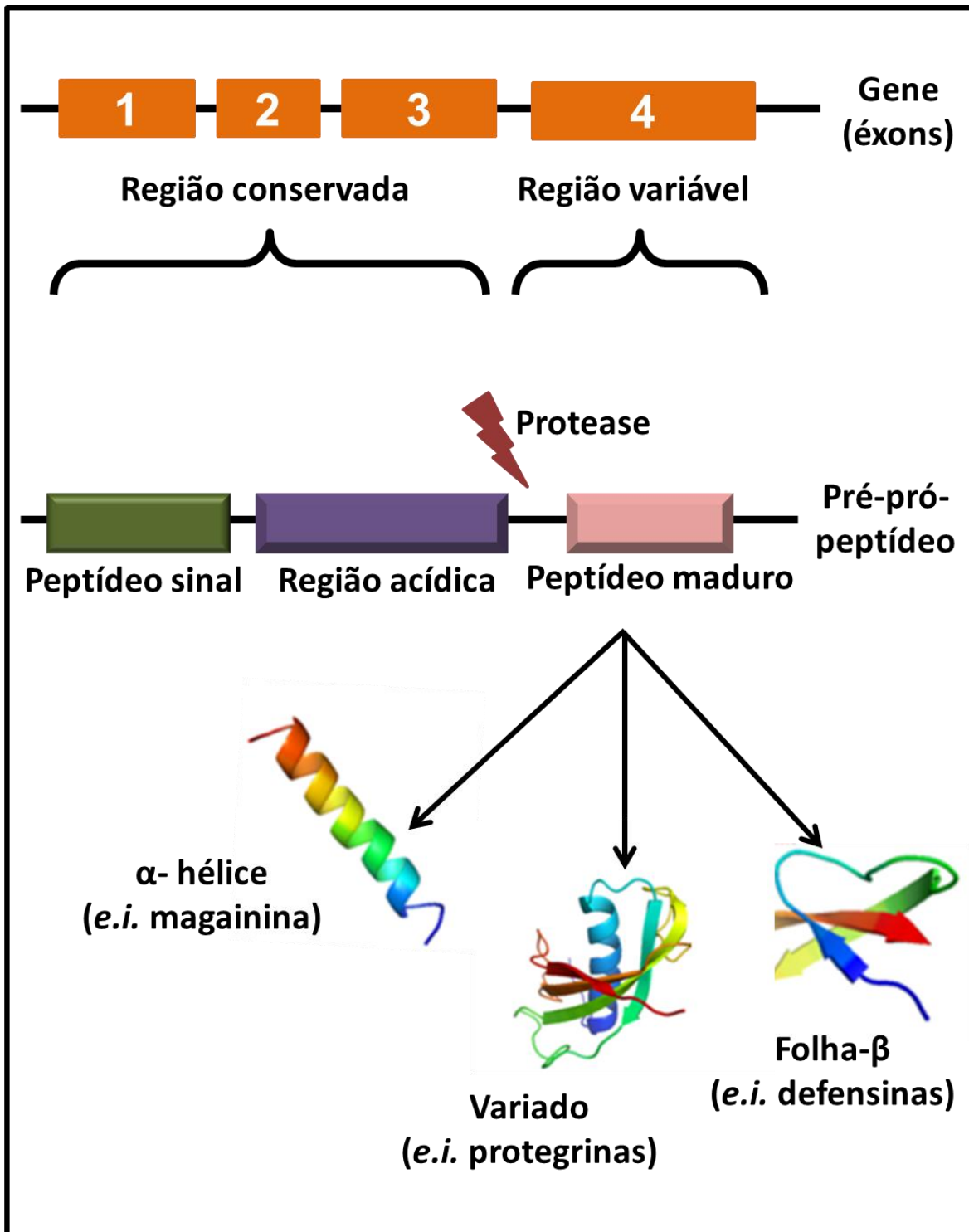


Figura 1. Estrutura geral do cDNA codificador de peptídeos antimicrobianos. Em coloração laranja estão representados os éxons presente na estrutura gênica. Em verde, o peptídeo sinal, em roxo a região acídica, e finalmente em coloração rosa o peptídeo maduro, o qual é secretado/liberado após a ação de enzimas específicas. Na figura exemplos das diferentes estruturas que os peptídeos antimicrobianos podem assumir.

Especula-se que estes peptídeos surgiram a partir da duplicação de um gene ancestral (Tenessen e Blouin, 2007) e que a multiplicidade pode fornecer um espectro mais amplo de defesa contra uma gama maior de microrganismos. Contudo, estas hipóteses ainda não são comprovadas (Peschel e Sahl, 2006; Tennessen et al., 2009). Alguns pesquisadores utilizam a sequência de aminoácidos destes peptídeos para complementar outros tipos de análises filogenéticas (i.e. cladística), como comparação de genes ortólogos, para elucidar a história evolutiva de determinados gêneros (Conlon et al. 2004a, 2009d).

Hoje se sabe que a conservação da sequência de aminoácidos não é crucial para a sua função e que os mecanismos que regem sua atividade estão relacionados com outras características (Haney et al., 2009). Acredita-se que a variabilidade estrutural destes PAMs seja consequência da diversidade de microrganismos oportunistas, os quais compartilham o habitat dos anfíbios (Simmaco et al., 1994; Peschel e Sahl, 2006). Sendo estas as moléculas efetoras diretas para a imunidade inata dos anfíbios, a seleção natural teria impulsionado a geração de moléculas de amplo espectro, ou com seletividade para determinados alvos, nos fazendo inferir que a diversidade molecular é um resultado da interação do hospedeiro com um número variado de microrganismos, em seu ambiente natural (Mor et al., 1994).

Modificações pós-traducionais em peptídeos de anfíbios

Sabemos que as proteínas são sintetizadas nos polissomos⁵ como cadeias simples de aminoácidos, e que este produto primário pode ser modificado por uma série de reações conhecidas como **processamento pós-traducional**. As extremidades amino e carboxi-terminais podem ser bloqueadas, bem como alguns motivos, pequenos ou grandes, podem ser adicionados às cadeias simples de aminoácidos. De uma forma geral, praticamente todos os grupos reativos das proteínas presente em um organismo podem ser modificados quimicamente *in vivo* (Holland e Wagh, 1984; Auvynet et al., 2006).

Estas reações podem alterar as propriedades dos produtos primários básicos modificando a solubilidade, a estabilidade, as interações com receptores ou com outras proteínas e a localização subcelular (i.e. pela adição de motivos apolares), e toda a rede de transdução de sinal pode ser alterada pela desfosforilação de certos aminoácidos (i.e. serina, treonina e tirosina). São estas e outras modificações pós-traducionais que contribui para a diversidade biológica e, provavelmente, a vida como nós conhecemos seria inimaginável (Kreil, 1997).

⁵ Polissomos são ribonucleoproteínas formadas por rRNA (RNA ribossomal) e proteínas.

Neste trabalho vamos destacar a presença de um tipo específico de modificação pós-traducional: a enantiomerização⁶ (Heck et al., 1996; Kreil, 1997). A história de peptídeos biologicamente ativos contendo D-aminoácido tem início nos primeiros anos da década de 80 e muitos estudos demonstraram a presença destes na secreção de anfíbios, sendo alguns com alta taxa de similaridade aos peptídeos presente em mamíferos (i.e. demorfina e deltorfina) (Erspamer et al., 1989; Melchiorri et al., 1992; Tooyama et al., 1993; Heck et al., 1996; Auvynet et al., 2006).

Logo após o isolamento da encefalina presentes no cérebro de mamíferos (Simantov e Snyder, 1976), Erspamer e colaboradores iniciaram uma busca por análogos presentes na secreção da pele de diferentes anfíbios. Foi este fato que levou ao isolamento das dermorfinas e das deltorfinas presentes na secreção do anuro *Phyllomedusa sauvagei*. Estas moléculas possuem alta afinidade e seletividade aos receptores opióide do tipo μ e δ . As dermorfinas, quando injetadas no cérebro, provocam efeitos de analgesia 1000 vezes mais potentes que a morfina. É interessante notar que o aminoácido presente na segunda posição da sequência é uma D-alanina e que seu isômero contendo o L-alanina, na mesma posição, é desprovido de atividade biológica. Outros peptídeos opióides também presentes na secreção de *Phyllomedusa* têm em sua sequência N-terminal o motivo Tyr-Xaa-Phe, onde Xaa pode ser D-alanina, D-metionina, D-leucina (Broccardo et al., 1981; Erspamer et al., 1981; Erspamer et al., 1989; Kreil et al., 1989; Auvynet et al., 2006).

Uma classe de peptídeos contendo D-aminoácidos são as chamadas bombininas, as quais também possuem a modificação na segunda posição (D- isoleucina), sendo que pequenas quantidades de isômeros contendo L-isoleucina também foram detectadas na secreção do mesmo anfíbio. Em todos os peptídeos mencionados acima, o D-aminoácido parece estar presente na segunda posição das sequências (Gibson et al., 1991; Simmaco et al., 1991).

A formação pós-traducional do D-aminoácido obviamente aumenta a diversidade de produtos que podem ser formados a partir de um único gene. Além do mais, alguns elementos estruturais não podem ser formados pela simples presença de L-aminoácidos. Por exemplo, estudos de difração de raios-x demonstraram que a sequência Gly-**D-Phe**-Ala, forma um tipo particular de estrutura II' B-turn, o que é extremamente importante para a atividade biológica

⁶ Enantiomerização: Conversão enzimática de um resíduo de aminoácido na conformação L- (levógena) para a forma D- (destrógena). Estas formas são especulares (em espelho) uma da outra.

desta molécula, uma vez que a presença de **L-Phe** na posição 2 torna a molécula inativa (Kamatani et al., 1989).

Evidências de estudos de RMN sugerem que peptídeos opióides de anfíbios, formam estruturas em que os anéis aromáticos conseguem interagir. Esta estrutura é crucial para a interação dos peptídeos com os receptores opióides. Para estes peptídeos, o L- isômero não é capaz de se ligar ao receptor correspondente, entretanto outras interações mais sutis são observadas (Naim et al., 1996).

Outro ponto importante a ser salientado é que peptídeos contendo D-aminoácidos são muito mais resistentes à proteólise. Este fato pode ser observado nas dermorfinas, que possuem D-aminoácido em sua porção N-terminal, e não são hidrolisadas por aminopeptidases, enquanto que seu L- isômero é rapidamente degradado (Darlak et al., 1988).

Este tipo de modificação é dificilmente detectado por grande parte das técnicas proteômicas, pois sua ocorrência não implica em mudanças na massa molecular dos aminoácidos. Entretanto, com o avanço das técnicas de Química de Proteínas estes problemas começam a ser resolvidos com maior facilidade (i.e. mobilidade iônica, espectrometria de massa, cromatografia líquida de alta eficiência-HPLC).

Estrutura e modo de ação dos peptídeos antimicrobianos de anfíbios.

Nos tópicos anteriores, discutimos sobre a estrutura primária dos peptídeos antimicrobianos e os processos pelos quais sua diversidade pode ser aumentada e exemplificamos a vasta rede de possibilidades para o seu espectro de ação. Agora entraremos em uma nova etapa, onde será importante compreender que, apesar de compartilharem pouca identidade em relação à estrutura primária, os PAMs podem compartilhar semelhanças com relação aos padrões estruturais, podendo ser categorizados em pelo menos quatro classes estruturais:

- i.* Peptídeos em α -hélice que não possuem cisteína (i.e.defensinas);
- ii.* Peptídeos em folha- β estabilizados por pontes dissulfeto intramoleculares (i.e. Protegrina D);
- iii.* Peptídeos contendo aminoácidos como histidina, prolina e triptofano (i.e. Pro/Arg Bac7);
- iv.* Peptídeos com estrutura estendida (Figura 2).

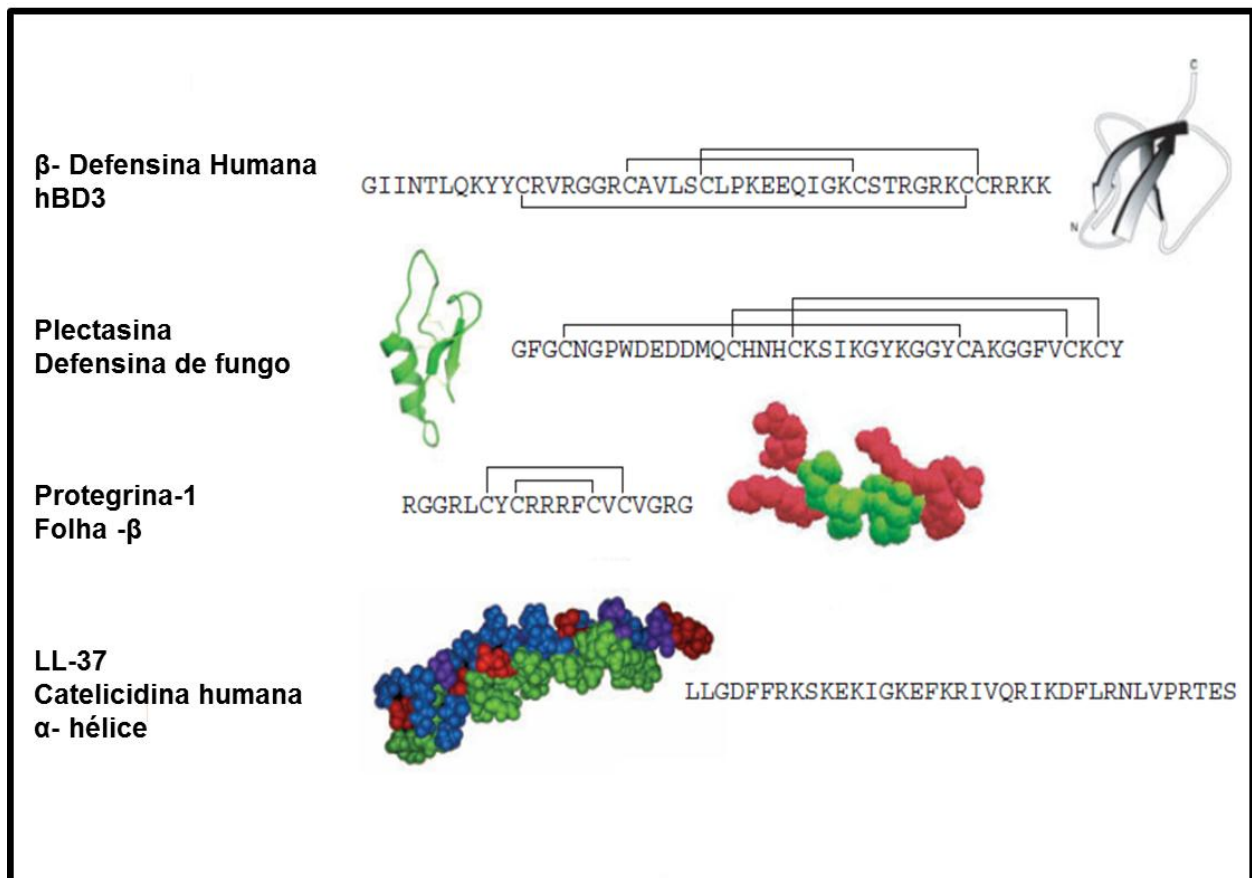


Figura 2. Exemplos de estruturas de peptídeos de defesa encontrados em diferentes espécies. Figura retirada e modificada do artigo Hancock e Sahl, 2006, *Nature Biotechnology*.

Os dois primeiros tipos, em geral, têm uma carga líquida positiva e assumem uma estrutura anfipática, sendo estas características primordiais para o entendimento do mecanismo de ação dos conhecidos PAMs.

A primeira interação dos peptídeos com as células alvo é mediada principalmente por atração eletrostática, causada pelo caráter catiônico dos peptídeos e a abundância de fosfolipídios aniônicos (i.e. fosfatidilglicerol) nas membranas dos microrganismos. Sendo assim, a interação dos peptídeos com as membranas biológicas é dependente não somente das características físico-químicas dos peptídeos, mas também da constituição fosfolipídica de cada tipo celular (Haney et al., 2009).

Em concentrações micromolares, os peptídeos membranolíticos podem agir causando rompimento da membrana plasmática das células procarióticas, enquanto muitas moléculas são incapazes de romper membranas de células de organismos eucarióticos superiores (i.e. as

hemácias) (Brand et al., 2006). Outro fator importante para ação dos peptídeos é a agregação e a posterior integração com a bicamada lipídica, o que resulta na expansão da porção externa levando a membrana à ruptura (Shaw et al., 2006; Chi et al., 2007; Mason et al., 2007).

Existem modelos que sugerem a formação de canais iônicos ou poros, os quais levavam a ruptura das membranas biológicas: os modelos “Barrel-Stave”, “carpet-like”, “toroidal” e “detergent-like”.

O modelo “Barrel-Stave” foi criado no pressuposto de que as regiões do peptídeo hidrofóbico alinham-se com as cadeias acil dos lipídios da membrana, enquanto as regiões hidrofílicas peptídicas formam a superfície interna do canal de poros. Embora amplamente vistos como protótipos para peptídeos indutores de poros, este modelo se encaixa apenas para um número muito restrito de exemplos (Shai, 2002) (Figura 3).

O modelo “carpet-like” descrito por Shai e colaboradores (2002), talvez o mais aceito, baseia-se na ligação dos peptídeos, em sua forma monomérica, à membrana plasmática, com subsequente inserção na membrana para a formação de poros e, por fim, no recrutamento progressivo dos monômeros, gerando agregação, a qual causa aumento no diâmetro do poro formado (Shai, 2002; Shai et al., 2006) (Figura 3).

O modelo “toroidal” descreve que durante o processo de permeabilização da membrana, os peptídeos antimicrobianos interagem continuamente com a porção externa dos fosfolipídeos. Os peptídeos são atraídos eletrostaticamente, ligando-se à superfície da membrana e formando uma estrutura de carpete. Ou seja, os monômeros se alinham na superfície da membrana fazendo com que a face hidrofílica fique frente aos fosfolipídeos. Em seguida, ocorre uma re-orientação dos resíduos hidrofóbicos em direção à região hidrofóbica da membrana, com a posterior formação de poros transientes e desintegração da membrana (Shai, 2002).

E, finalmente o modelo mais geral “detergent-like”, proposto por Bechinger e Lohner em 2006. Este modelo descreve que a permeabilização da membrana ocorre apenas quando os peptídeos atingem alta concentração, envolvendo toda a superfície celular, não existindo uma organização das porções hidrofílicas. Sendo assim, os peptídeos não adotariam uma estrutura determinada no momento da interação com a membrana (Bechinger e Lohner, 2006).

Alguns peptídeos com atividade antitumoral têm seu mecanismo mediado por gangliosídeos negativamente carregados que estão presentes em quantidade anormalmente elevada sobre esses tipos celulares (Lizzi et al., 2009). No entanto, vários PAMs com caráter catiônico ou anfipático menos acentuado são capazes de translocar para dentro do citoplasma

sem permeabilizar a membrana citoplasmática e, aparentemente, abordam alvos intracelulares (i.e. defensina de ervilha Psd1) (Kovaleva et al., 2009)

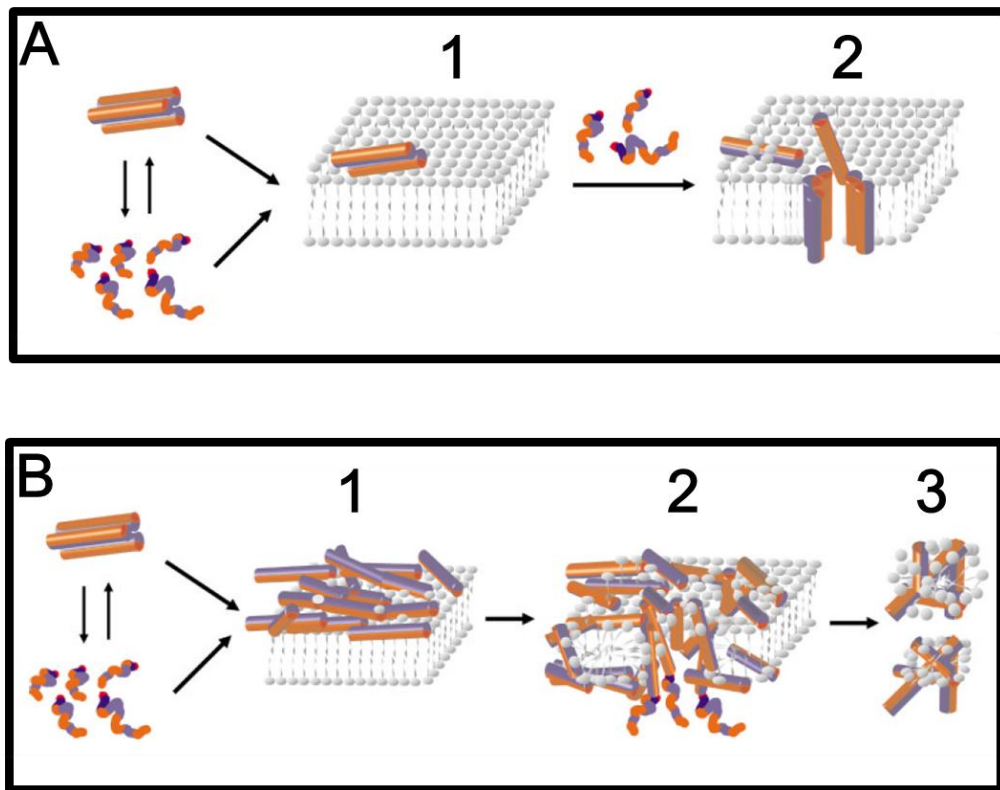


Figura 3. Exemplos de modelos para mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos. (A) Figura representando o modelo “Barrel-stave” de permeabilização dos peptídeos na membrana. (1) O peptídeo encontra a membrana (tanto os monômeros, quanto os oligômeros) e quando atingem a superfície da membrana (2) se inserem no core lipídico da mesma recrutando outros monômeros de peptídeos. (B) Esta figura ilustra o modelo “carpet-like” sugerido para permeabilização dos peptídeos na membrana. (1) Os peptídeos encontram a membrana e se ligam a superfície da mesma com a face hidrofóbica, enquanto a face hidrofílica interage com o solvente. (2) Quando é atingida a concentração crítica de peptídeos monoméricos, a membrana é permeada e poros transitórios são formados, (3) o processo também pode levar a desintegração da membrana. Em coloração azul as superfícies hidrofóbicas, e em vermelho as superfícies hidrofílicas. Figura retirada e adaptada de Shi, 2002. [Biopolymers](#).

Estudos estruturais de peptídeos antimicrobianos de anfíbios.

Resumindo todas as informações e conhecimentos descritos até o momento, observamos que os modelos existentes tentam descrever o modo de ação destes peptídeos, mas talvez mais importante do que compreender os mecanismos é tentar observar os padrões de multiplicidade conformacional, que podem ser gerados a partir das modificações pós-traducionais descritas anteriormente, por degradações enzimáticas, ou simplesmente pela plasticidade das moléculas de poderem se adaptar a diferentes ambientes químicos. Este último ponto é de torna-se relevante se pensarmos nos peptídeos na pele dos anfíbios como moléculas que estão sujeitas desde o contato com a membrana de microrganismos, até um ambiente químico repleto de enzimas com pH diferenciado (i.e. a boca de pequenos mamíferos).

Neste sentido, a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) surge como uma ferramenta importante para a elucidação estrutural de moléculas biológicas em solução, em especial proteínas e peptídeos (Marion et al., 1988; Park et al., 2007; Resende et al., 2008). Foi no início da década de 80, que surgiram os primeiros trabalhos utilizando essa técnica para a obtenção de estruturas tridimensionais de biomoléculas, como a determinação estrutural do glucagon (Braun et al., 1981) e o estudo conformacional, em solução aquosa, de uma entomotoxina proveniente do veneno de um escorpião – utilizando-se metodologias de restrições conformacionais (Arseniev, 1984).

Nessa mesma época, em 1986, Wüthrich desenvolveu a metodologia de atribuição sequencial fundamentada na identificação de sequências únicas de resíduos em cadeias polipeptídicas e de ácidos nucleicos, pela sistematização de informações estruturais dos mapas de contornos de RMN 2D (Wüthrich, 1986). Desde então, a espectroscopia de RMN nos estudos de biomoléculas desenvolveu-se consideravelmente, permitindo a obtenção de espectros em aparelhos de alta resolução e mapas de contornos multidimensionais sem sobreposição de sinais.

As percepções químico-sensoriais são as mais antigas e universais do reino animal, orientando o comportamento das espécies mais do que qualquer outra percepção. Nos animais, os quimiorreceptores são utilizados para diversas finalidades, como por exemplo, encontrar nutrientes e parceiros sexuais, reconhecer território e evitar situações de perigo (Nei et al., 2008). Estas são ações essenciais à sobrevivência dos animais, as quais ao longo do processo evolutivo permaneceram conservadas tanto no ambiente aquático como no terrestre. Os mamíferos são capazes de sentir um variado repertório de estímulos químico-sensoriais, o que permitiu o desenvolvimento de um apurado senso crítico sensorial (Adler et al., 2000; Zhao et al., 2003).

O paladar é responsável por detectar e distinguir entre os mais diversos estímulos. Os compostos químicos capazes de evocar sensações gustativas em humanos são classificados em cinco tipos: o azedo, o salgado, o doce, o umami e o amargo. Os compostos azedos (ácidicos) são detectados por um canal iônico da família TRP, e se supõe atualmente que este também seja o caso para o gosto salgado. Os compostos de sabor doce, umami e amargo, por sua vez, são detectados por células e receptores específicos e foram identificados em várias espécies, incluindo camundongos e humanos (Boughter e Bachmanov, 2007) (Figura 4).

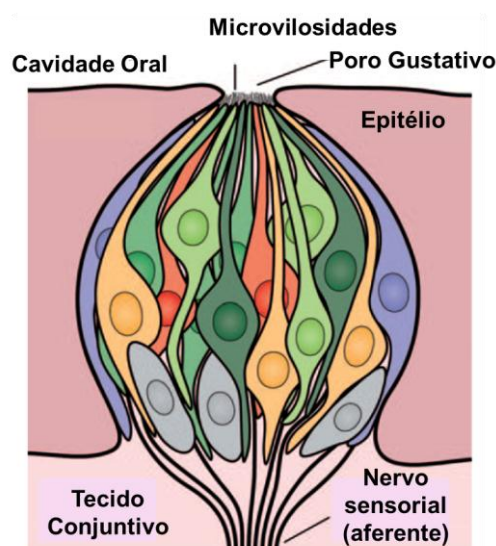


Figura 4. Célula gustativa. Em amarelo as células do tipo I, e em verde as células do tipo II ou células receptoras, dedicadas para estímulos doce, amargo e umami. Em laranja células do tipo III ou células pré-sinápticas, em cinza, células do tipo IV ou basais e, em azul, as células do tipo V, ou perigemal. Figura retirada e modificada de Behrenas, et al, 2011. Chemistry of taste

Os receptores gustativos responsáveis pela decodificação dos sabores doce são responsáveis por reconhecer fontes nutricionais ricas, enquanto que os receptores para amargor são capazes de despertar no animal uma resposta aversiva sinalizando a presença de compostos tóxicos ou potencialmente nocivos (Nei et al., 2008).

Estes receptores de membrana, em vertebrados, são codificados por seis famílias multigênicas diferentes, sendo os genes: receptores olfativos, receptores associados ao gosto de amina, receptores vomeronasais do tipo 1 e 2, (V1R e V2R), receptores gustativos dos tipos 1 e 2 (Tas1r e Tas2r). Todas as proteínas codificadas por estes genes são receptores do tipo proteína-G acoplada, possuindo sete regiões de alfa-hélices transmembrânicas (Chandrashekar et al., 2000).

Os dois tipos de receptores gustativos (i.e. os produtos das classes de genes Tas1r e Tas2r), denominados T1R e T2R, são expressos na região apical de células epiteliais especializadas (células gustativas) que se aglomeram em pequenos grupos celulares (50-150) localizados nas papilas gustativas da língua. Em mamíferos, são conhecidos atualmente três genes da classe Tas1r (Tas1r1, Tas1r2 e Tas1r3). Os produtos dos genes Tas1r2 e Tas1r3, denominados T1R2 e T1R3, formam heterodímeros que funcionam como receptores de amplo espectro para o sabor doce, e respondem a um grande número de substâncias percebidas como tais por humanos, incluindo açúcares e os chamados adoçantes artificiais (i.e. compostos não calóricos possuindo alta afinidade com sub-regiões do dímero T1R2+T1R3). Entretanto, especula-se também que homodímeros da forma T1R3+T1R3 podem ter uma função específica na detecção de carboidratos, mas não os adoçantes artificiais (Zhao et al., 2003).

Os heterodímeros da forma T1R1+T1R3, por sua vez, atuam como receptores de sabores umami. Os receptores para amargor são os do tipo T2R, reconhecendo uma grande variedade de substâncias. Os genes codificadores de receptores do tipo T2R estão, em geral, presentes em maior quantidade do que os genes de receptores do tipo T1R - receptores para sabor doce e umami (Chandrashekar et al., 2000; Zhao et al., 2003).

Esta diferença pode ser atribuída à grande diversidade de toxinas presentes no ambiente, o que significou um ganho evolutivo para o animal em termos de proteção individual contra intoxicações e envenenamentos. O número de receptores T2R presentes também varia de espécie para espécie, sugerindo que diferentes espécies são expostas a diferentes toxinas (Nei et al., 2008).

É ponto de destaque em nosso estudo notar que a transmissão da informação gustativa ao sistema nervoso central é mediada pelos receptores T1R e T2R e depende da presença

integral do canal iônico não específico Trpm5, expresso na região basolateral das células gustativas, as quais expressam estes receptores (Zhang et al., 2003). Em particular, camundongos *knockout* para o gene *trpm5* são insensíveis a compostos doces, umami e amargos, o que os torna um ótimo modelo para o estudo comportamental das propriedades gustativas de estímulos complexos (Figura 5).

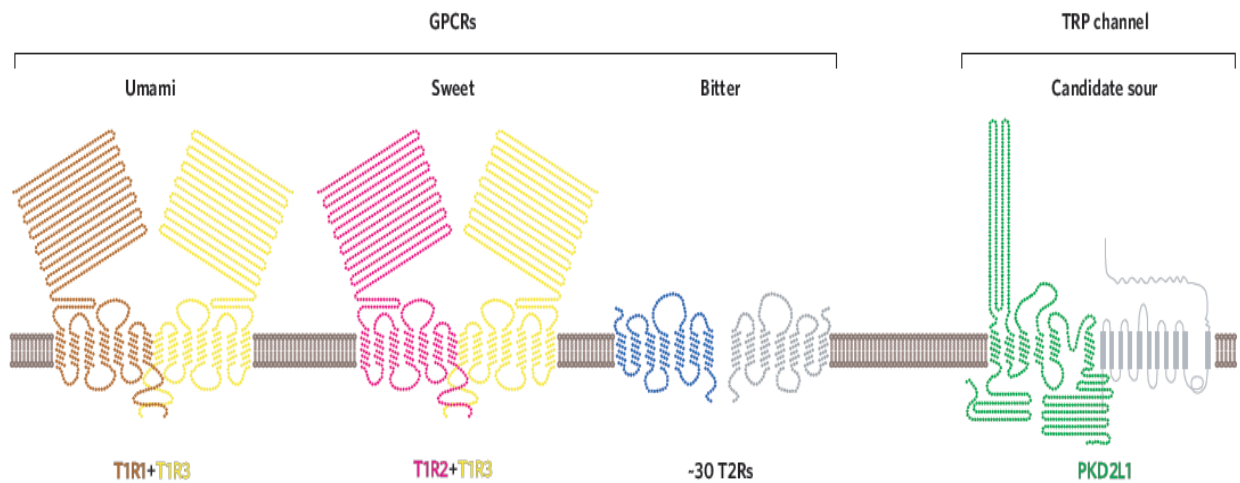


Figura 5. Esquema representativo dos receptores de gostos umami, doce, amargo e azedo. Este esquema é um modelo dos receptores ou candidatos a receptores, os quais mediam quatro das cinco modalidades básicas de gosto. Em cinza/azul, estão representados os receptores T2R, os quais são semelhantes aos receptores T1R, em coloração amarela/marrom/rosa. De modo similar, o receptor PKD2L1 encontra-se próximo a um membro da família PKD1, os quais também podem formar um heterodímero. Figura retirada de Chandrashekar, et al, 2006. Nature.

Estrutura de peptídeos relacionados com amargor

Quando as primeiras inferências sobre as unidades do amargor das moléculas foram propostas, há duas décadas, não havia conhecimento sobre os receptores para amargor, hoje os conhecidos T2Rs. Em 1971, K.H.Ney estudou as características amargas dos aminoácidos e postulou a existência de uma relação entre a hidrofobicidade e o sabor amargo das moléculas. A regra postulada descreve que a presença de uma interação hidrofóbica é essencial para a sensação de amargor, sendo assim a sequência específica de aminoácidos de um dado peptídeo não será a única influência a determinar o amargor destes peptídeos.

Alguns anos mais tarde, outros pesquisadores compararam estes dados com os dados de Tanford, C. 1962 para 61 peptídeos amargos presentes em fontes alimentares ricas. Os experimentos corroboraram uma teoria segundo a qual é necessária uma hidrofobicidade média dos resíduos presentes nos peptídeos, permitindo uma relação entre a hidrofobicidade dos resíduos de aminoácidos e os sabores amargos. Entretanto, cabe ressaltar, a determinação do amargor não pode apenas ser determinada por estas relações (Tanford et al., 1962; Maehashi e Huang, 2009).

Alguns peptídeos amargos foram detectados em fontes naturais, como leite e queijo, e foi demonstrada uma relação entre o amargor e a estrutura dos peptídeos. Alguns exemplos de peptídeos encontrados são GPPFVI, FFVAPFPQVFGVK, FALPQYLK (Roudot-Algaron, 1996).

Todos estes peptídeos, ricos em leucina, isoleucina e fenilalanina, foram classificados como peptídeos extremamente amargos (Roudot-Algaron, 1996). Devido à constante presença do resíduo de fenilalanina nos peptídeos amargos, esta foi estudada e, posteriormente, considerada como o aminoácido central na predição do sabor amargo.

A fenilalanina (Phe) possui um sabor amargo, o qual pode ser intensificado quando o aminoácido encontra-se bloqueado por grupamentos acetil e etoxi (Ishibashi N, 1987; Maehashi e Huang, 2009). Vários peptídeos foram sintetizados juntamente com seus derivados (acetil e etoxi) e experimentos sistemáticos entre as relações de amargor e a estrutura dos peptídeos foram realizados. Nestes estudos, peptídeos glicídicos com aminoácido hidrofóbicos, como Gly-Leu, Val-Gly e Gly-**Phe**-Gly, foram todos considerados como amargos. Entretanto, aqueles não associados a aminoácidos hidrofóbicos não têm características de amargor, como, por exemplo, Gly-Gly, Gly-Ala e Gly-Glu (Maehashi e Huang, 2009).

O amargor dos aminoácidos hidrofóbicos é intensificado quando estes são introduzidos em certas cadeias peptídicas. Por exemplo, os resíduos dos aminoácidos leucina e fenilalanina são amargos numa escala de 15-20 mM, e quando associados em Leu-Leu ou Leu-Phe esta escala diminui, tornando estes dipeptídeos 10 vezes mais amargos (Maehashi e Huang, 2009a).

Os peptídeos que possuem em suas extremidades N- ou C- terminal grupamentos bloqueadores, também têm seu amargor aumentado. Estes grupamentos podem ser aminoacil, acetilações, esterificações, metil-ésteres (Maehashi e Huang, 2009). Peptídeos amargos podem variar muito em sua estrutura primária, não havendo uma regra de similaridade, mas sim uma relação entre as propriedades físico-químicas compartilhadas entre eles.

Sabe-se que todos eles possuem uma elevada quantidade de aminoácidos de cadeia lateral hidrofóbica. Em solução aquosa, as proteínas possuem grupamentos polares e hidrofílicos em sua superfície, com um centro hidrofóbico empacotado. Quando degradadas expõem estes grupamentos hidrofóbicos, os quais alcançam mais facilmente os receptores presentes, conferindo a sensação de amargor. Ou seja, para que os peptídeos apresentem sabor amargo faz-se necessária a presença de aminoácidos hidrofóbicos. Ishibashi e colaboradores (1988) demonstraram - utilizando mais de 200 peptídeos sintéticos -, que o anel hidrofóbico presente em alguns aminoácidos funciona como um sítio de ligação para receptores de amargor, enquanto que grupamentos guanidínicos - como aqueles presentes na arginina - desempenham um papel de unidade estimuladora (Ishibashi, 1988).

Aparentemente, o sabor amargo parece apenas se manifestar quando ambas as situações ocorrem. Nestes estudos, grupos como guanidina (arginina), fenil (fenilalanina), imidazol (histidina) e anéis iminos são reconhecidos como sítios de ligação determinantes para o amargor (Ishibashi, 1988). Outra característica importante estudada é a conformação espacial em que os aminoácidos se encontram (Maehashi e Huang, 2009).

Uma abordagem comumente utilizada para estudar peptídeos amargos é a análise de QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*). Este tipo de abordagem tem sido utilizado como ferramenta para a predição e a modelagem de fármacos, bem como em proteínas e peptídeos funcionais de alimentos. Estas análises permitem encontrar correlações estatísticas que descrevem a relação estrutura-atividade de peptídeos, por exemplo, antimicrobianos e amargos (Kim, 2006). Hellberg e colaboradores (1987) conduziram um trabalho pioneiro de QSAR com aminoácidos e estabeleceram um sistema capaz de descrever os 20 resíduos de aminoácidos como três propriedades derivadas de uma análise de

componentes principais de uma matriz contendo 29 elementos físico-químicos (Hellberg, 1987).

Estas três propriedades são conhecidas como três valores de Z , representados por hidrofobicidade (Z_1), massa molecular (Z_2) e propriedades eletrônicas ou cargas (Z_3) dos aminoácidos. Hellberg, também aplicou a regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS) para construir um QSAR baseado em 48 peptídeos amargos descritos por Asao e colaboradores (1987). Baseando-se nestes estudos preliminares, Kim e seus colaboradores (2006), desenharam mais de 224 peptídeos contendo os cinco aminoácidos mais hidrofóbicos para estudar as relações entre estrutura e amargor.

Os peptídeos foram baseados nas características de sequência, de hidrofobicidade global, de massa molecular e número de resíduos. Estes estudos demonstraram que o amargor é conferido principalmente pelos aminoácidos hidrofóbicos e, também, por resíduos de aminoácidos polares não carregados. Na escala descrita nesse trabalho, peptídeos como Phe-Phe-Phe, Arg-Gly-Pro-Pro-Phe-Phe-Phe, Arg-Pro-Pro-Pro-Phe-Phe-Phe foram considerados extremamente amargos quando comparados aos demais (Kim e Li-Chan, 2006b; 2006a).

O amargor como estratégia de defesa em anfíbios

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos demonstrando a impalatabilidade de diversos anfíbios e girinos, associada ao amargor, como estratégia de defesa (Madison et al., 2002; Taylor et al., 2003; Darst e Cummings, 2006; Darst et al., 2006; Richardson et al., 2006). Sendo assim, é clara a existência de uma estratégia de defesa baseada no sistema químico-sensorial dos animais. Esta estratégia conhecida há décadas, e bem descrita no campo da ecologia, ainda não foi explorada do ponto de vista químico.

A toxicidade da secreção cutânea, o aposematismo e o comportamento intimidador servem como armas para evitar potenciais predadores. Especificamente, sinais químico-sensoriais são liberados pelas presas reduzindo as chances de ataques futuros, como pode ser observado para alguns tipos de larvas e desovas de anfíbios, os quais são reconhecidos como repulsivos pelos predadores.

Como descrito anteriormente, apesar de uma variedade de peptídeos apresentar ação antimicrobiana, estes diferem em tamanho, composição de aminoácidos, anfifilicidade, ângulo polar e conformação estrutural. Apesar de esta diversidade de estruturas primárias encontradas, os resíduos presentes compartilham algumas características como a

hidrofobicidade e anéis aromáticos em suas cadeias laterais e estes parecem ser fundamentais para a estrutura e atividade biológica dos peptídeos.

Tirando do contexto a atividade antimicrobiana, observamos que resíduos hidrofóbicos como leucina e fenilalanina também são encontrados em peptídeos que são percebidos como amargos para mamíferos. Além desta característica, alguns autores descrevem a importância da localização destes resíduos na estrutura primária para a potencialização do efeito de amargor percebido (Ney, 1971).

No presente trabalho, descrevemos a estrutura por ^1H RMN e realizamos estudos funcionais de duas moléculas antimicrobianas análogas, em suas formas naturais de L- e D-peptídeo, sequenciadas por uma combinação de mobilidade iônica/espectrometria de massa, degradação de Edman e isolamento de cDNAs. Os dois enantiômeros foram nomeados como L- e D-fenilseptina, e ambos apresentaram propriedades gustatórias mediadas por vias específicas, sendo comparáveis a resultados alcançados para alcalóides conhecidamente amargos.

Este tipo de abordagem pode abrir novas perspectivas para estudos de toxinas animais, permitindo uma visão mais elaborada sobre a importância da presença destas moléculas sob o ponto de vista evolutivo, ecológico e comportamental.

A busca por peptídeos e a elaboração de ensaios para a determinação de suas atividades biológicas fazem parte da rotina de muitos laboratórios de pesquisa. O estudo destas moléculas atingiu um novo nível com o desenvolvimento das técnicas proteômicas, principalmente de cromatografia líquida de alta eficiência, da espectrometria de massa e da ressonância magnética nuclear. Atualmente, os equipamentos possuem alta resolução e sensibilidade acelerando o processo de obtenção de sequências peptídicas, permitindo uma mudança no conceito de prospecção, analisando as moléculas como componentes de um conjunto mais complexo e não como um protótipo isolado.

A secreção presente na pele dos anfíbios nos permite explorar um fascinante campo de estudo. Estes animais produzem uma variedade de moléculas bioativas, as quais são utilizadas no tratamento de doenças e em rituais místicos indígenas. O veneno destes animais faz parte do sistema imunológico inato, atuando na defesa imediata contra patógenos sendo que, para cada espécie este mecanismo de defesa parece distinto, gerando uma diversidade ainda maior de moléculas.

Neste contexto, tentar identificar peptídeos com potencialidade para desempenhar diferentes funções contribui para o entendimento mais claro e objetivo destas moléculas permitindo a criação de novas abordagens, abrindo novas perspectivas no intuito de se buscar resolver antigos problemas. Por conseguinte, aumentando o conhecimento funcional e estrutural sobre essas moléculas.

Todo o patrimônio científico assim gerado, além de despertar o interesse imediato das indústrias de alimentos, farmacêuticas e agrícolas, pode igualmente representar uma alternativa promissora para a descoberta de moléculas com novas funções.

O grupo de pesquisa do Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia vem desenvolvendo um trabalho de prospecção sistemática de moléculas bioativas disponíveis na biodiversidade brasileira. Tal esforço culminou, entre outros, no desenvolvimento de abordagens mais amplas sobre peptídeos bioativos. É exatamente a partir dessa abordagem e de resultados já alcançados pelo grupo que o presente trabalho se fundamentou.

O objetivo principal deste trabalho consistiu da identificação, da caracterização bioquímica e estrutural, e da determinação das propriedades químico-sensoriais dos peptídeos bioativos isolados a partir da secreção cutânea do anuro *Hypsiboas punctatus*.

Objetivos específicos e estratégias adotadas.

a. Isolar e identificar novas moléculas bioativas em *H. punctatus*;

Estratégias:

- i.** Fracionar o extrato bruto obtido utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC);
- ii.** Analisar os componentes proteicos presentes, em cada fração cromatográfica, por técnicas de espectrometria de massa; fragmentá-los em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF, na célula de LIFT; obter a sequência primária manualmente por sequenciamento *de novo*; e analisar as sequências obtidas com auxílio de técnicas de bioinformática disponíveis *on-line*.

b. Clonar e sequenciar os genes codificadores de peptídeos antimicrobianos;

Estratégias:

- i.** Amplificar os genes codificadores de peptídeos antimicrobianos utilizando oligonucleotídeos específicos para regiões conservadas de peptídeos antimicrobianos já descritos na literatura; construir bibliotecas de cDNA; e realizar a análise completa das sequências dos genes obtidos.

c. Determinar as modificações pós-traducionais existentes nos peptídeos;

- i.** Clivar enzimaticamente os peptídeos Fenilseptinas; purificar os fragmentos por cromatografia líquida ultra rápida em fase reversa (HP-UFLC); e determinar a massa molecular de cada fragmento isolado por MALDI-TOF/TOF;
- ii.** Sintetizar os peptídeos quimicamente pela estratégia Fmoc, modificando as regiões que apresentarem diferenças com relação ao tempo de retenção (cromatografia), porém mesma massa molecular.

- d. Testar a atividade antimicrobiana das novas moléculas** em cepas de bactérias patogênicas humanas e bactérias fitopatogênicas com os peptídeos isolados da secreção cutânea de *H. punctatus*;
- e. Sintetizar quimicamente os peptídeos da família Fenilseptina** pelo método de síntese de peptídeos em fase sólida (SPPF) via estratégia Fmoc, bem como purificar e caracterizar os peptídeos sintéticos gerados;
- f. Utilizar os peptídeos sintéticos para determinar**, por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), **a estrutura terciária dos peptídeos Fenilseptina (D- e L-Phes)**;
- g. Estudar por mobilidade iônica** as características estruturais diferenciais entre os peptídeos D/L- Fenilseptinas (nativos) por **mobilidade iônica acoplada à espectrometria de massa (IM-MS)**
- h. Testar a hipótese de que os peptídeos da família Fenilseptina são amargos**, em camundongos mutantes insensíveis ao amargor, bem como averiguar o sistema de percepções gustatórias, utilizando-se substâncias controle conhecidamente amargas (metilxantinas: cafeína, teofilina e teobromina).

Coleta dos animais

Espécimes adultos do anuro *Hypsiboas punctatus*, de ambos os sexos, foram coletados na região de Palmas (TO) (Figura 6). A coleta, o acondicionamento para transporte e a manutenção dos espécimes vivos seguiram as normas estabelecidas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA), que emitiu autorização para os procedimentos sob número 011/2007 – CGFAU.

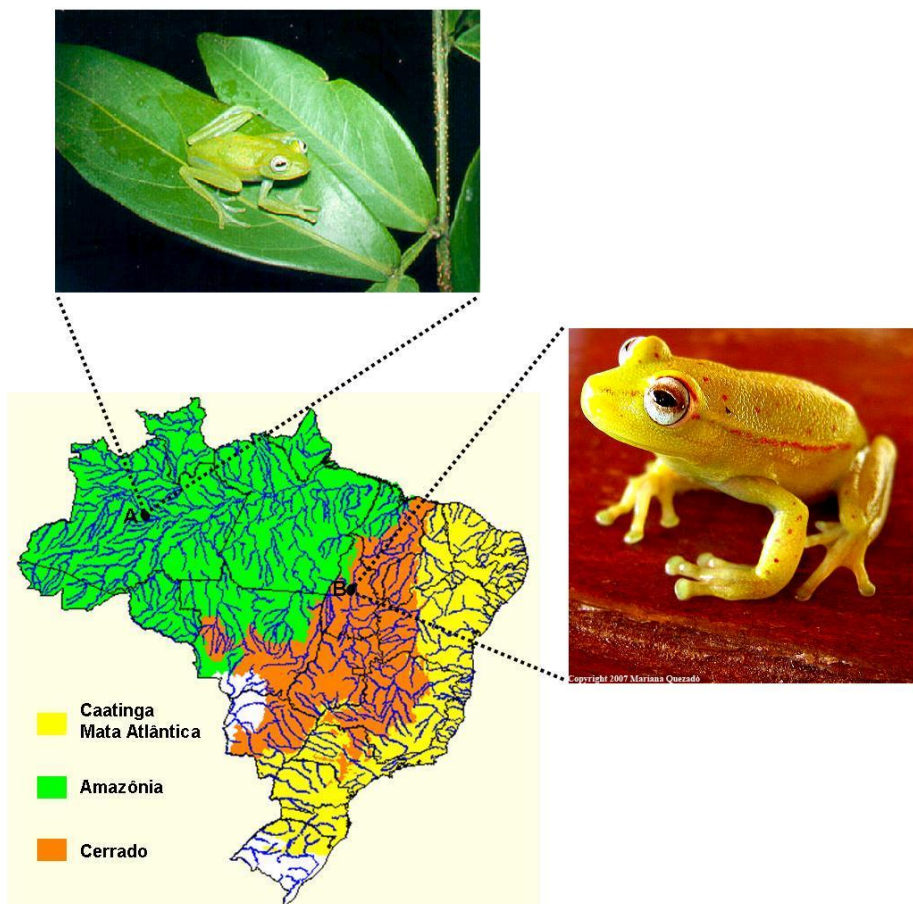


Figura 6. Mapa de alguns biomas do Brasil mostrando a localização dos representantes da espécie de anfíbio investigadas. (A) *H. punctatus* de Manaus – AM e (B) *H. punctatus* de Palmas – TO (localização dos anfíbios estudados).

Extração do tecido granular.

Segmentos de tecido da porção dorsal de pele dos animais foram extraídos e colocados em lamínas de vidro, secadas e montadas com fita dupla-face na superfície de placas de MALDI-TOF para as análises de imagem. Adicionalmente, a pele extraída foi congelada em nitrogênio líquido para subsequente extração de RNA (construção de bibliotecas de cDNA).

Extração da secreção cutânea

A secreção cutânea foi extraída pela estimulação elétrica branda (6 - 9 V) das glândulas granulares da pele de *H. punctatus* e coletada em água Milli-Q resfriada como um extrato solúvel. O extrato foi filtrado em papel de filtro de fibra de celulose (Millex 0,45 µm), congelado em nitrogênio líquido, liofilizado (*Centrivap concentrator*, Labconco, Kansas City, MO) e estocado a -80°C.

Construção de bibliotecas de cDNAs codificadores de peptídeos antimicrobianos

Extração do RNA total e síntese da cDNA

Amostras (10 mg) do tecido dorsal de *H. punctatus* contendo as glândulas granulares foram pulverizadas com nitrogênio líquido utilizando almofariz e pistilo. O tecido animal em pó foi transferido para um tubo *Falcon* de 15 mL com 4 mL de solução de Trizol® (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. A quantidade de RNA total foi determinada em espectrofotômetro e a integridade avaliada em gel de agarose desnaturante com formaldeído. Uma fração enriquecida com poli-A⁺ foi obtida por RT-PCR a partir de 200 µg de RNA total, utilizando uma resina associada a oligo-dT (Tabela 1) do kit Oligotex® (QIAGEN®), conforme recomendações do fabricante. Foram utilizados 4 µg do RNA-poliA⁺ resultando na construção da biblioteca de cDNAs, utilizando a técnica de RT-PCR. A síntese de cDNA a partir de mRNA foi feita utilizando-se um oligonucleotídeo oligo-dT e uma transcriptase reversa (Invitrogen) seguindo protocolo do fabricante.

Amplificação dos cDNAs por PCR

Para identificar os genes codificadores dos peptídeos presentes em *H. punctatus* foi utilizada a técnica de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia). Os cDNAs gerados foram

submetidos a uma reação de PCR com os oligonucleotídeos específicos descritos na Tabela 2. As reações foram realizadas em volumes de 25 µL contendo 2 µg de cDNA, 10 mM de Tris-HCl pH 8,4, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 200 mM de cada dNTP, 500 nM de cada oligonucleotídeo e 0,1 U·µL⁻¹ de *Taq* DNA polimerase, para cada amostra de DNA.

A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorf®) sob as seguintes condições: desnaturação prévia a 94°C por 2 min; repetição de 30 ciclos a 94°C por 45 s (desnaturação); anelamento dos oligonucleotídeos por 45 s; 72°C por 2 min (extensão da DNA polimerase) e ao final uma extensão a 72°C por 5 min.

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados nas amplificações de PCR

Descrição	Tm*	Sequência de nucleotídeos do oligonucleotídeo
dT-AP	77,8°C	5'GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'
AP	75,0°C	5'GACCACGCGTATCGATGTCGAC 3'
PPS-1	79,2°C	5'TGGCTTTCCTGAARAARTCBCTTTTYCTTGACTATTTCCTTGS 3'
PPS-1A	82,0°C	5'ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTTTTCCTTGACTATTTCCTT 3'
PPS-2	79,2°C	5'ATGGCTTTCCTGAARAARTCBCTTTTYCTTGATTATTTCTCGG 3'
PPS-2A	81,1°C	5'ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTTTTCCTTGATTATTTCTCGC 3'

*Tm – Temperatura de Melting (parâmetro calculado utilizando-se o programa gratuito Oligotech)

Clonagem dos produtos de PCR, transformação dos clones e purificação dos plasmídeos.

Os fragmentos amplificados por PCR foram separados e visualizados por eletroforese em gel 0,8% (p/v) de agarose. Os fragmentos de DNA excisados do gel foram purificados utilizando-se o kit “GeneClean” (Bio 101 System). Os fragmentos purificados foram então ligados a 50 ng de vetor comercial pGEM-T easy (Promega), na razão molar de 3:1 (inserto:vetor), com 4 U/µL T4 DNA ligase e tampão 1×. Para a transformação do sistema de ligação em *Escherichia coli* por eletroporação foram utilizados tubos com alíquotas de 40 µL de células competentes de *E. coli* linhagem DH5α. O sistema de ligação foi adicionado às células e o conteúdo do tubo foi transferido para uma cubeta de eletroporação estéril de 0,1 cm e aplicou-se a corrente em um eletroporador Bio-Rad Gene Pulser TM com os seguintes parâmetros: 1,8 kV de voltagem, 200 Ω de resistência e 25 µF de capacitância.

Clones positivos foram inoculados em tubos de vidro contendo 3,5 mL de meio LB-amp e incubados por 16 h a 37°C em estufa a 300 rpm. Todo o material foi centrifugado e o DNA plasmidial foi extraído conforme protocolos padrões em biologia molecular e posteriormente armazenado a - 20°C.

Análise e alinhamento de sequências nucleotídicas e peptídicas.

Os fragmentos clonados (500 ng de vetor) foram sequenciados em um sequenciador automático ABI, utilizando-se 4 pmoles de oligonucleotídeos gerais T7, SP6, reverso e universal. As sequências obtidas foram submetidas a um banco dados de dados do GeneBank e SwissProt pelos programas “BLASTn” e “BLASTp”, pelo endereço eletrônico do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). A sequência consenso foi obtida pela análise dos alinhamentos múltiplos das sequências dos fragmentos gênicos, por meio dos programas “gelassemble” e “pileup” do GCG (Universtiy of Wisconsin), para determinação da sequência completa dos genes. A análise de domínios dos genes foi feita pelo programa “CDD-Search” (Marchler-Bauer *et al.*, 2005) utilizando-se o banco de domínios conservados (*Conserved Domain Database*), também do NCBI, para a determinação da identidade ou da similaridade, a identificação de domínios conservados que podem estar associados ao domínio em questão e a observação do contexto no qual tais domínios são encontrados. A massa molecular e o ponto isoelétrico das proteínas preditas foram determinados por programas do “Expasy” (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html e <http://www.up.univ-mrs.fr/cgi-wabim/acomp-p.pl>). As sequências também foram alinhadas pelo “CLUSTALW” (Thompson *et al.*, 2002) (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>). Todos os oligonucleotídeos desenhados foram testados no programa “OligoTech”, que informa a T_m (temperatura onde metade dos oligonucleotídeos estão anelados) e a ocorrência de *loops* ou de homodímeros, assim como a energia necessária para romper estas estruturas indesejáveis.

As sequências de aminoácidos dos peptídeos obtidas foram submetidas ao banco dados do GeneBank e SwissProt pelo programa “BLASTp”. A massa molecular e ponto isoelétrico das proteínas preditas foram determinados por programas do “Expasy” (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html e <http://www.up.univ-mrs.fr/cgi-wabim/acomp-p.pl>).

Separação e purificação dos peptídeos

O extrato total da secreção foi solubilizado em 0,1% (v/v) ácido trifluoroacético/água (solvente A) e fracionado em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC (Class LC-10VP, Shimadzu Co., Kyoto, Japão) utilizando coluna semi-preparativa de fase reversa Vydac 218TP510 (C₁₈) (10 mm/250 mm) equilibrada com 0,1% TFA (v/v) com gradiente de 0,1% TFA (v/v) em acetonitrila (solvente B) em um fluxo de 2,5 mL·min⁻¹. Foram injetados 5 mg de extrato total em um volume de 400 µL. As frações cromatográficas foram eluídas sob gradiente linear de acetonitrila variando de 5 a 95% com fluxo contínuo de 2,5 mL·min⁻¹. O experimento foi monitorado a 216 e 280 nm, todas as frações foram coletadas manualmente, submetidas à liofilização e mantidas a -20°C. Algumas frações foram re-cromatografadas usando as colunas Vydac 218TP54 (C₁₈) e Source 5 RPC ST 4,6 mm/150 mm (poliestireno/divinil benzeno) (GE Healthcare, Waukesha, WI) utilizando gradientes otimizados. Para validação do grau de pureza e cromatografias de alta resolução foram realizadas cromatografias líquidas ultra rápidas de alta eficiência – UFLC (Prominence UFLC, Shimadzu Co., Kyoto, Japão) em fase reversa em coluna analítica C₁₈ Shim-pack XR-ODS de alta velocidade e eficiência de separação (3,0 mm ID x 50 mm), fluxo 0,4 mL·min⁻¹, gradientes lineares de acetonitrila e controle da temperatura.

Análise por espectrometria de massa (MS) e sequenciamento de novo

Alíquotas de cada fração cromatográfica foram diluídas em água Milli-Q ultrapura e misturadas com uma solução saturada de matriz ácido α -cyano-4-hydroxycinâmico em acetonitrila (1/3 v/v), e TFA a 3% (5/1 v/v). Foram aplicadas em triplicata em uma placa do tipo Anchorchip com 600 µm e cristalizadas à temperatura ambiente. Os dados de MS e MS/MS foram obtidos em MALDI-TOF/TOF (Ultraflex II e Ultraflex III, Bruker Daltonics) equipado com laser SmartBeamTM, controlado pelo software FlexControl 3.0. Os espectros foram adquiridos no modo refletor, com calibração externa, utilizando uma mistura de peptídeos ‘Peptide Calibration Standard I, Bruker Daltonics’ descritos na Tabela 2. Os espectros de massa foram adquiridos com 200 disparos de laser, a uma frequência de 100 Hz e detecção nas faixas de m/z 500-5000 e m/z 6000-20000 para os modos refletido e linear, respectivamente. O modo MS/MS, visando à fragmentação dos íons precursores (TOF-TOF), é realizado por meio de aceleração dos precursores de 3.6 kV. A fragmentação dos íons ocorreu na célula de LIFT com aceleração de 19 kV. Os espectros foram processados

utilizando o software FlexAnalysis 3.0. A estrutura primária dos peptídeos foi interpretada manualmente por sequenciamento *de novo* dos espectros obtidos nas análises de MS/MS. Os espectros foram visualizados utilizando-se os softwares FlexAnalysis 3.0 e PepSeq (Garrett, 1995).

Tabela 2. Mistura peptídica utilizada para calibração do espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics)

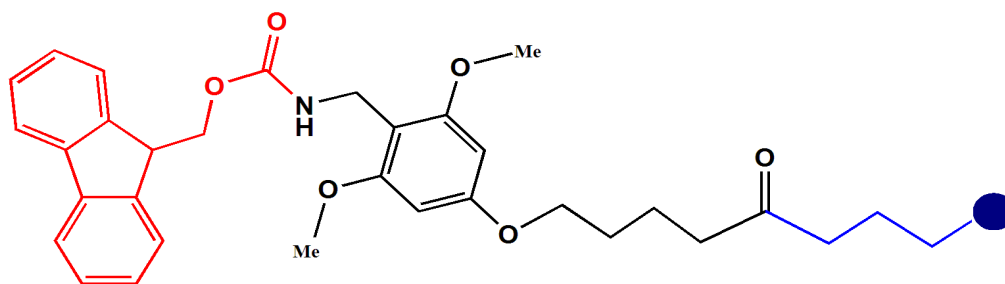
Peptídeo	Massa Monoisotópica [M+H]⁺
Bradicinina (1-7)	757,4
Angiotensina_II	1046,5
Angiotensina_I	1296,7
Substância_P	1347,7
Bombesina	1619,8
ACTH (1-17)	2093,1

Degradação de EDMAN

O sequenciamento automático N-terminal de alguns peptídeos foi realizado em um sequenciador de proteínas e peptídeos PPSQ-23 (Shimadzu Co.) seguindo as instruções do fabricante.

Síntese do peptídeo Fenilseptina - L-Phes e D-Phes

Os peptídeos **L-Phes**, de sequência NH₂ - Phe, Phe, Phe, Asp, Thr, Leu, Lys, Asn, Leu, Ala, Gly, Lys, Val, Ile, Gly, Ala, Leu, Thr - NH₂, e **D-Phes** de sequência NH₂ - Phe, **D-Phe**, Phe, Asp, Thr, Leu, Lys, Asn, Leu, Ala, Gly, Lys, Val, Ile, Gly, Ala, Leu, Thr -NH₂ foram sintetizados manualmente utilizando a estratégia Fmoc/t-butila em suporte sólido (Chan e White, 2000). Para este procedimento utilizou-se como suporte sólido a resina Fmoc-PAL-PEG-OS (Figura 7) com grau de substituição 0,21 mmol·g⁻¹, a qual fornece como produto final o peptídeo amidado.



5 - (4-N-Fmoc-aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy) valeryl - PEG - PS

Figura 7. Suporte sólido utilizado para a síntese de peptídeos. Estrutura da resina Fmoc-PAL-PEG-OS. Em vermelho o grupamento Fmoc, em preto o grupamento PAL, em azul o grupamento PEG e o círculo azul representa o grupo OS.

O primeiro passo da síntese foi a etapa de desproteção do grupo Fmoc Figura 7, o qual protege o sítio reativo da resina. Como o grupo Fmoc é base-lábil, a desproteção foi realizada com uma solução de piperidina a 20% (v/v) em dimetilformamida (DMF). Posteriormente, foi realizada a etapa de acoplamento do primeiro resíduo de Fmoc aminoácido. Este procedimento foi realizado com uma solução contendo 1,3-diisopropilcarbodimida (DIC), 1H-hidroxibenzotriazol (HOBt) (agentes ativadores do grupo carboxila) e o Fmoc aminoácido específico, os quais foram encubados por 2 horas sob agitação contínua.

Estas duas etapas (desproteção e acoplamento) são repetidas sucessivamente até a adição e posterior desproteção do último resíduo de aminoácido. Após cada etapa, a resina deve ser lavada com DMF e MeOH (metanol), repetindo-se este procedimento alternadamente por três vezes.

Para acompanhamento da eficiência de todas as etapas de acoplamento das sínteses foi utilizado o teste de Kaiser (teste químico qualitativo colorimétrico que detecta a presença de aminas livres na cadeia peptídica - Figura 8), o qual emprega soluções de piridina em KCN, fenol em etanol e ninhidrina em piridina, nas proporções 1:2:1 e nesta ordem respectivamente (Troll e Cannan, 1953).

No caso de acoplamentos realizados com sucesso, a solução apresenta-se com uma coloração amarelada, indicando que não existem aminas livres para reagir com a solução de ninhidrina. Quando o resultado da reação é negativo (reação de coloração azulada), existem aminas livres indicando que o acoplamento da reação não foi eficiente. Para as etapas de remoção do grupo Fmoc foram empregadas soluções de 4-metilpiperidina em DMF (20% em volume), sob agitação de 15 minutos.

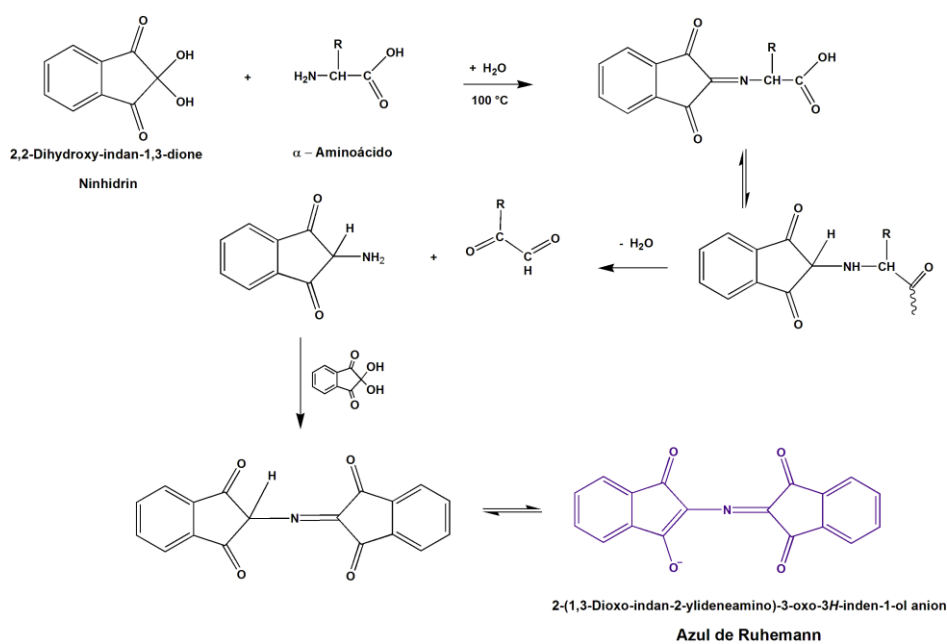


Figura 8. Reação de ninhidrina para detecção de amina primária. Teste de Kaiser, Troll e Cannan, 1953.

Após a síntese, o peptídeo foi clivado da resina utilizando-se triisopropilsilano (TIS) e 1,2-etanoditiol (EDT), sequestradores de carbocátions, e uma mistura de ácido trifluoroacético (TFA) e água como solventes. A proporção dos reagentes na solução TFA:TIS:EDT:H₂O foi de 5:1:1:3 em volume. A ligação do resíduo C-terminal do peptídeo com a resina é ácido lábil, por isso a desproteção final e a clivagem da resina foram conduzidas em uma solução de TFA:TES:H₂O (95:2,5:2,5; v:v:v).

Após a reação de clivagem entre o peptídeo e a resina, o TFA foi removido, borbulhando-se N₂ dentro do tubo de reação. O peptídeo foi precipitado com éter diisopropílico gelado, retirando desta forma o excesso de grupamentos protetores e de sequestradores de carbocátions. Ao final, o peptídeo foi solubilizado em água contendo 20 % (v/v) de ACN, filtrado em funil de placa porosa, congelado em N₂ líquido e liofilizado.

O material bruto gerado foi purificado por RP-HPLC seguindo os procedimentos descritos no item *Separação e purificação dos peptídeos*.

Estudos estruturais por mobilidade iônica e espectrometria de massa (IM-MS)

As amostras dos dois enantiômeros (5 μM) foram diluídas em 1:1 MeOH/H₂O contendo 0,1 % de ácido fórmico. Todos os espectros foram adquiridos por infusão direta com fluxo de 1 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ em uma faixa de massa molecular de 100 a 1000 m/z. A voltagem do capilar de 3,0 kV e no cone de 40 V. As espécies triplamente carregadas foram selecionadas no quadrupolo, sendo a análise por mobilidade iônica feita em seguida na célula T-wave, e com posterior análise no analisador TOF. A energia de colisão foi mantida no *trap* em 5 eV e variada de acordo com a m/z de cada íon no *transfer*. Os experimentos foram realizados em um espectrômetro Synapt HDMS (Waters Co.). Este espectrômetro de massa de mobilidade iônica de alta-resolução é equipado com um ionizador do tipo nano-spray, uma célula de TWIMS -*travelin wave ion mobility spectrometry*- entre o analisador quadrupolo e o TOF (Waters Micromass, UK). O *T-wave* possui três subunidades: o *trap* responsável por aprisionar os íons, permitindo a entrada pulsada desse para a próxima cela; a câmara de mobilidade situada na região que contem o gás N₂, onde ocorre a separação por mobilidade iônica, e o *transfer* que fica responsável por transferir os íons para o analisador TOF.

Dados estruturais obtidos por RMN

Os espectros de RMN de ¹H foram obtidos no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas (CNRMN), localizado no Centro de Ciências da Saúde da UFRJ, em um aparelho Bruker DRX800 – série AVANCE III, com quatro canais e sonda (5 mm de diâmetro) de tripla ressonância com gradiente de campo, que opera a 800,118 MHz (para ¹H). As amostras para RMN em TFE foram preparadas adicionando-se 2,2,2-trifluoretanol-d₂ (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA) e D₂O (99,9%, Isotec, Inc.) na proporção de TFE-d₂:D₂O/60/40(v/v). Como padrão de referência interna para as ressonâncias de ¹H foi utilizado o 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfonato de sódio (DSS). O peptídeo foi adicionado a esta mistura a uma concentração de 2 mmol·L⁻¹, a qual foi transferida para um tubo de RMN de 5 mm.

Foram realizadas sequências de pulso padrão fornecidos pelo fabricante, para os experimentos de correlação 2D homonuclear (modo de aquisição *States-TPPI*) e heteronuclear (modo de aquisição *Echo-antiecho*), empregando-se uma sonda de detecção inversa multinuclear de 5 mm, com pulso ¹H a 90° e largura = 11.3 ms. Os mapas de contornos 2D HSQC foram obtidos com sequências de pulso [¹J (C,H) e ¹J (N,H)], com

incrementos de tempo de 512, coletados para cada conjunto de dados de 1024 para preenchimento de zero.

O tempo de mistura empregado no experimento de TOCSY foi de 70 ms (observando-se experimentos anteriores), utilizando-se a sequência de pulsos MLEV-17. Os parâmetros empregados foram: largura espectral de 11,96 ppm, incrementos de 512 t_1 e 12 transientes de 4096 pontos. O tempo de mistura para o experimento 2D NOESY foi determinado realizando-se vários experimentos preliminares, variando-se o tempo de mistura de 60 a 200 ms, onde foi determinado o tempo ideal de 100 ms. A supressão do sinal da água foi alcançada empregando-se a técnica de *WATERGATE* (Piotto et al. 1992), e os espectros construídos com um conjunto de dados de 512 espectros em F1 e 4096 espectros em F2 com 16 transientes.

O processamento dos dados foi realizado em um microcomputador SGI com o programa NMRDraw para plataforma Linux. Os espectros processados foram convertidos, utilizando-se o programa NMRPipe (Delaglio et al., 1995). Os espectros de RMN foram analisados utilizando-se o programa NMRView 5.0 (Johnson e Blevins, 1994) também para plataforma Linux.

As correlações de eNOEs, obtidas do experimento NOESY e analisadas no programa NMRVIEW, foram integradas e seus volumes convertidos em distâncias semi-quantitativas através da calibração de Hybert (Hyberts et al., 1992) Os limites de restrições de distâncias usados foram de 2,8 - 3,4 - 5,0 (NOEs fortes, médios e fracos, respectivamente).

Os cálculos estruturais foram realizados no programa Xplor-NIH versão 3.00 (Schwieters e Clore, 2001; Schwieters et al., 2003) e o algoritmo de *simulated annealing sa_new.inp* (Schwieters et al., 2003) dos átomos em estruturas de proteínas determinadas em alta resolução. Utilizou-se uma estrutura de partida gerada aleatoriamente pelo algoritmo *generate_input* e com uma topologia determinada pelo programa *seq2psf*, e que levava em conta a terminação amidada da extremidade C-terminal. Partindo-se da estrutura estendida, 500 estruturas foram geradas. Foram realizadas 10.000 etapas a 1000 K e o subsequente decréscimo da temperatura em 20.000 etapas. Todas as estruturas foram analisadas por meio do programa MOLMOL (Koradi et al., 1996).

As restrições angulares foram obtidas pelo programa Talos+ (Delaglio et al., 1995), por meio de análise dos valores de deslocamento químico dos átomos da cadeia principal α , H_α , $C\beta$, N, HN e C', em relação a um banco de dados de deslocamentos químicos.

Os conjuntos de restrições de distâncias e de ângulos diedros foram analisados previamente ao cálculo de dinâmica molecular utilizando-se o programa *on line* QUEEN

(*Quantitative Evaluation of Experimental NMR Restraints*). Neste programa foram empregados dois parâmetros (unicidade de informação e informação média) para analisar a contribuição e a consistência de cada restrição que constitui o conjunto total das restrições geométricas. A unicidade de informação representa a informação adicionada para a restrição em questão, tendo-se conhecimento das demais restrições no conjunto de dados e informa se um tipo de restrição é único em um dado conjunto, enquanto que a informação média indica a importância de uma dada restrição considerando-se a totalidade do conjunto de restrições, sendo calculada pela média do conteúdo de informação em cada permutação possível na lista de restrições.

Os dados estatísticos, tais como os ângulos diedros e as violações de eNOEs foram analisados pelo programa PROCHECK. Foram selecionadas as 20 estruturas de menor energia total, as quais foram sobrepostas e tiveram o valor de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) calculado para parte da validação do cálculo. A validação e análises estruturais foram feitas utilizando-se o servidor *iCing* (<http://nmr.cmbi.ru.nl/icing/iCing.html>), e a qualidade dos modelos foi analisada observando-se as classificações de combinações dos ângulos ϕ e ψ em quatro regiões do gráfico de Ramachandran: as regiões mais favoráveis, as adicionalmente permitidas, as generosamente permitidas e a região proibida.

Análise da atividade antimicrobiana.

A atividade antimicrobiana dos peptídeos foi investigada contra *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (*American Type Culture Collection*). Os microrganismos foram cultivados em cultura estacionária a 37°C e então transferidos para o meio líquido de cultura Mueller-Hinton (indicado pelo *National Comitee for Clinical Laboratory standards*). O peptídeo foi dissolvido e diluído oito vezes em meio Mueller-Hinton, sendo sua concentração máxima de 128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O inóculo inicial de bactérias foi de $2,510^5$ cfu·mL⁻¹ (segundo-se a escala McFarland). O volume final foi de 100 μL , sendo 50 μL do peptídeo testado e os outros 50 μL do inóculo. O experimento foi realizado em cultura estacionária a 37°C e as medidas espectrofotométricas foram efetuadas 12 horas após a incubação. A concentração inibitória mínima (MIC) foi calculada a partir da densidade óptica (A_{595} nm) e foi o resultado de três medidas independentes. Antibióticos convencionais (ampicilina e cloranfenicol) tiveram seus MICs determinados e foram utilizados como padrão.

Caracterização das propriedades gustatórias.

Preparação dos estímulos Metilxantinas: Cafeína, Teofilina e Teobromina

Como substâncias controle foram utilizadas moléculas conhecidamente amargas, como as metilxantinas Cafeína (1,3,7 – Trimetilxantina), teofilina (1,3 – Dimetilxantina), teobromina (3,7 – Dimetilxantina), óleo de mostarda (Allyl isothiocynate 95%) ultra puros da marca Sigma (St Louis, MO) foram utilizados nos experimentos. Para todas as concentrações de cafeína e teofilina utilizadas (5, 10 e 20 mM), as soluções foram preparadas em temperatura ambiente em água destilada. No caso da teofilina, devido a sua insolubilidade, em concentrações acima de 5 mM, concentrações como 10 e 20 mM foram preparadas em tampão fosfato 1X (PBS). Nestas situações o tampão foi utilizado como linha de base dos estímulos, sendo a base de comparação dos experimentos. O pH de todas as soluções foi cuidadosamente analisado após cada preparo, e quando necessário corrigido.

A concentração dos estímulos controles foi escolhida com base em experimentos de comportamento, eletrofisiologia e *in vitro* os quais analisavam o efeito das metilxantinas em roedores (ratos e/ou camundongos). Em ratos, a resposta à cafeína em nervos cranianos é na faixa de 10 mM para o nervo glossofaríngeo, e de cerca de 10-30 mM para a corda timpânica (Iwasaki et al., 1981). O mesmo estudo demonstra que 10 mM é o necessário para uma resposta aversiva a cafeína em experimentos de comportamento de dois recipientes.

Com base nestes experimentos, utilizamos em nossos estudos as concentrações de 10 e 20 mM, bem como a concentração de 5 mM (concentração basal) para avaliar o papel do canal iônico TRPM5 na geração de uma resposta comportamental a cafeína (Zhao et al., 2010, Nagatomo e Kubo, 2008). E, para poder comparar todas as metilxantinas neste estudo, todas as substâncias foram analisadas nas mesmas concentrações.

Peptídeos: L-Phes e D-Phes

Poucos estudos relatam o comportamento de camundongos ou ratos quando estimulados com peptídeos. Concentrações de 20-50 mM de aminoácidos livres parecem provocar rejeição ou preferência dos animais, enquanto alguns peptídeos parecem ser amargos em concentrações de 5- 10 mM (Maehashi e Huang, 2009). Infelizmente, os peptídeos testados são comumente di, tri ou tetra peptídeos, o que dificulta a escolha de uma faixa de concentração. Diante desta situação todos os peptídeos foram testados inicialmente a uma

concentração de 1 mM, e as concentrações subsequentes foram escolhidas com referencia no resultado deste estímulo nos animais. Como controle negativo dos experimentos contendo os peptídeos foram preparadas soluções contendo os aminoácidos livres presentes nos 3 peptídeos. Todos os aminoácidos livres utilizados neste trabalho são da marca Sigma (St Louis, MO). A concentração escolhida foi de 1 mM para todas as misturas.

Avaliação comportamental da resposta gustativa em camundongos

Os testes comportamentais de reação gustativa aos peptídeos foram realizados em camundongos machos, adultos (três a cinco meses de vida), da linhagem C57BL/6 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EUA). Em todos os experimentos foram utilizados animais homocigotos para uma deleção parcial do gene *trpm5* (controle negativo). Este gene codifica um canal iônico expresso no epitélio sensorial da língua, necessário para a transdução do amargor. Na sua ausência esses animais tornam-se incapazes de diferenciar soluções amargas de água (Zhang et al., 2003).

Desta forma, foi possível verificar se o amargor era o fator gustativo responsável pelo aspecto aversivo das soluções-teste contendo os peptídeos. Como controles positivos foram utilizadas substâncias conhecidamente amargas como as metilxantinas. Desta forma, os animais foram condicionados em um sistema modelo, e subsequentemente sob as mesmas condições foram submetidos aos peptídeos da classe fenilseptina. Este tipo de experimento nos permite uma análise confiável dos dados, permitindo a avaliação de um padrão de comportamento gustatório nos animais.

Para avaliação quanto à presença ou deleção parcial do gene *trpm5*, o DNA de todos os animais foi averiguado por PCR. Foram utilizados oligonucleotídeos específicos para o gene *trpm5*. Todas as reações de PCR foram conduzidas em um termociclador *iCycle* (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Os produtos da reação foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) e a documentação de cada gel foi obtida usando-se o sistema de imageamento digital *ChemiDoc* (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). O comprimento de cada segmento foi avaliado usando-se software apropriado (QuantityOne, Bio-Rad) Sequência dos oligonucleotídeos utilizados no estudo: *sense*- 5'-ATTCTAGAGCCCCACCCGCCCATC-3' e *anti-sense* 5'- TTCACCTGCCAGCCCTCATCTAC-3'

Câmaras comportamentais

Os testes de gustação foram conduzidos em câmaras de comportamento operante, equipadas com duas aberturas para acoplamento dos recipientes contendo as soluções a serem testadas. Cada abertura dos recipientes é equipada com detectores de contato, os quais identificam com precisão temporal de aproximadamente 10 milissegundos, o momento em que o animal encosta a língua no tubo metálico do recipiente (*Contact lickometer*, Med Associates Inc., St. Albans, VT, EUA).

Testes de Preferência com dois recipientes

Os camundongos também foram testados em um segundo protocolo clássico, o teste de apresentação de dois recipientes, ou simplesmente “teste de duas garrafas” (Bachmanov, 2001). A cada animal (desprovido de acesso à água por 16 horas) foi oferecida a oportunidade de ingerir soluções de dois recipientes. Tipicamente, neste teste, uma das garrafas conterá água destilada e a outra conterá uma das soluções-teste; em alguns experimentos a preferência entre duas soluções-teste diferentes foi avaliada.

Para minimizar a influência de efeitos fisiológicos pós-ingestivos, cada teste foi conduzido por um período máximo de dez (10) minutos. Finalmente, para controle de possíveis tendências de consumo em um lado específico da câmara, os testes foram repetidos no dia seguinte invertendo-se a posição das garrafas. Estes experimentos foram conduzidos por quatro (4) dias para cada solução-teste.

Análise de dados comportamentais

Os resultados dos experimentos comportamentais foram expressos como média \pm erro padrão. As análises foram realizadas usando-se *scripts* escritos na plataforma Matlab (R14, Mathworks, Inc., EUA), ou Origin Professional (v8, OriginLab, Northampton, MA) baseadas em análises de variância (de um fator - *1-way*, ou dois fatores - *2-way* ANOVAs) e testes *t* para comparações posteriores entre duas médias. Correções para comparações múltiplas (Bonferroni) foram aplicadas sempre que necessário.

Para o caso dos testes de acesso breve, a preferência por uma solução-teste foi definida como a quantidade de solução consumida em relação à água ou, mais precisamente, a razão entre o número de detecções (língua contatando o recipiente) para a solução e o número de

detecções para água: $2n H_2O n Sol Teste Razao$ onde n , denota o número total de detecções para um determinado estímulo durante a sessão experimental. Estes valores foram inseridos em um teste de 2-way ANOVAs (genótipo \times solução), seguidos por testes t .

Nestes, a hipótese nula estabelece que Razão = 1.0 (i.e. não existe diferença de palatabilidade entre a solução teste e água destilada). Nós antecipamos uma interação genótipo \times solução significativa, onde os valores de Razão serão significativamente menores do que 1.0 (aversivos) em animais normais, mas não significativamente diferentes de 1.0 em animais knockout (devido ao amargor ser o principal aspecto aversivo da solução).

Para o caso dos testes com duas garrafas, a preferência pelo estímulo contido no recipiente 1 em relação ao estímulo contido no recipiente 2 foi definida como Preferência por recipiente 1 (Re 1) (Re 2) (Re 1) $n recipiente n recipiente n recipiente$ onde n (Recipiente 1) e n (Recipiente 2) denotam, respectivamente, o número total de detecções para os estímulos contidos nas garrafas 1 e 2 durante a sessão experimental.

Estes valores serão inseridos em 2 - way ANOVAs (genótipo \times solução), seguidos por testes t . Nestes, a hipótese nula estabelece que Preferência = 0.5 (i.e. não existe diferença de palatabilidade entre os dois estímulos). No caso em que o recipiente 1 contenha uma das soluções teste e recipiente 2 água destilada, nós antecipamos uma interação genótipo \times solução significativa, onde os valores de “Preferência por Recipiente 1” serão significativamente menores do que 0.5 (aversivos) em animais normais mas não significativamente diferentes de 0.5 em animais knockout (devido ao amargor ser o principal aspecto aversivo da solução).

Purificação e identificação dos componentes presentes na secreção cutânea de H. punctatus.

O extrato total liofilizado dos espécimes de *H. punctatus* foi fracionado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), utilizando-se uma coluna semi-preparativa C₁₈ (Figura 9). Ao final, foram coletadas, manualmente, aproximadamente 55 frações cromatográficas, as quais foram submetidas a análises de espectrometria de massa do tipo MALDI TOF-TOF/MS, em modo refletido e linear, com o intuito de identificar a massa molecular dos componentes isolados. Após a análise monoisotópica de massa os componentes foram agrupados em nove grupos distintos (Figura 9). Os valores obtidos das massas moleculares correspondentes a cada grupo e os tempos de retenção referentes ao experimento da Figura 9 foram transcritos para a Tabela 3.

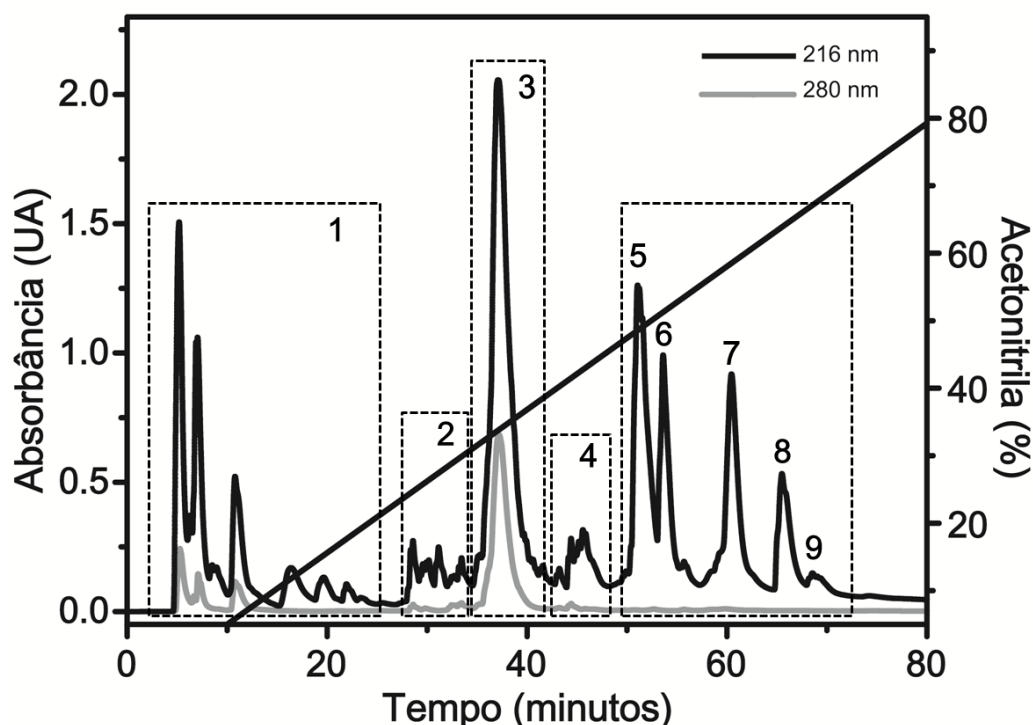


Figura 9. Cromatograma do extrato bruto fracionado de *H. punctatus*. O extrato foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) em coluna semi-preparativa Vydac C₁₈, fluxo 2,5 mL·min⁻¹, utilizando gradiente linear de acetonitrila. A absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm (linha preta e cinza, respectivamente). As frações obtidas foram separadas em nove grupos representados pelas caixas e números.

Tabela 3. Lista das massas moleculares encontradas na secreção do anuro *H. punctatus* adquiridas por MALDI-TOF/TOF em modo de aquisição refletido e linear.

Localização	TR (min)	Massa Molecular [M+H] ⁺					
Grupo 01	5,1	667,00	665,00				
	6,2	1120,64	1878,85	1300,92			
	8,9	893,45	943,45	921,48			
	10,7	1087,54					
	16,4	1216,58	785,29	769,31			
	19,7	655,95	1289,54	1522,60	884,31	1161,49	
	21,7	1272,61	786,34	1400,70	770,35	1290,61	1418,71
	21,8	1418,64	1290,60	899,41	1281,59	643,93	1653,73
		1395,64					
	23,4	1768,92	1794,05	1737,96	1074,64	1052,66	1274,64
	6265,70	5811,50	5339,60				
Grupo 02	28,3	1108,71	1122,72	1100,73	1086,71		
	29,5	1709,96	1481,93	1086,65	1553,86	754,48	1122,64
		1100,67					
	30,0	1132,69	709,30	754,49	1507,98	1116,71	1515,95
		1529,97	5860,90	1094,76			
	31,2	2987,99	635,28	1524,02	1556,00	1541,97	2155,10
	33,2	1507,99	1225,69	1541,97	2155,18	1556,00	
33,4	1180,61	2155,05	1166,60	1550,00	1051,57		
Grupo 03	35,1	486,00	6488,7				
Grupo 04	37,2	1839,14	859,84	971,91	3059,24		
	39,7	810,78					
	41,7	1826,06	1362,92				
	43,2	1120,66	810,69	1947,22			
	44,2	766,70	1323,03	1120,72	1301,01		
	44,4	2365,43	2379,43	1894,78	1878,81	1369,80	1353,83
		1300,90	1331,87				
	45,6	1297,85	1331,84	1340,86			
	49,5	2365,52	2276,44	2365,64			
Grupo 05	53,5	1124,73	1256,77	2524,83	2661,63	2716,12	
Grupo 06	60,5	1954,20	2740,25	2416,6	2438,60	2447,66	2919,06
Grupo 07	65,5	1954,40	1661,26				
Grupo 08	68,6	1691,29	1661,26				
Grupo 09	68,6	1691,29	1661,26				

Hilaseptinas (Hsp) – Purificação, identificação e caracterização.

As frações contendo os íons identificados com os valores de massa $[M+H]^+ = 2365,95$ Da, $[M+H]^+ = 2425,72$ Da, $[M+H]^+ = 2416,44$ Da, $[M+H]^+ = 2661,67$ Da, $[M+H]^+ = 2716,63$ Da e $[M+H]^+ = 2740,62$ Da foram submetidas a novas purificações utilizando-se colunas C₁₈ analíticas, e gradientes otimizados. Em alguns casos foi necessário o uso de fases estacionárias e matrizes de colunas de natureza distintas (i.e. $M+H^+ = 2365,95$ Da). Os cromatogramas dos peptídeos purificados e as massas moleculares correspondentes podem ser observados na Figura 10. Todos os espectros de massa foram obtidos utilizando-se o modo refletido de análise.

Os peptídeos isolados foram então fragmentados por MS/MS e as sequências elucidadas por sequenciamento *de novo*⁷. Após a análise pelo programa Blastp foram identificados como novos membros da família Hilaseptina (Hsp), descrita por Prates (2003). As sequências obtidas, a massa molecular calculada, o ponto isoelétrico (teórico), a massa experimental e os a nomenclatura de peptídeo podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Sequências de aminoácidos dos peptídeos da família das Hilaseptinas (Hsp) identificadas no anuro *H. punctatus*. A massa molecular teórica (MM_t) e o ponto isoelétrico foram calculados *in silico*, utilizando o pacote de programas disponível na plataforma do *ExPASy Proteomics Tools*, de domínio público, disponível on-line. As massas moleculares experimentais (MM_e) form obtidas por análises de espectrometria de massa.

Hsp	Sequência	MM _e [M+H] ⁺	MM _t [M+H] ⁺	pI
Hsp-1	NH ₂ -G I L D A I K A I A K A A G -NH ₂	1311,77	1131,80	8,6
Hsp-2	NH ₂ -G V F D A I K A I A K A A G K A A L H A A G D S I -NH ₂	2365,31	2366,31	8,6
Hsp-3	NH ₂ -G V F D A I K A I A K A A G K A A L H A A G D S I -NH ₂	2365,31	2366,31	8,6
Hsp-4	NH ₂ -G V L D A I K A I A K A A G K A A F H A A G D S I -NH ₂	2365,31	2366,31	8,6
Hsp-5	NH ₂ -G I G D I L K N I A K A A G K A A L H A V G E S I -NH ₂	2416,38	2417,18	8,6
Hsp-6	NH ₂ -G F V D T L K K I G K V A G K V V L G I A K N F L T -COOH	2716,63	2716,64	10,1
Hsp-7	NH ₂ -G F V D T L K T I G K V A G K V A L G L A K N F L T -COOH	2661,68	2661,56	10,0
Hsp-8	NH ₂ -G F V D T L K T I G K V A G K V A L G L A K N F L T -COOH	2740,60	2740,46	11,0
Hsp-9	NH ₂ -F I G A I L K A V A K V A K T V V V E I A N A L S - NH ₂	2524,72	2525,54	9,7

MM_e – Massa Molecular Experimental, MM_t – Massa Molecular Teórica, pI – Ponto Isoelétrico Teórico.

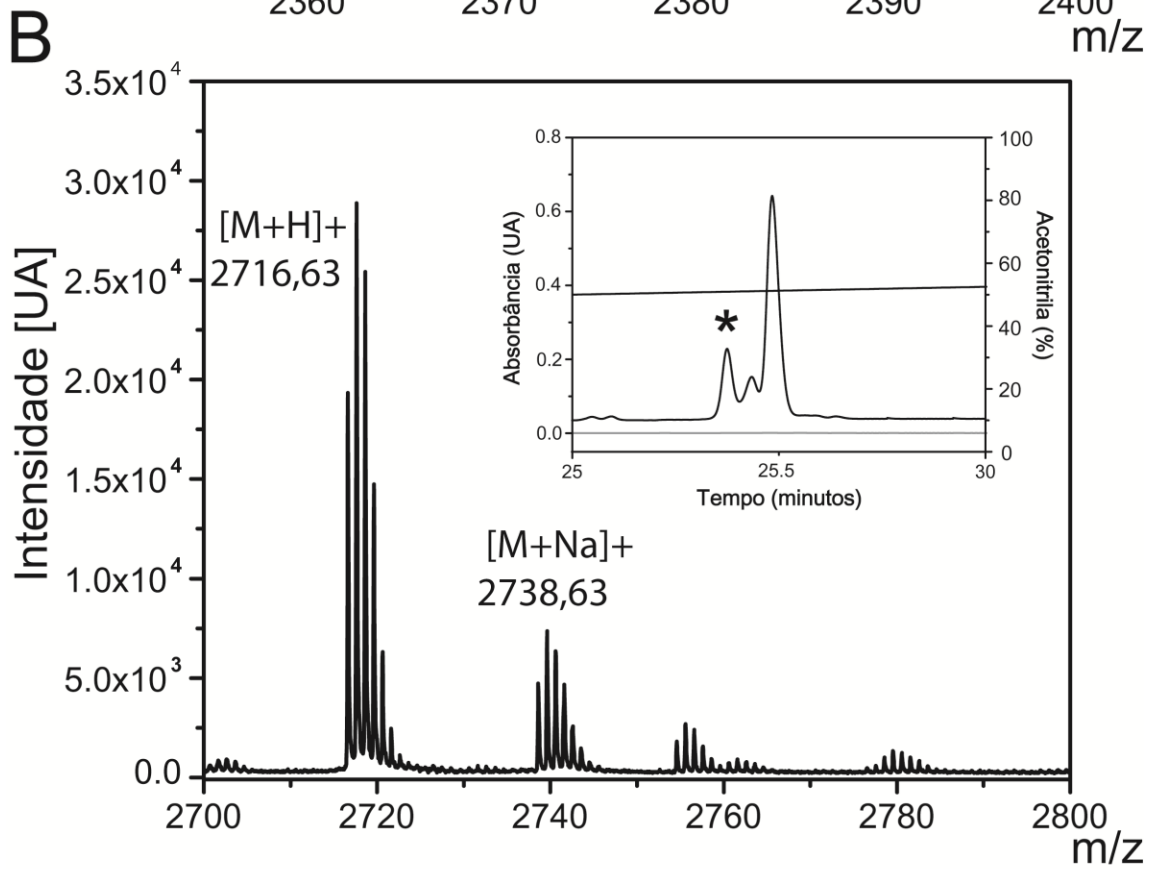
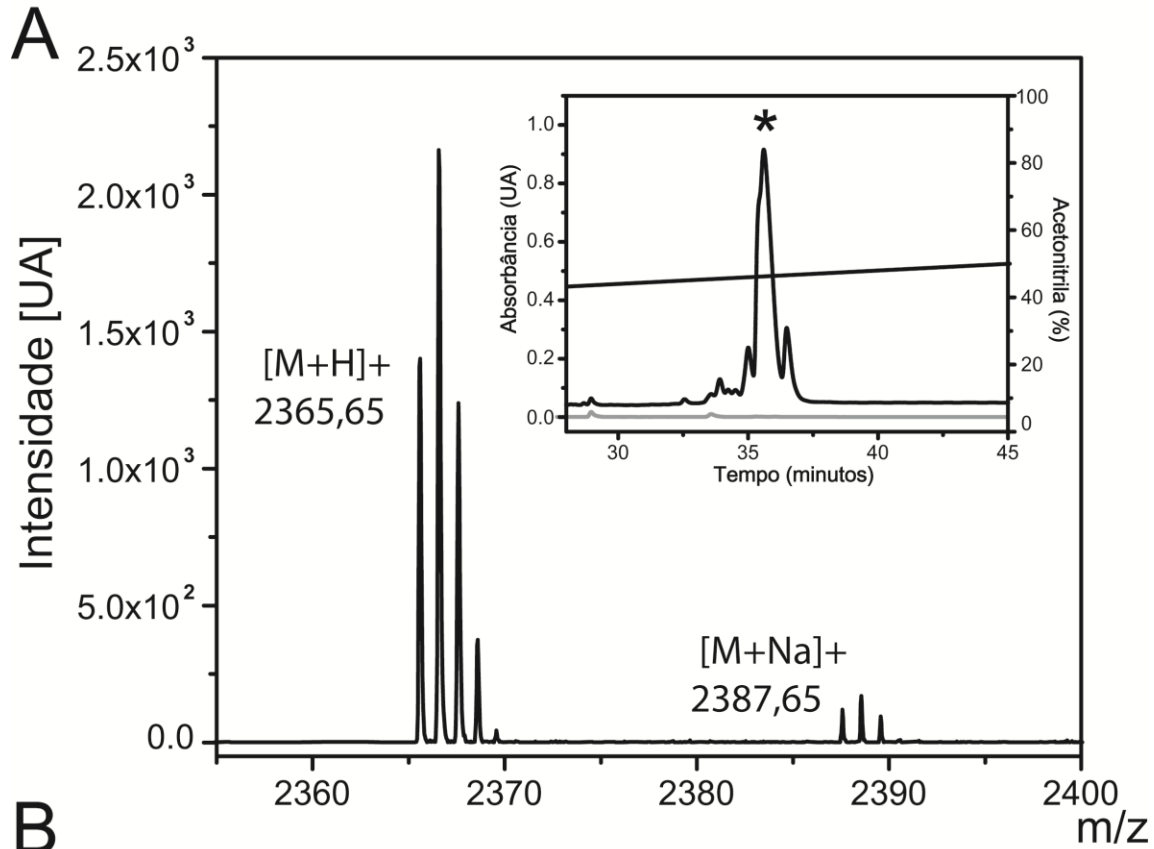
⁷ Para conferir as análises de interpretação dos espectros MS/MS obtidos - seção ‘Anexos’ desta tese.

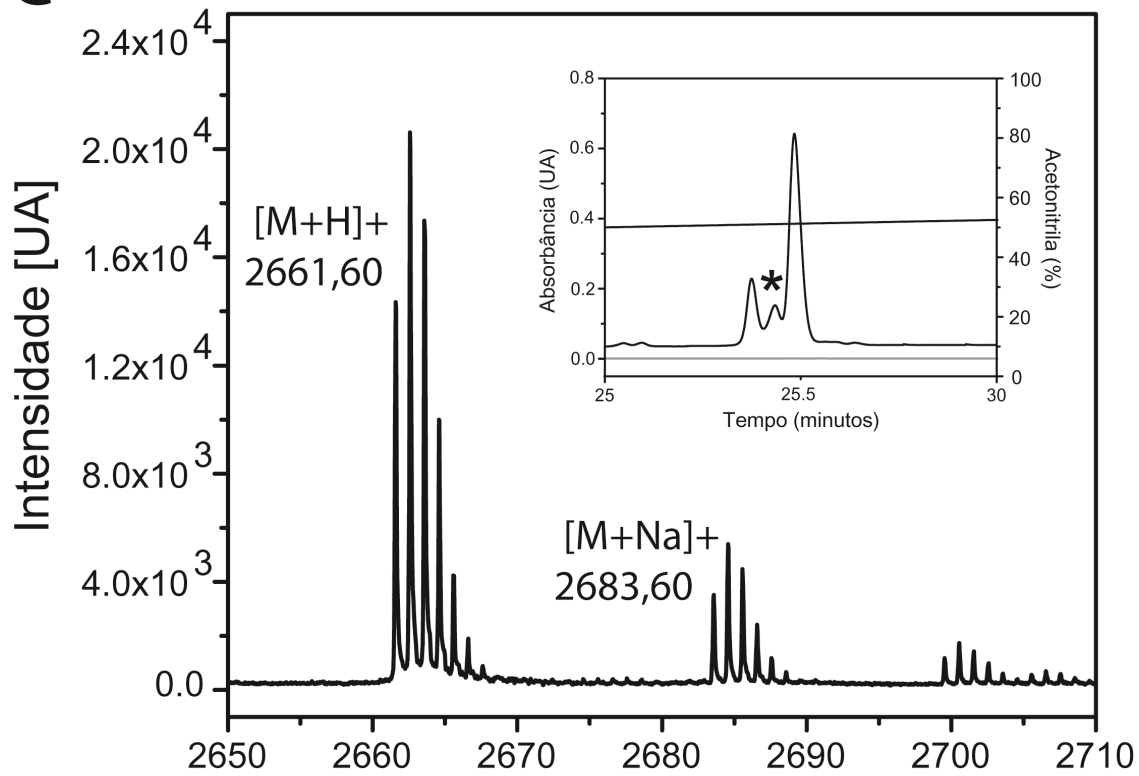
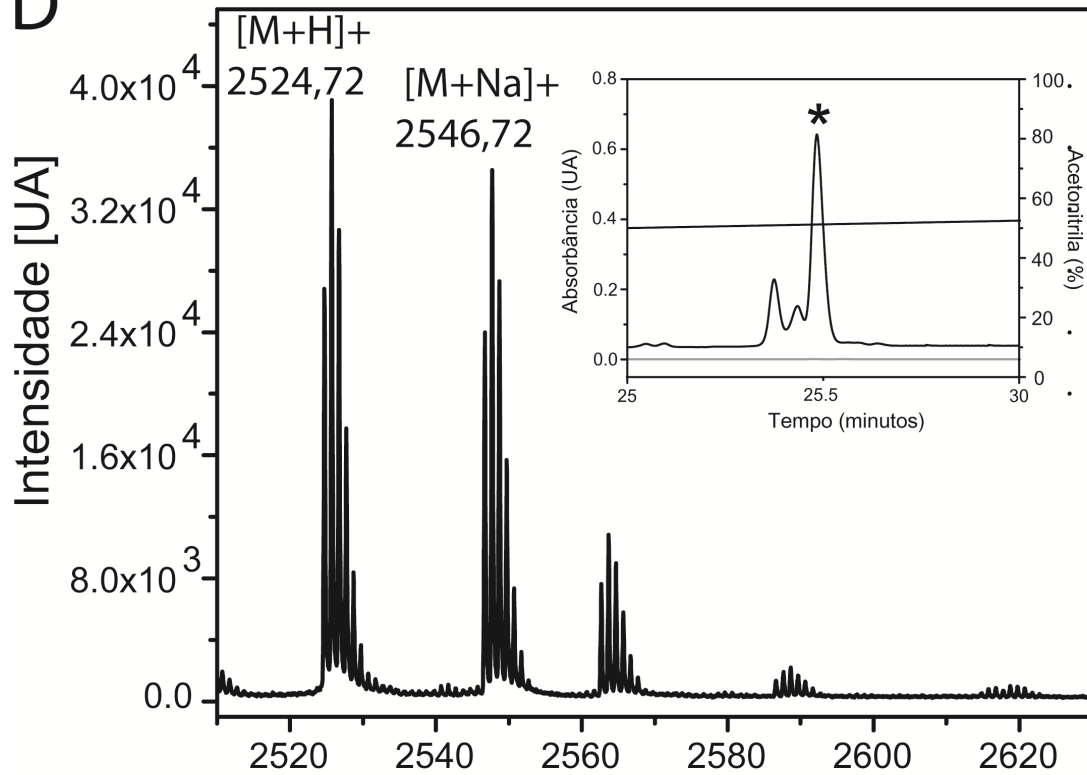
Os valores de massa molecular calculados dos peptídeos Hsp-2, Hsp-3, Hsp-4, Hsp-5 e Hsp-9 quando comparados aos valores obtidos experimentalmente, apresentaram uma diferença de aproximadamente 0,97 Da. Esta discrepância sugere a presença de uma carboxiamidação na porção C-terminal dos peptídeos (Sforca et al., 2004). Este tipo de modificação pós-traducional é comum em peptídeos antimicrobianos oriundos de anfíbios como, por exemplo, as dermaseptinas (Mor et al., 1994; Brand et al., 2002), as filoseptinas (Leite et al., 2005) e Hsp-1 (Prates et al., 2003).

As Hsp encontradas na secreção cutânea de *H. punctatus* possuem o N-terminal com identidade de 92,2% com Hsp-1. Os peptídeos desta família ainda apresentam similaridade de 53% com os peptídeos da família das dermaseptinas (*Phyllomedusa azurea*). Foram identificadas substituições conservativas de resíduos de aminoácidos Valina (V) por Isoleucina (I) e Alanina (A) por Glicina (G), todos de cadeia lateral neutra e hidrofóbicos. Além destas, também foram observadas substituições não conservativas de Lisina (K) por Alanina (A) e Glicina (G) por Histidina (H), aminoácidos de cadeia lateral carregada para aminoácidos de cadeia lateral neutra.

Informações complementares para identificação dos resíduos isóbaros como Leu/Ile e Lys/Gln foram obtidas por meio de análises de sequenciamento N-terminal por degradação de Edman e análises de cDNA. Os resultados encontrados nestes métodos foram coincidentes entre si e com os dados observados por espectrometria de massa (MS).

As Hsp-2, Hsp-3 e Hsp-4 apresentaram massa molecular de $[M+H]^+ = 2365,95$ Da e mesma composição de aminoácidos. Na Figura 10A observamos a presença de apenas uma fração cromatográfica (*), bem como de um único componente molecular. Entretanto, o espectro de MS/MS gerado permitiu três modos distintos de interpretação. Com o intuito de averiguar esta ambiguidade, a amostra foi submetida ao sequenciamento N-terminal. Os dados gerados por esta análise demonstram a co-eluição de alguns resíduos em pontos específicos da sequência. Os resíduos Phe e Leu trocam suas posições gerando os peptídeos Hsp-2 com Phe³ e Leu¹⁸ e o peptídeo Hsp-4 com Leu³ e Phe¹⁸. Ainda pode ser percebida outra troca de aminoácidos entre os resíduos Val² e Phe³ de Hsp-2, gerando o peptídeo Hsp-3 com Phe² e Val³ (vide Anexo)



C**D**

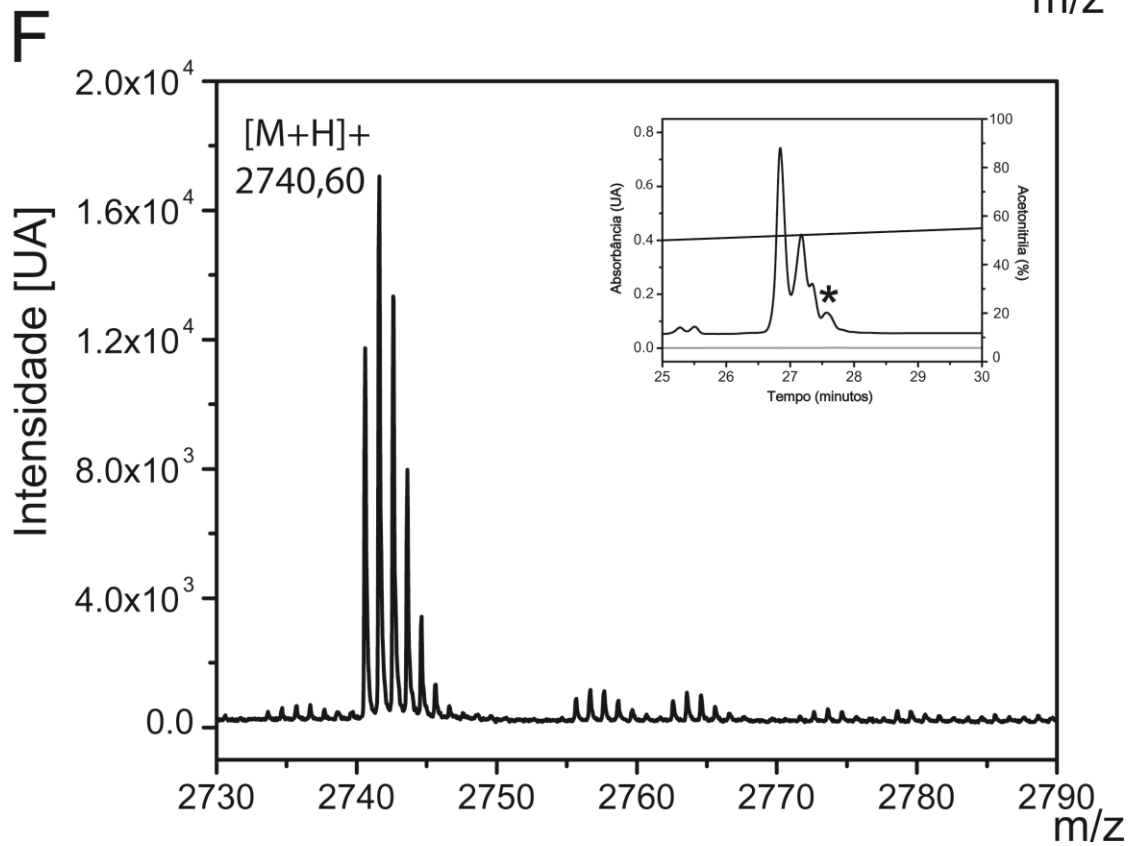
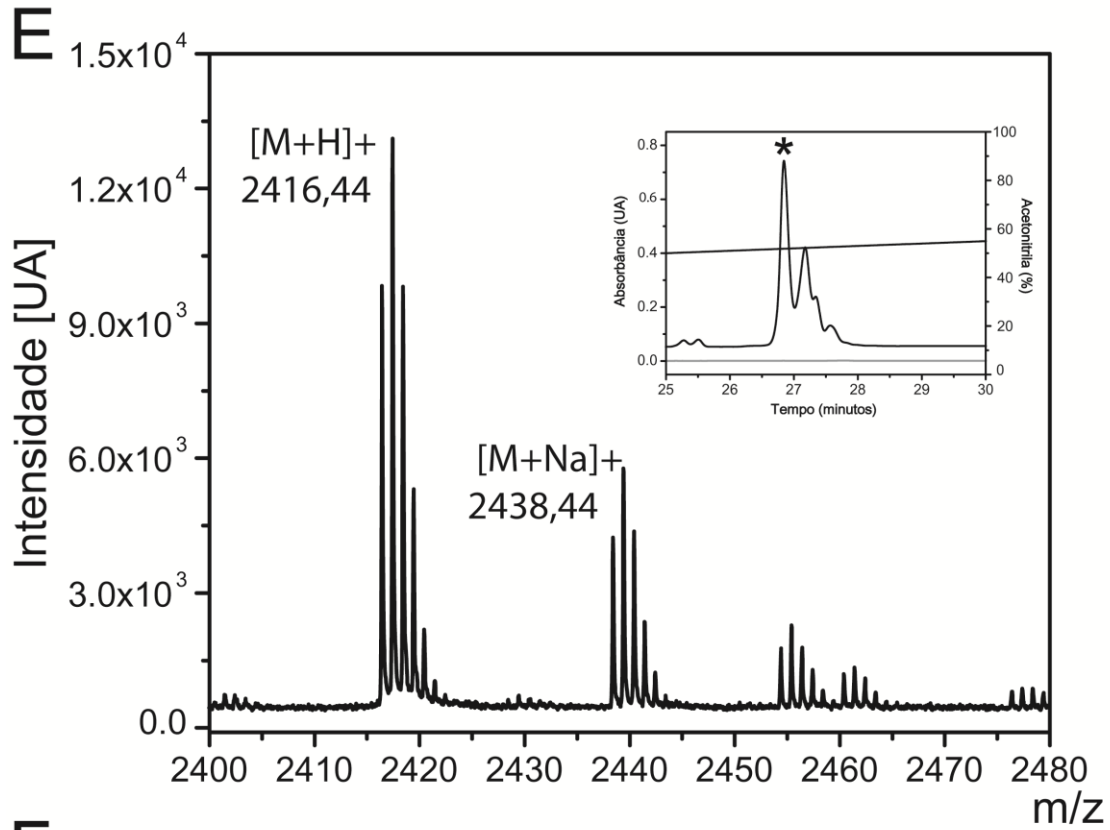


Figura 10. Purificação e caracterização de Hilaseptinas de *H. punctatus*. Espectros de massa (MS) e perfil cromatográfico analítico dos peptídeos identificados. Todas as frações foram submetidas a uma cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) em coluna analítica Vydac C₁₈, fluxo 1,0 mL·min⁻¹, utilizando gradiente modificado. A absorbância foi monitorada a 216 nm. As frações majoritárias foram submetidas à análise de espectrometria de massa MALDI TOF-TOF/MS para a determinação da massa monoisotópica dos peptídeos nativos. Nos espectros obtidos podem ser observados os adutos de sódio (Na⁺) e potássio (K⁺). Todos os espectros foram obtidos em modo refletor, usando calibrante externo. As hilaseptinas encontradas no grupo 05 são observadas na figura (A) Hsp-2, Hsp3 e Hsp-4, [M+H]⁺ = 2365,65 Da; hilaseptinas encontradas no grupo 06 nas figuras (B) Hsp-6, [M+H]⁺ = 2716,63 Da (C) Hsp-7, [M+H]⁺ = 2661,60 Da e (D) Hsp-9, [M+H]⁺ = 2524,72 Da; e hilaseptinas encontradas no grupo 07 nas figuras (E) Hsp-5, [M+H]⁺ = 2416,44 Da e (F) Hsp-8, [M+H]⁺ = 2740,60 Da.

Análises das frações do grupo 02 demonstraram a presença de hilaseptinas de menor massa molecular, as quais podem ser observadas na Tabela 5 e na Figura 11.

Tabela 5. Sequências de aminoácidos dos fragmentos de peptídeos da família Hsp.

Hsp	Sequência	MM _t [M+H] ⁺	MM _e [M+H] ⁺	pI
Hsp-01	NH2-GILDAIKAIKAAG-NH2	1311,77	1311,80	8,6
Hsp-02b	NH2-GVFDAIKAIKAAG	1331,76	1331,23	8,6
Hsp-04b	NH2-GVLDAIKAIKAAG	1297,78	1298,56	8,6
Hsp-05b	NH2-GIGDILKNIKAAG	1340,78	1340,22	8,6
Hsp-06b	NH2-GFVDTLKKIGKVAG	1433,84	1432,53	9,7
Hsp-06c	NH2-GFVDTLKKIG	1077,62	1077,62	8,6
Hsp-10b	NH2-KVALGIKNFLT	1273,78	1274,87	10,0
Hsp-11	NH2-GILDTLKALAKAAG	1341,80	1341,34	8,6
Hsp-12	NH2-KAAFHAAGDSL	1086,55	1086,45	6,7
Hsp-13	NH2-KAAFHAAGESL	1100,56	1100,20	6,7
Hsp-14	NH2-KAALHAAGESV	1053,56	1052,56	6,7
Hsp-15	NH2-KAALHAAGESL	1066,58	1066,40	6,7
Hsp-16	NH2-KAALHAAGESM	1085,53	1085,20	6,7
Hsp-17	NH2-FLGLALKLGKAVA	1300,83	1300,10	10,0

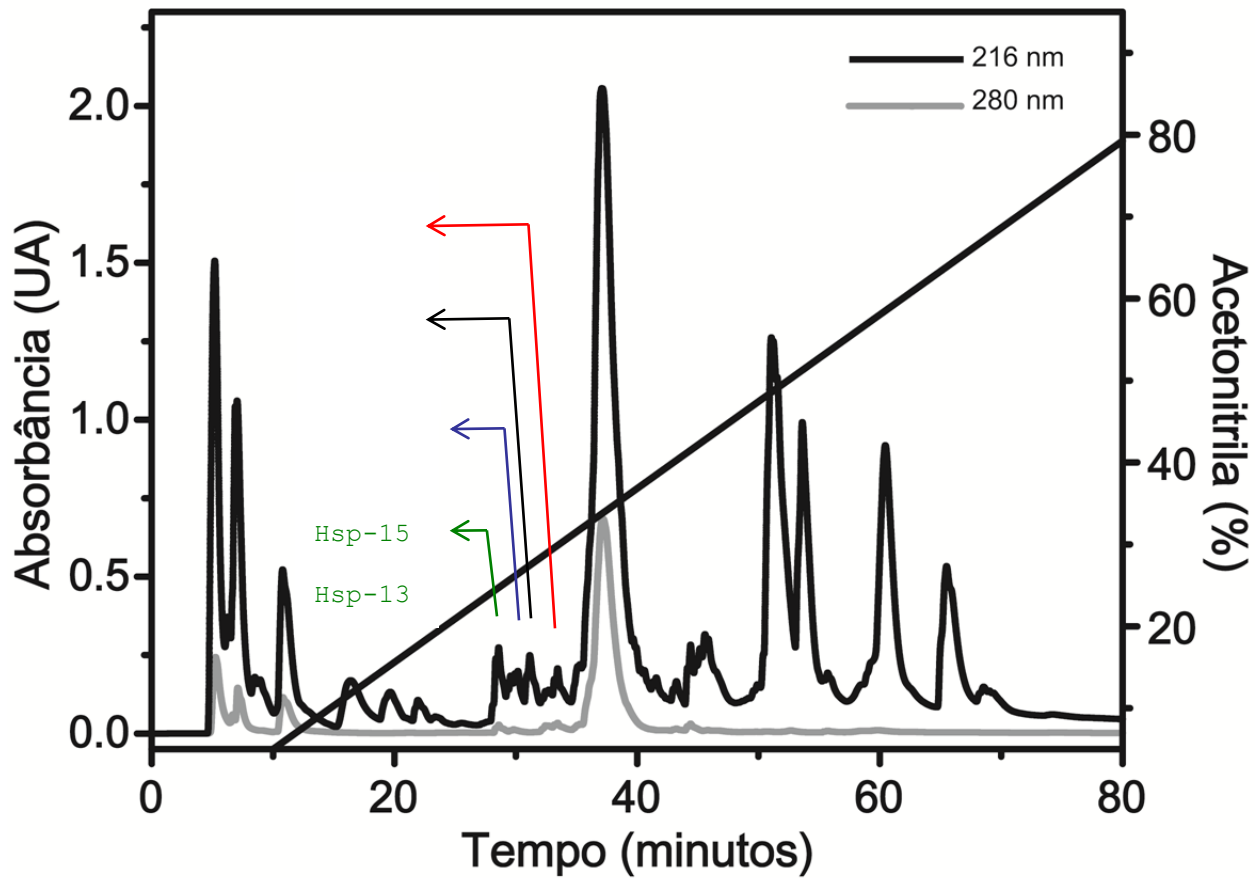


Figura 11. Localização das hilaseptinas pertencentes ao grupo 02. Todos os íons pertencentes a este grupo são fragmentos de hilaseptinas ou versões curtas. O extrato foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) em coluna semi-preparativa Vydac C₁₈, fluxo 2,5 mL·min⁻¹, utilizando gradiente linear de acetonitrila. A absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm (linhas em cor preta e cinza, respectivamente).

Análise dos cDNAs codificadores de hilaseptinas

Para determinar a sequência completa dos genes, codificadores de Hsp, foram desenhados oligonucleotídeos degenerados nas regiões conservadas, referentes ao peptídeo sinal, de peptídeos antimicrobianos descritos na literatura (i.e. dermaseptinas). Esta estratégia foi adotada devido à alta similaridade desta região nos PAM's de Hilídeos.

Os fragmentos amplificados (400 pb) foram clonados e sequenciados. As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas utilizando-se os dados depositados no Genbank – NCBI, e observou-se que correspondiam a novos genes codificadores de hilaseptinas. Os novos genes apresentaram 58% de identidade com genes correspondentes às brevininas, oriundas de *Rana esculenta* e 52% de identidade com dermaseptinas oriundas de *P. azurea*. As sequências de cDNA, codificadoras foram deduzidas e alinhadas (Figura 12).

Os cDNAs identificados possuem uma região sinal característica de sinalização para translocação na membrana do retículo endoplasmático (resíduos 1 ao 25). Esta região, conhecida como peptídeo sinal, é seguida de uma região intermediária acídica contendo 23 resíduos com um par de resíduos básicos (Lys22 e Arg23) no C-terminal. As sequências dos peptídeos apresentaram 99% de similaridade na região de peptídeo sinal e acídica, e alta variabilidade na região do peptídeo maduro, demonstrando a alta diversidade destes genes (Nicolas e El Amri, 2009).

As sequências proteicas deduzidas foram comparadas com os peptídeos identificados na secreção cutânea do mesmo anuro, e observou-se que três precursores gênicos correspondiam as Hsp-4/-6/-8, enquanto que as demais apresentavam regiões correspondentes as hilaseptinas curtas Hsp-5b/-10/-18/-19. Algumas publicações com peptídeos desta natureza relatam a presença de formas truncadas, as quais são geradas a partir de um peptídeo precursor maior. Este tipo de processamento parece modular o potencial de ação dos peptídeos, bem como o arsenal bioquímico destes animais (Magalhaes et al., 2008).

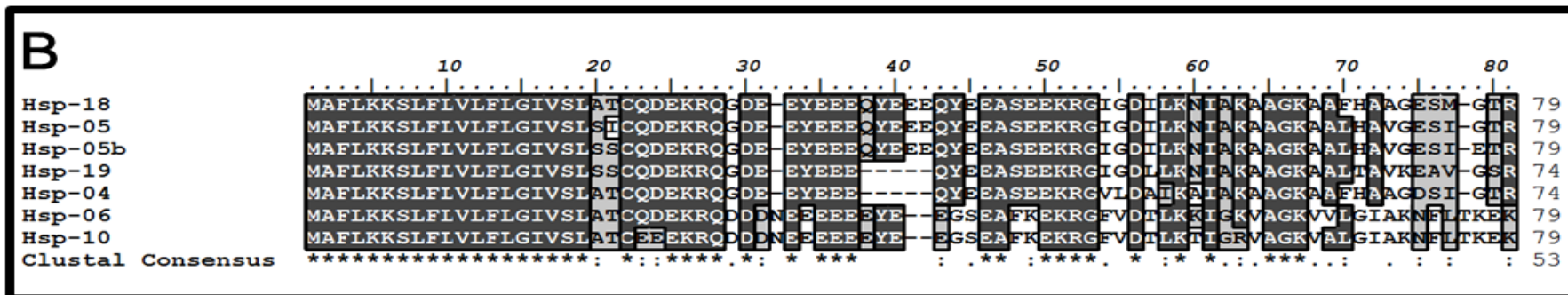
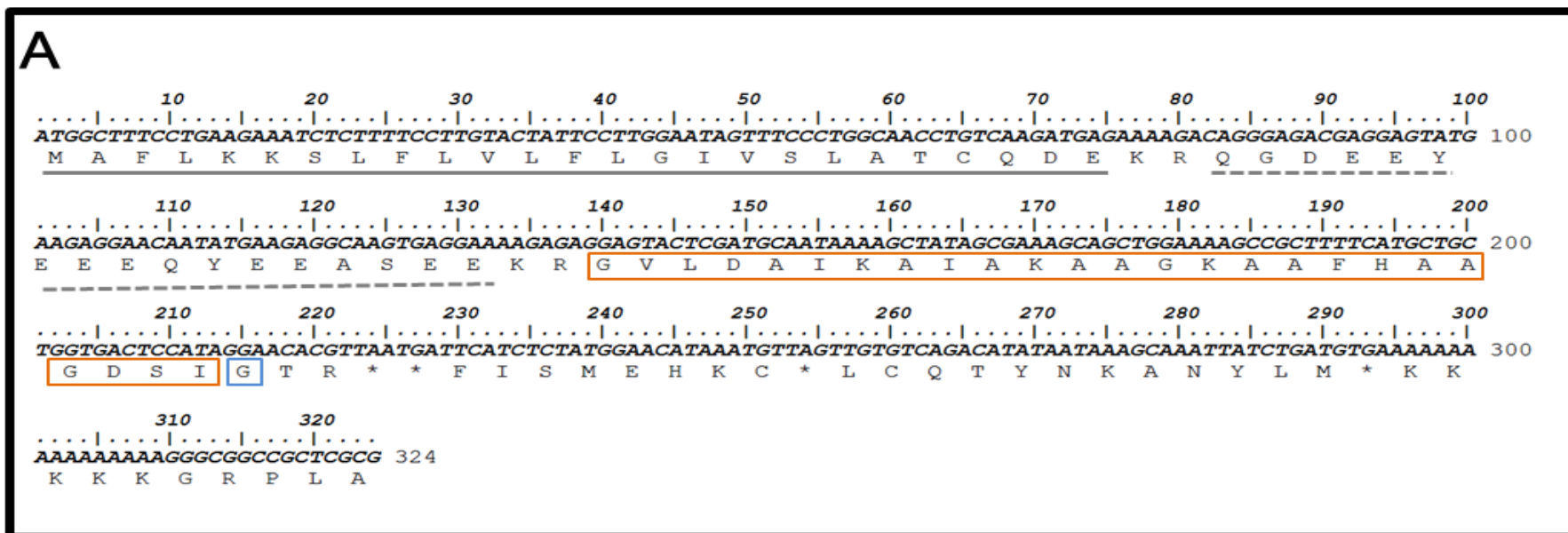


Figura 12. Identificação dos cDNAs codificadores de Hilaseptinas (Hsp). (A) cDNA de *Hsp-04* representado pelas letras em itálico, e a sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência nucleotídica em código de uma letra. As linhas contínua, pontilhada e a caixa em cor laranja representando os três domínios característicos dos peptídeos conhecidos antimicrobianos (peptídeo sinal, região ácida e o peptídeo maduro, respectivamente). (B) Alinhamento das sequências deduzidas a partir das sequências nucleotídicas de cDNA de Hsp. As sequências gênicas, juntamente com as análises de Edman, auxiliaram na confirmação dos resíduos isóbaros e também na confirmação das modificações pós-traducionais encontradas no C-terminal (carboxiamidação).

Determinação da atividade antimicrobiana de hilaseptinas

A atividade mínima inibitória (MIC) necessária para inibição do crescimento bacteriano foi testada em ensaios de micro diluição utilizando-se bactérias patogênicas da espécie humana do tipo ATCC. As bactérias testadas foram *S. aureus* (Gram-positiva), *E.coli* e *P.aeruginosa* (Gram-negativas). Os ensaios foram realizados por meio de diluição seriada dos peptídeos, partindo-se de uma concentração inicial de 256 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ até uma concentração mínima de 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Como referências foram testados antibióticos de uso comercial como ampicilina e cloranfenicol, nas mesmas concentrações molares dos peptídeos. Os peptídeos DS01 e magainina foram utilizados como peptídeos controle, devido a sua conhecida ação antimicrobiana (Zasloff, 1987; Brand et al., 2002).

Os resultados demonstram que os peptídeos pertencentes à família Hsp possuem atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento das três bactérias testadas (Tabela 6). Estes dados corroboram com os dados obtidos por Prates e colaboradores, onde o peptídeo Hsp-1, oriundo do mesmo anfíbio, pertencente à mesma família, também apresentou atividade antimicrobiana satisfatória.

Tabela 6. Determinação da atividade antibacteriana das Hilaseptinas oriundas de *H. punctatus*.

Microrganismo	MIC (μM)									
	Hsp-4	Hsp-5	Hsp-6	Hsp-7	Hsp-8	Hsp-9	Mg	DS01	Amp	Clor
<i>S. aureus</i> ATCC 29313	6,76	19,4	23,5	12,02	5,8	12,6	ND	26,5	<11	ND
<i>E. coli</i> ATCC 25922	6,76	19,4	23,5	12,02	5,8	12,6	79	6,6	46	25
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	27,06	77,03	23,5	24,05	ND	50,71	157,8	NT	25	25

ND – Atividade não determinada; NT – Atividade não testada

Fenilseptinas (Phes) – Identificação, purificação e caracterização.

As análises iniciais dos componentes obtidos a partir do fracionamento do extrato bruto permitiram a identificação de mais de 20 moléculas, por MALDI TOF-TOF/MS. Estas foram, em sua maioria, descritas como membros da classe de peptídeos antimicrobianos hilaseptina. Além destas moléculas foram encontrados dois componentes, inicialmente, denominados de ‘a’ e ‘b’, os quais foram eluídos da cromatografia com os tempos de retenção de 61.0 e 64.3 minutos, respectivamente (Figura 13A). Análises iniciais destes dois peptídeos sugeriram que estes, apesar de eluídos em frações distintas, apresentavam mesmas características, como mesma massa molecular, bem como a mesma sequência primária.

Objetivando confirmar este resultado, cada uma das frações foi submetida a novos passos cromatográficos, agora em escala analítica, para obtenção de amostras homogêneas para ambos os peptídeos (Figura 13B-E). A diferença com relação ao tempo de retenção foi então confirmada (Figura 14B, linha preta), e as análises moleculares de massa monoisotópica refeitas, confirmando que as duas amostras apresentavam valor de $M+H^+ = 1954,2$ Da (Figura 14A).

Os íons precursores dos peptídeos foram novamente fragmentados no modo LIFT (MS/MS) em um MALDI TOF-TOF/MS e os espectros foram manualmente interpretados. A análise dos espectros de MS/MS permitiu o reconhecimento completo dos fragmentos gerados, e das séries de íons y e b confirmando uma similaridade de 100% entre os íons dos dois peptídeos (Figura 15). Ao final, foi obtida uma sequência de 18 resíduos: FFFDTLKNLAGKVIGALT-NH₂.

Análises de degradação de Edman e dos fragmentos trípticos correspondentes excluíram a possibilidade de típicas ambiguidades de MS/MS para resíduos isóbaros como leucina/isoleucina e lisina/glutamina Tabela 7. Além disso, identificamos nos dois peptídeos uma amidação da porção C-terminal no resíduo Thr-18, e este mesmo resultado foi confirmado pelas análises de cDNA como demonstrado na Figura 16.

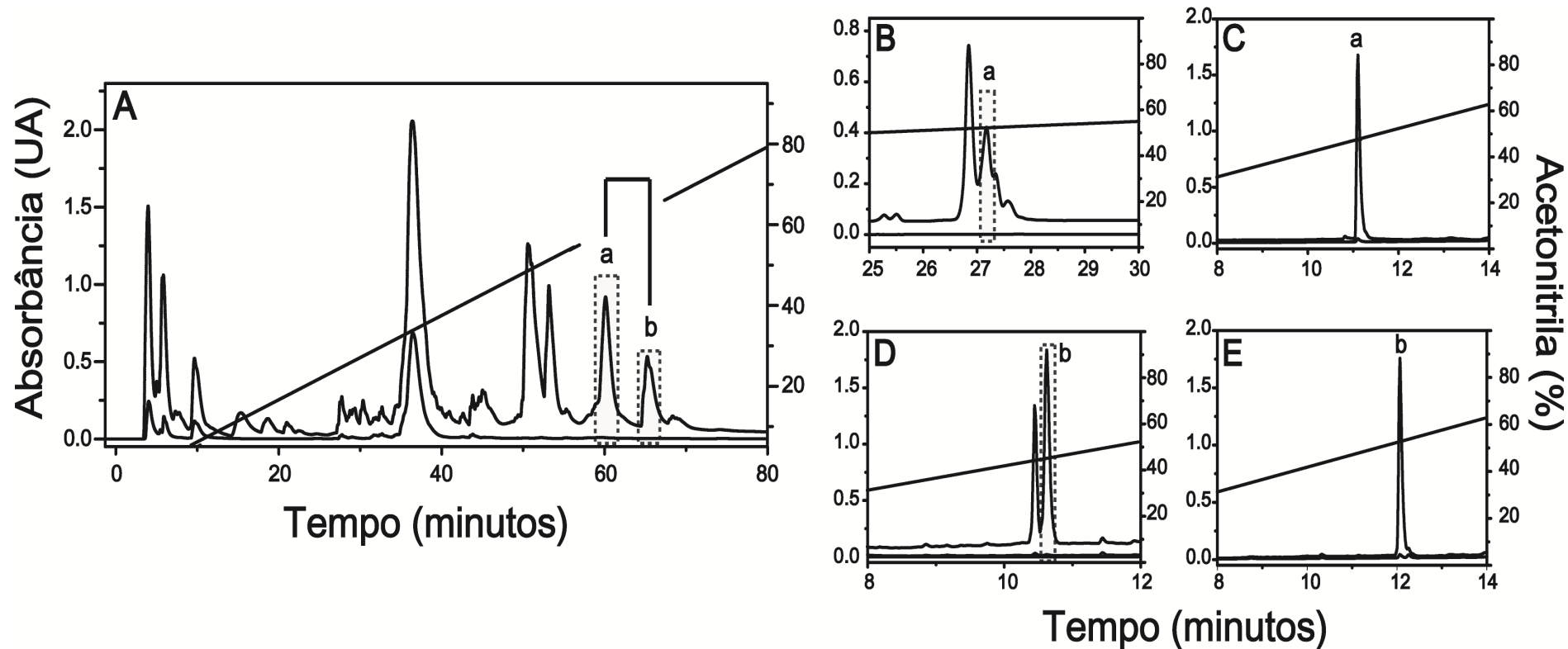


Figura 13. Identificação e purificação de fenilseptinas presentes na secreção cutânea de *H. punctatus*. Identificação dos peptídeos fenilseptina ‘a’ e ‘b’ que são eluídos a 61 e 64.3 minutos, respectivamente (A). Purificação do componente ‘a’ (B) e ‘b’ (D) purificados por cromatografia de fase reversa utilizando colunas RPC ST 4.6 mm/150 mm de poliestireno/divinil benzeno com gradientes de acetonitrila otimizados, em um fluxo de $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Após estes passos cromatográficos em gradientes lentos de acetonitrila, os peptídeos ‘a’ (C) e ‘b’ (E) foram finalmente purificados por cromatografia ultra rápida de alta eficiência (UFLC Prominence system Shimadzu Co., Japão) usando uma coluna Shimpack-XR-ODS (Shimadzu Co) em um gradiente linear de acetonitrila, com fluxo de $0.4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Em todos os passos a absorbância foi monitorada a 216 nm, e quando necessário a 254 ou 280 nm.

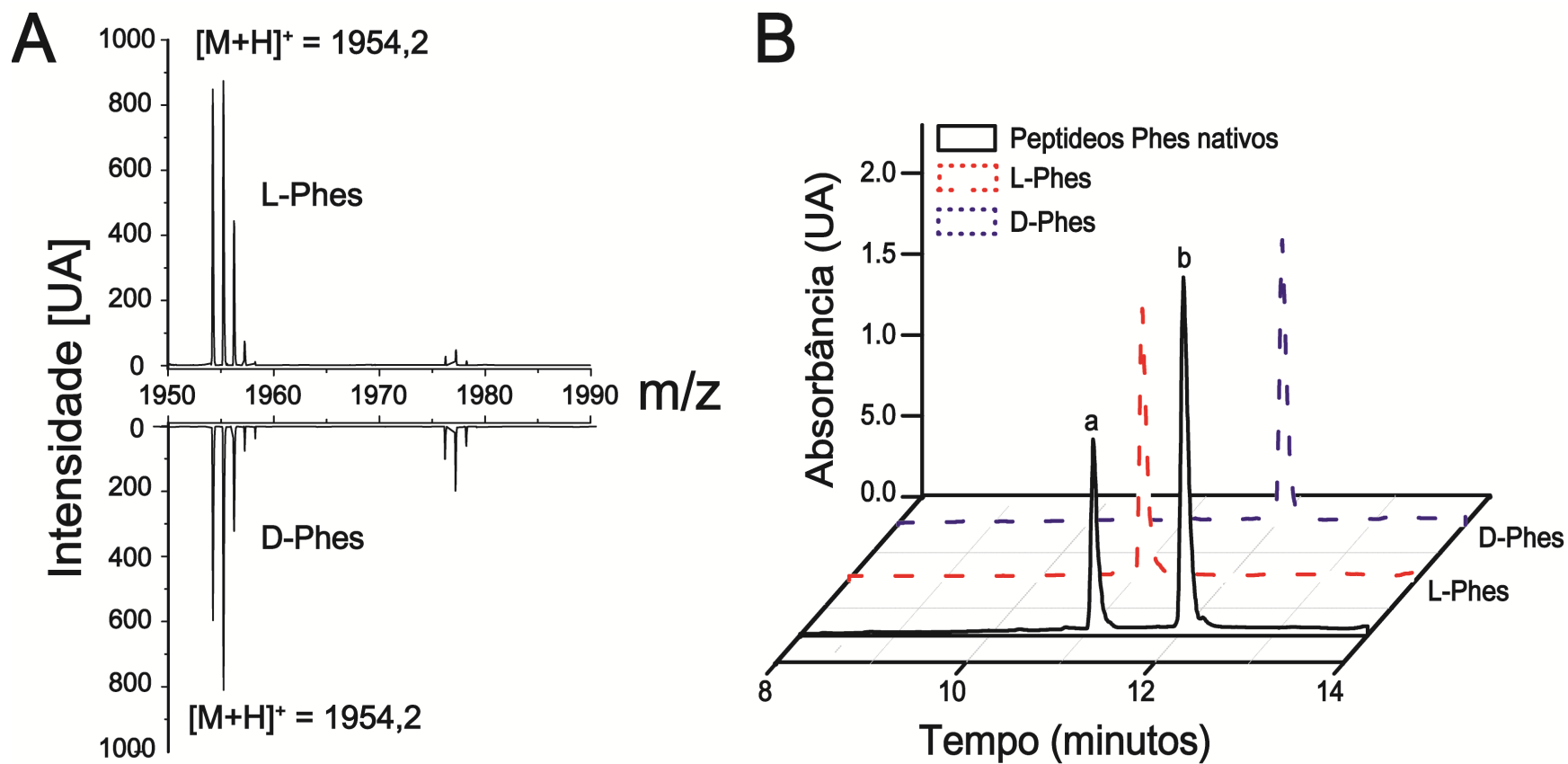


Figura 14. Determinação da massa molecular e tempo de retenção de fenilseptinas. (A) A massa molecular acurada e a pureza dos íons de Phe foram determinados por MALDI-TOF/MS (UltraFlex III, Bruker Daltonics, Alemanha) e a massa molecular observada foi 1954.2 para os dois peptídeos. (B) Perfil cromatográfico analítico dos peptídeos naturais (linha preta) e sintéticos L- Phe (linha vermelha pontilhada) e D- Phe (linha azul pontilhada). Quantidades equimolares dos dois peptídeos foram misturadas com o intuito de formar uma única amostra homogênea, a qual foi submetida a uma cromatografia líquida ultra rápida (UFLC-HPLC) usando uma coluna Shimpack-XR-ODS (Shimadzu Co) com gradiente linear de acetonitrila, e fluxo de $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Duas frações foram obtidas: L- Phe a 11 minutos e D- Phe 12 minutos.

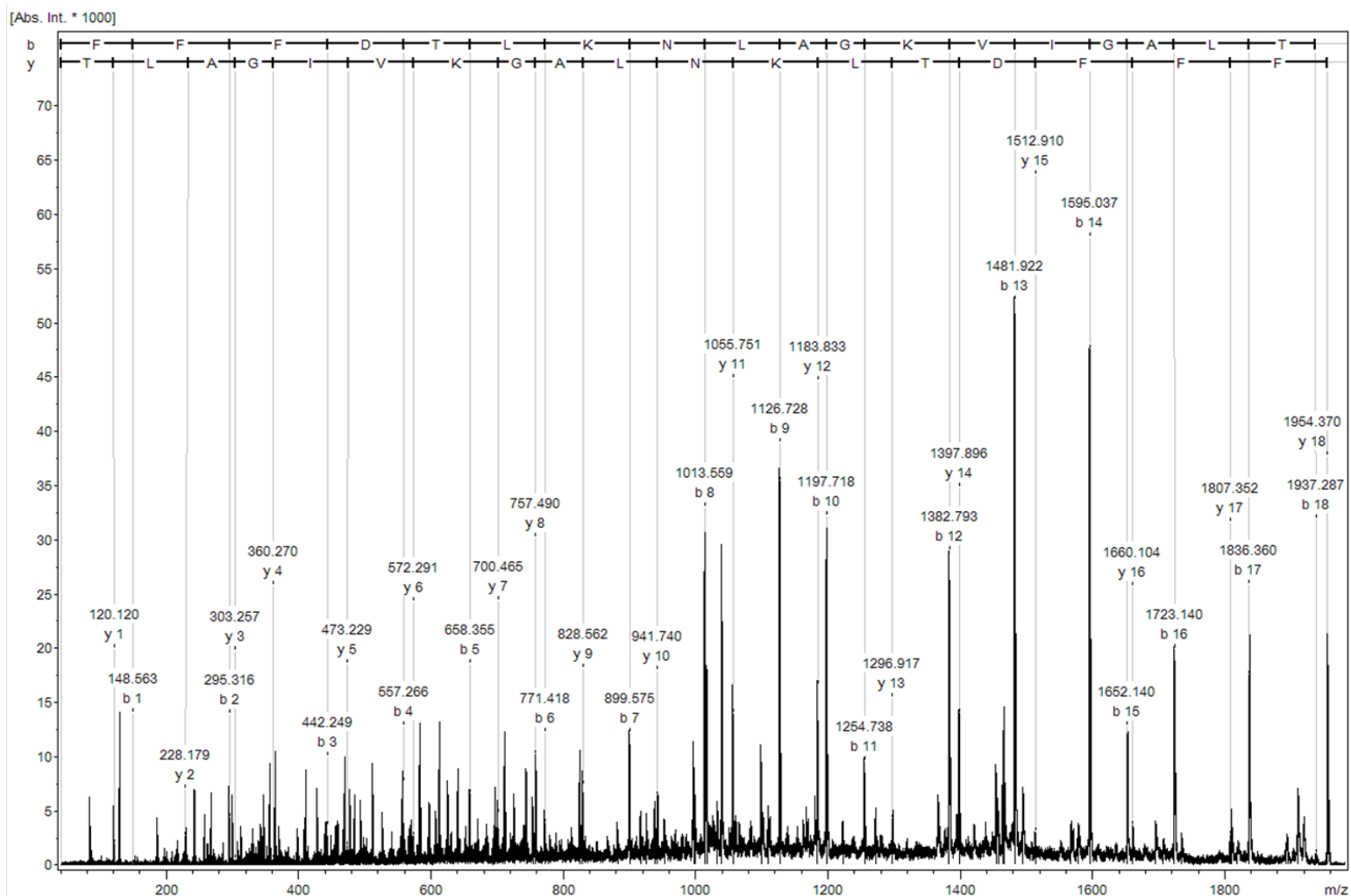


Figura 15. Assinalamento do espectro de MS/MS para os fragmentos dos peptídeos L/ D- Phes. A massa molecular observada foi de 1954.2 Da. Os peptídeos foram fragmentados por experimentos de MALDI-LIFT-MS/MS demonstrando o mesmo perfil de fragmentação. Os resultados foram analisados manualmente usando o programa Pepseq (Garrett, 1995) e Flex Analysis 3.0 (Bruker Daltonics). A sequência primária foi confirmada por degradação de Edman (PPSQ-23 Shimadzu Corp.). A perda de 1 Da no C-terminal Thr-18 indica a presença de uma amidação. Carga do precursor:+1. Tolerância:0.3 Da.

Tabela 7. Íons preditos de fenilseptina que corroboram com aqueles observados experimentalmente.

N-terminal*	Ion*	a_{calc}	b_{calc}	y_{calc}	z_{calc}	C-terminal *	Ion *
F	1	120.08	148.08	1954.12	1937.09	T	18
F	2	267.15	295.14	1807.05	1790.02	L	17
F	3	414.22	442.21	1659.98	1642.95	A	16
D	4	529.25	557.24	1512.91	1495.88	G	15
T	5	630.29	658.29	1397.88	1380.85	I	14
L	6	743.38	771.37	1296.84	1279.81	V	13
K	7	871.47	899.47	1183.75	1166.72	K	12
N	8	985.51	1013.51	1055.66	1038.63	G	11
L	9	1098.6	1126.59	941.61	924.58	A	10
A	10	1169.64	1197.63	828.53	811.5	L	9
G	11	1226.66	1254.65	757.49	740.46	N	8
K	12	1354.75	1382.75	700.47	683.44	K	7
V	13	1453.82	1481.82	572.38	555.35	L	6
I	14	1566.9	1594.9	473.31	456.28	T	5
G	15	1623.93	1651.92	360.22	343.19	D	4
A	16	1694.96	1722.96	303.2	286.2	F	3
L	17	1808.05	1836.05	232.17	215.14	F	2
T	18	1909.1	1937.09	119.08	102.05	F	1

* Os números e os códigos de uma letra dos aminoácidos correspondem ao peptídeo precursor e seus respectivos resíduos. Tolerância de massa 0.1 Da.

Um único gene codificador da família Fenilseptina

A partir da biblioteca de cDNA gerada para as hilaseptinas, identificamos uma sequência nucleotídica codificadora para um típico precursor de gene antimicrobiano na forma de pré-pró-peptídeo, a qual contém em sua sequência deduzida um peptídeo, de 18 resíduos de aminoácido, 100% idêntico aquele previamente descrito por espectrometria de massa (*de novo*) e degradação de Edman. O fragmento gênico apresenta antes do *stop códon* (taa), um códon para o resíduo de aminoácido Glicina (Gly-G), característico de peptídeos carboxiamidados (Figura 16). Na sequência de aminoácidos deduzida nota-se a presença dos três domínios característicos dos peptídeos conhecidamente antimicrobianos: peptídeo sinal, em caixa, região acídica, em linha tracejada, e o peptídeo maduro em negrito (Figura 16A).

A sequência de aminoácidos deduzida do pré-pró-peptídeo apresentou identidade com outras sequência de genes antimicrobianos descritos na família Ranidae, nas espécies *Rana rugosa* (37% gaegurina), *Rana temporaria* (48% brevinina-2Ta e 46% 2Tb), *Rana esculenta* (50% brevinina-2Ef), e com um gene descrito na família Hylidae, na espécie *Litorea aurea* (54% aureina 3.1; 56% aureina 2.5 e aureina 2.3; 57 % aureina 2.2). Todos os dados foram obtidos no banco de dados GenBank™ (Figura 16B).

O peptídeo pouco convencional contendo o motivo phe-phe-phe na porção N-terminal, com estrutura primária madura semelhante a outras moléculas antimicrobianas, apresentando duas formas com relação ao tempo de retenção por RP-HPLC e a confirmação de uma sequência proteica primária idêntica para ambas, nos levou a formular a hipótese de que existiria, ao longo da cadeia polipeptídica, pelo menos um resíduo de aminoácido isômero.

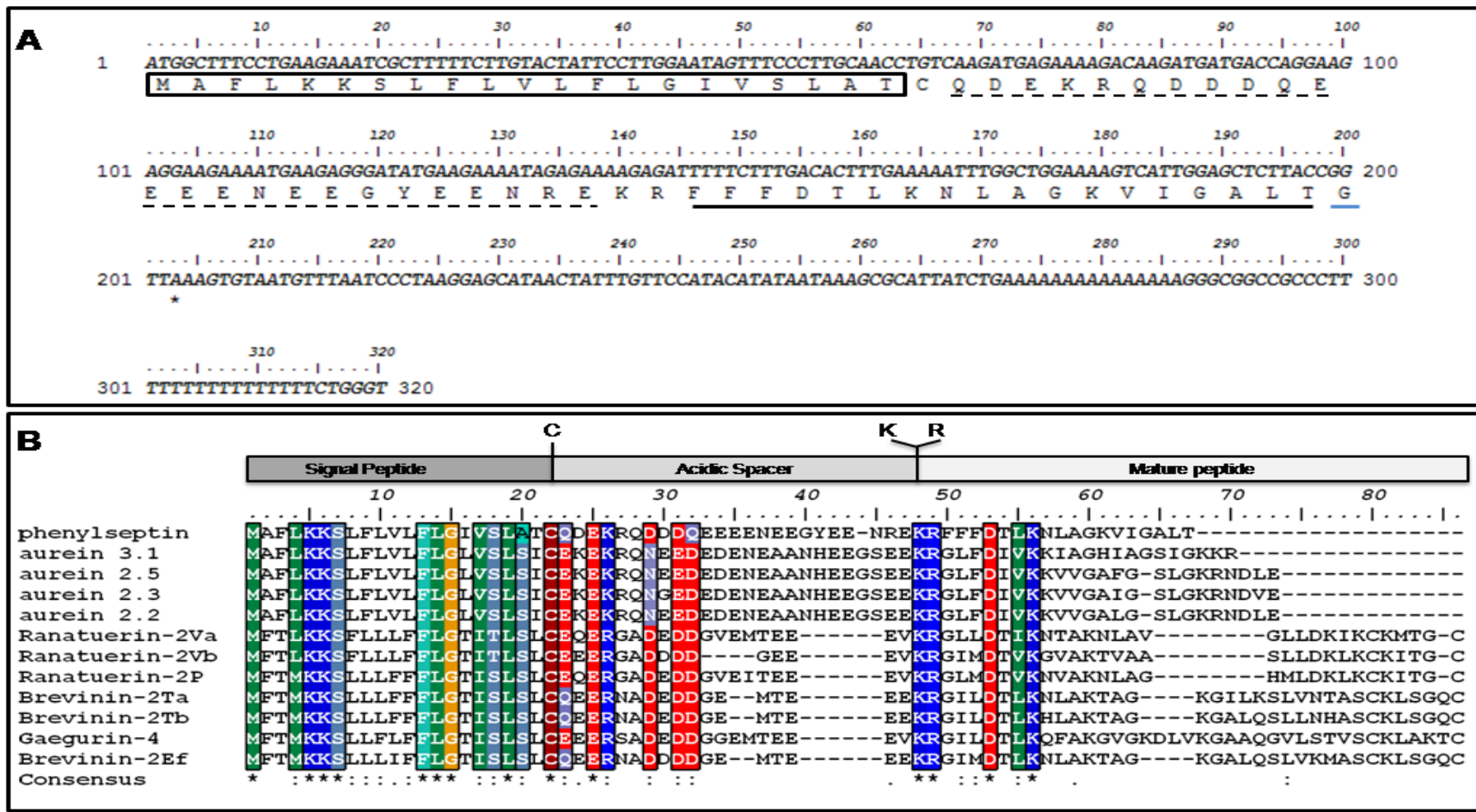


Figura 16. Um único gene codificador de fenilseptinas (A) Sequência nucleotídica do gene codificador de fenilseptina. (A) Em destaque, peptídeo sinal (em caixa), região ácida (linhas pontilhadas) e o peptídeo maduro (negrito sublinhado); códon C-terminal referente a uma glicina (azul) e o códon de terminação (*). A sequência nucleotídica foi depositada no banco de dados NCBI com número de acesso HQ0112497. (B) A sequência de aminoácidos deduzida de fenilseptina foi alinhada com outras sequências conhecidas de híldeos (aureína, ranatuerina, brevinina e gaegurina). O alinhamento das sequências foi realizado no programa CLUSTAL W e editado no programa BIOEDIT.

D- fenilalanina está presente no peptídeo natural D- Phes ('b').

Análises de RP-UFLC usando colunas Shim-Pack-XR-ODS (2.0 mm *i.d.* x 30.0 mm) C₁₈ determinaram que Phes 'a' estava relacionado com um tempo de retenção de 11 minutos, enquanto, Phes 'b' com um tempo de retenção de 12 minutos. (Figura 14B – linha contínua preta). Após digestões enzimáticas com tripsina imobilizada, os fragmentos gerados foram submetidos a uma análise de UFLC, a qual determinou o tempo de retenção de cada um (Figura 17 e Tabela 8).

Esta análise permitiu observar que o fragmento 1-7, correspondente à porção N-terminal de Phes 'b' (FFFDTLK; M+H⁺ = 917.55 Da) tem quase um minuto de diferença (em relação ao tempo de retenção) quando comparado com o mesmo fragmento em Phes 'a'. Com o intuito de investigar a presença de um resíduo de D- fenilalanina na segunda posição do N-terminal como descrito por outros trabalhos (Mangoni et al., 2006), foram sintetizados análogos contendo [D-Phe2]-Phes e [L-Phe2]-Phes (de agora em diante chamados de D-Phes e L-Phes, respectivamente).

Os peptídeos foram sintetizados manualmente pela técnica Fmoc/t-butila em suporte sólido. O produto bruto (aproximadamente 20 mg) obtido para cada uma das sínteses foi submetido a uma primeira análise de espectrometria de massa para confirmação do produto de interesse de massa [M+H]⁺ = 1954 Da na amostra (Figura 18 e Figura 19). Frações contendo os peptídeos sintéticos foram submetidas a uma nova RP-HPLC em coluna analítica C₁₈ para obtenção de amostras homogêneas em larga escala. Após estas etapas o peptídeo nativo Phes 'a' co-eluiu com L-Phes, enquanto que Phes 'b' co-eluiu com D-Phes, como pode ser observado na Figura 14.

Tabela 8. Fragmentos trípticos teóricos gerados pela fragmentação com a enzima tripsina

Fenilseptina	Região	Sequência	MM [M+H] ⁺		Hidrofobicidade ^b
			Calc.	Exp.	
	1-7	FFFDTLK	917.4	917.5	2.51
FFFDTLK NLAG K VIGALT-NH2	8-12	NLAGK	502.2	524.1 ^a	-2.16
	13-18	VIGALT-NH2	572.3	594.1 ^a	2.53

* Massa molecular calculada utilizando o programa *PeptideMass* disponível *on-line* no *Expasy* (<http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html>).

^a A massa molecular experimental determinada corresponde aos adutos de sódio [M+Na]⁺ = 22Da

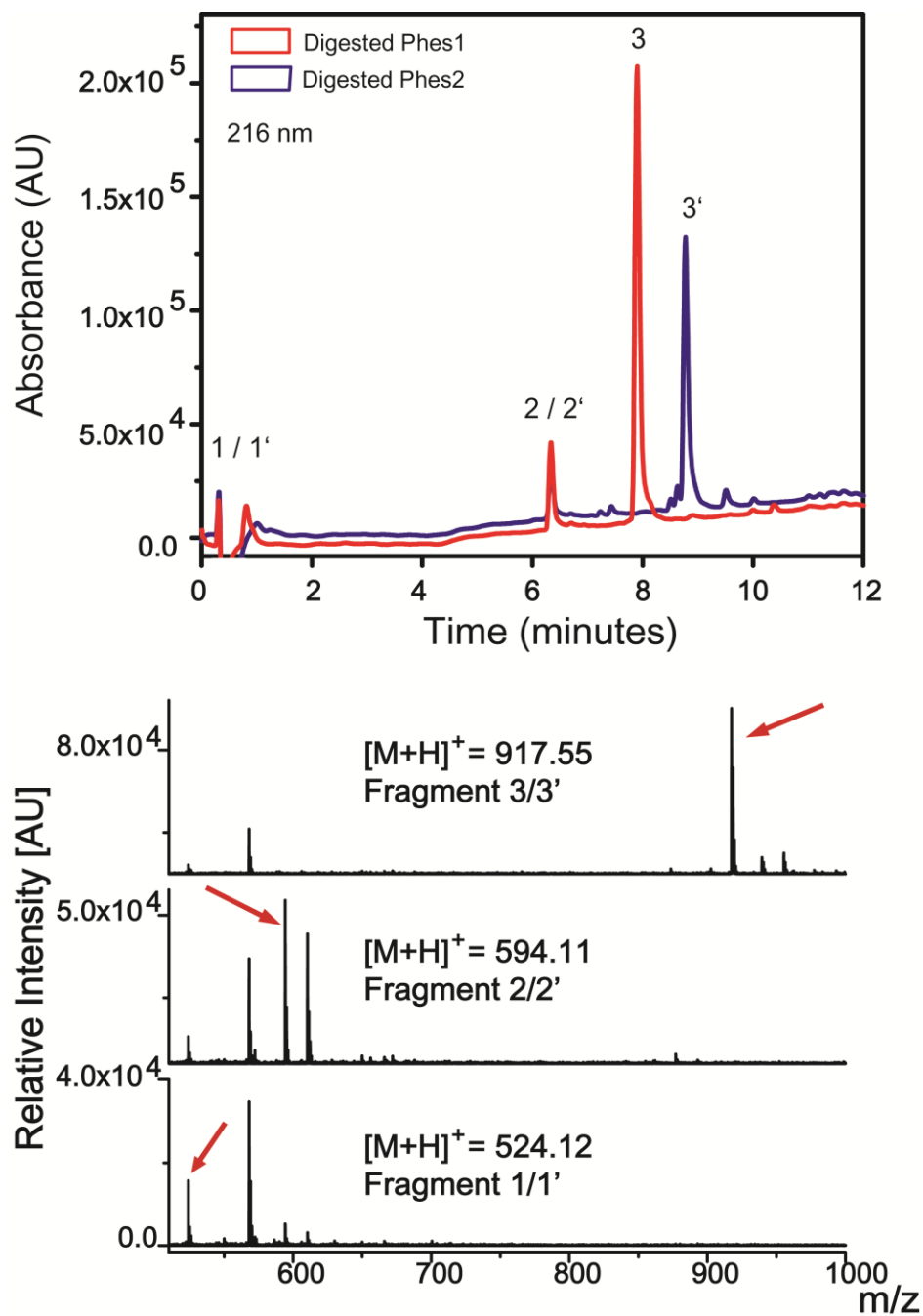


Figura 17. Análises por UFLC e espectrometria de massa da digestão enzimática dos peptídeos naturais L/D-Phes. (A) Perfil cromatográfico analítico dos peptídeos digeridos usando UFLC-HPLC com coluna Shimpack-XR-ODS, com gradiente linear de acetonitrila, fluxo de $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. L- Phes (linha vermelha) e D- Phes (linha azul) geraram três fragmentos cada. Fragmentos 1/1' e 2/2' foram eluídos ao mesmo tempo, enquanto que o fragmento 3/3' foi diferencialmente eluído com uma diferença de aproximadamente 1 minuto. (B) A massa molecular acurada e o grau de pureza de todos os fragmentos foram determinados por MALDI TOF-TOF/MS (UltraFlex III, Bruker Daltonics, Alemanha) e as massa moleculares observadas foram 524,1 para 1/1', 594,1 para 2/2' e 917 para o fragmento 3/3'.

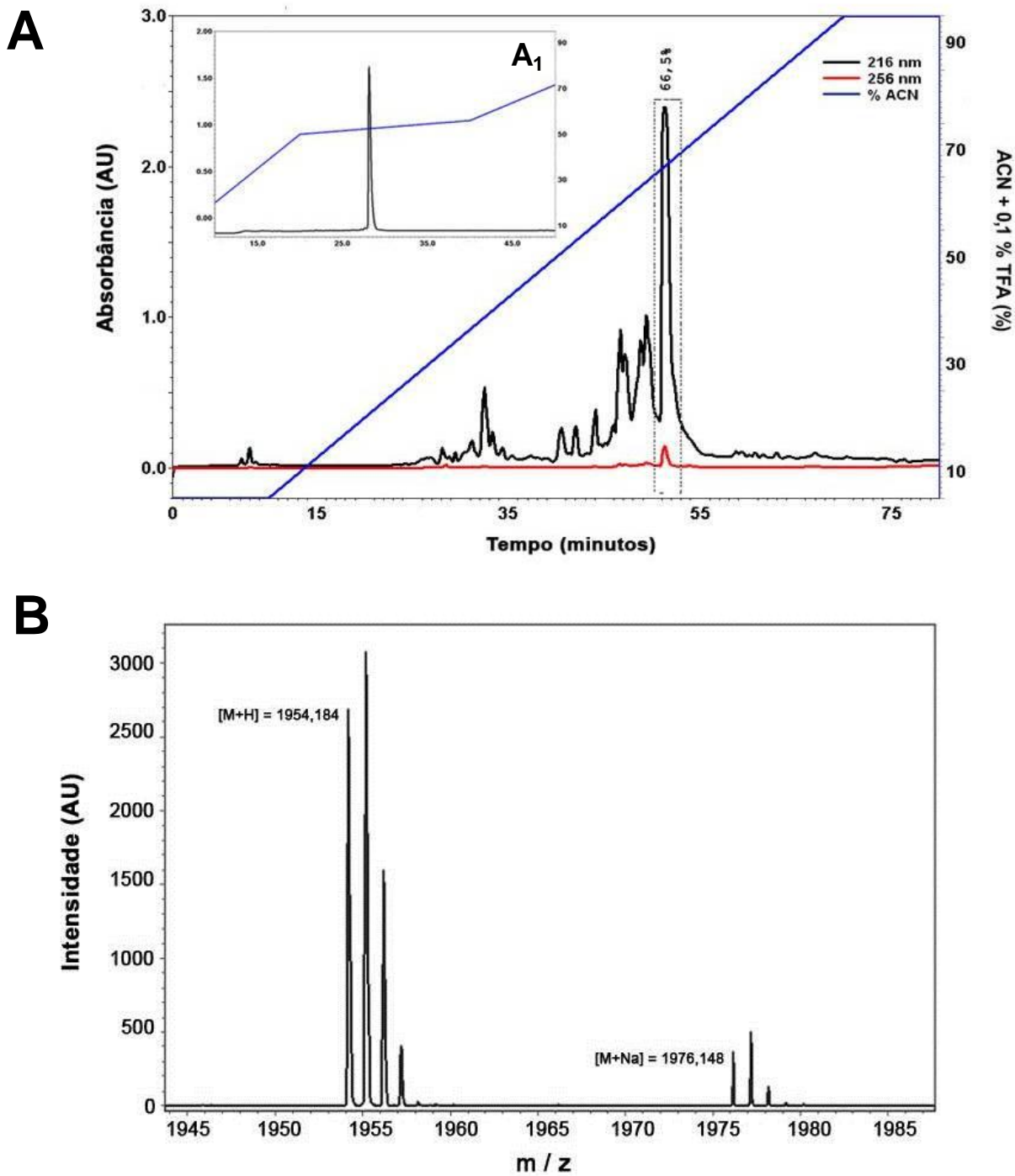


Figura 18. Purificação do peptídeo sintético L-Phe. (A) Perfil cromatográfico do extrato bruto, destacando o peptídeo sintético L-Phe eluído com 66,5% de acetonitrila e em A₁ o perfil cromatográfico analítico do peptídeo, demonstrando a pureza do material. (B) Massa monoisotópica do peptídeo sintético, seus adutos de sódio (Na⁺) e potássio (K⁺), e as impurezas. O espectro foi obtido em modo refletido, usando calibrante externo.

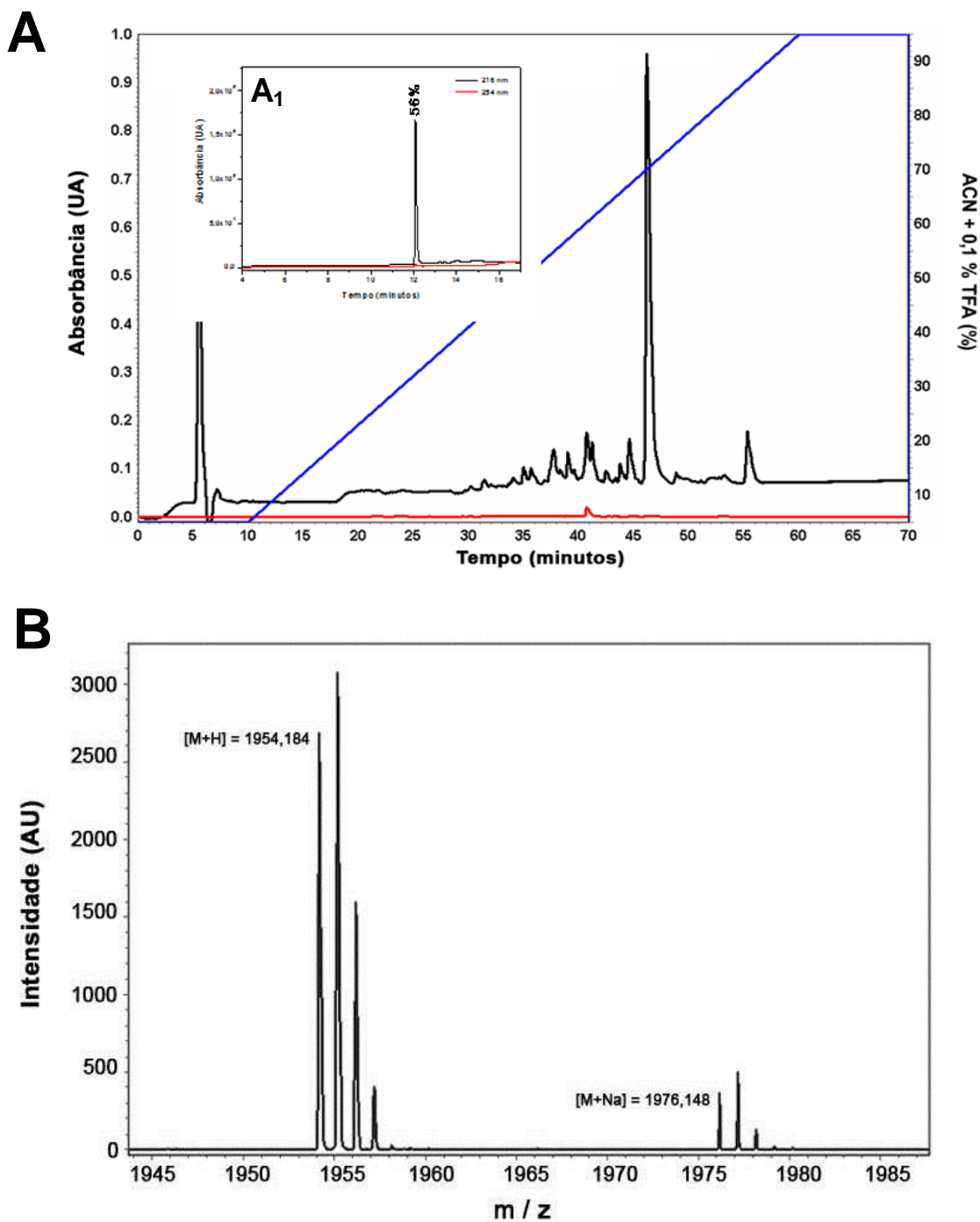


Figura 19. Purificação do peptídeo sintético D-Phes. (A) Perfil cromatográfico do extrato bruto, destacando o peptídeo sintético D-Phes eluído com 70,5% de acetonitrila e em A₁ o perfil cromatográfico analítico do peptídeo, demonstrando a pureza do material. (B) Massa monoisotópica do peptídeo sintético, seus adutos de sódio (Na⁺) e potássio (K⁺), e as impurezas. O espectro foi obtido em modo refletido, usando calibrante externo.

L- Phes e D- Phes tem atividade antimicrobiana distinta

Ensaios de atividade antimicrobiana realizados *in vitro* demonstraram que os peptídeos possuem atividades distintas contra as bactérias patogênicas *S. aureus* (ATCC 29313) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Especificamente, D- Phes foi mais efetivo contra estas bactérias do que L- Phes e Magainina (Mg), porém menos efetivo do que DS01, que foi utilizado com controle positivo mais potente. Quando testados contra a bactéria fitopatogênica *X. axonopodis pv glycines ISBF 327* o MIC obtido para D- Phes foi oito vezes maior do que L- Phes, 4,1 contra 32,7 μM , respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9. Determinação da atividade antibacteriana das Fenilseptinas oriundas de *H. punctatus*.

Microrganismo		MIC (μM) ^a					
		L-Phes	D-Phes	Mg	DS-01	Amp	Cloran
<i>S. aureus</i>	ATCC 29313	65.5	32.7	ND	26,5	<11	ND
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	65.5	65.5	79	6,6	46	25
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	>130	130	157.8	NT	25	25
<i>X. axonopodis pv glycines ISBF 327</i> ^a		32.7	4.1	13	<1.42	ND	ND

^aMIC - "minimal inhibitory concentration". Concentração mínima que inibe o crescimento bacteriano em micro-molar.

*ND - Atividade antimicrobiana não-detectada;

^a Bactéria fitopatogênica; Amp e Cloran- ampicilina e cloranfenicol;

Mg -Peptídeo controle Magainina (Zaslouff, et al);

DS01 - Peptideo controle (Brand, et al).

Estudos conformacionais dos análogos de fenilseptina por Mobilidade iônica acoplada a espectrometria de massa (IM-MS).

Com o objetivo de investigar as possíveis preferências conformacionais dos análogos de Fenilseptina, os mesmos foram submetidos a uma análise de IM-MS. Este tipo de abordagem permite a separação de íons de acordo com a massa, a carga e a geometria da molécula (*cross-section*). No equipamento utilizado, Synapt HDMS (Waters Co.), existe uma câmara pressurizada com um gás inerte (em geral, N₂), onde um baixo campo elétrico é aplicado continuamente, e um campo RF mais forte é aplicado em uma porção empurrando os íons. Desse modo os íons se movem em pulsos, conforme a onda causada pelo campo elétrico separando-os de acordo com sua mobilidade.

Teoricamente, todos os íons movem-se simultaneamente, mas como consequência da presença do gás, íons ‘maiores’ ou com menor número de cargas movimentam-se de modo mais lento do que íons ‘menores’ ou com menor número de cargas. Ou seja, quanto maior o íon maior o número de colisões com o gás presente na célula fazendo com que os mesmos demorem a passar pela câmara de mobilidade iônica.

Quando acoplada à espectrometria de massa (IM-MS), a mobilidade iônica permite a separação das moléculas em uma nova dimensão, com definição permitindo a geração de espectros contendo a relação massa/carga, intensidade e o tempo de separação (*drift-time*). Isso permite resolver problemas em amostras heterogêneas complexas uma vez que a geometria das moléculas é fundamental na separação.

Neste caso, quando os análogos de Phes foram analisados quanto a mobilidade iônica notou-se a presença de dois conformémeros majoritários para L- Phes, e um conformémero majoritário para D- Phes, que pode ser determinado pelos tempos de mobilidade de 10.45, 12.89 e 10.80 ms, respectivamente (Figura 20). Estes resultados sugerem que L-Phes, quando analisada em fase gasosa, tem muito mais graus de liberdade em sua estrutura do que o peptídeo D-Phes. Estes resultados corroboram com os dados obtidos por cromatografia líquida, e posteriormente os encontrados pelas análises de RMN.

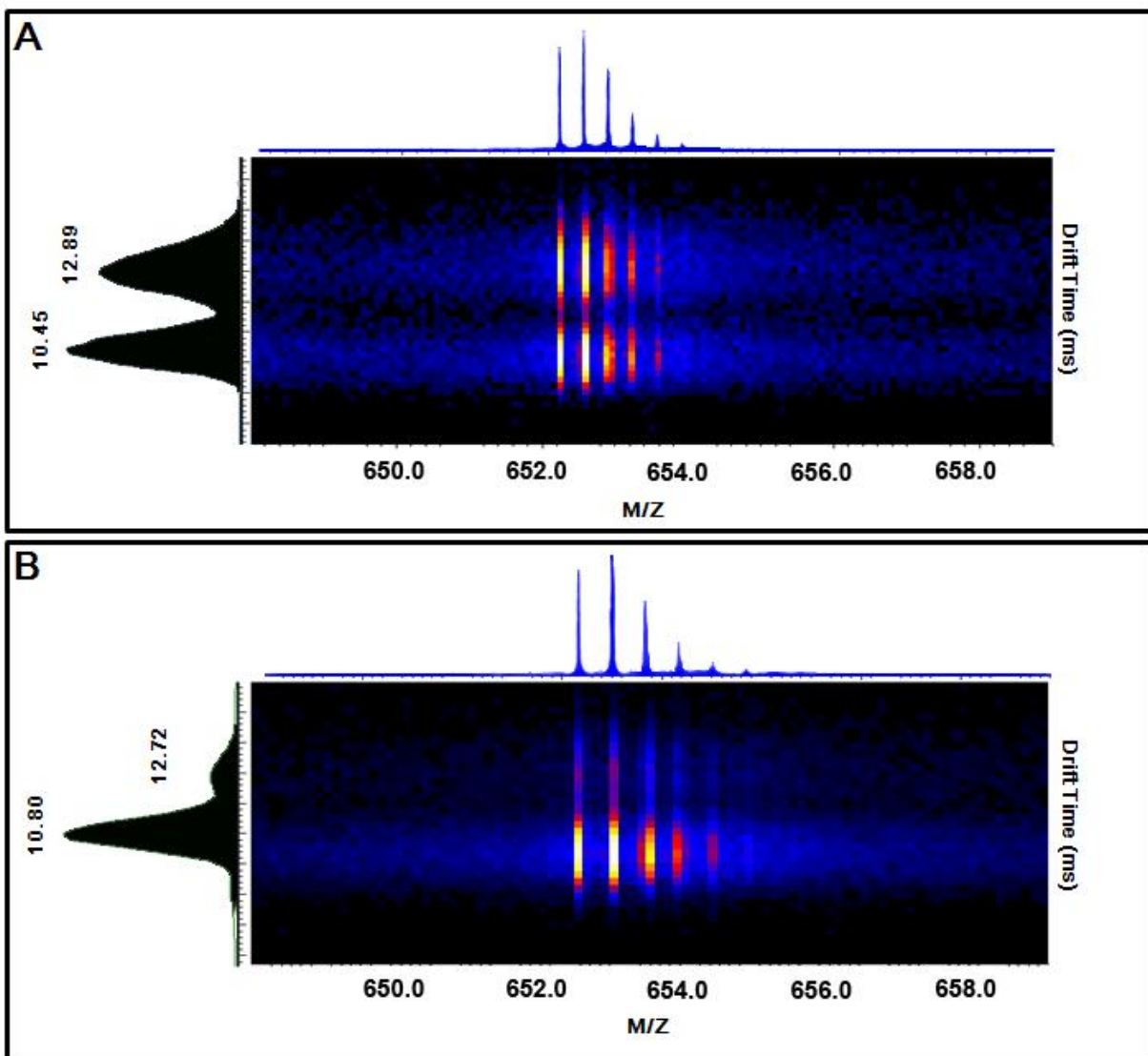


Figura 20. Análise da mobilidade iônica dos peptídeos L- e D- Phe. (A) L- Phe de massa triplamente carregada $[M+3H]^+ = 652,17$ com dois conforméros majoritários em 10,45 e 12, 89 ms. (B) D- Phe de massa triplamente carregada $[M+3H]^+ = 652,17$ com o conforméro majoritário em 10,89 ms.

Estruturas de Fenilseptinas obtidas por RMN

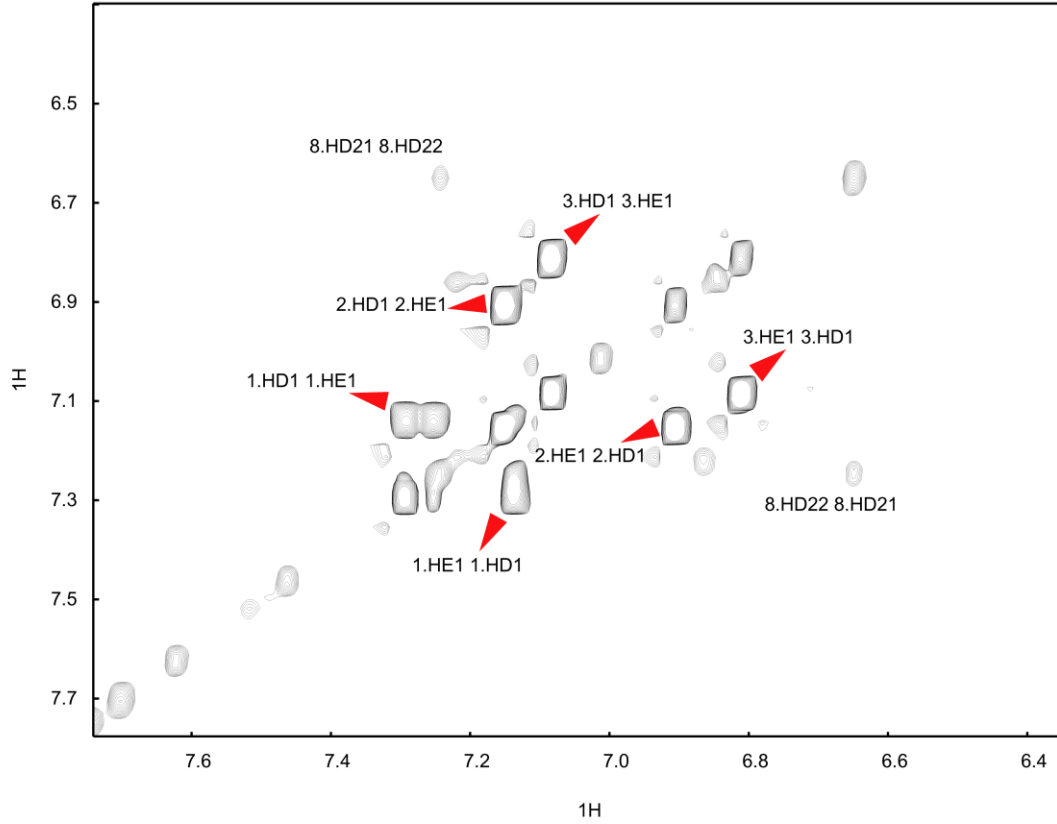
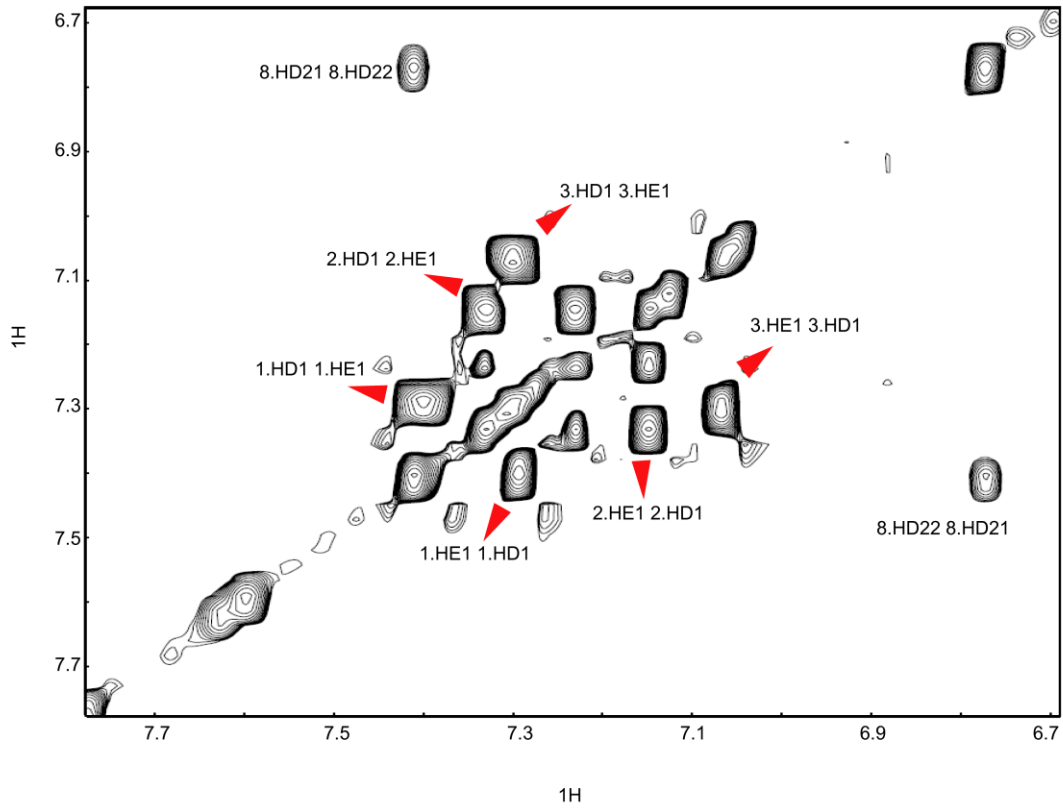
Os assinalamentos das ressonâncias dos núcleos de hidrogênio foram feitos usando-se a técnica padrão de Würthrich (Wüthrich, 1986) para os sistemas de *spin* intra-residuais e para determinação das conectividades inter-residuais por meio de experimentos de 2D ^1H - ^1H TOCSY e 2D ^1H - ^1H NOESY.

As amostras foram solubilizadas em 60% de TFE-d₂ em água contendo 2 mmol/L de peptídeo. Os mapas de contorno de TOCSY em TFE foram utilizados para identificar acoplamentos de sistemas de spin NH-C α H, NH-C β H, NH-C γ H, e NH-C δ H intra-residuais e, assim, determinar cada resíduo da sequência. Os mapas de contorno de NOESY forneceram dados de conectividades de hidrogênios $d\alpha\text{N}(i,i+1)$ para o assinalamento sequencial (Figura 21). As duas estruturas foram obtidas utilizando-se um conjunto de 361 e 373 NOEs, respectivamente (Tabela 10).

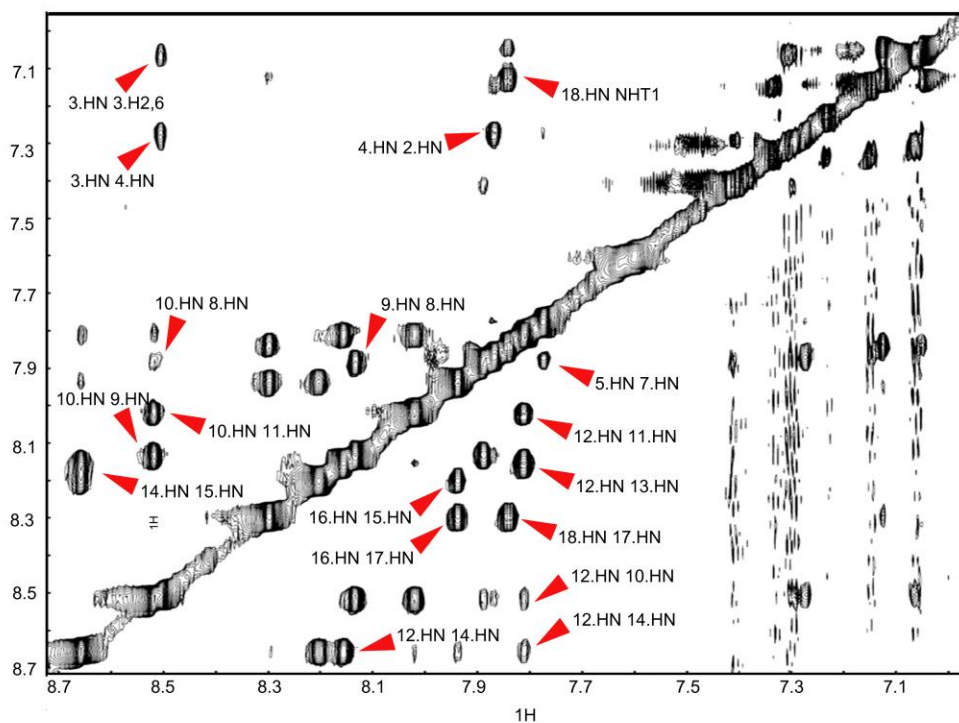
As regiões de interações de hidrogênio amídicos (NH-NH) dos mapas de contornos de NOESY em TFE estão apresentadas na Figura 21. Pode ser observada a diferença entre os dois mapas de contornos de algumas conectividades $d\text{NN}(i,i+1)$, mostrando a maior estruturação do peptídeo D-Phes. Outras conectividades encontradas, incluindo $d\alpha\text{N}(i,i+1)$, $d\alpha\text{N}(i,i+2)$, $d\alpha\text{N}(i,i+3)$ e $d\alpha\text{N}(i,i+4)$ nos mapas de contornos de NOESY forneceram também informações sobre a estrutura dos peptídeos. A quantidade de NOEs observados foram resumidos graficamente na Figura 23.

A Figura 24 mostra os deslocamentos químicos de cada resíduo (CSI) para as ressonâncias dos prótons α , dos dois peptídeos. Os valores negativos observados a partir do sugerem a presença de um segmento helicoidal para ambos os peptídeos, e apesar dos inferiores a 0,1, indicando possíveis flutuações conformacionais.

As correlações de NOEs na região N-terminal (phe-phe-phe) dos peptídeos indicam diferenças estruturais significativas entre as formas L- e D- Phes, principalmente devido à enantiomerização do resíduo Phe2. A combinação dos resultados obtidos a partir dos padrões de NOE fortes do tipo $d\text{NN}(i, i+1)$ e $d\alpha\text{N}(i, i+3)$ e os deslocamentos dos prótons de αCH indicam a conformação típica de α -hélice para a região dos resíduos 4-18, para os dois peptídeos.

A**B**

C



D

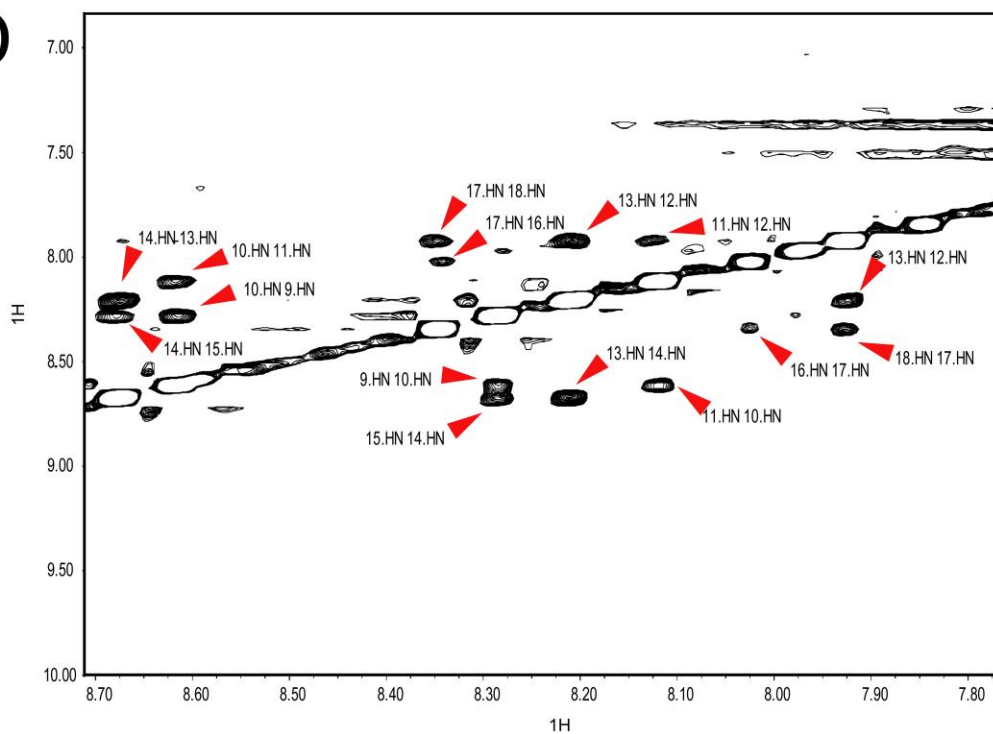


Figura 21. Mapa de contornos parcial TOCSY (800 MHz) de (A) L-Phes e (B) D-Phes em solução de TFE/H₂O 40:60 v/v da região de interação das fenilalaninas. Mapas de contornos parciais NOESY (800 MHz) de (C) L-Phes e (D) D-Phes da região de interação da $\alpha N_{(i,i+1)}$.

As análises individuais de *RMSD* (*Root Mean Square Deviation*) de todos os átomos da cadeia principal de cada um dos peptídeos foi $0,53 \pm 0,21$ para L-Phes e $0,38 \pm 0,18$ para D-Phes, e nenhuma violação acima de 11 foi observada. Os valores de *RMSD* para o segmento 4-17 foi similar entre as duas estruturas sendo $0,22 \pm 0,09$ para L- Phes e $0,22 \pm 0,08$ para D- Phes. Entretanto, quando analisada a região N-terminal ¹Phe- ³Phe os valores de *RMSD* para L- Phes foi de $0,40 \pm 0,22$ e de $0,08 \pm 0,06$ para D- Phes. Na estrutura D- Phes calculada foi observado que os anéis aromáticos dos resíduos Phe1 e Phe3 têm uma interação significativa, enquanto o anel aromático de Phe2 interage fortemente com os grupamentos laterais CH₂ de Leu6 permitindo uma maior estruturação da região N- terminal em D- Phes (Figura 22).

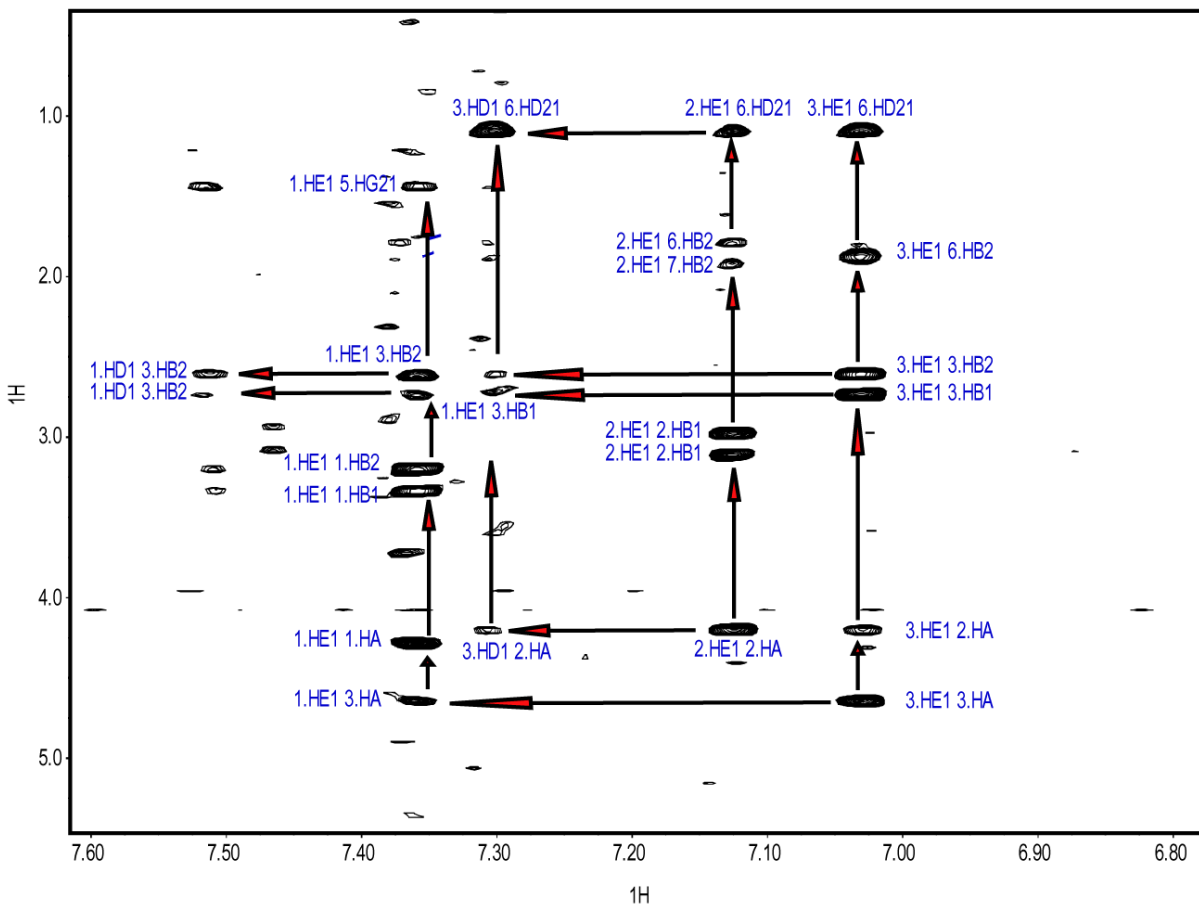


Figura 22. Mapa de contornos parciais NOESY (800 MHz) de D-Phes da região $\alpha N_{(i,i+1)}$ mostrando a interação entre Phe2 e Leu6, Phe3 e Phe1.

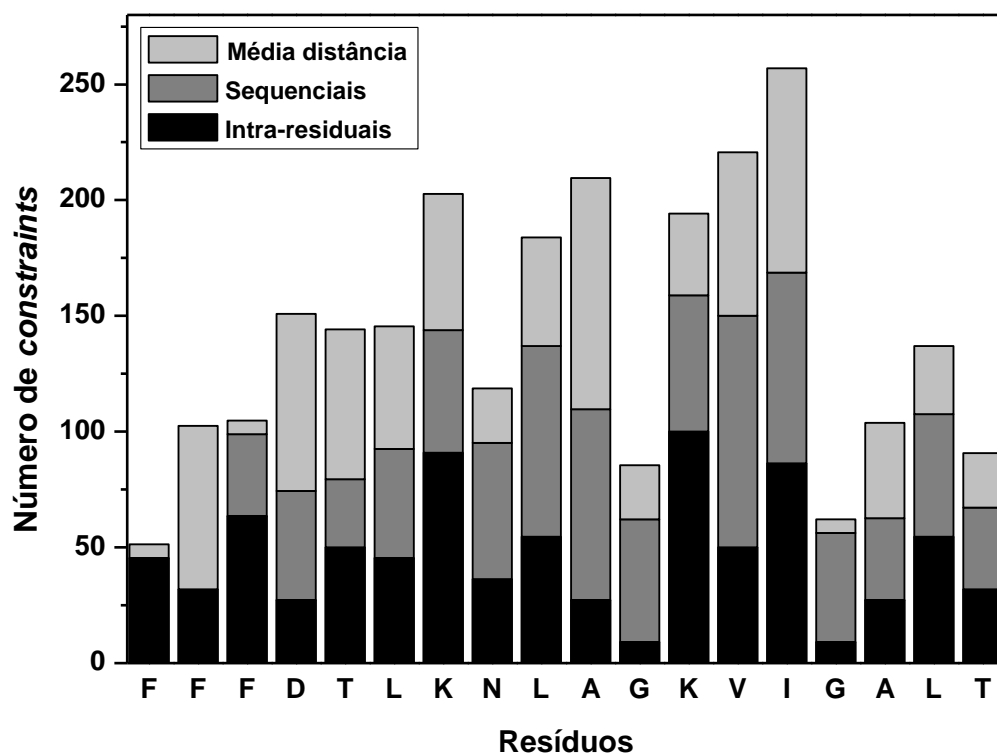


Figura 23. Número de constraints de eNOEs para cada resíduo de aminoácido utilizado no cálculo da estrutura em 60% TFE para os dois peptídeos L-/D-Phe. As categorias de eNOE estão representadas em preto os eNOEs intra-residuais, em cinza escuro os eNOEs sequenciais e em cinza claro os eNOEs de média distância.

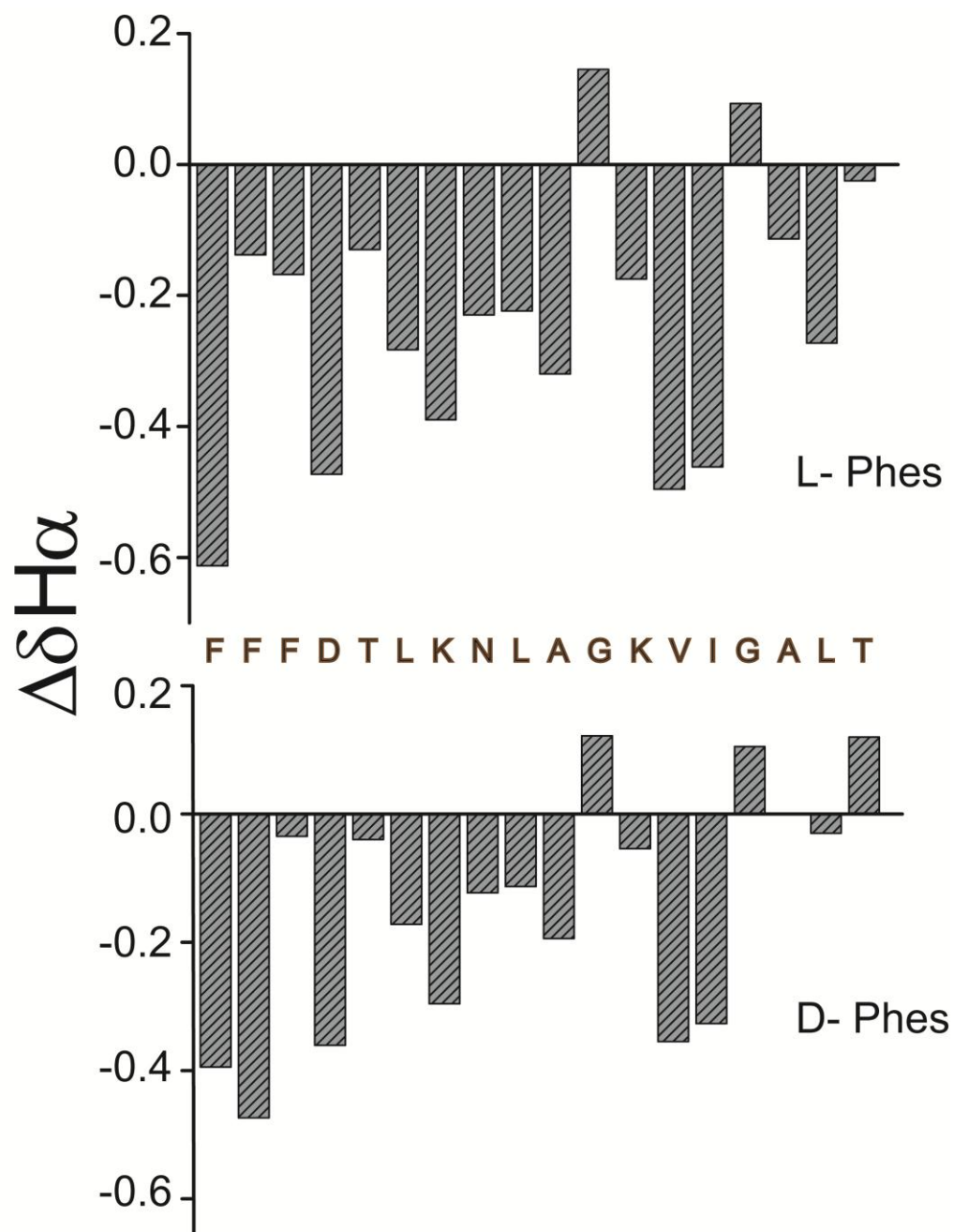


Figura 24. Deslocamento químico dos prótons de α CH dos peptídeos L- Phes e D- Phes 2 mmol mL⁻¹ em TFE/H₂O (40:60). As diferenças de deslocamento foram calculadas pela subtração dos valores observados para cada um dos peptídeos dos valores da estrutura randômica obtida de dados da literatura.

Tabela 10. Dados e estatísticos obtidos das análises das estruturas de L/D- Phes em 60% TFE/H₂O.

Estatísticas das estruturas ^a	L-Phes	D-Phes
Restrições experimentais ^b		
<i>Distância</i>		
Intra-residual (i-j = 0)	185	184
Sequenciais (i-j = 1)	80	82
Média distância (2 ≤ i-j ≤ 4)	66	78
Longa distância (i-j ≥ 5)	0	1
<i>Restrições diedral</i>		
Ângulo de torção (phi/psi)	30	28
<i>Número total de restrições</i>	361	373
<i>Estatística das restrições</i>		
NOE violações > 0.5 Å	11	8
Diedral violações > 5°	3	1
CNS energias (Kcal/mol)		
E _{total}	308.8 ± 7.40	37,66 ± 4,56
RMSD total dos resíduos 1-18 (Å) ^c		
Cadeia principal N, CA, C'	0.51 ± 0.17	0,44 ± 0,12
Átomos pesados	1.55 ± 0.40	1.01 ± 0,10
RMSD total dos resíduos 1-3 (Å) ^c		
Cadeira principal N, CA, C'	0.47 ± 0.22	0,24 ± 0,18
RMSD total dos resíduos 4-17 (Å) ^c		
Cadeira principal N, CA, C'	0.20 ± 0.08	0,20 ± 0,08
Ramachandran plot ^d		
Regiões favorecidas (%)	85,7	99,6
Regiões permitidas adicionais (%)	0,0	0,4
Regiões generosamente permitidas (%)	8,9	0,0
Regiões proibidas (%)	5,4	0,0

^a Os dados estatísticos foram obtidos a partir das 20 estruturas de menor energia refinadas no vácuo. Estruturas para os dois peptídeos (L-/D-Phes).

^b Dados estatísticos das restrições descritos para uma única, não-ambígua assinalamento de NOEs.

^c A precisão das coordenadas é dada pelas coordenadas cartesianas do conjunto de RMSD do somatório das estruturas.

^d Valores obtidos após análises dos resíduos globais no programa **PROCHECK-NMR**.

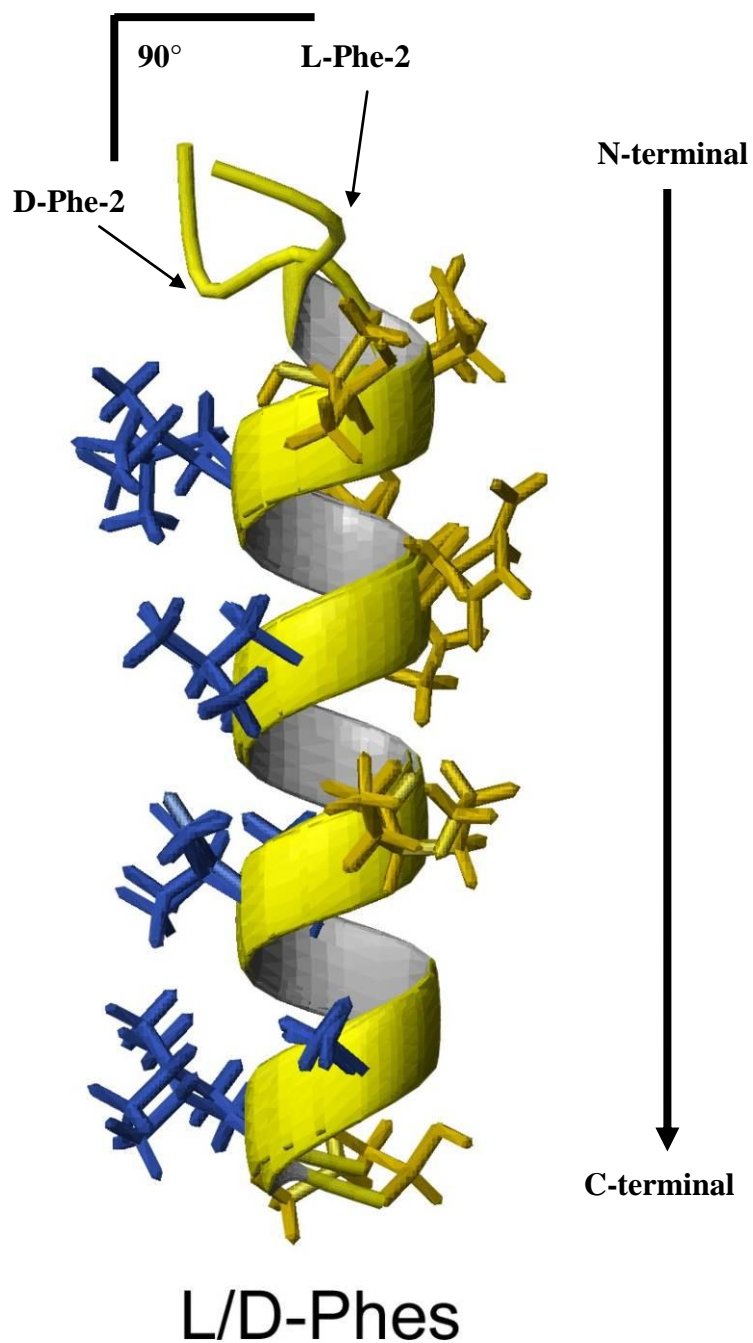


Figura 25. Estruturas calculadas de L/D- Phe em TFE/ H₂O (40/60, v/v) a partir de dados de RMN. Sobreposição da cadeia principal e das cadeias laterais das estruturas de menor energia (mais estáveis). Em destaque os resíduos hidrofóbicos em azul e os resíduos hidrofílicos em verde. A estrutura entre os enantiômeros apresenta-se conservada do resíduo Asp4-Thr18. Nota-se que a extremidade N-terminal não é conservada entre as duas estruturas, os detalhes referentes estão destacados na Figura 27.

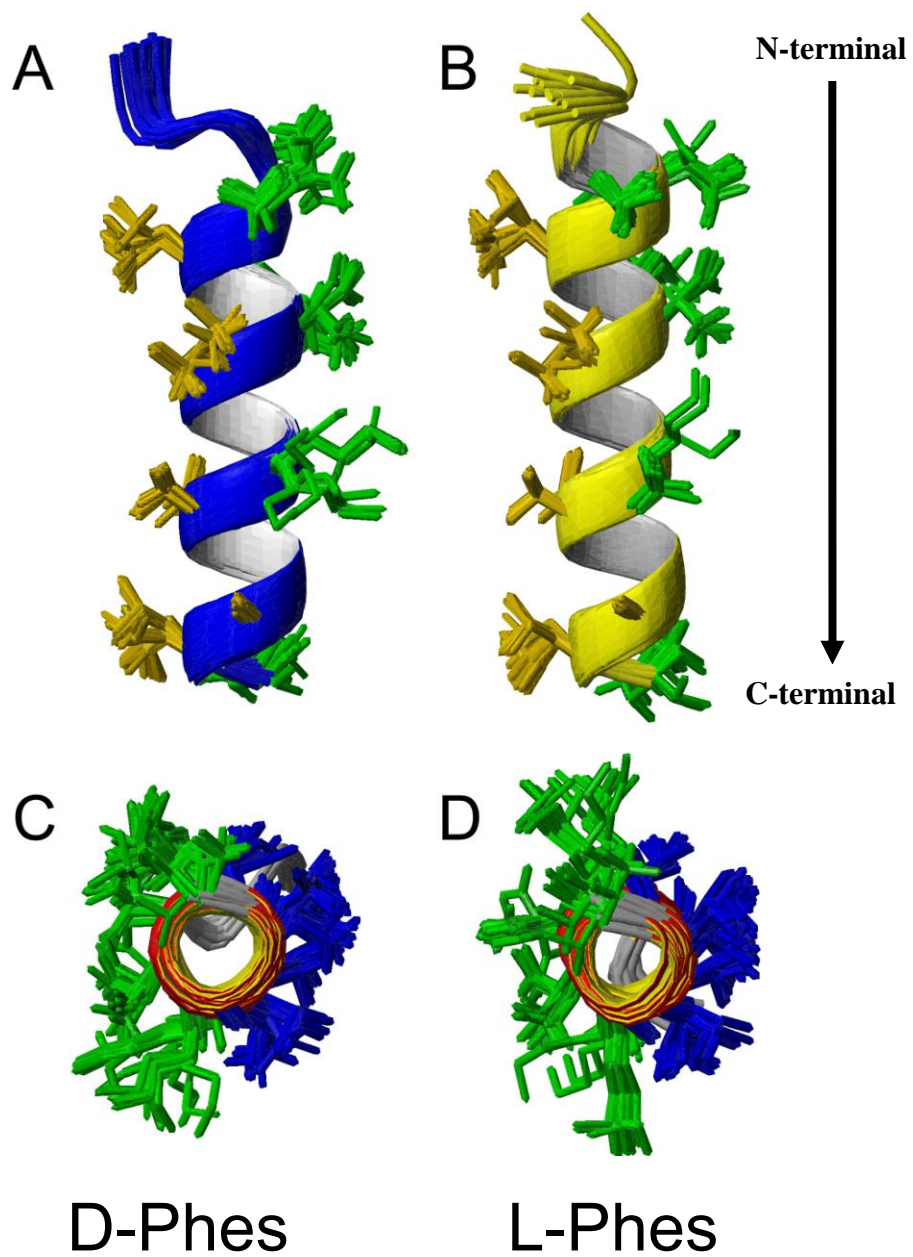


Figura 26. Estruturas calculadas de D-Phe (A)-(C) e L-Phe (B)-(D). (A-B) Sobreposição das 20 estruturas mais estáveis com estrutura em α -hélice mostrando a região de 4-18. Em verde os resíduos hidrofílicos e em dourado os resíduos hidrofóbicos. (C-D) Demonstração frontal da hélice (verde polares e azul apolares).

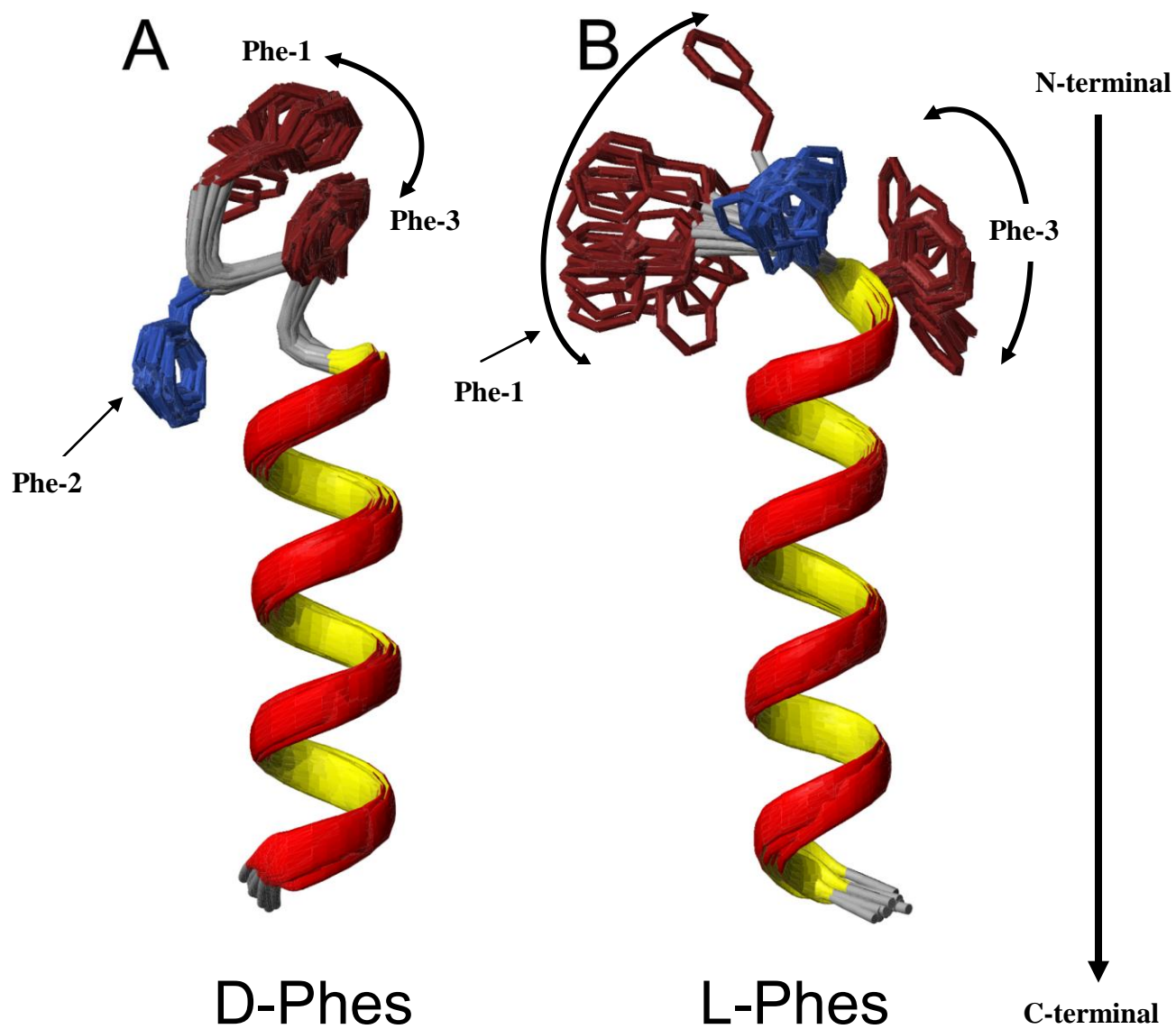


Figura 27. Estruturas calculadas de D-Phe e L-Phe com destaque para as fenilalaninas. Sobreposição das 20 estruturas mais estáveis com estrutura em α -hélice mostrando a região de 1-1. Em azul, Phe2 e em vermelho Phe1 e Phe3.

Estrutura primária relacionado com amargor em fenilseptinas

Analisando a sequência primária de fenilseptinas notamos a presença de um motivo rico em Fenilalanina na porção N- Terminal, a qual compartilha similaridades como os motivos conhecidos amargos phe-phe-phe demonstrados na Figura 28. Desta forma, hipotetizamos: Seria a presença do motivo phe-phe-phe, encontrado nos dois peptídeos, capaz de fornecer propriedades aversivas, mediadas pelas conhecidas vias de transdução de sinal da resposta ao amargor?

Peptídeo	Sequência	Amargor	Referências
Phenylseptin10.....20..... ~...FFD...K...NLA...GRVICALT	=====	Trabalho Atual
Bitter peptide 1	~...RRPP...FF	=====	Shinoda, I., <i>et al</i> , 1987
Bitter peptide 2	~...RRPP...FF	=====	Otagiri, K., <i>et al</i> , 1984
Bitter peptide 3	~...F...R...P...F...R...P...F...F	=====	Otagiri, K., <i>et al</i> , 1984
Bitter peptide 4	~...RGPP...FF	=====	Nosho, Y., <i>et al</i> , 1985
Bitter peptide 5	~...R...P...F...R...P...F...F	=====	Shinoda, I., <i>et al</i> , 1987
Bitter peptide 6	~...R...P...F...R...P...F...F	=====	Nosho, Y., <i>et al</i> , 1985
Bitter peptide 7	~...RRPP...FF	=====	Otagiri, K., <i>et al</i> , 1984
Bitter peptide 8	~...RPP...FF	=====	Shinoda, I., <i>et al</i> , 1987
Bitter peptide 9	~...RGPP...FF	=====	Nosho, Y., <i>et al</i> , 1985
Bitter peptide 10	~...RPP...FF	=====	Nosho, Y., <i>et al</i> , 1985
Bitter peptide 11	~...GGR...FFGG	=====	Shinoda, I., <i>et al</i> , 1987
Bitter peptide 12	~...RGPP...FF	=====	Otagiri, K., <i>et al</i> , 1985
Bitter peptide 13	~...RGPPGG...FF	=====	Nosho, Y., <i>et al</i> , 1985
Bitter peptide 14	~...RPG...FF	=====	Otagiri, K., <i>et al</i> , 1985
Bitter peptide 15	~...GGR...FF	=====	Otagiri, K., <i>et al</i> , 1985
Bitter peptide 16	~...F...P...R	=====	Otagiri, K., <i>et al</i> , 1985
Bitter peptide 17	RGPPGG...FF	=====	Shinoda, I., <i>et al</i> , 1987
Bitter peptide 18	~...R...P...FFGG	=====	Shinoda, I., <i>et al</i> , 1987
Bitter peptide 19	~...G...P...F	=====	Shinoda, I., <i>et al</i> , 1987
Bitter peptide 20	~...R...G...F...F	=====	Shinoda, I., <i>et al</i> , 1987
Bitter peptide 21	~...G...G...F...F...GG	=====	Otagiri, K., <i>et al</i> , 1985
Bitter peptide 22	~...F...F...F	=====	Shinoda, I., <i>et al</i> , 1987
Bitter peptide 23	~...R...P...G...F...F	=====	Ishibashi, N., <i>et al</i> , 1987
Bitter peptide 24	~...G...F...F	=====	Shinoda, I., <i>et al</i> , 1987
Bitter peptide 25	~...F...F	=====	Otagiri, K., <i>et al</i> , 1984
Bitter peptide 26	~...F...P...G	=====	Otagiri, K., <i>et al</i> , 1984
Bitter peptide 27	~...G...G...F...F	=====	Nosho, Y., <i>et al</i> , 1985
Bitter peptide 28	~...F...F...P...G...G	=====	Shinoda, I., <i>et al</i> , 1987
Bitter peptide 29	~...F...E...P...E	=====	Nosho, Y., <i>et al</i> , 1985
Bitter peptide 30	~...F...F...G	=====	Otagiri, K., <i>et al</i> , 1984
Bitter peptide 31	~...F...F...G...G	=====	Shinoda, I., <i>et al</i> , 1987
Bitter peptide 32	~...F...F...P...P	=====	Nosho, Y., <i>et al</i> , 1985

Figura 28. As fenilseptinas apresentam o típico motivo de amargor phe-phe-phe. A sequência foi comparada com outros peptídeos descritos na literatura como amargos. O alinhamento destas sequências foi realizado no programa **BIOEDIT**. Na coluna central está representada a escala de amargor hipotética descrita pelas análises de Kim, et al.

Caracterização das propriedades gustativas

*Preferências gustativas em camundongos *Trpm5* KO e WT envolvendo alcalóides tipicamente amargos.*

Os camundongos das linhagens selvagens (WT) e mutantes para o gene *Trpm5* (KO) foram expostos ao teste de preferência de dois recipientes de curta duração, onde as combinações de escolha foram:

5 mM, 10 mM ou 20 mM Cafeína (WT; N=7 e KO; N=7) x água destilada;

5 mM, 10 mM ou 20 mM Teofilina (WT; N=4 e KO; N=4) x água destilada;

5 mM, 10 mM ou 20 mM Teobromina (WT; N=7 e KO; N=7) x 1x Tampão PBS.

Análises de variância de dois fatores (*ANOVA two-way*) entre genótipo x concentração de metilxantinas foram realizadas individualmente para cada estímulo (cafeína, teofilina e teobromina).

A análise revelou um maior efeito de genótipo para cafeína ($p < 0,0005$) e teofilina ($p < 0,001$), e para o estímulo teobromina nenhum efeito foi observado ($p = 0,17$). Também foi observada uma interação significativa entre as duas variáveis para cafeína ($p < 0,02$) e teofilina ($p < 0,008$). Desta forma, cada genótipo foi analisado separadamente, e para teobromina não foram observados nem efeitos de genótipo ($p = 0,17$) ou interação ($p = 0,4$). Entretanto, existe um efeito significativo da interação entre genótipo x concentração de cafeína ($p < 0,02$) e de teofilina ($p < 0,008$), o que correlaciona diretamente com os dados obtidos para as análises de variância simples (*ANOVA one-way*). Análise *post-hoc* das preferências individuais para cada estímulo confirmaram que, enquanto os camundongos WT apresentam preferência significativa para 10-20 mM de cafeína, 5-10-20 mM de teofilina e 20 mM de teobromina, os camundongos KO foram uniformemente indiferentes a todas as escolhas. Estes controles estão descritos na Figura 29 A-C.

Diante estes resultados, concluímos que *Trpm5* é mediador fundamental para uma resposta comportamental normal a substâncias amargas como cafeína, teofilina e teobromina.

Preferências gustativas em camundongos *Trpm5* KO e WT envolvendo fenilseptinas de *H. punctatus*.

Após a validação da metodologia, os mesmos camundongos (WT e KO) foram expostos ao teste de preferência de dois recipientes de curta duração onde as combinações de escolha foram:

1 mM, 100 μ M ou 10 μ M mM L- Phes (WT; N=7 e KO; N=7) x água destilada;

1 mM, 100 μ M ou 10 μ M mM D-Phes (WT; N=7 e KO; N=7) x água destilada;

1 mM, 100 μ M ou 10 μ M mM L- Phes.1 (WT; N=7 e KO; N=7) x água destilada;

O peptídeo L- Phes.1 foi utilizado como controle para averiguar a importância da sequência completa, ou apenas do fragmento tríptico, o qual também foi encontrado no extrato de *H. punctatus*. Hipotetizamos a possibilidade do C- terminal ser crucial para o aumento ou diminuição do amargor deste peptídeo.

Análises de variância de dois fatores (*ANOVA two-way*) entre genótipo x concentração foram realizadas individualmente para todas as três metilxantinas, e foi observado um significativo efeito de genótipo entre os camundongos testados para L-Phes ($F_{1,12} = 31.9$, $p < 0.0002$), D- Phes ($F_{1,12} = 21.2$, $p < 0.0006$) e L-Phes.1 ($F_{1,12} = 76.1$, $p < 0.0005$). Entretanto, nenhum efeito entre camundongos foi encontrado para L- Phes ($F_{1,12} = 1.12$, $p = 0.31$), D- Phes ($F_{1,12} = 1.32$, $p = 0.27$) ou L- Phes.1 ($F_{1,12} = 1.23$, $p = 0.30$). Da mesma forma, nenhum efeito significativo da concentração dos peptídeos x genótipo para L- Phes ($F_{1,12} = 0.29$, $p = 0.75$), D- Phes ($F_{1,12} = 1.32$, $p = 0.27$) e L- Phes.1 ($F_{1,12} = 0.04$, $p = 0.84$).

Especificamente, usando o teste *t* (*Student* ao nível de 0.05), observamos que, mesmo em baixas concentrações, os camundongos WT rejeitam os peptídeos, enquanto os camundongos KO permanecem indiferentes. O mesmo padrão de resposta comportamental foi observado para o controle positivo de metilxantinas. Nossos resultados demonstram que testes de preferência de dois recipientes de curta duração são eficazes para análise de diferentes modelos, e que os animais *Trpm5* KO são indiferentes às escolhas de peptídeos. Os resultados podem ser observados na Figura 29 D-F.

Resultados prévios descrito demonstram que em concentrações elevadas, a mistura de aminoácidos-livres foi reconhecida pelos camundongos WT, enquanto que os camundongos KO

foram uniformemente indiferentes a todas as escolhas. Mais uma vez, diante estes resultados, concluímos que TRPM5 é mediador fundamental para uma resposta comportamental normal para peptídeos da classe fenilseptina.

Importância da estrutura primária dos peptídeos para a percepção gustatória.

Os aminoácidos presentes em cada fenilseptina (L- e D- Phes) foram misturados individualmente na concentração de 1 mM. A solução de aminoácidos livre foi oferecida aos mesmos camundongos dos experimentos anteriores, para a condução do mesmo experimento. As análises de variância de dois fatores (*ANOVA two-way*) entre genótipo x concentração foram feitas individualmente para cada genotípico utilizando-se a preparação como fator. Não foram observados efeitos nas médias de preferência, tanto em camundongos WT, quanto em KO. Este resultado demonstra que o sabor amargo dos peptídeos percebido pelos camundongos é dependente da estrutura primária que as moléculas assumem. Os resultados encontram-se na Figura 29G.

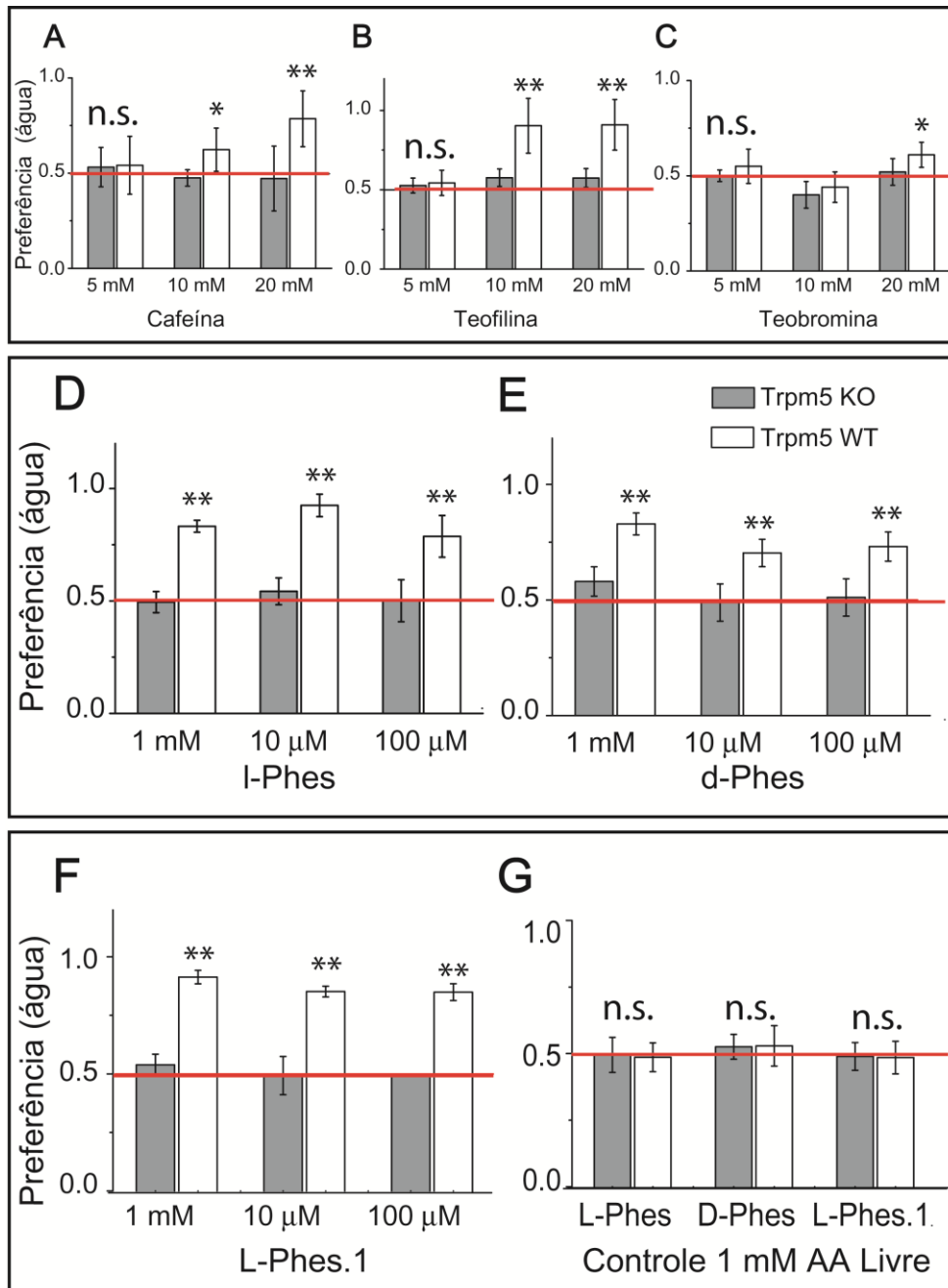


Figura 29. A estrutura primária nos peptídeos é fundamental para as percepções gustatórias das fenilseptinas. As substâncias testadas são percebidas como amargas, e dependentes do canal iônico *Trpm5*. Ensaios de preferência de dois recipientes de curta-duração (10 minutos) (A) cafeína vs. Água, (B) teofilina e (C) teobromina. Os camundongos mutantes *Trpm5* (KO) foram indiferentes a todas as escolhas. (D) O amargor de fenilseptinas é dependente de *Trpm5*. Os camundongos mutantes (KO) foram indiferentes a todas as escolhas. Os valores foram normalizados e calculados em relação à preferência por água. (G) Os camundongos normais (WT) e mutantes (KO) foram indiferentes a todas as escolhas. Correções de Bonferroni (teste *t*) contam as médias de indiferença 0,5; * $p < 0.05$; ** $p < 0.04$; todas as outras comparações $p > 0.05$. A linha vermelha representa os níveis de indiferença (média de preferência de 0.5).

As glândulas secretoras dos anfíbios produzem uma variedade de peptídeos bioativos, sendo muitos com atividade antimicrobiana. Estas moléculas são importantes elementos do sistema imune inato destes animais, e possivelmente funcionam como uma estratégia de sobrevivência (Zasloff, 2002b; 2002a). Em particular, do gênero *Hypsiboas*, são poucos os peptídeos isolados [i.e. hilinas presentes em *H. albomarginatus*, (Castro et al., 2009), as ranaceptinas em *H. raniceps*, (Magalhaes et al., 2008) e a hilaseptina Hsp-1 em *H. punctatus*, (Prates et al., 2004)].

A partir do extrato total da secreção cutânea de *H. punctatus*, foram identificados e caracterizados 27 novos peptídeos biologicamente ativos, dos quais dez apresentam uma cadeia peptídica de 18-25 resíduos de aminoácido, e dezessete de cadeia contendo 8-12 resíduos. Após análises de massa e pureza por MALDI TOF-TOF/MS, os peptídeos foram sequenciados por métodos distintos, e complementares, cujos resultados foram compatíveis entre si.

Estas análises levaram à identificação de duas classes de peptídeos antimicrobianos: (i) a primeira classe foi denominada de **hilaseptina**, constituída por 25 moléculas, as quais apresentaram alto grau de identidade (92%) com o peptídeo Hsp-1 descrito, na mesma espécie, por Prates, et al (2004); (ii) e a segunda classe foi denominada de **fenilseptina**, a qual é composta por dois peptídeos, que coexistem naturalmente em uma mistura racêmica nas formas L-/ D-, onde a enantiomerização do segundo resíduo N-terminal L-Phe ocorre como consequência de uma modificação pós-traducional do respectivo gene codificador.

No passado, acreditava-se que durante o processo evolutivo haviam sido selecionados apenas os peptídeos e as proteínas que continham L- aminoácidos (Kreil, 1997; Ohide et al., 2011). Entretanto, no início do século XX, vários estudos começam a sugerir a presença de D-aminoácidos em microrganismos (Heilmann, 1974; Lam et al., 2009), o que levou a identificação de uma D- alanina e uma D- glutamina em peptideoglicanas de paredes celulares bacterianas (Ashiuchi et al., 2002; Lee e Fischetti, 2003; Korza e Bochtler, 2005). Estudos posteriores demonstraram que os mesmos organismos eram capazes de produzir, metabolizar e utilizar D-aminoácidos.

O primeiro relato de D- aminoácidos presentes em tecidos animais foram em invertebrados e anfíbios (Kreil, 1994). A partir de técnicas cromatográficas, D- alaninas livres foram isoladas do sangue de *Oncopeltus fasciatus*, e proteínas contendo D-alanina, D-fenilalanina, D-serina, D-metionina, e D-cisteína foram isoladas de alguns animais (Auclair e

Patton, 1950; Bassi e Feir, 1972). Recentemente, com o desenvolvimento das técnicas cromatográficas, e com o aumento da sensibilidade de detecção de quantidades extremamente baixas começam a ser identificadas, a exemplo do peptídeo D- Phes identificado na mistura complexa de *H. punctatus*.

Em anfíbios, os primeiros peptídeos isolados da secreção contendo D- aminoácido foram os peptídeos-opioides deltorfinas e dermorfinas, presentes em *Phyllomedusa sauvagei* e *P. bicolor*. Porém, o descobrimento de peptídeos antimicrobianos contendo um único D- aminoácido foi descrita por (Mignogna et al., 1992), nas bombininas. Ao contrário dos peptídeos opioides, as L-/D- bombininas coexistem em um mesmo organismo formando uma mistura racêmica, assim como foi observado para as fenilseptinas.

As fenilseptinas são peptídeos catiônicos, hidrofóbicos que possuem um precursor gênico que carrega características clássicas de peptídeos antimicrobianos, como a presença de uma região sinalizadora e acídica extremamente conservadas, e um domínio hipervariável (Figura 16). Este tipo de estrutura pode ser observada em outros peptídeos antimicrobianos. Essa variabilidade pode ter um valor seletivo adaptativo, que foi ocorrendo à medida que os anfíbios ocupavam novos nichos ecológicos, ou que novos elementos são introduzidos em seu habitat (Vanhoye et al., 2003). Peptídeos com estas características, não são exclusivos de anfíbios, mas podem ocorrer em plantas, invertebrados e humanos, e todos funcionam como elementos fundamentais do sistema imune inato dos organismos de referencia.

Foi exatamente observando estas características que testamos a atividade antimicrobiana das fenilseptinas. As fenilseptinas foram ativas contra os microrganismos testados como representado na Tabela 9. A fenilseptina contendo D-Phes apresentou uma maior atividade antimicrobiana, principalmente na bactéria fitopatogênica *X. glycines*, padrão este observado nas bombininas, e outros PAM's contendo D- aminoácido. Alguns autores descrevem que a seletividade dos peptídeos antimicrobianos esta fundamentada exatamente nas diferenças de composição das membranas entre os eucariotos e os procariotos (Matsuzaki et al., 1999). A membrana dos eucariotos superiores é constituída de fosfolipídios neutros, como a fosfatidilcolina e a esfingomiéline, enquanto que as membranas bacterianas possuem fosfolipídios com cargas negativas expostas como o fosfatidilglicerol e a cardiolipina (Matsuzaki et al., 1999). A característica em comum das bactérias é que nenhuma delas apresenta colesterol.

Outra característica observada nas fenilseptinas, também correlacionada com a sua estrutura primária, é a presença do motivo incomum phe-phe-phe na porção N-terminal. Este motivo também é encontrado em peptídeos descritos como amargos, os quais são provenientes de fontes naturais, como leite e queijo (exemplos de peptídeos contendo phe-phe-phe estão descritos na Figura 28).

É curioso notar que Roudot-Algaron, em 1966, demonstrou que existe uma íntima relação entre o amargor e a estrutura primária destes peptídeos e que aqueles extremamente amargos são ricos em leucina, isoleucina e fenilalanina. Devido à presença constante do resíduo de fenilalanina em peptídeos amargos, esta característica, também presente em Phes, foi estudada e, posteriormente considerada como o aminoácido central na predição do sabor amargo. A L-Phes possui um sabor amargo, o qual pode ser intensificado principalmente quando presente no N-terminal dos peptídeos (Ishibashi N, 1987; Maehashi e Huang, 2009b).

Além desta peculiaridade de estrutura primária, foram observados, por análises de mobilidade iônica, que L- Phes e D- Phes formam diferentes conformémeros quando analisadas em vácuo (Figura 20). Esta multiplicidade conformacional nos levou a questionar se estas moléculas não seriam capazes de assumir conformações diferenciadas, quando interagindo com ambientes químicos distintos, assumindo assim diferentes funções biológicas.

Nossas análises de RMN corroboram com os dados anteriores mostrando que apesar da estrutura rígida na região de α -hélice dos resíduos 4-18, o peptídeo L- Phes apresenta alta variabilidade estrutural na região phe-phe-phe N-terminal, o que levaria a uma maior diversidade de conformémeros. Já o peptídeo D- Phes devido à enantiomerização da Phe2, sofre uma mudança de conformação de 90° no N-terminal da molécula, causada pela forte interação das Phe1-Phe3, e da D-Phe2-Leu6, levando a uma rigidez estrutural maior.

Conectando estas informações, testamos os peptídeos L-/ D- Phes quanto às possíveis características gustativas relacionadas com amargor. Observamos que as respostas gustativas aversivas observadas em camundongos WT às soluções aquosas contendo fenilseptinas são comparáveis com aquelas constituídas pelas substâncias alcalóides classicamente amargas, as metilxantinas (cafeína, teofilina e teobromina), quando oferecidas aos mesmos animais.

De fato, os animais homozigotos (com uma deleção parcial do gene *trpm5*) foram indiferentes às soluções contendo os peptídeos e as substâncias controle. Estes dados validam a

nossa hipótese que as fenilseptinas são amargas, e também demonstram que o canal iônico TRPM5 é necessário para que a resposta normal de rejeição seja gerada.

Nós não pretendemos neste estudo afirmar que o sabor amargo das fenilseptinas é mediado por receptores da família T2R. Nossos resultados são limitados ao fato de que TRPM5, um canal iônico importante para que a transdução de amargor via receptores do tipo T2R (Zhang, et al., 2003; Damak et al., 2006), está diretamente envolvido com a detecção pelos camundongos das amargas fenilseptinas.

Em particular, devemos lembrar que estes peptídeos podem entrar diretamente nas células atuando nos domínios intracelulares de TRPM5, mediando a resposta por meio de uma sinalização intracelular (Zhang et al., 2007). Alguns autores descrevem peptídeos antimicrobianos com modos de ação via ativação de alvos intracelulares, que penetram a célula e encontram seus alvos. Independente da forma como a via de transdução de sinal foi ativada, percebemos que as concentrações de peptídeo utilizadas neste estudo são aversivas aos animais WT, e indiferentes aos animais KO.

É interessante notar que muitos autores descrevem o aposematismo, o comportamento e a impalatabilidade como sendo estratégias eficientes contra o ataque de predadores que engolem ou estraçalham suas presas, como por exemplo, os peixes (Heyer et al., 1975; Van Burskirk, 1988; Hero et al., 2001).

Supostamente, os predadores aprendem a evitar presas de sabor repelente (desagradáveis) mais rapidamente caso elas sejam visíveis a eles, fazendo com que estas características trabalhem juntas (Gittleman et al 1980;. Guilford 1988). Sendo assim, algumas substâncias funcionariam como protetores iniciais de defesa nos anfíbios. E, aproveito para especular que, talvez, fenilseptinas atuem especificamente em potenciais predadores em que o canal iônico TRPM5 esteja presente, como por exemplo em peixes, morcegos, pequenos mamíferos. Devido à falta de dados sobre a ecologia e comportamento desta espécie torna-se difícil qualquer outro tipo de especulação diretamente relacionando com o sistema predador-presa destes animais.

A presença destas moléculas com estruturas e espectros de ação tão diversificados representa o sucesso evolutivo do processo de defesa, permitindo aos anfíbios proteção contra invasores e predadores, aumentando assim as chances de sobrevivência. Isso por que os anfíbios são alvos de pequenos mamíferos, aves e peixes, os quais possuem receptores gustativos, e são capazes de perceber o amargor via TRPM5.

De fato, até onde o nosso conhecimento chega, as fenilseptinas são o primeiro relato de genes codificadores de uma proteína, a qual é expressa na forma madura, sofre pelo menos duas modificações pós-traducionais, uma no último resíduo da porção C-terminal e outra ao longo da cadeia por enzimas amino-isomerases, e que apresenta atividade antimicrobiana e propriedades sensoriais.

Sendo assim, torna-se plausível inferir que um tipo semelhante de resposta aversiva pode ser um constituinte das estratégias de defesa dos animais contra predadores de várias espécies. Estes resultados sugerem que as fenilseptinas podem ser parte de um “*pool*” de peptídeos e proteínas multifuncionais produzidos pelas glândulas da pele de *H. punctatus* com pelo menos duas potencialidades de defesa testadas: (i) uma contra microrganismos patogênicos e (ii) outra contra potenciais predadores capazes de perceber amargor.

E, apesar deste ser o primeiro relato de uma molécula, tão pequena, versátil e com características funcionais tão incríveis, provavelmente devem existir outras moléculas com as mesmas propriedades, tornando as fenilseptinas uma regra, e não uma exceção. Talvez, as fenilseptinas sejam o primeiro exemplo de moléculas com tamanha plasticidade, e este é apenas o primeiro passo para um novo mundo a ser explorado.

Adler, E.; Hoon, M. A.; Mueller, K. L.; Chandrashekar, J.; Ryba, N. J.; Zuker, C. S. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* [S.I.], v. 100, n. 6, p. 693-702, 2000.

Amrein, H. e Bray, S. Bitter-sweet solution in taste transduction. *Cell* [S.I.], v. 112, n. 3, p. 283-4, 2003.

Anastasi, A. e Erspamer, G. F. Occurrence of phyllomedusin, a physalaemin-like decapeptide, in the skin of *Phyllomedusa bicolor*. *Experientia* [S.I.], v. 26, n. 8, p. 866-7, 1970.

Arseniev, A. S.; Kondakov, V. I.; Maiorov, V. N.; Bystrov, V. F. NMR solution spatial structure of 'short' scorpion insectotoxin I5A. *FEBS Lett* [S.I.], v. 165, p. 57, 1984.

Asao, M.; Iwamura, H.; Akamatsu, M.; Fujita, T. Quantitative structure-activity relationships of the bitter thresholds of amino acids, peptides, and their derivatives. *J Med Chem* [S.I.], v. 30, n. 10, p. 1873-9, 1987.

Ashiuchi, M.; Kuwana, E.; Yamamoto, T.; Komatsu, K.; Soda, K.; Misono, H. Glutamate racemase is an endogenous DNA gyrase inhibitor. *J Biol Chem* [S.I.], v. 277, n. 42, p. 39070-3, 2002.

Auclair, J. L. e Patton, R. L. On the occurrence of d-Alanine in the haemolymph of the milkweed bug, *oncopeltus fasciatus*. *Rev Can Biol* [S.I.], v. 9, n. 1, p. 3-8, 1950.

Auvynet, C.; Seddiki, N.; Dunia, I.; Nicolas, P.; Amiche, M.; Lacombe, C. Post-translational amino acid racemization in the frog skin peptide deltorphin I in the secretion granules of cutaneous serous glands. *Eur J Cell Biol* [S.I.], v. 85, n. 1, p. 25-34, 2006.

Bassi, S. D.; Feir, D. Effects of actinomycin D and puromycin on RNA and protein synthesis in *Oncopeltus fasciatus* after juvenile hormone treatment. *Comp Biochem Physiol B* [S.I.], v. 41, n. 4, p. 771-6, 1972.

Bechinger, B. e Lohner, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 1758, n. 9, p. 1529-39, 2006.

Boughter, J. D., Jr. e Bachmanov, A. A. Behavioral genetics and taste. *BMC Neurosci* [S.I.], v. 8 Suppl 3, p. S3, 2007.

Brand, G. D.; Leite, J. R.; Silva, L. P.; Albuquerque, S.; Prates, M. V.; Azevedo, R. B.; Carregaro, V.; Silva, J. S.; Sa, V. C.; Brandao, R. A.; Bloch, C., Jr. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-Trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells. *J Biol Chem* [S.I.], v. 277, n. 51, p. 49332-40, 2002.

Brand, G. D.; Leite, J. R.; De Sa Mandel, S. M.; Mesquita, D. A.; Silva, L. P.; Prates, M. V.; Barbosa, E. A.; Vinecky, F.; Martins, G. R.; Galasso, J. H.; Kuckelhaus, S. A.; Sampaio, R. N.; Furtado, J. R., Jr.; Andrade, A. C.; Bloch, C., Jr. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 347, n. 3, p. 739-46, 2006.

Braun, W.; Bosch, C.; Brown, L. R.; Go, N.; Wuthrich, K. Combined use of proton-proton Overhauser enhancements and a distance geometry algorithm for determination of polypeptide conformations. Application to micelle-bound glucagon. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 667, n. 2, p. 377-96, 1981.

Broccardo, M.; Erspamer, V.; Falconieri Erspamer, G.; Improta, G.; Linari, G.; Melchiorri, P.; Montecucchi, P. C. Pharmacological data on dermorphins, a new class of potent opioid peptides from Amphibian skin. *Br J Pharmacol* [S.I.], v. 73, n. 3, p. 625-31, 1981.

Castro, M. S.; Ferreira, T. C.; Cilli, E. M.; Crusca, E., Jr.; Mendes-Giannini, M. J.; Sebben, A.; Ricart, C. A.; Sousa, M. V.; Fontes, W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). *Peptides* [S.I.], v. 30, n. 2, p. 291-6, 2009.

Chan, W. C. e White, P. D. Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach. 2000.

Chandrashekar, J.; Mueller, K. L.; Hoon, M. A.; Adler, E.; Feng, L.; Guo, W.; Zuker, C. S.; Ryba, N. J. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* [S.I.], v. 100, n. 6, p. 703-11, 2000.

Chi, S. W.; Kim, J. S.; Kim, D. H.; Lee, S. H.; Park, Y. H.; Han, K. H. Solution structure and membrane interaction mode of an antimicrobial peptide gaegurin 4. *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 352, n. 3, p. 592-7, 2007.

Clarke, B. T. The natural history of Amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biol Rev Camb Philos Soc* [S.I.], v. 72, n. 3, p. 365-79, 1997.

Clement, B. A., Goff, C.M. And Forbes, D.A. Toxic amines and alkaloids from *Acacia rigidula* *Phytochemistry* [S.I.], v. 49, n. 5, p. 3, 1998.

Conlon, J. M.; Kolodziejek, J.; Nowotny, N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 1696, n. 1, p. 1-14, 2004.

Conlon, J. M.; Abraham, B.; Sonnevend, A.; Jouenne, T.; Cosette, P.; Leprince, J.; Vaudry, H.; Bevier, C. R. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin secretions of the carpenter frog *Rana virgatipes* (Ranidae, Aquarana). *Regul Pept* [S.I.], v. 131, n. 1-3, p. 38-45, 2005a.

Conlon, J. M.; Jouenne, T.; Cosette, P.; Cosquer, D.; Vaudry, H.; Taylor, C. K.; Abel, P. W. Bradykinin-related peptides and tryptophyllins in the skin secretions of the most primitive extant frog, *Ascaphus truei*. *Gen Comp Endocrinol* [S.I.], v. 143, n. 2, p. 193-9, 2005b.

Conlon, J. M.; Kolodziejek, J.; Nowotny, N. Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 1788, n. 8, p. 1556-63, 2009.

Conlon, J. M. e Sonnevend, A. Antimicrobial peptides in frog skin secretions. *Methods Mol Biol* [S.I.], v. 618, p. 3-14, 2010.

Csordas, A. e Michl, H. Primary structure of two oligopeptides of the toxin of *Bombina variegata* L. *Toxicon* [S.I.], v. 7, n. 2, p. 103-8, 1969.

Daly, J. W. The chemistry of poisons in Amphibian skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 92, n. 1, p. 9-13, 1995.

Damak, S.; Rong, M.; Yasumatsu, K.; Kokrashvili, Z.; Perez, C. A.; Shigemura, N.; Yoshida, R.; Mosinger, B.; Glendinning, J. I.; Ninomiya, Y.; Margolskee, R. F. Trpm5 Null Mice Respond to Bitter, Sweet, and Umami Compounds. *Chem Sens* [S.I.], v. 31, p. 253-64, 2006.

Darlak, K.; Benovitz, D. E.; Spatola, A. F.; Grzonka, Z. Dermorphin analogs: resistance to in vitro enzymatic degradation is not always increased by additional D-amino acid substitutions. *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 156, n. 1, p. 125-30, 1988.

Darst, C. R. e Cummings, M. E. Predator learning favours mimicry of a less-toxic model in poison frogs. *Nature* [S.I.], v. 440, n. 7081, p. 208-11, 2006.

Darst, C. R.; Cummings, M. E.; Cannatella, D. C. A mechanism for diversity in warning signals: conspicuousness versus toxicity in poison frogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 103, n. 15, p. 5852-7, 2006.

de Araújo, I. E. Food reward in the absence of taste receptor signaling. *Neuron* [S.I.], v. 57, n. 6, p. 11, 2008.

Delaglio, F.; Grzesiek, S.; Vuister, G. W.; Zhu, G.; Pfeifer, J.; Bax, A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* [S.I.], v. 6, n. 3, p. 277-93, 1995.

Duellman, W. E. e Trueb, L. *Biology of Amphibian*. Baltimore and London: Johns Hopkins Paperbacks edition, 1986.

Erspamer, V.; Bertaccini, G.; De Caro, G.; Endean, R.; Impicciatore, M. Pharmacological actions of caerulein. *Experientia* [S.I.], v. 23, n. 9, p. 702-3, 1967.

Erspamer, V. Biogenic amines and active polypeptides of the Amphibian skin. *Annu Rev Pharmacol* [S.I.], v. 11, p. 327-50, 1971.

Erspamer, V.; Melchiorri, P.; Broccardo, M.; Erspamer, G. F.; Falaschi, P.; Improta, G.; Negri, L.; Renda, T. The brain-gut-skin triangle: new peptides. *Peptides* [S.I.], v. 2 Suppl 2, p. 7-16, 1981.

Erspamer, V.; Melchiorri, P.; Falconieri Erspamer, G.; Montecucchi, P. C.; De Castiglione, R. Phyllomedusa skin: a huge factory and store-house of a variety of active peptides. *Peptides* [S.I.], v. 6 Suppl 3, p. 7-12, 1985.

Erspamer, V.; Melchiorri, P.; Falconieri-Erspamer, G.; Negri, L.; Corsi, R.; Severini, C.; Barra, D.; Simmaco, M.; Kreil, G. Deltorphins: a family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for delta opioid binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 86, n. 13, p. 5188-92, 1989.

Erspamer, V.; Erspamer, G. F.; Severini, C.; Potenza, R. L.; Barra, D.; Mignogna, G.; Bianchi, A. Pharmacological studies of 'sapo' from the frog Phyllomedusa bicolor skin: a drug used by the Peruvian Matses Indians in shamanic hunting practices. *Toxicon* [S.I.], v. 31, n. 9, p. 1099-111, 1993.

Faivovich, J.; Garcia, P. C.; Ananias, F.; Lanari, L.; Basso, N. G.; Wheeler, W. C. A molecular perspective on the phylogeny of the Hyla pulchella species group (Anura, Hylidae). *Mol Phylogenet Evol* [S.I.], v. 32, n. 3, p. 938-50, Sep 2004.

Frost, D. Amphibian species of the world: an online reference. <http://research.amnh.org/herpetology/PAMhibia/index.html>. 2004.

Futuyma, D. J. *Biologia Evolutiva*. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 2002.

Garrett, R. H. e Grisham, C. M. *Biochemistry*. 1995.

Gee, H. Palaeontology. Four legs to stand on. *Nature* [S.I.], v. 342, n. 6251, p. 738-9, 1989.

Gibson, B. W.; Tang, D. Z.; Mandrell, R.; Kelly, M.; Spindel, E. R. Bombinin-like peptides with antimicrobial activity from skin secretions of the Asian toad, Bombina orientalis. *J Biol Chem* [S.I.], v. 266, n. 34, p. 23103-11, 1991.

Gurney, B. F. The xanthines: caffeine, theophylline, and theobromine. *Dent Dig* [S.I.], v. 77, n. 6, p. 352-5, 1971.

Haney, E. F.; Hunter, H. N.; Matsuzaki, K.; Vogel, H. J. Solution NMR studies of Amphibian antimicrobial peptides: linking structure to function? *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 1788, n. 8, p. 1639-55, 2009.

Heck, S. D.; Faraci, W. S.; Kelbaugh, P. R.; Saccomano, N. A.; Thadeio, P. F.; Volkmann, R. A. Posttranslational amino acid epimerization: enzyme-catalyzed isomerization of amino acid residues in peptide chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 93, n. 9, p. 4036-9, 1996.

Heilmann, H. D. On the peptidoglycan of the cell walls of *Pseudomonas aeruginosa*. Structure of the peptide side chains. *Eur J Biochem* [S.I.], v. 43, n. 1, p. 35-8, 1974.

Hellberg, S. e Sjostrom, M. Peptide quantitative structure-activity relationships, a multivariate approach. *J Med Chem* [S.I.], v. 30, n. 7, 1987.

Holland, L. J. e Wangh, L. J. Xenopus fibrinogen synthesis and secretion. Analysis of precursor polypeptides and their post-translational modification. *J Biol Chem* [S.I.], v. 259, n. 6, p. 3757-62, 1984.

Hyberts, S. G.; Goldberg, M. S.; Havel, T. F.; Wagner, G. The solution structure of eglin c based on measurements of many NOEs and coupling constants and its comparison with X-ray structures. *Protein Sci* [S.I.], v. 1, n. 6, p. 736-51, 1992.

Ishibashi N. S. K.; Yamamoto O; Kanehisa H; Kouge K; Kikuchi E; Okai H; Fukui S. Studies on flavored peptides .2. bitterness of phenylalanine-containing and tyrosine-containing peptides. *Agricultural and biological chemistry* [S.I.], v. 51, n. 12, 1987.

Ishibashi, N.; Kubo, T.; Chino, M.; Fukui, H.; Shinoda, I.; Kikuchi, E.; Okai, H.; Fukui, S. Taste of prolinecontaining peptides. *Agric. Biol. Chem.* [S.I.], v. 52, n. 3, 1988.

Iwasaki, Y.; Satoh, H.; Ikeda, H.; Uchimura, H.; Ohkubo, A.; Nagataki, S. An evaluation of factors which affect circulating thyroid hormone levels in liver diseases. *Kaku Igaku* [S.I.], v. 18, n. 5, p. 601-8, 1981.

Johnson, B. A. e Blevins, R. A. A program for the visualization and analysis of NMR datasets. *J Biomol NMR* [S.I.], v. 4, 1994.

Kamatani, Y.; Minakata, H.; Kenny, P. T.; Iwashita, T.; Watanabe, K.; Funase, K.; Sun, X. P.; Yongsiri, A.; Kim, K. H.; Novales-Li, P. Achatin-I, an endogenous neuroexcitatory tetrapeptide from *Achatina fulica* Ferussac containing a D-amino acid residue. *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 160, n. 3, p. 1015-20, 1989.

Kim, H. O. e Chan, E. E. C. L. Quantitative structure-activity relationship study of bitter peptides. *J Agric Food Chem* [S.I.], v. 54, n. 26, 2006.

Kim, H. O. e Li-Chan, E. C. Application of Fourier transform Raman spectroscopy for prediction of bitterness of peptides. *Appl Spectrosc* [S.I.], v. 60, n. 11, p. 1297-306, 2006a.

Kim, H. O. e Li-Chan, E. C. Quantitative structure-activity relationship study of bitter peptides. *J Agric Food Chem* [S.I.], v. 54, n. 26, p. 10102-11, 2006b.

Kim, Y. S.; Choi, Y. E.; Sano, H. Plant vaccination: Stimulation of defense system by caffeine production in planta. *Plant Signal Behav* [S.I.], v. 5, n. 5, 2010.

Koradi, R.; Billeter, M.; Wuthrich, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph* [S.I.], v. 14, n. 1, p. 51-5, 29-32, 1996.

Kordis, D. e Gubensek, F. Adaptive evolution of animal toxin multigene families. *Gene* [S.I.], v. 261, n. 1, p. 43-52, 2000.

Korza, H. J. e Bochtler, M. Pseudomonas aeruginosa LD-carboxypeptidase, a serine peptidase with a Ser-His-Glu triad and a nucleophilic elbow. *J Biol Chem* [S.I.], v. 280, n. 49, p. 40802-12, 2005.

Kovaleva, V.; Kiyamova, R.; Cramer, R.; Krynytsky, H.; Gout, I.; Filonenko, V.; Gout, R. Purification and molecular cloning of antimicrobial peptides from Scots pine seedlings. *Peptides* [S.I.], 2009.

Kreil, G.; Barra, D.; Simmaco, M.; Erspamer, V.; Erspamer, G. F.; Negri, L.; Severini, C.; Corsi, R.; Melchiorri, P. Deltorphan, a novel Amphibian skin peptide with high selectivity and affinity for delta opioid receptors. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 162, n. 1, p. 123-8, 1989.

Kreil, G. Peptides containing a D-amino acid from frogs and molluscs. *J Biol Chem* [S.I.], v. 269, n. 15, p. 10967-70, 1994.

Kreil, G. D-amino acids in animal peptides. *Annu Rev Biochem* [S.I.], v. 66, p. 337-45, 1997.

Lam, H.; Oh, D. C.; Cava, F.; Takacs, C. N.; Clardy, J.; De Pedro, M. A.; Waldor, M. K. D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. *Science* [S.I.], v. 325, n. 5947, p. 1552-5, 2009.

Lee, S. G. e Fischetti, V. A. Presence of D-alanine in an endopeptidase from *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem* [S.I.], v. 278, n. 47, p. 46649-53, 2003.

Leite, J. R.; Silva, L. P.; Rodrigues, M. I.; Prates, M. V.; Brand, G. D.; Lacava, B. M.; Azevedo, R. B.; Bocca, A. L.; Albuquerque, S.; Bloch, C., Jr. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides* [S.I.], v. 26, n. 4, p. 565-73, 2005.

Lizzi, A. R.; Carnicelli, V.; Clarkson, M. M.; Di Giulio, A.; Oratore, A. Lactoferrin derived peptides: mechanisms of action and their perspectives as antimicrobial and antitumoral agents. *Mini Rev Med Chem* [S.I.], v. 9, n. 6, p. 687-95, 2009.

Lopez, J. A.; Scarabotti, P. A.; Medrano, M. C.; Ghirardi, R. Is the red spotted green frog *Hypsiboas punctatus* (Anura: Hylidae) selecting its preys? The importance of prey availability. *Rev Biol Trop* [S.I.], v. 57, n. 3, p. 847-57, 2009.

Madison, D. M.; Sullivan, A. M.; Maerz, J. C.; Mcdarby, J. H.; Rohr, J. R. A complex, cross-taxon, chemical releaser of antipredator behavior in Amphibians. *J Chem Ecol* [S.I.], v. 28, n. 11, p. 2271-82, 2002.

Maehashi, K. e Huang, L. Bitter peptides and bitter taste receptors. *Cell Mol Life Sci* [S.I.], v. 66, n. 10, p. 1661-71, 2009.

Magalhães, B. S.; Melo, J. A.; Leite, J. R.; 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.; Bloch, C., Jr. Post-

secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 377, n. 4, p. 1057-61, 2008.

Mangoni, M. L.; Papo, N.; Saugar, J. M.; Barra, D.; Shai, Y.; Simmaco, M.; Rivas, L. Effect of natural L- to D-amino acid conversion on the organization, membrane binding, and biological function of the antimicrobial peptides bombinins H. *Biochemistry* [S.I.], v. 45, n. 13, p. 4266-76, 2006.

Mangoni, M. L.; Carotenuto, A.; Auriemma, L.; Saviello, M. R.; CPAMiglia, P.; Gomez-Monterrey, I.; Malfi, S.; Marcellini, L.; Barra, D.; Novellino, E.; Grieco, P. Structure-activity relationship, conformational and biological studies of temporin L analogues. *J Med Chem* [S.I.], v. 54, n. 5, p. 1298-307, 2011.

Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, P. F. Cherukuri, C. Deweese-Scott, L. Y. Geer,; M. Gwadz, S. H., D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. Ke, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert,; C. Liu, F. L., G. H. Marchler, M. Mullokandov, B. A. Shoemaker, V. Simonyan, J. S.; Song, P. A. T., R. A. Yamashita, J. J. Yin, D. Zhang E S. H. Bryant. . CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res* [S.I.], v. 33, n. n.Database issue, p. p.D192-196., 2005.

Marion, D.; Zasloff, M.; Bax, A. A two-dimensional NMR study of the antimicrobial peptide magainin 2. *FEBS Lett* [S.I.], v. 227, n. 1, p. 21-6, 1988.

Mason, A. J.; Marquette, A.; Bechinger, B. Zwitterionic phospholipids and sterols modulate antimicrobial peptide-induced membrane destabilization. *Biophys J* [S.I.], v. 93, n. 12, p. 4289-99, 2007.

Matsuzaki, K.; Sugishita, K.; Miyajima, K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of gram-negative bacteria. *FEBS Lett* [S.I.], v. 449, n. 2-3, p. 221-4, 1999.

Melchiorri, P.; Maritati, M.; Negri, L.; Erspamer, V. Long-term sensitization to the activation of cerebral delta-opioid receptors by the deltorphin Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH₂ in rats exposed to morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 89, n. 9, p. 3696-700, 1992.

Mignogna, G.; Severini, C.; Simmaco, M.; Negri, L.; Erspamer, G. F.; Kreil, G.; Barra, D. Identification and characterization of two dermorphins from skin extracts of the Amazonian frog *Phyllomedusa bicolor*. *FEBS Lett* [S.I.], v. 302, n. 2, p. 151-4, 1992.

Mor, A.; Hani, K.; Nicolas, P. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *J Biol Chem* [S.I.], v. 269, n. 50, p. 31635-41, 1994.

Nagatomo, K. e Kubo, Y. Caffeine activates mouse TRPA1 channels but suppresses human TRPA1 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 105, n. 45, p. 17373-8, 2008.

Naim, M.; Nicolas, P.; Baron, D. Folded conformations of the delta-selective opioid dermenkephalin with head-to-tail interactions. A simulated annealing study through NMR restraints. *Int J Pept Protein Res* [S.I.], v. 47, n. 5, p. 353-60, 1996.

Nascimento, A. C.; Fontes, W.; Sebben, A.; Castro, M. S. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein Pept Lett* [S.I.], v. 10, n. 3, p. 227-38, 2003.

Nei, M.; Niimura, Y.; Nozawa, M. The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. *Nat Rev Genet* [S.I.], v. 9, n. 12, p. 951-63, Dec 2008.

Neuwirth, M.; Daly, J. W.; Myers, C. W.; Tice, L. W. Morphology of the granular secretory glands in skin of poison-dart frogs (Dendrobatidae). *Tissue Cell* [S.I.], v. 11, n. 4, p. 755-71, 1979.

Ney, K. H. Prediction of bitterness of peptides from their amino acid composition. *Z. Lebernsm Unters Forsch* [S.I.], v. 147, 1971.

Nicolas, P. e El Amri, C. The dermaseptin superfamily: a gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 1788, n. 8, p. 1537-50, 2009.

Noonan, B. P. e Comeault, A. A. The role of predator selection on polymorphic aposematic poison frogs. *Biol Lett* [S.I.], v. 5, n. 1, p. 51-4, 2009.

Ohide, H.; Miyoshi, Y.; Maruyama, R.; Hamase, K.; Konno, R. d-Amino acid metabolism in mammals: Biosynthesis, degradation and analytical aspects of the metabolic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* [S.I.], 2011.

Peschel, A. e Sahl, H. G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* [S.I.], v. 4, n. 7, p. 529-36, 2006.

Poe, C. F. e Johnson, C. C. Toxicity of caffeine, theobromine and theophylline. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* [S.I.], v. 9, n. 3, p. 267-74, 1953.

Park, S.; Son, W. S.; Kim, Y. J.; Kwon, A. R.; Lee, B. J. NMR spectroscopic assessment of the structure and dynamic properties of an Amphibian antimicrobial peptide (Gaegurin 4) bound to SDS micelles. *J Biochem Mol Biol* [S.I.], v. 40, n. 2, p. 261-9, 2007.

Prates, M. V. *Peptídeos bioativos de Hyla punctata*. (2003). (Ph.D) - Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília - UnB, Brasília, 2003.

Prates, M. V.; Sforca, M. L.; Regis, W. C.; Leite, J. R.; Silva, L. P.; Pertinhez, T. A.; Araujo, A. L.; Azevedo, R. B.; Spisni, A.; Bloch, C., Jr. The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran *Hyla punctata*. *J Biol Chem* [S.I.], v. 279, n. 13, p. 13018-26, 2004.

Resende, J. M.; Moraes, C. M.; Prates, M. V.; Cesar, A.; Almeida, F. C.; Mundim, N. C.; Valente, A. P.; Bemquerer, M. P.; Pilo-Veloso, D.; Bechinger, B. Solution NMR structures of the antimicrobial peptides phylloseptin-1, -2, and -3 and biological activity: the role of charges and hydrogen bonding interactions in stabilizing helix conformations. *Peptides* [S.I.], v. 29, n. 10, p. 1633-44, 2008.

Ribeiro, A. C. J. *Síntese química e purificação de análogos de somatostatina de Hysiboas punctatus*. (2011). (Master Degree) - Departamento de Biologia Animal, Universidade de Brasília - UnB, Brasília, 2011.

Richardson, J. M.; Gunzburger, M. S.; Travis, J. Variation in predation pressure as a mechanism underlying differences in numerical abundance between populations of the poeciliid fish *Heterandria formosa*. *Oecologia* [S.I.], v. 147, n. 4, p. 596-605, 2006.

Roudot-Algaron, F. Le gout des acides amines, des peptides et des proteines. *Lait* [S.I.], v. 76, 1996.

Schempp, C.; Emde, M.; Wolfle, U. Dermatology in the Darwin anniversary. Part 1: Evolution of the integument. *J Dtsch Dermatol Ges* [S.I.], v. 7, n. 9, p. 750-7, 2009.

Scott, K. Taste recognition: food for thought. *Neuron* [S.I.], v. 48, n. 3, p. 455-64, 2005.

Schwieters, C. D.; Clore, G. M. The VMD-XPLOR visualization package for NMR structure refinement. *J Magn Reson* [S.I.], v. 149, n. 2, p. 239-44, 2001.

Schwieters, C. D.; Kuszewski, J. J.; Tjandra, N.; Clore, G. M. The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. *J Magn Reson* [S.I.], v. 160, n. 1, p. 65-73, 2003.

Sforca, M. L.; Oyama, S., Jr.; Canduri, F.; Lorenzi, C. C.; Pertinhez, T. A.; Konno, K.; Souza, B. M.; Palma, M. S.; Ruggiero Neto, J.; Azevedo, W. F., Jr.; Spisni, A. How C-terminal carboxyamidation alters the biological activity of peptides from the venom of the eumenine solitary wasp. *Biochemistry* [S.I.], v. 43, n. 19, p. 5608-17, May 18 2004.

Shai, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* [S.I.], v. 66, n. 4, p. 236-48, 2002.

Shai, Y.; Makovitzky, A.; Avrahami, D. Host defense peptides and lipopeptides: modes of action and potential candidates for the treatment of bacterial and fungal infections. *Curr Protein Pept Sci* [S.I.], v. 7, n. 6, p. 479-86, 2006.

Shaw, J. E.; Alattia, J. R.; Verity, J. E.; Prive, G. G.; Yip, C. M. Mechanisms of antimicrobial peptide action: studies of indolicidin assembly at model membrane interfaces by in situ atomic force microscopy. *J Struct Biol* [S.I.], v. 154, n. 1, p. 42-58, 2006.

Simantov, R. e Snyder, H. Isolation and structure identification of a morphine-like peptide "enkephalin" in bovine brain. *Life Sci* [S.I.], v. 18, n. 8, p. 781-7, 1976.

Simmaco, M.; Barra, D.; Chiarini, F.; Noviello, L.; Melchiorri, P.; Kreil, G.; Richter, K. A family of bombinin-related peptides from the skin of *Bombina variegata*. *Eur J Biochem* [S.I.], v. 199, n. 1, p. 217-22, 1991.

Simmaco, M.; Mignogna, G.; Barra, D.; Bossa, F. Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNAs encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides. *J Biol Chem* [S.I.], v. 269, n. 16, p. 11956-61, 1994.

Strother, P. K.; Battison, L.; Brasier, M. D.; Wellman, C. H. Earth's earliest non-marine eukaryotes. *Nature* [S.I.], v. 473, n. 7348, p. 505-9, 2011.

Tanford, C. e Buckley, C. E., 3rd; De, P. K.; Lively, E. P. Effect of ethylene glycol on the conformation of gamma-globulin and beta-lactoglobulin. *J Biol Chem* [S.I.], v. 237, p. 1168-71, 1962.

Taylor, R. B.; Lindquist, N.; Kubanek, J.; Hay, M. E. Intraspecific variation in palatability and defensive chemistry of brown seaweeds: effects on herbivore fitness. *Oecologia* [S.I.], v. 136, n. 3, p. 412-23, 2003.

Tennessen, J. A. e Blouin, M. S. Selection for antimicrobial peptide diversity in frogs leads to gene duplication and low allelic variation. *J Mol Evol* [S.I.], v. 65, n. 5, p. 605-15, 2007.

Tennessen, J. A.; Woodhams, D. C.; Chaurand, P.; Reinert, L. K.; Billheimer, D.; Shyr, Y.; Caprioli, R. M.; Blouin, M. S.; Rollins-Smith, L. A. Variations in the expressed antimicrobial peptide repertoire of northern leopard frog (*Rana pipiens*) populations suggest intraspecies differences in resistance to pathogens. *Dev Comp Immunol* [S.I.], v. 33, n. 12, p. 1247-57, 2009.

Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics* [S.I.], v. Chapter 2, p. Unit 2 3, 2002.

Tooyama, I.; Abe, H.; Renda, T.; Erspamer, V.; Kimura, H. [d-Ala²]deltorphin I-like immunoreactivity in the adult rat brain: immunohistochemical localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 90, n. 20, p. 9635-9, 1993.

Troll, W. e Cannan, R. K. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids. *J Biol Chem* [S.I.], v. 200, n. 2, p. 803-11, 1953.

Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. 1986.

Trueb, L. *In Evolutionary Biology of the Anurans*. Vial, J. L. ed.: University of Missouri Press, Columbia, 1973.

Vanhoye, D.; Bruston, F.; Nicolas, P.; Amiche, M. Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *Eur J Biochem* [S.I.], v. 270, n. 9, p. 2068-81, 2003.

Wood, W. F.; Sollers, B. G.; Dragoo, G. A.; Dragoo, J. W. Volatile components in defensive spray of the hooded skunk, *Mephitis macroura*. *J Chem Ecol* [S.I.], v. 28, n. 9, p. 1865-70, 2002.

Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. 1986.

Zasloff, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 84, n. 15, p. 5449-53, 1987.

Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* [S.I.], v. 415, n. 6870, p. 389-95, 2002a.

Zasloff, M. Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity. *Lancet* [S.I.], v. 360, n. 9340, p. 1116-7, 2002b.

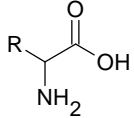
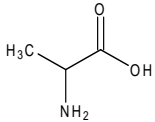
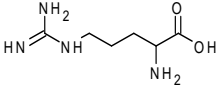
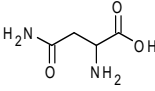
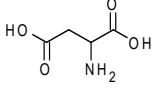
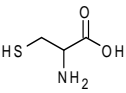
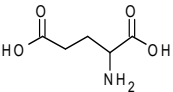
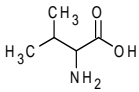
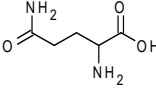
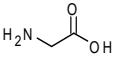
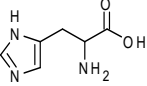
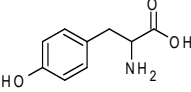
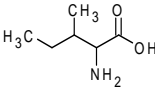
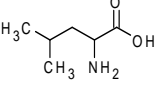
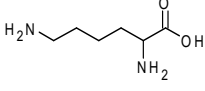
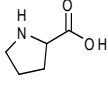
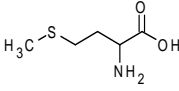
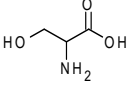
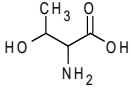
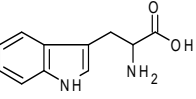
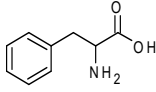
Zhang, Y.; Hoon, M. A.; Chandrashekar, J.; Mueller, K. L.; Cook, B.; Wu, D.; Zuker, C. S.; Ryba, N. J. Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* [S.I.], v. 112, n. 3, p. 293-301, 2003.

Zhang, Z.; Zhao, Z.; Margolskee, R.; Liman, E. The transduction channel TRPM5 is gated by intracellular calcium in taste cells. *J Neurosci* [S.I.], v. 27, p. 5777-86, 2007.

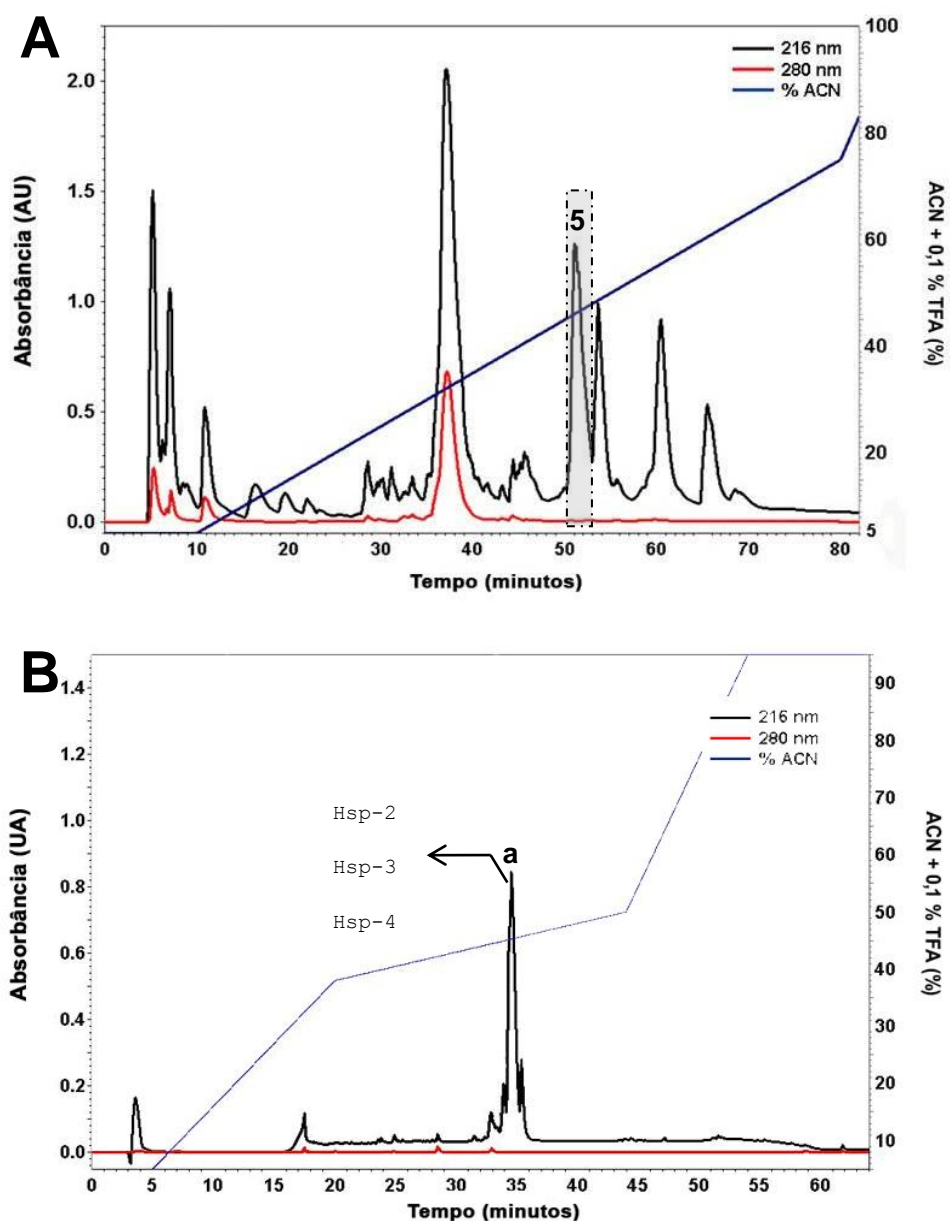
Zhao, X.; Yamazaki, D.; Park, K. H.; Komazaki, S.; Tjondrokoesoemo, A.; Nishi, M.; Lin, P.; Hirata, Y.; Brotto, M.; Takeshima, H.; Ma, J. Ca²⁺ overload and sarcoplasmic reticulum instability in *tric-a* null skeletal muscle. *J Biol Chem* [S.I.], v. 285, n. 48, p. 37370-6, 2010.

Zhao, G. Q.; Zhang, Y.; Hoon, M. A.; Chandrashekar, J.; Erlenbach, I.; Ryba, N. J.; Zuker, C. S. The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* [S.I.], v. 115, n. 3, p. 255-66, 2003.

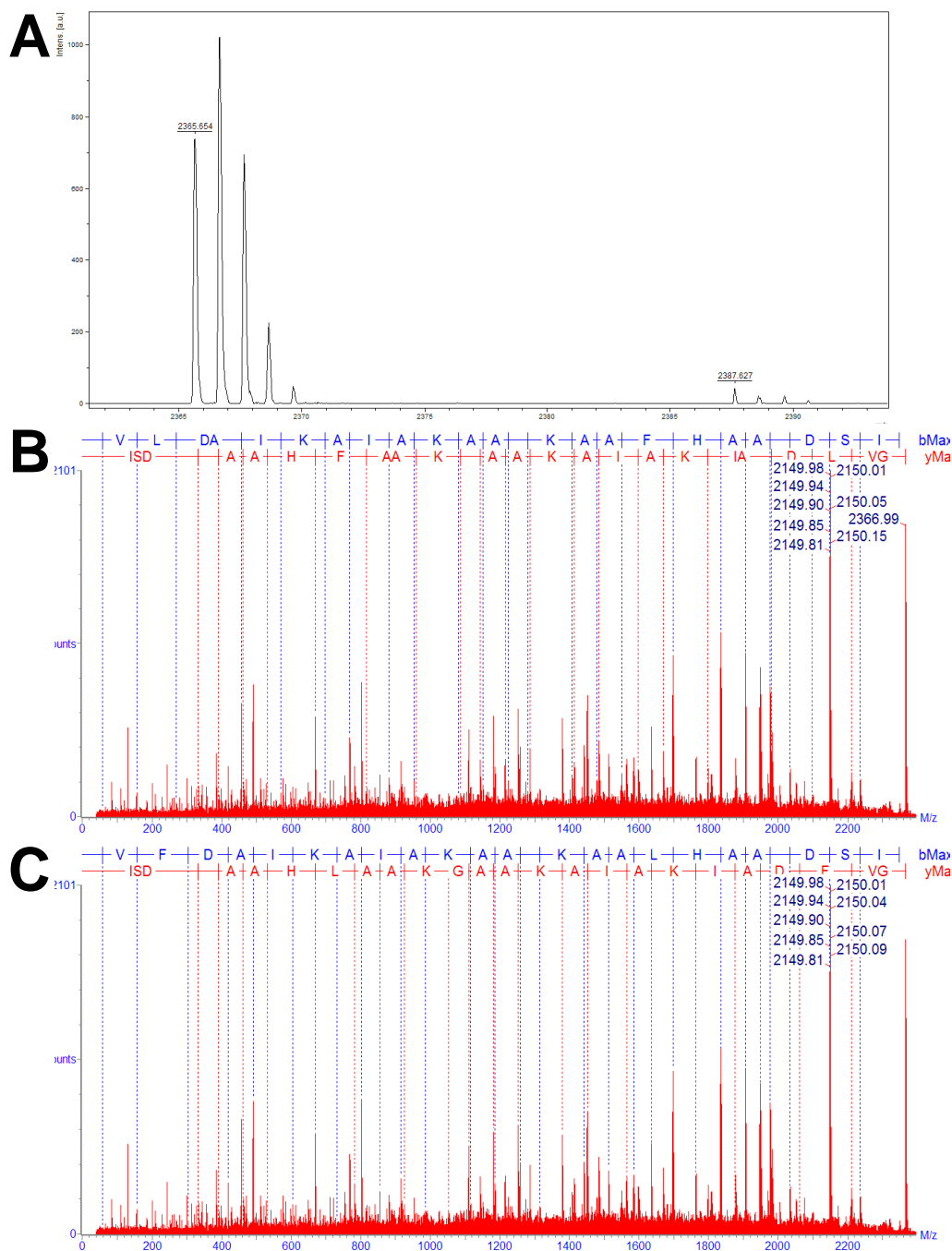
Tabela de aminoácidos

 <p>Nome (Abreviação) Símbolo</p>	 <p>Alanina (Ala) A</p>	 <p>Arginina (Arg) R</p>	 <p>Asparagina (Asn) N</p>	 <p>Ácido Aspártico (Asp) D</p>
	 <p>Cisteína (Cys) C</p>	 <p>Ácido Glutâmico (Glu) E</p>	 <p>Valina (Val) V</p>	 <p>Glutamina (Gln) Q</p>
	 <p>Glicina (Gly) G</p>	 <p>Histidina (His) H</p>	 <p>Tirosina (Tyr) Y</p>	 <p>Isoleucina (Ile) I</p>
	 <p>Leucina (Leu) L</p>	 <p>Lisina (Lys) K</p>	 <p>Prolina (Pro) P</p>	 <p>Metionina (Met) M</p>
	 <p>Serina (Ser) S</p>	 <p>Treonina (Thr) T</p>	 <p>Triptofano (Trp) W</p>	 <p>Fenilalanina (Phe) F</p>

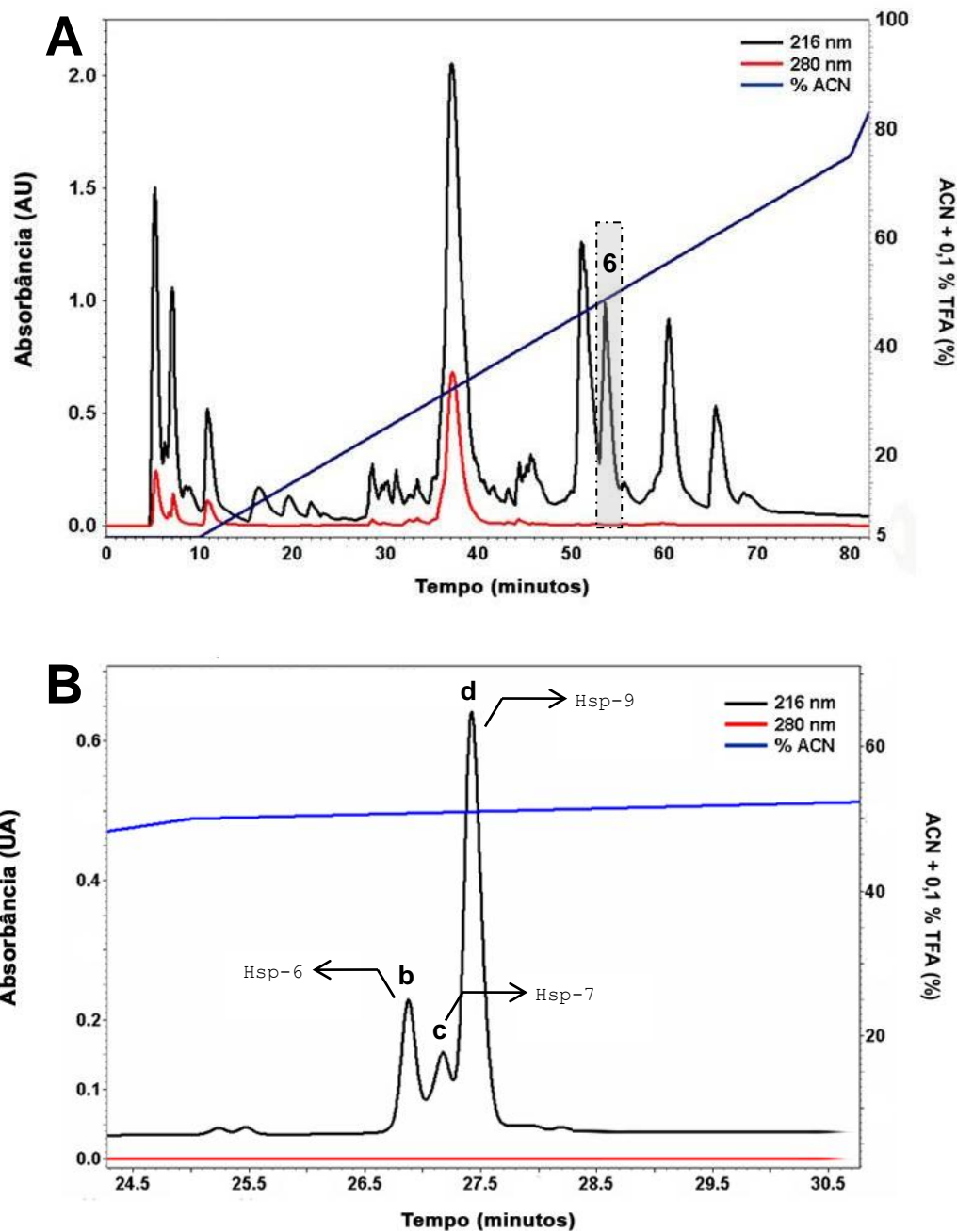
Purificação e espectros MS e MS/MS das hilaseptinas identificadas.



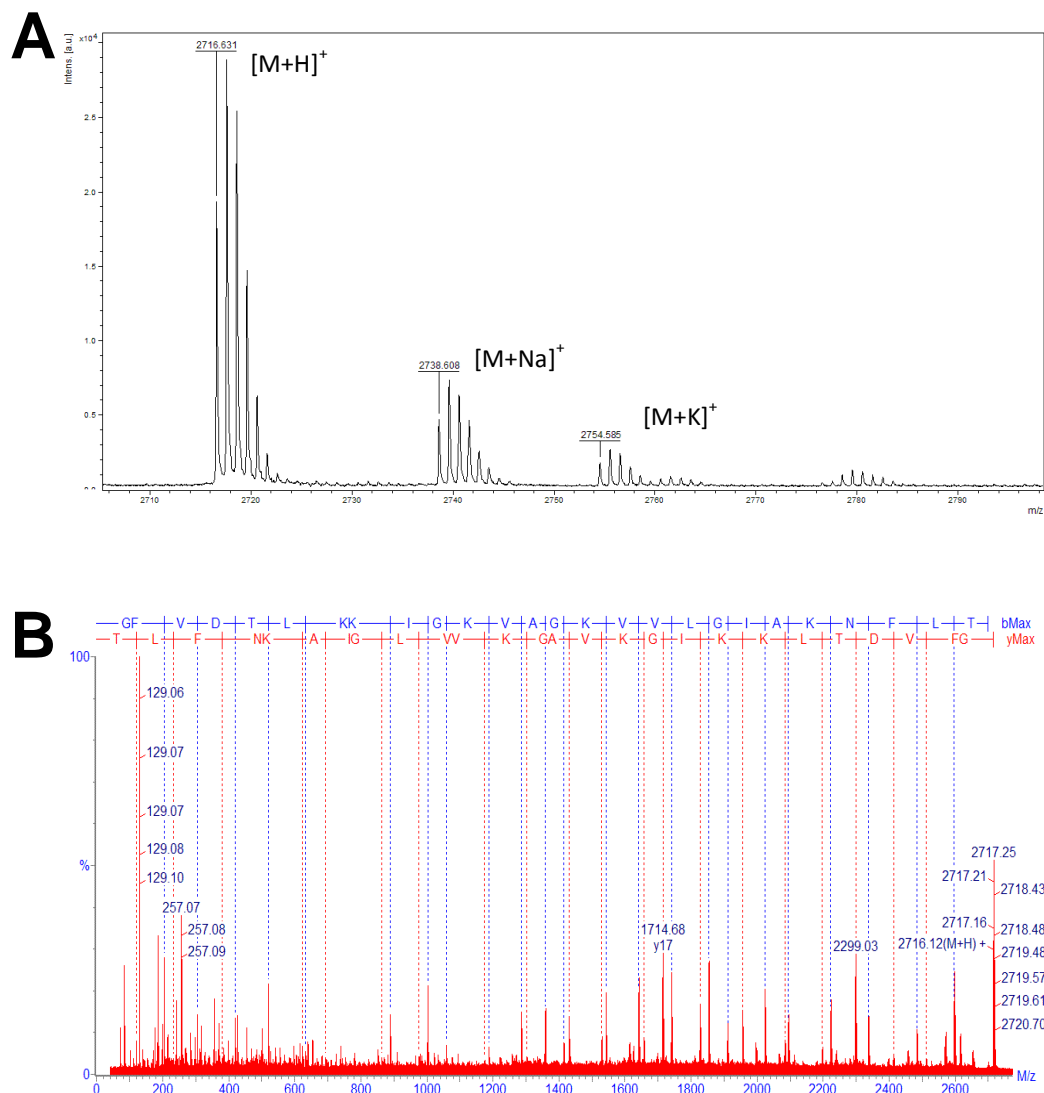
Purificação dos componentes pertencentes ao Grupo_05 do extrato bruto de *H. punctatus*. (A) Perfil cromatográfico do extrato bruto, destacando a fração cromatografia 6. (B) Perfil cromatográfico analítico da fração_5. A fração foi submetida a uma cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) em coluna analítica Vydac C₁₈, fluxo 1,0 mL·min⁻¹, utilizando gradiente modificado (linha azul). A absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm (linhas pretas e vermelhas, respectivamente). A fração majoritária foi submetida a análise de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF.



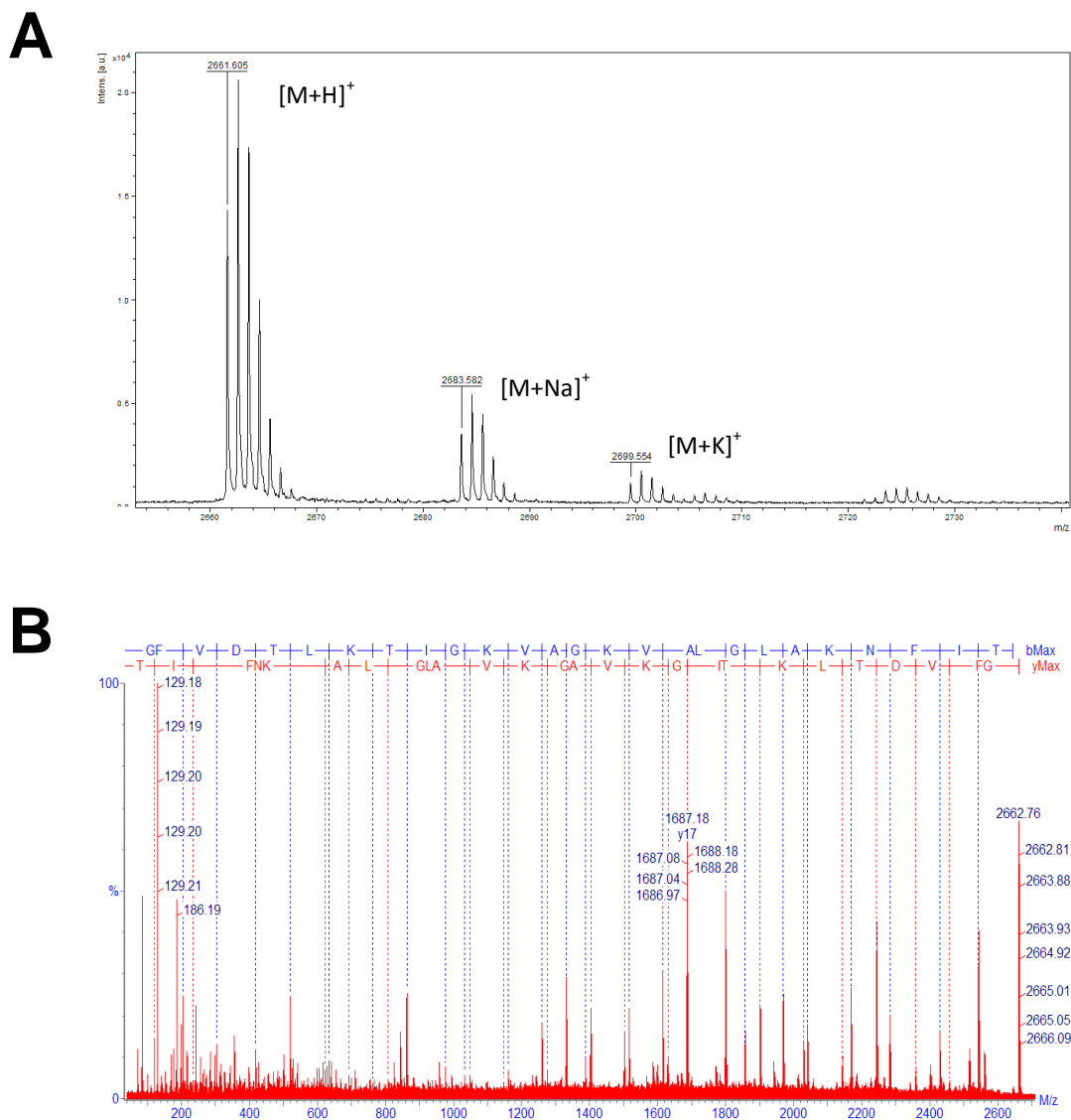
Espectro de massa (MS) do componente 'a' de $[M+H]^+ = 2365,65$ Da (A) e Sequenciamento *de novo* (B) e (C). (A) Massa monoisotópica do peptídeo nativo e seu aduto de sódio (Na^+). O espectro foi obtido em modo refletido, usando calibrante externo. (B) e (C) Sequenciamento da molécula Hsp-2, 3 e 4 $[M+H]^+ = 2365,65$ Da, em MALDI-TOF/TOF utilizando o modo LIFT. Os fragmentos gerados permitiram o reconhecimento completo das séries de íons y (vermelho) e b (azul). As sequências peptídicas usando o código de uma única letra estão indicadas na parte superior.



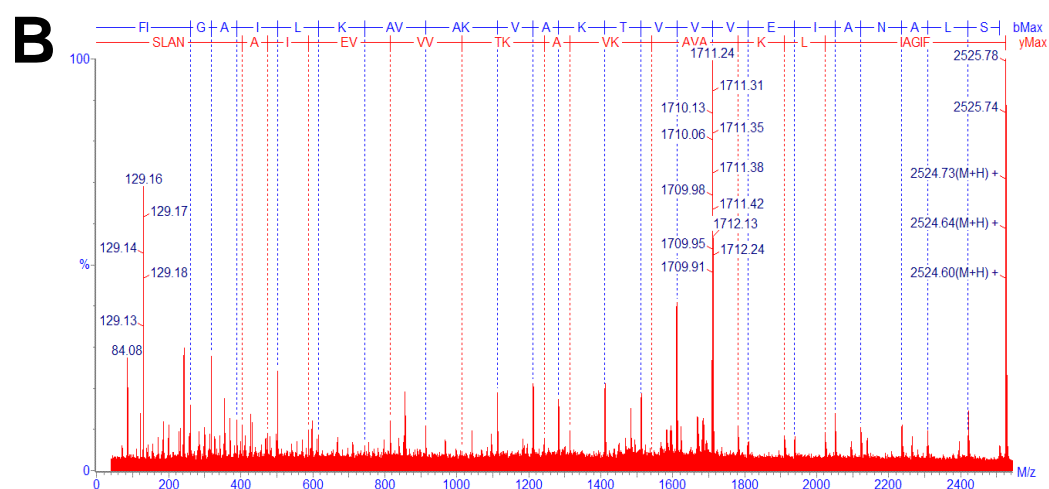
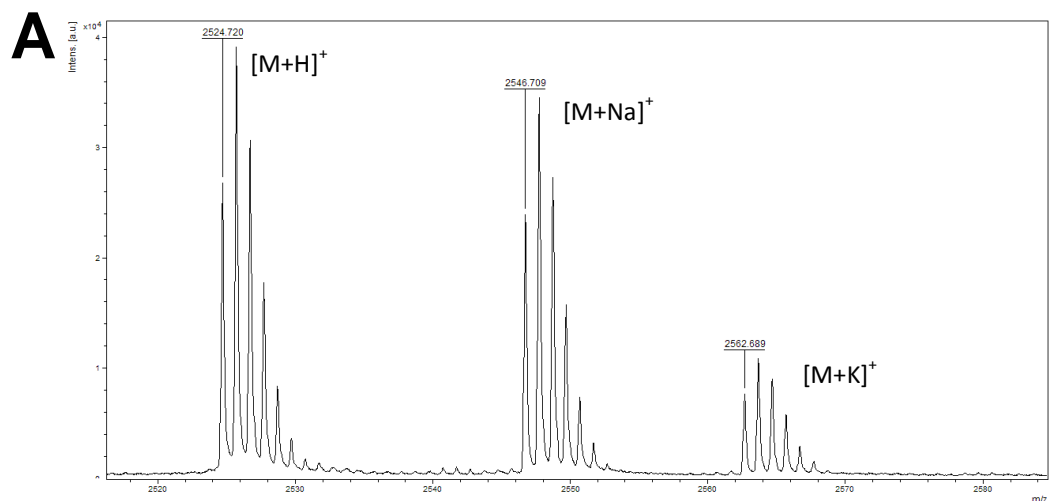
Purificação dos componentes pertencentes ao Grupo_06 do extrato bruto de *H. punctatus*. (A) Perfil cromatográfico do extrato bruto, destacando a fração cromatografia 6. (B) Perfil cromatográfico analítico da fração_6. A fração foi submetida a uma cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) em coluna analítica Vydac C₁₈, fluxo 1,0 mL·min⁻¹, utilizando gradiente modificado (linha azul). A absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm (linhas pretas e vermelhas, respectivamente). As três frações obtidas foram submetidas a análise de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF.



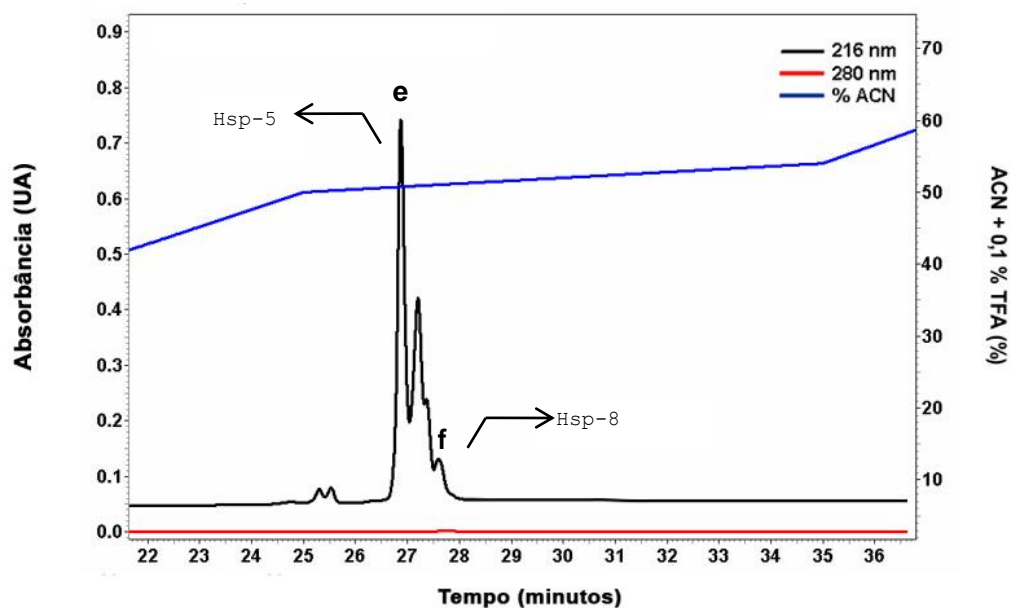
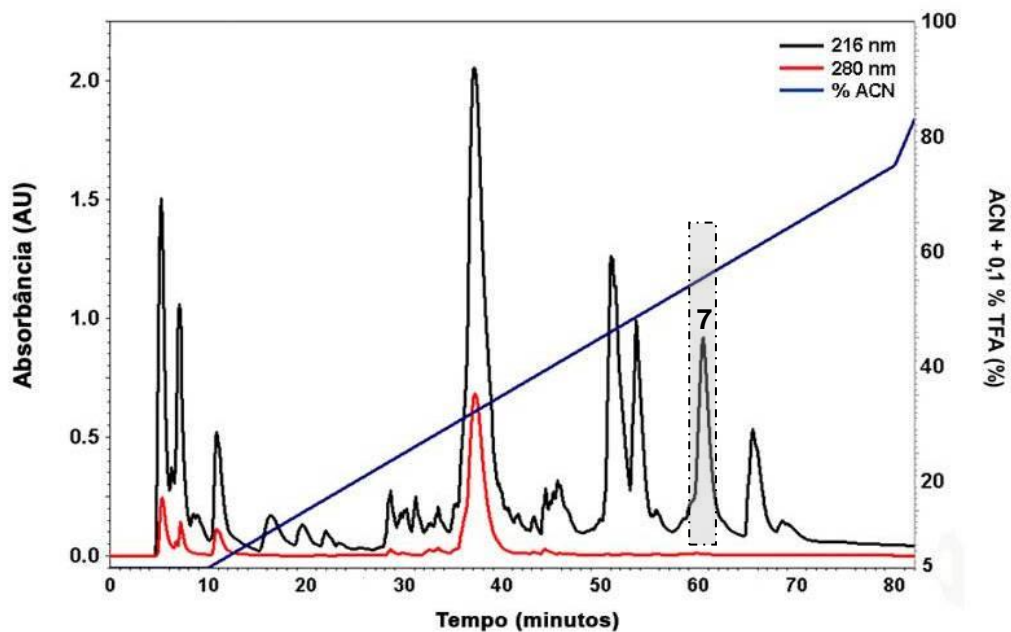
Espectro de massa (MS) do componente ‘b’ de $[M+H]^+ = 2716,63$ Da (A) e Sequenciamento *De novo* (B). (A) Massa monoisotópica do peptídeo nativo e seus adutos de sódio (Na^+) e potássio (K^+). O espectro foi obtido em modo refletido, usando calibrante externo. **(B)** Sequenciamento da molécula Hsp-6, $[M+H]^+ = 2716,63$ Da, em MALDI-TOF/TOF utilizando o modo LIFT. Os fragmentos gerados permitiram o reconhecimento completo das séries de íons y (vermelho) e b (azul). As sequências peptídicas usando o código de uma única letra estão indicadas na parte superior.



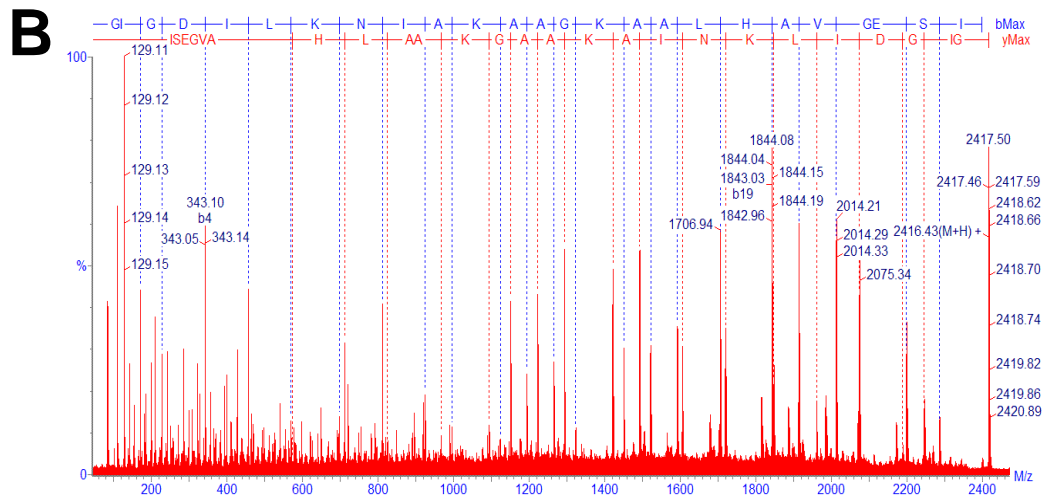
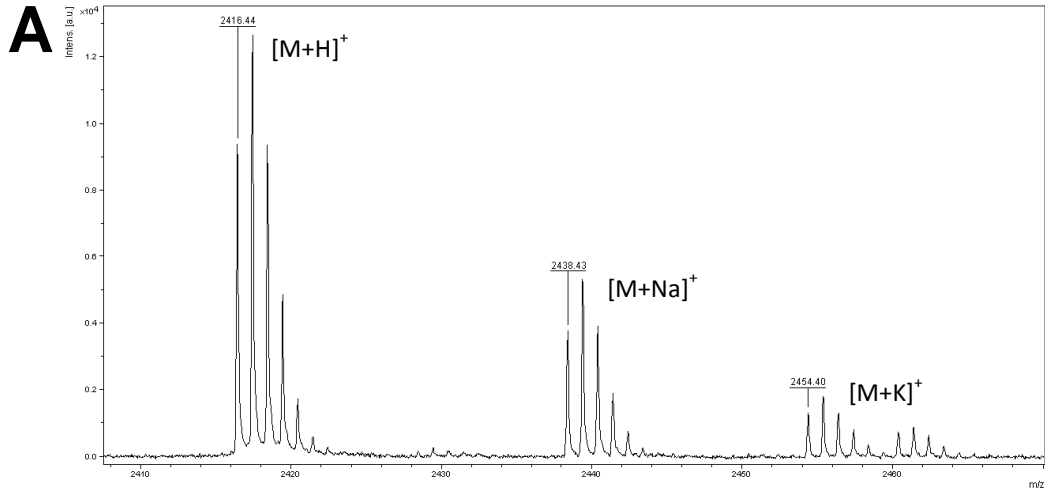
Espectro de massa (MS) do componente ‘c’ de $[M+H]^+ = 2661,60$ Da (A) e Sequenciamento *De novo* (B). (A) Massa monoisotópica do peptídeo nativo e seus adutos de sódio (Na^+) e potássio (K^+). O espectro foi obtido em modo refletido, usando calibrante externo. (B) Sequenciamento da molécula Hsp-7, $[M+H]^+ = 2661,60$ Da, em MALDI-TOF/TOF utilizando o modo LIFT. Os fragmentos gerados permitiram o reconhecimento completo das séries de íons y (vermelho) e b (azul). As sequências peptídicas usando o código de uma única letra estão indicadas na parte superior.



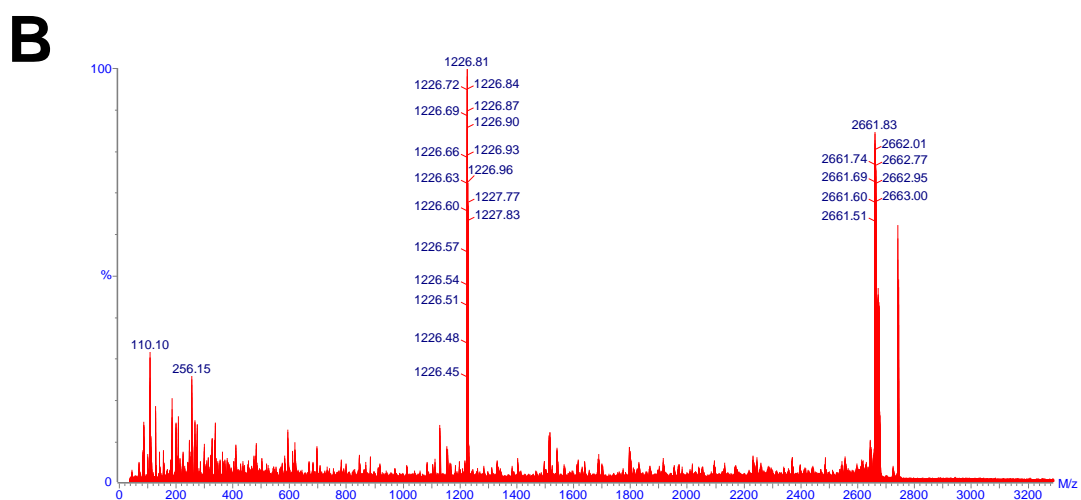
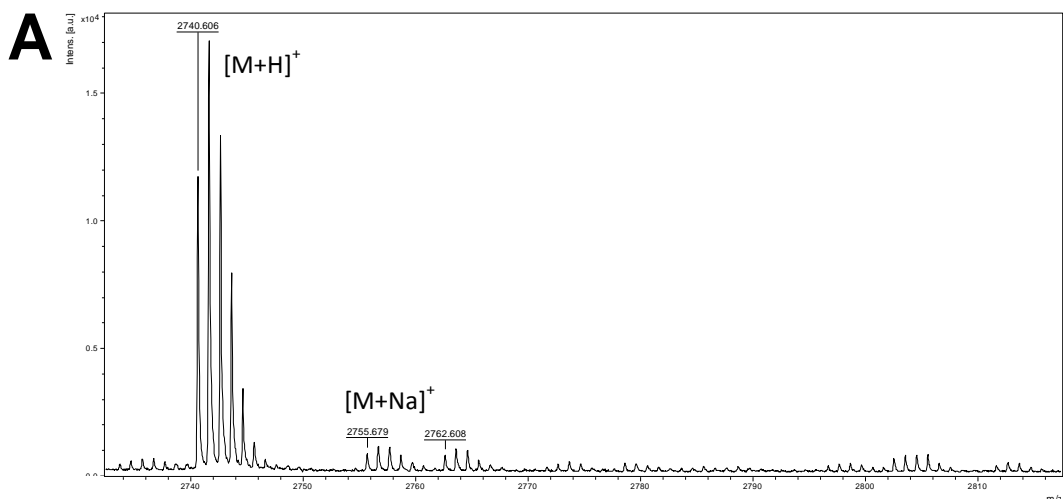
Espectro de massa (MS) do componente ‘d’ de $[M+H]^+ = 2524,72$ Da (A) e Sequenciamento *De novo* (B). (A) Massa monoisotópica do peptídeo nativo e seus adutos de sódio (Na^+) e potássio (K^+). O espectro foi obtido em modo refletido, usando calibrante externo. (B) Sequenciamento da molécula Hsp-9, $[M+H]^+ = 2524,72$ Da, em MALDI-TOF/TOF utilizando o modo LIFT. Os fragmentos gerados permitiram o reconhecimento completo das séries de íons *y* (vermelho) e *b* (azul). As sequências peptídicas usando o código de uma única letra estão indicadas na parte superior.



Purificação dos componentes pertencentes ao Grupo_07 do extrato bruto de *H. punctatus*. (A) Perfil cromatográfico do extrato bruto, destacando a fração cromatografica 7. (B) Perfil cromatográfico analítico da fração_7. A fração foi submetida a uma cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) em coluna analítica Vydac C₁₈, fluxo 1,0 mL·min⁻¹, utilizando gradiente modificado (linha azul). A absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm (linhas pretas e vermelhas, respectivamente). As três frações obtidas foram submetidas a análise de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF.



Espectro de massa (MS) do componente ‘d’ de $[M+H]^+ = 2416,44$ Da (A) e Sequenciamento *De novo* (B). (A) Massa monoisotópica do peptídeo nativo e seus adutos de sódio (Na^+) e potássio (K^+). O espectro foi obtido em modo refletido, usando calibrante externo. (B) Sequenciamento da molécula Hsp-5, $[M+H]^+ = 2416,44$ Da, em MALDI-TOF/TOF utilizando o modo LIFT. Os fragmentos gerados permitiram o reconhecimento completo das séries de íons y (vermelho) e b (azul). As sequências peptídicas usando o código de uma única letra estão indicadas na parte superior.



Espectro de massa (MS) do componente 'd' de $[M+H]^+ = 2740,60$ Da (A) e Sequenciamento *De novo* (B). (A) Massa monoisotópica do peptídeo nativo e seus adutos de sódio (Na^+) e potássio (K^+). O espectro foi obtido em modo refletido, usando calibrante externo. (B) Sequenciamento da molécula Hsp-8, $[M+H]^+ = 2740,60$ Da, em MALDI-TOF/TOF utilizando o modo LIFT. Peptídeo de $[M+H]^+ = 2661,56$ Da sulfonado. Os fragmentos gerados permitiram o reconhecimento completo das séries de íons γ (vermelho) e b (azul). As seqüências peptídicas usando o código de uma única letra estão indicadas na parte superior.