

WANESSA FERNANDA ALTEI

Estudo químico de *Jatropha curcas* e de *J. gossypifolia* nativas e cultivadas: Avaliação de ciclopeptídeos em função de habitat e hábito: prospecção e atividade biológica.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Química

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vanderlan da Silva
Bolzani
Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

**ARARAQUARA
2009**

WANESSA FERNANDA ALTEI

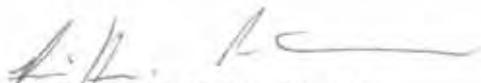
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 16 de fevereiro de 2009.

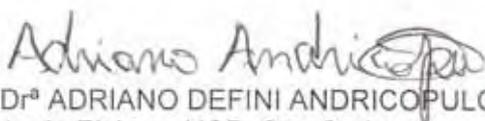
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª VANDERLAN DA SILVA BÓLZANI (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. MARIO SERGIO PALMA
Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro



Profª Drª ADRIANO DEFINI ANDRICOPULO
Instituto de Física – USP, São Carlos

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus.

Aos meus pais que são meu alicerce, meu refúgio e minha inspiração. Sem vocês com certeza eu não teria chegado até aqui.

Ao meu namorado Julio, amigo e companheiro em todas as horas.

Aos meus queridos amigos, essenciais para a alegria dos meus dias.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que participaram da minha jornada, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

À minha família e ao meu namorado, que estiveram sempre ao meu lado. Eles foram a minha base, e me deram forças sempre que foi preciso.

Agradeço também à minha “mãe científica” Vanderlan da Silva Bolzani, a pessoa que tornou possível essa conquista simplesmente por ter me dado uma oportunidade. A confiança depositada em mim e em meu trabalho fizeram uma enorme diferença para o meu desenvolvimento. Apesar de muitas vezes estar longe, ela sempre se fez presente nos momentos decisivos, não apenas cientificamente, mas também como um grande ser humano, digno de ser admirado. Aprendi com você Vanderlan que antes de pesquisadores nós somos seres humanos, e devemos nos respeitar e viver como tal.

Não posso deixar de agradecer com o mesmo carinho ao meu co-orientador, professor Eduardo Maffud Cilli, a quem eu chamo de meu segundo orientador. É impossível descrever aqui o quanto sou grata a toda a ajuda que me foi proporcionada, e todo o carinho que sinto por essa pessoa. Devo ao Professor Eduardo muito do que aprendi em todos esses anos de trabalho, ele é para mim um exemplo de dedicação, inteligência, prestatividade e humildade. Agradeço pela paciência com a minha teimosia e com os meus muitos erros, e acima de tudo, pela amizade que nós aprendemos a cultivar. Independentemente do caminho que eu vá seguir agora, saiba que você sempre será sempre o Teacher, para quem eu enviarei meus emails cheios de dúvidas, e que com certeza continuará fazendo parte da minha jornada.

Ao meu amigo Douglas, uma pessoa única, na qual eu sempre me inspirei. Sinto saudades dos nossos longos papos a respeito dos peptídeos. Como ele mesmo gosta de dizer, nós formamos o pequeno “subgrupo” de peptídeos cíclicos do NuBBE. Espero ainda um dia poder ter a enorme satisfação de trabalharmos juntos novamente.

Agradeço aos meus amigos irmãos da bioquímica, Eduardo Festozo Vicente (Lentilha), Edson Crusca Junior (Crusca) e a minha amiga Graziely Cespedes, que têm uma participação especial na minha vida. Foram vocês que fizeram tudo ficar

mais gostoso, mais descontraído, que tornaram os meus dias melhores nestes anos. Sempre lembrarei dos nossos almoços, as musiquinhas na salinha, e até as brigas e os problemas que enfrentamos juntos, que nos fizeram mais fortes e mais unidos.

Aos outros queridos amigos, que não poderiam ficar de fora: Saulo (Tio Mofo), a pessoa que fala alto, mas sempre disposto a ajudar, e os mais recentes, Sybele Saska, com suas idéias, Ronaldo (Gandhi) e Anderson, que sempre me respeitaram.

Aos amigos do NuBBE. Começando pela minha querida amiga professora Hosana Maria Debonisi, que literalmente me pegou pela mão e me deu um rumo no início de tudo. Luis Octavio Regasini, sempre me fazendo rir e indiscutivelmente alguém em quem sempre pude confiar. Simone, sempre dedicada, que me ajudou muito na finalização do projeto de mestrado, Otavio Flausino, com toda a sua calma nas explicações sobre os ensaios enzimáticos, Vânia (Vaninha), Adriana Lopes (Dri) e Ana Cristina (Cris), companheiras nas viagens diárias Araraquara-São Carlos, João Marcos, Andrea, Lidiane, Débora, Scheila, Mike, Marcos Pivatto, Amanda, Marília, Denise, Magela, Glenda, Fernando Passareli, Fernando Continguiba, Silvia Noeli Lopes e Amélia. Enfim, todos, que de alguma forma, tiveram sua pequena participação em minha história, seja pelo trabalho ou pelas boas discussões na hora do café.

Gostaria também de citar os outros professores do NuBBE, com quem acabei criando um vínculo de amizade: Ian Castro, Alberto Cavalheiro, Dulce Helena, Maísa Furlan, Márcia Nasser e Ângela Vieira.

Fica aqui também o meu agradecimento ao Instituto de Química, o que inclui os funcionários, responsáveis pelo bom funcionamento e pela excelência desse instituto. Em especial agradeço às meninas da sessão de pós graduação, Célia, Sandra e Wenia, que se tornaram mais do que colegas, e sempre estiveram prontas para ajudar, não é “pessoas”?.

Aos meus amigos de São Carlos, que mesmo estando fora da minha vida acadêmica, sempre entenderam as vezes em que eu não pude sair por estar ocupada com o meu trabalho em Araraquara.

À FAPESP e ao projeto BIOTA, que financiaram todo o meu aprendizado.

Obrigado a todos!!!

EPÍGRAFE

Se és incapaz de sonhar, nasceste velho; se teu sonho te impede de agir conforme a realidade, nasceste inútil; se, porém, sabes transformar sonhos em realidade e tocar a realidade com a luz do teu sonho, então serás grande no teu mundo, e o mundo será grande em ti

A humildade é o nutriente mais inteligente, fino e penetrante da personalidade humana. Ela alicerça o aprendizado, instiga a inspiração, aguça a intuição, amplia o campo de visão, expande a maneira de ser e reagir.

Augusto Cury

RESUMO

Este projeto é parte do projeto temático "*Conservation and Sustainable Use of the Plant Diversity from Cerrado and Atlantic Forest: Chemical Diversity and Prospecting for Potencial Drugs*" – Biota/FAPESP e descreve o isolamento, purificação e caracterização de peptídeos cíclicos presentes em *Jatropha curcas* L. Este tema foi proposto para o projeto temático por tratar-se de um assunto atual e inédito no Brasil, sendo importante no que diz respeito da descoberta de novas classes de produtos naturais. A obtenção dos peptídeos foi realizada através da partição do látex com acetato de etila e da aplicação de técnicas cromatográficas para sua purificação. Este procedimento permitiu a obtenção de dois peptídeos cíclicos, posteriormente caracterizados por análise de aminoácidos e espectrometria de massas. O seqüenciamento dessas substâncias foi realizado por Ressonância Magnética Nuclear, e permitiu identificar o peptídeo cíclico Polianina A [α (Pro-Leu-Gly-Val-Leu-Leu-Tyr)], já descrito na literatura, e um peptídeo de estrutura inédita, denominado Jatroidina I [α (Leu-Leu-Asn-Leu-Trp-Cly-Pro-Gly)]. Análogos lineares e cíclicos desses peptídeos foram obtidos pela metodologia da síntese peptídica em fase sólida, empregando a estratégia Fmoc/tBu. Os análogos obtidos bem como os peptídeos naturais foram submetidos a diversos ensaios biológicos. Por fim, foi feita uma avaliação mensal qualitativa e/ou quantitativa do perfil ciclopeptídico de espécimes cultivadas de *Jatropha curcas* L.(Euphorbiaceae), *gossypifolia*, para verificar se ocorrem alterações na produção destas moléculas em função da época do ano. Os resultados mostraram que as 2 espécies produzem os peptídeos cíclicos durante o ano todo. É interessante notar que as descrições de peptídeos cíclicos na literatura foram obtidas de espécies de *Jatropha* coletadas usualmente em regiões da África e da Ásia e, nesse contexto, este trabalho contribui para a elucidação do perfil ciclopeptídico dessas espécies em diferentes ecossistemas no território brasileiro.

Palavras chave: peptídeos cíclicos, *Jatropha curcas* L., *Jatropha gossypifolia*

ABSTRACT

This project is part of the thematic project "*Conservation and Sustainable Use of the Plant Diversity from Cerrado and Atlantic Forest: Chemical Diversity and Prospecting for Potential Drugs*" – Biota/FAPESP, and deals with the isolation, purification and characterization of cyclic peptides from *Jatropha curcas* L. This is a quite new natural product subject in Brazil, which is also important for discovery from our biodiversity. These compounds were obtained through partition of the latex with ethyl acetate, followed of HPLC chromatography for separation and purification. This procedure resulted in two cyclic peptides, which were characterized by amino acid analysis and mass spectrometry. The structures of these compounds were elucidated by 2D Nuclear Magnetic Resonance. One compound was identified as Pohlianin A [α (Pro-Leu-Gly-Val-Leu-Leu-Tyr)], a known cyclic peptide already isolated from XXX, and one novel which was named jatrophidin I [α (Leu-Leu-Asn-Leu-Trp-Cly-Pro-Gly)]. Linear and cyclic analogues of these peptides were obtained through solid phase synthesis methodology by using of Fmoc/tBu reagents. The linear peptides as well as synthetic cyclic peptides were submitted to several biological assays. Finally, the cyclopeptidic profile of *Jatropha curcas* and *gossypifolia* was evaluated. The results showed a continuing production of these compounds in both species all over the year. These results can be relevant for further chemotaxonomy and phylogeny studies of *Jatropha* species that occur in Latin America, and in special Brazil. Previously, all cyclic peptide in the literature search were isolated from African and Asian *Jatropha* species, and our results can be useful to map the chemical composition of other Brazilian *Jatropha* species.

Keywords: *cyclic peptides*, *Jatropha curcas* L., *Jatropha gossypifolia*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Classificação dos peptídeos cíclicos isolados de plantas (ZHOU; TAN, 2005).</i>	22
Figura 2. <i>Peptídeos cíclicos ciclizados via cabeça-cauda pertencentes à classe dos homociclopeptídeos. À esquerda, um peptídeo cíclico do tipo ciclotídeo com sua principal característica estrutural, o cyclic cystine knot (em amarelo), e à direita um peptídeo cíclico do tipo euciclopeptídeo (à direita), neste caso com cadeia de 7 resíduos de aminoácidos.</i>	24
Figura 3(a) <i>Peptídeos cíclicos vegetais isolados na década de 90; (b) Peptídeos cíclicos vegetais isolados entre os anos de 2005 a 2008.</i>	25
Figura 4. <i>Síntese de peptídeo cíclico utilizando a técnica de contração de anel.</i>	30
Figura 5. <i>Três possíveis posições para a ciclização do precursor linear da dendroamida A, e conformações mais estáveis dos 3 precursores para que a ciclização ocorra de maneira efetiva.</i>	31
Figura 6. <i>Seqüência peptídica (cores) indicando quais porções são essenciais para a atividade, detectadas mediante síntese de diferentes análogos e posteriores testes de relação estrutura-atividade (GEORGE et al., 2007).</i>	32
Figura 7. <i>Fotos da espécie Jatropha curcas L. cultivada no Instituto de Química UNESP-Araraquara.</i>	35
Figura 8. <i>Fotos da espécie Jatropha gossypifolia cultivada no Instituto de Química UNESP Araraquara.</i>	36
Figura 9. <i>Representação do ABTS.</i>	48
Figura 10. <i>DPPH radical (à esquerda) e reduzido (à direita).</i>	49
Figura 11. <i>Revelação clorox, mostrando resultado positivo para o padrão peptídico (A), e para a fração acetato de etila resultante da partição do látex (B).</i> ...	53
Figura 12. <i>Cromatograma da fração fr B obtida após clean up, os picos são referentes aos dois materiais subseqüentemente purificados.</i>	54
Figura 13. <i>Perfil cromatográfico da amostra após clean up, da extração do látex dos pecíolos das folhas.</i>	55

Figura 14. <i>Peptídeos puros isolados de Jatropha curcas L. Peptídeo A (amarelo); peptídeo B(rox)</i>	56
Figura 15. <i>Análise de aminoácidos dos peptídeos A(à esquerda) e B (à direita)</i>	57
Figura 16. <i>Composição de aminoácidos e espectro de massas dos peptídeos isolados de Jatropha curcas L</i>	58
Figura 17. <i>Seqüenciamento do peptídeo B por espectrometria de massas</i>	59
Figura 18. <i>Estrutura do peptídeo cíclico Polianina A, seqüência de aminoácidos em duas e três dimensões</i>	60
Figura 19. <i>Espectro TOCSY 2D, mostrando a identificação de cada aminoácido na região NH</i>	61
Figura 20. <i>Espectro TOCSY 2D mostrando a identificação de cada aminoácido na região correspondente aos H alifáticos</i>	61
Figura 21. <i>Espectro TOCSY 2D mostrando os sinais referentes ao resíduo de prolina</i>	62
Figura 22. <i>Espectro TOCSY 2D mostrando os sinais referentes ao resíduo de prolina da Polianina A (GUETTE, et al., 1999)</i>	62
Figura 23. <i>Seqüenciamento do peptídeo Polianina A pelo espectro de NOESY 2D</i>	64
Figura 24. <i>Correlação do hidrogênio α da prolina com o hidrogênio do αH i-1 (tirosina)</i>	64
Figura 25. <i>Peptídeo Polianina A com correlações $NH_i-\alpha H_{i-1}$</i>	65
Figura 26. <i>Espectro TOCSY 2D, mostrando a identificação de cada aminoácido na região NH</i>	66
Figura 27. <i>Espectro TOCSY 2D mostrando os sinais referentes ao resíduo de prolina</i>	67
Figura 28. <i>Seqüenciamento do peptídeo 4a pelo espectro de NOESY 2D</i>	69
Figura 29. <i>Espectro de NOESY mostrando as correlações que caracterizam a prolina da conformação trans</i>	69

Figura 30. Seqüenciamento do peptídeo 4a por NOESY 2D utilizando alguns sinais diferentes do primeiro sequenciamento.	70
Figura 31. Espectro de NOESY mostrando uma das correlações que caracterizam a prolina da conformação cis.	70
Figura 32 . Peptídeo A com correlações $NH_i-\alpha H_{i-1}$	71
Figura 33. Estrutura do peptídeo cíclico Jatroidina I, seqüência de aminoácidos em duas e três dimensões.	72
Figura 34. A- Sobreposição de 10 conformações do peptídeo Jatroidina I, em 2 orientações diferentes, contendo as violações mais baixas das restrições H-H, obtidas do SA/MD. B- Confôrmeros cis e trans de Jatroidina I.	73
Figura 35. Esquema simplificado da obtenção de uma resina Fmoc-Gly-Wang	74
Figura 36. Clivagem do grupo Fmoc por piperidina (que ocorre ao final de cada reação de acoplamento), e locais aonde a clivagem ácida ocorre após o término da seqüência. Essas reações são realizadas separadamente.	75
Figura 37. Esquema simplificado da síntese peptídica em fase sólida. A cadeia linear é sintetizada sob o suporte sólido através de reações de acoplamento e desproteção. Ao final a cadeia linear é clivada da resina e posteriormente submetida à reação de ciclização da cadeia.	75
Figura 38. Protocolo de síntese em fase sólida empregado.	76
Figura 39. Cadeia peptídica linear (verde), e após a ciclização (vermelho).	78
Figura 40. Análogo sintético da Jatroidina I.	78
Figura 41. Perfil cromatográfico da Jatroidina I com D-aminoácidos linear (verde) e cíclica (vermelho).	79
Figura 42. Perfil cromatográfico do peptídeo D-polianina A bruto.	80
Figura 43. Perfil cromatográfico do peptídeo D-polianina A puro.	81
Figura 44. Estrutura do peptídeo pohlianina A ($C_{39}H_{61}N_7O_8$).	83
Figura 45. Variações do espectro de UV da hemina em presença de diferentes concentrações de cloroquina (a) e do peptídeo (b).	84

Figura 46. Resultado do teste de inibição de DNA-girase. Poços: 1 (-)girase; 2 (+)girase 1U; Jatrof. – Peptídeo Jatrofidina I; CBC – Ciclogossina B cíclico.....	85
Figura 47. Atividade antioxidante do padrão rutina com ABTS.....	86
Figura 48. Atividade antioxidante das amostras testadas com ABTS: SPL1 – WA0717; SPL2 – Polianina A; SPL3 – D-polianina A; SPL4 – D-polianina A linear ...	86
Figura 49. Atividade antioxidante do padrão rutina com DPPH.....	87
Figura 50. Atividade antioxidante das amostras testadas com DPPH: SPL1 – WA0717; SPL2 – Polianina A; SPL3 – D-Polianina A; SPL4 – D-Polianina A linear	87
Figura 51. (a) Cromatograma do extrato da partição do látex com acetato de etila mostrando a detecção dos peptídeos Jatrofidina I e Polianina A e verificação da pureza dos picos; (b) Espectro de absorção UV.....	89
Figura 52. Cromatogramas das diferentes concentrações do peptídeo Polianina A realizadas em triplicata em ordem crescente de concentração. a – 0,005; b – 0,015; c – 0,030; d – 0,0625; e – 0,125; f – 0,25 mg/mL.....	91
Figura 53. Gráfico da curva de calibração de diferentes concentrações de Polianina A.....	92
Figura 54. Cromatogramas das diferentes concentrações do peptídeo Jatrofidina I realizadas em triplicata em ordem crescente de concentração. a – 0,005; b – 0,015; c – 0,030; d – 0,0625; e – 0,125; f – 0,25 mg/mL.....	94
Figura 55. Gráfico da curva de calibração de diferentes concentrações de Jatrofidina I.....	94
Figura 56. Cromatograma do padrão Polianina A na concentração de 0,005mg/mL.....	96
Figura 57. Cromatograma do padrão Jatrofidina I na concentração de 0,005mg/mL.....	97
Figura 58. Cromatogramas obtidos com concentração 0,25mg/mL.....	99
Figura 59. Cromatogramas obtidos com concentração 0,50mg/mL.....	100
Figura 60. Cromatogramas obtidos com concentração 1,0 mg/mL.....	101

Figura 61. Comparação dos perfis cromatográficos em coluna Phenomenex C-18 – Júpiter 5 μ C-18 300A (rosa) e Coluna C-18 – Shimadzu Shim-pack CLC-ODS(M) (preto).....	106
Figura 62. Comparação dos perfis cromatográficos em coluna Phenomenex C-18 – Júpiter 5 μ C-18 300A (rosa) e Coluna C-18 – Supelco, Supelcosil LC-18(preto).....	106
Figura 63. Comparação dos perfis cromatográficos em coluna Phenomenex C-18 – Júpiter 5 μ C-18 300A (rosa) e Coluna C-18 – Gemini C-18 – Phenomenex (preto).....	107
Figura 64. Cromatograma da análise com fase móvel tamponada.	109
Figura 65. Cromatograma da análise com fluxo 0,8 mL/min.	110
Figura 66. Cromatograma da análise com fluxo 1,0 mL/min.	110
Figura 67. Cromatograma da análise com fluxo 1,2 mL/min.	111
Figura 68. Variação da concentração de Polianina A na <i>Jatropha curcas</i> L. cultivada no Instituto de Química – UNESP.	113
Figura 69. Variação da concentração de Polianina A na <i>Jatropha curcas</i> L. cultivada em um bairro próximo ao Instituto de Química.....	113
Figura 70. Variação da concentração de Polianina A na <i>Jatropha curcas</i> L. cultivada em um bairro próximo ao Instituto de Química.....	114
Figura 71. Variação da concentração de Jatrofídina I na <i>Jatropha curcas</i> L. cultivada no Instituto de Química – UNESP.	114
Figura 72. Variação da concentração de Jatrofídina I na <i>Jatropha curcas</i> L. cultivada em um bairro próximo ao Instituto de Química.....	115
Figura 73. Variação da concentração de Jatrofídina I na <i>Jatropha curcas</i> L. cultivada em um bairro próximo ao Instituto de Química.....	115
Figura 74. Perfil cromatográfico do extrato de <i>Jatropha gossypifolia</i>	116

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. <i>Peptídeos cíclicos isolados de plantas e suas atividades</i>	28
Quadro 2. <i>Seqüências peptídicas com proteção patentária</i>	29
Quadro 3. <i>Extrações realizadas do látex do caule <i>Jatropha curcas</i> L., de janeiro de 2007 a março de 2008</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Dados do espectro de ^1H	63
Tabela 2. Dados do espectro de ^1H	68
Tabela 3. Inibição das enzimas pepsina e subtilisina	82
Tabela 4. Valores de CIM* para os peptídeos, testados contra diferentes espécies de fungos.	84
Tabela 5. Tratamento estatístico das áreas obtidas das diferentes concentrações.	92
Tabela 6. Tratamento estatístico das áreas obtidas das diferentes concentrações. .	94
Tabela 7. Resultados do limite de detecção - Polianina A	96
Tabela 8. Resultados do limite de detecção – Jatroidina I	97
Tabela 9. Resultados do limite de quantificação – Polianina A.	98
Tabela 10. Resultados do limite de quantificação – Jatroidina I	98
Tabela 11. Tratamento estatístico dos dados obtidos para precisão– Polianina A	101
Tabela 12. Tratamento estatístico dos dados obtidos precisão – Jatroidina I	102
Tabela 13. Tratamento dos dados obtidos das análises de fortificação de extratos de <i>Jatropha curcas</i> L. – Polianina A.	103

Tabela 14. Tratamento dos dados obtidos das análises de fortificação de extratos de <i>Jatropha curcas</i> L. – Jatroidina I	104
Tabela 15. Valores obtidos com coluna Júpiter	106
Tabela 16. Resultados experimentais quali e quantitativos da análise de robustez em diferentes colunas – Polianina A.....	107
Tabela 17. Resultados experimentais quali e quantitativos da análise de robustez em diferentes colunas – Jatroidina I	108
Tabela 18. Resultados quali e quantitativos referentes à análise de robustez variando o pH da fase móvel – Jatroidina I	109
Tabela 19. Resultados quali e quantitativos referentes à análise de robustez variando o pH da fase móvel – Polianina A.....	109
Tabela 20. Resultados da variação do tempo de retenção, área e concentração do peptídeo Jatroidina I variando-se a fluxo da fase móvel.	111
Tabela 21. Resultados da variação do tempo de retenção, área e concentração do peptídeo Polianina A variando-se a fluxo da fase móvel.	112

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS - ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)
CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
DAD – *Diode Array Detector*
DIC - *N, N*- diisopropilcarbodiimida
DIEA - *N*- etildiisopropilamina
DMF - Dimetilformamida
DMSO-*d*6 – Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH - 1,1 difenil -2-picril-hidrazila
ESI – *Electrospray ionization*
Fmoc - 9-fluorenilmetiloxicarbonila
HBTU - Fosfato de hexafluor 2-(1H- benzotriazol-1-il)-1,1,3,3- tetrametilurônio
HOBT - *N*- hidroxibenzotriazol
HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*
HRCB – *Herbarium Rioclarense*
HRMS – *High Resolution Mass Spectrometry*
MS – *Mass spectrometry*
NOESY – *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
ODS – Octadecilsilano (C₁₈)
OPA – *orto*-ftalaldeído
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
SA/MD - *Simulated Annealing/Molecular Dynamics*
TFA – Ácido Trifluoroacético
TOCSY – *Total Correlation Spectroscopy*
UV - Ultravioleta

ABREVIATURA DOS AMINOÁCIDOS-PADRÃO DAS PROTEÍNAS

Nome	Símbolos		Aminoácido		Resíduo (-H ₂ O)	
	3 letras	1 letra	Fórmula	M.M.(g/mol)	Fórmula	M.M. (g/mol)
<i>Com cadeia lateral apolar</i>						
Glicina	Gly	G	C ₂ H ₅ NO ₂	75,068	C ₂ H ₃ NO	57,052
Alanina	Ala	A	C ₃ H ₇ NO ₂	89,095	C ₃ H ₅ NO	71,079
Valina	Val	V	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117,149	C ₅ H ₉ NO	99,134
Leucina	Leu	L	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,176	C ₆ H ₁₁ NO	113,161
Isoleucina	Ile	I	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,176	C ₆ H ₁₁ NO	113,161
Metionina	Met	M	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	149,213	C ₅ H ₉ NOS	131,198
Prolina	Pro	P	C ₅ H ₉ NO ₂	115,133	C ₅ H ₇ NO	97,118
Fenilalanina	Phe	F	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165,194	C ₉ H ₉ NO	147,178
Triptofano	Trp	W	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204,230	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O	186,215
<i>Com cadeia lateral neutra</i>						
Serina	Ser	S	C ₃ H ₇ NO ₃	105,094	C ₃ H ₅ NO ₂	87,079
Treonina	Thr	T	C ₄ H ₉ NO ₃	119,121	C ₄ H ₇ NO ₂	101,106
Asparagina	Asn	N	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132,120	C ₄ H ₆ N ₂ O ₂	114,104
Glutamina	Gln	Q	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146,147	C ₅ H ₈ N ₂ O ₂	128,132
Tirosina	Tyr	Y	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181,193	C ₉ H ₉ NO ₂	163,178
Cisteína	Cys	C	C ₃ H ₇ NO ₂ S	121,159	C ₃ H ₅ NOS	103,145
<i>Com cadeia lateral carregada</i>						
Lisina	Lys	K	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146,191	C ₆ H ₁₂ N ₂ O	128,175
Arginina	Arg	R	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174,204	C ₆ H ₁₂ N ₄ O	156,189
Histidina	His	H	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155,158	C ₆ H ₇ N ₃ O	137,142
Ácido Aspártico	Asp	D	C ₄ H ₇ NO ₄	133,105	C ₄ H ₅ NO ₃	115,089
Ácido Glutâmico	Glu	E	C ₅ H ₉ NO ₄	147,132	C ₄ H ₇ NO ₃	129,116

- M.M. – massa molecular

ÍNDICE

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1 PEPTÍDEOS CÍCLICOS EM PLANTAS: O QUE HÁ DE NOVO?	23
2.2 ALGUMAS CONSIDERAÇÕES SOBRE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS PEPTÍDEOS CÍCLICOS.....	26
2.3 ESTUDOS CONFORMACIONAIS.....	29
2.4 ESTUDOS DE SÍNTESE	30
3. OBJETIVOS	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 ATUALIZAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS.....	34
4.2 MATERIAIS VEGETAIS.....	34
4.2.1 <i>Jatropha curcas</i> L.	35
4.2.2 <i>Jatropha gossypifolia</i>	35
4.3 CROMATOGRAFIA.....	36
4.3.1 <i>Cromatografia em camada delgada comparativa</i>	36
4.3.2 <i>Cromatografia de permeação em gel</i>	37
4.3.3 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)</i>	38
4.3.3.1 HPLC analítico para análise do perfil peptídico das frações e das respectivas purificações.....	39
4.3.3.2 HPLC semi-preparativo	39
4.3.3.3 HPLC analítico para análise qualitativa e quantitativa	39
4.3.3.4 Análise de aminoácidos por cromatografia de troca iônica.....	39
4.4 ESPECTROSCOPIA.....	41
4.4.1 <i>Ressonância Magnética Nuclear</i>	41
4.4.2 <i>Espectrometria de Massas</i>	41
4.5 ESTUDOS DE DINÂMICA MOLECULAR	41
4.6 SÍNTESE EM FASE SÓLIDA DE PEPTÍDEOS	42
4.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	43
4.7.1 <i>Ensaio fluorimétrico de inibição de proteases</i>	43
4.7.1.1 Reagentes	43
4.7.1.2 Protocolo experimental.....	43
4.7.2 <i>Avaliação da atividade antifúngica</i>	44
4.7.3 <i>Avaliação da atividade antimalárica</i>	45
4.7.4 <i>Ensaio de Inibição da Atividade da DNA girase</i>	47
4.7.5 <i>Avaliação da atividade antioxidante</i>	48
4.7.5.1 ABTS (ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)).....	48
4.7.5.2 DPPH (1,1 difenil -2-picril-hidrazila).....	48
4.8 ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DOS PEPTÍDEOS DE <i>JATROPHA CURCAS</i> L. E ANÁLISE QUALITATIVA DOS PEPTÍDEOS DE <i>JATROPHA GOSSYPIFOLIA</i>	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	52
5.1 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE PEPTÍDEOS NOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE <i>JATROPHA CURCAS</i> L.	52
5.2 EXTRAÇÃO DE PEPTÍDEOS DO LÁTEX DE <i>JATROPHA CURCAS</i> L.....	52
5.2.1 <i>Cromatografia de permeação em gel</i>	53
5.2.2 <i>Clean up da fração peptídica e análise em gradiente exploratório</i>	53
5.2.3 <i>Purificação em HPLC</i>	55
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS CÍCLICOS ISOLADOS DE <i>JATROPHA CURCAS</i> L.....	57

5.3.1 Hidrólise ácida e análise de aminoácidos	57
5.3.2 Espectrometria de massas.....	58
5.4 SEQÜENCIAMENTO DOS PEPTÍDEOS CÍCLICOS ISOLADOS	59
5.4.1 Peptídeo B.....	59
5.4.1.1 Espectrometria de massas.....	59
5.4.1.2 Ressonância Magnética Nuclear	60
5.4.2 Peptídeo A.....	66
5.4.2.1 Ressonância Magnética Nuclear	66
5.5 ESTUDO DE DINÂMICA MOLECULAR	72
5.6 SÍNTESE PEPTÍDICA EM FASE SÓLIDA.....	73
5.6.1 Síntese do peptídeo Jatroidina I	76
5.6.2 Síntese do peptídeo Jatroidina I com D-aminoácidos	79
5.6.3 Síntese do peptídeo Polianina A com D-aminoácidos	80
5.7 TESTES BIOLÓGICOS.....	81
5.7.1 Ensaio de inibição fluorimétrica de proteases.....	81
5.7.1.1 Ensaio de inibição da subtilisina e pepsina	81
5.7.2 Avaliação da atividade antimalárica	83
5.7.3 Avaliação da atividade antifúngica	84
5.7.4 Ensaio de Inibição da Atividade da DNA girase	85
5.7.5 Avaliação da atividade antioxidante.....	86
5.7.5.1 ABTS	86
5.7.5.2 DPPH	87
5.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DO PERFIL CICLOPEPTÍDICO DA ESPÉCIE <i>JATROPHA CURCAS</i> L.	88
5.8.1 Preparação da amostra para análise	88
5.8.2 Especificidade e seletividade	88
5.8.3 Linearidade e Intervalo.....	90
5.8.3.1 Polianina A – curva de calibração e tratamento estatístico.....	90
5.8.3.2 Jatroidina I – curva de calibração e tratamento estatístico	93
5.8.4 Limite de detecção	95
5.8.4.1 Polianina A	95
5.8.4.2 Jatroidina I.....	97
5.8.5 Limite de Quantificação.....	97
5.8.5.1 Polianina A	98
5.8.5.2 Jatroidina I.....	98
5.8.6 Precisão	98
5.8.6.1 Repetibilidade	98
5.8.7 Exatidão	102
5.8.7.1 Polianina A	102
5.8.7.2 Jatroidina I.....	104
5.8.8 Robustez.....	105
5.8.8.1 Variação das colunas.....	105
5.8.8.2 Variação do pH da fase móvel	108
5.8.8.3 Variação do fluxo da fase móvel	110
5.8.9. Análise quantitativa – resultados.....	112
5.9 ANÁLISE QUALITATIVA DO PERFIL CICLOPEPTÍDICO DE <i>JATROPHA GOSSYPIFOLIA</i>	116
6. CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS	118

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a procura por novas moléculas potencialmente ativas, principalmente oriundas de produtos naturais, tem sido focada na busca de macromoléculas. Nesse contexto, os peptídeos cíclicos, isolados de poucos táxons de plantas superiores, são de interesse da indústria farmacêutica, devido ao amplo espectro de atividades biológicas (MORITA et al., 1997) e à possibilidade de serem protótipos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (HORSTEN, S.F.A.J., 1995).

Peptídeos cíclicos isolados de vegetais superiores são ciclos contendo de 2-37 aminoácidos, sendo a maioria proteinogênicos (HORSTEN S.F.A.J, 1995). São encontrados principalmente em espécies das famílias *Caryophyllaceae*, *Rubiaceae* e *Euphorbiaceae* e apresentam atividades biológicas diversas (JOHANSSON S., 2001). Dentre estes podemos citar alguns peptídeos do tipo *Caryophyllaceae*, que são homomonociclopeptídeos contendo de 2 a 12 aminoácidos e que possuem atividade citotóxica, antiplaquetária, antimalárica, imunomodulatória, imunossupressiva, antagonista de Ca^{+2} , inibidora de ciclooxigenase e tirosinase (ZHOU; TAN, 2005).

O látex das plantas do gênero *Jatropha* (família *Euphorbiaceae*) tem se destacado como uma fonte de peptídeos cíclicos bioativos. A espécie *Jatropha multifida* proporcionou o isolamento dos primeiros 2 peptídeos cíclicos descritos na literatura para este gênero, chamados de labaditina e bioboleina, ambas as seqüências com atividade imunomodulatória. Utilizando a metodologia empregada para a *Jatropha multifida*, outros peptídeos cíclicos foram isolados de um grande número de plantas, como por exemplo, a curcaciclina A da *Jatropha curcas* L. com atividade imunossupressiva, e as ciclogossinas A e B, provenientes da *Jatropha gossypifolia* (BARAGUEY et al., 1998).

A primeira classificação destas substâncias foi feita por Zhou e Tan em 2000, pois até então a literatura tratava esses compostos como peptídeos alcaloídicos, depsiciclopeptídeos e ciclopeptídeos. Atualmente, esta classificação foi atualizada, sendo as cadeias peptídicas cíclicas divididas em 2 classes, 5 subclasses e 8 tipos, de acordo com seus esqueletos estruturais (**Figura 1**).

Apesar de todas as atividades biológicas descritas para os peptídeos cíclicos, o seu modo de ação ainda é pouco conhecido. Desta forma, além da procura por novas moléculas, ênfase tem sido dada à elucidação do esqueleto estrutural e sua relação com a atividade biológica.

Os dados obtidos, até o momento, destacam a restrição estrutural desses peptídeos, que são descritos como importantes para o seu modo de ação, mas até agora não avaliados (KARLE, et. al., 2007). Essa característica estrutural favorece as interações ligante-receptor devido à pouca mobilidade, e aumenta a estabilidade dos ciclopeptídeos frente à degradação enzimática (HORSTEN, 1995). Essas particularidades não são observadas em peptídeos lineares, que apresentam livre rotação em torno da ligação amida e várias conformações, além de baixa estabilidade química (CRAIK, 2001). Os fármacos desenvolvidos a partir de peptídeos lineares requerem inibidores de proteases em suas formulações, ou modificações em sua estrutura primária a fim de não serem degradados rapidamente (REDDY et al., 2004). Como resultado dessa nova abordagem, que relaciona a estrutura com a atividade, espera-se o desenvolvimento de novos fármacos através do desenho racional de novas moléculas.

O desenvolvimento de novas moléculas necessita em um determinado momento, tanto da síntese da molécula natural como de análogos. Dentre os métodos utilizados, o mais empregado é o da síntese peptídica em fase sólida, já utilizado para a síntese de vários peptídeos cíclicos de plantas, como é o caso das segetalinas (DAHIYA et al., 2007), dendroamidas, (MATSUMOTO et al., 2007), cherimolaciclopeptideo G (DAHIYA R., 2008), interregimidas (MONGKOLVISUT et al., 2006), chevalierinas (BARAGUEY et al., 1998), entre outros.

A partir do exposto, é evidente a importância tanto do isolamento de novos ciclopeptídeos de espécies vegetais, como da relação estrutura/função destas moléculas. Os dados obtidos através destes estudos podem orientar no desenvolvimento de novos fármacos.

Desta forma neste trabalho foram isolados 2 peptídeos cíclicos de espécies vegetais, caracterizados, sintetizados quimicamente e avaliados biologicamente. Para complementar este estudo, alguns análogos também foram obtidos, visando avaliar a importância do ciclo na atividade destes peptídeos.

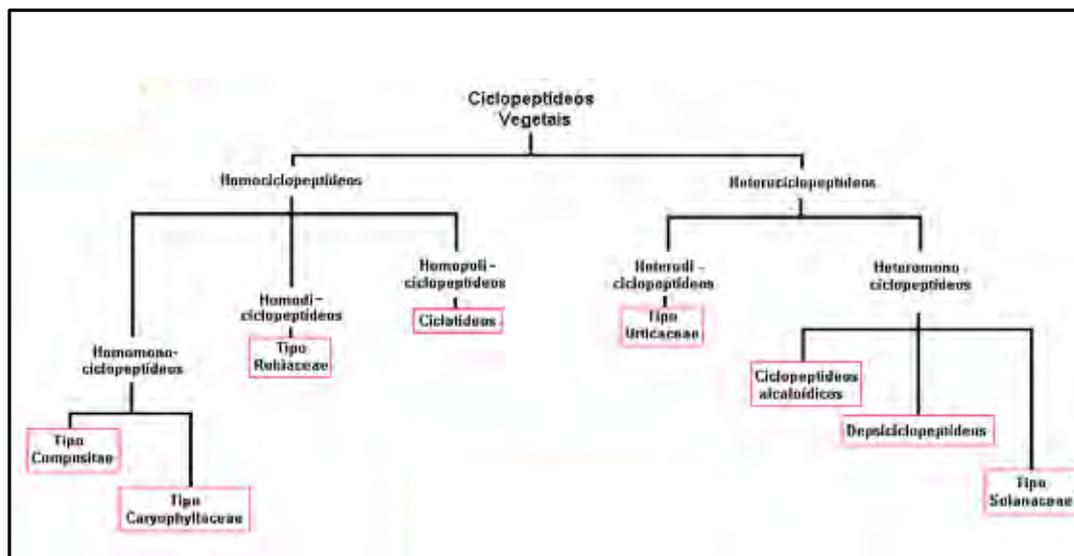


Figura 1. Classificação dos peptídeos cíclicos isolados de plantas (ZHOU; TAN, 2005).

2. REVISÃO DA LITERATURA

A década de 90 foi marcada pelo isolamento, elucidação estrutural e atividades biológicas dos peptídeos cíclicos, entretanto, no século XXI novas perguntas surgiram sobre os aspectos conformacionais, sintéticos, e biológicos desta classe. Assim, na era pós genômica e em resposta a estas indagações observa-se que o estudo dessas macromoléculas está tomando direções novas com foco no desenvolvimento de novos fármacos.

2.1 Peptídeos Cíclicos em Plantas: O que há de novo?

Por ser uma classe de estruturas relativamente nova na literatura, os ciclopeptídeos ainda não possuem uma nomenclatura esclarecida. Por este motivo, são propostos constantemente novos termos para auxiliar a sua descrição estrutural. O termo ciclopeptídeo abrange todos os peptídeos cíclicos vegetais, contudo, em se tratando de peptídeos ciclizados via cabeça-cauda, e ainda contendo apenas um ciclo, pode-se destacar dois tipos comumente encontrados em espécies vegetais: os ciclotídeos e os peptídeos de pequenos ciclos.

Os ciclotídeos são peptídeos cíclicos cabeça-cauda que possuem em média 30 resíduos de aminoácidos, além de um arranjo característico denominado CCK (Cyclic Cystine Knot), um anel formado por 3 pontes dissulfeto, que confere propriedades interessantes à esses compostos. Esses peptídeos, segundo Zhou e Tan, são da classe dos homociclopeptídeos, e da subclasse homopolíciclopeptídeos (**Figura 1**).

Os pequenos peptídeos cíclicos, segundo essa mesma classificação, pertencem também à classe dos homociclopeptídeos, porém, são da subclasse homomonociclopeptídeos, e dentro dessa subclasse são inseridos no Tipo Caryophyllaceae (**Figura 1**). Esta classificação, no entanto, gera equívocos, pois os peptídeos cíclicos de 2 a 12 resíduos de aminoácidos não ocorrem somente na família Caryophyllaceae. Desta forma, Picchi, observando a inadequação de termos, propôs, em 2008, a terminologia euciclopeptídeos para descrever todos que contém cadeias de ciclização cabeça-cauda, englobando seqüências com 2 - 12 resíduos de aminoácidos.

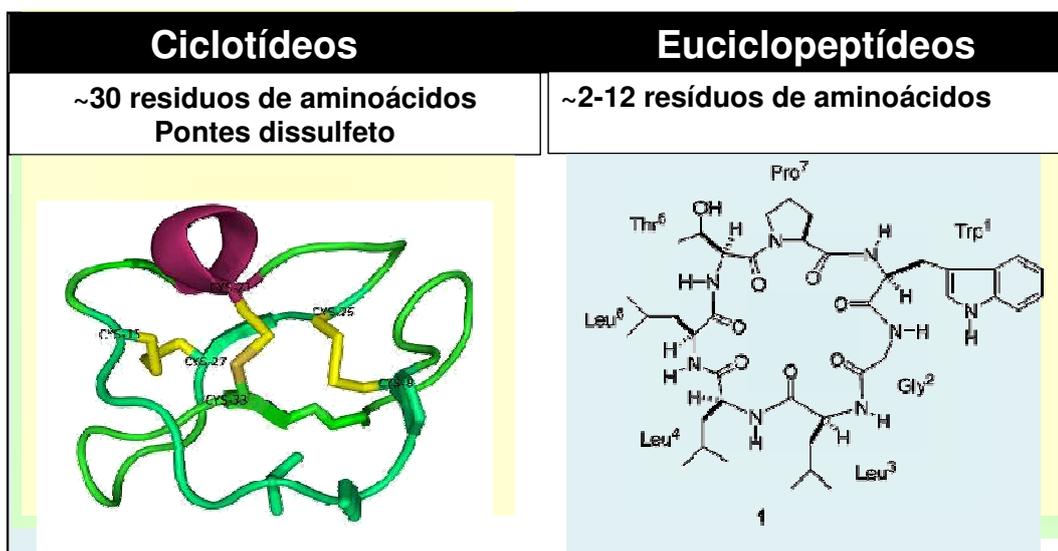


Figura 2. Peptídeos cíclicos ciclizados via cabeça-cauda pertencentes à classe dos homociclopeptídeos. À esquerda, um peptídeo cíclico do tipo ciclotídeo com sua principal característica estrutural, o cyclic cystine knot (em amarelo), e à direita um peptídeo cíclico do tipo euciclopeptídeo, neste caso com cadeia de 7 resíduos de aminoácidos.

Dentre as famílias que produzem peptídeos cíclicos, os euciclopeptídeos também ocorrem em Euphorbiaceae (HORSTEN, S.F.A.J., 1995), Annonaceae (WELE et al., 2005a,b), Linaceae (GÓRSK et al, 2001; MORITA et al, 1999; BENEDETTI; PEDONE, 2005;). Desde que o primeiro exemplar desta classe, ciclinopeptídeo A, de potente atividade imunossupressiva (GAYMES et al., 1997) foi isolado da espécie *Linum usitatissimum* em 1959, mais de 168 peptídeos de espécies de plantas superiores foram descritos até o ano de 2005 (ZHOU; TAN, 2005).

No período compreendido entre os anos de 2005 a 2008, novos peptídeos de fontes naturais foram isolados, tais como cariofilusina A (LI et al., 2008), ciclomontaninas A-D (CHUANG et al, 2008), querimolaciclopeptídeo E e F (WÉLÉ et al, 2005b), interregimidas (MONGKOLVISUT et al., 2006), e longicalicinina (HSIEH et al., 2005, evidenciando a importância desta classe de produtos naturais.

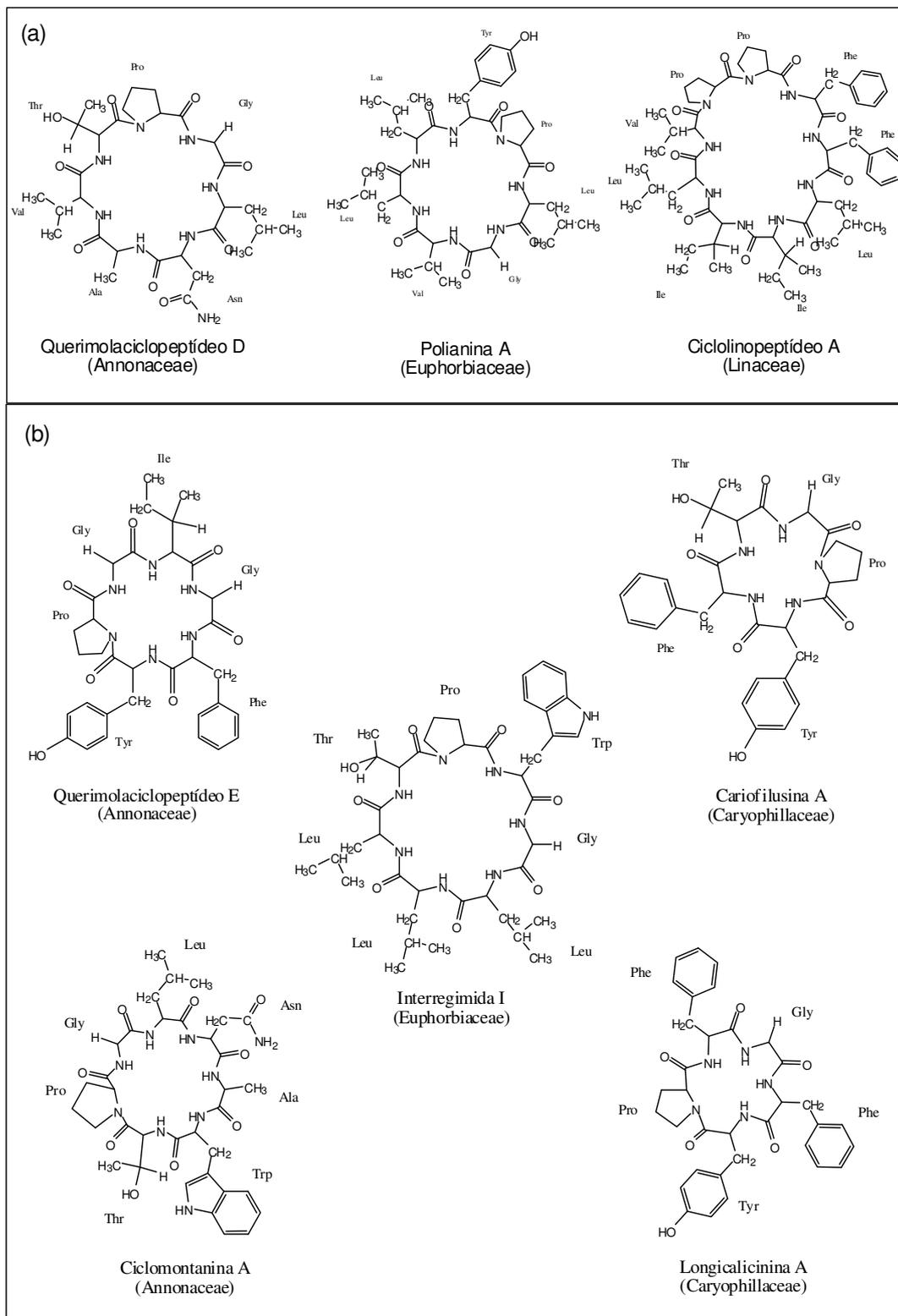


Figura 3 (a) Peptídeos cíclicos vegetais isolados na década de 90; (b) Peptídeos cíclicos vegetais isolados entre os anos de 2005 a 2008.

2.2 Algumas considerações sobre atividades biológicas dos peptídeos cíclicos

Poucos autores discutem os aspectos moleculares das interações dos peptídeos cíclicos frente ao seu alvo. Entretanto, este tipo de investigação vem crescendo nos últimos anos.

Vários euciclopeptídeos apresentam uma expressiva variedade de atividades farmacológicas, e alguns resultados interessantes estão descritos sendo possível traçar um perfil do potencial desses compostos para o desenvolvimento de novos fármacos. Vários euciclopeptídeos apresentam ação citotóxica para linhagens de células tumorais, como por exemplo, o glaucaciclopeptídeo A que inibiu o crescimento da cultura de células tumorais (WÉLE et al., 2005b). Outros como querimolaciclopeptídeo A e B (WÉLE et al., 2005a), diantina E (HSIEH et al, 2004) e segetalina C (MORITA et al., 1995) também apresentaram ação citotóxica bastante relevante.

Os peptídeos isolados de espécies de *Jatropha* (Euphorbiaceae) se destacam pela atividade anti-proliferativa nas cepas do parasita *Plasmodium falciparum*. Entre as substâncias mais ativas vale mencionar quevalierina A (BARAGUEY et al., 1998), mahafaciclina A (BARAGUEY et al., 2000) e B (BARAGUEY et al., 2001) e polianinas A, B e C (AUVIN-GUETTE et al., 1999). Além das atividades citotóxica e antimalárica, os euciclopeptídeos exibem atividade sobre proteases (MORITA et al., 1994) e cicloxigenase (MORITA et al, 1996, 1997), também são imunomoduladores (van-den-BERG et al, 1995), imunossupressores (GAYMES et al, 1997) e miméticos de hormônios estrogênicos (YUN et al, 1997) (**Quadro 1**).

Peptídeo	Seqüência	Propriedade Farmacológica	Referência
Astinas	c(ProCl ₂ -Thr-Ser-(S)β ³ -Phe-Abu)	anticancerígena	COZZOLINO et al., 2005
Querimolaciclopeptídeo C	c(Pro-Gly-Ala-Ala-Trp-Ile-Pro)	atividade citotóxica contra células KB	WÉLE et al., 2004
Querimolaciclopeptídeo D	c(Pro-Gly-Leu-Asn-Ala-Val-Thr)	atividade citotóxica contra células KB	WÉLE et al., 2005a
Quevalierina A	c(Pro-Ile-Leu-Ala-Ile-Met-	antimalárica	BARAGUEY et al.,

	Gly-Ile)		1998
Curcaciclina A	α (Gly-Leu-Leu-Gly-Thr-Val-Leu-Leu)	imunomoduladora	VAN DEN BERG et al., 1995
Curcaciclina B	α (Leu-Gly-Ile-Leu-Gly-Ser-Pro-Ile-Leu)	aumento da atividade rotamase da ciclofilina	BARAGUEY et al., 1997
Diantina E (3)	α (Gly-Pro-Ile-Ser-Phe-Val)	citotóxica	HSIEH et al., 2004
Dicotomina F	α (Val-Leu-Pro-Ser-Val-Tyr-Pro-Tyr-Phe)	inibição de ciclooxigenase	MORITA et al., 1997a
Dicotomina G	α (Ser-Pro-Leu-Pro-Ile-Pro-Phe-Tyr)	inibição de ciclooxigenase	MORITA et al., 1997a
Dicotomina H	α (Ala-Pro-Thr-Phe-Tyr-Pro-Leu-Ile)	citotóxica	MORITA et al., 1997b
Dicotomina I	α (Val-Pro-Thr-Phe-Tyr-Pro-Leu-Ile)	citotóxica	MORITA et al., 1997b
Dicotomina J	α (Gly-Ile-Phe-Leu-Tyr-Ala)	vasodilatadora	MORITA et al., 2005
Dicotomina K	α (Tyr-Tyr-Val-Ile-Pro-Ala-Val-Ile-Pro)	vasodilatadora	MORITA et al., 2005
Gipsofina A	α (Gly-Phe-Asp-Phe-Ile-Leu-Pro)	inibidor de α -glicosidase	LUO et al., 2007
Glaucaciclopeptídeo A	α (Pro-Gly-Ala-Gly-Val-Val-Leu)	citotóxica	WÉLE et al., 2005b
Integerrimida A	α (Pro-Trp-Gly-Leu-Leu-Leu-Thr)	citotóxica	MONGKOLVISUT et al., 2006
Interregimida B	α (Pro-Trp-Ala-Leu-Leu-Val-Ser)	citotóxica	MONGKOLVISUT et al., 2006
Labaditina	α (Gly-val-Trp-Thr-Val-Trp-Gly-Thr-Ile-Ala)	imunomoduladora	KOSASI et al., 1989
Longicalicinina A	α (Gly-Phe-Tyr-Pro-Phe)	citotóxica	HSIEH et al., 2005
Polianina A	α (Tyr-Pro-Leu-Gly-Val-Leu-Leu)	antimalárica	AUVIN-GUETTE et al., 1999
Polianina B	α (Pro-Leu-Gly-Leu-Leu-Leu-Tyr)	antimalárica	AUVIN-GUETTE et al., 1999
Polianina C	α (Gly-Gly-Thr-Ile-Ile-Phe-Gly-Phe)	antimalárica	AUVIN-GUETTE et al., 1999
Pseudostelarina D	α (Pro-Leu-Ile-Leu-Gly-Tyr-Gly)	inibidor de tirosinase	HIMAJA et al., 1999
Segetalina G	α (Gly-Ala-Lys-Tyr-Val)	atividade estrogênica	YUN et al., 1997

Segetalina H	α (Gly-Phe-Ser-Tyr-Arg)	atividade estrogênica	YUN et al., 1997
Yunanina A	α (Gly-Gly-Pro-Phe-Pro-Gly-Tyr)	citotóxica	NAPOLITANO et al., 2003
Yunanina C	α (Tyr-Ser-Pro-Gly-Ile-Gly-Phe)	citotóxica	MORITA et al., 1996

Quadro 1. Peptídeos cíclicos isolados de plantas e suas atividades

O largo espectro de atividades desta classe é atribuído à sua estrutura molecular rígida. Acredita-se que a função biológica dos peptídeos cíclicos esteja relacionada à diminuição da flexibilidade estrutural imposta pelo anel pequeno, em muitos casos permitindo aumentar a seletividade para um dado receptor e com isso a estabilidade metabólica (GOMES et al., 2007). De fato, Bogdanowich-Knipp et al. mostraram que o peptídeo cíclico RGD (Arg-Gly-Asp) é mais estável na faixa de pH entre 3-7 que seu análogo linear. Outros estudos revelaram a perda da atividade biológica após a linearização da cadeia peptídica (MORITA et al., 1997), como as segetalinas isoladas da espécie *Vaccaria segetalis*. A atividade anticancerígena das astinas também é perdida com a quebra do ciclo peptídico (COZZOLINO et al., 2005).

A composição de aminoácidos também é considerada importante, pois modifica as características físico-químicas dos peptídeos. A tirocidina A, por exemplo, é um peptídeo cíclico antimicrobiano cuja ação antibacteriana depende de seu caráter anfipático. Deste modo, a deleção ou substituição de um aminoácido por outro pode modificar a atividade ou até mesmo neutralizá-la. O comportamento dos peptídeos frente à membranas biológicas também varia bastante. No modelo virtual exposto por Rezai, um peptídeo cíclico é permeável à membrana porque tem a propriedade de formar ligações de hidrogênio.

Assim, denota-se a importância do isolamento de novas estruturas de origem natural, bem como o estudo das já existentes, que possam servir de modelos para o desenvolvimento de novos protótipos, pois a diversidade de funções farmacológicas apresentadas por este tipo de substâncias tem sido explorada pelas indústrias farmacêuticas, fato observado com o considerável número de peptídeos cíclicos com proteção patentária (**Quadro 2**).

Peptídeo	Número da Patente	Ano	Atividade Farmacológica	Referência
Pro-His ciclodipeptídeo	1951954-A	2007	não informado	Ma et al., 2007
α [Tyr-Tyr-(D-HSer)-L-Pro-L-Val- ((2S,4S)-4-MePro)-Tyr]	2007138171-A1	2008	antibacteriano	Sivonen et al., 2007
cadeia não informada	2007072037-A1	2007	antibacteriano	Oneil D., 2007
VPAC2	2007101146-A2	2007	antidiabético, anorexígeno	Zhang; Alsina-Fernandez, 2007
α (Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Lys-Arg-Arg)n	RU2330860-C1	2008	anti-estresse	Navolotskaya E.V., 2008
Cadeia não informada	WO2008080845-A1	2008	análogo de agonista de receptor de melanocortina	Chen, L. et al, 2008

Quadro 2. Seqüências peptídicas com proteção patentária.

2.3 Estudos Conformacionais

Analisar as características do arranjo espacial dos peptídeos cíclicos é importante na investigação da relação estrutura-atividade, visto o amplo espectro de atividades biológicas envolvidas. Com isso, técnicas físico-químicas, como estudos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Dicroísmo Circular (CD) e métodos computacionais químicos, têm sido empregadas na determinação da conformação predominante das cadeias peptídicas.

Análises sobre os aspectos conformacionais dos peptídeos cíclicos demonstram em geral a presença de dobras na estrutura, estabilizadas por ligações de hidrogênio entre um grupo-amino na extremidade C-terminal e um grupo-carboxi localizado na extremidade N-terminal (JOSH; VERMA, 2007).

Neste contexto, alguns aminoácidos, como a glicina, prolina e D-aminoácidos são conhecidos como unidades indutoras de dobras das estruturas peptídicas (JEREMIC et al. , 2005), em especial o aminoácido prolina, devido à sua cadeia lateral alifática ciclizada, que o torna conformacionalmente único dentre os demais aminoácidos (MORETTO et al., 2007). Nas plantas superiores a presença de resíduos de prolina é freqüente, o que resulta na formação de dobras, freqüentemente estabilizadas por ligações de hidrogênio, reduzindo o número de conformações possíveis.

2.4 Estudos de Síntese

Os peptídeos são substâncias que podem ser obtidas sinteticamente por meio de diversas metodologias, portanto têm sido explorados no que diz respeito ao desenvolvimento de protocolos de síntese e modificações estruturais. A princípio, para peptídeos pequenos isolados de plantas superiores, a técnica mais utilizada é a síntese peptídica em fase sólida, como já descrito anteriormente, contudo, alguns estudos sobre a obtenção de seqüências peptídicas cíclicas podem ser ferramentas para o melhoramento da síntese de peptídeos de plantas.

Os euciclopeptídeos ciclizados via “cabeça-cauda”, são um tipo estrutural de interesse para a síntese química e, mesmo que a síntese de cadeias lineares ocorra facilmente, o passo chave e desafiante para sua obtenção é a reação de ciclização (RIVERA et al., 2008). A ciclização de peptídeos cíclicos pequenos é freqüentemente difícil, sendo necessária a utilização de métodos e reagentes sintéticos especiais para auxiliar na reação, como por exemplo, a introdução de aminoácidos glicina e prolina, D-aminoácidos, e aminoácidos N-alquilados que induzam uma volta na estrutura (JEREMIC et al., 2005).

Com base nessas particularidades, Horton e colaboradores sintetizaram uma série de tetrapeptídeos cíclicos após uma otimização da síntese mediante a utilização do HnB (2-hydroxy-6-nitrobenzylaldehyde) para auxiliar na ciclização, o que foi chamado de estratégia de contração de anel (**Figura 4**). (HORTON, et. al., 2008).

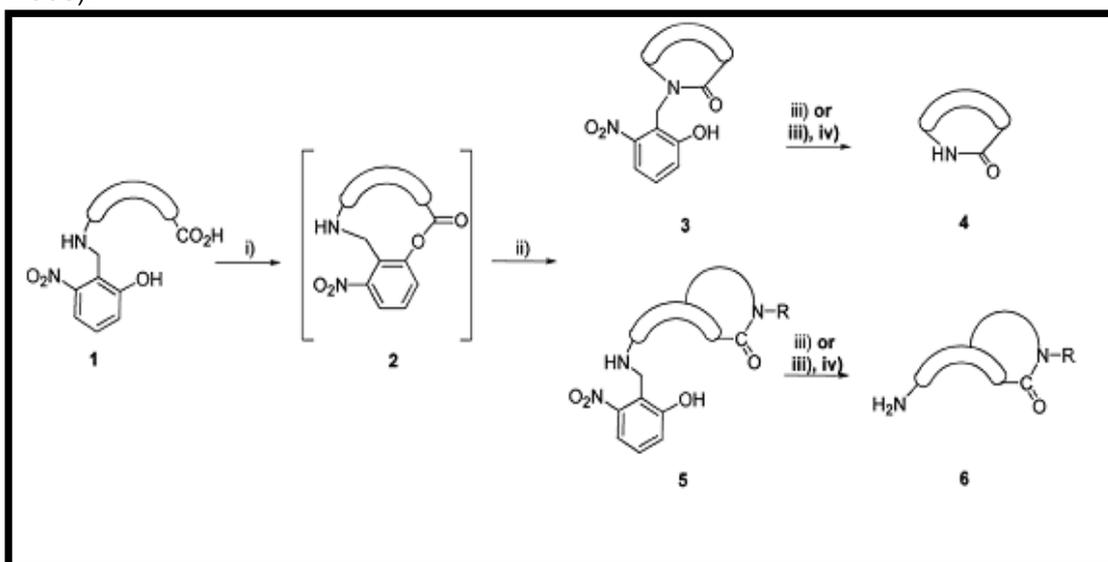


Figura 4. Síntese de peptídeo cíclico utilizando a técnica de contração de anel.

Outros dados interessantes foram apresentados para o peptídeo cíclico dendroamida A, isolado da cianobactéria *Stigonema dendroideum*. Análogos desse peptídeo foram sintetizados na forma linear e a ciclização foi feita em diferentes posições na seqüência peptídica. Como resultado, foi comprovado que pode haver na cadeia peptídica um resíduo específico para sofrer o ataque do nucleófilo que favorece a reação de ciclização cabeça cauda (MATSUMOTO et al., 2007).

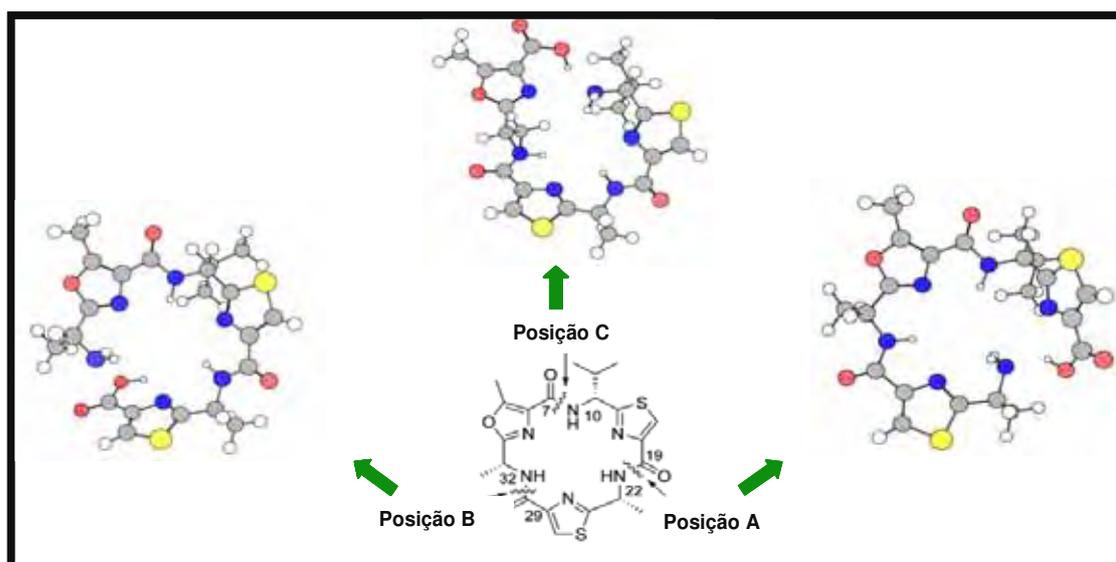


Figura 5. Três possíveis posições para a ciclização do precursor linear da dendroamida A, e conformações mais estáveis dos 3 precursores para que a ciclização ocorra de maneira efetiva.

Avanços nas técnicas sintéticas também se fazem presentes na descoberta das relações estrutura-atividade dos peptídeos cíclicos. Conhecendo-se a cadeia original e sua atividade, é possível sintetizar análogos com modificações em pontos específicos da estrutura, observando qual alteração se deseja na ligação com o receptor, e com isso indicando as porções essenciais na substância para que ela seja reativa (**Figura 6**) (GEORGE et al., 2007).

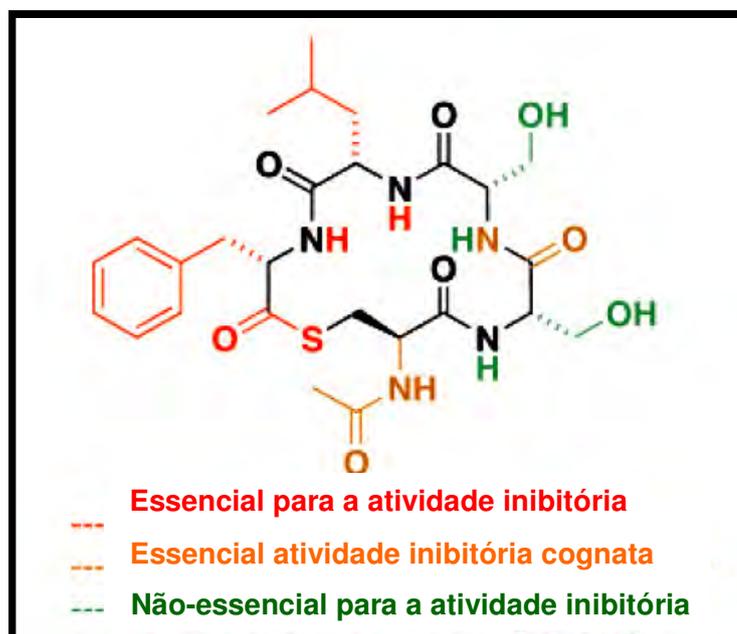


Figura 6. Seqüência peptídica (cores) indicando quais porções são essenciais para a atividade, detectadas mediante síntese de diferentes análogos e posteriores testes de relação estrutura-atividade (GEORGE et al., 2007)..

Conclui-se, diante de tantos aspectos químicos a serem analisados, que a pesquisa sobre peptídeos cíclicos é fascinante e oferece diferentes desafios para serem desvendados buscando a compreensão completa de sua estrutura e modo de ação. Ainda há diversos alvos a serem explorados, e uma infinidade de combinações que podem ser utilizadas para a construção de uma biblioteca de estruturas peptídicas. Plantas superiores podem contribuir com novos peptídeos, que podem ser potenciais protótipos para a indústria farmacêutica.

3. OBJETIVOS

Como parte do projeto temático "*Conservation and Sustainable Use of the Diversity from Cerrado and Atlantic Forest: Chemical Diversity and Prospecting for Potential Drugs Phase II*" (PROC. No. 03/02176-7) este trabalho teve como objetivos principais:

- Isolamento e caracterização de peptídeos cíclicos bioativos de *Jatropha curcas* L.
 - Avaliação mensal qualitativa e quantitativa do perfil ciclopeptídico de espécimes cultivadas de *Jatropha curcas* L.(Euphorbiaceae), e qualitativa de uma espécime cultivada de *Jatropha gossypifolia*.
 - Síntese, purificação e caracterização de análogos do peptídeo isolado, através da metodologia em fase sólida, incluindo moléculas lineares e cíclicas com ou sem D-AA.
 - Avaliação biológica dos peptídeos isolados e sintéticos, quanto à inibição de proteases e de DNA girase, atividade antimalárica, antifúngica e antioxidante.
-

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Atualizações bibliográficas

Durante o período de desenvolvimento do projeto (Processo FAPESP nº 06/58699-6) foram realizados vários levantamentos bibliográficos sobre peptídeos. De modo geral as principais fontes foram os bancos de dados disponíveis on line.

Vários tópicos relacionados aos peptídeos cíclicos foram abordados, desde novas descrições, atividades biológicas, estudos conformacionais e síntese. Por meio das informações obtidas percebe-se o aumento crescente de pesquisa com essa classe de substâncias, evidenciando a relevância do projeto desenvolvido nesta dissertação (o levantamento bibliográfico resultou em um artigo de revisão em Química Nova 2009 – no prelo).

4.2 Materiais Vegetais

As espécies selecionadas para o presente trabalho foram a *curcas* e a *gossypifolia*, da família Euphorbiaceae. O látex foi o material escolhido para o isolamento dos peptídeos devido a várias tentativas iniciais de extração destes constituintes nas folhas e caules com resultados negativos.

A técnica utilizada para a extração do material foi o gotejamento do látex mediante um corte feito no caule da planta. Após a coleta o material foi armazenado em freezer até o seu uso.

Para ambas as espécies foram preparadas exsicatas com os espécimes estudados, e os *vouchers* foram depositados no *Herbarium Rioclarense* (HRCB) do Instituto de Biociências da UNESP/ Campus Rio Claro. O material referente à espécie *Jatropha curcas* L. recebeu o número de tombo HRCB 43228 e *J. gossypifolia* L., HRCB 43.224. Os espécimes foram identificados por Douglas Gatte Picchi com base em chaves de identificação botânica, pesquisa bibliográfica e comparação com o acervo do HRCB.

4.2.1 *Jatropha curcas* L.

Inicialmente esta espécie foi selecionada por sua conhecida capacidade de produção de peptídeos de natureza cíclica, bem como pelos relatos de uso na medicina tradicional.

A primeira coleta de material foi realizada na cidade de Fortaleza, no Ceará, em 27 e 28 de abril de 2005, para o início do projeto de iniciação científica (Processo FAPESP nº 04/07062-2). As coletas subseqüentes utilizadas para o projeto de mestrado foram realizadas no Instituto de Química – UNESP Araraquara, de espécies cultivadas. Não há relatos de ocorrência desta espécie no estado de São Paulo e o estudo com a planta cultivada tem interesse para a fitogeografia de espécies e gera adaptação a um clima tropical, bastante diferente do Nordeste, considerado seco com duas estações. A observação do perfil ciclopeptídico busca avaliar se estas substâncias relacionam-se à capacidade de adaptação ao clima seco.



Figura 7. Fotos da espécie *Jatropha curcas* L. cultivada no Instituto de Química UNESP-Araraquara.

4.2.2 *Jatropha gossypifolia*

O primeiro estudo com esta espécie no NuBBE foi realizado pelo mestre Douglas Gatte Picchi, bolsista FAPESP (Processo nº 04/11982-0).

A espécie utilizada nos estudos iniciais ocorre no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. Esta espécie também foi cultivada no Instituto de Química – UNESP, Araraquara, e a partir dela foram iniciados os estudos do projeto desta dissertação de mestrado.



Figura 8. Fotos da espécie *Jatropha gossypifolia* cultivada no Instituto de Química UNESP Araraquara.

4.3 Cromatografia

4.3.1 Cromatografia em camada delgada comparativa

Para a cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram utilizadas placas comerciais de Sílica Gel Baker-flex IB2. Os solventes utilizados na fase móvel das eluições das placas foram clorofórmio, metanol e água, todos de grau P.A, previamente destilados.

Para a revelação das placas cromatográficas utilizou-se solução de ninidrina, um composto que reage com o grupo amino do α -aminoácido terminal da cadeia peptídica, resultando em um composto de coloração púrpura. Também foi empregado o método Cl_2 /*o*-tolidina (clorox), que detecta ligações peptídicas pela reação do grupo amida com Cl_2 formando *N*-halogênio, que é revelado por uma

solução de *o*-tolidina/KI (HORSTEN, S.F.A.J., 1995) resultando em uma coloração azul escuro para teste positivo. O procedimento para essa revelação consiste na nebulização de hipoclorito de sódio (4%) diluído em água na proporção 1:1, etanol puro, solução *o*-tolidina/KI respectivamente, com intervalo de secagem entre uma nebulização e outra.

4.3.2 Cromatografia de permeação em gel

Para o fracionamento por exclusão molecular, utilizou-se como fase estacionária a resina do tipo Sephadex G-15 (PHARMACIA LKB BIOTECHNOLOGY, 1990), e colunas com dimensões que variaram de acordo com a quantidade de amostra aplicada. Esta metodologia baseia-se no retardamento da eluição de substâncias de baixo peso molecular pela penetração destas nos poros do gel, enquanto que as de maior peso molecular, que ficam na porção externa dos poros, eluem mais rapidamente. Para a fase móvel foi utilizado metanol.

Condições para a preparação da Sephadex:

- Quantidade de resina:

$$\begin{array}{rcl} 50\text{g de resina} & & 1\text{g de material} \\ & \times & \\ & & 1,3779\text{g de material} \\ \hline x = 68,895\text{g de Sephadex G 15} \end{array}$$

- Saturação:

Para a saturação, 2,5 a 3,5 mL de solvente/g de resina devem ser utilizados, podendo-se variar de um solvente a outro. Foram utilizados 200 mL de metanol para a massa de resina calculada, durante 3 horas a 25°C.

- Deaeração da Sephadex:

A resina foi submetida à deaeração sob vácuo durante 1 hora para a retirada de partículas de ar.

As dimensões da coluna foram de 26,5cm de altura x 2,5 cm de largura, com fluxo de 1,5 mL por minuto.

4.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para as análises cromatográficas foram utilizadas as seguintes fases móveis:

A: [água miliQ 0,045% /ácido trifluoroacético(TFA)]

B: [acetonitrila grau HPLC/ 0,036% ácido trifluoroacético (TFA)]

A HPLC foi utilizada para fracionamento e purificações dos peptídeos, para as análises do perfil analítico de amostras obtidas ao longo do trabalho, e para as análises de aminoácidos. Ressalta-se que as frações injetadas nas colunas analíticas foram anteriormente submetidas a clean-up em cartucho de extração em fase sólida C₁₈ da marca Strata C₁₈ – E - Phenomenex.

Parte desta pesquisa foi realizada no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química de Araraquara sob a responsabilidade do Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli e Prof. Dr. Reinaldo Marchetto, sendo o Professor Cilli co-orientador deste mestrado.

Para as análises do perfil ciclopeptídico das espécies de *Jatropha*, Primeiramente o extrato e os peptídeos puros foram analisados em um gradiente exploratório de 5-95% de solvente B em 30 minutos. De acordo com o espectro observado, foi desenvolvido um método isocrático de 45% de B em 12 minutos. Os peptídeos cíclicos Jatroidina I e Polianina A foram monitorados no método analítico pelo detector DAD e o grau de pureza e a validade do método foram confirmados.

As condições utilizadas foram: coluna C-18 – Júpiter 5 μ C-18 300A – Phenomenex – P/N^o 00G-4053 – EO – S/N 357630-6 – dimensões 250 x 4,60mm, fluxo 1mL/min, volume injetado: 20 μ L, fase móvel: ACN com 0,036% de TFA e H₂O com 0,045% de TFA (50/50). Cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU – PROMINENCE SPD M20A – Diode Array Detector; auto sampler SIL-20A; CBM 20A; Degasser PROMINENCE – DGU – 20A₃ ; forno CTO-20A/20AC e bombas LC – 20AT.

4.3.3.1 HPLC analítico para análise do perfil peptídico das frações e das respectivas purificações

Para análise dos extratos brutos, das frações obtidas, e análises de materiais puros, foi utilizado um HPLC analítico Shimadzu, com detector UV-VIS, em comprimento de onda de 220 e 280nm, e eluição de solvente (A e B) variando de acordo com o método empregado, com coluna da marca Shimadzu, dimensões de 150 X 4,6 mm, tipo C₁₈ com partículas de 5 µm e poro de 300 Å, com fluxo de 1,5 e 1,0 mL/min.

4.3.3.2 HPLC semi-preparativo

A purificação dos peptídeos foi feita num equipamento HPLC semi-preparativo (System Gold BECKMAN), com detector UV-VIS em comprimento de onda de 220 e coluna de fase reversa C₁₈ Ultrasphere BECKMAN, de dimensões 250 X 10 mm, partículas de 5 µm de tamanho e fluxo de 5mL/min.

4.3.3.3 HPLC analítico para análise qualitativa e quantitativa

As análises dos extratos quantificados e dos padrões externos foram feitas em HPLC analítico Shimadzu, com Detector Diode Array (DAD), comprimento de onda de 220nm, com eluição de solvente (A e B) variando de acordo com o método, e coluna da marca Phenomenex Júpiter, dimensões de 250 X 4,6 mm, tipo C₁₈ com partículas de 5 µm e poro de 300 Å, e fluxo de 1,0 mL/min.

4.3.3.4 Análise de aminoácidos por cromatografia de troca iônica

A determinação dos aminoácidos constituintes da cadeia peptídica foi realizada em um analisador automático Shimadzu LC-10A/C-47A. Neste equipamento os aminoácidos obtidos após a hidrólise do peptídeo foram eluídos em uma coluna de troca iônica. Após a eluição, os aminoácidos passaram por uma reação de derivatização pós-coluna com *orto*-ftalaldeído (OPA). A detecção foi realizada por um

detector de fluorescência utilizando para excitação e emissão comprimentos de onda de 348 e 450 nm, respectivamente.

O sistema foi periodicamente calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos. Neste procedimento atribui-se para cada aminoácido um pico, com base no tempo de saída, e calcula-se um fator de conversão que relaciona a concentração de cada aminoácido com área do pico correspondente.

- *Condições analíticas:*

- Coluna Shim-pack ISC-07/S1504 Na, temperatura 55° C

- Fase móvel:

- A: citrato de sódio 0,2N pH 3,20 (contendo 7% de etanol)

- B: citrato de sódio 0,6N e ácido bórico 0,6N (pH 10,0)

- C: Hidróxido de sódio 0,2M

- *Solução de reação de derivatização pós-coluna:*

- 0,4 mL de solução de hipoclorito de sódio comercial/ 1L de tampão alcalino

- 0,8 g de *orto*-ftalaldeído/ 14 mL de etanol 0,4g polioxietileno lauril éter (Brij-35) 1g N-acetilcisteína e adicionar tampão alcalino até completar volume de 1L.

obs.: Tampão alcalino: solução de carbonato de sódio (0,384M), ácido bórico (0,216M) e sulfato de potássio (0,108M)

Condições da hidrólise

Os peptídeos (0,2 - 1 mg) foram hidrolisados em 1 mL de HCl 6 N, na presença de 0,08 mL de fenol a 5% em H₂O, a 110°C por 72 h em atmosfera de N₂. Após a hidrólise, o material foi concentrado a vácuo, dissolvido em tampão de diluição NaS, pH 2,2 e filtrado em unidade filtrante GV Millex - Millipore antes de ser injetado no aparelho. Para o cálculo da proporção relativa de aminoácidos na amostra, se determina a relação entre as suas concentrações unitárias e a média.

4.4 Espectroscopia

4.4.1 Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos iniciais de RMN foram realizados no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química sob a responsabilidade do Dr. Nivaldo Borali. As análises de RMN foram realizadas em um equipamento Varian Inova 500, operando a 500 MHz. Foram realizados experimentos de TOCSY e NOESY.

As amostras submetidas a RMN foram solubilizadas em DMSO- d_6 , com resolução de 512 pontos e “mixing time” de 60 ms. Como referência interna foi o utilizado o padrão tetrametilsilano (TMS) (MERK E ALDRICH).

4.4.2 Espectrometria de Massas

A determinação do peso molecular das substâncias selecionadas e a fragmentação dos peptídeos de interesse foram efetuadas com os seguintes equipamentos e condições:

I - MS em modo *eletrospray* positivo (ESI) de baixa resolução em um espectrômetro de massa de triplo quadrupolo (Quattro-LC, Micromass, Manchester, UK). O capilar foi aquecido a 250 °C e a voltagem mantida a 3 kV. A energia do cone aplicada foi variada para a extração do íon. O argônio foi utilizado como gás de colisão.

II - MS UltrOTOF-Q (Brucker, Daltonics Billerica MA, USA). As amostras foram injetadas diretamente no sistema com um fluxo de 10 μ L/min. O capilar foi aquecido a 250 °C e a voltagem mantida a 3 kV. O nitrogênio foi utilizado como gás de colisão e todos os experimentos foram realizados utilizando o modo positivo.

4.5 Estudos de dinâmica molecular

Nomenclatura e software

As recomendações e símbolos de nomenclatura propostas pela IUPAC (IUPAC-IUB, 1970) foram utilizadas. A manipulação das estruturas foi realizada com

o Visual Molecular Dynamics (HUMPHREY et. al., 1996), e programas PyMol. Todos os cálculos de dinâmica molecular e análises foram realizados utilizando o pacote de programas GROMACS versão 3.3.1 (BERENDSEN et. al., 1995) e o campo de força OPLS/AA.

Dinâmica Molecular/ Simulação de Anelação (DM/SA)

As coordenadas iniciais do peptídeo de *Jatropha curcas* L. foram solvatadas em uma caixa retangular usando um modelo aquoso SPC (BERENDSEN et. al., 1987). O protocolo DM/SA empregado foi baseado em estudos prévios (COLLINO et. al., 2007). Os valores de NOE foram obtidos do espectro do peptídeo cíclico isolado da espécie *Jatropha curcas* L. e suas restrições foram usadas para definir as distâncias H-H correspondentes em locais específicos dentro da seqüência peptídica.

O refinamento do MD/AS, utilizando um passo de integração de 1fs após uma minimização da energia inicial usando Steepest Descents, compreende 15 ciclos de 270ps, totalizando a simulação de 4050ps. Cada ciclo inicializa com equilíbrio dinâmico de 50ps a 310K, seguido por um aumento de temperatura em 5ps e então a amostra do espaço conformacional chega a 2000K.

O sistema foi resfriado de 2000 K a 310 K a passos de 100K com 10ps de duração, seguido por uma minimização de energia usando Steepest Descents. As conformações de energia mais baixas na trajetória foram reunidas em clusters e 10 conformações com as menores violações das restrições H-H foram selecionadas para formar a biblioteca de confôrmeros.

4.6 Síntese em Fase Sólida de Peptídeos

As sínteses químicas em fase sólida dos peptídeos naturais e dos análogos foram realizadas usando a estratégia 9-fluorenilmetiloxycarbonila (Fmoc)/ *terc*-butila (tBu), onde uma solução 20% de piperidina em dimetilformamida (DMF) foi usada nas etapas de desproteção do grupo α -amino. Todo processo de alongação da cadeia peptídica linear foi efetuado com a resina Fmoc-Gly-Wang, e os agentes de acoplamento N- hidroxibenzotriazol (HOBt) / N, N1- diisopropilcarbodiimida (DIC). Cada reação de acoplamento foi feita sob agitação moderada por períodos mínimos de 2 horas. O acoplamento de cada resíduo, bem como a desproteção da porção α -

amino foi monitorado por meio da reação de pequenas alíquotas da resina com ninidrina. Entre cada etapa de acoplamento e desproteção a resina foi lavada diversas vezes com diclorometano e DMF. Por fim, o peptídeo foi clivado da resina por meio de uma solução contendo 90% de TFA, 5% de água e 5% de p-cresol, na proporção de 10 mL para cada 1,0 g de resina, com agitação moderada durante 3 horas e, em seguida o peptídeo foi precipitado com éter gelado, lavado e centrifugado.

A ciclização do peptídeo foi realizada em DMF na concentração de 10^{-3} mol/L, contendo 1,5 equivalentes de hexafluorofosfato de 2-(1H- benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HBTU) e 10 equivalentes de *N*- etildiisopropilamina (DIEA), sob agitação por 2 horas. A solução foi então particionada com acetato de etila e a fração orgânica, que contém o peptídeo cíclico foi concentrada e direcionada para etapas posteriores de purificação.

4.7 Atividades Biológicas

4.7.1 Ensaio fluorimétrico de inibição de proteases

4.7.1.1 Reagentes

Reagentes:

Foram utilizados, pepsina da mucosa gástrica suína, subtilisina recombinante tipo VII Carlsbergs, substrato fluorogênico Arg-Glu-(EDANS)-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-Lys-(DALBCYL)-Arg (EDANS-DABCYL), DMSO (grau espectrofotométrico) (Sigma-Aldrich, Brasil).

4.7.1.2 Protocolo experimental

As proteases subtilisina (concentração final de 37 nM) e pepsina (1,7 nM) foram utilizadas como modelos farmacológicos para um screening de peptídeos com atividade inibitória de proteases serínica e aspártica, respectivamente. A protease foi incubada por 1 h com o inibidor padrão aprotinina, (50 μ M) para a subtilisina e a pepstatina (12,5 μ M) para a pepsina. ou com os peptídeos a serem testados. O padrão é considerado como a amostra contendo somente a enzima e o substrato. As amostras foram diluídas em uma solução de tampão fosfato 0,1 mM (pH 7,5) contendo 0,1 M de NaCl, para o ensaio com a subtilisina e em tampão acetado 0,1

M (pH 4,4) para o ensaio com a pepsina. Após a incubação, o substrato fluorogênico (2 µM) foi injetado automaticamente em uma placa preta opaca e imediatamente deu-se início à leitura (excitação em 355 nm e emissão em 460 nm com sensibilidade de 110, num leitor Synergy™ HT Multi-Detection Microplate (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) à 37° C. A transferência dos dados obtidos para o programa excel foi feita por meio do software KC4. A porcentagem de inibição (%I) foi calculada a partir da tangente da curva (tempo de reação de 4 min). Para isso, o último valor de fluorescência obtido foi subtraído do basal, para todas as amostras. O valor encontrado para o padrão foi considerado como 100% de atividade enzimática, logo, a %I foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$\%I = [100 - (FA/FP)] * 100$$

Onde, FA é o valor encontrado para a amostra contendo a substância testada e FP, o valor encontrado para o padrão.

As substâncias testadas foram solubilizadas em DMSO e as diluições foram feitas nos respectivos tampões.

4.7.2 Avaliação da atividade antifúngica

Esse ensaio foi realizado pelo grupo da Professora Doutora Maria José Giannini, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara.

A avaliação de atividade antifúngica e determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) por meio da técnica de microdiluição com adaptações, de acordo com os documentos M27-A e M27-A2 do CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institutes* (antigo NCCLS). A CIM é a concentração do antimicrobiano necessária para inibir a multiplicação de um determinado organismo, sendo assim, é o valor que irá identificar a capacidade de determinada substância quanto à sua atividade antifúngica, nesse caso.

O meio de cultura RPMI – 1640 foi suplementado com 2% de glicose, e pH 7,0. O inóculo foi padronizado na faixa de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ células/mL e após sua distribuição, as placas foram incubadas à 37°C sob agitação. As leituras visuais e espectrofotométricas foram feitas após 24 horas para as leveduras do gênero *Candida* e de 48 a 72 horas para *Cryptococcus*.

4.7.3 Avaliação da atividade antimalárica

Uma das mais importantes estratégias na busca de novos fármacos para o tratamento da malária é a identificação de novos alvos e a subsequente descoberta de substâncias que sejam capazes de agir nestes alvos. Um destes alvos é a polimerização de heme. No vacúolo digestivo ácido, o *Plasmodium* degrada 75 % da hemoglobina do hospedeiro e utiliza os seus aminoácidos para a síntese de proteínas. Nesse processo, heme tóxica é liberada, armazenando-se na forma de um polímero inerte chamado hemozoína ou pigmento malárico, onde o grupo propionato do heme liga-se ao Fe^{3+} do outro heme. Sendo assim, substâncias capazes de inibir a síntese de hemozoína podem servir de modelos na terapia da malária.

A hemozoína parece ser estruturalmente idêntica a β -hematina que pode formar-se espontaneamente em condições não fisiológicas sem a adição de nenhuma proteína. O conhecimento bioquímico deste processo experimental permitiu o desenvolvimento de um método rápido, barato e eficiente na busca de substâncias que inibam a polimerização do heme. (Pagola et al., 2000; Dorn et al., 1995; Bohle et al., 2002)

A formação de β -hematina *in vitro* pode ser realizada através de vários procedimentos experimentais. Os protocolos descritos na literatura envolvem incubação a 37 °C (24 horas) ou 60 °C (1 hora) de hemina bovina (preparada em DMSO ou NaOH 0,1 M) num tampão apropriado (pH 3,0 – 5,5). A formação de β -hematina pode ocorrer espontaneamente ou pela adição de um catalisador.

Procedimento:

Os solventes utilizados foram de grau HPLC.

Os espectros de HRMS foram registrados em espectrômetro de massa Bruker Daltonics ultrOTOFQ-ESI-TOF, e as leituras no ultravioleta e visível foram realizadas em leitor de microplaca Synergy HT – BioTeK. A hemina bovina, cloroquina e artemisinina da marca Sigma-Aldrich. As soluções dos ensaios foram incubadas num shaker II Boekel com temperatura regulada até 70°C.

Cromatógrafo SHIMADZU, CLASS-LC10A operando com sistema ternário equipado com um auto-injetor e acoplado a um detetor UV-Diodo Array mod. SPD-MXA, com aquisição de dados feita por um microcomputador acoplado ao

equipamento. Coluna cromatográfica Phenomenex Onyx monolítica, ODS, 100 x 4,60 mm, mesoporos 13 nm e macroporos 2 µm. Condição cromatográfica usada:

a. volume de injeção: 5 µL, fluxo: 3,0 mL/min e condição: água : CH₃OH, gradiente linear, (5%→100%) em 5 minutos, 3 minutos 100 % CH₃OH, 5 minutos de equilíbrio, 2 minutos para retornar a condição inicial.

b. volume de injeção: 5 µL, fluxo: 3,0 mL/min e condição: água (dopada com 0,1 % de CH₃COOH) : CH₃OH , gradiente linear, (5%→100%) em 5 minutos, 3 minutos 100 % CH₃OH, 5 minutos de equilíbrio, 2 minutos para retornar a condição inicial.

- Tampão HEPES 20 mM (pH 7,5): 0,47662 g de HEPES em 100 mL de água, o pH 7,5 foi ajustado com NaOH 2 M.
- Acetato de sódio 0,5 M: 408,1g de C₂H₃NaO₂ · 3 H₂O em 1L de água.
- Solução de NaOH 0,1 M: 200 mg de NaOH em 100 mL.
- Solução de NaOH 0,2 N: 8 g em 1 L.
- Ácido acético 17,4 M: 0,77 mL de água mais 99,23 mL de ácido acético.

Análise dos complexos entre heme-substância usando espectrofotômetro.

O ensaio antimalárico foi realizado pela Dra.Patricia Pauletti NuBBE/Instituto de Química de Araraquara, atualmente Professora da UNIFRAN.

Uma solução de heme (12 µM) foi preparada numa solução de HEPES (pH 7,5) em 40% DMSO (solução A). As substâncias (2 mM) e extratos (1 mg) a serem analisados foram dissolvidos em 1 mL de DMSO e/ou água e diluídas com a solução A.

	Concentração	Quantidade	Concentração final	heme
Solução A		100 µL		
Hemina bovina	12 µM	100 µL	6 µM	

	Concentração	Quantidade	Concentração final	branco
Solução A		100 µL		
Substâncias	50, 40, 30, 20, 10 µM	100 µL	25, 20, 15, 10, 5 µM	

	Concentração	volume	Concentração final	Amostras
Substâncias	50, 40, 30, 20, 10 μM	100 μL	25, 20, 15, 10, 5 μM	
Hemina bovina	12 μM	100 μL	6 μM	

As soluções foram analisadas de 350 a 450 nm no leitor de microplaca Synergy HT– BioTeK. Os valores finais foram processados no programa Excel e Origin, as absorbâncias resultantes foram subtraídas do branco.

4.7.4 Ensaio de Inibição da Atividade da DNA girase

Os peptídeos também foram testados quanto à inibição de DNA girase, uma enzima essencial para o enovelamento do DNA bacteriano e vital para o microorganismo. Para este ensaio, incubou-se a enzima com os inibidores, para subsequente a avaliação da inibição do enovelamento.

Os ensaios foram realizados incubando-se 1 unidade (U) de girase com 0,5μg de plasmídeo pBR322 relaxado em um volume de reação de aproximadamente 30 μL, a 37°C por 30 minutos em tampão de ensaio*. A reação foi interrompida pela adição de 1 μL de uma solução de proteinase K (2,5 mg/mL) e posterior incubação por 60 min a 37°C. Em seguida as amostras foram submetidas à análise por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE (Tris 89 mM / ácido bórico 89 mM / EDTA 2 mM, pH 8.2). As amostras foram aplicadas uma a uma nos poços do gel e submetidas à tensão constante de 60V ou 4V/cm (fonte Pharmacia Biotech – GNA 100), à temperatura ambiente, por 3 horas. Ao término da corrida, corou-se o gel durante 30 minutos em tampão de corrida, contendo brometo de etídio (50 μg/mL). Examinou-se o gel em transiluminador de luz ultravioleta (Germetec LTDA.), o qual foi fotografado com luz ultravioleta incidente, utilizando-se câmera fotográfica Kodak Digital Screen DC40.

* **Tampão de ensaio (concentrado- 5x)** - Tris.HCl 35 mM, pH 7,5; KCl 2,4 mM; MgCl₂ 4 mM; Ditioneitol 1,2 mM; Espemidina 1,8 mM; ATP 1 mM; Glicerol 6,5% (m/v); Albumina 0,1mg/mL.

4.7.5 Avaliação da atividade antioxidante

Para a avaliação da atividade antioxidante, dois ensaios específicos foram utilizados: ensaio ABTS e DPPH.

4.7.5.1 ABTS (ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico))

Neste ensaio, ABTS é oxidado por radicais peróxidos ou outros oxidantes a seu cátion radical, que é intensamente colorido. A capacidade antioxidante é determinada pela capacidade da substância teste em reagir diretamente com o radical causando uma diminuição na absorbância a 734 nm.

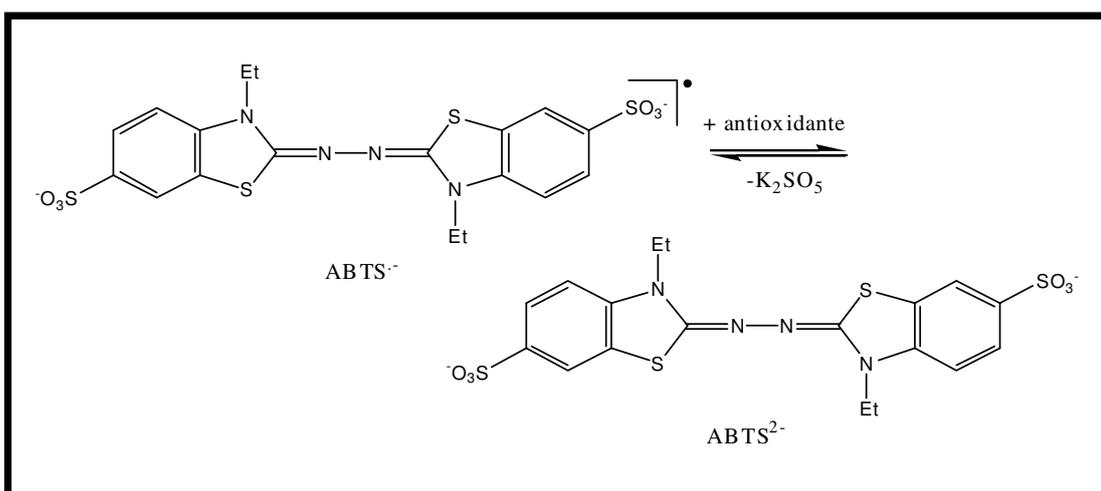


Figura 9. Representação do ABTS.

4.7.5.2 DPPH (1,1 difenil -2-picril-hidrazila)

Quando substâncias capazes de seqüestrar radicais livres estão presentes, o radical livre estável DPPH • (púrpura) é reduzido a um produto amarelo, e a atividade seqüestradora de radicais livres é avaliada através da diminuição da absorbância a 517 nm. (PAULETTI et al. 2003).

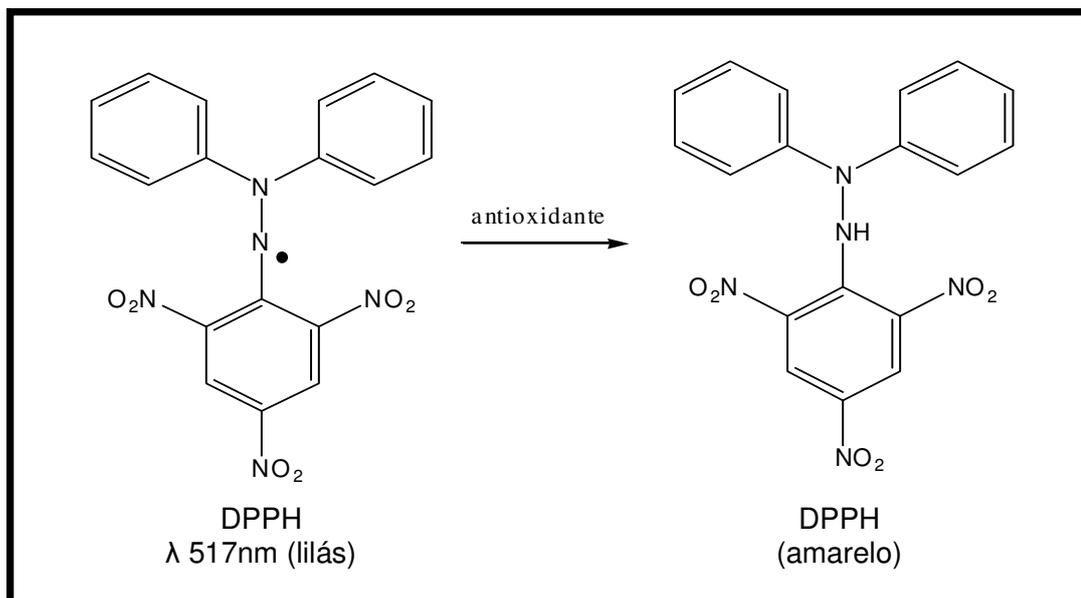


Figura 10. DPPH radical (à esquerda) e reduzido (à direita).

O ensaio foi realizado determinando-se a porcentagem de seqüestro de radicais livres da molécula de DPPH (2,2-diphenil-1-picrylhydrazyl, PM 394,3).

Como padrão positivo, utilizou-se uma solução mãe de rutina, em concentração de 1,64mM, diluída 10 vezes (0,164 mM)

As amostras testadas foram preparadas à uma concentração de 1mg/mL.

Todas as soluções empregaram metanol como solvente.

Após o preparo das soluções dos padrões e das frações a serem testadas, estes materiais foram aplicados em uma placa de 96 poços com capacidade para 2,0 mL em várias concentrações diferentes, representadas abaixo:

Rutina:

Poço A1: 100 µM (610 µL Rutina (0,164 mM) + 390 µL CH ₃ OH);
Poço B1: 80 µM (488 µL Rutina (0,164 mM) + 512 µL CH ₃ OH);
Poço C1: 60 µM (366 µL Rutina (0,164 mM) + 634 µL CH ₃ OH);
Poço D1: 40 µM (244 µL Rutina (0,164 mM) + 756 µL CH ₃ OH);
Poço E1: 20 µM (122 µL Rutina (0,164 mM) + 878 µL CH ₃ OH);
Poço F1: 10 µM (61 µL Rutina (0,164 mM) + 939 µL CH ₃ OH);
Poço G1: 5 µM (30 µL Rutina (0,164 mM) + 970 µL CH ₃ OH);
Poço H1: 0 µM (0 µL + 1000 µL CH ₃ OH).

Extrato bruto ou frações:

Poço A2: 0,2 mg/mL (200 µL extrato ou fração (1,0 mg/mL) + 800 µL CH ₃ OH);
Poço B2: 0,1 mg/mL (100 µL extrato ou fração (1,0 mg/mL) + 900 µL CH ₃ OH);
Poço C2: 0,03 mg/mL (150 µL extrato ou fração (0,2 mg/mL) + 850 µL CH ₃ OH);

Poço D2: 0,02 mg/mL (100 µL extrato ou fração (0,2 mg/mL) + 900 µL CH ₃ OH);
Poço E2: 0,01 mg/mL (100 µL extrato ou fração (0,1 mg/mL) + 900 µL CH ₃ OH);
Poço F2: 0,008 mg/mL (80 µL extrato ou fração (0,1 mg/mL) + 920 µL CH ₃ OH);
Poço G2: 0,005 mg/mL (250 µL extrato ou fração (0,02 mg/mL) + 750 µL CH ₃ OH);
Poço H2: 0 mg/mL (0 µL + 1000 µL CH ₃ OH).

A solução de DPPH utilizada foi de concentração 101,4 µM ou 0,04 g/L.

A placa de 96 poços utilizada na avaliação da atividade foi composta da seguinte forma:

1. BRANCO:

1. 300 µL de CH₃OH

2. CONTROLE – DPPH:

1. 100 µL de CH₃OH
2. 200 µL de DPPH

3. PADRÕES

1. 100 µL do padrão nas diferentes concentrações
2. 200 µL de DPPH

4. AMOSTRAS:

1. 100 µL da amostra nas diferentes concentrações
2. 200 µL de DPPH

Preparo da Microplaca de 96 poços para leitura:

Para a leitura da atividade antioxidante, foi utilizada uma microplaca de 96 poços transparente e com capacidade para 400 µL. Nesta placa foram adicionados 100 µL das soluções armazenadas na placa de 96 poços de 2,0 mL. As análises foram feitas em triplicata. Ao fim, **200 µL** da solução de DPPH foram adicionados aos poços, e após 30 minutos ao abrigo da luz a placa foi colocada no leitor de microplacas SYNERGY-HTS a λ 517 nm.

Processamento dos dados:

- Fórmula: porcentagem de seqüestro do radical livre estável DPPH

$$\% = \frac{(\text{absorbância do CONTROLE-DPPH} - \text{absorbância da AMOSTRA ou PADRÃO}) * 100}{\text{Absorbância do CONTROLE-DPPH}}$$

Os dados obtidos foram exportados para o programa EXCEL onde a média e o desvio padrão foram calculados para cada uma das concentrações, gerando um gráfico que ilustra a atividade antioxidante.

Na microplaca submetida à leitura, as concentrações finais dos padrões e dos materiais testados são 1/3 da concentração inicial, portanto:

- **Padrões:**

Concentrações finais de: 33,3; 26,7; 20,0; 13,3; 6,7; 3,3; 1,7 μM .

- **Amostras:**

Concentrações finais de: 66,7; 33,3; 10,0; 6,67; 3,33; 2,67; 1,67 $\mu\text{g/mL}$.

4.8 Análise qualitativa e quantitativa dos peptídeos de *Jatropha curcas* L. e análise qualitativa dos peptídeos de *Jatropha gossypifolia*.

Para as análises quali e quantitativa dos peptídeos em *Jatropha curcas* L., e análise qualitativa dos peptídeos de *Jatropha gossypifolia*, 0,5 mL de látex foram coletados mensalmente, mediante corte dos caules utilizando lâmina cortante descartável. As coletas foram realizadas nos dias 23 de cada mês, por volta das 8 e 30 da manhã. O látex foi coletado e armazenado em freezer até uso.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Avaliação da presença de peptídeos nos extratos das folhas de *Jatropha curcas* L.

Foram preparados os extratos diclorometânico, hexânico e metanólico das folhas de *Jatropha curcas* L. Os extratos obtidos foram submetidos aos testes usuais para a verificação de peptídeos. As cromatoplasmas foram eluídas com CHCl_3 ; CH_3OH ; H_2O (5;4;1), e reveladas com clorox para a detecção de ligações peptídicas. Nenhuma das frações das folhas mostrou a presença de peptídeos, fato constatado após a ausência de manchas azuis no suporte cromatográfico após a revelação.

5.2 Extração de peptídeos do látex de *Jatropha curcas* L.

O látex (V_L) foi coletado mediante incisão no caule e gotejamento, sendo mantido sob refrigeração (-5°C) até o uso. Este material foi solubilizado em água deionizada ($4 \times V_L$) com adição de 4% de etanol, e esta solução foi particionada com acetato de etila ($10 \times V_L$) por 3 vezes. Após a obtenção da fase orgânica e aquosa, as mesmas foram submetidas à CCDC para a verificação de peptídeos nas frações do látex.

Esta metodologia, desenvolvida por Horsten em 1995, foi aplicada com sucesso para os peptídeos de *J. multifida* (Processo FAPESP – 04/07062-2), porém, na partição do látex de *Jatropha curcas* L., houve formação de grande quantidade de emulsão, causando perda do material de partida. Alguns ajustes na proporção água/acetato foram necessários visando a diminuição da formação de emulsão e com isso facilitando a obtenção da fração peptídica.

Látex de *Jatropha curcas* L. (44,0 mL) foram solubilizados em 264,0 mL de água ($6 \times V_L$) e particionados com 660 mL ($15 \times V_L$) de acetato de etila, 5 vezes. A emulsão formada foi centrifugada, separando-se o acetato de etila da fase aquosa. As duas fases, orgânica e aquosa, foram testadas em CCDC, utilizando-se o método de revelação clorox, que detectou ligações peptídicas (**Figura 9**) na fase orgânica. Nesta etapa foi possível verificar o caráter cíclico dos peptídeos mediante o resultado negativo para a revelação com ninidrina, positivo somente na presença de

grupos amínicos livres, e negativo para peptídeos cíclicos (ciclização cabeça-cauda). Assim, após a eluição de duas placas na fase móvel CHCl_3 ;MeOH; H_2O (5;4;1), e revelação de uma com ninidrina e outra com clorox (revela ligações peptídicas), foi possível a confirmação da ausência de grupos amínicos livres.

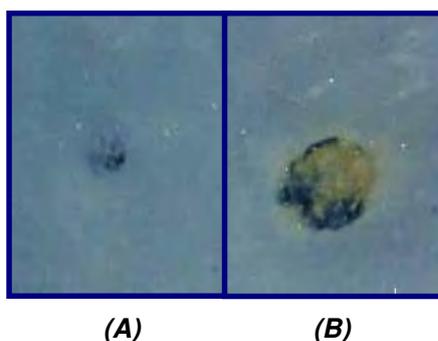


Figura 11. Revelação clorox, mostrando resultado positivo para o padrão peptídico (A), e para a fração acetato de etila resultante da partição do látex (B).

5.2.1 Cromatografia de permeação em gel

A fração peptídica obtida foi submetida ao processo de separação, no qual foi utilizada uma coluna do tipo Sephadex G-15, e metanol como eluente. Os peptídeos foram eluídos mais rapidamente em relação aos constituintes micromoleculares presentes no extrato.

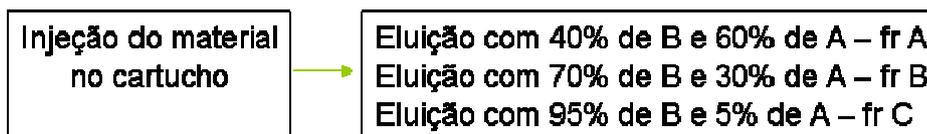
A quantidade de material injetada foi de 1,3779g, resultando em 35 frações, todas testadas em CCDC para avaliar a presença de peptídeos. As frações 4 e 5 mostraram resultado positivo para a detecção de ligações peptídicas, sendo, portanto, reunidas e submetidas a uma pré purificação antes da injeção em HPLC. Nesta etapa comprovou-se a natureza cíclica dos peptídeos isolados, mediante um teste negativo com ninidrina.

5.2.2 Clean up da fração peptídica e análise em gradiente exploratório

As frações 4 e 5 da coluna Sephadex foram reunidas totalizando uma massa de 116,7 mg. Este material foi submetido a um clean up em cartucho de C_{18} para posterior injeção em HPLC.

Preparação do cartucho para extração em fase sólida:

- Passagem de 95% de solvente B e 5% de solvente A.
- Passagem da primeira solução do gradiente: 40% de solvente B e 60% de solvente A;



As 3 frações obtidas foram submetidas à análise em HPLC em um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B em 30 minutos, e a fr B foi selecionada para a purificação (**Figura 12**). As demais frações não apresentaram picos característicos de peptídeos. Para a fr B foram observados dois picos bem definidos, com absorção no UV em 220nm, comprimento de onda absorvido pelas ligações peptídicas.

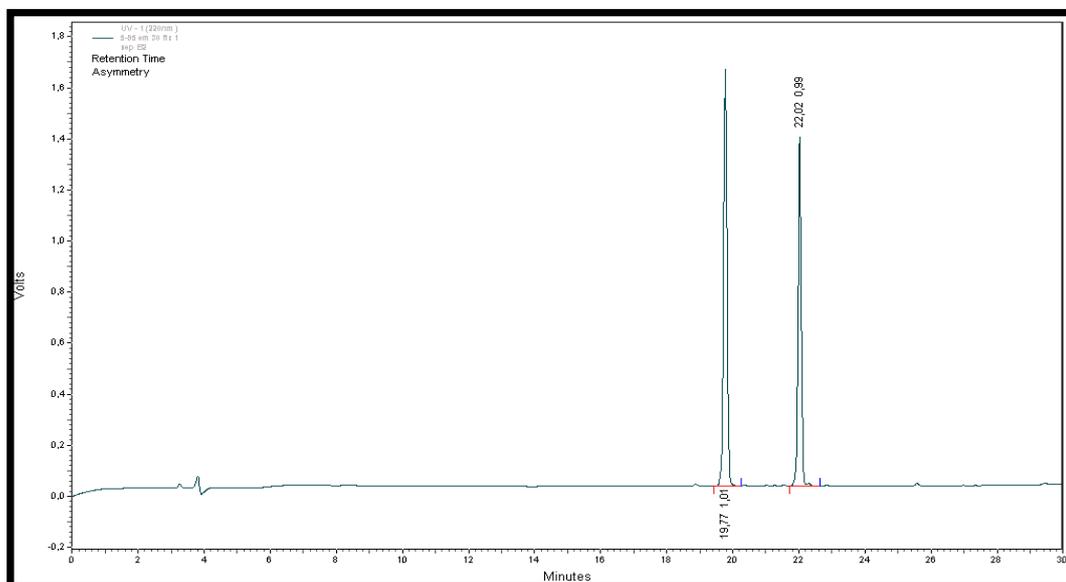


Figura 12. Cromatograma da fração fr B obtida após clean up, os picos são referentes aos dois materiais subseqüentemente purificados.

Para observar a presença de peptídeos no látex de outras partes do organismo vegetal, foi realizado um teste coletando-se material do pecíolo das folhas de *Jatropha curcas*. Este látex foi submetido aos procedimentos descritos, e mediante análise do perfil cromatográfico, foi possível observar qualitativamente que os peptídeos distribuem-se também no látex contido nos pecíolos das folhas (**Figura 13**).

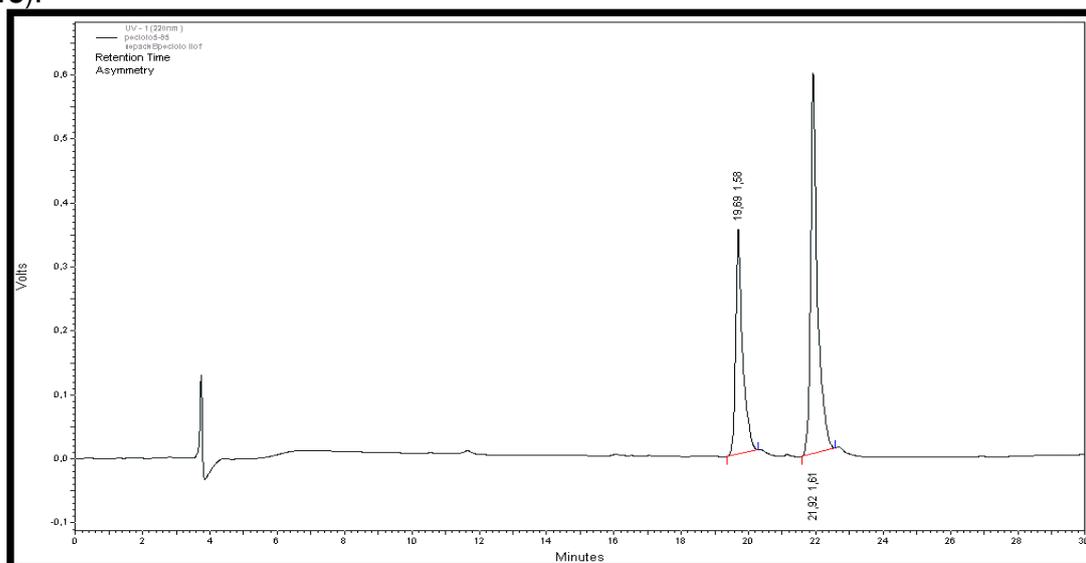


Figura 13. Perfil cromatográfico da amostra após clean up, da extração do látex dos pecíolos das folhas.

5.2.3 Purificação em HPLC

Após a visualização do gradiente exploratório da fração peptídica, foi desenvolvido um método de 40-70% de solvente B em 120 minutos para a purificação deste material em HPLC semi-preparativo. Este método foi desenvolvido com base na porcentagem da fase móvel na qual os peptídeos eluíram: 59,4% de B (19,8 min) e 66% de B (22 min). A análise das frações da purificação foi em HPLC analítico shimadzu em modo isocrático de 50% de B.

Ao final, os dois peptídeos cíclicos A e B foram purificados, ambos em forma de pó amorfo, de coloração branca (**Figura 14**).

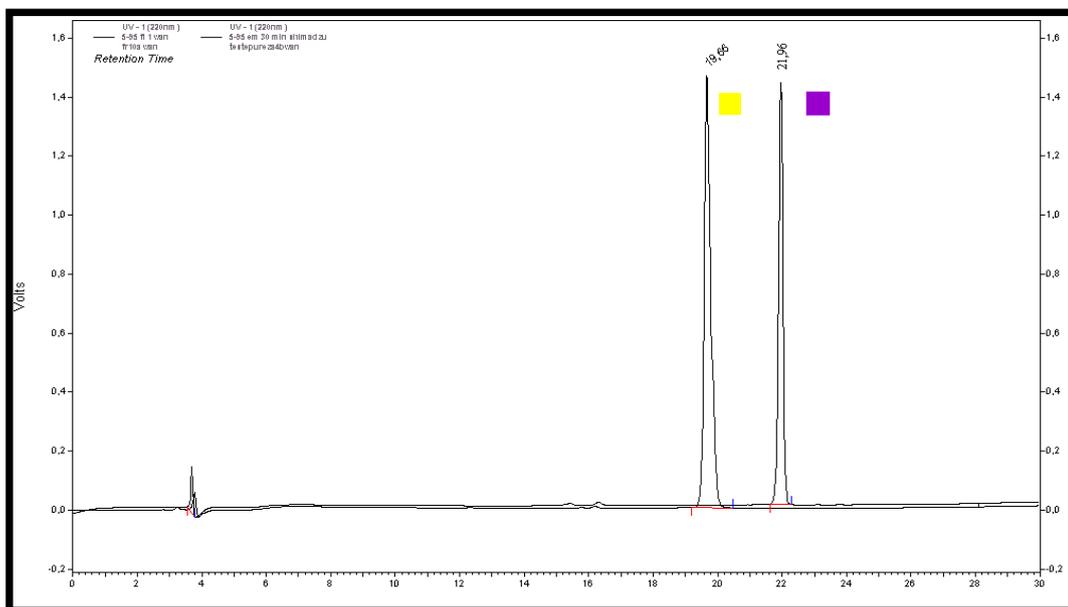


Figura 14. Peptídeos puros isolados de *Jatropha curcas* L. Peptídeo A (amarelo); peptideo B(roxo).

Foram realizadas 5 extrações de peptídeos cíclicos do látex da porção inferior do caule da espécie *Jatropha curcas* L. (**Quadro 3**), cultivada no Instituto de Química de Araraquara. Vários isolamentos foram necessários para a obtenção de mais massa de material puro em quantidade suficiente para a realização de experimentos de RMN, e dos testes biológicos, descritos nesta pesquisa.

Data	Volume de látex (V _L)	Volume de água / acetato de etila
26/02/2007	20,0 mL	4xV _L /10x V _L
25/04/2007	24,0 mL	8x V _L /20x V _L
14/01/2008	44,0 mL	6x V _L /15x V _L
25/03/2008	50,0 mL	6x V _L /15x V _L

Quadro 3. Extrações realizadas do látex do caule *Jatropha curcas* L., de janeiro de 2007 a março de 2008.

5.3 Caracterização dos Peptídeos Cíclicos Isolados de *Jatropha curcas* L.

5.3.1 Hidrólise ácida e análise de aminoácidos

Para identificar a composição de aminoácidos nas amostras peptídicas, estas foram submetidas a hidrólise ácida (condições descritas em materiais e métodos) considerando uma reação que cliva as ligações peptídicas, possibilitando a verificação dos resíduos de aminoácidos presentes na amostra. Após a clivagem, os peptídeos hidrolisados foram injetados em um analisador de aminoácidos que detectou qualitativa e quantitativamente os aminoácidos presentes na cadeia peptídica, mediante a comparação com um padrão (**Figura 15**).

Salienta-se que a hidrólise ácida decompõe o aminoácido triptofano, portanto, sua detecção não é eficaz por este método.

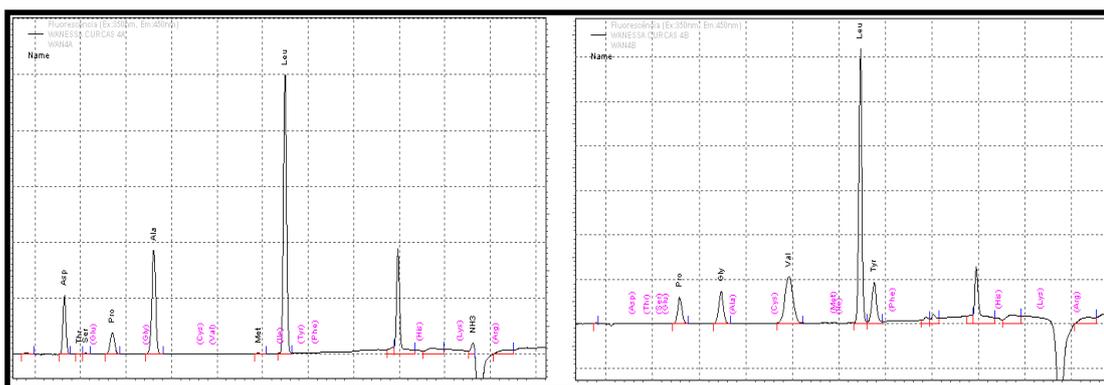


Figura 15. Análise de aminoácidos dos peptídeos A (à esquerda) e B (à direita).

Após análise de aminoácidos, as seguintes composições foram encontradas para os peptídeos:

- Peptídeo A – 1Asp/Asn; 1Pro; 2Gly; 3Leu
- Peptídeo B – 1Pro; 1Gly; 1Val; 3Leu; 1Tyr

Nesta etapa, foi constatado que o peptídeo B era composto pelos mesmos resíduos do peptídeo Polianina A isolado por Guette e colaboradores em 1999. Para a confirmação de que as estruturas eram idênticas, estes dados foram complementados com a espectrometria de massas, visto que se houvesse um resíduo de triptofano este não seria detectado na análise de aminoácidos.

5.3.2 Espectrometria de massas

A análise da massa molecular dos peptídeos através de espectrometria de massas permitiu concluir que o peptídeo B possui peso molecular (M+H) de 756,4510 g/mol, idêntico ao da Polianina A (**Figura 16**).

Para o peptídeo A (**Figura 16**), as análises de massas e de aminoácidos revelaram uma composição inédita. O peso molecular encontrado foi de 851,4644g/mol, na forma de (M+H⁺).

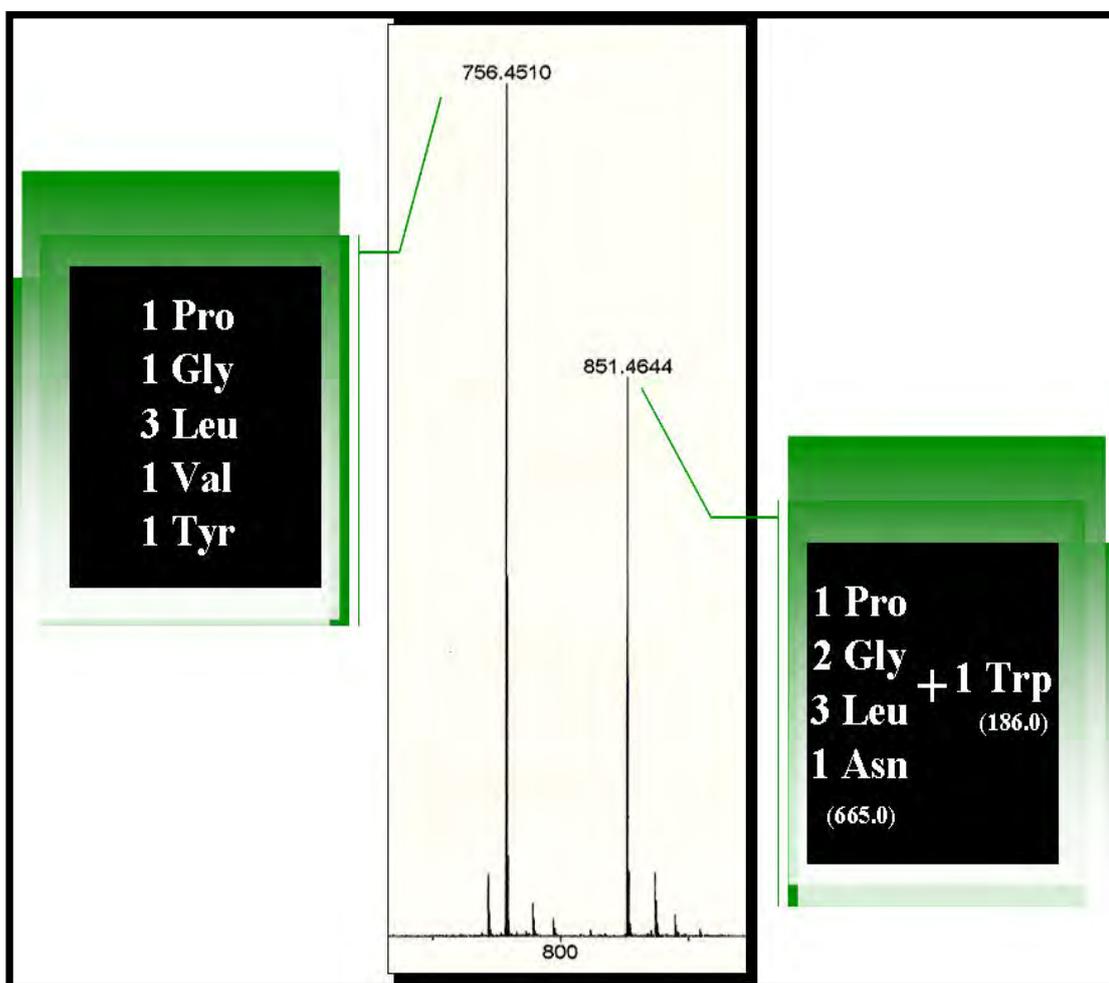


Figura 16. Composição de aminoácidos e espectro de massas dos peptídeos isolados de *Jatropha curcas* L.

5.4 Seqüenciamento dos peptídeos cíclicos isolados

5.4.1 Peptídeo B

5.4.1.1 Espectrometria de massas

De acordo com os resultados obtidos pelos métodos espectrométricos e cromatográficos, concluiu-se que o peptídeo B é a Polianina A. Para confirmar esta estrutura, foi feito o seqüenciamento da cadeia por MS-MS (Figura 17), e experimentos de RMN.

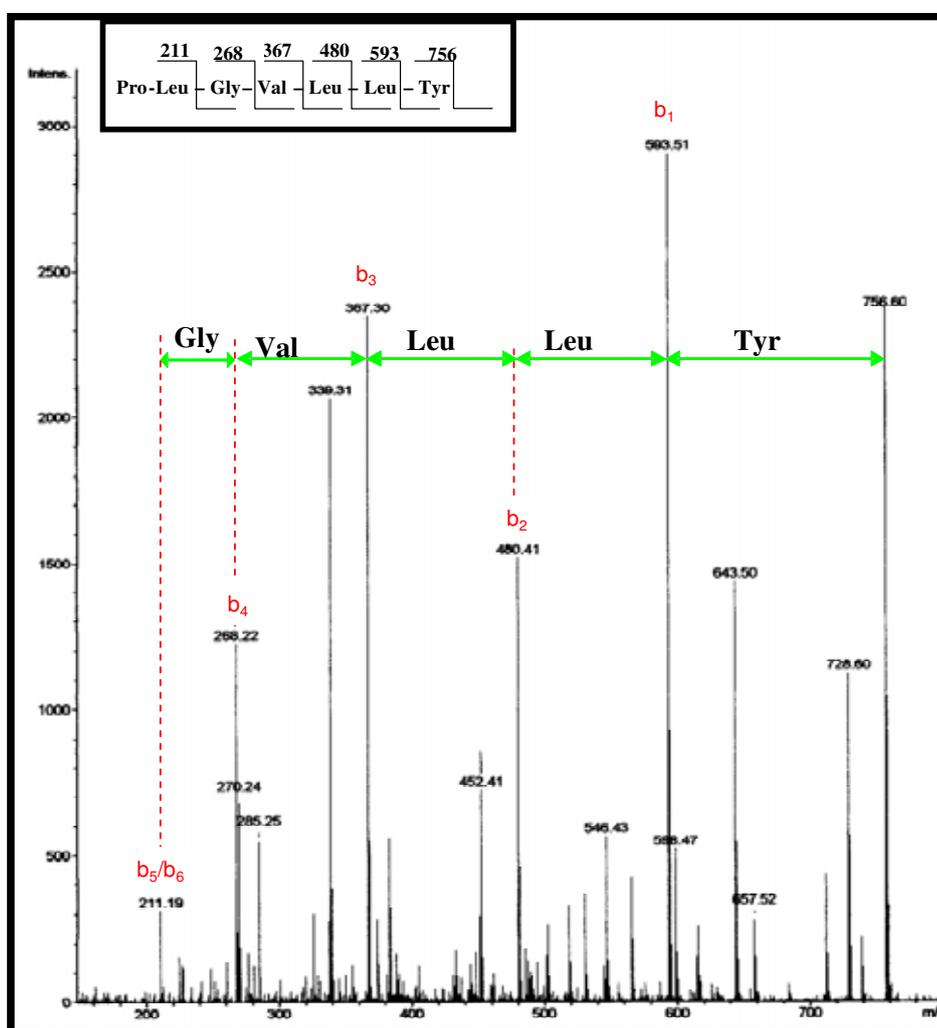


Figura 17. Seqüenciamento do peptídeo B por espectrometria de massas.

O seqüenciamento por MS-MS foi eficaz, resultando na seguinte estrutura:



A fórmula molecular da estrutura elucidada por HRMS corresponde a: $C_{39}H_{62}N_7O_8$. Desenhando-se este peptídeo no software ChemDraw Ultra 10.0, as figuras geradas em duas e três dimensões são (**Figura 18**):

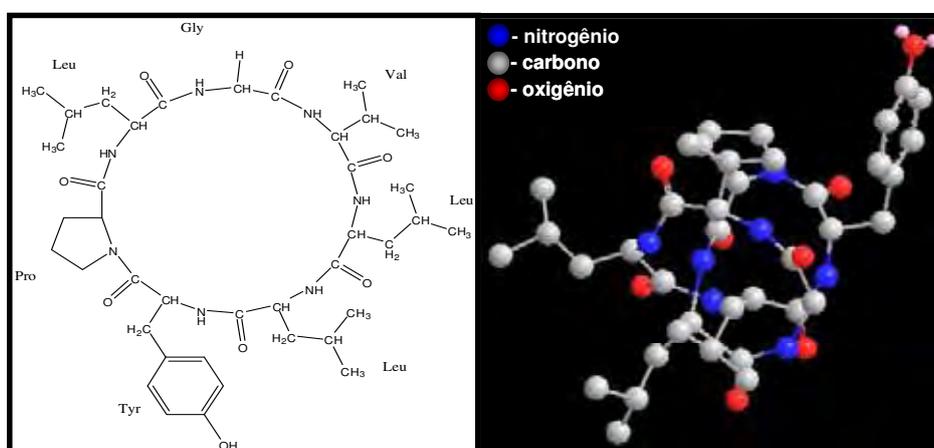


Figura 18. Estrutura do peptídeo cíclico Polianina A, seqüência de aminoácidos em duas e três dimensões.

5.4.1.2 Ressonância Magnética Nuclear

Para a confirmação da estrutura do peptídeo foram realizados experimentos de RMN em duas dimensões, TOCSY e NOESY.

A amostra foi preparada mediante diluição do peptídeo puro em DMSO- d_6 (5,0 mg em 1mL), e depositada em tubo de ressonância. Através da análise dos valores dos desvios químicos característicos dos hidrogênios dos aminoácidos, cada resíduo da seqüência foi identificado no espectro de TOCSY (**Figura 19 e 20**).

nesta região. Desta forma, a identificação da prolina só foi possível através das correlações existentes entre o hidrogênio pertencente ao carbono α e os demais hidrogênios (β , γ e δ) - região entre 1,5 a 5,0 ppm (**Figura 21**).

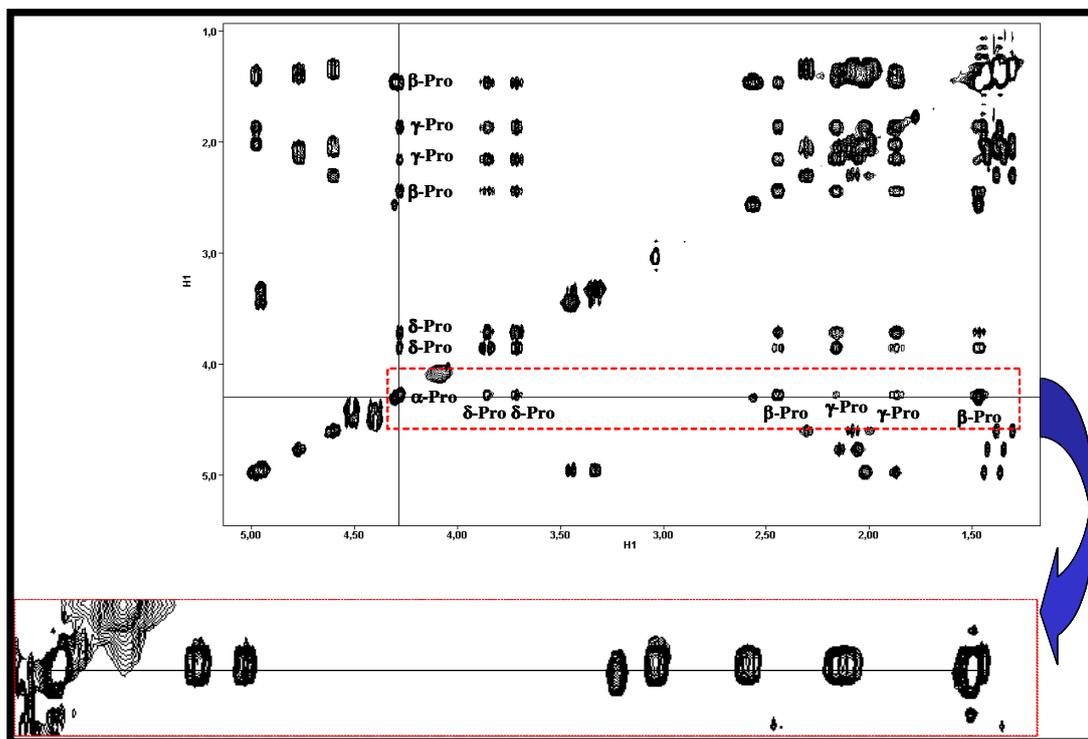


Figura 21. Espectro TOCSY 2D mostrando os sinais referentes ao resíduo de prolina.

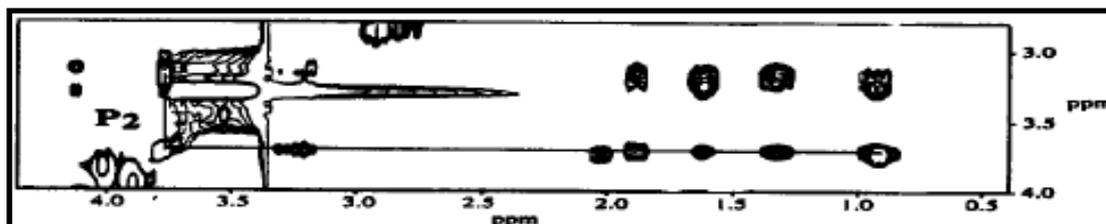


Figura 22. Espectro TOCSY 2D mostrando os sinais referentes ao resíduo de prolina da Polianina A (GUETTE, et al., 1999).

Os valores de desvios químicos encontrados para o primeiro peptídeo isolado estão mostrados na **Tabela 1**.

Tabela 1 Dados do espectro de ^1H

Resíduo		δ_{H}	Resíduo		δ_{H}
Tyr ₁	NH	9,01	Val ₅	NH	8,05
	α	4,38		α	3,75
	β	2,90		β	2,01
	γ	2,77	Leu ₆	γ_1	0,91
				γ_2	0,90
		NH		7,92	
α		4,22			
β		1,58			
Pro ₂	α	3,74	Leu ₇	β	1,48
	β	1,87		γ	
		0,93		δ_1	0,86
	γ	1,60		δ_2	0,77
		1,30		NH	7,02
	δ	3,18		α	4,43
Leu ₃	NH	8,24	β	1,32	
	α	4,05		1,45	
	β	1,75	γ		
		1,50	δ_1		
	γ	1,50	δ_2		
	δ_1	0,82			
	δ_2	0,74			
Gly ₄	NH	7,50			
	α	3,97			
		3,85			

Após a determinação dos picos correspondentes a cada um dos aminoácidos por meio do TOCSY, o seqüenciamento da cadeia peptídica foi feito utilizando-se correlações do tipo $\text{NH}_i\text{-}\alpha\text{H}_{i-1}$ (**Figuras 23 e 24**) existentes nos espectros de NOESY. A prolina, por não possuir H no grupo α -amino, não pode ser identificada por este tipo de correlação. Para este resíduo o seqüenciamento continuou através das correlações do resíduo αH_{i-1} com o α ou δ da prolina posterior. Neste caso, quando se observa a correlação com o α da prolina, a conformação encontrada é a *cis*, enquanto que se a correlação for com o δ , a prolina está na conformação *trans*. A prolina é o único dos aminoácidos que possui a cadeia lateral ciclizada, e o único encontrado em quantidade considerável nestas duas conformações. Desta forma, de

acordo com a conformação assumida por este aminoácido na molécula, serão encontradas conectividades diferentes.

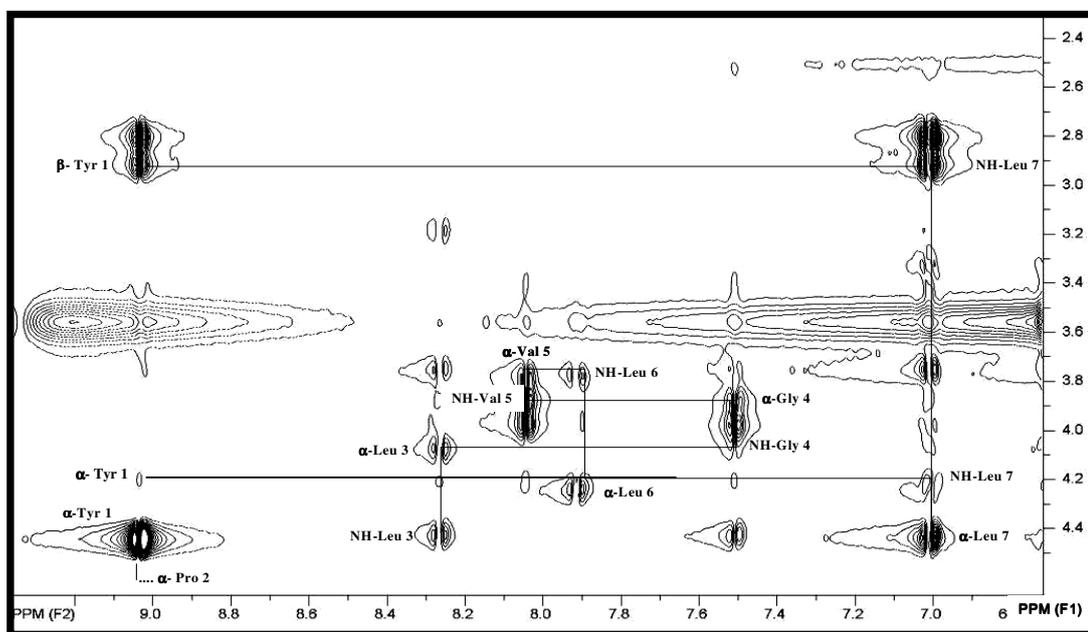


Figura 23. Seqüenciamento do peptídeo Polianina A pelo espectro de NOESY 2D.

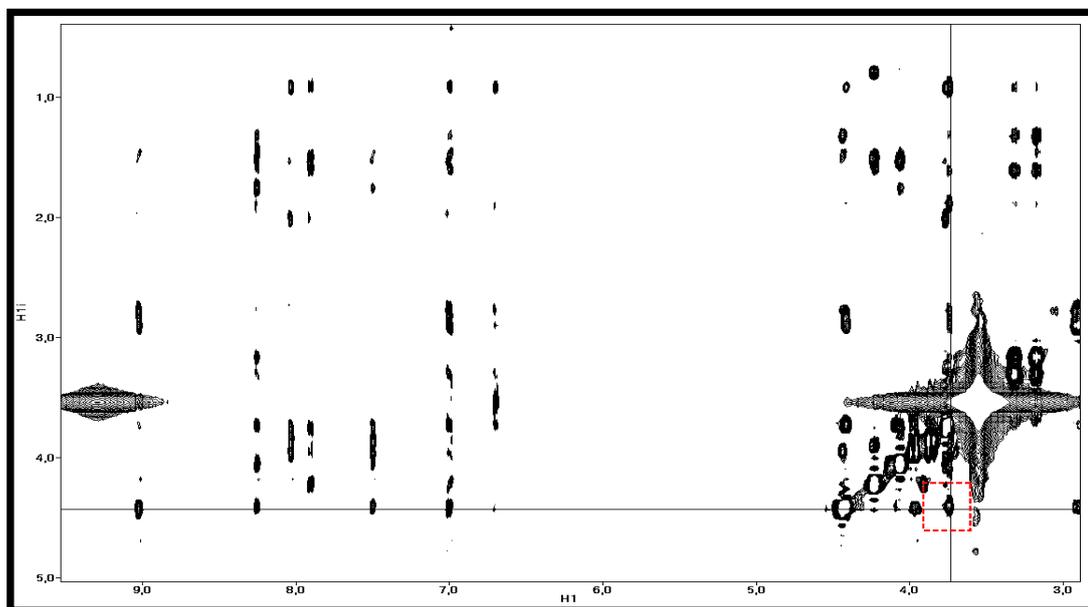


Figura 24. Correlação do hidrogênio α da prolina com o hidrogênio do α H i-1 (tirosina).

As correlações encontradas permitiram concluir de que o peptídeo possuía a prolina em sua forma *cis*. O peptídeo com as correlações encontradas no experimento de NOESY está representado na **Figura 25**.

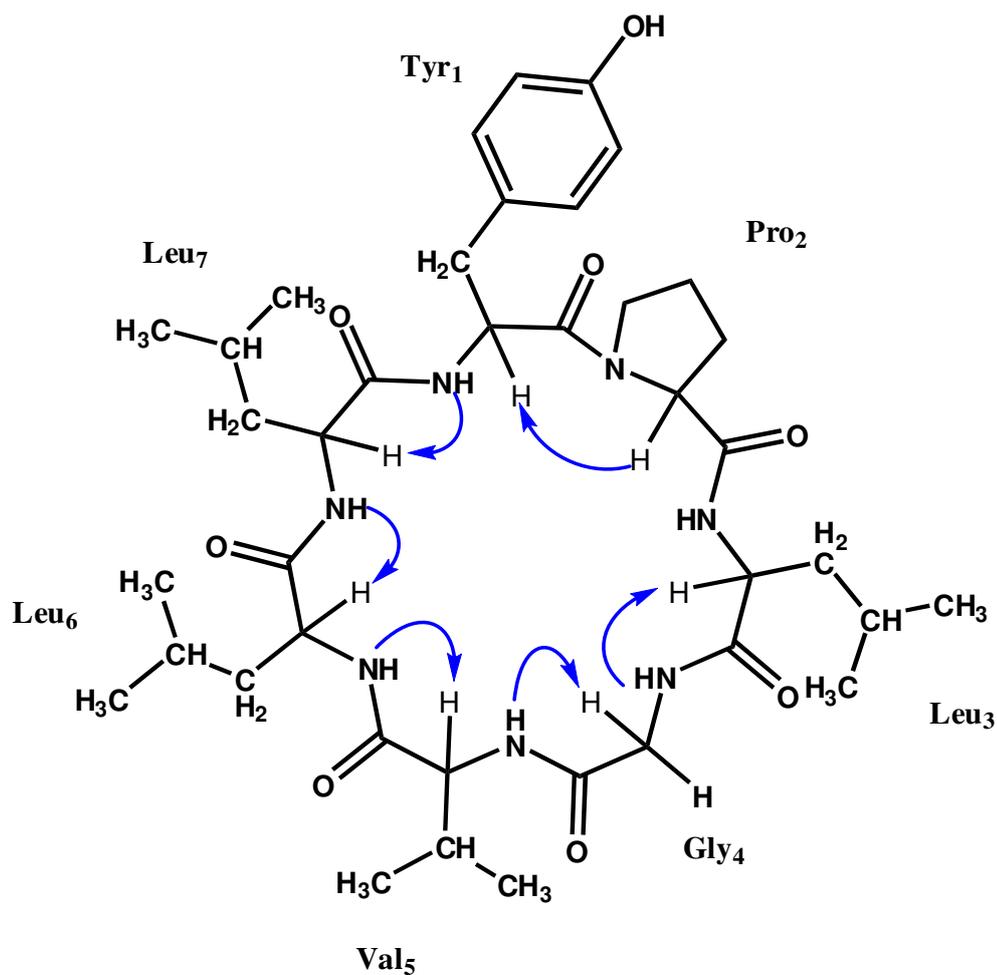


Figura 25. Peptídeo Polianina A com correlações $NH_i-\alpha H_{i-1}$.

Os dados obtidos mostraram que este peptídeo corresponde a Polianina A. Apesar deste peptídeo já ter sido descrito na literatura (GUETTE et al, 1999) foi a primeira vez que foi isolado para a espécie *Jatropha curcas* L.

5.4.2 Peptídeo A

Os dados da fragmentação da estrutura do peptídeo A por MS-MS não possibilitaram informações suficientes para a conclusão da seqüência. A interpretação do espectro de massas mostrou que, além dos resíduos obtidos pela análise de aminoácidos, há a presença de um triptofano na cadeia, pois o espectro de massas apresentou uma diferença de aproximadamente 186 g/mol, entre a soma dos pesos moleculares dos resíduos encontrados na análise de aminoácidos e do peso molecular obtido. Foram necessárias, portanto, análises em RMN para concluir a seqüência deste peptídeo.

5.4.2.1 Ressonância Magnética Nuclear

Foram realizados experimentos de RMN na obtenção de espectro de TOCSY e NOESY. A amostra foi preparada mediante diluição do peptídeo puro em DMSO- d_6 (5,0 mg em 1,0 mL), e depositada em tubo de ressonância. Primeiramente foi feito um espectro de TOCSY 2D que revelou os desvios químicos correspondentes a cada resíduo de aminoácido da estrutura (**Figura 26**).

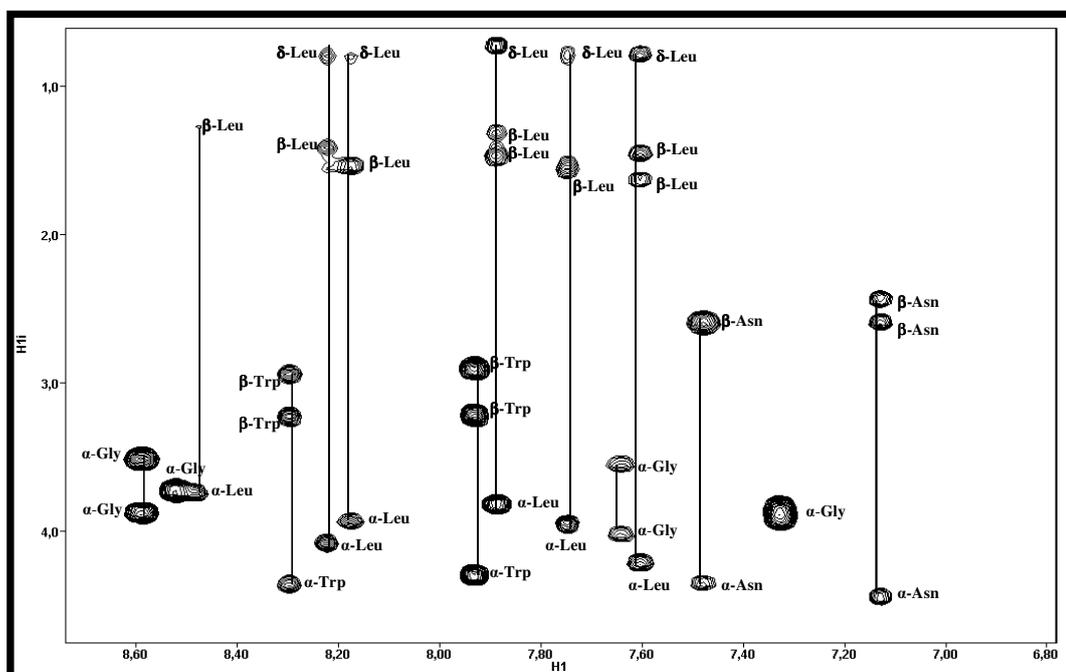


Figura 26. Espectro TOCSY 2D, mostrando a identificação de cada aminoácido na região NH

O espectro de TOCSY revelou um número de sinais maior do que o esperado na região de 7.0 a 9.0 ppm para um peptídeo de 8 resíduos. Este comportamento pode ser justificado pela presença de mais de uma conformação do peptídeo em solução, devido ao resíduo de prolina, que pode assumir as conformações *cis* ou *trans* em solução, como descrito anteriormente.

De fato, após a interpretação dos desvios químicos na região de correlação entre 3.0 a 5.0 ppm, foram observados dois conjuntos de sinais que poderiam corresponder às duas conformações possíveis da prolina (**Figura 27**).

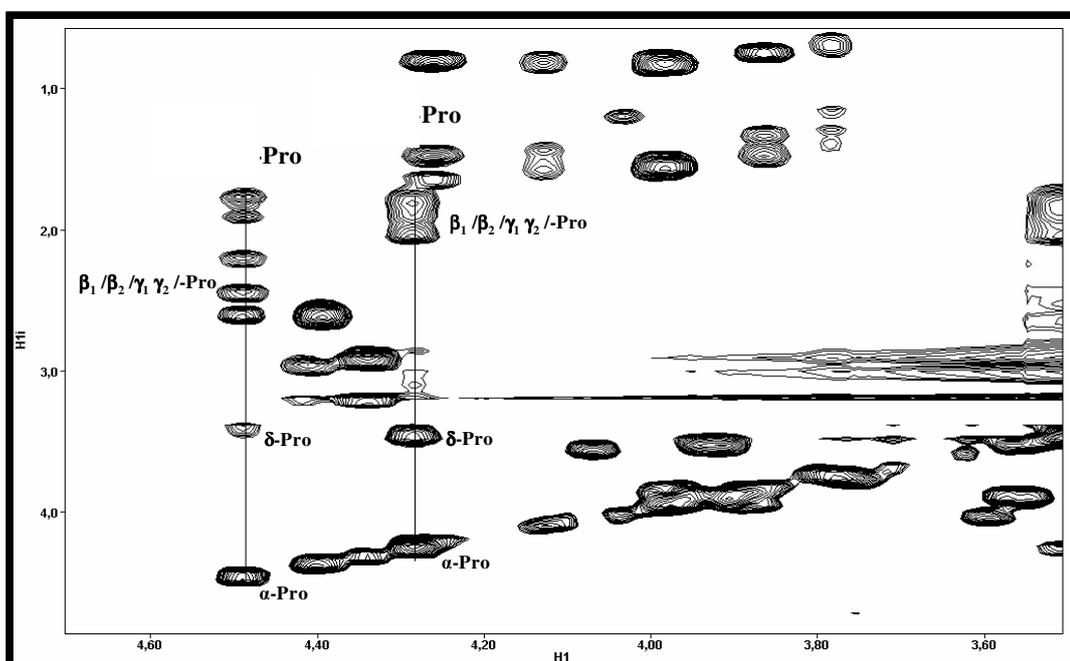


Figura 27. Espectro TOCSY 2D mostrando os sinais referentes ao resíduo de prolina.

Dois conjuntos de valores foram assinalados correspondendo aos desvios químicos encontrados, desta forma, a **Tabela 2** apresenta o conjunto A e B, que significam as atribuições feitas a todos os sinais encontrados no espectro de TOCSY.

Tabela 2. Dados do espectro de ^1H

Resíduo		δ_{H}	Resíduo		δ_{H}
A			B		
gly1	H-N	8,59	gly1	H-N	8,52
	α 1	3,9		α 1	3,74
	α 2	3,52		α 2	
leu2	H-N	7,6	leu2	H-N	8,22
	α	4,23		α	4,09
	β	1,47		β	1,42
	β			β	
	γ	1,64		γ	1,56
leu 3	H-N	8,17	leu 3	H-N	7,75
	α	3,94		α	3,95
	β	1,54		β	1,56
	δ	0,8		δ	0,8
asn4	H-N	7,48	asn4	H-N	7,13
	α	4,37		α	4,45
	β	2,61		β	2,61
	β	-		β	2,43
leu5	H-N	7,89	leu5	H-N	8,48
	α	3,82		α	3,75
	β	1,48		β	1,28
	γ	1,33		γ	1,14
trp6	H-N	7,93	trp6	H-N	8,3
	α	4,3		α	4,37
	β	3,23		β	3,23
	β	2,9		β	2,95
gly7	H-N	7,33	gly7	H-N	7,64
	α 1	3,9		α 1	4,04
pro8	H-N	não tem	pro8	α 2	3,56
	α	4,24		H-N	não tem
	β	2,7		α	4,46
	β	1,8		β	2,23
	γ	1,95		β	1,8
	γ	1,87		γ	1,93

Novamente a relação inter-resíduo $NH_i-\alpha H_{i-1}$ foi utilizada para a conclusão da seqüência dos aminoácidos na cadeia. O número de sinais maior do que o esperado para este peptídeo possibilitou o seqüenciamento da mesma cadeia por meio da utilização de dois conjuntos diferentes de sinais. De fato, o espectro de NOESY mostrou a correlação entre o hidrogênio α do resíduo anterior, tanto com o hidrogênio α quanto com o δ da prolina na região entre 3.0 a 5.0 ppm, indicando a presença das duas conformações possíveis da prolina, e conseqüentemente 2 estruturas tridimensionais diferentes para este peptídeo (Figuras 28 a 30).

As Figuras 28 e 29 mostram o seqüenciamento no qual a prolina encontra-se na conformação *trans*.

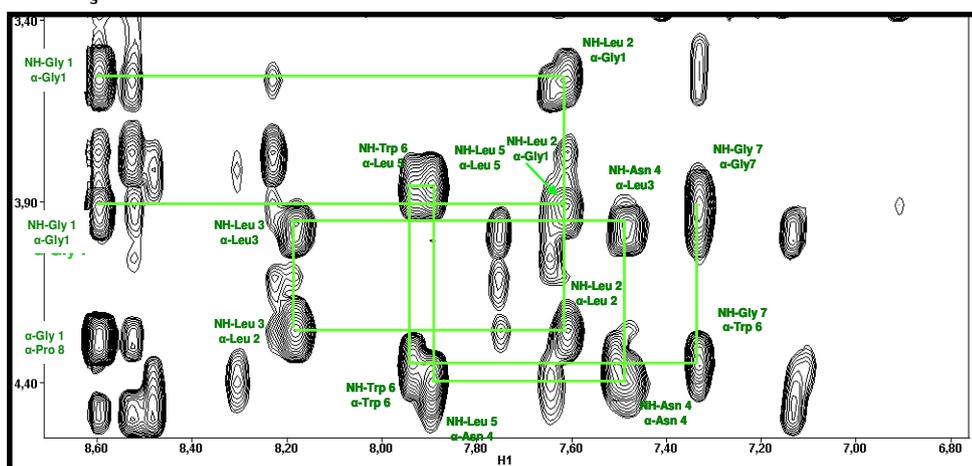


Figura 28. Seqüenciamento do peptídeo 4a pelo espectro de NOESY 2D.

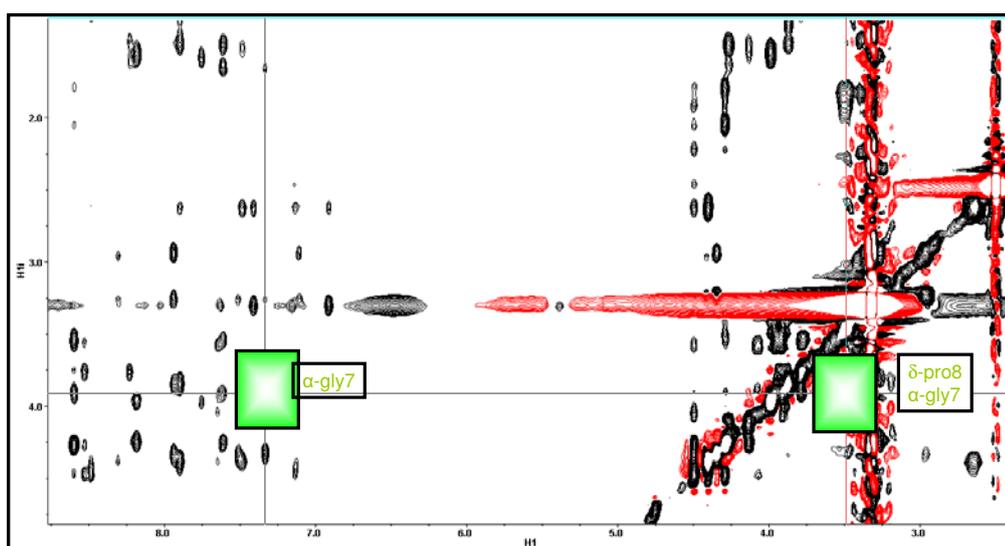


Figura 29. Espectro de NOESY mostrando as correlações que caracterizam a prolina da conformação *trans*.

Nas **Figuras 30 e 31**, está representado o outro seqüenciamento, no qual os sinais que correlacionam a glicina com o resíduo de prolina são característicos de conformação *cis*.

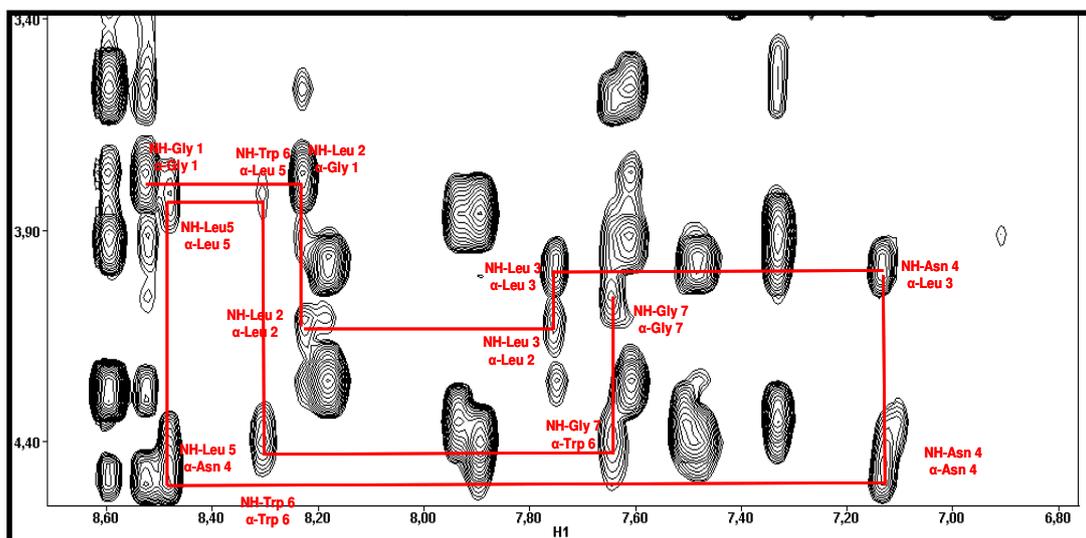


Figura 30. Seqüenciamento do peptídeo 4a por NOESY 2D utilizando alguns sinais diferentes do primeiro seqüenciamento.

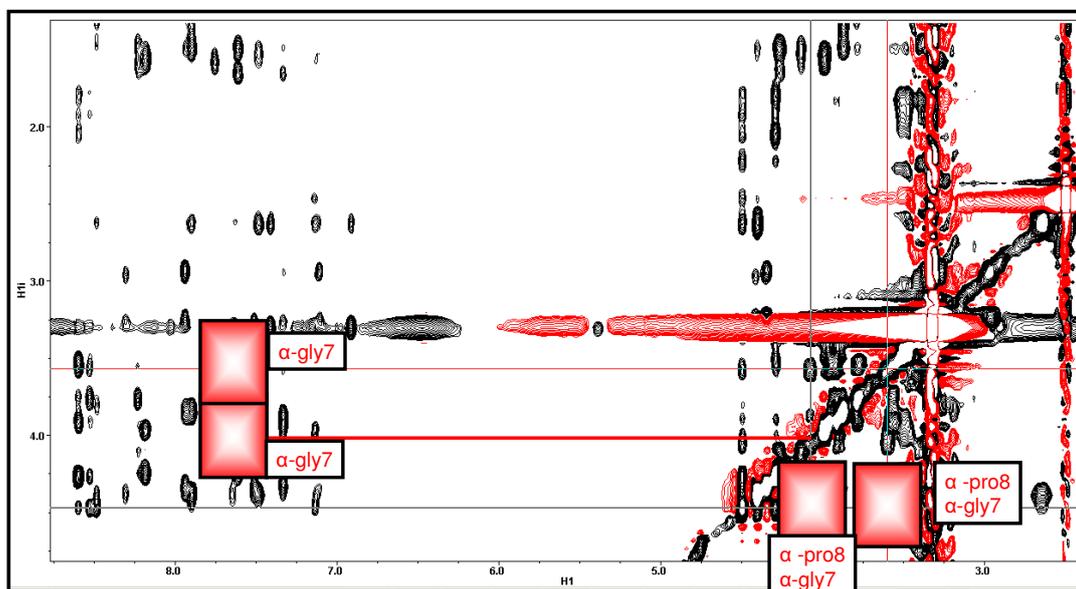


Figura 31. Espectro de NOESY mostrando uma das correlações que caracterizam a prolina da conformação *cis*.

As correlações encontradas permitiram concluir de que o peptídeo possuía a prolina em sua forma *cis* ou *trans*. O peptídeo com as correlações encontradas no experimento de NOESY está representado na **Figura 32**.

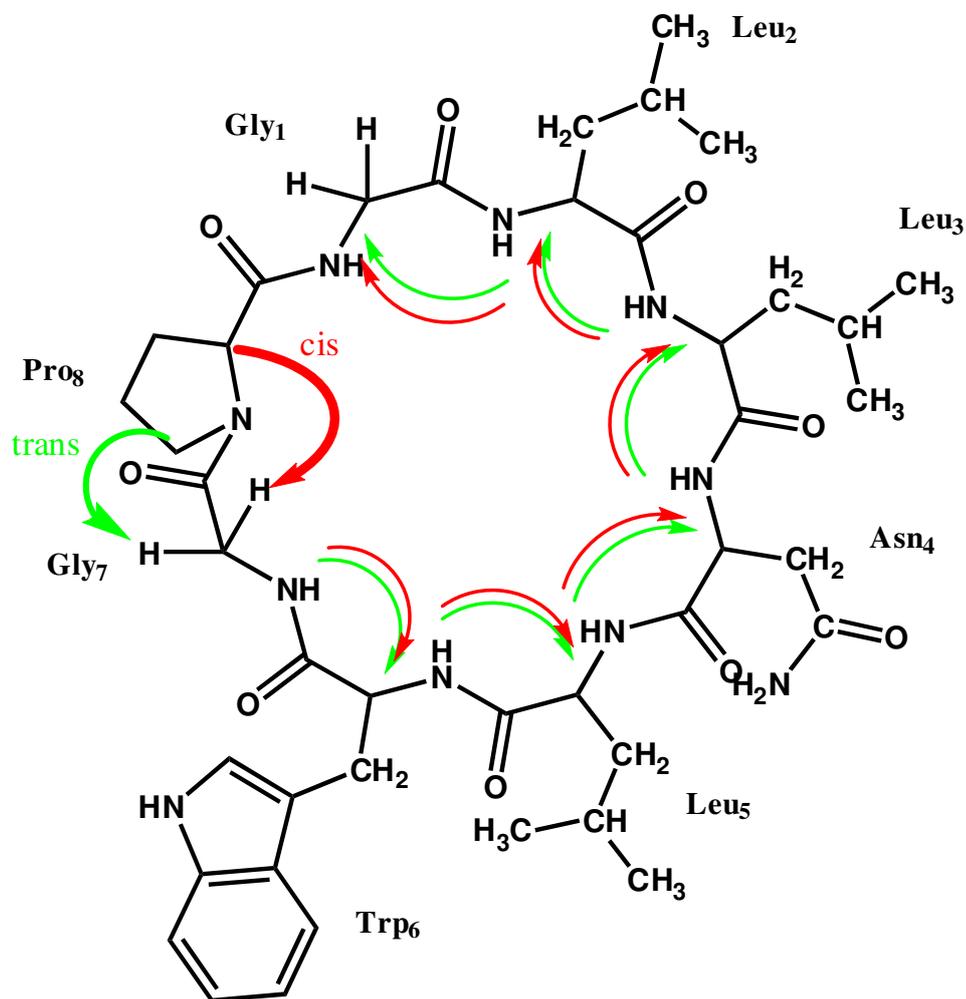


Figura 32 . Peptídeo A com correlações $NH_i-\alpha H_{i+1}$.

Ao fim da elucidação pelos espectros de RMN, a seqüência encontrada foi a seguinte:



O peptídeo, de estrutura inédita, foi denominado Jatroidina I.

A fórmula molecular considerando os dados obtidos foi de $C_{42}H_{62}N_{10}O_9$. Abaixo estão duas representações da estrutura desenhadas no software Chemdraw Ultra 10.0.

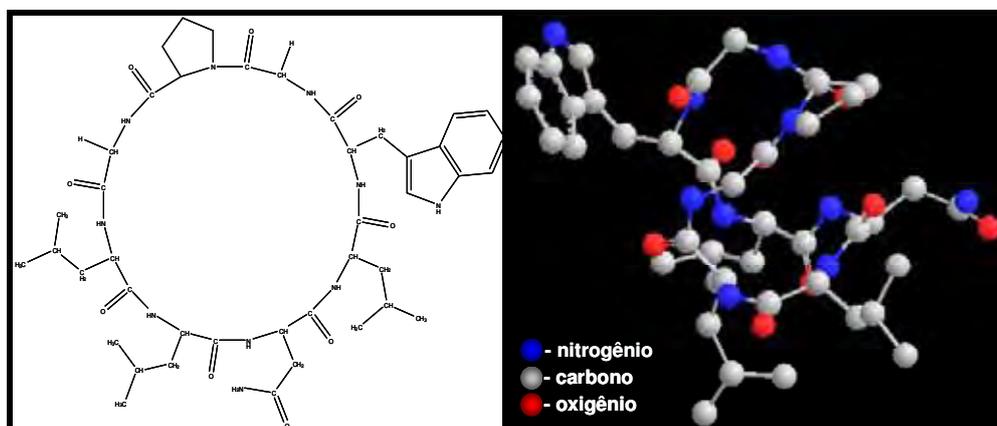


Figura 33. Estrutura do peptídeo cíclico Jatroidina I, seqüência de aminoácidos em duas e três dimensões.

5.5 Estudo de dinâmica molecular

Os experimentos de dinâmica molecular aliados à metodologia de simulated annealing nos permitiram descrever o comportamento dinâmico da orientação do resíduo prolina, demonstrando que mesmo dentro de uma mesma orientação o peptídeo pode adotar conformações parecidas, porém levemente diferentes. Além disso, podemos concluir que as orientações do resíduo prolina podem se interconverter e, assim, alterar a conformação do peptídeo de um estado para o outro, o que ajuda a explicar os dados obtidos por NOESY. Essa visualização não seria possível mediante o uso de modelagem molecular, que permitiria a visualização de apenas um modelo estático levando-se em conta a orientação do resíduo prolina. Como os experimentos de NOESY demonstraram que há uma mistura de conformações, o estudo de dinâmica molecular mostrou-se eficiente para a explicação dos dados experimentais.

Baseando-se nos espectros de NOESY, as distâncias dos hidrogênios do peptídeo Jatroidina I foram travadas de forma a obter o resíduo de prolina tanto na posição *cis* quanto *trans*. Isso foi feito por meio da adição de parâmetros na topologia da conformação do peptídeo. Posteriormente, foi realizado o simulated

annealing (AS) no pacote GROMACS de simulação de dinâmica molecular para obtenção dos prováveis confôrmeros de menor energia livre em solução.

Estes estudos originaram duas ilustrações das prováveis conformações assumidas pelo peptídeo, considerando-se a hipótese de uma conformação *cis* e *trans* para a prolina.

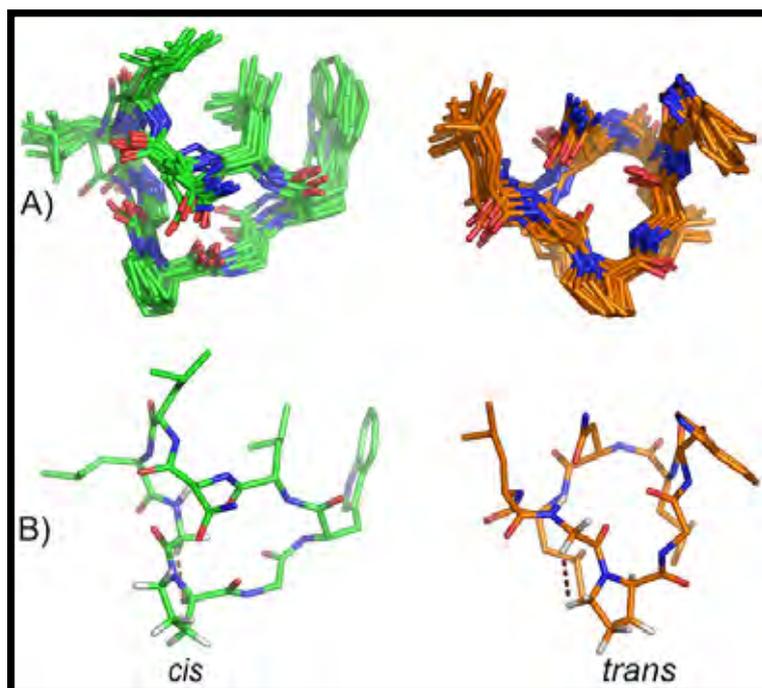


Figura 34. A- Sobreposição de 10 conformações do peptídeo Jatrofídina I, em 2 orientações diferentes, contendo as violações mais baixas das restrições H-H, obtidas do SA/MD. B- Confôrmeros *cis* e *trans* de Jatrofídina I.

5.6 Síntese peptídica em fase sólida

Para realizar a síntese dos peptídeos cíclicos de *Jatropha*, primeiramente foi utilizada a estratégia de síntese em fase sólida para a obtenção da cadeia linear, e posteriormente houve uma reação de ciclização “cabeça-cauda” em solução, para a obtenção do ciclopeptídeo.

As sínteses foram efetuadas utilizando a resina (suporte sólido) Fmoc-Gly-Wang. A resina Wang é um suporte de poliestireno funcionalizado com o grupo 4-hidroximetilfenoxi. Este grupo permite a ligação do primeiro aminoácido à resina, sendo esta ligação lábil a ácidos. A ligação da glicina à resina Wang ocorre através da reação de esterificação entre o grupo OH do linker e o aminoácido glicina

protegido com um Fmoc (grupo fluorenil-9-metiloxicarbonil) (**Figura 35**), obtendo-se ao final da síntese o peptídeo com o grupo C-terminal na forma de carboxilato. Neste trabalho, a resina foi adquirida já com o resíduo Fmoc-glicina acoplado à resina, sendo necessária somente a retirada do grupo protetor Fmoc para que o próximo resíduo da cadeia fosse acoplado.

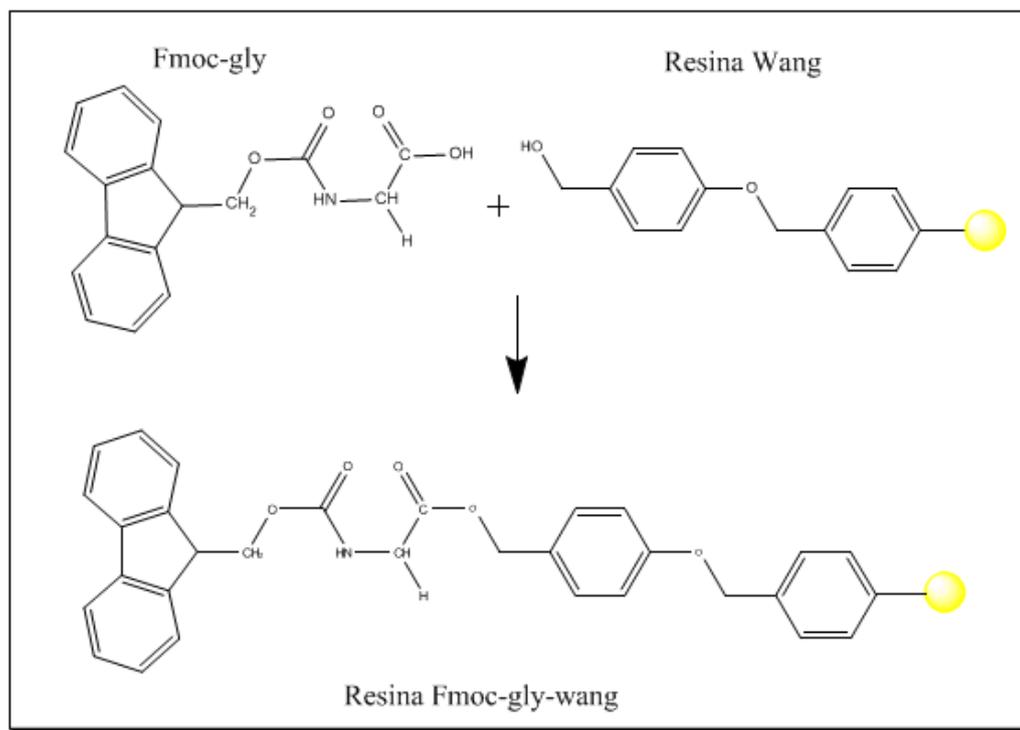


Figura 35. Esquema simplificado da obtenção de uma resina Fmoc-Gly-Wang

Para o alongamento da cadeia, um aminoácido com o α -amino grupo protegido, reage através do grupo carboxila com o grupo α -amino do aminoácido ligado ao suporte, e em seguida, o protetor temporário é removido e o próximo aminoácido acoplado. A remoção do grupo protetor Fmoc (desproteção) é realizada por uma base (amina secundária), que através de uma reação de eliminação remove este grupo, deixando o carboxi terminal do aminoácido livre para o ataque nucleofílico do nitrogênio do resíduo posterior da síntese. Estas etapas são repetidas até que todos os resíduos da cadeia estejam ligados. Após a obtenção do peptídeo desejado, o polímero e os protetores das cadeias laterais são então removidos pelo TFA (**Figura 36**) e separado mediante filtração (**Figura 37**).

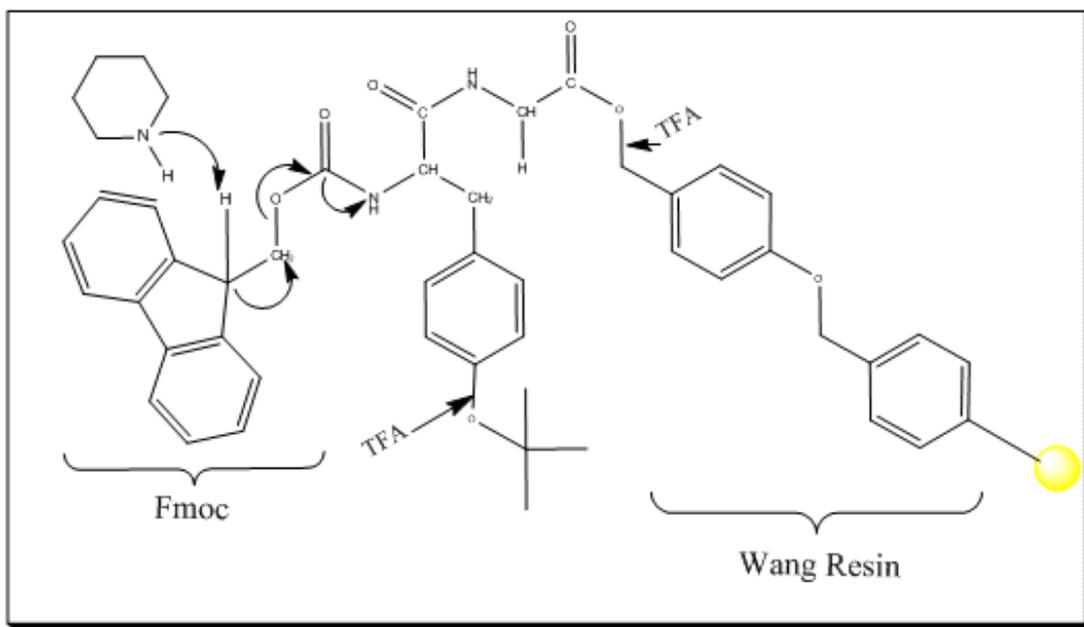


Figura 36. Clivagem do grupo Fmoc por piperidina (que ocorre ao final de cada reação de acoplamento), e locais aonde a clivagem ácida ocorre após o término da seqüência. Essas reações são realizadas separadamente.

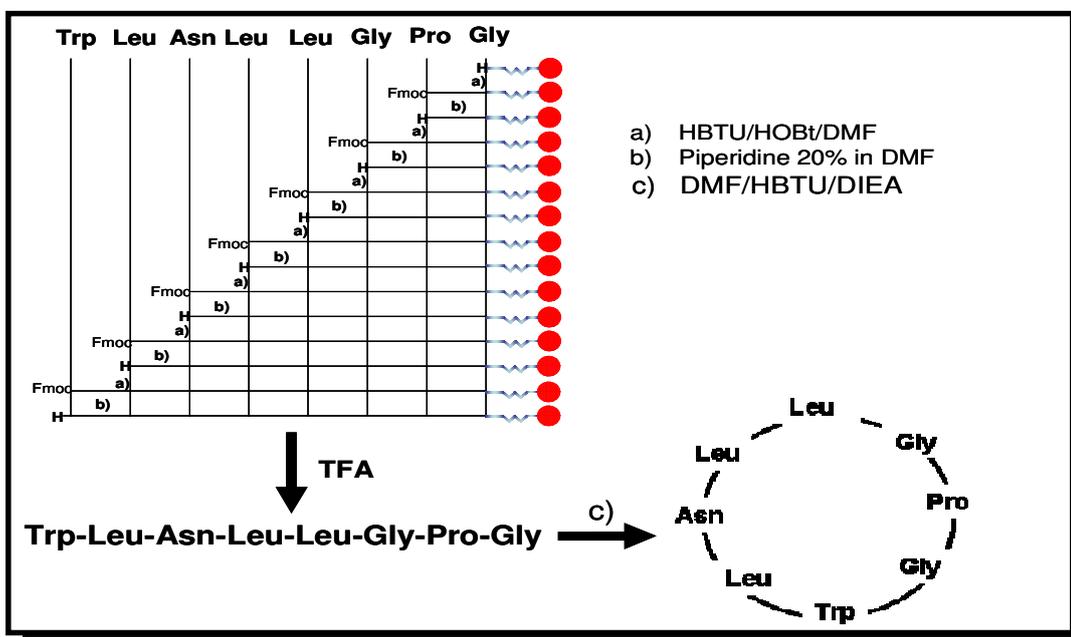


Figura 37. Esquema simplificado da síntese peptídica em fase sólida. A cadeia linear é sintetizada sob o suporte sólido através de reações de acoplamento e desproteção. Ao final a cadeia linear é clivada da resina e posteriormente submetida à reação de ciclização da cadeia.

O protocolo das sínteses realizadas pode ser representado pelo seguinte esquema:

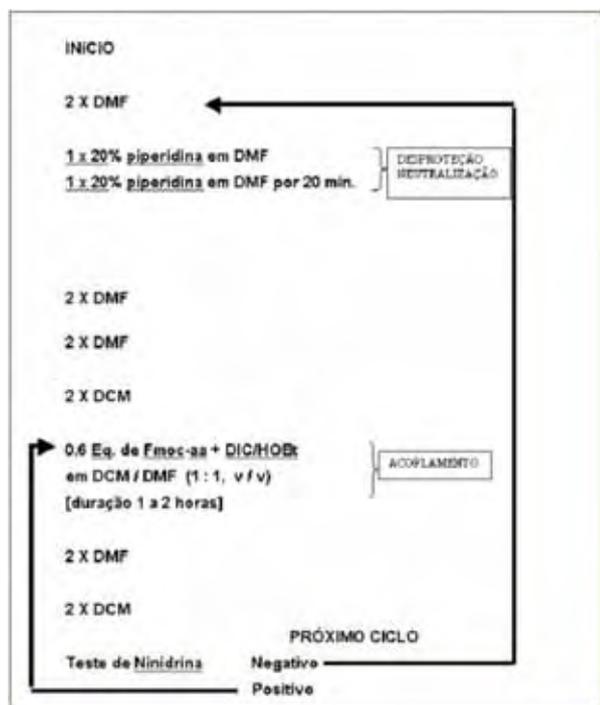


Figura 38. Protocolo de síntese em fase sólida empregado.

5.6.1 Síntese do peptídeo Jatroidina I

A síntese do peptídeo Jatroidina I foi proposta objetivando obtenção de mais material para a realização de estudos biológicos, visto que o primeiro isolamento a partir da planta não resultou em bons rendimentos.

Foi realizada a síntese de uma cadeia análoga à elucidada: GLLNLWGP, utilizando-se resina do tipo Fmoc-Gly-Wang, com grau de substituição de 0,66 mmol/g, o que significa que em 1g de resina pesada havia 0,66 mmol de aminoácido ligado. A escala utilizada foi para a obtenção de 48,0 mg de peptídeo, o que resultou em escala de 0,2 mmol para a síntese. Seguem os cálculos:

- $1 \text{ mol}_{\text{peptídeo}} \text{ ----- } 850,00 \text{ g}$
- $0,1 \text{ mmol}_{\text{peptídeo}} \text{ ---- } 85,1 \text{ mg}$

Como o rendimento da síntese normalmente é por volta de 30% seriam obtidos aproximadamente 25 mg de peptídeo. Para 50 mg, a escala foi de 0,2 mmol.

Assim, a quantidade de aminoácidos pesados foi o equivalente a 0,4 mmol, um excesso de 2x do aminoácido para aumentar o rendimento da reação de acoplamento. A massa de resina utilizada foi de 0,303g e a massa de cadeia linear obtida foi de 151,8 mg, que corresponde a um rendimento de 87,7%.

Após o término da síntese da cadeia linear, o suporte sólido foi separado do peptídeo por meio de clivagem ácida, utilizando-se o TFA, que cliva simultaneamente a resina e os protetores das cadeias laterais dos aminoácidos.

Para a ciclização da cadeia, 100 mg do peptídeo linear foram solubilizados em DMF para a obtenção de uma solução de concentração 1mM, e posteriormente foi adicionada uma solução com os agentes acoplantes HOBt, HBTU e a base DIEA. A base é necessária para desprotonar o HBTU, cuja forma ativa é a desprotonada. Durante a reação, houve monitoração do pH, que permaneceu básico.

Após 2 horas de reação, a solução foi transferida para um funil de separação e particionada com acetato de etila. A fração acetato de etila da partição foi então concentrada e purificada em gradiente 35 a 60% de B em 120 minutos e análises em isocrático de 38% de B em 7 minutos. A massa de peptídeo cíclico obtido, denominado WA0717 foi de 18,0 mg.

A **Figura 39** mostra a comparação do perfil cromatográfico da cadeia linear e do peptídeo após a ciclização. Pode-se observar que há um aumento no tempo de retenção do peptídeo cíclico em relação ao linear, pois a ciclização diminui a polaridade da substância.

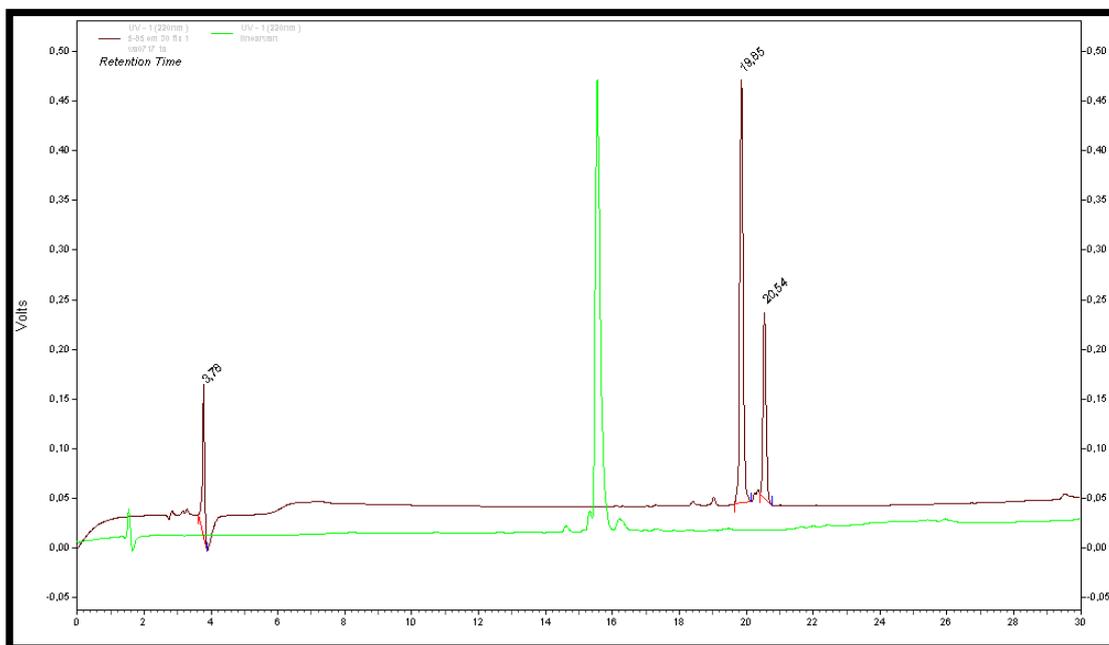


Figura 39. Cadeia peptídica linear (verde), e após a ciclização (vermelho).

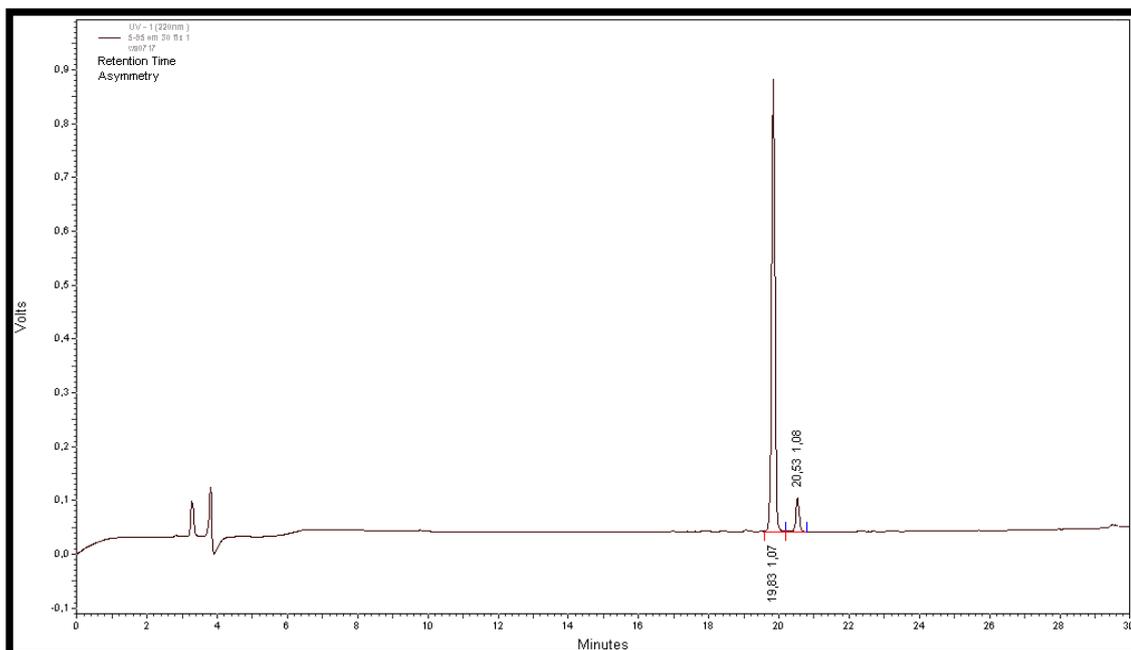


Figura 40. Análogo sintético da Jatroidina I.

O tempo de retenção apresentado para o WA0717 é o mesmo do peptídeo Jatroidina I, o que comprovou a eficiência da síntese.

5.6.2 Síntese do peptídeo *Jatrofidina I* com *D*-aminoácidos

Foi proposta a síntese de outro análogo de cadeia do peptídeo cíclico *Jatrofidina I*, porém com a utilização de aminoácidos de configuração *D*.

O mesmo protocolo descrito para o WA0717 foi empregado. Foi utilizada uma quantidade de 0,730g de resina Fmoc-Gly-Wang com grau de substituição 0,55 mmol/g, com escala de 0,4mmol, e método de acoplamento DIC/HOBt. Foram obtidos 300,0 mg de peptídeo linear, que corresponde a um rendimento de 86,3% .

Para a etapa de ciclização foram utilizados 200 mg do peptídeo linear. Após a partição com acetato de etila, foi realizado um clean up da amostra, visto que produtos de reações colaterais encontravam-se em grande quantidade, dificultando a purificação. Após o clean up, foi obtida uma massa de material de 60 mg.

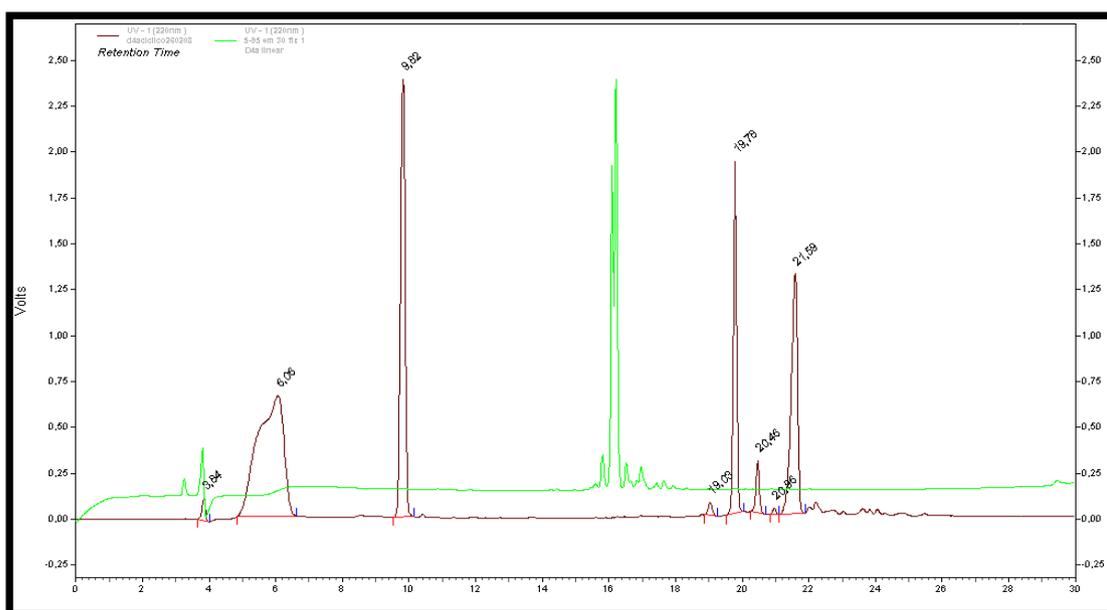


Figura 41. Perfil cromatográfico da *Jatrofidina I* com *D*-aminoácidos linear (verde) e cíclica (vermelho).

Este peptídeo foi submetido à 2 purificações, porém não foram obtidas frações com grau de pureza acima de 90%. O material foi armazenado para uma próxima tentativa de purificação e também foi enviado para ensaio de inibição de proteases.

5.6.3 Síntese do peptídeo Polianina A com D-aminoácidos

Também foi realizada a síntese do peptídeo Polianina A com D-aminoácidos para envio à ensaios biológicos. Utilizando-se o mesmo protocolo, foi empregada uma massa de 0,730g de resina, com grau de substituição de 0,55 mmol/g. Foram obtidos 210,9 mg de peptídeo linear, com rendimento de 68,12%. Para a etapa de ciclização foram utilizados 139 mg do peptídeo linear, resultando em 93,7mg de material cíclico bruto denominado D-polianina A BR(**Figura 42**).

O ciclopeptídeo bruto foi purificado utilizando-se gradiente convexo de 40 a 70% de B, e as análises foram feitas em isocrático 50% de B em 12 minutos. Foram obtidos 29,0 mg de D-polianina A puro (**Figura 43**).

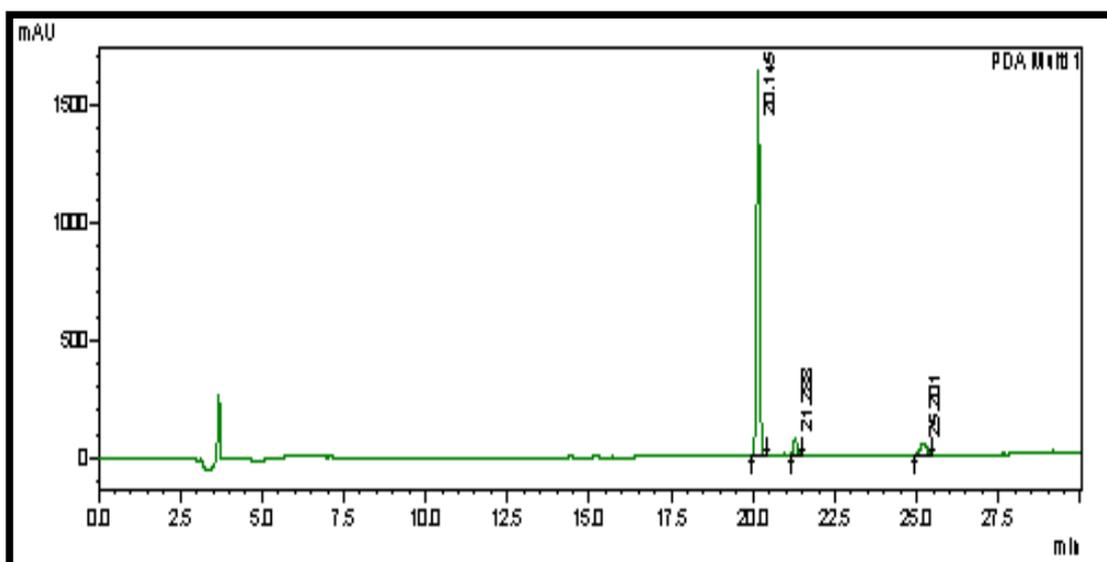


Figura 42. Perfil cromatográfico do peptídeo D-polianina A bruto.

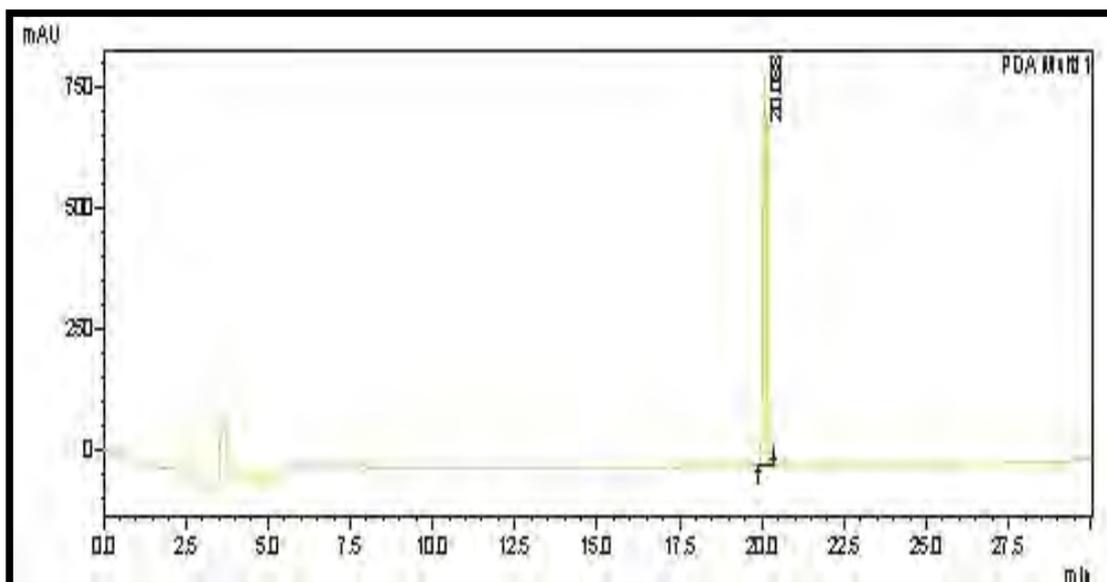


Figura 43. Perfil cromatográfico do peptídeo D-polianina A puro.

5.7 Testes biológicos

5.7.1 Ensaio de inibição fluorimétrica de proteases

5.7.1.1 Ensaio de inibição da subtilisina e pepsina

Os peptídeos sintéticos puros D-Polianina e D-Jatrofidina cíclicos e lineares foram testados no ensaio de inibição das proteases pepsina e subtilisina. Os resultados estão demonstrados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Inibição das enzimas pepsina e subtilisina

Amostra	Pepsina		Subtilisina	
	%I			
Peptídeos	1 µg/mL	0,1 µg mL	1 µg/mL	0,1 µg mL
D-Polianina Linear	49,40	38,97	nd	18,69
D-Polianina Cíclica	17,23	14,83	0	0
D-Jatroidina Linear	1,55	0,03	nd	28,26
D-Jatroidina Cíclica	48,21	34,33	0	0
Inibidores padrão				
Pepstatina (12,5 uM)	54,93			
Aprotinina (50 uM)			37,36	

Interessantemente, a D-Polianina linear e a D-Jatroidina cíclica apresentaram significativa atividade inibitória específica sobre a pepsina, sem alterar, no entanto, a atividade inibitória da subtilisina. A relação entre a diferença das estruturas da D-Polianina linear e da D-Jatroidina cíclica e semelhança entre suas atividades devem ser investigadas futuramente em experimentos de relação estrutura-atividade.

Os resultados mostraram que os peptídeos testados apresentaram atividade seletiva sobre a pepsina, sem alterar a atividade da subtilisina. Estas proteases pertencem a diferentes famílias, proteases aspárticas e serínicas, respectivamente, que estão relacionadas com distintas atividades na manutenção do organismo humano ou com o desenvolvimento de doenças. Como exemplos de proteases aspárticas de interesse farmacológico podemos citar a protease do vírus HIV e a renina, e a protease do vírus da hepatite C e a elastase, para proteases serínicas.

Considerando-se que as proteases de uma mesma família mantêm em seu sítio catalítico os mesmos resíduos de aminoácidos, estes ensaios enzimáticos podem ser utilizados num pré-screening de substâncias ativas.

5.7.2 Avaliação da atividade antimalárica

O peptídeo Polianina A foi descrito na literatura como uma estrutura de atividade antimalárica, sendo, portanto, submetido a este teste.

Análise dos complexos entre heme-substância usando espectrofotômetro.

A mudança na banda Soret depende do pH, da polaridade do solvente e da natureza do ligante que interage com a porfirina. Na presença de cloroquina (**Figura 45a**) é possível perceber uma diminuição da banda Soret, que pode ser atribuída à formação de complexo (doador-aceptor) entre estas moléculas. (DASCOMBE et al., 2005)

O peptídeo testado, (**Figura 44**), que não apresenta um valor considerado de absorvância na concentração de 25 μM entre 350-450 nm, linha em amarelo (**Figura 45b**), evidenciou *in vitro* um aumento considerado da banda Soret do heme, indicando que o mesmo está interagindo com o heme. Compostos de amônio Bis-quaternário, que exibem potente atividade *in vitro* nas cepas do *Plasmodium* (IC_{50} = 25 nM) e são considerados uma nova classe de antimaláricos promissores, ligam-se ao heme causando um aumento considerado na banda Soret do heme. (BIAGINI et al., 2003)

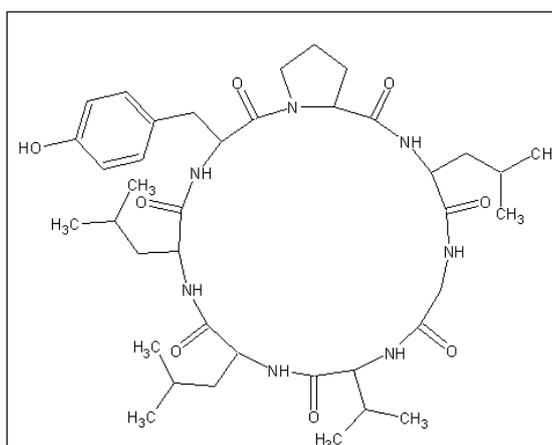


Figura 44. Estrutura do peptídeo polianina A ($\text{C}_{39}\text{H}_{61}\text{N}_7\text{O}_8$).

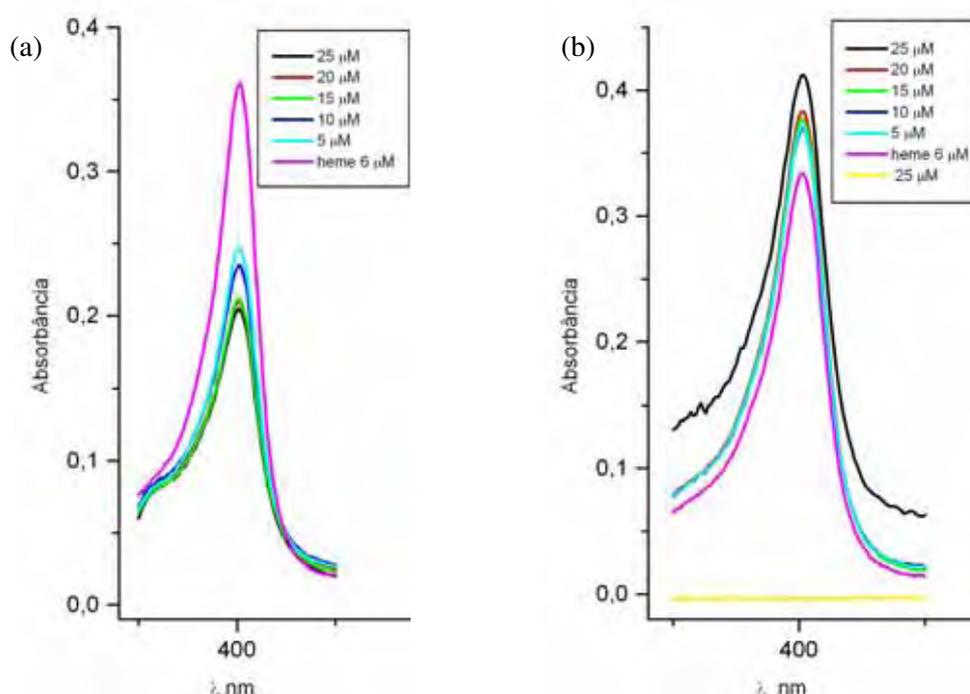


Figura 45. Variações do espectro de UV da hemina em presença de diferentes concentrações de cloroquina (a) e do peptídeo (b).

5.7.3 Avaliação da atividade antifúngica

A atividade antifúngica dos peptídeos isolados de *Jatropha curcas* foi avaliada com 4 linhagens. Os resultados estão expostos na **Tabela 4**.

Tabela 4. Valores de CIM* para os peptídeos, testados contra diferentes espécies de fungos.

Fração	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	CIM	CIM	CIM	CIM
Jatroidina I	0,147	0,147	0,147	0,147
Polianina A	0,165	0,165	0,165	0,0429
fluconazol	0,0163	0,051	0,000815	0,01275

* Concentração inibitória mínima, em $\mu\text{mol/mL}$

De acordo com a tabela, o teste mostrou resultados positivos para os peptídeos. A concentração inibitória mínima é alta quando comparada à substâncias comerciais, como por exemplo o fluconazol (de $0,000815\mu\text{mol/mL}$ a $0,0163\mu\text{mol/mL}$), porém, estudos extensos vem sendo feitos na tentativa de se descobrir novas estruturas peptídicas antifúngicas, incluindo química combinatória e análises

diferenciando a atividade entre estruturas cíclicas e lineares (MONROC, et al., 2006), o que vem a ser de grande valia para o estudo de peptídeos cíclicos em plantas quanto a esse aspecto.

5.7.4 Ensaio de Inibição da Atividade da DNA girase

Para este ensaio foram utilizados os peptídeos Jatroidina I (Jatrof.) e Ciclogossina B (CBC) (isolado de *Jatropha gossypifolia*) em concentração de 150 μ M. A DNA girase catalisa o superenovelamento do DNA plasmidial. O plasmídeo superenovelado migra mais na eletroforese, gerando uma banda característica. No caso de uma substância inibidora da DNA-girase, a banda correspondente ao plasmídeo não aparece na corrida.

Com base nas fotografias obtidas do ensaio realizado (**Figura 46**), concluiu-se que os peptídeos testados não possuem atividade inibidora da enzima.

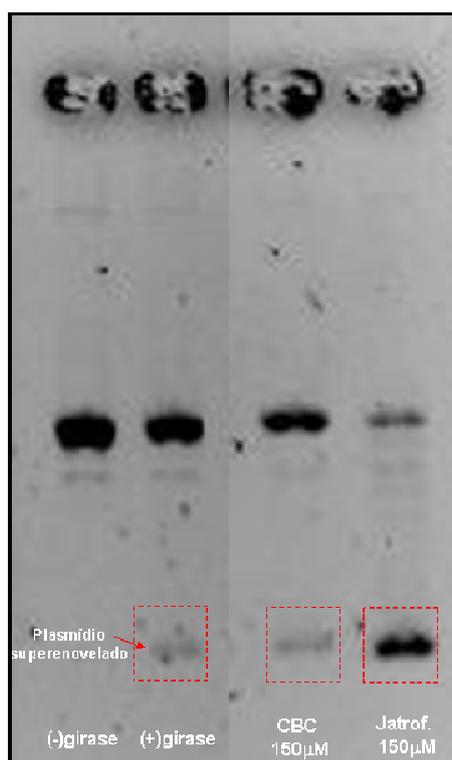


Figura 46. Resultado do teste de inibição de DNA-girase. Poços: 1 (-)girase; 2 (+)girase 1U; Jatrof. – Peptídeo Jatroidina I; CBC – Ciclogossina B cíclico.

5.7.5 Avaliação da atividade antioxidante

Os peptídeos cíclicos WA0717, Polianina A e D-polianina A foram testados quanto à atividade antioxidante. Para a avaliação desta atividade, a rotina foi utilizada como padrão positivo nos dois ensaios (**Figuras 47 e 49**). Os resultados estão representados nas **Figuras 48 e 50**.

5.7.5.1 ABTS

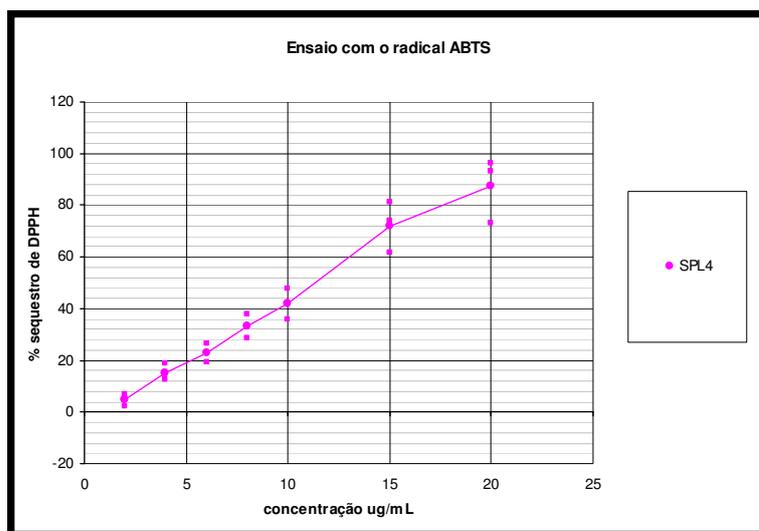


Figura 47. Atividade antioxidante do padrão rutina com ABTS.

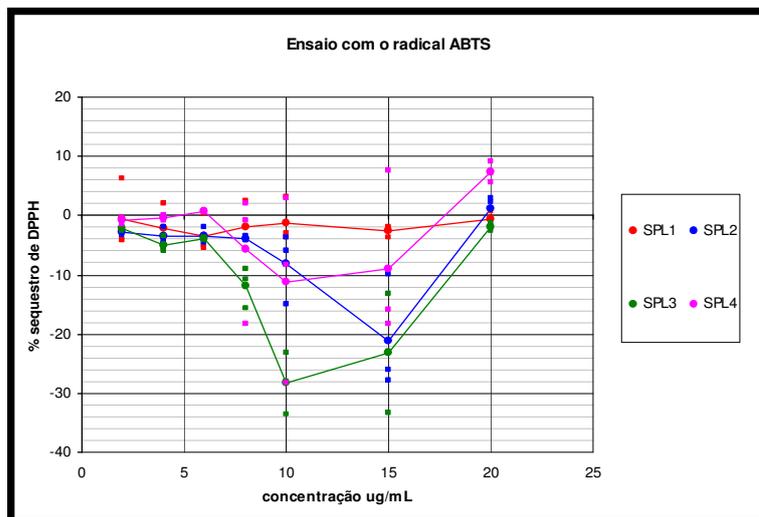


Figura 48. Atividade antioxidante das amostras testadas com ABTS: SPL1 – WA0717; SPL2 – Polianina A; SPL3 – D-polianina A; SPL4 – D-polianina A linear .

5.7.5.2 DPPH

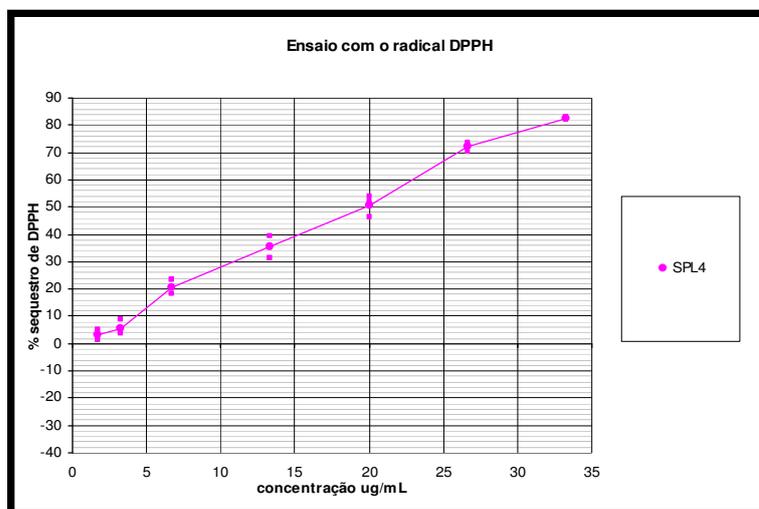


Figura 49. Atividade antioxidante do padrão rutina com DPPH.

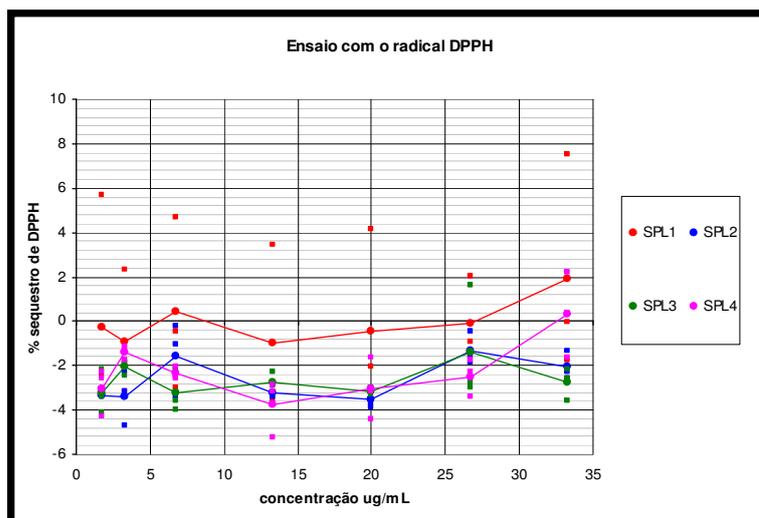


Figura 50. Atividade antioxidante das amostras testadas com DPPH: SPL1 – WA0717; SPL2 – Polianina A; SPL3 –D-Polianina A; SPL4 –D-Polianina A linear .

De acordo com os resultados apresentados, os peptídeos testados não apresentam atividade antioxidante quando comparados ao padrão rutina utilizado.

5.8 Validação de Método para Análise do perfil ciclopeptídico da espécie *Jatropha curcas* L.

Segundo a resolução nº 899 da ANVISA, o objetivo de uma validação é demonstrar que o método utilizado é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Desta forma, para demonstrar a confiabilidade da quantificação de determinada substância em um extrato, o método desenvolvido para análise deve passar pelos seguintes ensaios: especificidade, linearidade, intervalo, precisão (repetibilidade), exatidão e robustez.

Para o caso da quantificação dos peptídeos cíclicos de *Jatropha curcas* L., todos os ensaios foram realizados visando à confiabilidade do método para a avaliação do perfil ciclopeptídico. Devido à presença de dois peptídeos cíclicos, os testes foram realizados para cada um deles, com o objetivo de validar um método capaz de quantificar as duas substâncias simultaneamente.

5.8.1 Preparação da amostra para análise

O extrato utilizado para a validação do método foi a fase acetato de etila da partição do látex da planta. Para a obtenção da amostra, inicialmente 0,5 mL(V1) de látex foram solubilizados em 4 mL de água (8xV1), com 4 gotas de etanol; a mistura foi então particionada com 10 mL (20xV1) de acetato de etila 5 vezes. O extrato foi submetido aos ensaios exigidos para a validação do método.

5.8.2 Especificidade e seletividade

Estas propriedades se relacionam com a capacidade do método em detectar e quantificar um composto (marcador) na presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Os requisitos necessários para a avaliação destes itens são o monitoramento do grau de pureza

do analito por detectores específicos como detector ultravioleta com arranjo de diodos (DAD) ou massas.

Primeiramente o extrato e os peptídeos puros foram analisados em um gradiente exploratório de 5-95% de solvente B em 30 minutos. De acordo com o espectro observado, foi desenvolvido um método isocrático de 45% de B em 12 minutos. Os peptídeos cíclicos Jatroidina I e Polianina A foram monitorados no método analítico pelo detector DAD e o grau de pureza e a validade do método foram confirmados (**Figura 51**).

As condições utilizadas foram: coluna C-18 – Júpiter 5 μ C-18 300A – Phenomenex – P/N^o 00G-4053 – EO – S/N 357630-6 – dimensões 250 x 4,60mm, fluxo 1mL/min, volume injetado: 20 μ L, fase móvel: ACN com 0,036% de TFA e H₂O com 0,045% de TFA (50/50). Cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU – PROMINENCE SPD M20A – Diode Array Detector; auto sampler SIL-20A; CBM 20A; Degasser PROMINENCE – DGU – 20A₃; forno CTO-20A/20AC e bombas LC – 20AT.

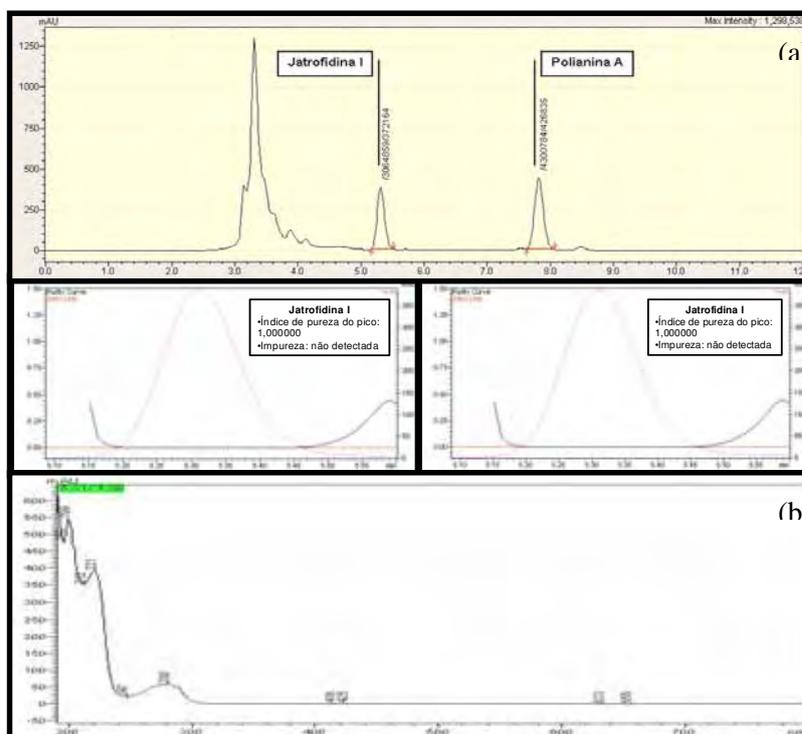


Figura 51. (a) Cromatograma do extrato da partição do látex com acetato de etila mostrando a detecção dos peptídeos Jatroidina I e Polianina A e verificação da pureza dos picos; (b) Espectro de absorção UV.

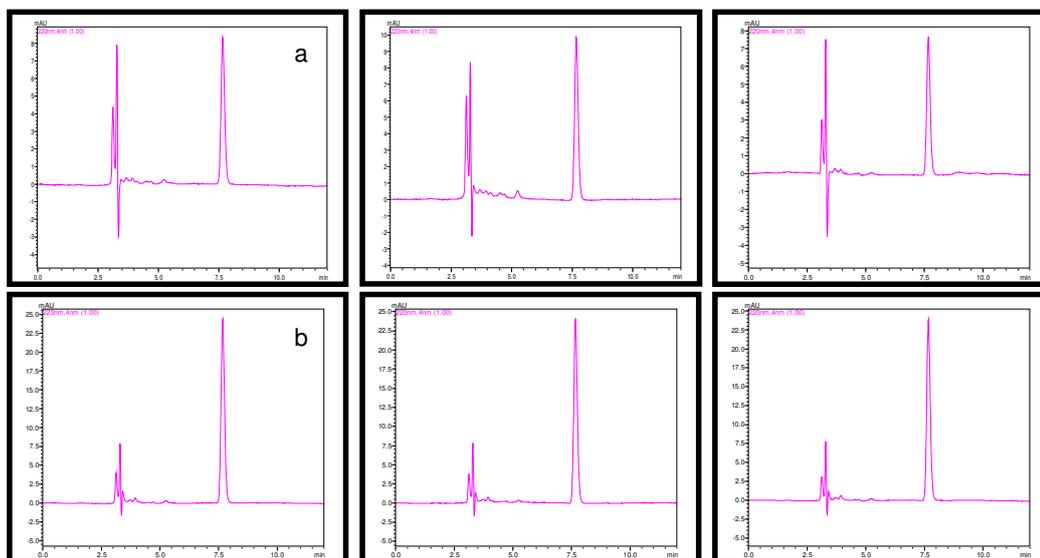
5.8.3 Linearidade e Intervalo

Estes parâmetros comprovam a capacidade da metodologia de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico.

Para a obtenção destes dados, a construção de uma curva de calibração deve ser realizada em triplicata com no mínimo cinco concentrações diferentes e o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação R^2 deve ser de no mínimo 0,99.

Os peptídeos Jatroidina I e Polianina A foram utilizados como padrões na construção das curvas de calibração. As curvas foram geradas com as seguintes concentrações: 0,250; 0,125; 0,0625; 0,030; 0,015; 0,005 mg/mL. Os cromatogramas obtidos estão representados na **Figura 52 e 54**. O coeficiente de linearidade (R^2) encontrado para os peptídeos foi de 0,9999387 para Jatroidina I e 0,9994098 para Polianina A. Os resultados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico (**Tabelas 5 e 6**).

5.8.3.1 Polianina A – curva de calibração e tratamento estatístico



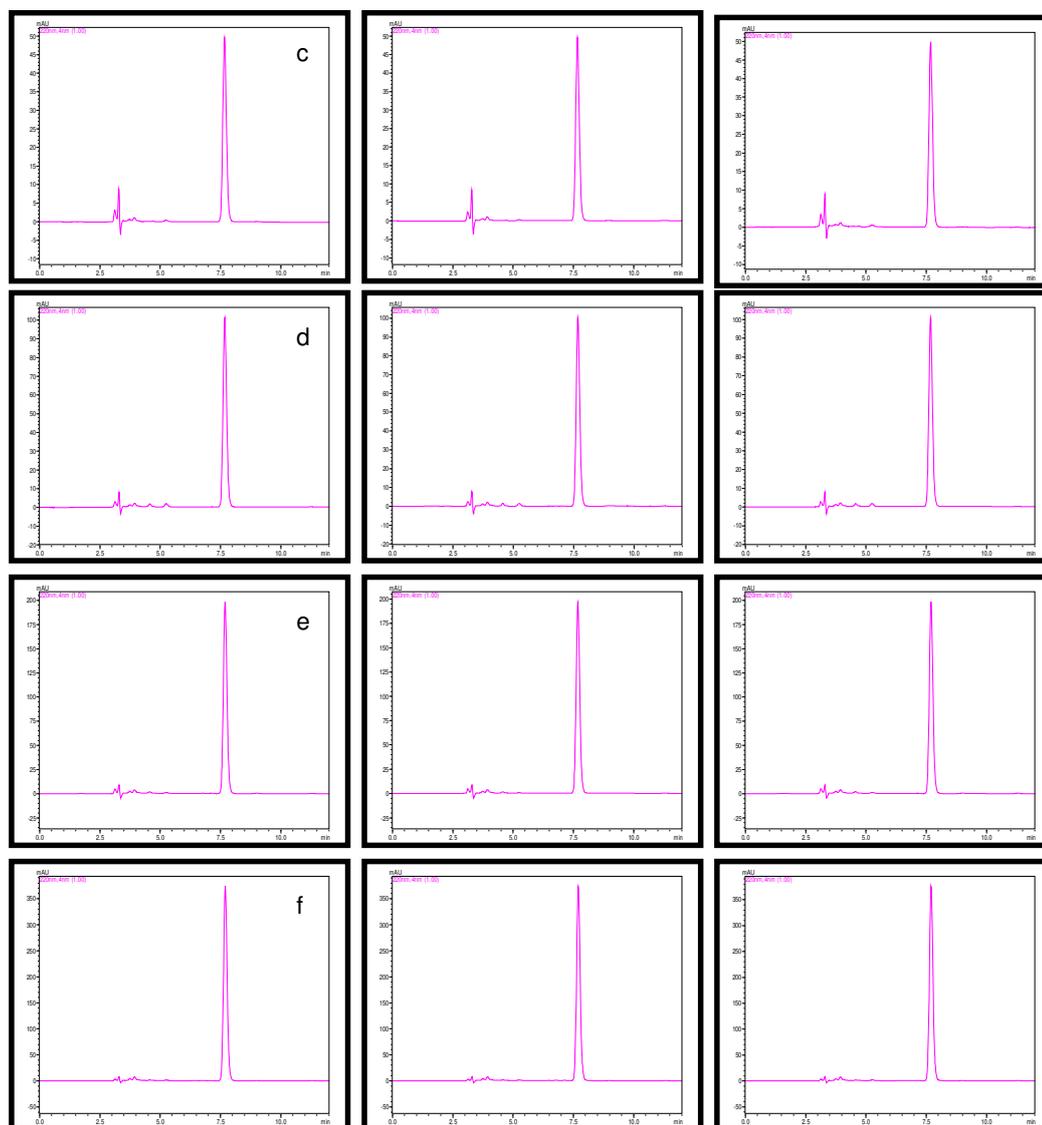


Figura 52. Cromatogramas das diferentes concentrações do peptídeo Polianina A realizadas em triplicata em ordem crescente de concentração. a – 0,005; b – 0,015; c – 0,030; d – 0,0625; e – 0,125; f – 0,25 mg/mL.

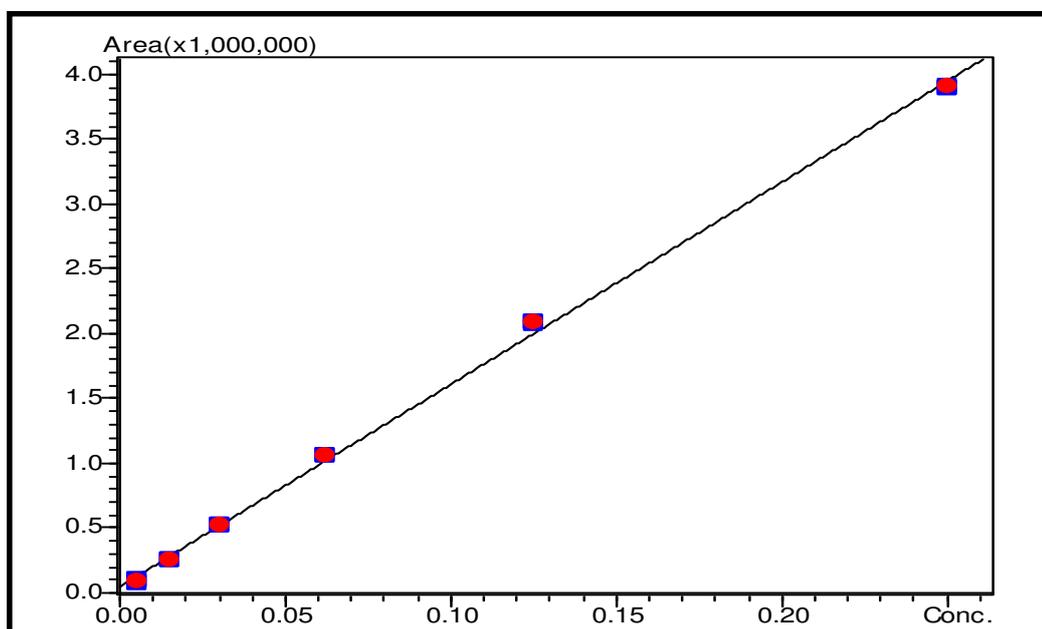
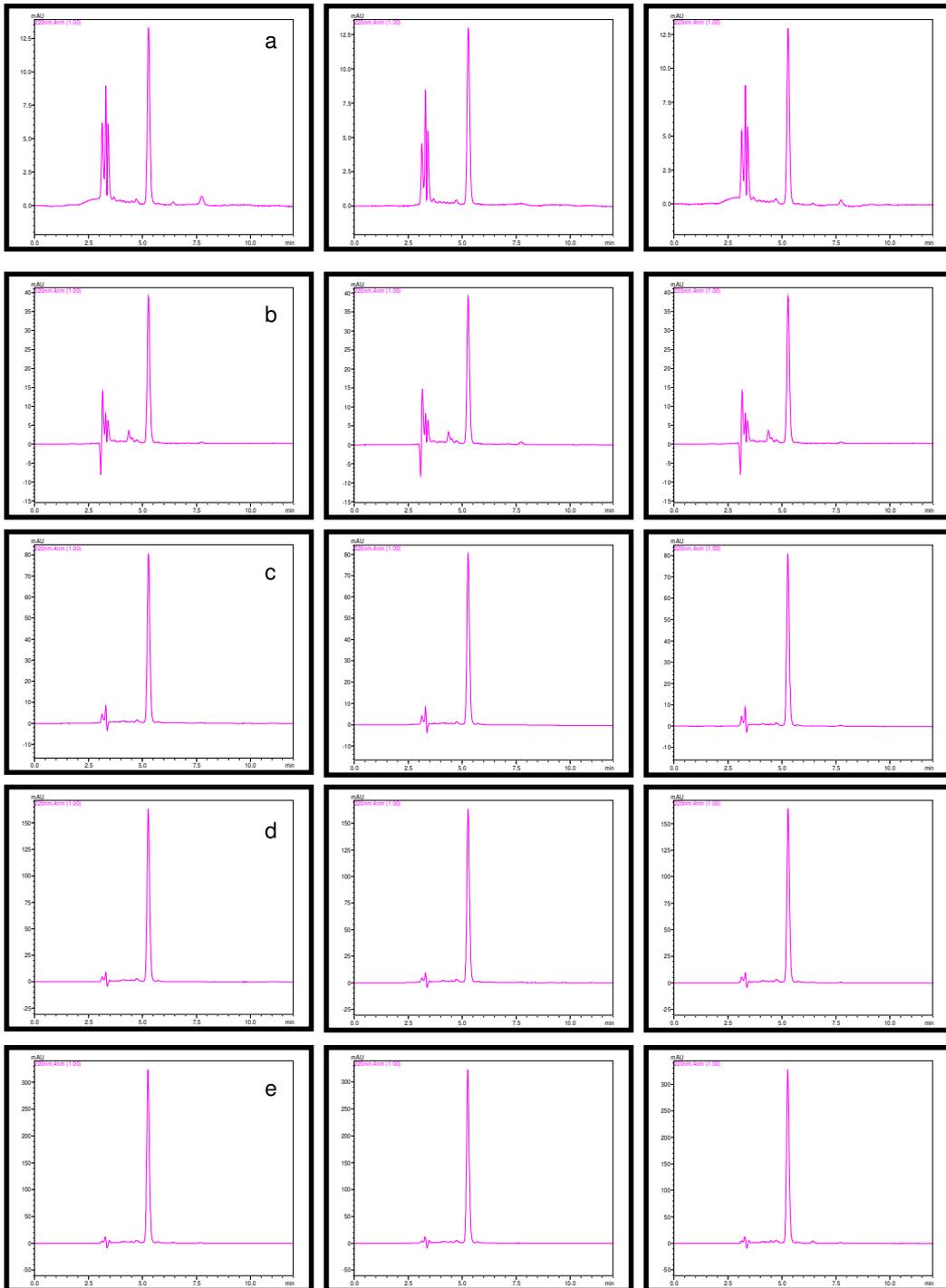


Figura 53. Gráfico da curva de calibração de diferentes concentrações de Polianina A.

Tabela 5. Tratamento estatístico das áreas obtidas das diferentes concentrações.

Concentração (mg/mL)	Resposta (Área em mAU)	Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo (%)
0,25	3892580			
0,25	3900767	3901579	9,431,595	0,241738
0,25	3911391			
0,125	2073740			
0,125	2083921	2082574	8,243,734	0,395844
0,125	2090061			
0,0625	1053271			
0,0625	1054786	1055358	2,423,920	0,229678
0,0625	1058017			
0,03	518045			
0,03	520915	521017	3,023,777	0,580361
0,03	524090			
0,015	250752			
0,015	252464	252898	2,391,807	0,945761
0,015	255476			
0,005	80222			
0,005	86374	89806	11684,28	1,301
0,005	102822			

5.8.3.2 Jatrofidina I – curva de calibração e tratamento estatístico



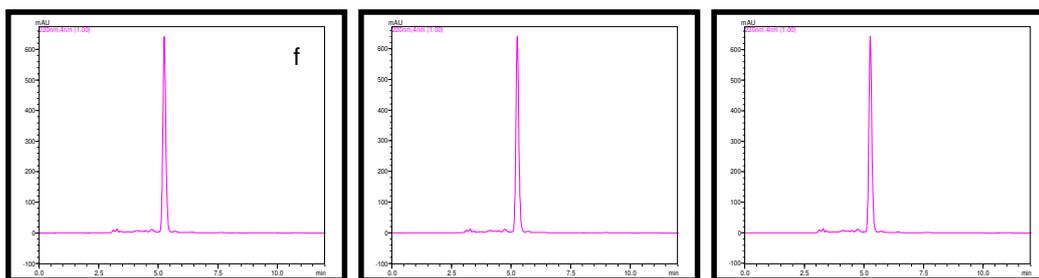


Figura 54. Cromatogramas das diferentes concentrações do peptídeo Jatrofídina I realizadas em triplicata em ordem crescente de concentração. a – 0,005; b – 0,015; c – 0,030; d – 0,0625; e – 0,125; f – 0,25 mg/mL.

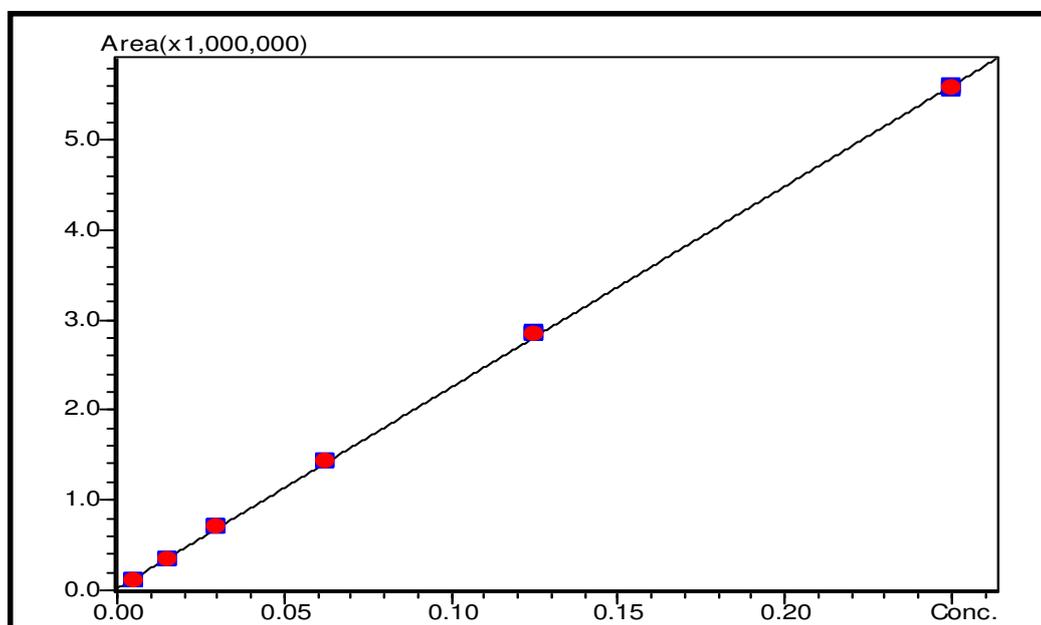


Figura 55. Gráfico da curva de calibração de diferentes concentrações de Jatrofídina I.

Tabela 6. Tratamento estatístico das áreas obtidas das diferentes concentrações.

Concentração (mg/mL)	Resposta (Área em mAU)	Área	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo (%)
0,25	5571829			
0,25	5565322	5580241	20464,38	0,366729
0,25	5603570			
0,125	2835594			
0,125	2831960	2842282	14842,58	0,522206
0,125	2859292			
0,0625	1428321			
0,0625	1428429	1430095	2,980,147	0,208388

0,0625	1433536			
0,03	698793			
0,03	701021	700991	2,184,004	0,311559
0,03	703160			
0,015	333198			
0,015	333623	334108	1,226,293	0,367036
0,015	335502			
0,005	109273			
0,005	110447	110476	1,217,601	1,102,142
0,005	111708			

O tratamento estatístico é o que vai conferir confiabilidade à curva de calibração obtida. O desvio padrão é o objetivo final destes cálculos, e deve possuir um valor menor do que 5%. Como se pode verificar, o valor do desvio padrão ficou na faixa desejada, o que validou as curvas de calibração dos peptídeos.

5.8.4 Limite de detecção

O limite de detecção corresponde à menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições estabelecidas. O valor é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. No caso de métodos instrumentais, a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base, ou seja, calcula-se a concentração que a área do ruído corresponde, e o limite de detecção é este valor multiplicado por 3.

5.8.4.1 Polianina A

Para a obtenção do limite de detecção para a Polianina A, dois cromatogramas do peptídeo com concentração 0,005mg/mL foram analisados, e a área do ruído foi detectada (**Tabela 7**).

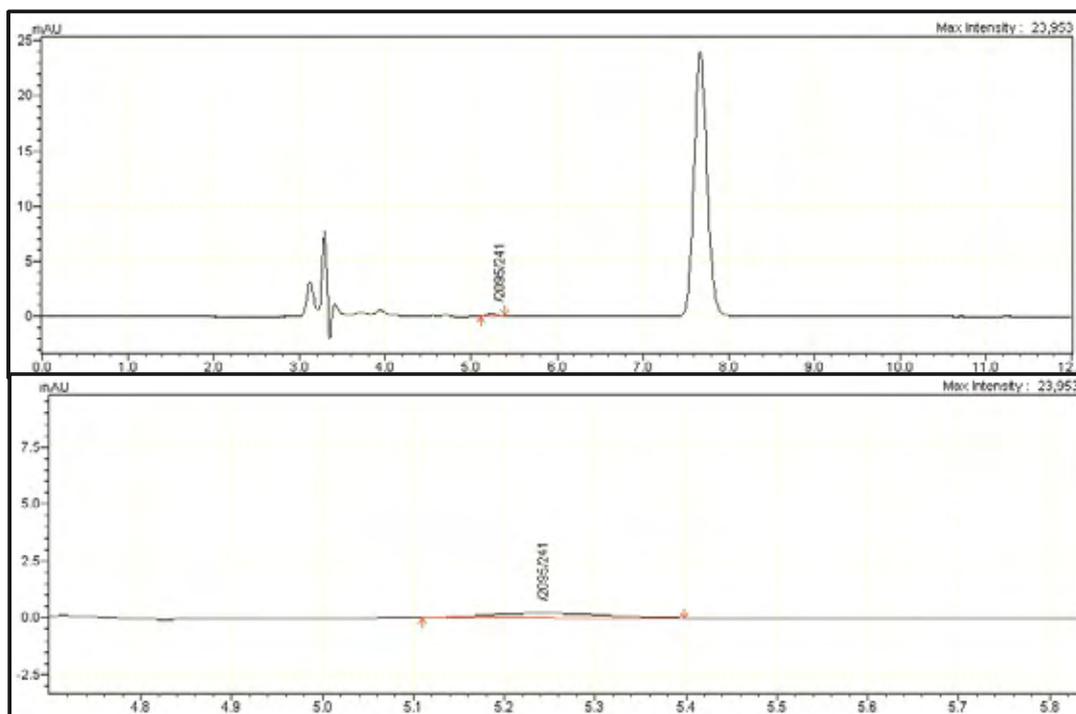


Figura 56. Cromatograma do padrão Polianina A na concentração de 0,005mg/mL.

Tabela 7. Resultados do limite de detecção - Polianina A

Área do Ruído	Média da área do ruído	Concentração equivalente do ruído (mg/mL)	Média da Concentração Equivalente do Ruído (mg/mL)
2095	2056,5	$9,482 \times 10^{-5}$	$9,308 \times 10^{-5}$
2018		$9,133 \times 10^{-5}$	
Limite de Detecção (concentração): $2,792 \times 10^{-4}$ mg/mL			

5.8.4.2 Jatroidina I

O mesmo procedimento descrito anteriormente foi aplicado, os dados estão representados na **Figura 57** e na **Tabela 8**.

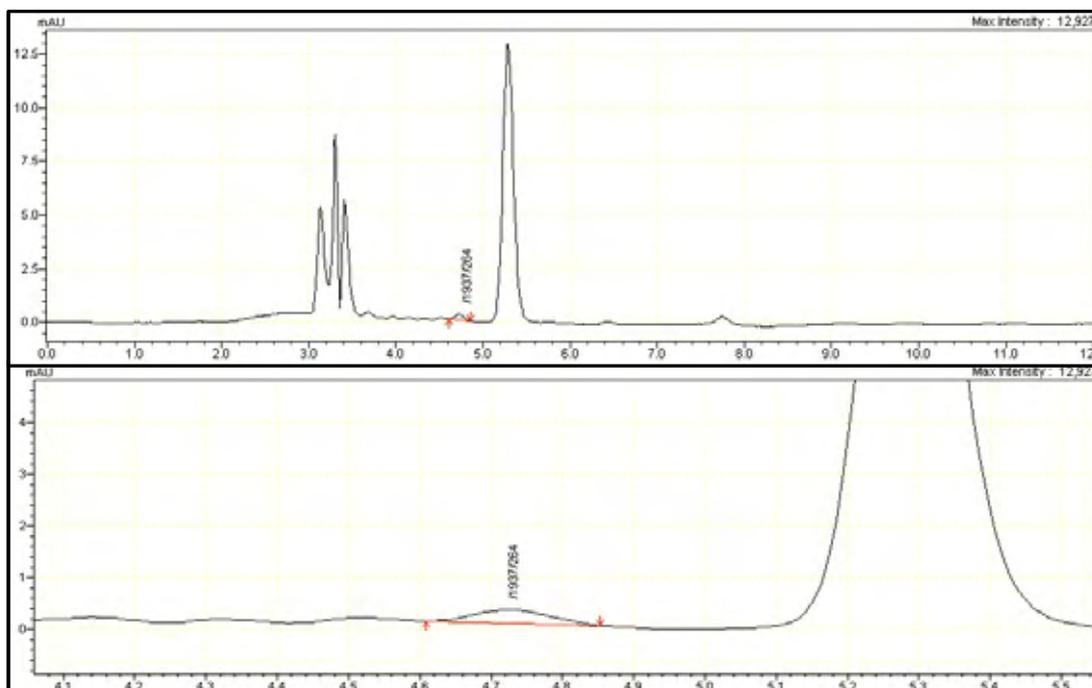


Figura 57. Cromatograma do padrão Jatroidina I na concentração de 0,005mg/mL.

Tabela 8. Resultados do limite de detecção – Jatroidina I

Área do Ruído	Média da área do ruído	Concentração equivalente do ruído (mg/mL)	Média da Concentração Equivalente do Ruído (mg/mL)
1937	2017	$8,767 \times 10^{-5}$	$9,119 \times 10^{-5}$
2097		$9,471 \times 10^{-5}$	
Limite de Detecção (concentração): $2,735 \times 10^{-4}$ mg/mL			

5.8.5 Limite de Quantificação

Limite de Quantificação é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantificada pelo método com precisão e exatidão.

O limite de quantificação é determinado pela relação de 10 vezes o ruído da linha de base. Os valores dos limites de quantificação dos dois peptídeos estão expostos nas **Tabelas 9 e 10**.

5.8.5.1 Polianina A

Tabela 9. Resultados do limite de quantificação – Polianina A.

Área do Ruído	Média da área do ruído	Concentração equivalente do ruído (mg/mL)	Média da Concentração Equivalente do Ruído (mg/mL)
2095	2056.5	$9,482 \times 10^{-5}$	$9,308 \times 10^{-5}$
2018		$9,133 \times 10^{-5}$	

Limite de Quantificação (concentração): $9,308 \times 10^{-4}$ mg/mL

5.8.5.2 Jatroidina I

Tabela 10. Resultados do limite de quantificação – Jatroidina I.

Área do Ruído	Média da área do ruído	Concentração equivalente do ruído (mg/mL)	Média da Concentração Equivalente do Ruído (mg/mL)
1937	2017	$8,767 \times 10^{-5}$	$9,119 \times 10^{-5}$
2097		$9,471 \times 10^{-5}$	

Limite de Quantificação (concentração): $9,119 \times 10^{-4}$ mg/mL

5.8.6 Precisão

A análise de **Precisão** está dividida em três etapas: repetibilidade (precisão intra-corridas), precisão intermediária (precisão inter-corridas) e reprodutibilidade, sendo solicitado somente a repetibilidade para análises de matéria-prima.

5.8.6.1 Repetibilidade

Este parâmetro avalia a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com análises realizadas pelo mesmo analista e com a mesma instrumentação.

Para a medida da repetibilidade, são verificadas análises da amostra em 3 concentrações diferentes (baixa, média e alta), cada uma analisada em triplicata. A repetibilidade é expressa como desvio padrão relativo (DPR) e o valor máximo aceitável é de <5%.

A fórmula para o cálculo do DPR é:

$$\text{DPR} = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{conc. média experimental}} \times 100$$

Três concentrações diferentes de extrato foram analisadas: Baixa – 0,25 mg/mL (**Figura 58**) ; Média – 0,50 mg/mL (**Figura 59**); Alta – 1,0 mg/mL (**Figura 60**), todas injetadas em triplicata.

Os cálculos de desvio padrão foram tratados separadamente para os dois padrões e estão representados nas **Tabelas 11 e 12**.

- Concentração Baixa (0,25 mg/mL da fração resultante de extração do látex de *Jatropha curcas* L. com acetato de etila):

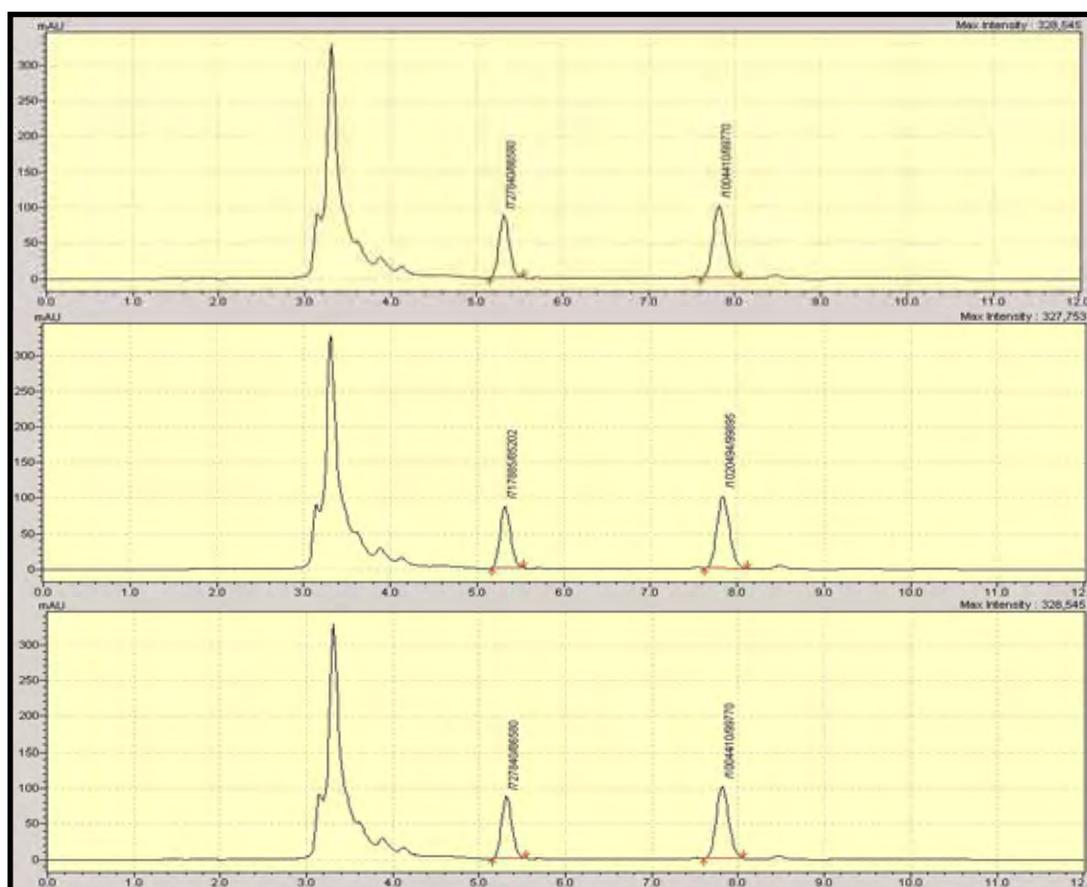


Figura 58. Cromatogramas obtidos com concentração 0,25mg/mL.

- Concentração Média (0,50 mg/mL da fração resultante de extração do látex de *Jatropha curcas* L. com acetato de etila):

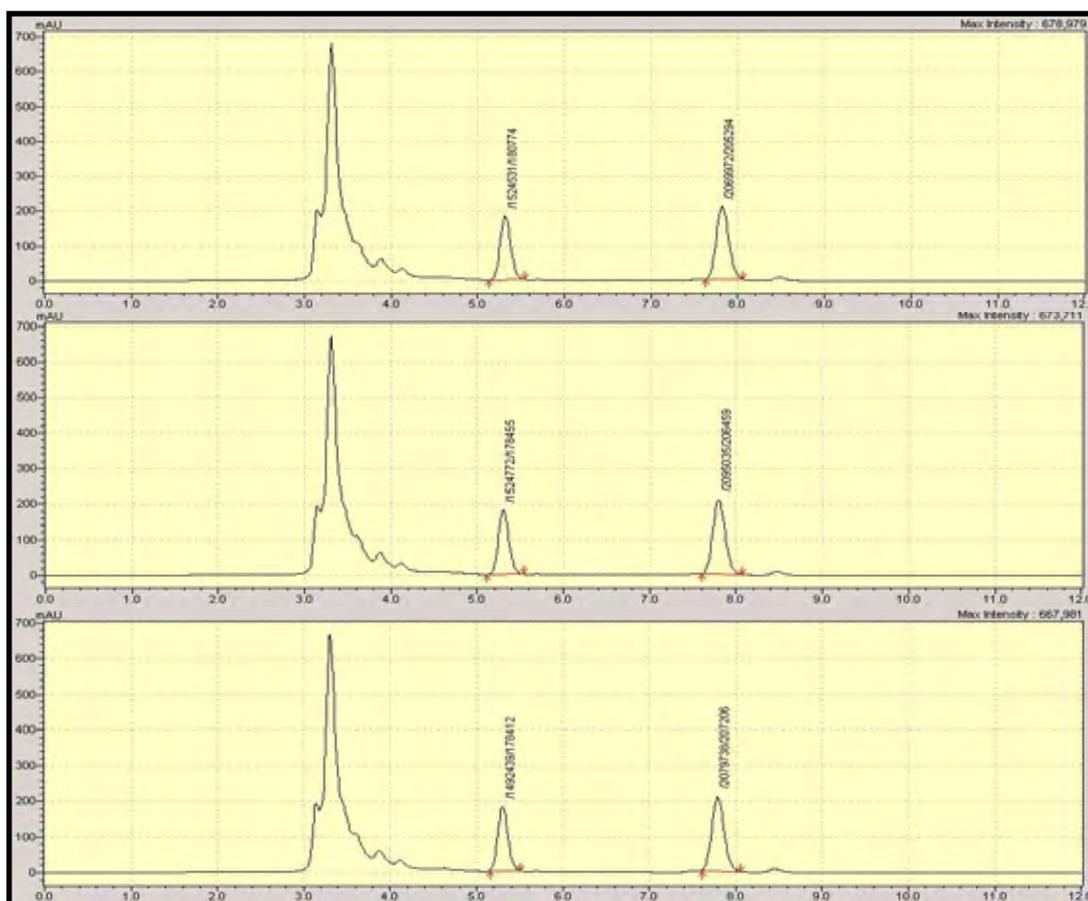


Figura 59. Cromatogramas obtidos com concentração 0,50mg/mL.

- Concentração Alta (1,0 mg/mL da fração resultante de extração do látex de *Jatropha curcas* L. com acetato de etila):

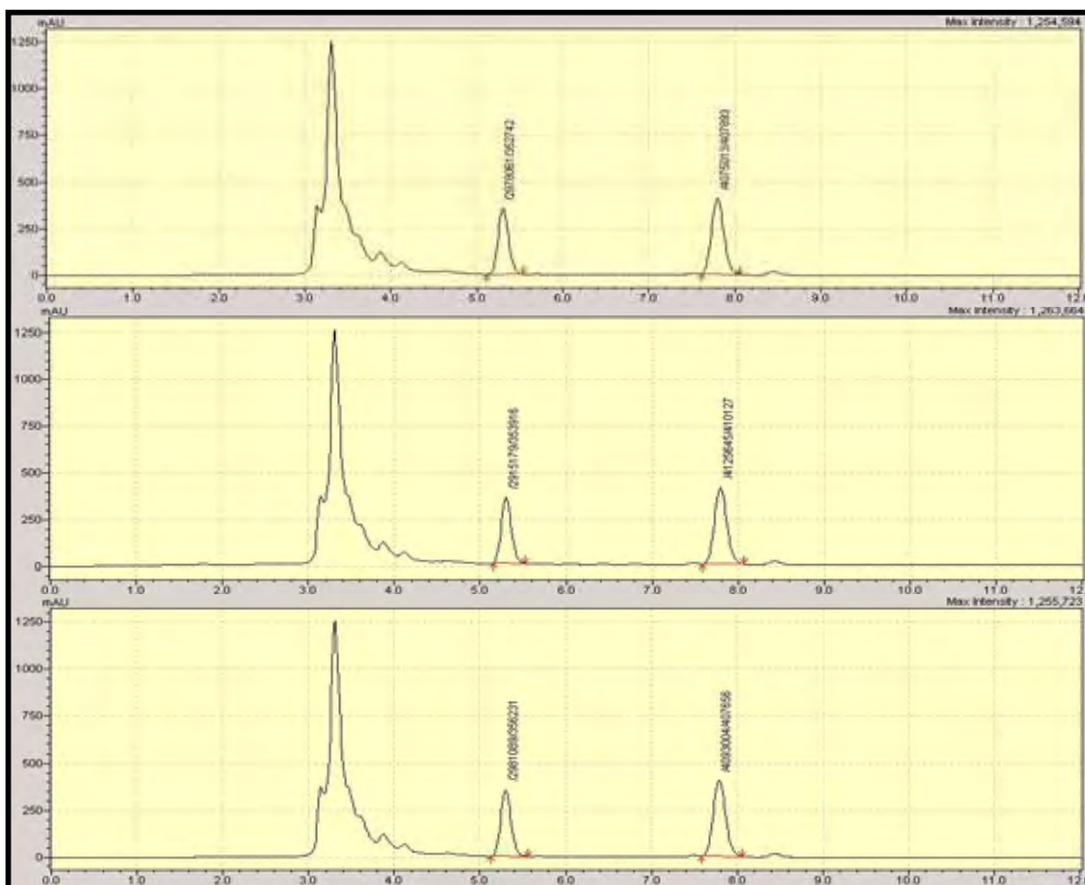


Figura 60. Cromatogramas obtidos com concentração 1,0 mg/mL.

Tabela 11. Tratamento estatístico dos dados obtidos para precisão– Polianina A

Concentração da amostra	Resposta (área)	Valor de x (concentração)	Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo
0,25	1027146	0,06256			
0,25	1031119	0,06281	0,06297	0,00050922	0,81%
0,25	1042597	0,06354			
0,5	2131942	0,13315			
0,5	2173235	0,13579	0,13456333	0,00132986	0,98%
0,5	2153142	0,13475			
1,0	4233399	0,26742			
1,0	4246419	0,26825	0,26589333	0,00338857	1,27%
1,0	4148748	0,26201			

Tabela 12. Tratamento estatístico dos dados obtidos precisão – Jatrofidina I

Concentração da amostra	Resposta (área)	Valor de x (concentração)	Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo
0,25	740876	0,03233			
0,25	740630	0,03232	0,03237	7,8102E-05	0,24%
0,25	743722	0,03246			
0,5	1542306	0,06823			
0,5	1544306	0,06832	0,06831667	8,5049E-05	0,12%
0,5	1546227	0,0684			
1,0	3009951	0,13396			
1,0	3018618	0,13435	0,13425	0,00025515	0,19%
1,0	3020681	0,13444			

5.8.7 Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

Para o teste de exatidão, deve-se fazer o método da adição de padrão, no qual, quantidades conhecidas de um padrão são adicionadas na amostra a ser analisada e em seguida, esse padrão é quantificado.

Deve ser determinada depois do estabelecimento da linearidade e intervalo do padrão e verificada com 3 concentrações diferentes (baixa, média e alta) com triplicata de cada uma delas. A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação do analito na amostra.

$$\text{Exatidão} = \text{conc. Experimental recuperada} / \text{conc. teórica} \times 100$$

Novamente os peptídeos foram tratados separadamente, seguindo os resultados:

5.8.7.1 Polianina A

Primeiramente foi realizada uma análise cromatográfica em duplicata do mesmo extrato avaliado no teste de precisão na concentração 0,5 mg/mL, esta amostra foi considerada como sendo o “branco”, e a concentração teórica do

peptídeo polianina A considerada foi de 0,005mg/mL. Utilizando-se a equação da reta $y = 1,55 \times 10^7 x + 155082$ obtida no gráfico da curva de calibração, onde y = área do pico e x = concentração, foi determinado uma concentração de 0,002mg/mL do peptídeo Polianina A contido em 0,5mg/mL da amostra analisada. Foram feitas três fortificações com o peptídeo puro ao branco, sendo a primeira fortificação de concentração baixa: 0,0125 mg/mL, a segunda de concentração intermediária: 0,0325mg/mL e a terceira fortificação de concentração alta: 0,225mg/mL. As três fortificações foram analisadas em triplicatas (**Tabela 13**) e a porcentagem de recuperação de cada concentração foi:

- Concentração Baixa (0,0125 mg/mL):

Exatidão= (0.011996667/0,0125) x 100 = 95,97%

- Concentração Média (0,0325 mg/mL):

Exatidão= (0.034056667/0,0325) x 100 = 104,78%

- Concentração Alta (0,225 mg/mL):

Exatidão= (0.236736667/0,225) x 100 = 105 %

Tabela 13. Tratamento dos dados obtidos das análises de fortificação de extratos de *Jatropha curcas* L. – Polianina A.

Concentração teórica	Área	Média	Concentração experimental	Média	Concentração recuperada (Z) Z=Y-X
0,005	80078		0,00191		
0,005	82514	81874,33333	0,00207	0,00202667	-
0,005	83031		0,0021	(X)	
0,0125	268070		0,01397		
0,0125	267358	268958,3333	0,01392	0,01402333	0,011996667
0,0125	271447		0,01418	(Y)	
0,0325	609086		0,03608		
0,0325	604877	610651,6667	0,03581	0,03608333	0,034056667
0,0325	617992		0,03636	(Y)	
0,225	3767761		0,2408		
0,225	3716108	3736381,333	0,23745	0,23876333	0,236736667
0,225	3725275		0,23804	(Y)	

5.8.7.2 Jatroidina I

Da mesma forma realizada para o peptídeo Polianina A, foi realizada uma análise cromatográfica em duplicata do mesmo extrato avaliado no teste de precisão na concentração 0,5 mg/mL, esta amostra foi considerada como sendo o “branco”, e a concentração teórica do peptídeo Jatroidina I considerada foi de 0,005mg/mL. Utilizando-se a equação da reta $y = 1,55 \times 10^7 x + 155082$ obtida no gráfico da curva de calibração, onde y = área do pico e x = concentração, foi determinado uma concentração de 0,0026mg/mL do peptídeo Jatroidina I contido em 0,5mg/mL da amostra analisada. Foram feitas três fortificações com o peptídeo puro ao branco, sendo a primeira fortificação de concentração baixa: 0,0125 mg/mL, a segunda de concentração intermediária: 0,0325mg/mL e a terceira fortificação de concentração alta: 0,225mg/mL. As três fortificações foram analisadas em triplicatas (**Tabela 14**) e a porcentagem de recuperação de cada concentração foi:

- Concentração Baixa (0,0125 mg/mL):

Exatidão= (0.01245/0,0125) x 100 = 99,6%

- Concentração Média (0,0325 mg/mL):

Exatidão= (0.030896667/0,0325) x 100 = 95,06%

- Concentração Alta (0,225 mg/mL):

Exatidão= (0.214473333/0,225) x 100 = 95,32 %

Tabela 14. Tratamento dos dados obtidos das análises de fortificação de extratos de *Jatropha curcas* L. – Jatroidina I

Concentração teórica	Área	Média	Concentração experimental	Média	Concentração recuperada (Z) Z=Y-X
0.005	66661		0.0026		
0.005	66387	66672.66667	0.00259	0.0026	
0.005	66970		0.00261	(X)	
0.0125	356072		0.0154		
0.0125	353189	348175	0.01527	0.01505	0.01245
0.0125	335264		0.01448	(Y)	
0.0325	763534		0.03344		
0.0325	765177	764816	0.03351	0.033496667	0.030896667
0.0325	765737		0.03354	(Y)	

0.225	4897541		0.21641		
0.225	4917653	4912552.667	0.2173	0.217073333	0.214473333
0.225	4922464		0.21751	(Y)	

5.8.8 Robustez

Robustez é a medida da capacidade do equipamento em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

A avaliação da robustez pode ser considerada durante a fase de desenvolvimento e depende do tipo de processo em estudo. Nos testes de robustez são aplicados experimentos estatísticos que examinam simultaneamente os efeitos das alterações em diferentes variáveis do método. No caso de métodos cromatográficos, as variações se referem a diferentes tipos de colunas, pH, fluxo da fase móvel entre outras.

No método por HPLC, foram avaliados os seguintes parâmetros: a variação do uso de diferentes lotes ou fabricantes de coluna, o fluxo da fase móvel e o pH da fase móvel.

5.8.8.1 Variação das colunas

Foram realizadas análises com três colunas diferentes: **coluna 1**: Coluna C-18 – Shimadzu Shim-pack CLC-ODS(M) No.4257770 – dimensões 250 x 4,6 mm (**Figura 61**); **coluna 2**: Coluna C-18 – Supelco, Supelcosil LC-18 – nº 58298 – Col: 18031-006 – dimensões 250 x 4,6 mm (**Figura 62**) e **coluna 3**: Coluna C-18 – Gemini C-18 – Phenomenex – 286728 – dimensões 250 x 4,6mm (**Figura 63**).

Para uma melhor visualização da alteração do cromatograma com a troca das colunas, as **Figuras 61, 62 e 63** contêm uma comparação entre as análises na coluna Phenomenex Júpiter, utilizada para todas as análises e testes da validação, e as demais colunas empregadas.

Tabela 15. Valores obtidos com coluna Júpiter

	Tempo de retenção (min)	Área	Concentração (mg/mL)
Jatroidina I	5,321	1861436	0,084246171
Polianina A	7,562	1935675	0,107769804

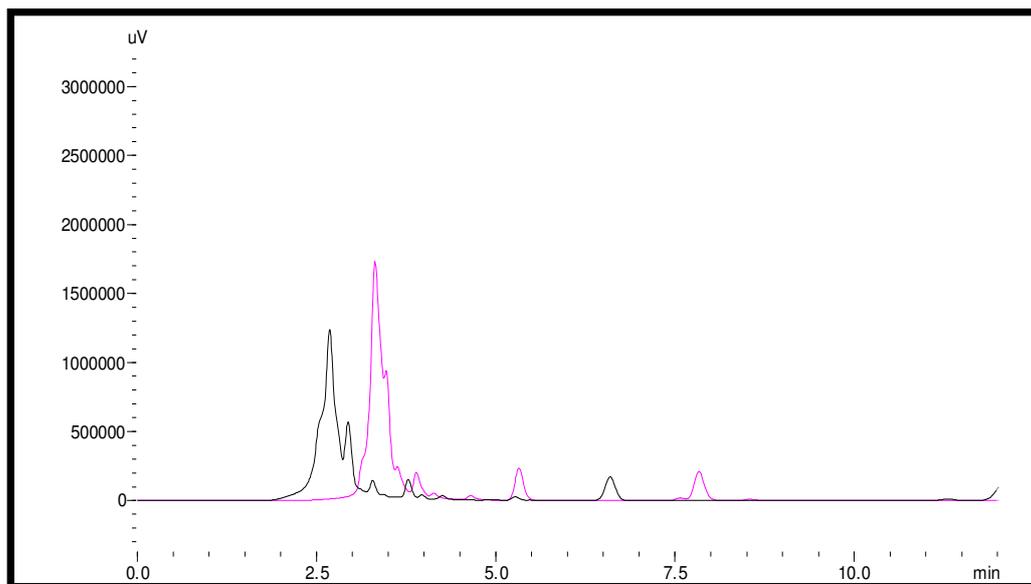


Figura 61. Comparação dos perfis cromatográficos em coluna Phenomenex C-18 – Júpiter 5 μ C-18 300A (rosa) e Coluna C-18 – Shimadzu Shim-pack CLC-ODS(M) (preto).

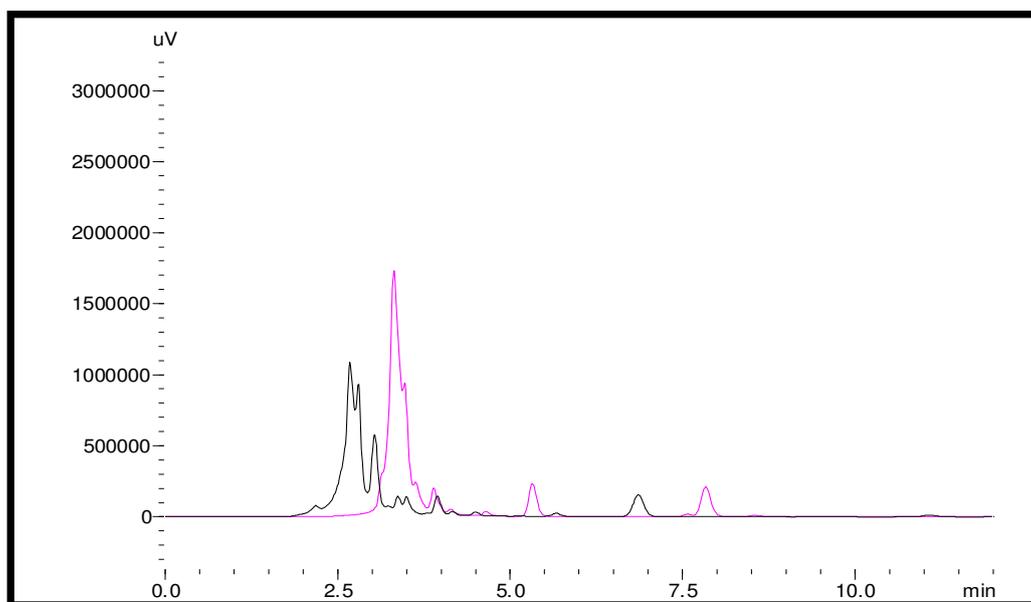


Figura 62. Comparação dos perfis cromatográficos em coluna Phenomenex C-18 – Júpiter 5 μ C-18 300A (rosa) e Coluna C-18 – Supelco, Supelcosil LC-18(preto).

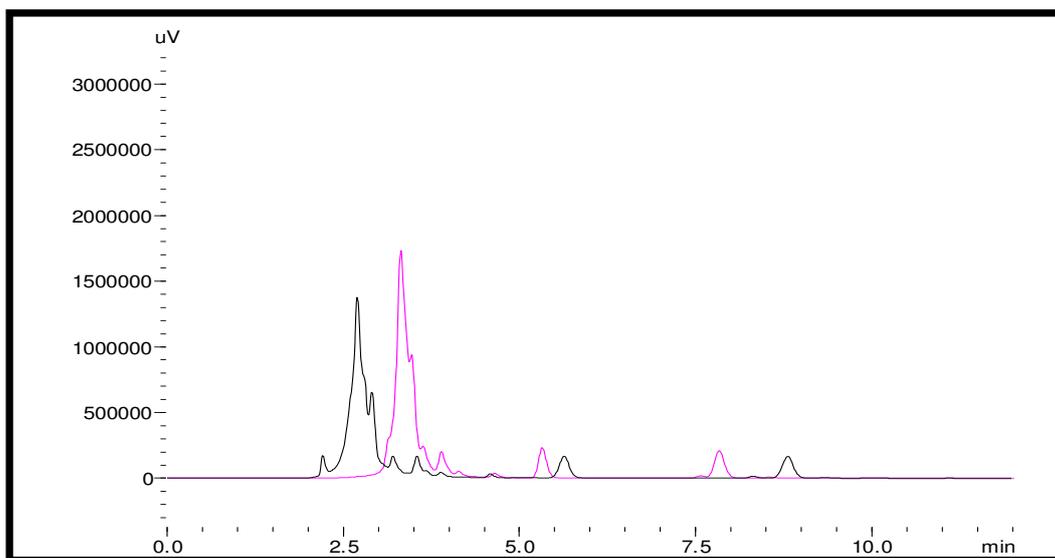


Figura 63. Comparação dos perfis cromatográficos em coluna Phenomenex C-18 – Júpiter 5µ C-18 300A (rosa) e Coluna C-18 – Gemini C-18 – Phenomenex (preto).

Os resultados quali e quantitativos estão representados na **Tabela 16**, para o peptídeo Polianina A, e **Tabela 17** para o peptídeo Jatroidina I.

Tabela 16. Resultados experimentais quali e quantitativos da análise de robustez em diferentes colunas – Polianina A.

Coluna	Tempo de retenção Polianina A (min)	Área	Concentração de Polianina A (mg/mL)
1	não detectou	-	-
2	não detectou	-	-
3	8,801	1883644	0,104872948
DPR (%)	-	-	-

No caso do peptídeo Polianina A, a única coluna eficiente em sua detecção pelo método empregado foi a Supelco, enquanto que as outras duas colunas não possibilitaram a detecção do mesmo. Desta forma, não foi possível realizar os cálculos de desvio padrão relativo.

Tabela 17. Resultados experimentais quali e quantitativos da análise de robustez em diferentes colunas – Jatroidina I

Coluna	Tempo de retenção Jatroidina A (min)	Área	Concentração de Jatroidina I (mg/mL)
1	6,591	1701910	0,077026232
2	5,627	1672806	0,075709023
3	6,852	1699425	0,076913764
DPR (%)	10,15067223%	0,95%	0,964472847

Com base nos resultados obtidos, pode-se observar que o tempo de retenção do peptídeo Jatroidina I sofreu mudanças significativas nas colunas diferentes. Por outro lado, os parâmetros área e concentração não sofreram alterações significativas frente à mudança das colunas, e o desvio padrão apresentou-se dentro da faixa aceitável, que é menor do que 5%.

5.8.8.2 Variação do pH da fase móvel

O ácido trifluoroacético foi removido da composição dos solventes da fase móvel, sendo substituído por um tampão de acetato de amônio 0,02M. Deste modo, as soluções, anteriormente com pH na faixa de 2,0, passaram a ter os seguintes valores de pH:

Solvente A – água/tampão 0,045% - pH: 4,98

Solvente B – água/tampão 0,036% - pH: 5,77

Após análise da amostra contendo os peptídeos, foi constatado que esta variação de pH não causou alterações na corrida, tanto nos aspectos qualitativos quanto nos quantitativos. O tratamento estatístico dos resultados apresentados para os dois padrões está exposto nas **Tabelas 18 e 19**.

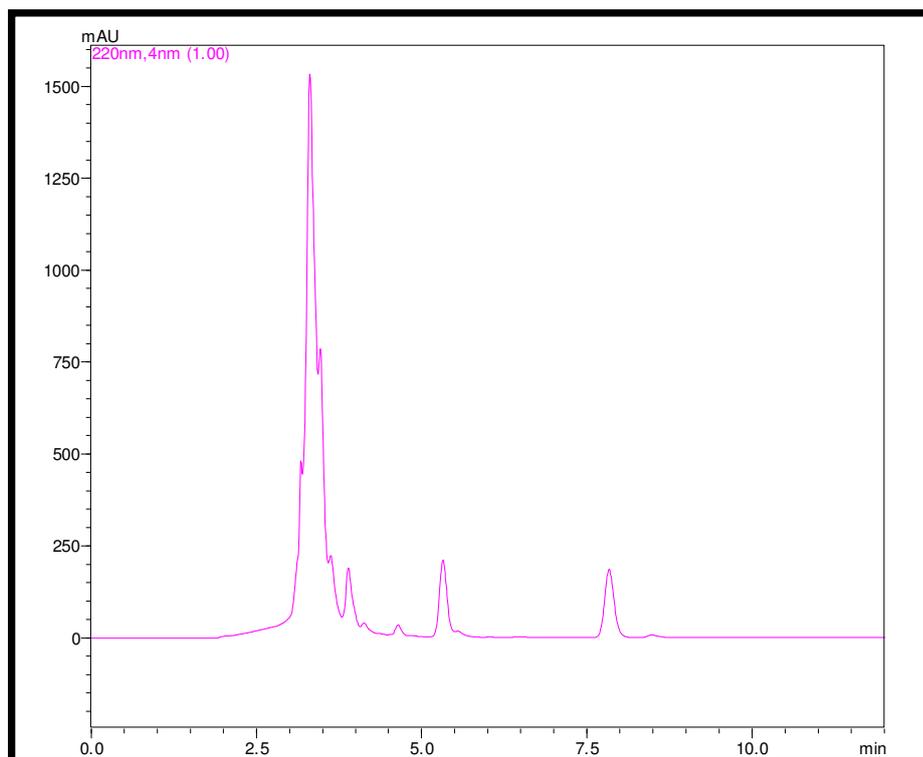


Figura 64. Cromatograma da análise com fase móvel tamponada.

Tabela 18. Resultados quali e quantitativos referentes à análise de robustez variando o pH da fase móvel – Jatroidina I

pH	Tempo de Retenção		Concentração (mg/mL)
	Jatroidina	Área	
2	5,319	1895541	0,08405
tampão	5,318333333	1843861	0,08173333
desvio padrão	0,000471405	36543.278	0,00163813
média	5,318666667	1869701	0,08289167
DPR	0,01%	1,95%	1,97%

Tabela 19. Resultados quali e quantitativos referentes à análise de robustez variando o pH da fase móvel – Polianina A

pH	Tempo de Retenção		Concentração (mg/mL)
	Polianina	Área	
2	7,561	1691940	0,07654
tampão	7,562335422	1679987	0,07985
desvio padrão	0,000944	8452,047356	0,00092631
média	7,561668	1685963,5	0,077195
DPR	0,0124878%	0,501318525	1,199960986

5.8.8.3 Variação do fluxo da fase móvel

Na análise de robustez do método, foram realizadas corridas da amostra utilizando três fluxos diferentes: 0,8mL/min; 1,0mL/min; 1,2mL/min. Os cromatogramas estão representados abaixo:

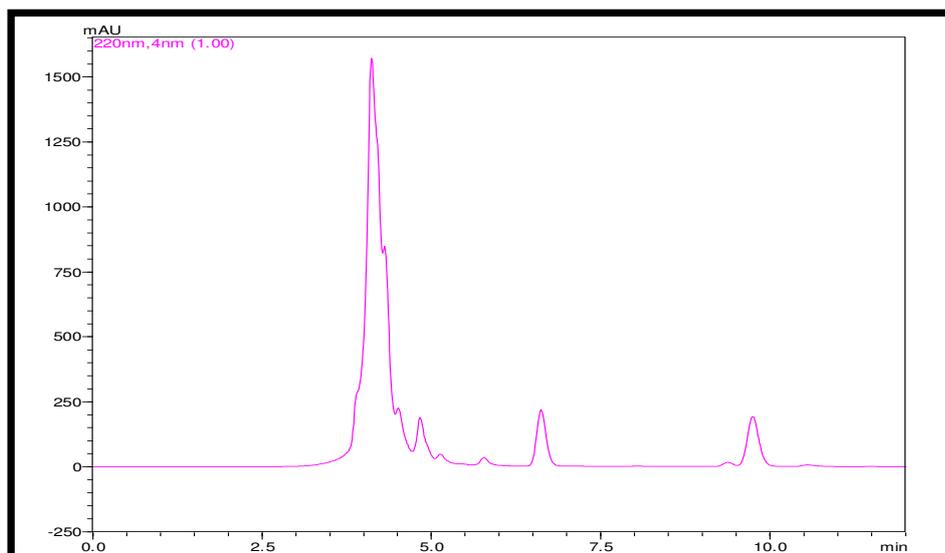


Figura 65. Cromatograma da análise com fluxo 0,8 mL/min.

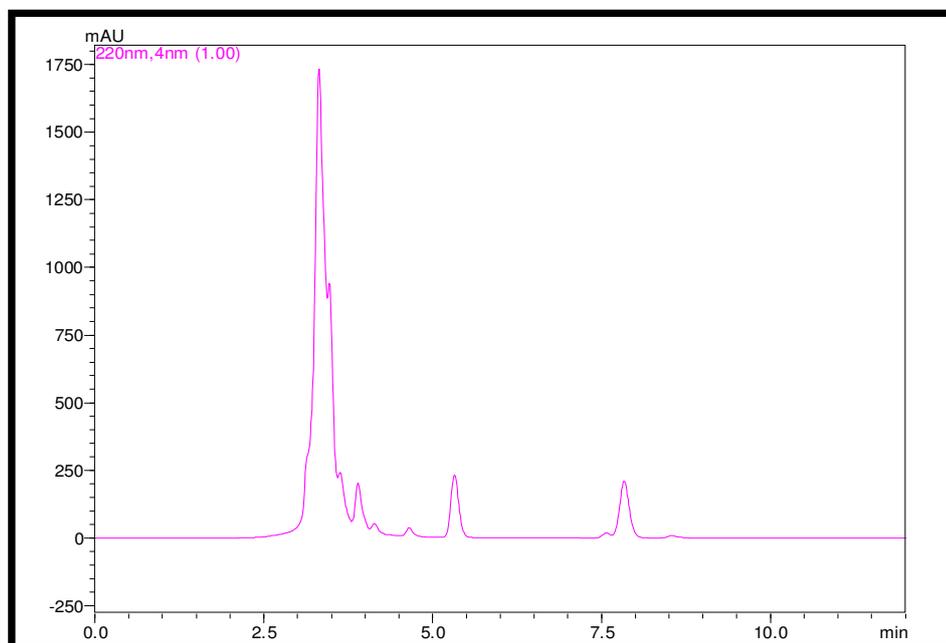


Figura 66. Cromatograma da análise com fluxo 1,0 mL/min.

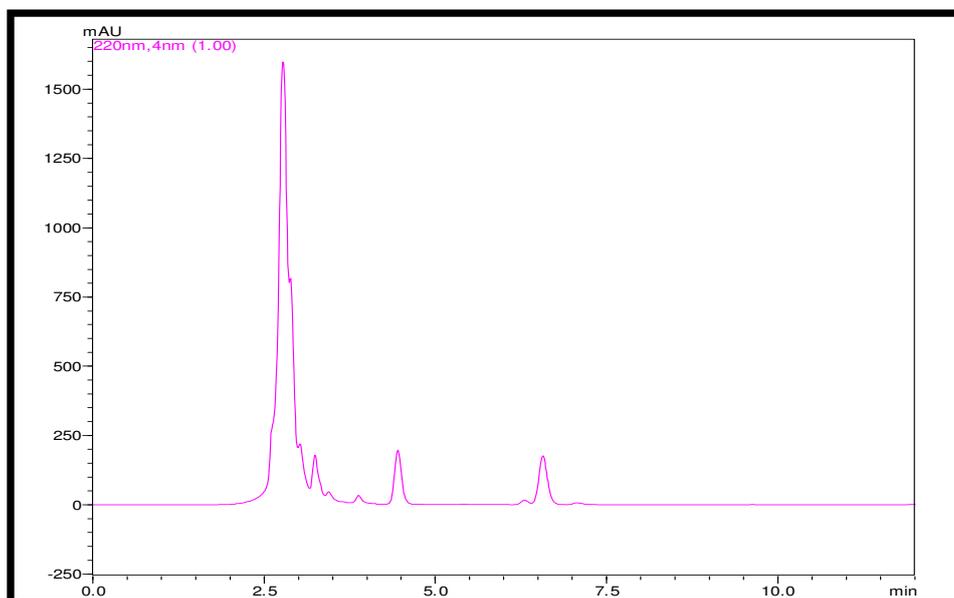


Figura 67. Cromatograma da análise com fluxo 1,2 mL/min.

A variação do fluxo da fase móvel causou uma variação significativa nos parâmetros quali e quantitativos. As diferenças quantitativas verificadas condizem com o esperado, pois a variação do fluxo da fase móvel produz alargamento dos sinais cromatográficos, ocasionando mudanças nos valores das áreas calculadas. As diferenças qualitativas também são esperadas, uma vez que, quando se aumenta o fluxo a tendência do pico analisado é ter um tempo de retenção maior e, conseqüentemente a diminuição do fluxo ocasiona um tempo de retenção maior do pico do composto analisado. Os tratamentos estatísticos estão representados nas **Tabelas 20 e 21**.

Tabela 20. Resultados da variação do tempo de retenção, área e concentração do peptídeo Jatroidina I variando-se a fluxo da fase móvel.

Fluxo (mL/min)	Tempo de Retenção Jatroidina	Área	Concentração
1,0	5,319	1895541	0,08405
0,8	5,127	492814	0,02122
1,2	4,447	1419662	0,06294
desvio padrão	0,458193554	713343	0,0319734
média	4,964333333	1269339	0,05607
DPR	9,23%	56,19	57,02

Tabela 21. Resultados da variação do tempo de retenção, área e concentração do peptídeo Polianina A variando-se a fluxo da fase móvel.

Fluxo (mL/min)	Tempo de Retenção Jatroidina	Área	Concentração
1,0	7,561	111010	0,003893
0,8	9,759	2327568	0,081625
1,2	6,563	1553902	0,054494
desvio padrão	1,635115898	1124991	0,039452204
média	7,961	1330827	0,046670644
DPR	20,47%	84,53%	84,54%

5. 8. 9. Análise quantitativa – resultados

O material foi coletado de 3 espécimes cultivados diferentes, sendo 1 *Jatropha curcas* L., cultivada no Instituto de Química – UNESP Araraquara, e mais 2 *Jatropha curcas* L. cultivadas em residência, em um bairro próximo ao Instituto de Química, cuja localização por GPS é: latitude - 21°48'40.92"S: e longitude - 48°10'57.47"O.

Todas as coletas foram realizadas no período da manhã, aproximadamente no dia 23 de cada mês, mediante corte da porção inferior do caule e gotejamento do látex. Alguns parâmetros, como tamanho da planta, idade, condições das folhas e clima foram coletados.

Com base nos resultados obtidos das análises em HPLC, foram construídas curvas representando a concentração do peptídeo na planta, em mg/mL, em função do período de coleta.

As curvas estão representadas abaixo:

Peptídeo Polianina A

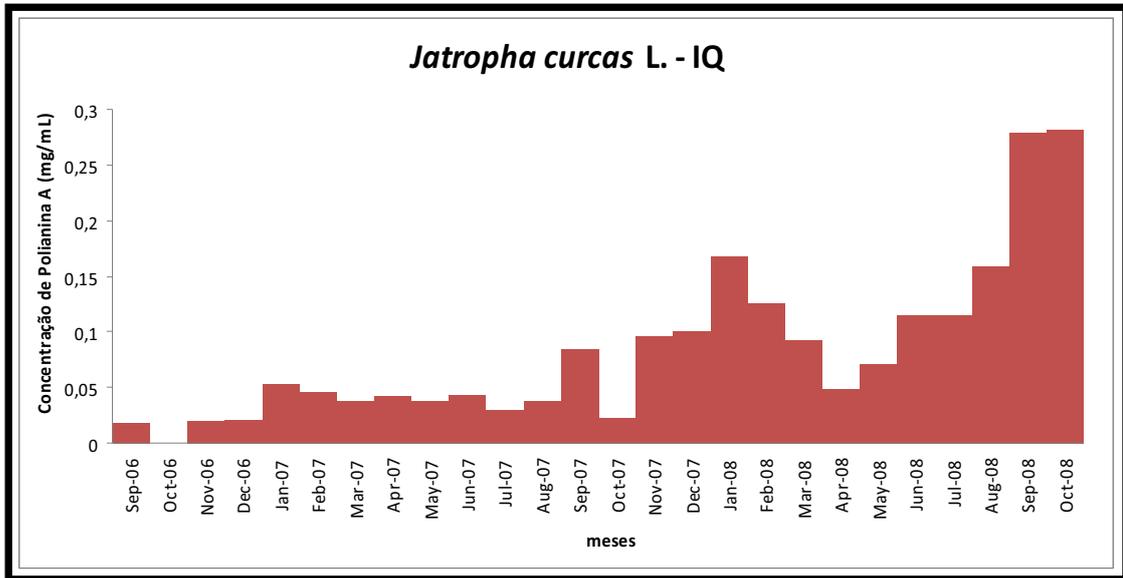


Figura 68. Variação da concentração de Polianina A na *Jatropha curcas* L. cultivada no Instituto de Química – UNESP.

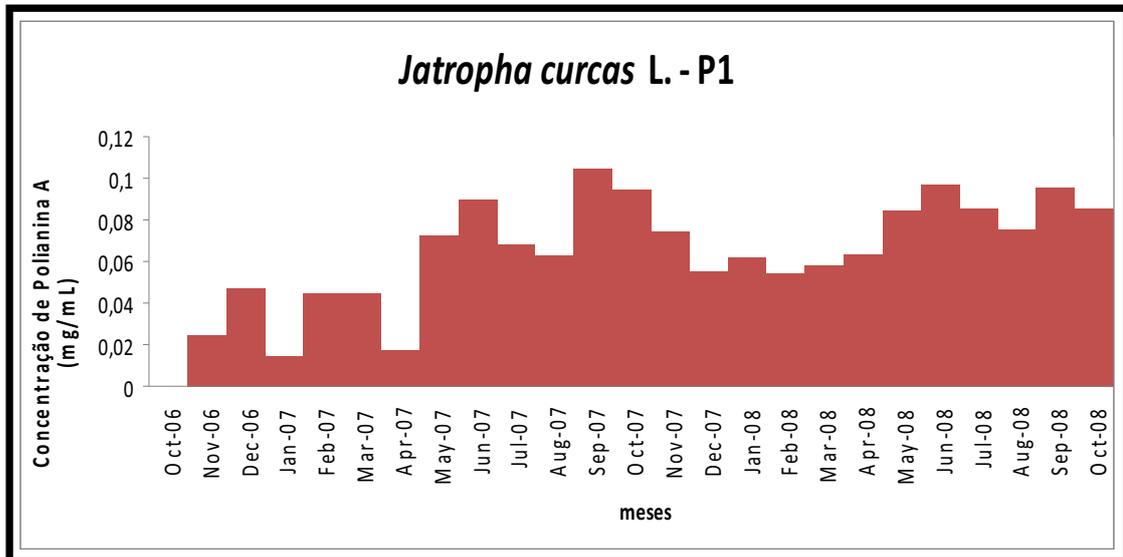


Figura 69. Variação da concentração de Polianina A na *Jatropha curcas* L. cultivada em um bairro próximo ao Instituto de Química.

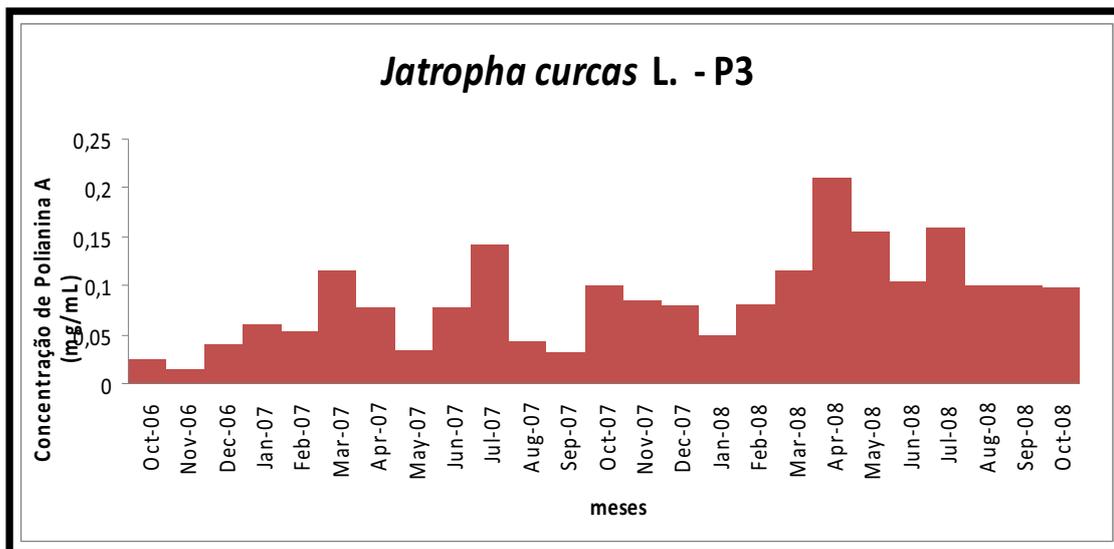


Figura 70. Variação da concentração de Polianina A na *Jatropha curcas* L. cultivada em um bairro próximo ao Instituto de Química.

Peptídeo Jatroidina I

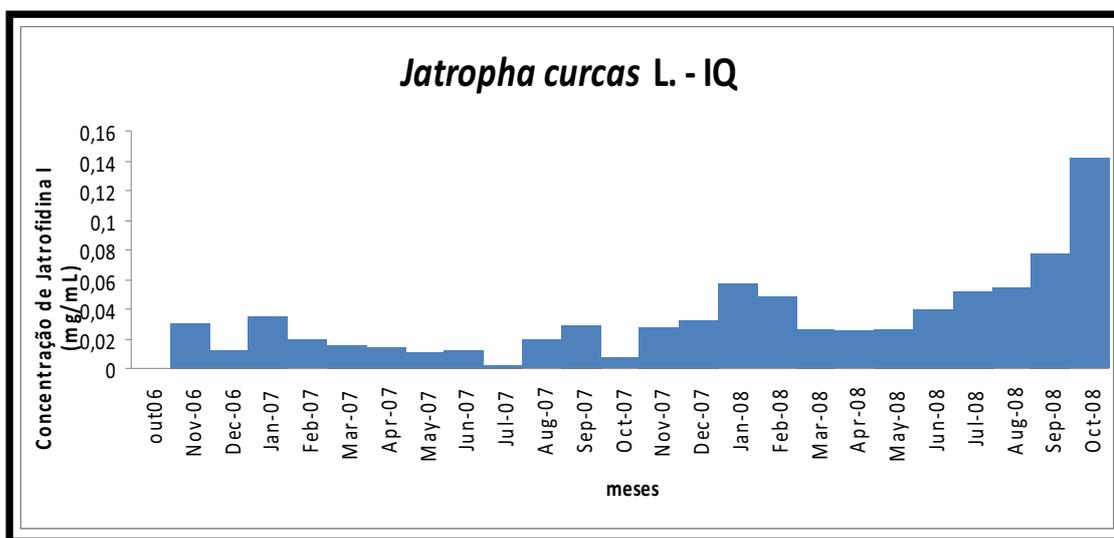


Figura 71. Variação da concentração de Jatroidina I na *Jatropha curcas* L. cultivada no Instituto de Química – UNESP.

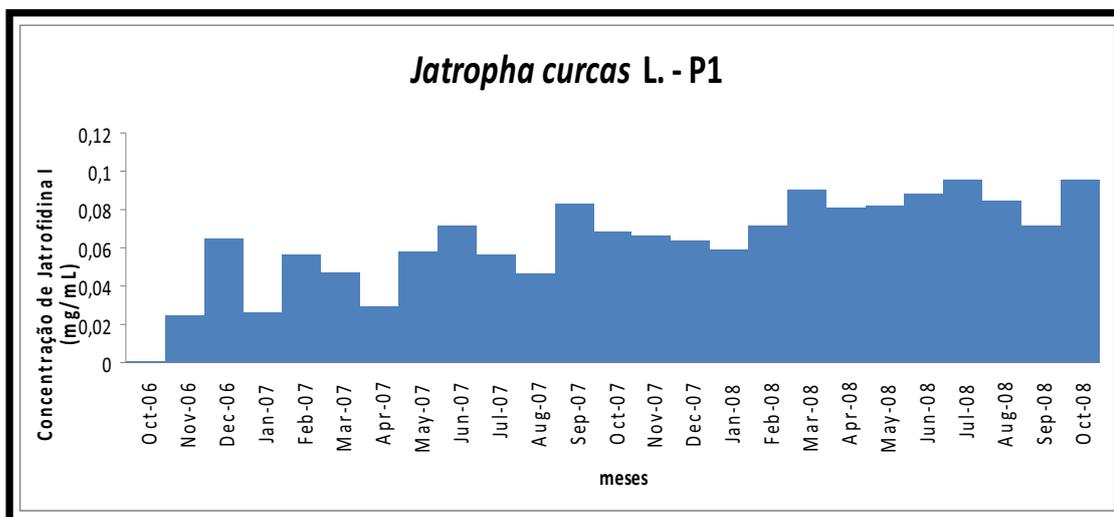


Figura 72. Variação da concentração de Jatroidina I na *Jatropha curcas* L. cultivada em um bairro próximo ao Instituto de Química.

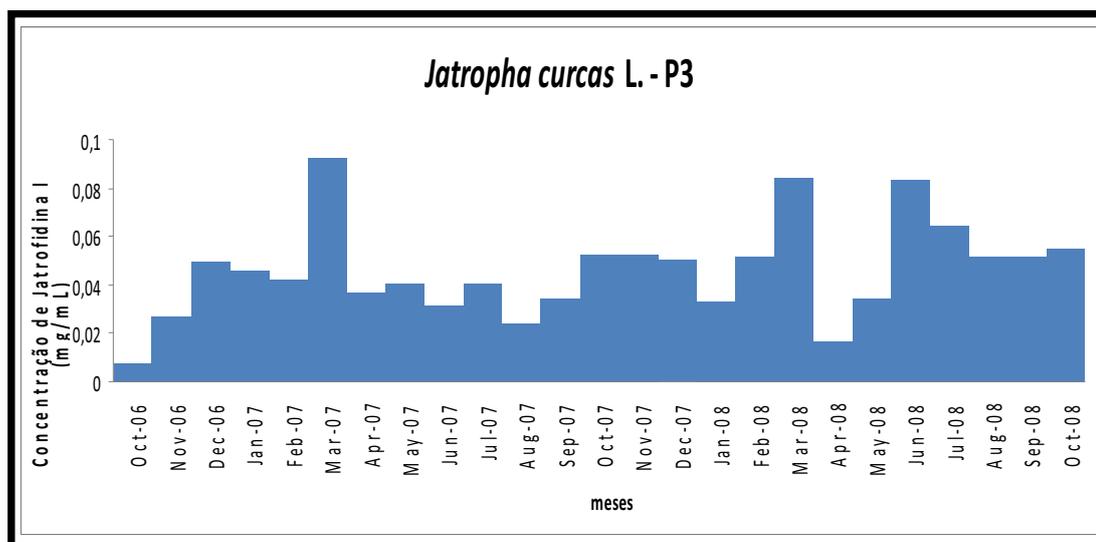


Figura 73. Variação da concentração de Jatroidina I na *Jatropha curcas* L. cultivada em um bairro próximo ao Instituto de Química.

Pela interpretação preliminar dos dados obtidos, foi observado que não há um padrão na variação da concentração dos peptídeos na planta, embora a concentração destas substâncias apresente variações. Os peptídeos Jatroidina I e Polianina A são produzidos continuamente na espécie *Jatropha curcas*, podendo estar relacionados com algum mecanismo de sobrevivência importante do organismo.

Salienta-se aqui que os resultados obtidos são apenas uma análise preliminar do perfil ciclopeptídico de *Jatropha curcas*, que é o objetivo deste trabalho. São necessárias análises comparando-se a concentração dessas substâncias mensalmente em cada planta, além de uma observação da variação na concentração de peptídeos cíclicos com o aspecto da planta, pois se percebe que os exemplares cultivados possuem alterações em seu aspecto conforme a época do ano.

5.9 Análise qualitativa do perfil ciclopeptídico de *Jatropha gossypifolia*

A espécie *Jatropha gossypifolia* foi submetida à avaliação do perfil ciclopeptídico apenas qualitativamente. As amostras para avaliação foram preparadas utilizando-se o mesmo procedimento empregado para os extratos de *Jatropha curcas* L, porém, como neste caso o interesse é visualizar apenas os peptídeos, um clean up das frações foi realizado, da mesma forma como descrito anteriormente na etapa de isolamento dos peptídeos.

Com base nos resultados obtidos, foi possível observar que durante todos os meses em que a coleta foi feita, a planta apresentou produção dos peptídeos, que, segundo comparações com padrões, são os peptídeos ciclogossina A e B, isolados anteriormente no processo FAPESP nº 04/11982-0. Todos os cromatogramas obtidos apresentaram o mesmo formato, portanto, está representado na **Figura 73** somente um resultado de análise, em representação a todos os extratos analisados.

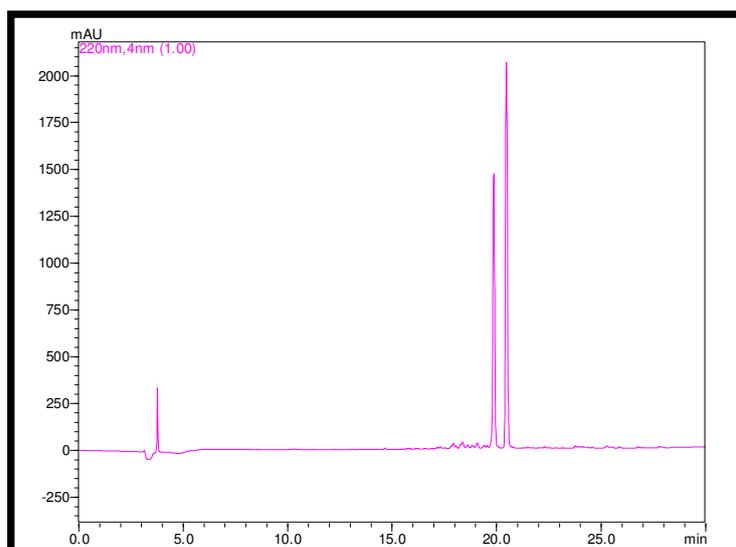


Figura 74. Perfil cromatográfico do extrato de *Jatropha gossypifolia*.

6. Conclusões

As metodologias para isolamento, caracterização e elucidação estrutural de peptídeos cíclicos de espécies de *Jatropha* descritas neste projeto mostraram-se práticas e eficientes, podendo ser aplicadas à outras espécies de plantas.

O desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificar ciclopeptídeos em plantas foram importantes, pois permitiram uma avaliação da produção destas estruturas na espécie *Jatropha curcas* L. em função da época do ano. Este tipo de avaliação pode ser considerado um passo inicial para o estudo da ecofisiologia relacionada aos peptídeos cíclicos.

A síntese peptídica, empregando-se a metodologia da fase sólida na obtenção da cadeia linear, com posterior ciclização em solução, se mostrou eficaz na obtenção de análogos dos peptídeos isolados. Essa é uma ferramenta que oferece flexibilidade, pois permite a síntese de estruturas diferentes em um curto período de tempo.

Com relação às atividades biológicas, os testes realizados durante este projeto não mostraram dados concretos a respeito de atividades biológicas. Ensaio preliminares mostraram que os peptídeos sintéticos D-Poliana A (análogo cíclico) e D-Jatrofidina I (análogo linear e cíclico) possuem capacidade de inibição da protease pepsina. Esses dados podem ser o passo inicial para a avaliação da importância do ciclo na seqüência peptídica. Desta forma, a análise do comportamento dos peptídeos cíclicos frente à novos alvos deve ser ampliada, pois estas estruturas são ainda pouco exploradas.

É interessante notar que as descrições de peptídeos cíclicos na literatura foram obtidas de espécies de *Jatropha* coletadas usualmente em regiões da África e da Ásia e, nesse contexto, este trabalho contribui para a elucidação do perfil macromolecular dessas espécies em diferentes ecossistemas no território brasileiro.

REFERÊNCIAS

AS RUSSIA BIO-ORGANIC CHEM INST(Russian). E.V. Navolotskaya; V. I. Vanina; V. M. Lipkin; A. A. Kolobov; N. E. A. Kampe; S. N. Orlov. **Cyclic peptides with antistress effect and structure similar to corticotrophin**. RU2330860-C1, 24 Apr. 2007, 10 Aug. 2008.

AUVIN, C.; BARAGUEY, C.; BLOND, A.; LEZENVEN, F.; POUSSET, J. L.; BODO, B. Curcacycline B, a cyclic nonapeptide from *Jatropha curcas* enhancing rotamase activity of cyclophilin. **Tetrahedron Letters**, v. 38, n.16, p. 2845-2848, 1997.

AUVIN-GUETTE, C.; BARAGUEY, C.; BLOND, A.; XAVIER, H. S.; POUSSET, J. L.; BODO, B. Pohlianins A, B and C, cyclic peptides from the latex of *Jatropha pohliana* ssp. *molissima*. **Tetrahedron**, v. 55, p. 11495-510, 1999.

BARAGUEY, C.; BLOND, A.; CORREIA, I.; POUSSET, J. L.; BODO, B.; AUVIN-GUETTE, C. Mahafacyclin A, a cyclic heptapeptide from *Jatropha mahafalensis* exhibiting β -bulge conformation. **Tetrahedron Letters**, v. 41, p. 325–329, 2000.

BARAGUEY, C.; BLOND, A.; CAVELIER, F.; POUSSET, J. P.; BODO, B.; AUVIN-GUETTE, C. Isolation, structure and synthesis of mahafacyclin B, a cyclic heptapeptide from the latex of *Jatropha mahafalensis*. **Journal Chemical Society Perkins 1**, v. 1, p. 2098-2103, 2001.

BARAGUEY, C.; AUVIN-GUETTE, C.; BLOND, A.; CAVELIER, F.; LEZENVEN, F.; POUSSET, J. L.; BODO, B. Isolation, structure and synthesis of chevalierins A, B and C, cyclic peptides from the latex of *Jatropha chevalieri*. **Journal Chemical Society, Perkins 1**, v. 1, p. 3033-9, 1998.

BENEDETTI, E.; PEDONE, C. Cyclolinopeptide A: inhibitor, immunosuppressor or other? **Journal of Peptide Science**, v. 11, p. 268–272, 2005.

BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. The missing term in effective pair potentials. **Journal of Physical Chemistry**, v. 91, p. 6269–6271, 1987.

BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: a message-passing parallel molecular-dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, p. 43–56, 1995.

BIAGINI, G. A.; RICHIER, E.; BRAY, P. G.; CALAS, M.; VIAL, H.; WARD, S. A. Heme binding contributes to antimalarial activity of bis-quaternary ammoniums. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 2584–2589, 2003.

BOGUSLAVSKY, V.; HRUBY, V. J. ; O'BRIEN, D. F.; MISICKA, A.; LIPKOWSKI, A. W. Effect of peptide conformation on membrane permeability. **Journal of Peptide Research**, v. 61, p. 287-297, 2003.

CHUANG, P.; HSIEH, P.; YANG, Y.; HUA, K.; CHANG, F.; SHIEA, J.; WU, S. Cyclopeptides with anti-inflammatory activity from seeds of *Annona montana*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 8, p. 1365-1370.

COLLINO, S.; EVANS, J. S. Structural features that distinguish kinetically distinct biomineralization polypeptides. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1686-1694, 2007.

COZZOLINO, R.; PALLADINO, P.; ROSSI, F.; CALI, G.; BENEDETTI, E.; LACCETTI, P. Antineoplastic cyclic astin analogues kill tumour cells via caspase-mediated induction of apoptosis. **Carcinogenesis**, v. 26, p. 733-739, 2005.

CRAIK, D. J. Plant cyclotides: circular, knotted peptides toxins. **Toxicon**, v. 39, p. 1809-1813, 2001.

CRAIK, D. J.; DALY, N. L.; BOND, T.; WAINE, C. Plant cyclotides: a unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, p. 1327-1336, 1999.

CRAIK, D. J.; CEMAZAR, M.; WANG, C. K. L.; DALY, N. L. The cyclotide family of circular miniproteins: nature's combinatorial peptide template. **Biopolymers: Peptide Science**, v. 84, p. 250–266, 2006.

DAHIYA, R. Synthesis, spectroscopic and biological investigation of cyclic octapeptide: Cherimolacyclopeptide G. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 32, p. 205-215, 2008.

DAHIYA, R.; KAUR, K. Synthetic and biological studies on natural cyclic heptapeptide: Segetalin E. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, p. 1380-1386, 2007.

DASCOMBE, M. J.; DREW, M. G. B.; MORRIS, H.; WILAIRAT, P.; AUPARAKKITANON, S.; MOULE, W. A.; SHEKALGOURABI, S.; EVANS, P. G.; LLOYD, M.; DYAS, P. C.; ISMAIL, F. M. D. Mapping antimalarial pharmacophores as a useful tool for the rapid discovery of drugs effective *in vivo*: design, construction, characterization, and pharmacology of mefloquine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 5423-5436, 2005.

GAYMES, T. J.; CEBRAT, M.; SIEMION, I. Z.; KAY, J. E. Cyclolinopeptide A (CLA) mediates its immunosuppressive activity through cyclophilin-dependent calcineurin inactivation. **FEBS Letters**, v. 418, p. 224-227, 1997.

GEORGE, E. A.; NOVICK, R. P.; MUIR, T. W. Cyclic peptide inhibitors of staphylococcal virulence prepared by fmoc-based thiolactone peptide synthesis. **Journal of American Chemical Society**, v. 130, p. 4914-4924, 2008.

GOMES, P.; VALE, N.; MOREIRA, R. Cyclization-activated prodrugs. **Molecules**, v. 12, p. 2484-2506, 2007.

GÓRSKI, A.; KASPRZYCKA, M.; NOWACZYK, M.; WIECZORECK, Z.; SZELEJEWSKI, W.; KUTNER, A. Cyclolinopeptide: a novel immunosuppressive agent with potential anti-lipemic activity. **Transplantation Proceedings**, v. 33, p. 553, 2001.

HAINAN HEXINTANG PHARM CO LTD (Canada). M. Y. Bai. **Preparation method for pro-his cyclic dipeptide**. CN1951954-A, 20 Oct. 2005, 25 Apr. 2007.

HIMAJA, M.; KUMAR, K. H.; RAMANA, M. V.; BELAGALI, S. L. Synthesis and biological evaluation of Pseudostellarin D. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 34, p. 525-529, 1999.

HOFFMANN LA ROCHE & CO AG F(HOFF-C) (United States) L.Chen; Y. Han; C. R. Roberts. **Forming cyclic peptide such as cyclic melanocortin-4 receptor agonist peptide involves solid phase synthesis of a dipeptide, which is coupled to a second peptide in a solid phase reaction; and cyclizing peptide followed by coupling reaction**. WO2008080845-A1, 19 Dec. 2007, 10 July 2008.

HORSTEN, S. F. A. J. **Cyclic peptides in the genus *Jatropha* (Euphorbiaceae)**. 239 f. (Docteur)- Faculteit Farmacie, Universiteit Utrecht, Utrecht, 1995.

HORTON, D. G.; BOURNE, G. T.; COUGHLAN, J.; KAISER, S. M.; JACOBS, C. M.; JONES, A.; RÜHMANN, A. R.; TURNER, J. Y.; SMYTHE, M. L. Cyclic tetrapeptides

via the ring contraction strategy: chemical techniques useful for their identification. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, p. 1386-1395, 2007.

HSIEH, P. W.; CHANG, F. R.; WU, K. Y.; LI, C. M.; CHEN, S. L.; WU, Y. C. New cytotoxic cyclic peptides and dianthramide from *Dianthus superbus*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p.1522-1527, 2004.

HSIEH, P. W.; CHANG, F. R.; WU, C. C.; LI, C. M.; WU, K. Y.; CHEN, S. L.; YEN, H. F.; WU, Y. C. Longicalycinin A, a new cytotoxic cyclic peptide from *Dianthus superbus* var. *longicalycinus* (MAXIM.) WILL. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, p. 336-338, 2005.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD-Visual Molecular Dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, p. 33-38, 1996. Disponível em: <<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>>. Acesso em: 10 jun. 2007.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Commission on Biochemical Nomenclature, Abbreviations and symbols for description of conformation of polypeptide chains. **Journal of Molecular Biology**, v. 52, p. 1-17, 1970.

JEREMIC, T.; LINDEN, A.; MOEHLE, K.; HEIMGARTNER, H. Synthesis and conformational analysis of 18-membered Aib-containing cyclohexapeptides. **Tetrahedron**, v. 61, p. 1871-1883, 2005.

JOHANSSON, S. **Studies on cytotoxic and neutrophil challenging polypeptides and cardiac glycosides of plant origin**. 2001. 73 f. Dissertation (Doctor of Philosophy in Pharmacognosy) - Faculty of Pharmacy, Uppsala University, Uppsala, 2001.

JOSHI, K. B.; VERMA, S. Monovalent cation-promoted ordering of a glycine-rich cyclic peptide. **Tetrahedron**, v. 63, p. 5602-5607, 2007.

KARLE, I. L.; RANGANATHAN, D.; KUMAR, M. G.; NAGARAJ, R. Design, synthesis, conformational and membrane ion transport studies of proline-adamantine hybrid cyclic depsipeptides. **Biopolymers**, v. 89, p.471-478, 2007.

KNIPP, S. J. B.; JOIS, D. S. S.; SIAHAAN, T. J. The effect of conformation on the solution stability of linear vs cyclic RGD peptides. **Journal of Peptide Research**, v. 53, p. 523-529, 1999.

KOSASI, S.; SLUIS, W. G.; VAN DEN BERG, A. J. J. ; BOELENS, R.; HART, L. A.; LABADIE, R. P. Labaditin, a novel cyclic decapeptide from the latex of *Jatropha multifida* L. (Euphorbiaceae). Isolation and sequence determination by means of two-dimensional NMR. **Febs Letters**, v. 256, n. 1-2, p. 91-96, 1989.

LI, F.; ZHANG, F. M.; YANG, Y.; B.; YANG, X. Q.; CAO, Q. E.; DING, Z. T. A new cyclopeptide from *Dianthus caryophyllus*. **Chinese Chemical Letters**, v. 19, p. 193-195, 2008.

LILLY & CO ELI (United States). L. Zhang; J. Alsina-Fernandez. **New cyclic VPAC2 peptide receptor agonist, useful for treating non-insulin-dependent diabetes or insulin-dependent diabetes, or for suppressing food intake (Eng)**. US 2007101146-A2, 26 Feb. 2007, 07 Sept. 2007.

LIU, X.; YAN, C.; TENG, H.; XIU, Z.; HAO, C. A quantum-mechanical study on the geometry of a hexacyclopeptide dichotomin A. **Journal of Molecular Structure**, v. 818, p. 77-83, 2007.

LUO, J. G.; WANG, X. B.; MA, L.; KONG, L. Y. Gypsophin: a novel α -glucosidase inhibitory cyclic peptide from the roots of *Gypsophila oldhamiana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 4460-4463, 2007.

MATSUMOTO, T.; MORISHITA, E.; SHIOIRI, T. Investigation of macrocyclization sites for the synthesis of dendroamide A - an approach from a conformational search. **Tetrahedron**, v. 63, p. 8571-8575, 2007.

MONGKOLVISUT, W.; SUTTHIVAIYAKIT, S.; LEUTBECHER, H.; MIKA, S.; KLAIBER, I.; MÖLLER, W.; RÖSNER, H.; BEIFUSS, U.; CONRAD, J. Integerrimides A and B, cyclic heptapeptides from the latex of *Jatropha integerrima*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1435-1441, 2006.

MONROC, S.; BADOSA, E.; BESALU, E.; PLANAS, M.; BARDAJI, E.; MONTESINOS, E.; FELIU, L. Improvement of cyclic decapeptides against plant pathogenic bacteria using a combinatorial chemistry approach. **Peptides**, v. 27, p. 2575-2584, 2006.

MORETTO, A.; TERRENZANI, F.; CRISMA, M.; FORMAGGIO, B. K.; KAPTEIN, B.; BROXTERMAN, Q. B.; TONIOLO, C. α -Methyl Proline: a unique example of split personality. **Biopolymers**, v. 89, 465-470, 2007.

-
- MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cyclic octapeptides from *Stellaria Dichotoma* var. *Lanceolata*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 841-845, 1997.
- MORITA, H.; YUN, Y. S.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Segetalins B, C and D, three new cyclic peptides from *Vaccaria segetalis*. **Tetrahedron**, v. 51, p. 6003-6014, 1995.
- MORITA, H.; YUN, Y. S.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Conformational Preference for Segetalins G and H, Cyclic peptides with estrogen-like activity from seeds of *Vaccaria segetalis* l. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 2063-2067, 1997.
- MORITA, H.; KAYASHITA, T.; SHIMOMURA, M.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cyclic peptides from Higher Plants. 24.1 Yunnanin C, a Novel Cyclic Heptapeptide from *Stellaria yunnanensis*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 280-282, 1996.
- MORITA, H.; SHISHIDO, A.; KAYASHITA, T.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cyclic peptides from higher plants. 39. Dichotomins F and G, cyclic peptides from *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 404-407, 1997.
- MORITA, H.; SHISHIDO, A.; MATSUMOTO, T.; ITOKAWA, H.; TAKEYA, K. Cyclolinopeptides B - E, new cyclic peptides from *Linum usitatissimum*. **Tetrahedron**, v. 55, p. 967-976, 1999.
- MORITA, H.; KAYASHITA, T.; KOBATA, H.; GONDA, A.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Pseudostellarins D - F, new tyrosinase inhibitory cyclic peptides from *Pseudostellaria heterophylla*. **Tetrahedron**, v. 50, p. 9975-9982, 1994.
- MORITA, H.; KAYASHITA, T.; SHISHIDO, A.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SHIRO, M. Dichotomins A - E, new cyclic peptides from *Stelluriu dichotomu* L. var. *lanceolata* Bge. **Tetrahedron**, v. 52, p. 1165-1176, 1996.
- MORITA, H.; IIZUKA, T.; CHOO, C. Y.; CHAN, K. L.; ITOKAWA, H.; TAKEYA, K. Dichotomins J and K, Vasodilator Cyclic Peptides from *Stellaria dichotoma*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1686-1688, 2005
- NAPOLITANO, A.; RODRIQUEZ, M.; BRUNO, I.; MARZOCCO, S.; AUTORE, G.; RICCIO, R.; GOMEZ-PALOMA, L. Synthesis, structural aspects and cytotoxicity of the natural cyclopeptides yunnanins A, C and phakellistatins 1, 10. **Tetrahedron**, v. 59, p. 10203-10211, 2003.
-

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NOVABIOTICS LTD (United States). D. Oneil. **New cyclic peptide useful to treat e.g. microbial infections or fungal infections**. US2007072037-A1, 21 Dec. 2006, 28 June 2007.

PAULETTI, P. M. ; YOUNG, C. M. ; SILVA, D. H. S. ; BOLZANI, V. S. ; TOMAZELA, D. M. ; EBERLIN, M. N. ; CASTRO-GAMBOA, I. New antioxidant C-glucosylxanthenes from the stems of *Arrabidaea samydoides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1384-1387, 2003.

PHARMACIA LKB BIOTECHNOLOGY. **Sephadex LH-20**: cromatography in organic solvents. Uppsala: T.K. Uppsala, 1990. 23 p.

PICCHI, D. **Peptídeos cíclicos de *Jatropha multifida* L. e *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae)**: prospecção, isolamento, elucidação estrutural e atividade biológica. 2007.142 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

POMILIO, A. B.; BATTISTA, M. E.; VITALE, A. A. Naturally-occurring cyclopeptides: structures and bioactivity. **Current Organic Chemistry**, v. 10, p. 2075-2121, 2006.

REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 536-47, 2004.

REZAI, T.; BOCK, J. E.; ZHOU, M. V.; KALYANARAMAN, C.; LOKEY, R. S.; JACOBSON, M. P. Conformational flexibility, internal hydrogen bonding, and passive membrane permeability: successful in silico prediction of the relative permeabilities of cyclic peptides. **Journal of American Chemical Society**, v. 128, n. 43, p. 14073-14080, 2006.

RIVERA, D. G.; VERCILLO, O. E.; WESSJOHANN, L. A. Rapid generation of macrocycles with natural-product-like side chains by multiple multicomponent macrocyclizations (MiBs). **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, p. 1787-1795, 2008.

TAN, N. H.; ZHOU, J. Plant cyclopeptides. **Chemical Review**, v. 106, p. 840-895, 2006.

UNIVERSITY HELSINKI; BERGEN TEKNOLOGIOVERFORING AS (Finland). K. Sivonen; J. Jokela; M. Wahlsten; P. Permi; S. O. Doskeland; L. Herfindal. **New bioactive cyclic peptide, useful for the treatment against hepatotoxins, as a cell reagent, or in screening method.** FI2007138171-A1, 30 May 2006, 30 May 2007.

VAN DEN BERG, A. J. J.; HORSTEN, S. F. A. J. A.; KETTENES-VAN DEN BOSCH, J. J.; KROES, B. H.; BEUKELMAN, C. J.; LEEFLANG, B. R.; LABADIE, R. P. Curcacycline A - a novel cyclic octapeptide isolated from the latex of *Jatropha curcas* L. **FEBS Letters**, v. 358, p. 215-8, 1995a.

WANG, C.; ZHANG, L. L.; ZHENG, Q. T.; CHENG, Y. X.; ZHOU, J.; TAN, N. H. Study on the spatial structure of brachyestemin C, a new cyclic peptide from *Brachyestemma calycinum*. **Journal of Molecular Structure**, v. 688, p. 67-71, 2004.

WÉLÉ, A.; NDOYE, I.; ZHANG, Y.; BROUARD, J. P. Cherimolacyclopeptide D, a novel cycloheptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 693-6, 2005a.

WÉLÉ, A.; NDOYE, I.; ZHANG, Y.; BROUARD, J. P.; POUSSET, J. L.; BODO, B. Glaucacyclopeptide A from the seeds of *Annona glauca*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1154-7, 2005b.

WÉLÉ, A.; ZHANG, Y.; NDOYE, I.; BROUARD, J. P.; POUSSET, J. L.; BODO, B. A cytotoxic cyclic heptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1577-1579, 2004.

YUN, Y. S.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cyclic peptides from higher plants. 34.1 segetalins G and H, structures and estrogen-like activity of cyclic pentapeptides from *Vaccaria segetalis*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 216-218, 1997.

ZHOU, J.; TAN, N. Application of a new TLC chemical method for detection of cyclopeptides in plants. **Chinese Science Bulletin**, v. 45, p. 1825-1831, 2000.

ZHU, J.; MARCHANT, R. E. Solid-phase synthesis of tailed cyclic RGD peptides using glutamic acid: unexpected glutarimide formation. **Journal of Peptide Science**, v. 14, p. 690-696, 2008.
