

**Peptídeos cíclicos em espécies do semiárido brasileiro e uma
cultivada: caracterização e atividade biológica**



MERI EMILI FERREIRA PINTO

2013

MERI EMILI FERREIRA PINTO

Peptídeos cíclicos em espécies do semiárido brasileiro e uma cultivada:
caracterização e atividade biológica

Tese de doutoramento apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual Paulista - campus Araraquara, em cumprimento as exigências para a obtenção do título de DOUTORA EM QUÍMICA.

ORIENTADORA: Profa Dra. Vanderlan da Silva Bolzani

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

Araraquara

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

P659p Pinto, Meri Emili Ferreira
Peptídeos cíclicos em espécies do semiárido brasileiro e
uma cultivada: caracterização e atividade biológica /
Meri Emili Ferreira Pinto. – Araraquara : [s.n], 2013
168 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Vanderlan da Silva Bolzani
Coorientador: Eduardo Maffud Cilli

1. Química orgânica. 2. Orbitídeos. 3. Ciclotídeos.
4. Euphorbiaceae. 5. Violaceae. I. Título.

CURRÍCULO

MERI EMILI FERREIRA PINTO

Nome em citações bibliográficas

PINTO, M. E. F.; NASCIMENTO, M. E. P.;

Endereço Profissional


Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara.
Unesp - Campus de Araraquara
Jardim Quitandinha
14800900 - Araraquara, SP - Brasil

Formação acadêmica/titulação

2009 - 2013

Doutorado em Química Orgânica.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
Orientador: Dr. Vanderlan da Silva Bolzani.
Co-orientador: Dr. Eduardo Maffud Cilli.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

2007 - 2009

Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (Conceito CAPES 5).
Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Brasil.
Orientador:  Marcelo Sobral da Silva.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2012 - 2012

Aperfeiçoamento em Doutorado sanduiche.
Medizinische Universität Wien, MUW, Austria.
Orientador: Dr. Christian Gruber.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2006

Graduação em andamento em Ciências Biológicas.
Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Brasil.

2003 - 2007

Graduação em Licenciatura em Química.
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, IFPB, Brasil.
Orientador: Vania Maria de Medeiros.

Formação Complementar

2011 - 2011

Biofísica Molecular. (Carga horária: 38h).
Sao Paulo State University.

2009 - 2009

Toxicologia. (Carga horária: 70h).
Universidade de São Paulo.

2008 - 2008

Metodologia de Pesquisa Científica Aplicada. (Carga horária: 60h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2008 - 2008

Introdução à Química Farmacêutica Medicinal. (Carga horária: 15h).
Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Atuação Profissional

1. Fundação para o Desenvolvimento da UNESP, FUNDUNESP, Brasil.

Vínculo institucional. 2012 – 2012. Vínculo: Celetista formal, Enquadramento Funcional:
Orientador Educacional Online de Química.

Outras informações

A divulgação do resultado da classificação final para o cargo de Orientador Educacional on Line (Química) foi feita no site da Fundação Vunesp (<http://www.vunesp.com.br/fund1004/>) e a convocação divulgada no Diário Oficial do Estado de São Paulo de 03 de Fevereiro de 2012, Pg. 159. Executivo - Caderno 1.

2. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, IFPB, Brasil. 02/2006 - 10/2008

Projetos de pesquisa

2007 - 2007

Avaliação da proposta de Prevenção ao Uso de Drogas na Escola no curso de licenciatura em Química

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) .

Integrantes: Meri Emili Ferreira Pinto - Integrante / Vania Medeiros - Coordenador.

Projetos de extensão

2006 - 2007

Avaliação dos fatores: Gênero, Religião, desempenho escolar no Uso e prevalência de Drogas em estudantes de Ensino Médio.

Situação: Concluído; Natureza: Extensão.

Integrantes: Meri Emili Ferreira Pinto - Integrante / Vania Medeiros - Coordenador /

Crisvalter Medeiros - Integrante / Daiana M. Vitória - Integrante / Wilbsan C. de Sousa -

Integrante / Jobson Ferreira - Integrante / Stuart de A. Barbosa - Integrante / Raissa M. C. E.

Lins. - Integrante.

2006 - 2007

Diagnóstico de Uso e Prevalência de Drogas no CPADC (Centro Profissionalizante Deputado Cabral)

Situação: Concluído; Natureza: Extensão.

Alunos envolvidos: Graduação: (5) / Especialização: (1) .

Integrantes: Meri Emili Ferreira Pinto - Integrante / Vania Medeiros - Coordenador /

Crisvalter Medeiros - Integrante / Daiana M. Vitória - Integrante / Wilbsan C. de Sousa -

Integrante / Jobson Ferreira - Integrante / SANTOS, N. S - Integrante.

Idiomas

Inglês

Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Bem.

Prêmios e títulos

2013. Natural Products Reports Poster Prize, Royal Society of Chemistry.

Produção bibliográfica

Citações

WEB OF SCIENCE™

PINTO, MERI EMILI F Data: 30/03/2013

Total de trabalhos: 3

Total de citações: 30

Fator H:1

SCOPUS

PINTO, M. E. F. Data: 31/08/2013

Total de trabalhos: 2

Total de citações: 46

Outras

PINTO, M. E. F. Data: 31/08/2013

Total de trabalhos: 2

Total de citações: 71

Artigos publicados e submetidos em periódicos

1. **PINTO, M. E.F.**, GAUR, P., SHARMA, A., NAKABASHI, M., CILLI, E. M., GIESEL, G., M., VERLI, H., GRUBER, C., TAVARES, J. F., SILVA, M. S., GARCIA, C. R. S., BOLZANI, V. S. Ribifolin a orbitide from *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill and its antimalarial activity. *Phytochemistry* (submetido).
2. BOLZANI, V. S. ; CAVALHEIRO, A. J. ; CASTRO-GAMBOA, I. ; VALLI, M. ; PIVATTO, M. ; ANDRICOPULO, A. D. ; **PINTO, M. E. F.** ; PESSOA, C. ; GARCIA, C. R. . Tracing secondary metabolites on Brazilian biodiversity: how to do it usefully to find new biologically active compounds?. *Pharmaceutical Biology*^{JCR}, v. 50, p. 662-663, 2012.
3. **FERREIRA, M. E. P.** ; CILLI, E. M ; TAVARES, J. F. ; SILVA, M. S. ; BOLZANI, V. S. . A CYCLOPEPTIDE ISOLATED FROM JATROPHA RIBIFOLIA (POHL) BAILL AND ITS SOLID PHASE SYNTHESIS. *Pharmaceutical Biology*^{JCR}, v. 50, p. 596-596, 2012.
4. NETTO, H. P. ; MANENTE, F. A. ; MOURA, E. L. ; REGASINI, L. O. ; **PINTO, M. E. F.** ; BOLZANI, V. S. ; OLIVEIRA, O. M. M. ; VELLOSA, J. C. R. . Avaliação das atividades antioxidante, anti- e pró-hemolítica do extrato etanólico das folhas de *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* (Impresso), v. 14, p. 666-672, 2012.
5. ★ **PINTO, M. E. F.** ; SILVA, M. S. ; SCHINDLER, E. ; BARBOSA FILHO, J. M. ; EL-BACHA, R. S. ; CASTELLO-BRANCO, M. V. S. ; AGRA, M. F. ; TAVARES, J. F. . 3',8'-biisokaempferide, a cytotoxic biflavonoid and other chemical constituents of *Nanuza plicata* (Velloziaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* (Impresso)^{JCR}, v. 21, p. 1819-1824, 2010.
6. MOTA, K. S. L. ; DIAS, G. E. N. ; **PINTO, M. E. F.** ; LUIZ-FERREIRA, A. ; SOUZA-BRITO, A. R. M. ; HIRUMA-LIMA, C. A. ; BARBOSA-FILHO, J. M. ; BATISTA, L. M. . Flavonoids with Gastroprotective Activity. *Molecules* (Basel)^{JCR}, v. 14, p. 979-1012, 2009.
7. MEDEIROS, V. ; CAVALCANTI, A. M. ; RODRIGUES, J. G. ; **PINTO, M. E. F.** ; SOUZA, N. S. ; BEZERRA, N. O. F ; RAMOS, R. F. A. ; OLIVEIRA, S. R. . Uma Experiência de Prática no Ensino de Química Ambiental com Estudantes de Licenciatura em Química do CEFET/PB - uma prática transdisciplinar?. *Química no Brasil*, v. 1, p. 57-70, 2007.

Capítulos de livros publicados

1. CILLI, E. M ; ALTEI, W. F. ; **PINTO, M. E. F.** ; SAITO, M. S. ; BOLZANI, V. S. . Obtenção de Peptídeos Bioativos de Plantas. In: Maysa Furlan. (Org.). E-Book UNESP. Araraquara: UNESP, 2011, v. , p. -.
2. ★ MEDEIROS, V. ; VITORIO, D. M. ; FERREIRA, J. ; **PINTO, M. E. F.** ; MEDEIROS, C. ; Nataliene Silva dos Santos . Uso de Drogas Lícitas e Ilícitas entre Estudantes de Duas Escolas Públicas de João Pessoa-PB. In: Barros, D.R.; Espínola, L. L.; Serrano, Maria, S. M.. (Org.). Diálogos sobre Drogadição - experiências no combate à dependência química. 1ªed.João Pessoa: Editora Universitária, 2007, v. 1, p. 219-230.

Resumos publicados em anais de congressos

1. **PINTO, M. E. F.** ; GRUBER, C. W. ; Cilli, E. M ; BOLZANI, V. S. . Cyclotides from *Hybanthus calceolaria* (L.) Schulze-Menz: Comparing of expression patterns in seeds, leaves and stem. In: São Paulo School of Advanced on Bioorganic Chemistry, 2013, Araraquara. Bioorganic Chemistry, 2013.

Apresentações de Trabalho

1. ★ **PINTO, M. E. F.** ; TAVARES, J. F. ; SILVA, M. S. ; Cilli, E. M ; BOLZANI, V. S. . A new cyclopeptide isolated from *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill.. 2011. (Apresentação de Trabalho/Outra).
2. ★ **PINTO, M. E. F.** ; TAVARES, J. F. ; SILVA, M. S. ; Cilli, E. M ; BOLZANI, V. S. . A cyclopeptide isolated from *Jatropha ribifolia* and its solid phase synthesis. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. SILVA, A. L. ; Santos, N. C. B. ; Pinto, C. E. M. ; Macedo, G. M. E ; **PINTO, M. E. F.** ; Santos, T. J. A. A. . Atividade Antioxidante de diferentes extratos das folhas de *Vitex agnus-castus* L.. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. **PINTO, M. E. F.** ; Santos, T. J. A. A. ; TAVARES, J. F. ; SILVA, M. S. ; BOLZANI, V. S. . Constituents Of *Nanuzaplicata* (Mart) L.B.Sm & Ayensu and antioxidant activity. 2010. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
5. SCHINDLER, E. ; **PINTO, M. E. F.** ; TAVARES, J. F. ; EL-BACHA, R. S. . ATIVIDADE CITOTÓXICA DO NOVO BIFLAVONOIDE NANUZOFILAVONA. 2009. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
6. SCHINDLER, E. ; **PINTO, M. E. F.** ; TAVARES, J. F. ; EL-BACHA, R. S. . Avaliação da Toxicidade dos Flavonóides Leucoantocianidina e Amentoflavona em Cultura de Células de Glioblastoma Humano. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

7. **PINTO, M. E. F.** ; ARWA, P. S. ; TAVARES, J. F. ; SILVA, M. S. ; BARBOSA-FILHO, J. M. ; AGRA, M. F. . Phytochemical profile of Velloziaceae. 2009. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
8. **PINTO, M. E. F.** ; TAVARES, J. F. ; COSTA, V. C. O. ; ANDRADE, Y. R. N. ; BARBOSA FILHO, J. M. ; AGRA, M. F. ; SILVA, M. S. . Other constituents of *Nanuzia plicata plicata* (Mart.) L.B.Sm. & Ayensu. 2008. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
9. ★ **PINTO, M. E. F.** ; TAVARES, J. F. ; COSTA, V. C. O. ; AGRA, M. F. ; BARBOSA FILHO, J. M. ; SILVA, M. S. . Nanuzoflavona, um novo biflavonóide de *Nanuzia plicata* (Mart.) L.B.Sm.& Ayensu. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
10. OLIVERIA, C. A. F., **PINTO, M. E. F.** ; RAMOS, R. F. A. . Equipamentos de Laboratório com Materiais Alternativos. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
11. MEDEIROS, V. ; **PINTO, M. E. F.** ; FERREIRA, J. ; Nataliene Silva dos Santos . Avaliando a Receptividade da ação educativa do Programa REde Viva- CEFET/PB. 2007. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
12. MEDEIROS, C. ; MEDEIROS, V. ; VITORIO, D. M. ; FERREIRA, J. ; Nataliene Silva dos Santos ; **PINTO, M. E. F.** ; SOUSA, W. C. . Proposta do Amor-Exigente como um instrumento de Redução dos Fatores de Risco entre Jovens. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
13. MEDEIROS, V. ; FERREIRA, J. ; **PINTO, M. E. F.** ; MEDEIROS, A. F. A. ; VITORIO, D. M. ; DANTAS, M. C. ; Nataliene Silva dos Santos ; CHISSOLUCOMBE, J. B. ; MEDEIROS, C. . Desafio da Prevenção em Rede: uma parceria do programa Rede Viva e Casa Brasil do Cefet-PB, em João Pessoa-PB. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
14. **PINTO, M. E. F.** ; MOTA, K. S. L. ; FAHEINA, G. V. . Caracterização do Perfil Químico e Farmacológico de *Mentha villosa* Hudson. 2007. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
15. TRINDADE, J. W. ; CAVALCANTI, A. M. ; RODRIGUES, J. G. ; **PINTO, M. E. F.** ; SOUZA, N. S. ; BEZERRA, N. O. F. ; RAMOS, R. F. A. ; OLIVEIRA, S. R. . Uma Proposta Didática para a Utilização do Jogo de Xadrez no Ensino de Ciências. 2006. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
16. MEDEIROS, V. ; MEDEIROS, C. ; **PINTO, M. E. F.** ; VITORIO, D. M. ; SOUSA, W. C. ; FERREIRA, J. ; BARBOSA, S. A. ; LINS., R. M. C. E. . "Programa de Educação Preventiva ao Uso de Drogas nas Escolas - Rede Viva: Uma experiência metodológica de prevenção em rede.. 2006. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
17. MEDEIROS, V. ; MEDEIROS, C. ; **PINTO, M. E. F.** . Programa Rede Viva: A Prevenção Através da Pedagogia de projetos. 2006. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. MEDEIROS, V. ; MEDEIROS, C. ; MEDEIROS, A. F. A. ; SANTOS, N. S. ; **PINTO, M. E. F.** ; MONTEIRO, T. R. R. ; CHISSOLUCOMBE, J. B. ; LIMA, J. F. ; LIMA, M. N. S. ; SILVA, H. F. ; SANTOS, A. C. . III SEMINÁRIO NACIONAL DE PREVENÇÃO AO USO DE DROGAS NAS ESCOLAS CONSTRUINDO REDES DE PROTEÇÃO PARA OS JOVENS. 2008. (Outro).
2. MEDEIROS, C. ; MEDEIROS, V. ; MEDEIROS, A. F. A. ; FERREIRA, J. ; VITORIO, D. M. ; Nataliene Silva dos Santos ; CHISSOLUCOMBE, J. B. ; **PINTO, M. E. F.** . I Seminário Nacional de Prevenção ao Uso de Drogas nas Escolas: Uma visão Sistêmica. 2007. (Outro).

MERI EMILI FERREIRA PINTO

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

Araraquara, 24 de setembro de 2013.

BANCA EXAMINADORA



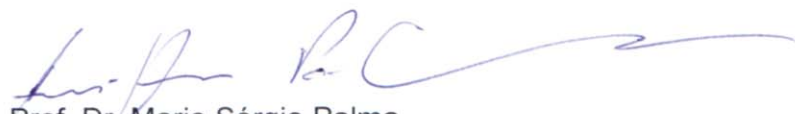
Profª Drª Vanderlan da Silva Bolzani (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Angela Regina Araujo
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Mario Sérgio Palma
Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro



Prof. Dr. Josean Fechine Tavares
Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa – PB

*À comunidade acadêmica, em especial aos
amantes de peptídeos.*

*Aos meus pais, Sr. Marco e Sra. Maria das
Graças por serem os instrumentos de Deus na
minha vida.*

*Ao meu esposo por ser meu amigo e ajudador
incondicional.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo.

Aos meus pais e irmãos, por entenderem a minha ausência na busca por conhecimento e por cada lágrima derramada de preocupação e saudade.

Aos meus parentes e irmãos na fé, por hospedarem-me e proporcionarem-me um ambiente familiar mesmo distante de casa.

À Dra. Vanderlan (Vanda para os seus alunos), minha elétrica orientadora, a qual me apresentou essa linha de pesquisa e me possibilitou crescer e desbravar meus medos.

Ao Dr. Eduardo Maffud Cilli pela amizade, paciência, ensinamentos e profissionalismo. Jamais esquecerei a contribuição prestada.

À equipe Bolzani: Marília Valli, Marcos Marçal, Marcos Pivato, Amanda Danuelo, Aline Coqueiro, Lucienne, Gabriel Mazzi, Welligton, Maria Luíza, Otávio Flausino e Luis Otávio.

Às colegas doutorandas Flávia Cagnin, Andreza Cristina da Silva, Teresinha Aguiar e Raíssa Sipowo por tudo o que passamos juntas e pela amizade.

Àos colegas Alfred Francis Attah, Johannes Köhbach, Justyna Kusek e Christian Bergmayr do *MS Core facility Laboratory*, coordenado pelo Prof. Christian W. Gruber pelo acolhimento e ensinamentos.

Ao CNPq e CAPES por financiarem minha bolsa de doutorado no país e bolsa PDSE no exterior, respectivamente.

A todos que direta ou indiretamente possibilitaram a formação desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

*Inspirar-se na natureza é dar espaço ao entendimento
da complexidade.*

RESUMO

O Brasil tem uma das maiores biodiversidades do mundo, no entanto poucos peptídeos derivados de plantas tem sido estudados desse bioma, constituindo uma rica fonte para buscar peptídeos com características estruturais e funções ecológicas interessantes. Neste estudo são descritos a investigação de orbitídeos e ciclotídeos em 24 espécies vegetais. Os orbitídeos referem-se a todos os peptídeos cíclicos ciclizados N-C que não apresentam ligação dissulfeto. Os ciclotídeos, grupo de mini- proteínas caracterizam-se por apresentar uma estrutura (CCK) conferindo -lhes uma notável estabilidade. Após a análise específica para estes compostos, foi possível selecionar três espécies para prosseguir com os estudos de isolamento: *J. ribifolia* , *H. calceolaria* e *B. vulgaris* . *J. ribifolia* (Pohl) Baill (syn. *Adenoropium ribifolium* Pohl, *J. gossypifolia* var. *ribifolia* (Pohl) Müll.), conhecida como "pinhão -manso" e "pinhão rasteiro", é um arbusto da família Euphorbiaceae, que geralmente cresce na região semi-árida do nordeste brasileiro. Plantas do gênero *Jatropha*, compreendem cerca de 175 espécies, ricas em compostos bioativos, como alcalóides, terpenos, lignanas, flavonóides e orbitídeos. A partir dos extratos etanólico de *J. ribifolia*, coletada no Estado da Paraíba, um novo octapeptídeo cíclico foi isolado por métodos cromatográficos, incluindo HPLC. A análise conformacional foi estabelecida por dados de RMN e dinâmica molecular. A síntese desse orbitídeo foi realizada por síntese em fase sólida (SPPS)-Fmoc/tBu. As atividades antimicrobiana, citotóxica e antimalárica foram avaliadas, para ambas as formas: circular e seu análogo linear sintéticos. Ribifolina (IC₅₀ 41,92 mM) foi moderadamente eficaz contra a o *Plasmodium falciparum* 3D7, mas seu análogo linear (IC₅₀ 519µmol / L) mostrou-se fraco em inibir a sobrevivência do parasita. Estes compostos não apresentam qualquer citotoxicidade contra nenhuma das linhagens celulares testadas. *H.calceolaria* (ipecacuanha) e *B. vulgaris* (beterraba) apresentaram rica composição em peptídeos com cisteínas. Neste trabalho, foi estudada a expressão de ciclotídeos em três diferentes tecidos de *H. calceolaria*: sementes, folhas, caules e *B. vulgaris*: bulbo, folhas e caules. Os extratos mostraram uma grande diversidade de peptídeos com massas entre 2600 e 4000 Da, muitos desses com seis resíduos de cisteínas. Assim, as frações foram purificadas por HPLC em fase reversa e gradiente linear com acetonitrila. Os picos referentes a cada fração foram coletados manualmente e avaliados por MALDI -TOF, permitindo a caracterização de cada pico e a diversidade de ciclotídeos. A partir das sementes de *H. calceolaria* foi possível isolar um novo ciclotídeo com massa molecular de 3030 Da contendo 29 aminoácidos - *Hycos* A. Além desse, outras duas sequências parciais: *Hycos* B (m/z 3171) e um peptídeo linear (m/z 3562) de *B. vulgaris*. As sequências moleculares foram estabelecidas por reações de redução, alquilação e digestão enzimática utilizando endoproteinases Glu-C, tripsina, quimotripsina e análises por MS/MS.

Palavras-chave: Orbitídeos, Ciclotídeos, Euphorbiaceae, Violaceae, Amaranthaceae, Peptídeos cíclicos.

ABSTRACT

Brazil has one of the largest biodiversity in the world, however only a few plant-derived peptides have been studied from our biomes, constituting a rich source of peptides with interesting structural features and ecological functions, and so far, with potential pharmacological properties. In this study are described the investigation of orbitides and cyclotides in 24 species from plants. The orbitides refer to all N-to-C cyclized peptides from plants that do not contain disulfides and cyclotides, mini-proteins group characterized by a cyclic topology, collectively known as cyclic cystine motif (CCK) conferring them with remarkable stability. After the specific analysis for these compounds, was possible to select three species for to isolated your peptides: *J. ribifolia*, *H. calceolaria* e *B. vulgaris*. *J. ribifolia* (Pohl) Baill (syn. *Adenoropium ribifolium* Pohl, *J. gossypifolia* var. *ribifolia* (Pohl) Müll.), known as “pinhão-mansó” and “pinhão rasteiro”, is a shrub of the Euphorbiaceae family that commonly grows in the semiarid region of northeastern Brazil. Plants of the genus *Jatropha*, which comprises approximately 175 species, have been established as a rich source of bioactive compounds such as alkaloids, terpenes, lignans, flavonoids and cyclic peptides, so called orbitides. From the EtOH extracts of the *J. ribifolia*, collected in the states of Paraíba, an octapeptide cyclic, was isolated by a multi-step chromatography procedures, including HPLC. Conformational analysis of these peptides has been evaluated by using of NMR experiments and simulated annealing molecular dynamics. The synthesis of the new cyclic peptides were accomplished by solid-phase peptide synthesis (SPPS)-Fmoc/tBu. The antimicrobial, cytotoxicity and antimalarial activities are being evaluated for both the circular and linear synthetic form of the novel orbitide from *J. ribifolia*. Ribifolin (IC₅₀ 41.92 µM) was moderately effective against the *Plasmodium falciparum* 3D7 strain, and linear ribifolin (IC₅₀ 519µmol/L) showed a weak effect in inhibiting the survival of the parasites. These compounds did not exhibit any cytotoxicity. As *H. calceolaria* (white ipecac) as *B. vulgaris* (beet roots) presented peptides rich in cysteines in your composition. In this work, were studied cyclotide expression in three different tissues from *H. calceolaria*, i.e. seeds, leaves, stems and *B. vulgaris*, i.e. bulb, leaves and stems. The extracts showed a wide diversity of peptides ranging in mass from 2600 to 4000 Da and most of these peptides contained 6 cysteine residues indicating the presence of cyclotides. Thus, the cyclotide fractions of each tissue were analysed by HPLC using reversed-phase C₁₈ columns and linear acetonitrile gradients. Eluting peaks for each fraction were monitored with UV absorbance, collected manually and assessed by MALDI-TOF allowing characterization of each cyclotide peak and the sequence diversity of these molecules in *H. calceolaria*. From seeds it was possible to isolate one novel bracelet cyclotide with a molecular weight of 3030 Da contain 29 amino acids *Hyco A* and other two partial sequences *Hyco B* and one linear peptide (defensin) from *B. vulgaris*; their molecular sequence has been analyzed using reduction, alkylation and enzymatic digest using endoproteinases Glu-C, trypsin, chymotrypsin and MS/MS peptide fragmentation.

Keywords: Orbitides, Cyclotides, Euphorbiaceae, Violaceae, Amaranthaceae, Cyclic Peptides

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Tipos de ciclizações encontradas nos peptídeos: cadeia lateral-cadeia lateral, cadeia lateral-cabeça, cadeia lateral-cauda e cabeça-cauda. _____ 34
- Figura 2** - Publicações sobre peptídeos cíclicos entre os anos de 2009-2013. _____ 34
- Figura 3**- Homologia entre as enzimas que compõe a síntese ribossomal e não ribossomal. 36
- Figura 4** - Biossíntese de peptídeos não-ribossomais(NRP). _____ 37
- Figura 5** - Classificação dos ciclopeptídeos isolados de plantas superiores, segundo características estruturais. _____ 38
- Figura 6** - Classificação dos ciclopeptídeos isolados de plantas superiores, segundo Picchi (2009) e colaboradores. _____ 39
- Figura 7**- Alinhamento dos orbitídeos, com base em sua homologia. _____ 42
- Figura 8** - Reação simplificada da obtenção de uma resina Fmoc-Gly-Wang. _____ 47
- Figura 9** - Clivagem do grupo Fmoc por piperidina, e locais aonde a clivagem ácida ocorre após o término da seqüência. _____ 48
- Figura 10** - Rota geral para síntese em fase sólida- Fmoc. _____ 48
- Figura 11** – Espécie *Oldenlandia affinis*, de onde foi isolado o primeiro ciclotídeo, kalata B1. _____ 50
- Figura 12** - Alinhamento das sequências de ciclotídeos inibidores de tripsina. _____ 51
- Figura 13** - Sequence Diversity Wheel de todos os ciclotídeos descritos. _____ 51
- Figura 14** - Isolamento, fracionamento e caracterização de ciclotídeo de plantas. _____ 55
- Figura 15** - *Jatropha ribifolia* Baill (Pohl), Serra Branca – PB. _____ 57

Figura 16 - <i>Hybanthus calceolaria</i> (L.) Schulze-Menz.	59
Figura 17 - Mapa de distribuição de <i>Beta vulgaris</i> .	61
Figura 18 - Representação das placas com a aplicação dos extratos submetidos aos reveladores químicos.	68
Figura 19 - Protocolo usado para a síntese do peptídeo linear utilizando resina Fmoc Wang.	75
Figura 20 - Fluxograma do estudo envolvendo <i>Jatropha ribifolia</i> .	76
Figura 21 - Procedimentos para o preparo das reações de redução e acetamidação	83
Figura 22 - Resumo de atividades delineadas para o sequenciamento dos ciclotídeos.	85
Figura 23 - Teste positivo para a revelação da fração acetato de etila de <i>J. ribifolia</i> .	89
Figura 24 - Perfil cromatográfico da fração acetato (azul) e do extrato bruto sem a fração acetato (preto) de <i>J. ribifolia</i> .	90
Figura 25 - Perfil cromatográfico das amostras Fr2-Fr8.	91
Figura 26 - Perfil cromatográfico de 1B, 1C e 1D, Respectivamente.	93
Figura 27 - Espectro de Massas HR-MS/ESI da fração 1B, obtido em modo positivo.	94
Figura 28 - Espectro de Massas (MS/MS) da fração 1B, com fragmentação do íon $(M+H)^+$ 767,5, 10-40 eV.	95
Figura 29 -Aminograma da fração 1B.	96
Figura 30 - Expansão do espectro de RMN TOCSY 2D, assinalando as correlações dos NH e H_{α} dos aminoácidos.	97
Figura 31 - Expansão do espectro de RMN TOCSY 2D, na região de 5,1-3,3ppm.	97
Figura 32 - Expansão do espectro de RMN TOCSY 2D, na região de 2,2-0,4 ppm.	98

Figura 33- <i>Expansão do espectro de NOESY 2D, mostrando as correlações entre hidrogênios NHi-NHi-1 e NHi-Hαi-1.</i>	98
Figura 34 - <i>Resíduos dos aminoácidos mostrando os diferentes acoplamentos visualizados no espectro de COSY.</i>	99
Figura 35- <i>Ribifolina, um novo peptídeo da <i>Jatropha ribifolia</i>.</i>	100
Figura 36- <i>Confômeros obtidos por SA/MD de ribifolina.</i>	101
Figura 37- <i>Síntese da cadeia linear do peptídeo e ciclização da cadeia.</i>	103
Figura 38 - <i>Cromatograma dos peptídeos sintéticos ribifolina (preto) e seu análogo linear (azul).</i>	104
Figura 39 - <i>Cromatograma da fração acetato de etila (azul) e ribifolina natural (preto).</i>	104
Figura 40- <i>Espectro de RMN ^1H obtido em 500 MHz, CDCl_3. Em destaque, expansão na região de 6,5-5,5ppm.</i>	106
Figura 41 - <i>Expansão do espectro de RMN ^1H obtido em 500 MHz, CDCl_3 na região de 3,1-1,7 ppm.</i>	107
Figura 42- <i>Expansão do espectro de RMN ^1H obtido em 500 MHz, CDCl_3 na região de 1,9-0,7 ppm.</i>	107
Figura 43- <i>Espectro de RMN ^{13}C obtido em 125 MHz.</i>	108
Figura 44 - <i>Porcentagem de inibição do crescimento celular de ribifolina e linear ribifolina para células HEX 293T.</i>	111
Figura 45 - <i>Atividade antimalárica de ribifolina. Curva dose-resposta de (A) ribifolina, (B) linear ribifolina and (C) controle cloroquina.</i>	112
Figura 46- <i>Distribuição dos extratos e famílias botânicas investigadas.</i>	113
Figura 47- <i>Representação da redução e acetamidação das cisteínas nos ciclotídeos.</i>	114

Figura 48 – Espectros de massas dos compostos nativos e alquilados de <i>Evolvulus linarioides</i> . _____	116
Figura 49 – Espectros de massas dos compostos nativos e alquilados de <i>Hybanthus calceolaria</i> (sementes). _____	117
Figura 50 – Espectros de massas dos compostos nativos e alquilados de <i>Hybanthus calceolaria</i> (folhas). _____	118
Figura 51 – Espectros de massas dos compostos nativos e alquilados de <i>Hybanthus calceolaria</i> (caules). _____	119
Figura 52 - Espectros de massas dos compostos nativos e alquilados de <i>Beta vulgaris</i> (bulbos). _____	120
Figura 53 - Espectros de massas dos compostos nativos e alquilados de <i>Beta vulgaris</i> (folhas). _____	121
Figura 54 - Espectros de massas dos compostos nativos e alquilados de <i>Beta vulgaris</i> (caules). _____	122
Figura 55 - Cromatogramas dos três órgãos de <i>H. calceolaria</i> . _____	124
Figura 56 - Cromatograma da fração AFr38. _____	125
Figura 57 - Espectro de massas da fração nativa AFr38. _____	126
Figura 58 - Espectro de massas da fração reduzida AFr38. _____	126
Figura 59 - Espectro de massas da fração reduzida, alquilada e digerida AFr38. Enzima Tripsina. _____	127
Figura 60 - MS/MS do íon m/z 2697 da fração AFr38. Expansão da região entre 1504 e 2850. _____	127
Figura 61 - MS/MS do íon m/z 2697 da fração AFr38. Expansão da região entre 16 e 1600. _____	128
Figura 62 - Cromatograma da fração AFr51. _____	131

<i>Figura 63- Espectro de massas da fração nativa AFr51.</i>	132
<i>Figura 64- Espectro de massas da fração reduzida AFr51.</i>	132
<i>Figura 65- Espectro de massas da fração reduzida, alquilada e digerida AFr51. Enzima EndoGlu-C.</i>	133
<i>Figura 66- MS/MS do íon m/z 3396 da fração AFr51, oriunda da digestão EndoGlu-C. Expansão da região entre 2361 e 3396.</i>	133
<i>Figura 67- MS/MS do íon m/z 3396 da fração AFr51, oriunda da digestão EndoGlu-C. Expansão da região entre 1294 e 2381.</i>	134
<i>Figura 68- MS/MS do íon m/z 3396 da fração AFr51, oriunda da digestão EndoGlu-C. Expansão da região entre 0 e 1294.</i>	134
<i>Figura 69- Espectro de massas da fração reduzida, alquilada e digerida AFr51. Enzima Tripsina.</i>	135
<i>Figura 70- MS/MS do íon m/z 3396 da fração AFr51, oriunda da digestão tripsina. Expansão da região entre 2602 e 3396.</i>	135
<i>Figura 71- MS/MS do íon m/z 3396 da fração AFr51, oriunda da digestão tripsina. Expansão da região entre 1582 e 2585.</i>	136
<i>Figura 72- MS/MS do íon m/z 3396 da fração AFr51, oriunda da digestão tripsina. Expansão da região entre 0 e 1597.</i>	136
<i>Figura 73 -Espectro de massas da fração reduzida, alquilada e digerida AFr51. Enzima quimiotripsina.</i>	137
<i>Figura 74- MS/MS do íon m/z 3396 da fração AFr51, oriunda da digestão quimiotripsina. Expansão da região entre 2107 e 3396.</i>	137
<i>Figura 75 - MS/MS do íon m/z 3396 da fração AFr51, oriunda da digestão quimiotripsina. Expansão da região entre 0 e 2111.</i>	138

<i>Figura 76</i> – MS/MS do íon m/z 2143 da fração AFr51, oriunda da digestão quimiotripsina. Expansão da região entre 1312 e 2194. _____	138
<i>Figura 77</i> – MS/MS do íon m/z 2143 da fração AFr51, oriunda da digestão quimiotripsina. Expansão da região entre 0 e 1312. _____	139
<i>Figura 78</i> – Hyco A, evidenciando os loops e a estrutura CCK e a estrutura tridimensional. _____	140
<i>Figura 79</i> – Alinhamento de sequências integras e parciais de ciclotídeos de Hybanthus. _____	140
<i>Figura 80</i> – Comparação dos cromatogramas das frações HcA, HcB e HcC. _____	142
<i>Figura 81</i> – Gráfico relacionando os tempos de retenção e os íons dos picos de HcA. ____	143
<i>Figura 82</i> – Gráfico relacionando os tempos de retenção e os íons dos picos de HcB. ____	147
<i>Figura 83</i> – Gráfico relacionando os tempos de retenção e os íons dos picos de HcC. ____	147
<i>Figura 84</i> – Cromatograma da fração BvA. _____	148
<i>Figura 85</i> – Cromatograma da fração BvA15. _____	149
<i>Figura 86</i> – Espectro de massas da fração pura de BvA15. _____	151
<i>Figura 87</i> – Espectro de massas da fração reduzida, alquilada e digerida BvA15. Enzima EndoGlu-C. _____	151
<i>Figura 88</i> – Espectro de massas da fração reduzida, alquilada e digerida BvA15. Enzima tripsina. _____	152
<i>Figura 89</i> – MS/MS do íon m/z 3910 da fração BvA15, oriunda da digestão EndoGlu-C. _____	152
<i>Figura 90</i> – MS/MS do íon m/z 2480 da fração BvA15, oriunda da digestão EndoGlu-C. _____	153
<i>Figura 91</i> – MS/MS do íon m/z 3320 da fração BvA15, oriunda da digestão tripsina. ____	153

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1- Alguns orbitídeos e suas atividades.</i>	41
<i>Tabela 2- Orbitídeos elucidados até julho de 2013, espécies e famílias.</i>	43
<i>Tabela 3 - Alguns ciclotídeos bioativos isolados de plantas.</i>	53
<i>Tabela 4 - Ciclotídeos de Hybanthus.</i>	60
<i>Tabela 5 - Alinhamento dos peptídeos de Beta vulgaris L.</i>	62
<i>Tabela 6 - Banco de espécies investigadas na triagem inicial (screening) de peptídeos cíclicos.</i>	65
<i>Tabela 7 - Codificações e massas das frações obtidas da HPLC semi-preparativo.</i>	70
<i>Tabela 8- Resultados das Revelações.</i>	88
<i>Tabela 9- Codificações e massas das frações obtidas por HPLC semi-preparativo.</i>	92
<i>Tabela 10 -Dados do espectro de RMN ¹H, DMSO- d₆, 500 MHz.</i>	99
<i>Tabela 11- Dados de RMN ¹H (500 MHz) e ¹³C(125 MHz) 1D SiOH-22 em CDCl₃ em comparação com dados da literatura.</i>	105
<i>Tabela 12 -Valores de CIM* para as amostras testadas contra diferentes espécies de fungos.</i>	109
<i>Tabela 13- Porcentagem de inibição do crescimento celular (GI) e a média ± desvio padrão da média (SD) das amostras.</i>	110
<i>Tabela 14- Orbitídeos isolados de espécies de Jatropha e suas atividades antimaláricas.</i>	112
<i>Tabela 15 – Massas e tempos de retenção das frações de HcA.</i>	144
<i>Tabela 16– Massas e tempos de retenção das frações de HcB.</i>	145

Tabela 17 – Massas e tempos de retenção das frações de HcC. 146

Tabela 18– Sequências parciais obtidos para o peptídeo pertencente à Bva15. 150

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Eluição da fase acetato de etila de J. ribifolia em coluna de extração Sepack. 69

Quadro 2-Frações obtidas após eluição da fração acetato de etila em cartucho C₁₈. 90

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA – aminoácido
- ACN – acetonitrila
- AcOEt – Acetato de etila
- ALCB – Herbário Alexandre Leal Costa
- AMP cíclico - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- AMPs – Peptídeos antimicrobianos
- APT – *Attached Proton Test*
- Boc - *tert-butyloxycarbonyl*
- BvA – Fração oriunda do bulbos de *Beta vulgaris*
- BvB – Fração oriunda das folhas de *Beta vulgaris*
- BvC – Fração oriunda dos caules de *Beta vulgaris*
- CAS - *Chemical Abstracts Service*
- CCDA – Cromatografia em Camada Delgada Analítica
- CCK - *Cyclic Cystine Knot*
- CDCl₃ – Clorofórmio deuterado
- cDNA – *Circular Deoxyribonucleic acid*
- HPLC – *High Pressure Liquid Chromatography*
- COBALT – *Constraint-based Multiple Alignment Tool*
- DCM – Diclorometano
- DIC - *N, N*¹- diisopropilcarbodiimida
- DIEA - *N*- etildiisopropilamina
- DMF - Dimetilformamida
- DMSO-*d*₆ - Dimetilsufóxido deuterado
- DNA – *Deoxyribonucleic acid*
- EBB - Extrato Bruto
- EndoGlu-C – Endoprotease de glicina
- EST – *Expressed sequence tags*
- Fmoc - 9-fluorenilmetiloxicarbonila
- gCOSY - *Gradient Correlation Spectroscopy*
- GI – *Growth inhibition*
- HBTU - Fosfato de hexafluor 2-(1H- benzotriazol-1-il)-1,1,3,3- tetrametilurônio

HcA – Fração oriunda das sementes de *Hybanthus calceolaria*
HcB – Fração oriunda das folhas de *Hybanthus calceolaria*
HcC – Fração oriunda dos caules de *Hybanthus calceolaria*
HOBt - N- hidroxibenzotriazol
HRMS – *High Resolution Mass Spectrometry*
J - constante de acoplamento
JPB – Herbário Prof. Lauro Pires Xavier
LNLS - Laboratório Nacional de Luz Sincroton
LTF – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
MALDI - *Matrix-assisted laser desorption/ionization*
MS - *Mass Spectrometry*
MTT - 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio
NOESY – *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
NRP – *Non-ribosomal peptides*
NRPS – *Non-ribosomal peptides synthetases*
ODS - Octadecilsilano (C18)
OPA - *orto-ftalaldeído*
PC – Peptídeo cíclico
PCP – *Peptidyl Carrier proteins*
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
RNA - *Ribonucleic acid*
RT – *Retention time/* Tempo de retenção
SD - *Standard deviation/* desvio-padrão
SPFS – *Synthesis Peptide Solid Phase*
TFA - Ácido Trifluoracético
TOCSY - *Total Correlation Spectroscopy*
TOF- *Time of flight*
UV – Ultravioleta
Vis – visível

ABREVIATURAS DO AMINOÁCIDOS

Glicina	Gly	G	Ácido 2-aminoacético ou ácido 2-amino-etanóico
Alanina	Ala	A	Ácido 2-aminopropiónico ou ácido 2-amino-propanóico
Leucina	Leu	L	Ácido 2-aminoisocapróico ou ácido 2-amino-4-metil-
Valina	Val	V	Ácido 2-aminovalérico ou ácido 2-amino-3-metil-butanóico
Isoleucina	Ile	I	Ácido 2-amino-3-metil-n-valérico ou ácido 2-amino-3-metil-
Prolina	Pro	P	Ácido pirrolidino-2-carboxílico
Fenilalanina	Phe	F	Ácido 2-amino-3-fenil-propiónico ou ácido 2-amino-3-fenil-
Serina	Ser	S	Ácido 2-amino-3-hidroxi-propiónico ou ácido 2-amino-3-
Treonina	Thr	T	Ácido 2-amino-3-hidroxi-n-butírico
Cisteína	Cys	C	Ácido 2-bis-(2-amino-propiónico)-3-dissulfeto ou ácido 3-
Tirosina	Tyr	Y	Ácido 2-amino-3-(p-hidroxifenil)propiónico ou
Asparagina	Asn	N	Ácido 2-aminossuccionâmico
Glutamina	Gln	Q	Ácido 2-aminoglutarâmico
ácido aspártico	Asp	D	Ácido 2-aminossuccínico ou ácido 2-amino-butanodióico
ácido glutâmico	Glu	E	Ácido 2-aminoglutárico
Arginina	Arg	R	Ácido 2-amino-4-guanidina-n-valérico
Lisina	Lys	K	Ácido 2,6-diaminocapróico ou ácido 2,6-diaminoexanóico
Histidina	His	H	Ácido 2-amino-3-imidazolpropiónico
Triptofano	Trp	W	Ácido 2-amino-3-indolpropiónico
Metionina	Met	M	Ácido 2-amino-3-metiltio-n-butírico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	33
2.1	PEPTÍDEOS CÍCLICOS/ CICLOPEPTÍDEOS	33
2.2	PEPTÍDEOS CÍCLICOS VEGETAIS	35
2.2.1.	ORBITÍDEOS	39
2.2.1.1.	<i>Síntese de Orbitídeos</i>	45
2.2.2.	CICLOTÍDEOS - MINI-PROTÉINAS VEGETAIS.	49
2.3	<i>JATROPHA RIBIFOLIA</i> (FAMÍLIA EUPHORBIACEAE)	57
2.4	<i>HYBANTHUS CALCEOLARIA</i> (L.) SCHULZE-MENZ (FAMÍLIA VIOLACEAE)	58
2.5	<i>BETA VULGARIS</i> L. (AMARANTHACEAE)	60
3	OBJETIVOS	63
2.1	OBJETIVO GERAL	63
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
4	MATERIAIS E MÉTODOS	65
4.1.	<i>JATROPHA RIBIFOLIA</i> : COLETA E OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO	66
4.2.	<i>HYBANTHUS CALCEOLARIA</i> : COLETA E OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO	66
4.3.	<i>BETA VULGARIS</i> : OBTENÇÃO DO MATERIAL FRESCO E PREPARAÇÃO DO EXTRATO	67
4.4.	TRIAGEM DOS EXTRATOS: AVALIAÇÃO DE ORBITÍDEOS (TIPO-CARYOPHYLLACEAE)	67
4.4.1.	APLICAÇÃO DA SOLUÇÃO DE NINIDRINA A 02%	68
4.4.2.	APLICAÇÃO DA SOLUÇÃO CL ₂ /O-TOLIDINA (CLOROX)	68
4.4.3.	APLICAÇÃO DA SOLUÇÃO DE COMASSIE BRILLANT BLUE (G-250)	69
4.5.	FRACIONAMENTO E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>JATROPHA RIBIFOLIA</i>	69
4.5.1.	HPLC ANALÍTICO PARA ANÁLISE DO PERFIL PEPTÍDICO DAS FRAÇÕES FR2-FR8	69
4.5.2.	HPLC SEMI-PREPARATIVO FRAÇÕES FR6- FR7	70

4.5.3. ESPECTROMETRIA DE MASSAS	71
4.5.4. ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS	71
4.5.5. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	72
4.5.6. DINÂMICA MOLECULAR	72
4.6. SÍNTESE DE RIBIFOLINA	73
4.7. ESTUDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	77
4.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	77
4.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA	78
4.9.1. CÉLULAS SF295, HCT-8 E MDA-MB-435	78
4.9.2. CÉLULAS HEK 293T	79
4.10. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA	79
4.11. ESTUDO DE CICLOTÍDEOS	81
4.11.1. INVESTIGAÇÃO DE CICLOTÍDEOS NO BANCO DE EXTRATOS	81
4.11.2. CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE CISTEÍNAS	82
4.11.3. ESTUDO DE CICLOTÍDEOS EM <i>HYBANTHUS CALCEOLARIA</i> .	83
4.11.4. PURIFICAÇÃO POR HPLC E ANÁLISE DOS PICOS POR MALDI	83
4.11.5. COMPARAÇÃO DA DIVERSIDADE PEPTÍDICA NOS DIFERENTES ÓRGÃOS DE <i>H. CALCEOLARIA</i>	85
4.12. ANÁLISE DE PEPTÍDEOS EM <i>BETA VULGARIS</i>	86
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
5.1. AVALIAÇÃO DE ORBÍTIDEOS NO BANCO DE ESPÉCIES	87
5.2. ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO DE RIBIFOLINA, UM NOVO ORBITÍDEO DE <i>JATROPHA RIBIFOLIA</i>	89
5.2.1. HPLC SEMI-PREPARATIVO FRAÇÕES FR6-FR7	92
5.2.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS	94
5.2.3. ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS	96
5.2.4. ELUCIDAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE 1B POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.	96
5.2.5. DINÂMICA MOLECULAR (SIMULATED ANNEALING MOLECULAR DYNAMICS)	101
5.3. SÍNTESE EM FASE SÓLIDA DE RIBIFOLINA.	102
5.4. IDENTIFICAÇÃO DO DITERPENO JATROFONA EM <i>JATROPHA RIBIFOLIA</i>	105
5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	109
5.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA	110

5.7. AVALIAÇÃO ANTIMALÁRICA	111
5.8. SCREEN DE CICLOTÍDEOS PARA O BANCO DE ESPÉCIES.	113
5.9. CICLOTÍDEOS DE <i>HYBANTHUS CALCEOLARIA</i>	123
5.9.1. ANÁLISE DE <i>HCA</i>.	124
5.9.1.1. Análise da fração AFr38 de <i>HcA</i>	125
5.9.1.2. Análise da fração AFr51 de <i>HcA</i>.	129
5.9.2. ANÁLISES DE <i>HCB</i> E <i>HCC</i>	141
5.9.3. COMPARAÇÃO DO CONTEÚDO DE CICLOTÍDEO ENTRE OS ÓRGÃOS DE <i>H. CALCEOLARIA</i>.	141
5.9.4. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO <i>BvA</i> - <i>BETA VULGARIS</i>	148
<u>CONCLUSÃO</u>	<u>154</u>
<u>REFERÊNCIAS</u>	<u>156</u>
<u>ANEXOS</u>	<u>167</u>

1 INTRODUÇÃO

O direcionamento das pesquisas buscando produtos úteis à humanidade advindos de fontes naturais é, sem dúvida, uma tarefa que demanda capricho e desenvoltura. No contexto atual da pesquisa de produtos naturais, propor um novo produto é trazer à sociedade uma nova ferramenta, seja para saúde, beleza, tecnologia, entre outras, sendo notável o valor agregado desses no mercado nacional e internacional.

Os metabólitos secundários, tais como alcalóides, terpenos e derivados fenólicos (flavonóides, lignóides, benzopiranos) têm sido largamente estudados. Na área da Química de Produtos Naturais (QPN) esses estudos tem se dado em função da investigação de diversas atividades biológicas e ou farmacológicas, a exemplo de antioxidante, antimicrobiana, imunossupressora, antiinflamatória, antifúngica, antitumoral, antimalárica, inibidores de acetilcolinesterase, entre outras. Nos últimos anos, além das micromoléculas tradicionalmente estudadas, os peptídeos têm trazido grandes expectativas para os químicos de Produtos Naturais no desenvolvimento de fármacos. Sabe-se que compostos peptídicos podem ser biossintetizados via ribossomal ou não-ribossomal, sendo sua cadeia curta (micromoléculas), chegando até cerca de 90 aa (aminoácidos), neste caso, caracterizados como mini-proteínas (macromoléculas). Segundo Clayden (2001) caracterizam-se peptídeos sequências de até 100 aa, aproximadamente. Dentre as principais macromoléculas, os peptídeos constituem uma classe de grande interesse biológico e farmacológico, pois possuem papéis fundamentais nos processos metabólicos, de manutenção da vida, antimicrobianos, anticâncer, etc (TIAN et al., 2009; NAPOLITANO et al., 2003).

Deve-se considerar que a estrutura tem relação direta com a atividade do composto em estudo; assim os peptídeos desempenham seus papéis dependendo da composição e sequência dos aminoácidos que o formam, bem como, da sua disposição espacial. Há genericamente, peptídeos ditos lineares e cíclicos. A aplicação de peptídeos lineares como fármacos é potencialmente limitada, pois são susceptíveis à clivagem proteolítica, possuem pobre farmacocinética e pouca biodisponibilidade (CRAIK, 2002). Tais limitações não são observadas nos peptídeos cíclicos, o que os fazem atrativos nos estudos de bioprospecção.

A interessante topologia do anel cativou a imaginação dos químicos por muitos anos, os quais relacionavam os peptídeos cíclicos a outros macrociclos bioativos, sendo os primeiros de particular importância devido à sua estabilidade à proteases (TYNDALL; NALL;

FAIRLIE, 2005), o que explicaria seu potencial terapêutico. A descoberta de gramicidina S (Gramicidina Soviética) em 1944 pela Gause e Brazhnikova foi o ponto crucial na história dos peptídeos cíclicos. Pouco depois de sua descoberta na metade da Segunda Guerra Mundial, este peptídeo foi amplamente utilizado como antibiótico no tratamento de soldados feridos. Desde então, novos peptídeos cíclicos foram descobertos, sendo que muitos deles têm sido utilizados como agentes terapêuticos. Alguns exemplos incluem a calcitonina, octreotida, a ciclosporina A, a nisina, polimixina, colistina, gomesina, ziconotídeo, didemina (WHITE; YUDIN, 2011). Inubitavelmente, isolar, elucidar e investigar as atividades inerentes a essas moléculas é de grande relevância para a bioprospecção de produtos naturais. Sua ocorrência se dá largamente no reino animal e microrganismos (actinomicetos, fungos, etc.) (TAN; ZHOU, 2006) e são amplamente pesquisados. Nas plantas a descoberta desses peptídeos são limitados a determinados táxons, sendo que os estudos descrevendo a ocorrência, composição química e função de peptídeos são cada vez mais frequentes.

No Brasil, os trabalhos com pequenos peptídeos cíclicos (PC) de origem vegetal são praticamente inéditos, sendo o Instituto de Química da UNESP responsável pelos primeiros trabalhos com tais direcionamentos. Os estudos envolvem a busca e caracterização dessa classe de substâncias de plantas do semiárido, região coberta pela Caatinga, único bioma exclusivamente brasileiro-, rico em espécies endêmicas. Além disso, são realizadas síntese e investigação das possíveis atividades biológicas e farmacológicas desempenhadas por elas. Estudos desenvolvidos pelo NuBBE (Processos/FAPESP: 04/07062-2; 06/58699-6 e 04/11982-0) pertencentes ao projeto temático "*Conservation and Sustainable Use of the Diversity from Cerrado and Atlantic Forest: Chemical Diversity and Prospecting for Potential Drugs*" - Programa Biota-Fapesp, descrevem o isolamento de seis euciclopeptídeos da biota brasileira e isolados da partição do látex das espécies *Jatropha multifida* L., *Jatropha gossypifolia* L. e *Jatropha curcas* L (PICCHI, 2007; ALTEI, 2009). Os excelentes resultados alcançados com os estudos anteriores com *Jatropha*, desenvolvidos em nosso laboratório, nos motivou a buscar novas moléculas em outras famílias e gêneros. A nova fase da pesquisa corroborou não só o isolamento de peptídeos cíclicos pequenos, mas também de ciclotídeos (mini-proteínas) de plantas nativas do semiárido paraibano – Brasil e seus possíveis papéis farmacológicos. A escolha das espécies *Jatropha ribifolia* e *Hybanthus calceolaria* se deu com base em dados da literatura, os quais já apresentavam peptídeos cíclicos para ambos os gêneros. A espécie *Beta vulgaris* também foi estudada, pois de acordo com estudos "*In silico*", há possibilidade de apresentar este tipo de peptídeo (PESTANA-CALSA; CALSA JR., 2011).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PEPTÍDEOS CÍCLICOS/ CICLOPEPTÍDEOS

Os peptídeos cíclicos representam uma diversa classe de produtos naturais distribuídos largamente em bactérias, fungos, plantas e animais (TAN; ZHOU, 2006; TANG et al., 2010a; CONDIE et al., 2011). De uma forma genérica, PCs são poliamidas cíclicas formadas de aminoácidos proteinogênicos (20 aa pertencentes ao código genético) (TAN; ZHOU 2006; TANG; WANG et al., 2010) ou ainda, em casos mais complexos, incluem outros tipos de resíduos, como *D*-aminoácidos e resíduos com variações em sua estrutura (CONDIE, et al., 2011).

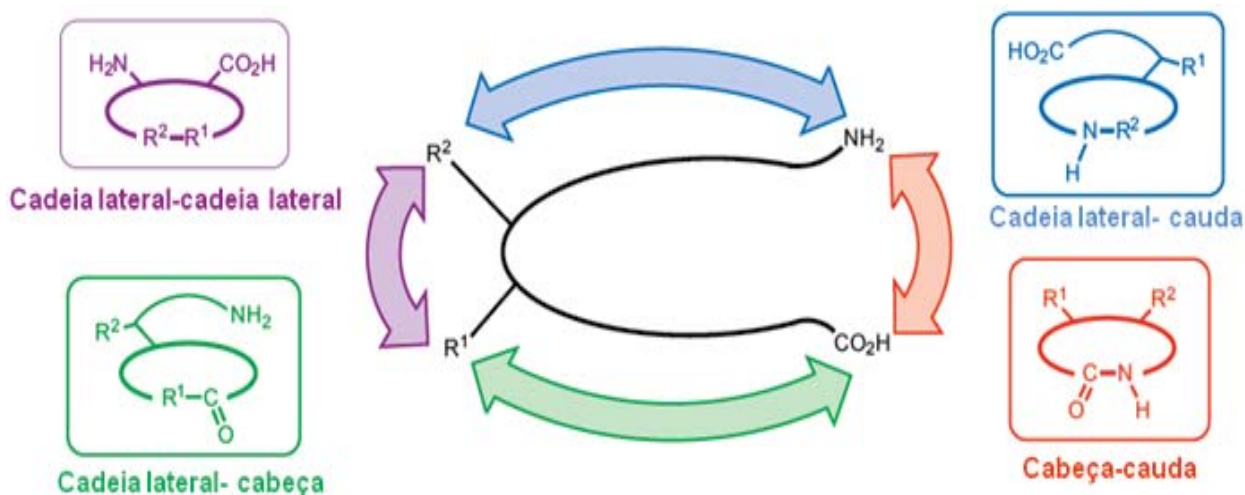
Genericamente, há quatro topologias para a ciclização destes peptídeos (Figura 1): Cabeça-cauda; ligação por meio das cadeias laterais; ligação cadeia lateral-cabeça; ou cadeia lateral-cauda (WHITE; YUDIN, 2011). As duas primeiras ciclizações são as mais encontradas. Na formação do ciclo cabeça-cauda, o grupo carboxila terminal do peptídeo reage por meio de uma reação de condensação com o grupo amino terminal do próprio peptídeo formando uma ligação amida (ligação peptídica). No segundo caso, geralmente os grupos sulfidrilas de resíduos de cisteína podem se unir formando ligações dissulfeto. Outra possibilidade é a reação das cadeias laterais de aminoácidos básicos e ácidos por meio de uma ligação amida, formando o composto cíclico. As outras duas são um misto entre as duas descritas acima. No entanto, mais de uma destas pode ocorrer ao mesmo tempo, como no caso dos ciclotídeos, onde tanto a ciclização cabeça-cauda como as ligações dissulfeto são encontradas.

Apesar do número crescente de publicações sobre peptídeos cíclicos, ainda há muito que se investigar sobre suas funções (DIEDERICH et al., 2008), bem como a biossíntese, a ocorrência e as funções fisiológicas. Essas moléculas compreendem uma classe de produtos naturais com um largo espectro de atividades biológicas. Em sua maioria são de natureza hidrofóbica apresentando grande diversidade biológica (AUVIN et al., 1997).

O desenvolvimento dos métodos analíticos e espectrométricos permitiu nos últimos anos a identificação de compostos, até então inéditos, em diversas plantas, microrganismos e animais. Somado a isto, a melhoria do protocolo utilizado na síntese de peptídeos em fase

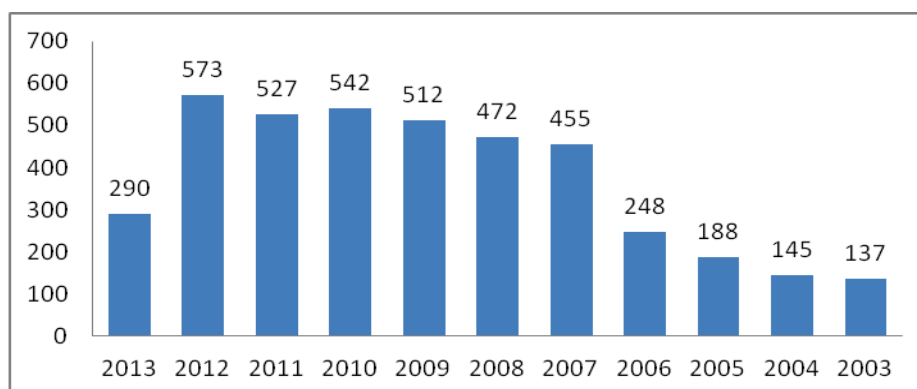
sólida (SPFS) tem permitido a obtenção por via sintética de inúmeros análogos e/ou novos peptídeos. Este avanço científico proporcionou a identificação e a caracterização de inúmeros peptídeos naturais bioativos, bem como a síntese de análogos e derivados inéditos. Investigando o panorama de publicações no banco de dados da Sociedade Americana de Química (ACS) entre os anos de 2002 a 2013 (Figura 2), por meio da ferramenta de pesquisa *SciFinder*, verificamos que há 6090 artigos publicados quando utiliza-se, nos campos de busca, as palavra-chaves *Cyclic peptides*.

Figura 1 - Tipos de ciclizações encontradas nos peptídeos: cadeia lateral-cadeia lateral, cadeia lateral-cabeça, cadeia lateral-cauda e cabeça-cauda.



Fonte: Traduzido de (WHITE; YUDIN, 2011).

Figura 2 - Publicações sobre peptídeos cíclicos entre os anos de 2009-2013.



Observação: *SciFinder*, agosto de 2013.

A maior parte deles descreve processos de sínteses totais, buscando viabilizar, sobretudo, a obtenção dos peptídeos cíclicos oriundos de fontes naturais, ou ainda a modificação destes visando à obtenção de moléculas mais ativas. Em segundo lugar estão as publicações descrevendo extração ou biotransformação dessas moléculas, bem como estudos de novas atividades biológicas. Um pequeno número, porém em ascensão estão as publicações descrevendo aplicações biotecnológicas de complexos de PC com outras moléculas. Este último ramo do estudo de peptídeos desperta atualmente grande interesse da comunidade científica, pois permite o desenvolvimento de nanodispositivos (*nanodevices*) desenvolvidos para o imageamento de tumores ou *targeting* (BAKLEH et al., 2009), e ainda na criação de carreadores moleculares (nano-carreadores) (BOTURYN et al., 2008).

No Brasil, os estudos envolvendo isolamento de pequenos peptídeos cíclicos de origem vegetal ainda são poucos, sendo o Instituto de Química da UNESP responsável por alguns trabalhos envolvendo isolamento, caracterização, síntese e atividades biológicas. Esses trabalhos são de projetos maiores como projeto temático "Conservation and Sustainable Use of the Diversity from Cerrado and Atlantic Forest: Chemical Diversity and Prospecting for Potential Drugs" - Programa Biot-Fapesp, no qual tem como objetivo caracterizar peptídeos dos látex das espécies *Jatropha multifida* L., *Jatropha gossypifolia* L. e *Jatropha curcas* L (PICCHI, 2007; ALTEI, 2009).

2.2 PEPTÍDEOS CÍCLICOS VEGETAIS

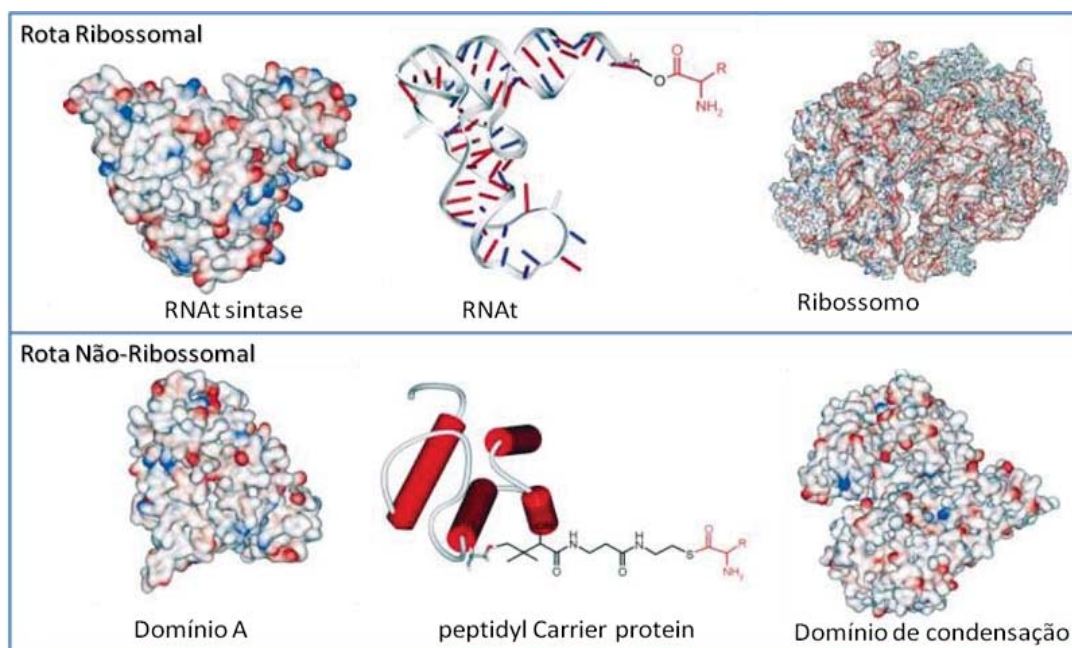
Até o momento, esses peptídeos ocorrem em 26 famílias de angiospermas, porém são particulares às famílias Caryophyllaceae, Rhamnaceae, Violaceae (CONDIE et. al., 2011), Annonaceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae (TAN; ZHOU 2006; PICCHI, 2009) e Apocynaceae (GRUBER et. al., 2008). Com relação à matriz vegetal, estão presentes em maior quantidade no látex (Euphorbiaceae), sementes (Annonaceae) ou folhas (Caryophyllaceae).

A biossíntese desses peptídeos pode depender de uma diversidade de reações e a compreensão biológica destes processos bioquímicos é de fundamental importância para o conhecimento das funções dessas substâncias nas espécies onde ocorrem (PICCHI, 2007). São descritas duas rotas envolvidas nesses processos bioquímicos: ribossomais ou não-ribossomais. A via ribossomal (síntese de proteínas) ocorre em organelas celulares

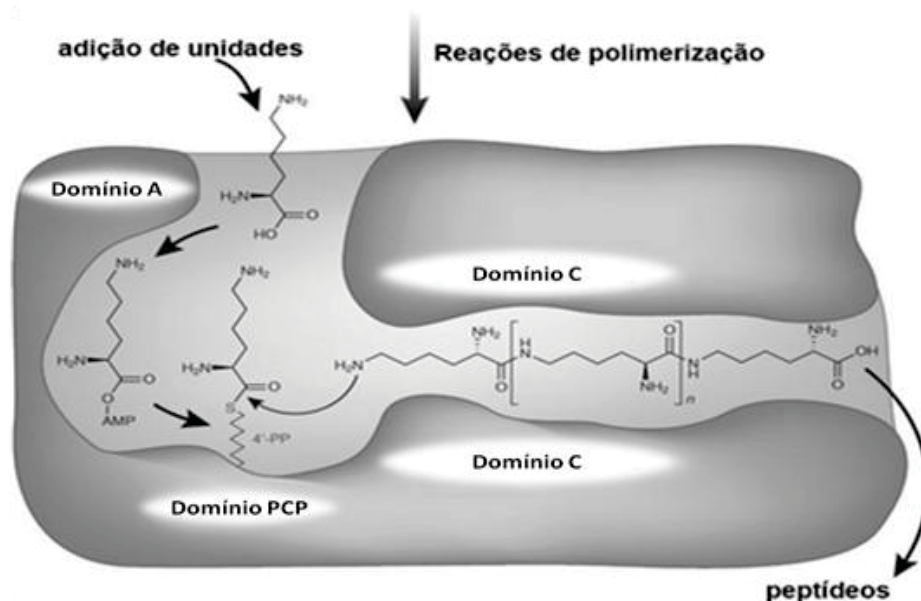
denominadas Ribossomos. Nesta via há o processo de transcrição do DNA pelo RNA mensageiro e a tradução deste pelos ribossomos.

Na via não-ribossomal há o envolvimento de pelo menos três proteínas que formam um complexo, que inclusive possuem analogia com seus homólogos ribossomais (Figura 3). Nesta síntese o aminoácido é inicialmente ativado se ligando ao AMP cíclico (domínio A). O aminoácido ativado é transferido para o PCP (*peptidyl Carrier protein*), que possui uma função semelhante ao RNAt transportando os intermediários até o domínio C (Figura 4). Finalmente este domínio catalisa as reações de formação das ligações peptídicas. Supõe-se que esta última enzima (domínio C) tenha um local nucleofílico e outro eletrofílico, também similar às subunidades do ribossomo (FINKING; MARAHIEL, 2004). Apesar das semelhanças, as diferenças ainda são predominantes.

Figura 3- Homologia entre as enzimas que compõe a síntese ribossomal e não ribossomal.



Fonte: (FINKING; MARAHIEL, 2004)

Figura 4 - Biossíntese de peptídeos não-ribossomais(NRP).

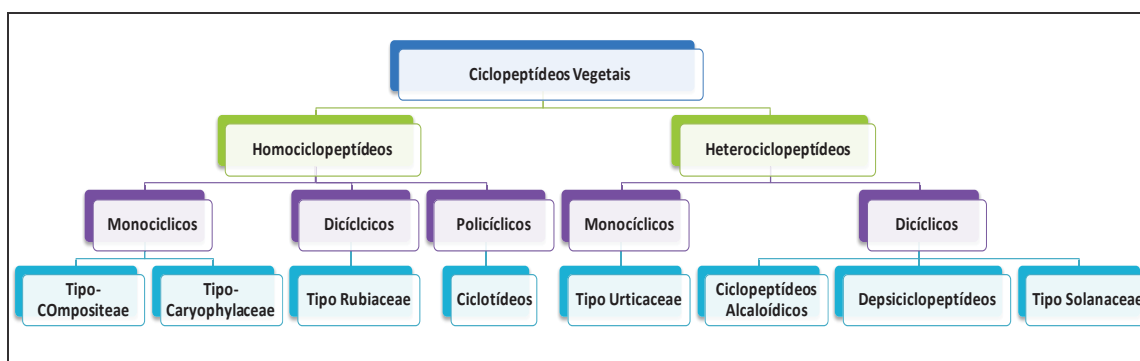
Fonte: Modificado de YAMANAKA e colaboradores (2008).

Ambas as vias possuem vantagens para seus ideais funcionais. A necessidade de precisão no metabolismo primário faz com que a síntese ribossomal possua mecanismos de revisão que tornam a sua variabilidade menor, restrita a um conjunto de 20 aa, o que não acontece com os NRP os quais possuem várias centenas de substratos. A diversidade estrutural é uma característica predominante de peptídeos não ribossomais, os quais podem ser compostos de *D* e *L*- aminoácidos, hidroxiácidos, ornitina, β -aminoácidos e outros constituintes não usuais (LEE et al., 2005). Além disso, supõe-se que estes peptídeos (NRPs) sejam de vital importância, especialmente em situações de estresse do vegetal, como a falta de nutrientes no ambiente, pois nestas situações a síntese ribossômica de proteínas é reprimida, tornando a via alternativa vantajosa. Adicionalmente esses compostos não ribossomais são imunes às substâncias que inibem a síntese de proteínas.

Diante da variedade dos esqueletos estruturais apresentados, em 2006 Zhou e Tan dividiram essas moléculas em 2 classes, 5 subclasses e 8 tipos, com o objetivo de organizar esses compostos. Na atribuição de classes foi considerada a conexão dos resíduos de aminoácidos; quando houvesse apenas ligações peptídicas a classe seria denominada de homociclopeptídeos, porém, na presença de outros tipos de ligações o termo a ser atribuído seria heterociclopeptídeos. Para a separação das subclasses foi considerada a quantidade de anéis presentes, podendo ser heteromonociclopeptídeos, heterodicropeptídeos, homomonociclopeptídeos, homodicropeptídeos e homopolicropeptídeos. Com base na distribuição dessas moléculas nas plantas, oito divisões foram criadas: Ciclopeptídeos

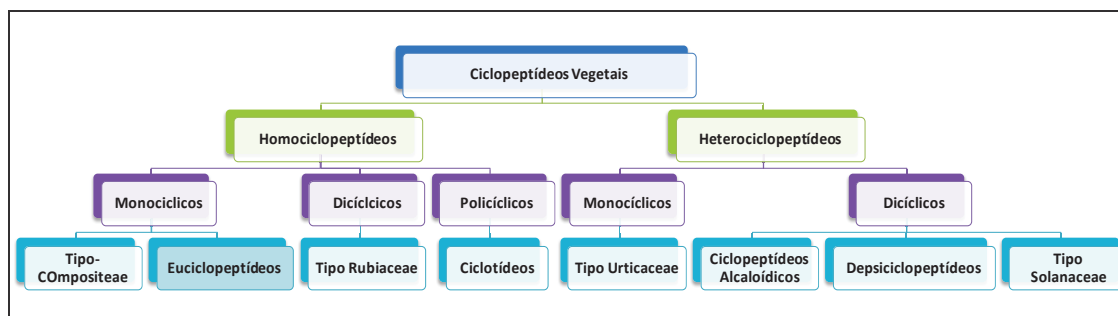
Alcaloídicos (Tipo I), Depsiciclopeptídios (Tipo II), Ciclopeptídeos tipo-Solanaceae (Tipo III), Ciclopeptídeos tipo-Urticaceae (Tipo IV), Ciclopeptídeos tipo-Compositae (Tipo V), Ciclopeptídeos tipo-Caryophyllaceae (Tipo VI), Ciclopeptídeos tipo-Rubiaceae (Tipo VII) e Ciclotídeos (Tipo VIII) (Figura 5).

Figura 5 - Classificação dos ciclopeptídeos isolados de plantas superiores, segundo características estruturais.



Porém essa nomenclatura precisava ser reavaliada, pois havia inferências pouco elucidativas quanto à filogenia dos grupos taxonômicos referenciados. Nomear um grupo, por exemplo, “tipo-Caryophyllaceae” leva a concluir que todos os peptídeos descritos nessa família botânica ocorrem exclusivamente nesse táxon, o que não é verdade, pois peptídeos desse tipo ocorrem em nove famílias distintas (CONDIE; NOWAK et al., 2011). Diante disto, sugerimos uma readequação do termo tipo-Caryophyllaceae para euciclopeptídeo, com o objetivo de descrever todos que tenham cadeias de ciclização cabeça-cauda (Figura 6), englobando sequências de 2 a 12 resíduos de aminoácidos (PICCHI et al., 2009). Este trabalho foi publicado em uma revista nacional, não tendo um impacto internacional significativo e a visibilidade para o reconhecimento desse novo sistema de classificação.

Figura 6- Classificação dos ciclopeptídeos isolados de plantas superiores, segundo Picchi (2009) e colaboradores.



Assim, em novembro de 2012, um grupo de 65 pesquisadores distribuídos ao redor do mundo publicaram a revisão: “*Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature*” o qual apresenta, entre outros pontos, a redefinição dos nomes atribuídos aos peptídeos oriundos de plantas. A partir de então, duas novas classes são propostas: orbitídeos e ciclotídeos (ARNISON et al., 2013).

2.2.1. ORBITÍDEOS

O termo orbitídeo é sugerido na denominação de todos os PC provenientes de plantas, ciclizados via cabeça-cauda e que não possuam ligações dissulfeto. São formados por sequências de 2 a 12 aminoácidos (PICCHI et al., 2009), sendo mais frequentes os de 5 a 9 resíduos de *L*-aminoácidos (CONDIE et al., 2011), possuindo desta forma baixo peso molecular. Reconhecidos por sua rigidez estrutural, sua sequência apresenta, na sua maioria, aminoácidos apolares com alto teor de resíduos aromáticos (PICCHI et al., 2009). A cisteína é o aminoácido menos abundante, ácido aspártico, ácido glutâmico e suas amidas (asparagina e glutamina), lisina e arginina também são raros. Glicina e prolina são encontradas na maioria dos peptídeos, sendo que serina, treonina e tirosina ocorrem em apenas 25, 31 e 54 dos peptídeos descritos, respectivamente. (ARNISON et al., 2013) (Figura 1).

Sua biossíntese se dá pela via não ribossomal, no qual os aminoácidos são ordenados pela enzima NRPS (*non-ribosomal peptide synthetases*), sem o envolvimento direto do ribossomo (FINKING; MARAHIEL, 2004).

O primeiro exemplar desta classe foi o ciclolinopeptídeo A, isolado do óleo de *Linum usitatissimum* (linhaça) por Kaufman e Tobschirble (1959) que apresenta forte atividade imunossupressora (WIECZOREK et al., 1991). Um estudo descrevendo diversos análogos lineares e cíclicos de ciclolinopeptídeo relacionou as sequências de aminoácidos com a atividade imunossupressora alcançada, e concluiu que a presença do tripeptídeo Pro-Phe-Phe é a responsável pela atividade imunossupressora (SIEMION; CEBRAT; WIECZOREK, 1999).

Desde que o primeiro exemplar desta classe foi descrito, mais de 168 peptídeos de espécies de plantas superiores foram caracterizados até o ano de 2005 (TAN; ZHOU, 2006). Atualmente, 116 orbitídeos são descritos na literatura. No *Cybase (The Date Base of Cyclic Proteins)* é possível encontrar 108 orbitídeos, dos quais 100 foram extraídos de plantas e o restante obtido por meio de predição da leitura do DNA. Este número é menor em relação à Tan e Zhou, 2006 devido à remoção de sequências redundantes (Tabela 2).

O *Cybase* é uma poderosa ferramenta para quem desenvolve estudos nessa área. É gerenciado pelo Instituto de Biosciência Molecular em Brisbane - Austrália. Trata-se de um site dedicado ao estudo de novos peptídeos cíclicos, em especial de ciclotídeos, porém nele também se podem achar dados referentes aos peptídeos (tipo-Caryophyllaceae), defensinas e ácidos nucléicos. Com o objetivo de acompanhar o número crescente de publicações nessa área, os desenvolvedores do site oferecem um banco de dados de sequências de peptídeos e proteínas cíclicas, bem como ferramentas de alinhamento e identificação estrutural. A Figura 7 nos mostra o alinhamento da sequência dos 108 orbitídeos obtidos pelo *Cybase*.

Distributivamente, esses peptídeos estão presentes em 31 espécies e 6 famílias: Annonaceae, Rutaceae, Euphorbiaceae, Linaceae, Lamiaceae e Caryophyllaceae.

São descritas inúmeras atividades biológicas para essas moléculas evidenciando um grande panorama de alvos a que esses compostos possam atuar. Alguns exemplos estão elencados na Tabela 1.

Tabela 1- Alguns orbitídeos e suas atividades.

Peptídeo	Atividades biológicas	Referência
Ciclogossina B	imunomoduladora	(AUVIN et al., 1997)
Ciclomontanina A	antiinflamatória	(CHUANG et al., 2008)
Ciclosquamosina D	antiinflamatória	(TIAN et al., 2009)
Gipsofina A	inibidor de α -glicosidase	(LUO., 2007)
Querimolaciclopeptídeo C	atividade citotóxica	(WELE et al., 2004)
Querimolaciclopeptídeo D	atividade citotóxica	(WELE et al., 2005)
Quevalierina A	antimalárica	(BARAGUEY et al., 1998)
Curcaciclina A	imunomoduladora	(VAN DEN BERG et al., 1995)
Curcaciclina B	aumento da atividade rotamase da	(AUVIN et al., 1997)
Diantina E	citotóxica	(HSIEH et al., 2004)
Dicotomina F	inibição de ciclooxigenase	(MORITA et al., 1997)
Dicotomina G	inibição de ciclooxigenase	(MORITA et al., 1997)
Dicotomina H	citotóxica	(MORITA; TAKEYA; ITOKAWA., 1997)
Dicotomina J	vasodilatadora	(MORITA et al., 2005)
Dicotomina K	vasodilatadora	(MORITA et al., 2005)
Gipsofina A	inibidor de α -glicosidase	(LUO et al., 2007)
Glaucaciclo-peptídeo	citotóxica	(WELE et al., 2005)
Integerrimida A	citotóxica	(MONGKOLVISUT et al., 2006)
Interregimida B	citotóxica	(MONGKOLVISUT et al., 2006)
Labaditina	imunomoduladora	(HORSTEN, 1995)
Longicalicinina A	citotóxica	(HSIEH et al., 2005)
Polianina A	antimalárica	(AUVIN-GUETTE et al., 1999)
Polianina B	antimalárica	(AUVIN-GUETTE et al., 1999)
Polianina C	antimalárica	(AUVIN-GUETTE et al., 1999))
Pseudostelarina D	inibidor de tirosinase	(HIMAJA et al., 1999)
Segetalina G	atividade estrogênica	(YUN et al., 1997)
Segetalina H	atividade estrogênica	(YUN et al., 1997)
Tuniciclina D	antifúngico	(TIAN et al., 2009)
Yunanina A	citotóxica	(NAPOLITANO et al., 2003)
Yunanina C	citotóxica	(MORITA et al., 1996)

Figura 7 - Alinhamento dos orbitódeos, com base em sua homologia.

segetalin A	---G---V---VVA---	brachySTEMIN C	---P---G---GAA---	cyclolinopeptide C	---P---P---O---E---T---I---
segetalin B	---G---V---A---	noname-671	---G---L---T---G---	cyclolinopeptide D	---P---F---I---O---E---T---L---
segetalin D	---G---S---P---A---P---	noname-672	---P---M---L---I---A---A---G---	cyclolinopeptide E	---P---P---L---F---I---O---E---T---V---F---
segetalin F	I---F---S---S---S---S---K---K---	citrusin II	---P---F---A---G---	cyclolinopeptide F	---P---F---M---O---E---T---O---M---E---T---
segetalin J	---P---P---G---L---P---A---F---	citrusin III	---P---P---W---G---G---	cyclolinopeptide G	---P---P---F---I---O---E---T---O---M---E---T---
segetalin G	---G---V---K---V---A---	citrusin IV	---P---P---L---L---P---Y---G---S---	cyclolinopeptide H	---P---P---F---I---O---E---T---O---M---E---T---
segetalin L	---G---L---L---P---G---H---P---	citrusin I	---P---L---A---T---G---T---	cyclolinopeptide I	---P---P---F---W---M---L---O---M---E---T---
segetalin K	---G---P---R---V---R---A---	cleomyrine I	---P---P---I---V---M---G---	microtoenin A	---P---P---V---A---P---P---V---L---
segetalin H	---G---P---P---F---S---	dianthin A	---P---A---M---G---	microtoenin B	---P---P---F---P---R---A---G---
IAA16-like	---G---P---P---F---V---G---	dianthin B	---P---P---I---P---P---P---G---	microtoenin C	---P---P---P---L---P---F---N---Y---
Dc004	---G---G---K---D---C---	dianthin C	---P---P---E---G---V---K---E---	heterophyllin A	---P---P---P---I---F---G---T---
CA26-C1-002-103-F06-CT.F	---G---L---L---P---P---P---G---	dianthin D	---P---P---P---H---P---F---G---S---P---	heterophyllin B	---P---P---P---I---F---G---G---P---
CA26-C1-002-078-G08-CT.F	---G---L---V---L---P---S---	dianthin E	---P---P---G---V---P---S---P---	pseudostellarin A	---P---P---P---L---A---G---
a_2_H09	---G---V---L---P---S---	dianthin F	---P---P---G---V---P---S---P---	pseudostellarin B	---P---P---P---G---G---G---
V03-1	---G---K---P---N---L---A---	drymarin A	---P---P---P---F---V---I---A---F---	pseudostellarin C	---P---P---E---P---F---L---G---T---
V03-3	---G---V---V---A---	drymarin B	---P---P---P---F---P---P---G---L---	pseudostellarin D	---P---P---P---E---L---I---L---G---
V03-2	---G---A---P---W---L---I---A---A---	grifficycloclin A	---P---G---L---I---G---T---L---L---L---	pseudostellarin E	---P---P---E---P---L---S---G---G---V---L---
V03-4	---G---V---P---W---A---L---A---A---	curcacycline A	---P---L---A---T---M---I---G---S---	pseudostellarin F	---P---P---P---P---S---F---G---P---L---A---
segetalin C	---G---G---P---A---P---	curcacycline B	---P---G---L---I---G---T---L---L---L---	pseudostellarin G	---P---P---P---P---S---F---G---P---L---A---
segetalin E	---G---G---V---V---L---P---	cyclogossine A	---P---L---A---T---M---I---G---S---	pseudostellarin H	---P---P---P---P---S---F---G---P---L---A---
cherimolacyclopeptide A	---P---Q---T---G---L---L---P---I---	cyclogossine B	---P---G---G---M---A---R---I---	stelladelin A	---P---P---P---L---I---G---P---P---S---G---
cherimolacyclopeptide B	---P---Q---T---G---M---E---T---L---P---I---	mahatfacyclin A	---P---G---T---L---I---G---V---F---	stelladelin B	---P---P---P---P---L---I---G---P---S---
glabrin A	---P---G---L---V---I---V---	labatidin	---P---A---G---V---A---T---V---M---G---T---	stelladelin C	---P---P---P---P---L---I---G---P---S---
glabrin B	---P---P---O---E---T---P---A---V---G---T---	podacyclin A	---P---G---L---L---G---A---M---A---G---	stellarin B	---P---G---S---I---O---L---L---E---P---P---A---
glabrin C	---P---G---V---V---I---A---L---V---	podacyclin B	---P---F---A---G---T---P---H---G---	stellarin C	---P---G---S---I---O---L---L---E---P---P---A---
glabrin D	---P---P---V---G---E---	pohllianin A	---P---F---A---G---T---P---H---G---	delavayin B	---P---P---P---G---G---Y---Y---
annomuricatin B	---P---P---M---A---M---I---G---T---	pohllianin B	---P---G---G---L---L---G---A---M---A---G---	delavayin C	---P---G---G---Y---Y---
annosquamosin A	---P---P---O---E---T---T---A---I---V---G---	pohllianin C	---P---P---I---G---L---L---I---L---Y---	dichotomin A	---P---G---T---F---L---Y---V---
cyclosquamosin A	---P---P---P---G---S---F---G---	cycloleonorinin	---P---G---G---T---P---H---G---	dichotomin B	---P---G---T---F---L---Y---V---
cyclosquamosin B	---P---P---P---T---C---L---M---O---	cycloleonoripeptide A	---P---P---Y---T---P---A---C---T---Q---	dichotomin C	---P---G---T---F---L---Y---V---
cyclosquamosin C	---P---P---P---T---G---L---O---E---T---Q---	cycloleonoripeptide B	---P---P---P---Y---P---P---M---G---	dichotomin D	---P---G---G---F---Y---V---
cyclosquamosin D	---P---P---P---G---G---V---I---S---Y---I---	cycloleonoripeptide C	---P---P---P---Y---P---P---O---E---T---I---G---	dichotomin E	---P---G---G---A---A---A---
cyclosquamosin E	---P---P---P---E---G---V---L---S---V---V---	cycloleonoripeptide D	---P---P---P---P---A---Q---T---P---S---	dichotomin F	---P---P---F---F---V---L---S---V---V---
cyclosquamosin F	---P---P---P---L---T---Y---G---A---	cyclolinopeptide A	---P---P---P---F---L---I---L---V---	dichotomin G	---P---P---P---P---P---P---P---S---
cyclosquamosin G	---P---P---P---T---A---I---V---G---	cyclolinopeptide B	---P---P---P---F---V---I---M---I---L---	dichotomin H	---P---P---P---P---T---F---Y---P---L---I---A---
				stellarin C	---P---P---P---G---S---O---G---P---P---S---
				yunnanin A	---P---P---P---G---G---
				yunnanin C	---P---P---P---G---G---

Fonte: (WANG et al., 2008).

Tabela 2- Orbitídeos elucidados até julho de 2013, espécies e famílias.

Nome	Nome opcional	Espécie	Sequência	
1	querimolaciclopeptídeo A	<i>Annona cherimola</i>	PQTGMLPI	Annonaceae
2	querimolaciclopeptídeo B	<i>Annona cherimola</i>	PQTG(OMet)LPI	
3	glabrina A	<i>Annona glabra</i>	PGLVIY	
4	glabrina B	<i>Annona glabra</i>	P(OMet)VAVYGT	
5	glabrina C	<i>Annona glabra</i>	PGYVLALV	
6	glabrina D	<i>Annona glabra</i>	PPVYGPE	
7	annomuricata B	<i>Annona muricata</i>	PNAWLGT	
8	annosquamosina A	<i>Annona squamosa</i>	P(OMet)TAIVGY	
9	ciclosquamosina A	<i>Annona squamosa</i>	PVPGSFG	
10	ciclosquamosina B	<i>Annona squamosa</i>	PPITGLMQ	
11	ciclosquamosina C	<i>Annona squamosa</i>	PPITGL(OMet)Q	
12	ciclosquamosina D	<i>Annona squamosa</i>	PGGVLSYY	
13	ciclosquamosina E	<i>Annona squamosa</i>	PGGVLSYYY	
14	ciclosquamosina F	<i>Annona squamosa</i>	PALTTYGA	
15	ciclosquamosina G	<i>Annona squamosa</i>	PMTAIVGY	
16	grifficilocina A	<i>Goniothalamus griffithii</i>	PIFPPGLP	
17	CA26-C1-002-078-G08-CT.F	<i>Citrus aurantium</i>	GLVLP	Rutaceae
18	CA26-C1-002-103-F06-CT.F	<i>Citrus aurantium</i>	GLLLPPFG	
19	noname-671	<i>Citrus medica</i>	GDLVTYF	
20	noname-672	<i>Citrus medica</i>	PWLIAAGL	
21	a_2_H09	<i>Citrus natsudaiddai</i>	GYLLPPS	
		<i>Citrus natsudaiddai</i>		
22	citrusina II	<i>Citrus sinensis</i>	PAPFWGG	
		<i>Citrus natsudaiddai</i>		
23	citrusina III	<i>Citrus sinensis</i>	PLLPYGS	
		<i>Citrus natsudaiddai</i>		
		<i>Citrus sinensis</i>		
24	citrusina IV		PEAEWGEV	
25	V03-1*	<i>Citrus sinensis</i>	GRPWNLA	
26	V03-2*	<i>Citrus sinensis</i>	GAPWLIAA	
27	V03-3*	<i>Citrus sinensis</i>	GYVAA	
28	V03-4*	<i>Citrus sinensis</i>	GVPWAIAA	
29	citrusina I	<i>Citrus unshiu</i>	LIATGTF	
30	braquistemina C	<i>Brachystemma calycinum</i>	PPIGVAA Y	Caryophyllaceae
31	Dc004*	<i>Dianthus caryophyllus</i>	GYKDCC	
32	IAA16-like*	<i>Dianthus caryophyllus</i>	GPIPFYG	
33	diantina A	<i>Dianthus superbus</i>	AYNFGL	
34	diantina B	<i>Dianthus superbus</i>	PIFFPG	
35	diantina C	<i>Dianthus superbus</i>	PGIVYF	
36	diantina D	<i>Dianthus superbus</i>	PPIFGSL	
37	diantina E	<i>Dianthus superbus</i>	PGVFSI	
38	diantina F	<i>Dianthus superbus</i>	PGFVF	
39	drimarina A	<i>Drymaria cordata</i>	PPPFVIAF	
40	drimarina B	<i>Drymaria cordata</i>	PFYPGL	
41	heterofilina A	<i>Pseudostellaria heterophylla</i>	PVIFGIT	
42	heterofilina B	<i>Pseudostellaria heterophylla</i>	PPPIFGGL	
43	delavaina B	<i>Stellaria delavayi</i>	GSIFFA	
44	delavaina C	<i>Stellaria delavayi</i>	PVPGYYY	
45	stelladelina A	<i>Stellaria delavayi</i>	PPLLGPPYYG	
46	stelladelina B	<i>Stellaria delavayi</i>	PPAYDLGI	
47	stelladelina C	<i>Stellaria delavayi</i>	PYPPFYSV	
48	stellarina B	<i>Stellaria delavayi</i>	GS(dOH-Ile)FFA	
49	dicotomina A	<i>Stellaria dichotoma</i>	GTFLYV	
50	dicotomina B	<i>Stellaria dichotoma</i>	GTFLYT	

51	dicotomina C		<i>Stellaria dichotoma</i>	GTFLYA
52	dicotomina D		<i>Stellaria dichotoma</i>	GVGFIYI
53	dicotomina E		<i>Stellaria dichotoma</i>	GYAFA
54	dicotomina F		<i>Stellaria dichotoma</i>	PYFVLPSVY
55	dicotomina G		<i>Stellaria dichotoma</i>	PLPIPPFYS
56	dicotomina H		<i>Stellaria dichotoma</i>	PTFYPLIA
57	dicotomina I		<i>Stellaria dichotoma</i>	PTFYPLIV
58	pseudostelarina A		<i>Stellaria yunnanensis</i>	PYLAG
59	pseudostelarina B		<i>Stellaria yunnanensis</i>	PPFGIGGG
60	pseudostelarina C		<i>Stellaria yunnanensis</i>	PSPFLGTL
61	pseudostelarina D		<i>Stellaria yunnanensis</i>	PLILGYG
62	pseudostelarina E		<i>Stellaria yunnanensis</i>	PPLGVPVIFG
63	pseudostelarina F		<i>Stellaria yunnanensis</i>	PPLSGGYL
64	pseudostelarina G		<i>Stellaria yunnanensis</i>	PFSFGPLA
65	pseudostelarina H		<i>Stellaria yunnanensis</i>	PTPLFFGT
66	stelarina C		<i>Stellaria yunnanensis</i>	GS(dOGI)FFS
67	yunnanina A		<i>Stellaria yunnanensis</i>	PFPGYGG
68	yunnanina C		<i>Stellaria yunnanensis</i>	PGIGFYS
69	segetalina A	vaccarina D	<i>Vaccaria hispanica</i>	GVPVWA
70	segetalina B	vaccarina A	<i>Vaccaria hispanica</i>	GVAWA
71	segetalina C		<i>Vaccaria hispanica</i>	GLHFAPF
72	segetalina D	vaccarina B	<i>Vaccaria hispanica</i>	GLSFAPF
73	segetalina E	vaccarina C	<i>Vaccaria hispanica</i>	GWVPLWP
74	segetalina F		<i>Vaccaria hispanica</i>	FSASYSSKP
75	segetalina G		<i>Vaccaria hispanica</i>	GVKYA
76	segetalina H		<i>Vaccaria hispanica</i>	GYRFS
77	segetalina J		<i>Vaccaria hispanica</i>	FGTHGLPAP
78	segetalina K*		<i>Vaccaria hispanica</i>	GRVKA
79	segetalina L*		<i>Vaccaria hispanica</i>	GLPGWP
80	curcaciclina A		<i>Jatropha curcas</i>	GLLGTVLL
81	curcaciclina B		<i>Jatropha curcas</i>	PILLGILGS
82	jatrofidina		<i>Jatropha curcas</i>	GWLNLLGP
83	quevalierina A		<i>Jatropha chevalieri</i>	GIPILAIM
84	quevalierina B		<i>Jatropha chevalieri</i>	GIPILAIM**
85	quevalierina C		<i>Jatropha chevalieri</i>	YTIFDIFGA
86	ciclogossina A		<i>Jatropha gossypifolia</i>	LATWLVG
87	ciclogossina B		<i>Jatropha gossypifolia</i>	GGWLAAIL
88	mahafaciclina A		<i>Jatropha mahafalensis</i>	GTILGVF
89	mahafaciclina B		<i>Jatropha mahafalensis</i>	GTFFGFF
90	integerrimida A		<i>Jatropha integerrima</i>	WGLLLTP
91	integerrimida B		<i>Jatropha integerrima</i>	TALLVSP
91	labatidina		<i>Jatropha multifida</i>	AGVWTVWGTI
92	bioboleina		<i>Jatropha multifida</i>	ASILGLGWA
93	podaciclina A		<i>Jatropha podagrica</i>	GLLGAVWAG
94	podaciclina B		<i>Jatropha podagrica</i>	FAGTIFG
95	pohlianina A		<i>Jatropha pohliana</i>	PLGVLLY
96	pohlianina B		<i>Jatropha pohliana</i>	PLGLLLY
97	pohlianina C		<i>Jatropha pohliana</i>	GGTIIFGF
98	cicloleonurinina		<i>Leonurus sibiricus</i>	PPYYTPAGPTQY
99	cicloleonurinina		<i>Leonurus japonicus</i>	PPYYTPAGPTQY
100	cicloleonuripeptídeo A		<i>Leonurus japonicus</i>	PPPYPPIG
101	cicloleonuripeptídeo B		<i>Leonurus japonicus</i>	PPPYP(OMet)IG
102	cicloleonuripeptídeo C		<i>Leonurus japonicus</i>	PPPYP(OMet)IG
103	cicloleonuripeptídeo D		<i>Leonurus japonicus</i>	PPPYFQTPIS
104	microtoenina A		<i>Microtoena prainiana</i>	PVAFPVLY
105	microtoenina B		<i>Microtoena prainiana</i>	PVFFAAGF
106	microtoenina C		<i>Microtoena prainiana</i>	PIPLPFNY
107	cleomirina I		<i>Rotheca myricoides</i>	PIVFAG

Euphorbiaceae

Lamiaceae

108	ciclolinopeptídeo A	<i>Linum usitatissimum</i>	PPFFLILV	Linaceae
109	ciclolinopeptídeo B	<i>Linum usitatissimum</i>	PPFFVIMLI	
110	ciclolinopeptídeo C	<i>Linum usitatissimum</i>	PPFFVI(OMet)LI	
111	ciclolinopeptídeo D	<i>Linum usitatissimum</i>	PFFWI(OMet)LL	
112	ciclolinopeptídeo E	<i>Linum usitatissimum</i>	PLFI(OMet)LVF	
113	ciclolinopeptídeo F	<i>Linum usitatissimum</i>	PFFWV(Omet)L(OMet)	
114	ciclolinopeptídeo G	<i>Linum usitatissimum</i>	PFFWI(OMet)L(OMet)	
115	ciclolinopeptídeo H	<i>Linum usitatissimum</i>	PFFWI(OMet)LM	
116	ciclolinopeptídeo I	<i>Linum usitatissimum</i>	PFFWVML(OMet)	

* Predição da sequência por ácidos nucleicos

** S=O

Fonte: Extraído de Wang et al.,2008 e Sabandar et al., 2013.

Pelo seu arsenal de atividades, essas moléculas inspiraram e inspiram a síntese orgânica na busca por novos protótipos a fármacos, cosméticos, agroquímico, seja como produto isolado, modelo sintético, fármaco híbrido ou mímico (NEWMAN et al., 2003). O advento da síntese permitiu realizar estudos fisiológicos, químicos, farmacológicos, bioquímicos e clínicos da maioria dos peptídeos de interesse, uma vez que na maioria dos casos, o conteúdo isolado não é suficiente para promoção destes testes.

2.2.1.1. SÍNTESE DE ORBITÍDEOS

Para a síntese dos orbitídeos, inicialmente é realizada a síntese do peptídeo linear em solução (síntese clássica), em fase sólida (SPFS) (utilizando suporte polimérico), ou ainda pela combinação de ambas. A síntese clássica tem sido substituída, pois para sua realização todos os reagentes e produtos formados encontram-se em solução, o que torna a síntese trabalhosa e demorada devido à necessidade e dificuldade de separar os peptídeos obtidos dos reagentes que foram empregados para gerá-lo.

Na síntese clássica, geralmente a α -carboxila do receptor de acila é esterificada ou amidada. Na SPFS, este grupo liga-se covalentemente ao suporte polimérico ou resina. A síntese em solução ocorre na direção N→C-terminal ou vice-versa, enquanto que a SPFS geralmente ocorre na direção do C→N-terminal (SAKAKIBARA, 1995).

Buscando agilizar o processo sintético, em 1963, Robert Bruce Merrifield - Prêmio Nobel de Química de 1984- descreveu a metodologia de síntese em fase sólida (SPFS), que se baseia na ligação dos aminoácidos que formam o peptídeo a um polímero orgânico insolúvel em qualquer solvente.

Basicamente um ciclo de síntese consiste em:

- Clivagem do grupo de protetor α -amino.
- Etapas de lavagem para remover o reagente de clivagem
- Acoplamento do aminoácido
- Etapas de lavagem para remover o material excessivo

À medida que a cadeia em crescimento está ligada a um suporte insolúvel os excessos de reagentes e subprodutos podem ser removidos por lavagens com solventes apropriados. Neste ponto deve-se considerar que alguns solventes tem a propriedade de inchar a resina, logo sua utilização deve ser apropriada. Depois de completa a síntese, é realizada a clivagem do peptídeo, normalmente, com ácidos de força variável.

Há dois tipos de grupos protetores necessários para a síntese de peptídeos: grupos que permitem a proteção temporária do grupo α -amino e grupos protetores "permanentes" bloqueadores das funcionalidades das cadeias laterais dos ácidos aminados. Os últimos grupos precisam suportar condições de desproteções $N\alpha$ repetitivas; geralmente, eles são removidos apenas durante a clivagem do suporte sólido. A prematura remoção de grupos protetores é uma causa comum na formação de subprodutos. A melhor estratégia para evitar este risco consiste na introdução de grupos protetores temporários e permanentes, que podem ser removidos por diferentes mecanismos químicos, ou seja, de proteção ortogonal. Os grupos protetores ortogonais podem ser verdadeiramente clivados com seletividade absoluta e em qualquer ordem. A estratégia Boc/Bzl-estratégia "clássica" não cumprem este requisito, pois ambos os grupos são clivados com ácido. No entanto, a sua instabilidade ácida difere suficientemente para proporcionar a remoção seletiva da proteção α -aminoácido. A combinação Boc/Bzl pode ser chamada de quasi-ortogonal. A junção de Fmoc/tBu, por outro lado, é verdadeiramente ortogonal. O grupo α -amino temporário é desbloqueado com base (piperidina). Assim, grupos lábeis à TFA e estáveis à base são perfeitamente selecionados.

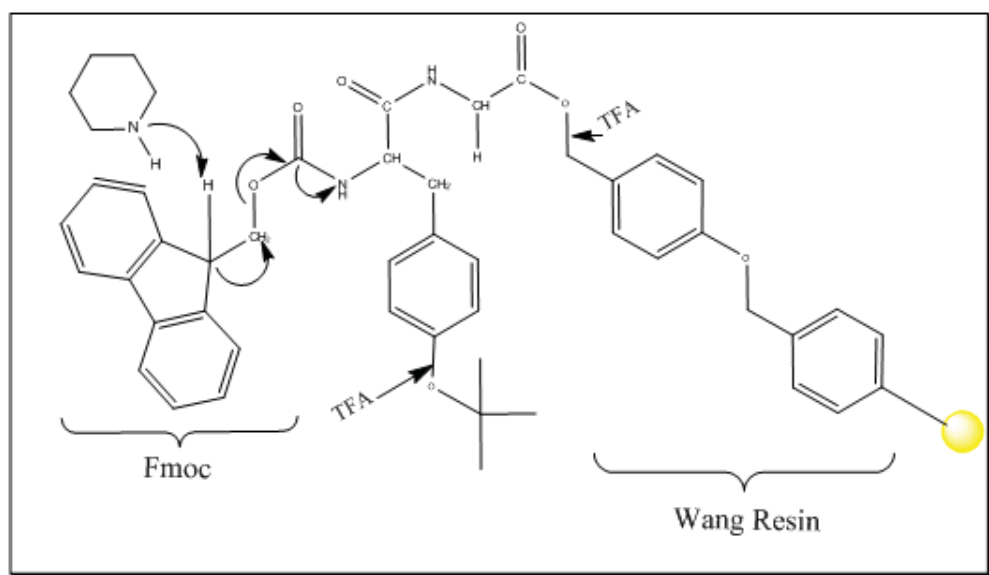
Nesta tese é descrita a estratégia Fmoc/tBu, efetuada sob a resina (suporte sólido) Fmoc-Gly-Wang, obtida através da reação de esterificação entre o *linker* e o aminoácido glicina protegido com um Fmoc (grupo fluorenil-9-metiloxicarbonil) (Figura 8). Desta forma, o primeiro aminoácido da cadeia a ser sintetizada já estava presente na resina, bastou apenas retirar o grupo Fmoc para que o próximo resíduo da cadeia fosse inserido.

No geral, para a obtenção do peptídeo linear, a cadeia é construída iniciando-se a partir do carbono terminal. O primeiro aminoácido é incorporado através do seu grupo carboxílico a um polímero insolúvel que pode ser facilmente separado por reagentes. Um pré-requisito

necessário é que sejam introduzidos *linkers* no material polimérico para que o resíduo de aminoácido seja ligado. Um aminoácido com o N-protetido reage com o grupo funcional do *linker*, e em seguida, o protetor temporário é removido e o próximo aminoácido é acoplado. Estes acoplamentos vão sendo repetidos até que todos os aminoácidos da cadeia a ser sintetizada estejam ligados. Após o término da cadeia, o polímero é clivado do peptídeo e separado mediante filtração.

A resina Wang consiste em uma fração álcool benzil 4-alcoxi-substituído, que torna o *linker* mais lábil frente a ácidos. Por este motivo esta resina é utilizada com a estratégia Fmoc/tBu de síntese, pois o Fmoc é base lábil, assim, durante as desproteções com a base, apenas o Fmoc é clivado, e a seqüência permanece com os protetores tBu de cadeia lateral, e ligada à resina, sendo necessário um meio ácido para que estas ligações sejam quebradas.

Figura 8 - Reação simplificada da obtenção de uma resina Fmoc-Gly-Wang.



O acoplamento do segundo aminoácido na cadeia irá depender da desproteção do primeiro aminoácido, ou seja, retira-se o grupo Fmoc mediante adição de 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 próximo resíduo da cadeia. A separação do polímero insolúvel da cadeia, e dos grupos protetores das cadeias laterais é feita pelo ácido trifluoroacético (TFA) (Figura 9). A Figura 10 exemplifica simplificada a rota de síntese seguida para a estratégia Fmoc.

Figura 9 - Clivagem do grupo Fmoc por piperidina, e locais aonde a clivagem ácida ocorre após o término da seqüência.

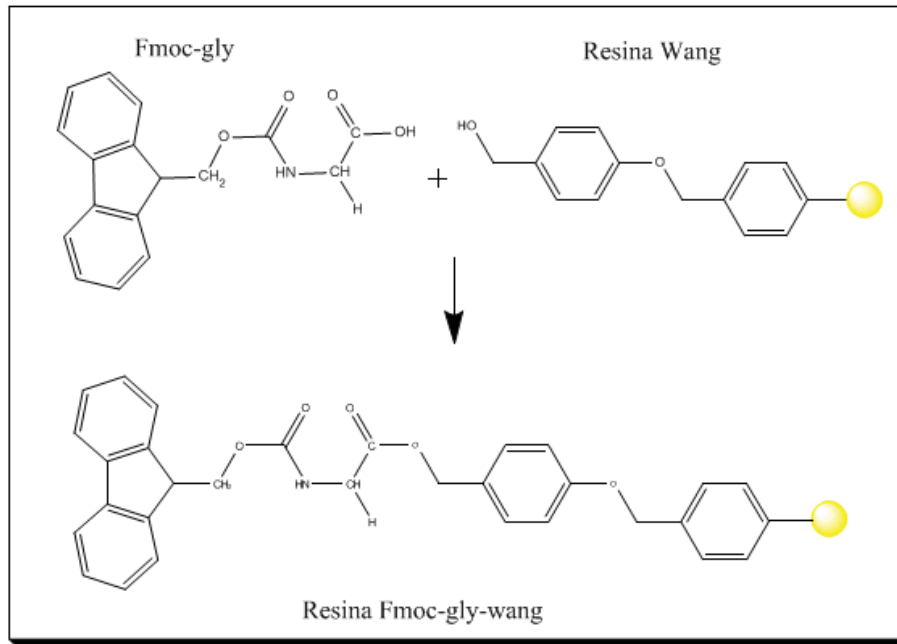
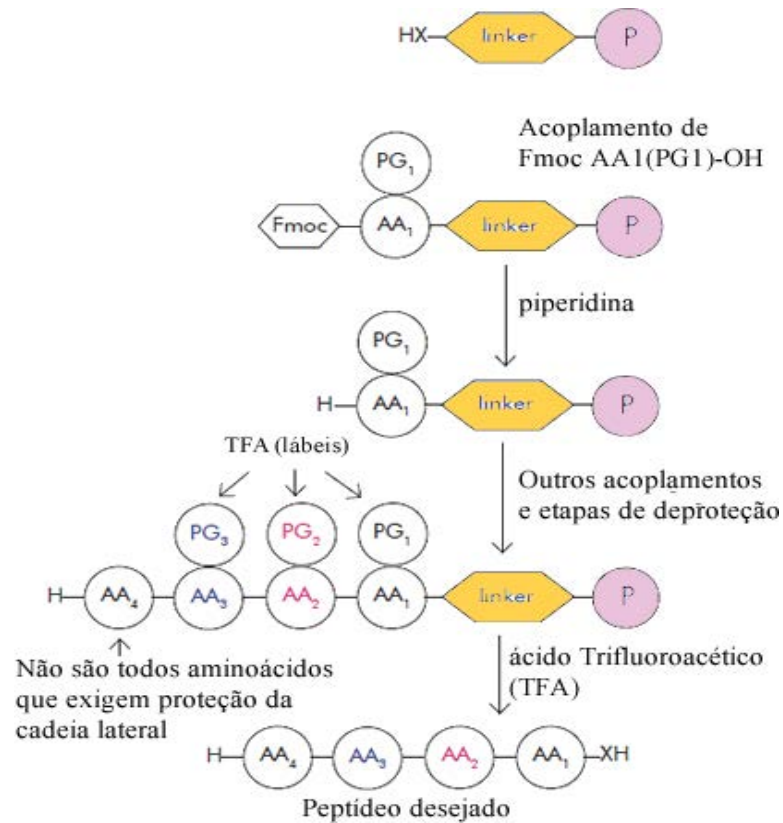


Figura 10 - Rota geral para síntese em fase sólida- Fmoc.



Fonte: Adaptado *Peptide User Guide*, Bachem. <https://www.bachem.com/service-support/technical-library/product-monographs/downloadpage/2/>.

2.2.2. CICLOTÍDEOS - MINI-PROTEÍNAS VEGETAIS.

Ciclotídeos compreendem uma família de peptídeos de 28 a 37 resíduos de aminoácidos encerrados em uma estrutura cíclica “cabeça-cauda” e com três ligações dissulfeto (CRAIK, et al., 2001) formando um arranjo característico denominado CCK (*Cyclic Cystine Knot*). Sua biossíntese se dá via ribossomo, cujas sequências são preditas através do genoma da planta. Assim como as proteínas, os ciclotídeos são compostos por *L*-aminoácidos os quais são produtos da expressão gênica e com isso os mecanismos de regulação e síntese podem ser modificados pelas técnicas da biotecnologia/biologia molecular (PICCHI et al., 2009).

A descoberta do primeiro ciclotídeo é atribuída a investigações etnobotânicas realizadas por volta da década de 60. Em 1965, um professor de Farmacognosia da Universidade de Uppsala (Suécia), Dr. Finn Sandberg, relatou suas observações sobre o uso da planta indígena República Africana Central. O chá da planta "Wetegere" (linguagem Gbaya), mais tarde identificado como *Oldenlandia affinis* (Roem & Schult) pertencente à família Rubiaceae, era administrado em grávidas com o objetivo de acelerar as contrações uterinas (SANDBERG, 1965 apud GERLACH; MONDAL, 2012). Na década de 1970, o médico norueguês Dr. Lorents Gran participou de uma missão salvamento da Cruz Vermelha no norte do Congo de África e observou que mulheres da tribo *Lulua* (linguagem Tsjiluba) coletavam a planta chamada "Kalata-Kalata", que posteriormente foi confirmado ser *O. affinis*. A administração consistia na ingestão do "chá" - um decocto aquosa (~ 1 parte em pó partes aéreas da planta para 1 parte de água fervente que induziria o parto.

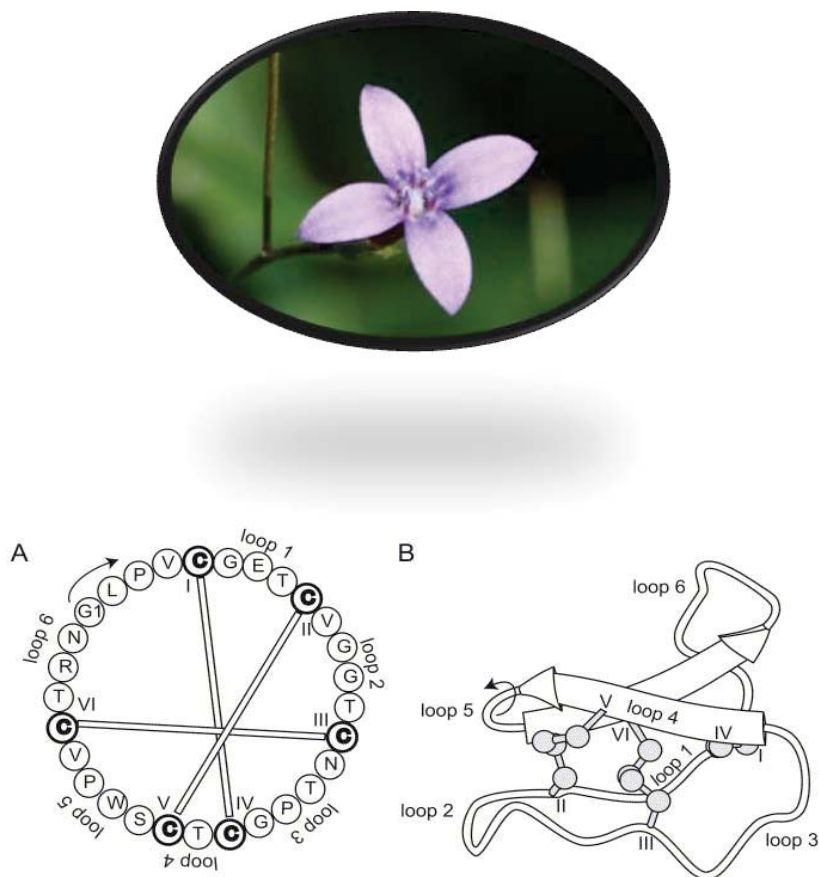
Vislumbrado pelos efeitos de “Kalata-Kalata”, o Dr. Gran, retornando para seu país isolou vários polipeptídeos os quais apresentaram forte efeito uterotônico. Contou com o auxílio do Dr. Knut Sletten (Químico de proteínas), os quais juntos identificaram e quase completamente sequenciado o principal peptídeo bioativo contido em *O. affinis* nomeado Kalata B1 (SLETTEN; GRAN; 1973 apud GERLACH; MONDAL, 2012). Sua estrutura sugeria ser cíclica, porém era muito resistente à degradação e ao sequenciamento por testes enzimáticos disponíveis na época, o que impossibilitou sua completa elucidação.

Somente em 1995, Saether e colaboradores, comprovaram que Kalata-B1 tratava-se, realmente de um peptídeo cíclico, contendo 29 resíduos de aminoácidos sendo 6 cisteínas, 5 treoninas e 5 glicinas. A estrutura tridimensional foi determinada utilizando ressonância (RMN), bidimensional e *distance-restrained simulated annealing*. A Figura 11 esboça a

estrutura de Kalata B-1. Em A, a estrutura ilustra as seis cisteínas conservadas, indicadas em negrito (números romanos), e as ligações dissulfeto (I-IV, V-II, III-VI) mostradas pelo cruzamento das linhas. O início do peptídeo é indicado pela seta (G₁), ponto no qual ocorre a ciclização (entre N₂₉ e G₁). Diagrama de fita (B), a estrutura cíclica (CCK) é caracterizada por três pontes de dissulfeto mostrados na representação (em cinza) e uma pequena folha- β antiparalelo (setas). As cisteínas separam o esqueleto em seis *loops*, numerados de 1 á 6. O resíduo *cis*-Pro no loop 5, indicado pela seta, é característico de ciclotídeos Möbius (GRUBER et al., 2007).

Resumidamente, a estrutura deste peptídeo compreende um anel formado por duas pontes dissulfeto (I-IV e V-II) e uma terceira ponte de dissulfeto (III-VI) transpassando ambas. Todo esse arranjo promove uma conformação que está associada a existência de folhas- β , 6 *loops* e dobras. Embora isto possa parecer um motivo estrutural improvável, é, na verdade, comum em uma grande variedade de proteínas (CRAIK, 2010) (Figura 11).

Figura 11 – Espécie *Oldenlandia affinis*, de onde foi isolado o primeiro ciclotídeo, kalata B1.

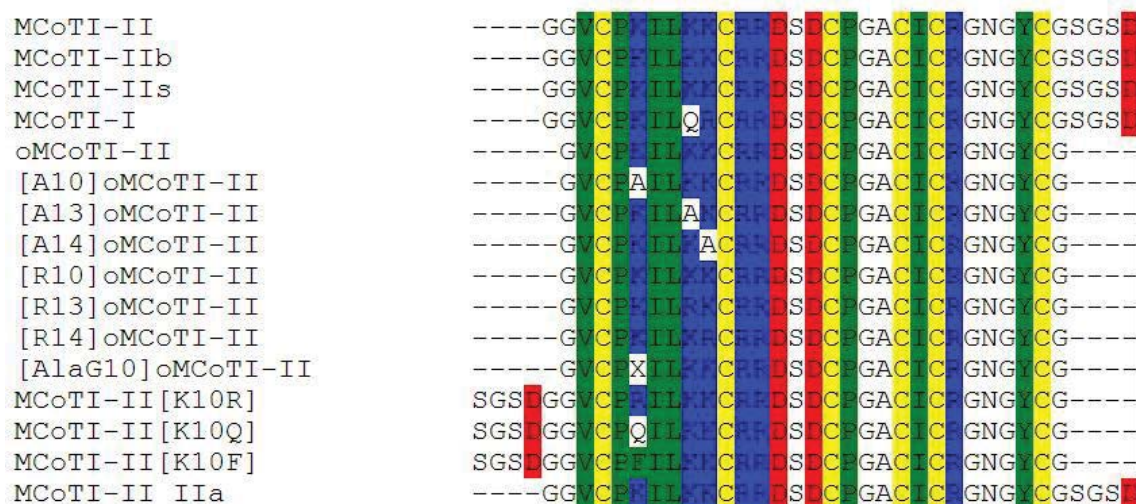


Fonte: (GRUBER et al., 2007).

A ligação de cistina cíclica é hoje bem entendida do ponto de vista da biologia estrutural. Seu papel é dar resistência à degradação enzimática e estabilização térmica e química ao peptídeo ou proteína.

Os ciclotídeos são classificados em três subfamílias, Möbius e Bracelete, baseado na presença ou ausência de uma ligação *cis* Pro no loop 5 na subfamília Möbius. A outra subfamília é chamada inibidores de tripsina, esta é composta por peptídeos que apresentam estrutura CCK, porém não possuem grande homologia com as outras classes. Atualmente, são descritos 16 ciclotídeos do tipo inibidores da tripsina. É notável o grau de conservação dessas moléculas (Figura 12).

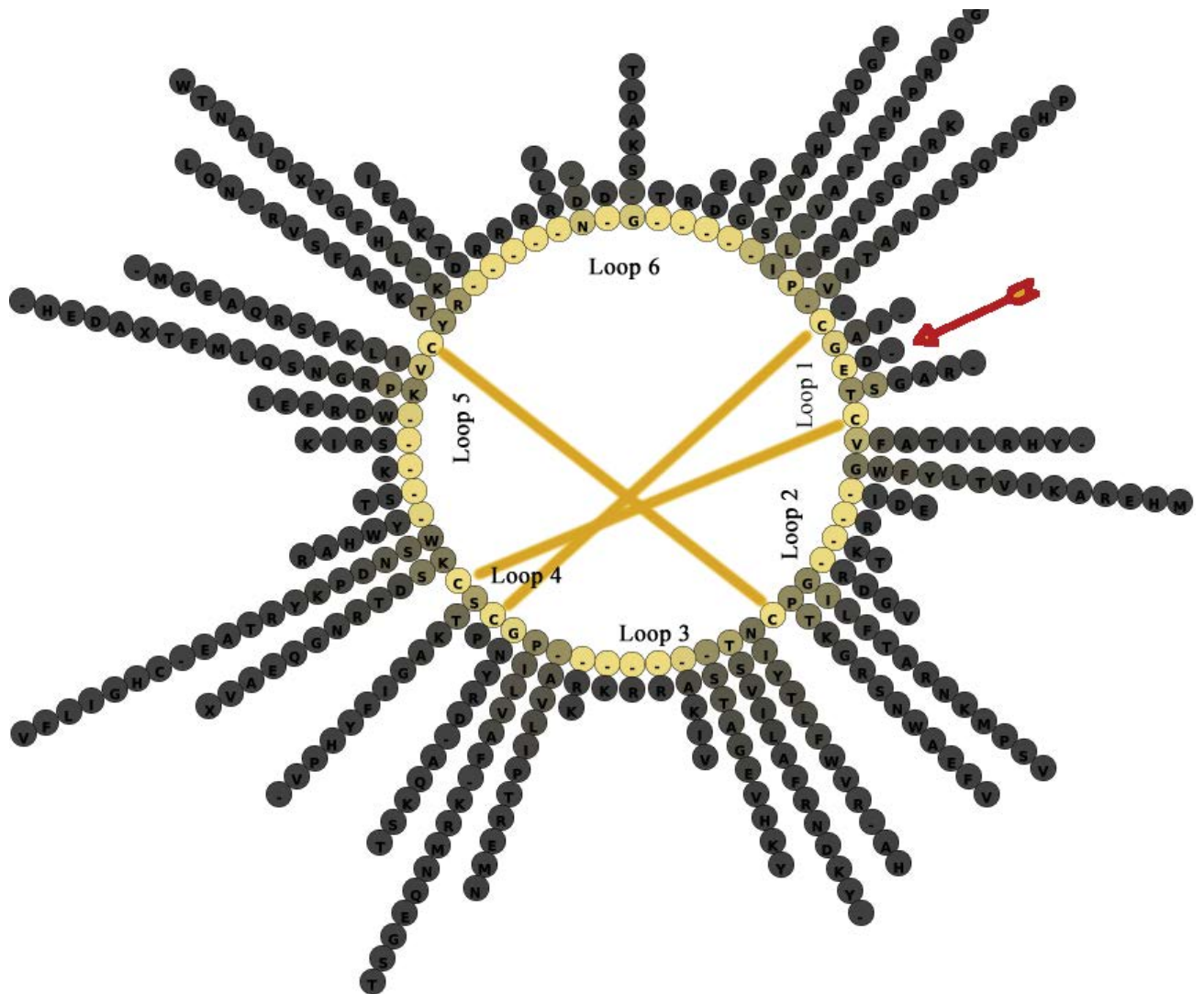
Figura 12 - Alinhamento das sequências de ciclotídeos inibidores de tripsina.



Fonte: (WANG et al., 2008). Disponível em : <www.cybase.org.au>. Acesso em agosto de 2013.

O ciclotídeos são moléculas com alto grau de conservação, em particular, o *loop* 1. Além dos seis resíduos de cisteína, Glu₃ é o único resíduo quase invariante ao longo de todos os ciclotídeos (Figura 13). Além disso, apenas mudanças muito típicas são observadas para os outros resíduos neste *loop*: Ala / Gly ou Ser / Thr. A representação *Sequence Diversity Wheel* tem sido muito utilizada na representação de diferentes ciclotídeos, sendo que o círculo interno ilustra a sequência de consenso de resíduos presentes nos ciclotídeos. A medida que os resíduos tornam-se mais externos, entende-se menor sua frequência na aparição em sequências, ou seja, quanto mais próxima do círculo, mais conservado será o resíduo (ROSENGREN et al., 2003).

Figura 13 - *Sequence Diversity Wheel* de todos os ciclotídeos descritos.



Fonte: (WANG et al., 2008) (www.cybase.org.au)

Os ciclotídeos são ativos contra um amplo espectro de microrganismos, bactérias ou fungos e são capazes de inibir proteinases digestivas, estando envolvidos nos processos fisiológicos e, marcadamente, nos mecanismos de defesa de plantas superiores. Apesar do modo de ação ainda não ser completamente esclarecido para todas as atividades, já se sabe que esses peptídeos se ligam a certos lipídeos nas membranas de forma seletiva (KAMIMORI et al., 2005) o que promove a formação de poros e a morte celular (HUANG et al., 2009).

Dentre os ciclotídeos já caracterizados podemos citar o kalata B1 (*Oldenlandia affinis*), com 29 resíduos de aminoácidos, indutor de contração uterina (GRAN et al., 2000) e com atividade inseticida (COLGRAVE et al., 2010; HENRIQUES et al., 2011; NGUYEN et al., 2011); o Vitri A, citotóxico em 5 linhagens tumorais diferentes e com $IC_{50} < 10 \mu\text{mol/L}$ (TANG et al., 2010b), o Psyle E, citotóxico e com IC_{50} próximo de $1 \mu\text{mol/L}$ (GERLACH et

al., 2010) MCoTI-II, inibidor de protease (AVRUTINA et al., 2005), além dos descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Alguns ciclotídeos bioativos isolados de plantas.

Peptídeos	Família vegetal	Propriedades farmacológicas	Referências
Ciclopsicotrídeo A	Rubiaceae	Antagonista da neurotensina	(WITHERUP et al., 1994)
		Antimicrobiano	(TAM et al., 1999)
Cicloviolacinas A-D	Violaceae	Anti-HIV	(HALLOCK et al., 2000)
Cicloviolacina O2	Violaceae	Antibacteriano	(PRANTING et al., 2010)
		Citotóxico	(LINDHOLM et al., 2002)
Circulina A e B	Rubiaceae	Anti- HIV	(DALY et al., 1999; DALY et al., 2004)
		Antimicrobiano	(TAM et al., 1999)
Cliotídeo T1 e T4	Fabaceae	Citotóxico	(NGUYEN et al., 2011)
Kalata B1	Rubiaceae	Anti- HIV	(DALY et al., 2004)
		Uterotônico	(GRAN, 1973)
		Antimicrobiano	(TAM et al., 1999)
		Inseticida	(JENNINGS et al., 2001)
		Inseticida	(HENRIQUES et al., 2011)
Kalata B5	Rubiaceae	Hemolítico	(PLAN et al., 2010)
MCoTI-II	Curcubitaceae	Inibidor de protease	(JAGADISH; CAMARERO, 2010)
Palicoureaína	Rubiaceae	Anti-HIV	(BOKESCH et al., 2001)
Psyle E	Rubiaceae	Citotóxico	(GERLACH et al., 2010)
Varv peptídeo A	Violaceae	Citotóxico	(SVANGARD et al., 2004)
Varv peptídeo E	Violaceae	Citotóxico	(SVANGARD et al., 2004)
Varv peptídeo F	Violaceae	Citotóxico	(LINDHOLM et al., 2002)
Vhl2	Violaceae	Hemolítico	(DALY et al., 2010)
Vitri A	Violaceae	Citotóxico	(TANG et al., 2010b)

O primeiro ciclotídeo tipicamente brasileiro tem sido descrito em 2012 pelo grupo de pesquisa da Universidade Católica de Brasília. Neste trabalho foi possível isolar uma nova sequência de ciclotídeo bracelete nomeado Parigidina-br1 de *Palicourea rígida* (Rubiaceae). Neste trabalho foi possível atribuir o uso de Parigidina como bioinseticida (PINTO et al., 2012).

A utilização de ciclotídeos como agente farmacológico tem sido limitada devida a sua inadequada estabilidade e biodisponibilidade em condições fisiológicas (GERLACH; MONDAL., 2012). Apesar disso, a excepcional plasticidade, flexibilidade estrutural juntamente com suas inúmeras bioatividades, resultantes da habilidade em ligar-se a lipídeos de membranas, fazem deles ideais candidatos no estudo do desenvolvimento de novas drogas e biopesticidas (PLAN et al., 2007).

O primeiro relato do uso de ciclotídeos em humanos foi o uso de Kalata B1 e, embora sua atividade uterotônica seja evidente, estudos demonstram que seu uso como agente oxitócico não é recomendado por causa dos efeitos colaterais graves. Porém, muitas outras atividades como antineurotensina (WANG et al., 2011), inibidor de tripsina, atividade hemolítica, citotóxico, antitumoral, anti-HIV, inseticida e nematocida, entre outras, (DALY et al., 2011; HENRIQUES et al., 2011) fazem dessas moléculas relevantes alvos.

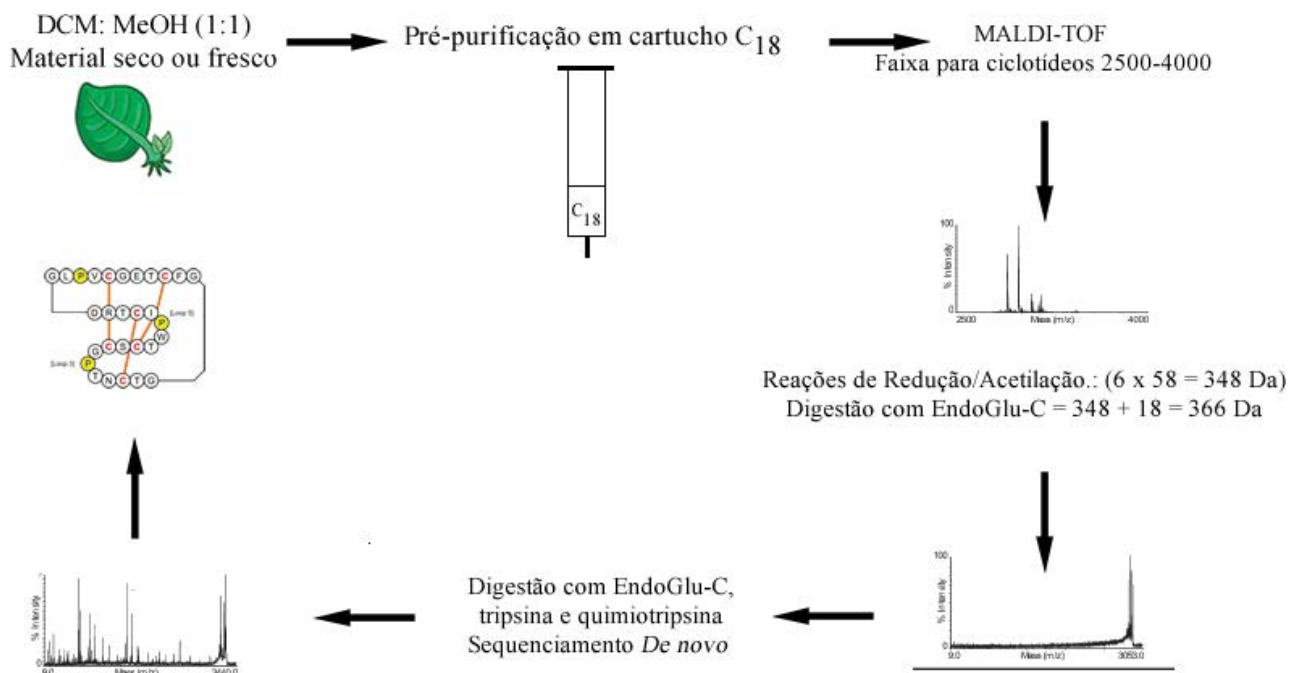
Estudos preveem que haja mais de 50.000 novos ciclotídeos ainda estão para serem descobertos (GRUBER et al., 2008). Uma listagem completa dos ciclotídeos isolados até o momento pode ser encontrada no site <http://www.cybase.org.au> (WANG et al., 2008), onde é possível visualizar 383 até o momento.

Estima-se que haja cerca de 1 mg de ciclotídeos por quilo de material seco de planta, embora esse valor possa variar entre as espécies e coletas. Em 1998, HPLCson e colaboradores desenvolveram uma metodologia para o isolamento de ciclotídeos. Essa metodologia consiste na extração com diclorometano; tratamento do material com etanol-água (1:1); filtração em gel poliamida para a remoção de taninos e fracionamento em água e n-butanol. As frações n-butanólicas são filtradas em sephadex G-10 para a remoção de materiais de baixo peso molecular e sais, sendo os polissacarídeos removidos por meio de extração em fase sólida com cartucho contendo como fase estacionária sílica funcionalizada com C₁₈. A purificação final é realizada por meio de cromatografia de troca iônica, sephadex LH-20, e HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) em modo preparativo com coluna de C₁₈.

Embora a metodologia descrita por HPLCson e colaboradores tenha alta aplicação, a procura por ciclotídeos em plantas tem estimulado o desenvolvimento de novos métodos de “*screening*” para estas moléculas. Envolvidos com essa necessidade, Gruber e colaboradores publicaram em 2008 um protocolo completo de isolamento, identificação e elucidação estrutural de ciclotídeos de plantas. Neste protocolo, extratos obtidos por meio da extração de partes da planta com diclorometano (DCM) / metanol (MeOH) ou 50% de acetonitrila (ACN)/H₂O são diretamente aplicados em um cartucho de extração em fase sólida contendo como fase estacionária sílica funcionalizada com C₁₈. A eluição é feita com concentrações

crecentes de ACN em solução aquosa. Perfis de HPLC das frações obtidas, mostrando substâncias eluídas em 20-50% de ACN, e valores de massa molar obtidos por espectrometria de massas, entre 2500 e 4000 daltons (Da) são um forte indicativo da presença de ciclotídeos na amostra. A confirmação da obtenção dos ciclotídeos é realizada por espectrometria de massas, após reações de redução e acetamidação das cadeias laterais das cisteínas (Cys) existentes na sequência peptídica. Para cada resíduo desse aminoácido ocorre um acréscimo de 58 Da correspondente à reação com o grupo acetila. Como os ciclotídeos apresentam três pontes dissulfeto, o valor da massa molar deverá ter um acréscimo de 348 Da (58×6) no valor inicialmente identificado. Todo o material que apresenta estes resultados é selecionado e direcionado para determinação e sequenciamento de seus aminoácidos (Figura 14).

Figura 14 - Isolamento, fracionamento e caracterização de ciclotídeo de plantas.



Fonte: baseado no protocolo de Gruber e colaboradores (HASHEMPOUR et al., 2013).

O sequenciamento é realizado primariamente utilizando espectrometria de massas e/ou, após digestão enzimática utilizando três diferentes enzimas: Endoprotease-GluC, tripsina e quimiotripsina. Utilizando a enzima EndoGlu-C a maioria dos ciclótídeos serão reduzidos de forma a se linearizarem. Isso ocorre por que esta enzima tem a capacidade de clivar resíduos de ácido glutâmico, os quais são conservados no *loop* 1 de ciclótídeos, produzindo a abertura do anel e a observação da adição 18u à massa do peptídeo reduzido/acetilado.

A tripsina cliva os resíduos de lisina e arginina que não antecederem prolina. O produto de digestão desta enzima produzirá cerca de 2 ou 3 clivagens que proporcionarão a análise MS/MS dos fragmentos e subsequente sequenciamento. Por fim, para sequenciamento é utilizada a enzima quimiotripsina com o objetivo de diferenciar alguns aminoácidos; a exemplo de leucina e isoleucina. A diferenciação se dá, pois quimiotripsina cliva fenilalanina, leucina, tirosina, triptofano e metionina, não antes de prolina, logo se o ponto que há dúvida não anteceder prolina e for clivado, subtende-se que se trata de isoleucina.

2.3 *JATROPHA RIBIFOLIA* (FAMÍLIA EUPHORBIACEAE)

Jatropha ribifolia Baill (Pohl). é um arbusto de aproximadamente 2 metros, popularmente conhecida como pinhão-rasteiro. Pertence à família Euphorbiaceae, gênero *Jatropha* que contem mais de 300 espécies comumente encontradas na América e na África (WEBSTER, 1994; LEAL; AGRA, 2005). No Brasil as mais comuns espécies desse gênero são *Jatropha gossypifolia*, *Jatropha curcas*, *Jatropha mollissima*, *Jatropha mutabilis* e *J. ribifolia* (PIMENTEL et al., 2012). A espécie *J. gossypifolia*, conhecida como pinhão roxo, é encontrada em todo o Brasil e muitas vezes é utilizada como faxadas de casas como uma planta ornamental e mística (LORENZI; MATOS, 2002; OLIVEIRA et al., 2008).

A palavra *Jatropha* é derivada do grego "jatros" (médico) e "trophe" (alimentos), o que sugere seu uso como planta medicinal (KUMAR; SHARMA, 2008).

Figura 15 - *Jatropha ribifolia* Baill (Pohl), Serra Branca – PB.

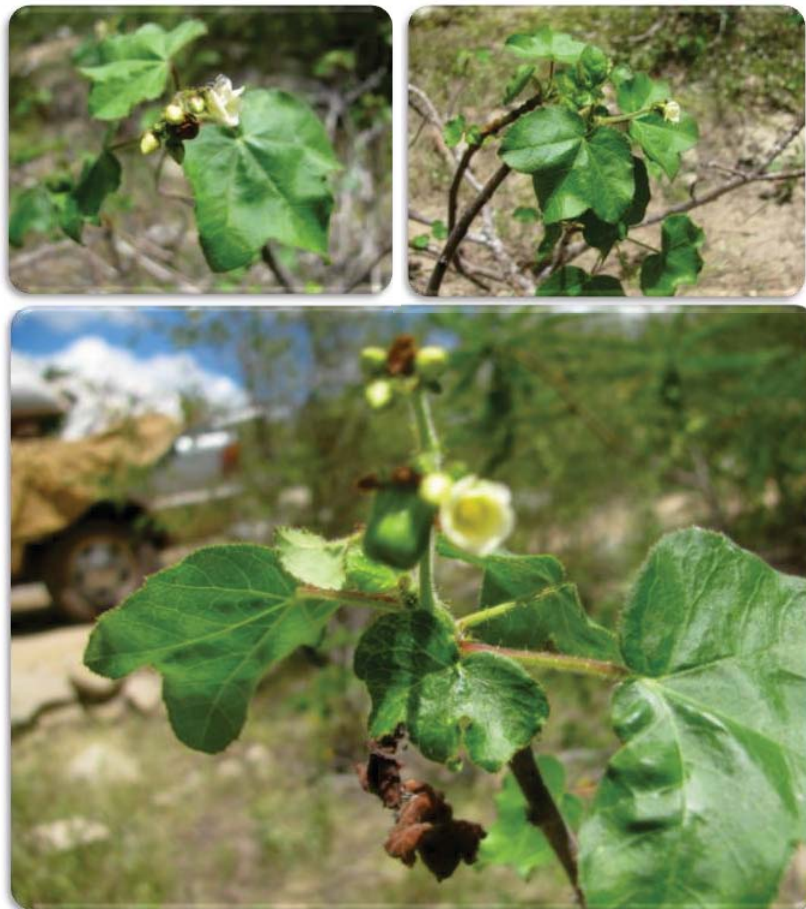


Foto: Josean Fechine Tavares

A família Euphorbiaceae é a sexta maior família do mundo e é representada por 307 gêneros os quais incluem cerca de 8000 espécies distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais do globo, principalmente da América e África. No Brasil ocorrem 72 gêneros e cerca de 1100 espécies, de hábito e habitat diferentes (BARROSO et al., 1991).

Euphorbiaceae tem-se destacado como uma família de grande importância econômica, especialmente na alimentação humana, produção de látex e óleos, e ainda na medicina popular. Algumas espécies são utilizadas na alimentação humana, principalmente na região nordeste do Brasil, como *Manihot esculenta* Crantz, da qual extrai-se a farinha de mandioca.

Espécies do gênero *Jatropha* em particular, têm se mostrado ricas em peptídeos cíclicos contendo de 7 a 10 resíduos com alta proporção de aminoácidos hidrofóbicos (BARAGUEY et al., 2001). Entre as sequências encontradas, podemos citar a labaditina, um decaciclopeptídeo, bioboleína, um nonaciclopeptídeo, ambos com atividade imunomoduladora e isolados do látex de *Jatropha multifida*. A curcaciclina A, um octapeptídeo cíclico (VAN DEN BERG et al., 1995), curcaciclina B isolados de *J. curcas*; podaciclina A e B, encontradas em *J. podagrica* (VAN DEN BERG et al. 1996) e jatroidina, um novo orbitídeo pertencente à *J. curcas* isolado pelo NuBBE (ALTEI, 2009). Todos os peptídeos de *Jatropha* são elencados na Tabela 2.

2.4 *HYBANTHUS CALCEOLARIA* (L.) SCHULZE-MENZ (FAMÍLIA VIOLACEAE)

Hybanthus calceolaria, é uma espécie pertencente à família Violaceae, conhecida popularmente como ipeca-branca, poaia-branca, ipecacuanha-branca, papaconha ou pepaconha, é uma espécie medicinal muito utilizada na medicina popular do nordeste brasileiro, cuja raízes são empregadas em decoctos, infusos e xaropes como purgativo (amebicida) e expectorante (SILVA et al., 2011).

Sua distribuição se dá na América do Sul, sendo bastante comum no nordeste brasileiro (LORENZI; MATOS, 2002). Segundo Lorenzi e Matos (2002), suas raízes são emeto-catárticas, empregada medicinalmente da mesma maneira que a verdadeira ipecacuanha (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes – Rubiaceae), porém desprovida de emetina. Sobre os aspectos botânicos, é uma herbácea anual ou perene, ereta, pouco ramificada, inteiramente pubescente, de 10-30 cm de altura, com raízes tortuosas e enrugadas nativa do Maranhão até São Paulo, principalmente na faixa costeira (restingas) e nos campos

e, em menor frequência no Mato Grosso do Sul, Goiás e Mato Grosso. Apresentam folhas simples, alternas, membráceas, peciolada, de margens denteadas, 2-4 cm de comprimento. Apresentam flores solitárias, brancas, densamente vilosas, com uma pétala grande, vexiliformes. Os frutos são cápsulas oblongas e deiscentes (LORENZI; MATOS, 2002).

Figura 16 - *Hybanthus calceolaria* (L.) Schulze-Menz.



Fonte: Google images

A família Violaceae Batsch é um grupo cosmopolita, com 25 gêneros e cerca de 800 espécies, sendo *Hybanthus* com cerca de 150 espécies, é o terceiro gênero mais representativo da família. Acredita-se que toda Violaceae possua ciclotídeos sendo mais de 50 ciclotídeos em uma única espécie (TRABI; CRAIK, 2004). Logo, a família Violaceae no geral pode conter mais de 1000 diferentes ciclotídeos (OVESEN et al., 2012). Na Tabela 4 são descritos algumas das estururas isoladas do gênero *Hybanthus*.

Tabela 4 - Ciclotídeos de *Hybanthus*.

Nomes	Loop 1	Loop 2	Loop 3	Loop 4	Loop 5	Loop 6
Hyfl A	GES	VYIP	TVTALVG	T	KDKV	YLNSIS
Hyfl B	AET	FIGK	YTEELG	T	TAFL	MKNGSPIQ
Hyfl C	AET	FIGK	YTEELG	T	TAFL	MKNGSPRQ
Hyfl D	GES	VYIP	FTGIAG	S	KSKV	YYNGSVP
Hyfl E	GES	VYLP	FLPN	Y	RNHV	YLNGEIP
Hyfl F	GET	TTFN	WIPN	K	NHHDKV	YWNSIS
Hyfl I	GES	VFIP	ISGVIG	S	KSKV	YRNGIP
Hyfl J	GES	AYFG	WIPG	S	RNKV	YFNGIA
Hyfl K	GES	VYIP	FTAVVG	T	KDKV	YLNGTP
Hyfl L	AES	VYLP	FTGVIG	T	KDKV	YLNGTP
Hyfl M	GES	IFFP	FNPG	S	KDNL	YYNGNIP
Hypa A	AES	VYIP	TITALLG	S	KNKV	YNGIP

Fonte: (WANG et. al., 2008)

2.5 BETA VULGARIS L. (AMARANTHACEAE)

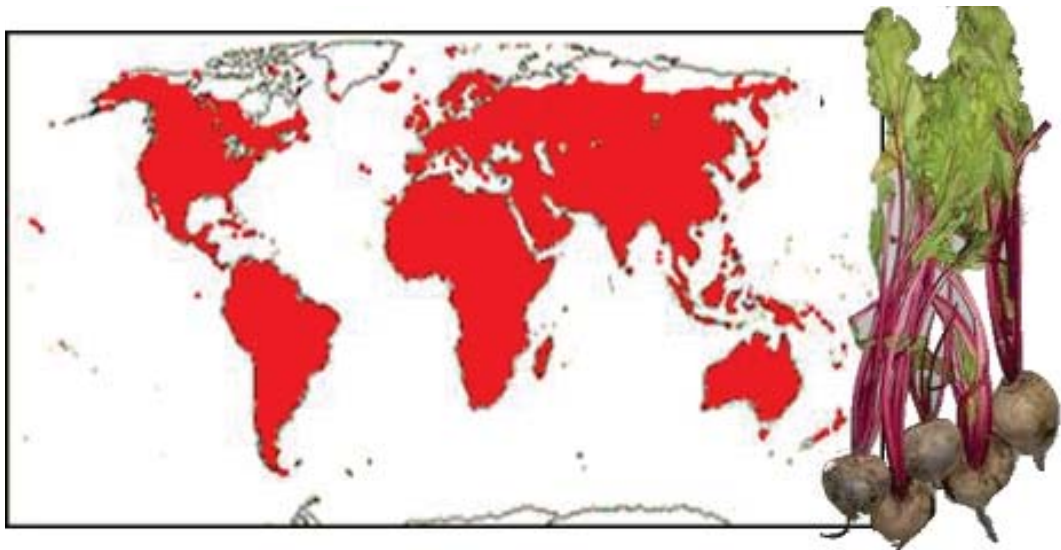
A beterraba (espécie *Beta vulgaris* L, gênero *Beta* L.) é uma planta herbácea da família das Chenopodiaceae, por Cronquist, ou das Amaranthaceae, pelo *Angiosperm Phylogeny Group*. O nome é derivado do substantivo francês *betterave* (sendo *Bette* a acelga, e *rave* nabo). Segundo LANGE e colaboradores (1999), a mesma se divide em três subespécies:

- Beta vulgaris* ssp. *adanesis*, grupo distinto de plantas semi-anuais, com características morfológicas específicas, que apresentam um grande declínio na autofertiização;
- Beta vulgaris* ssp. *maritima*, formada por um grande complexo de tipos morfológicos que ocorrem em uma vasta área geográfica, e cujas diferenças são insuficientes para estabelecer outras subdivisões e,
- Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*, que agrupa todas as cultivares já domesticadas.

Todas as cultivares da subespécie *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* (conhecidas até então) podem ser subdivididas em quatro grupos: beterrabas folhosas (*Leaf Beet Group*), cultivares nas quais as partes comestíveis são as folhas e os pecíolos, pois suas raízes não exibem diâmetro significativamente aumentado; beterrabas açucareiras (*Sugar Beet Group*), em sua maioria de coloração branca e que são cultivadas nos Estados Unidos da América e no continente europeu para produção de açúcar; beterrabas forrageiras (*Fodder Beet Group*), cultivares destinadas à alimentação dos rebanhos das regiões já citadas; e beterrabas hortícolas (*Garden Beet Group*), único grupo cultivado comercialmente no Brasil formado por cultivares que apresentam a uma parte tuberosa comestível (LANGE et al., 1999).

Sua distribuição se dá por todo o mundo, climas temperados, subtropicais, regiões salinas, quentes e secas (Figura 17) (STEVENS, 2001).

Figura 17 - Mapa de distribuição de *Beta vulgaris*.



Fonte: (STEVENS et al., 2001).

A beterraba (hortícola), além de possuir muitos nutrientes, possui uma intensa cor avermelhada que a torna atrativa. Esse aspecto sensorial pode ser uma das razões que explicam o crescimento, no mercado brasileiro, do consumo de beterraba em saladas prontas (*fresh-cut*). Essa coloração decorre da presença das betacianinas, pigmentos vermelhos que, juntamente com as betaxantinas (de coloração amarela), pertencem ao grupo das betalaínas. Esses pigmentos possuem atividade antioxidante e são hidrossolúveis (HERNANDES et al., 2007) o que a torna um dos 10 vegetais maior teor antioxidantes.

Sabe-se que beterraba é rica em proteínas. Para cada 100 g de *B. vulgaris* há, em média, 1,79 g de proteínas. Um estudo de peptídeos antimicrobianos (PESTANA-CALSA; CALSA JR, 2011) centrado em mostrar métodos de bioinformática associado a ferramentas de biologia molecular, utilizando banco de dados para identificar e caracterizar alguns AMPs (peptídeos antimicrobianos) supostos ou conhecidos discutindo procedimentos para testes *in vitro* e *in vivo*, utilizou-se de uma coleção de EST (*Expressed Sequence Tags*) em diversas plantas e propôs que *Beta vulgaris* possui genes que codificam ciclotídeos. Esse fato nos motivou a buscar compostos peptídeos ricos em cisteínas nesta espécie.

Há descrições na literatura de 2 defensinas ricas em cisteínas, AX1 e AX2 descritas por Kragh e colaboradores (1995), que foram isoladas das folhas de *B. vulgaris* infectadas com *Cercospora beticola*. Essas defensinas AX são produzidas em resposta a uma infecção atuando como antifúngicas (KRAGH et. al., 1995). Outro peptídeo chamado IFW4, contendo 6 cisteínas e 7 glicinas, também foi isolado das folhas infectadas de *B. vulgaris* em 1997 por Nielson e cols (1997). Sua sequência com 30 aminoácidos apresenta ponto isoelétrico altamente básico e forte afinidade com quitina (NIELSON et al., 1997), ligando-se a quitina mais fortemente do que as quitinases, daí sua propriedade fungicida. Na Tabela 5 são apresentados os alinhamentos dos peptídeos acima realizados por meio do COBALT (*Constraint-based Multiple Alignment Tool*).

Tabela 5 - Alinhamento dos peptídeos de *Beta Vulgaris L.*

Peptídeo	Ref.	Sequência (identidade mantida em vermelho)
AX1	KRAGH et. al., 1995	-A I C K K P S K F F K G A C G R D A D C E K A C D Q E N W P G G V C V P F L R C E C Q R S C
AX2	KRAGH et. al., 1995	-A T C R K P S M Y F S G A C F S D T N C Q K A C N R E D W P N G K C L V G F K C E C Q R P C
IWF4	NIELSON et al., 1997	S G E C N - - - - M Y - G R C P P G - Y C - - - C S K - - F - - G Y C G V G - R A Y C G - - -

3 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar orbitídeos e ciclotídeos em 24 espécies de plantas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- * Avaliar a presença de orbitídeos nas 22 espécies, encaminhando as com resultados preliminares positivos para o procedimento de isolamento;
- * Isolar, identificar e elucidar os orbitídeos da espécie *Jatropha ribifolia* através das técnicas de separação e caracterização química: Cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear e análise de aminoácidos por método de derivação química;
- * Sintetizar, purificar e caracterizar os orbitídeos isolados por meio da metodologia em fase sólida utilizando a estratégia Fmoc/tBu;
- * Testar os peptídeos isolados e sintéticos quanto as suas atividades antimalárica, antifúngica e citotóxica em linhagens de células MDA-MB435 (mama - humano), HCT-8 (cólon - humano) e SF-295 (glioblastoma – humano);
- * Avaliar a presença de ciclotídeos em 24 espécies vegetais, através da espectrometria de massas – *Matrix-Assisted Laser Desorption Time of Flight MS* (MALDI-TOF/TOF);

- * Confirmar a presença dos ciclotídeos das espécies selecionadas através das reações de redução/acetamidação e digestão enzimática;
- * Isolar os ciclotídeos da espécie *Hybanthus calceolaria* utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.
- * Isolar os peptídeos cíclicos da espécie *Beta vulgaris* utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.
- * Sequenciar os ciclotídeos obtidos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Essa pesquisa compreende o estudo de 23 espécies brasileiras e uma espécie austríaca. Os extratos 1-24 foram cedidos pelos professores Josean Fachine Tavares e Marcelo Sobral da Silva, pertencentes ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Esses extratos foram preparados de acordo com os critérios do laboratório em questão. As espécies *Fusae longifolia*, *Pithecoseris paconrinoides* e *Xylophia langsдорfiana*, foram extraídas com dois diferentes solventes cada uma. Além destas espécies, três outras plantas foram estudadas (*Jatropha ribifolia*, *Hybanthus calceolaria* e *Beta vulgaris*) sendo a coleta e a preparação dos extratos descritos nesta tese.

Abaixo são listadas na Tabela 6 os 31 extratos estudados, suas espécies e famílias, massas (extratos ou material vegetal) e o tipo de solvente utilizado na extração.

Tabela 6 - Banco de espécies investigadas na triagem inicial (*screening*) de peptídeos cíclicos.

	Família	Espécie	Massa (g)	Especificações
1.	Euphorbiaceae	<i>Acalipha sp</i>	7,3	Ext. EtOH partes aéreas
2.	Euphorbiaceae	<i>Acalipha multicaulis</i>	3,9	Fase MeOH
3.	Erytroxylaceae	<i>Erytroxylum caatinga</i>	8,4	Ext. EtOH
4.	Convolvulaceae	<i>Evolvulus linarioides</i>	6,7	Ext. MeOH
5.	Anonaceae	<i>Fusae longifolia</i>	4,6	Ext. CH ₂ Cl ₂
6.	Anonaceae	<i>Fusae longifolia</i>	2,2	Ext. Hex
7.	Lamiaceae	<i>Hyptenia salzmännii</i>	10,1	Ext. EtOH
8.	Lamiaceae	<i>Hyptis macrostachys</i>	6,5	Ext. EtOH
9.	Lamiaceae	<i>Hyptis umbrosa</i>	6,5	Ext. EtOH
10.	Mimosaceae	<i>Calliandra umbelifera</i>	6,9	Ext. MeOH
11.	Verbenaceae	<i>Lippia microphylla</i>	6,8	Ext. EtOH partes aéreas
12.	Apocynaceae	<i>Marsdenia megalanta</i>	6,4	Ext. MeOH partes aéreas
13.	Euphorbiaceae	<i>Maytenus erytroxylum</i>	8,3	Ext. EtOH caule
14.	Velozziaceae	<i>Nanuza plicata</i>	3,4	Ext. EtOH
15.	Euphorbiaceae	<i>Pera leandrii</i>	6,7	Ext. EtOH
16.	Asteraceae	<i>Pithecoseris paconrinoides</i>	11,2	Ext. EtOH das folhas
17.	Asteraceae	<i>Pithecoseris paconrinoides</i>	6,5	Ext. EtOH das flores
18.	Anonaceae	<i>Rolinia leptopetala</i>	2,1	Ext. do caule
19.	Melastomaceae	<i>Tibouchina gardineri</i>	8,8	Ext. MeOH
20.	Euphorbiaceae	<i>Tragia sp</i>	4,2	Ext. MeOH
21.	Anonaceae	<i>Xylophia langsдорfiana</i>	6,4	Ext. EtOH das folhas
22.	Fabaceae	<i>Zornia brasiliensis</i>	8,2	Ext. EtOH
23.	Anonaceae	<i>Xylophia langsдорfiana</i>	5,5	Ext. MeOH
24.	Erytroxylaceae	<i>Erythroxylum revolutum</i>	6,7	Ext. EtOH
25.	Euphorbiaceae	<i>Jatropha ribifolia</i>	93,0	Ext. EtOH
26.	Violaceae	<i>Hybanthus calceolaria</i>	790x10 ⁻³	Ext. EtOH das sementes
27.	Violaceae	<i>Hybanthus calceolaria</i>	11,5	Ext. EtOH das folhas

28.	Violaceae	<i>Hybanthus calceolaria</i>	10,4	Ext. EtOH dos caules
29.	Amaranthaceae	<i>Beta vulgaris</i>	904,3	Bulbos frescos
30.	Amaranthaceae	<i>Beta vulgaris</i>	81,7	Folhas frescas
31.	Amaranthaceae	<i>Beta vulgaris</i>	145,8	Caules frescos

4.1. *JATROPHA RIBIFOLIA*: COLETA E OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

Jatropha ribifolia foi coletada no município de Serra Branca, Estado da Paraíba, em setembro de 2009, coordenadas: 07° latitude, 08°30' sul, 36° longitude e 37°30' oeste. O material botânico foi identificado pela Prof^a Maria de Fátima Agra, do setor de botânica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF), sendo uma exsicata da planta depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), da Universidade Federal da Paraíba sob identificação AGRA et. al. 7243.

O material botânico foi seco em estufa com ar circulante à temperatura de 40 °C durante 3 dias. O material seco foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico, obtendo-se cerca de 3,0 Kg de pó. O pó foi submetido à maceração exaustiva com etanol a 95%, em um recipiente de aço não inoxidável, durante 72 horas. Essa etapa foi repetida por 4 vezes. Após a extração, a solução obtida foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida a uma temperatura de 40 °C obtendo-se o extrato etanólico bruto (93g).

4.2. *HYBANTHUS CALCEOLARIA*: COLETA E OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

Hybanthus calceolaria foi coletada no município de Piatã (Bahia) em maio de 2009 a aproximadamente 1304 metros acima do nível do mar, próximo as coordenadas 13° 04' 25" sul e 41° 47' 51" oeste. É uma planta herbácea com cerca de 30 cm de altura, folhas vilosas com cor lilás, que ocorre em campos gerais na região. Uma exsicata foi depositada no herbário Alexandre Leal Costa (ALCB) com número 88937.

O material botânico foi seco em estufa com ar circulante à temperatura de 40 °C durante 3 dias. Os órgãos - folhas, caule e sementes – foram separados e submetidos ao processo de pulverização em processador, obtendo-se 177 g, 280 g e 10 g do pó de folhas, caule e sementes, respectivamente. Os materiais secos e pulverizados foram submetidos à

maceração com etanol a 95%, durante 72 horas, empregando-se 5 minutos de sonicação a cada 24 horas. Para folhas e caule foram utilizados 5 litros de etanol a cada processo de maceração, entretanto para sementes, apenas 100 mL do mesmo. Essa etapa foi repetida por 3 vezes e, ao término, a solução extraída foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida a uma temperatura de 40 °C obtendo-se os extratos etanólicos brutos : Folhas 11,50 g, caules 10,4 g e sementes 790 mg.

4.3. BETA VULGARIS: OBTENÇÃO DO MATERIAL FRESCO E PREPARAÇÃO DO EXTRATO

A planta *Beta vulgaris*, popularmente conhecido como beterraba, foi adquirida no mês de agosto de 2012, no mercado nacional, chamado de *Naschmarkt* situado no bairro de Karlsplatz em Viena, Áustria. Foi comprado cerca de 1 Kg do material fresco, sendo separado em seus órgãos: bulbo, folhas e caule.

O bulbo e o caule foram picados em cubos de aproximadamente 0,5 cm e extraídos com a mistura DCM:MeOH, durante 24 horas; neste intervalo utilizou-se 15 minutos de ultrassom. Já as folhas, foram congeladas em nitrogênio líquido e trituradas com ajuda de pistilo e almofariz, sendo a extração realizada igualmente ao dos demais órgãos.

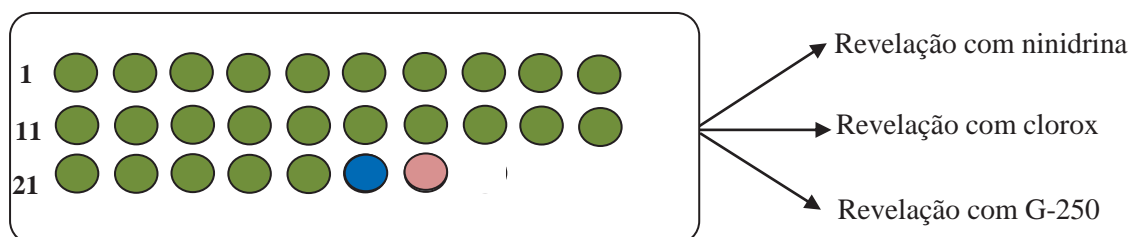
4.4. TRIAGEM DOS EXTRATOS: AVALIAÇÃO DE ORBITÍDEOS (TIPO-CARYOPHYLACEAE)

O estudo dos extratos vegetais teve como objetivo identificar, a priori, a presença de peptídeos cíclicos nessas matrizes e, posteriormente, encaminhar os extratos positivos para fracionamento e isolamento.

Inicialmente, foram realizados testes utilizando reveladores específicos para ligações peptídicas, como ninidrina, Cl₂/o-tolidina (clorox) e G-250 (*coomassie brilliant blue*), com a finalidade de comparar os resultados e selecionar algumas espécies para dar prosseguimento ao estudo. Foram preparadas três placas cromatográficas, com aplicação de 27 *spots*, realizadas com ajuda de um capilar (Figura 18). Os *spots* 1-25 são relativos às espécies da tabela 5 preparados nas concentrações de ~40 mg/mL e aplicados na placa concentrando 3

vezes cada *spot*. Os *spots* 26 e 27 foram os padrões usados, a saber: Peptídeo cíclico e albumina, respectivamente.

Figura 18 - Representação das placas com a aplicação dos extratos submetidos aos reveladores químicos. Em azul- peptídeo cíclico e em rosa- albumina.



4.4.1. APLICAÇÃO DA SOLUÇÃO DE NINIDRINA A 02%

Ninidrina (0,2 g) foi solubilizada em 100 mL de etanol a 95%. Esta foi então borrifada nas placas que tiveram as amostras aplicadas. Considerou-se positivo as manchas formadas na placa (*spots*) de coloração rosa-púrpura, o que indica que houve reação entre os grupos amino-terminal livres e a solução.

4.4.2. APLICAÇÃO DA SOLUÇÃO Cl_2 /O-TOLIDINA (CLOROX)

- 1) Preparo de uma solução de hipoclorito de sódio a 6%;
- 2) Borrifar etanol;
- 3) Borrifar a solução de *o*-tolidina (Esta solução consiste na solubilização de 160 mg de *o*-tolidina em 30 mL de ácido acético glacial, 470 mL de água e 1 g de KI).

Na presença de ligações peptídicas, o grupamento amida desta ligação reage com Cl_2 formando *N*-halogênios, revelados por solução de *o*-tolidina/KI (HORSTEN et al., 1996), que apresenta coloração azulada indicando a presença de peptídeos cíclicos.

4.4.3. APLICAÇÃO DA SOLUÇÃO DE COMASSIE BRILLANT BLUE (G-250)

O sólido G-250 (100 mg) foi dissolvido em 20 mL de etanol, adicionando-se 20 mL de ácido fosfórico e 160 mL de etanol a 50%.

A solução foi então borrifada na placa e seca em estufa por 15 minutos, sendo então observada.

4.5. FRACIONAMENTO E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *JATROPHA RIBIFOLIA*

Dois gramas do extrato etanólico foram solubilizados em acetato de etila, conforme metodologia de extração para peptídeos cíclicos (ALTEI, 2009), sendo a parte solúvel removida e seca em rotaevaporador. Os compostos contidos no extrato e na fração acetato de etila foram reveladas em *o*-tolidina/KI (clorox).

A fim de se realizar um *clean-up* das amostras para injeção em HPLC analítico, bem como verificar a polaridade de substâncias com polaridades próximas, a fase AcOEt (200 mg) foi carregada em cartucho C₁₈ da marca Strata C₁₈ – E Phenomenex – 500 mg, preconditionado e equilibrado com os solvente B (95% ACN/ 0,036% TFA) e solvente A (H₂O/ 0,045% TFA), respectivamente. A eluição se deu com os solventes A e B, seguindo as proporções evidenciadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Eluição da fase acetato de etila *J. ribifolia* em coluna de extração Sepack.

Frações	Solvente A(%)	Solvente B(%)
Fr2 – Fr3	100	0
Fr4 – Fr5	70	30
Fr6 – Fr8	30	70

4.5.1. HPLC ANALÍTICA PARA ANÁLISE DO PERFIL PEPTÍDICO DAS FRAÇÕES FR2-FR8

O extrato etanólico bruto (EEB) e as frações obtidas em extração em fase sólida foram injetadas em cromatógrafo líquido analítico Shimadzu, com detector UV-VIS, em comprimento de onda de 220, 214 e 280 nm, gradiente variando de 5 à 95 % de B em A (B:

ACN/0,036%TFA e A: H₂O MilliQ/0,045%TFA) durante 30 min, com fluxo de 1,0 mL/min. A coluna usada tratava-se da marca Kromasil, dimensões de 250 x 4,6 mm, tipo C₁₈ com partículas de 5µm e poro de 100 Å.

Todos os perfis foram analisados, sendo selecionadas as frações que apresentavam sinais indicativos de peptídeos, considerando o modelo experimental. Para tal análise, foram avaliados os tempos de retenção e as absorções no UV, característicos de peptídeos cíclicos (orbitídeos) de acordo com estudos anteriores realizados em nosso laboratório (ALTEI, 2009; PICCHI, 2007), a saber: eluição por volta de 50-75% de B e absorção em 220 nm. As frações que se apresentaram promissoras nesta avaliação foram reunidas e encaminhadas para purificação.

4.5.2. HPLC SEMI-PREPARATIVO FRAÇÕES FR6- FR7

As frações Fr6-Fr7 foram reunidas e submetidas à purificação de seus analitos. Para tanto, foi utilizado o equipamento HPLC semi-preparativo (System Gold BECKMAN), com detector UV-VIS em comprimento de onda de 220 nm e coluna de fase reversa C₁₈ AXIA Packed LUNA, de dimensões 250 x 21,20 mm, partículas de 5 µm de tamanho, com um programa de gradiente de 40 a 80% em 120 min e fluxo de 5 mL/min. Deste experimento obtivemos 128 tubos, os quais, foram reunidos de acordo com o perfis dos cromatogramas (Tabela 7). A pureza da fração foi confirmada por HPLC analítico.

Tabela 7 - Codificações das frações obtidas da HPLC semi-preparativa.

Frações	Codificadas como
61	1A
71 (61% de B)	1B
81 (65% de B)	1C
87-89 (67% de B)	1D
90	1E
95	1F
96-97	1G
98	1H
100	1I
123	1J
124	1L
128	1M

4.5.3. ESPECTROMETRIA DE MASSAS (ESI)

A análise dos dados de espectrometria de massas foi realizada na Universidade Federal de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto utilizando um espectrômetro MS UltrOTOF-Q (Brucker, Daltonics Billerica MA, USA). As amostras foram injetadas diretamente no sistema com um fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. O capilar foi aquecido a 250 °C. O nitrogênio foi utilizado como gás de colisão e todos os experimentos foram realizados utilizando o modo positivo.

4.5.4. ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

A análise da composição de aminoácidos foi realizada pelo método da derivatização pós-coluna por orto-phtalaldeído (OPA) em um analisador automático Shimadzu LC-10A/C-47A. O sistema foi periodicamente calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos, obtendo-se um valor para o tempo de saída de cada aminoácido, o fator de conversão entre a área de cada pico e a concentração da amostra. A detecção foi realizada utilizando-se detector de fluorescência para excitação e emissão nos comprimentos de onda de 348 e 450 nm, respectivamente.

O sistema foi calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos. Neste procedimento atribui-se para cada aminoácido um sinal, 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.

As condições analíticas e as soluções utilizadas estão descritas abaixo.

Condições analíticas:

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

- Fase móvel:

A: citrato de sódio 0,2 mol/L pH 3,20 (contendo 7% de etanol);

B: citrato de sódio 0,6 mol/L e ácido bórico 0,6 mol/L (pH 10,0);

C: Hidróxido de sódio 0,2 mol/L.

Solução de reação de derivatização pós-coluna:

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

- 0,8 g de orto-ftalaldeído / 14 mL de etanol; 0,4 g de polioxietileno lauril éter (Brij-35) e 1 g de N-acetilcisteína em tampão alcalino (solução de carbonato de sódio 0,384 mol/L, ácido bórico 0,216 mol/L e sulfato de potássio 0,108 mol/L) – 1 L.

Para hidrólise

O peptídeo em análise foi hidrolisado em 1 mL de HCl 6 mol/L, na presença de 0,08 mL de fenol a 5% em H₂O, a 110°C por 72 h em atmosfera de N₂. Após a reação de hidrólise, o material foi concentrado à vácuo, dissolvido em tampão de diluição NaS, pH 2,2 e filtrado em unidade filtrante GV Millex - Millipore antes de ser injetado no cromatógrafo. O cromatograma é dado em função da proporção relativa de aminoácidos do composto hidrolisado, sendo a resposta dada por meio da relação entre as suas concentrações unitárias e a média total.

4.5.5. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os experimentos de RMN foram realizados no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química sob a responsabilidade do Dr. Nivaldo Borali e Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) sobre a supervisão do Dr. Mauricio Luís Sforça. Ambos os experimentos foram realizados em equipamentos Varian Inova 500, operando a 500 MHz. Foram realizados experimentos de 1D (RMN ¹H) e 2D (TOCSY, COSY e NOESY). As amostras submetidas a RMN foram solubilizadas em DMSO-d₆ (600 µL), com resolução de 512 pontos e “*mixing time*” de 60 ms. Os dados foram plotados utilizando o software MestreNova.

4.5.6. DINÂMICA MOLECULAR

Nomenclatura e software

As recomendações e símbolos de nomenclatura propostas pela IUPAC (1970) foram utilizados. 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)

O peptídeo de *Jatropha ribifolia* foi solvatado em uma caixa retangular usando um modelo aquoso SPC (BERENDSEN et al., 1987). O protocolo DM/SA empregado foi baseado em estudos anteriores (COLLINO; EVANS, 2007; ADAMS et al., 1997; DEPRISTO et al., 2005). O método de Lincs (HESS et al., 1997) foi aplicado para restringir comprimentos de ligação covalente, permitindo um intervalo de integração de 1fs após uma minimização de energia inicial utilizando “*Steepest Descents*” algoritmo. Distâncias inter prótons em locais específicos, de acordo aos dados obtidos pelos espectros de NOESY, foram impedidos até 4,0 Å.

O refinamento de DM/SA compreende 15 ciclos de 300 ps cada, totalizando a simulação de 4050 ps. Cada ciclo inclui: 1) uma minimização inicial usando algoritmo “*Steepest Descents*”, 2) simulação do equilíbrio do sistema de 50 ps a 300 K) aumento incremental do sistema de 300 K à 2000 K, durante 5ps para transpor as barreiras energéticas, 4) simulação de 45 ps a 2000 k para entender o espaço conformacional do peptídeo em altas temperaturas, 5) refrigeração do sistema de 2000 K à 300 K, usando intervalos decrescentes de 100 K por 10ps, somando um total de 17 passos, ou seja 170 ps, 6) simulação de 30 ps à 300 K. No final do ciclo de 15 refinamentos DM/SA, a coordenada final, convergente com as restrições inter prótons de NOESY, foi submetida à dinâmica molecular com uma temperatura constante de 300 K durante 5500 ps, a fim de obter o que chamamos de “*conformacional pool*”. As trajetórias dessa simulação à 5500 ps em 300 K foram reunidas em clusters e 15 conformações com menores energias foram selecionadas para constituir uma biblioteca de confôrmeros para o peptídeo de *J. ribifolia* (Ribifolina).

4.6. SÍNTESE DE RIBIFOLINA

Primeiramente foi preparado o precursor linear de ribifolina, através da técnica manual de síntese em fase sólida usando a estratégia 9-fluorenilmetiloxycarbonila (Fmoc)/terc-butila (tBu) (Figura 19). A síntese foi realizada utilizando a resina Wang-Gly-Fmoc, a qual foi tratada com uma solução 20% de piperidina em DMF para a remoção dos grupos Fmoc -etapa de desproteção. O primeiro aminoácido adicionado foi a glicina, escolhida com base na disponibilidade da resina Wang-Gly-Fmoc em nosso laboratório. Para a reação de acoplamento foram usados 2 equivalentes de cada Fmoc-aminoácido com 2 equivalentes de

DIC e HOBt em relação ao teor de amino grupos livres na resina, usando os solventes CH_2Cl_2 e DMF. Todos os Fmoc-aminoácidos usados na síntese apresentaram configuração *L* (com exceção da glicina que não apresenta isomeria óptica). Cada etapa de acoplamento foi realizada sobre agitação branda durante 2 h. O acoplamento de cada resíduo de aminoácido, bem como a desproteção da porção α -amino antes da próxima etapa de acoplamento foi monitorada por meio da reação de pequenas alíquotas da resina com ninidrina. Entre cada etapa de acoplamento e desproteção a resina foi lavada com CH_2Cl_2 e DMF. A clivagem e desproteção dos peptídeos presos à resina foram feitas com 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 e agitação moderada durante 2 h.

Após esse período foi adicionado éter gelado, e a mistura foi então centrifugada. O precipitado (peptídeo-resina) foi lavado com éter gelado, sonificado e centrifugado. Essa etapa se repetiu por 2 vezes. Já na sua forma livre, o peptídeo linear foi analisado, para se verificar a pureza e rendimento de reação e, posteriormente, encaminhado para reação de ciclização.

O processo de ciclização química do peptídeo foi realizado em solução diluída com DMF (0,001 mol/L), contendo 1,5 equivalentes de HBTU e 10 equivalentes de DIEA sob agitação por 2 h. Após esse período a solução foi diluída em água e então submetida à partição com acetato de etila. A fração orgânica, que contém o peptídeo cíclico foi concentrada e direcionada para etapas posteriores de purificação.

O peptídeo cíclico sintético e seus análogos lineares e subprodutos foram purificados em HPLC semipreparativa e caracterizados por análise de aminoácidos, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear.

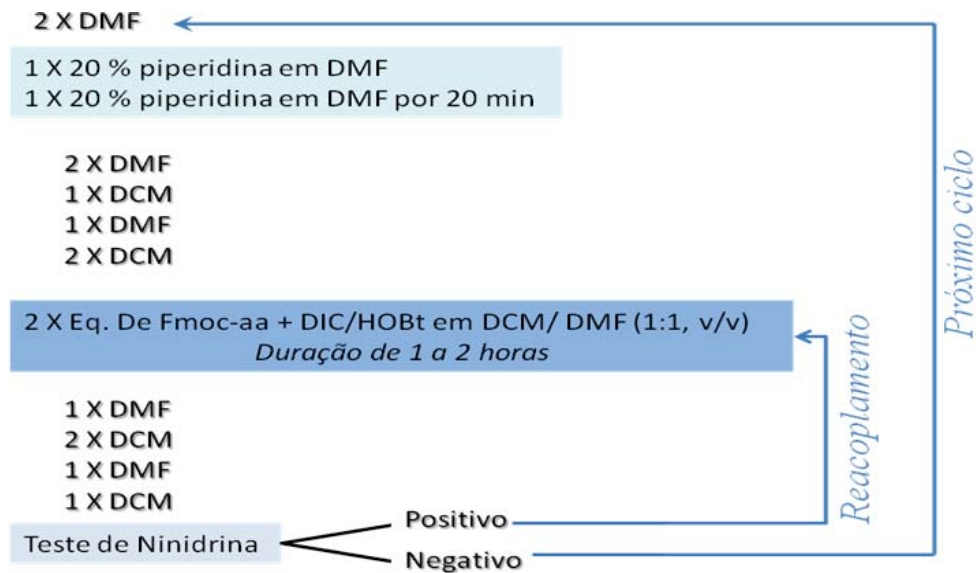
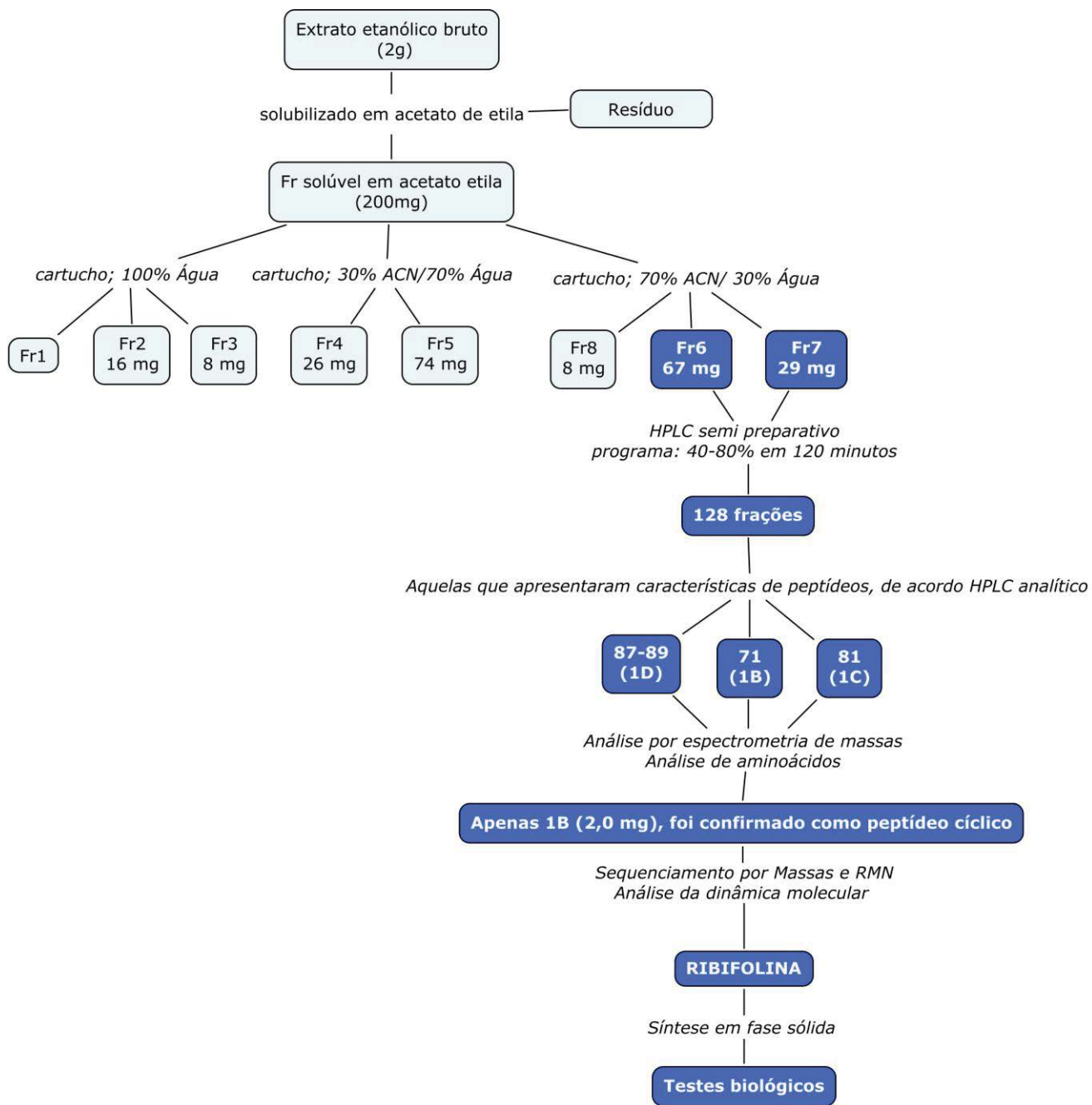
Figura 19 - Protocolo usado para a síntese do peptídeo linear utilizando resina Fmoc-Wang.

Figura 20 – Esquema de fracionamento do estudo envolvendo *Jatropha ribifolia*.



4.7. ESTUDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O extrato etanólico bruto (2,0 g) de *J. ribifolia* submetidos a purificação em coluna de sílica gel 60, 0,063 x 0,200 mm e eluídos com Hexano:AcOEt: MeOH em ordem crescente de polaridade. A coluna utilizada apresentava diâmetro de 3 cm por 98 cm de comprimento, com a altura da fase estacionário em 52 cm de sílica. Foram obtidas 78 frações coletadas em um volume de 10 mL cada, codificadas como SIOH.

Após aplicação das frações em CCDA, eluição e revelação em câmara de U.V averiguou-se que a amostra SIOH-22 apresentou considerável grau de pureza. Mediante essa observação, a fração foi solubilizada em solvente deuterado (CDCl_3) e encaminhada para análise de RMN.

4.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os bioensaios para atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Micologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Campus Araraquara sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Jose Soares Mendes Giannini. A avaliação da atividade antifúngica e determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram realizadas por meio da técnica de microdiluição com adaptações, de acordo com o protocolo M27-A2 do CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institutes* (antigo NCCLS).

Os peptídeos ribifolina linear e cíclico foram ensaiados frente aos fungos *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*. O meio de cultura utilizado foi RPMI - 1640, suplementado com 2% de glicose, e pH ajustado para 7,0. O inóculo foi padronizado na faixa de $5,0 \times 10^2$ 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 48 a 72 horas para o gênero *Cryptococcus*.

4.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

Esta avaliação foi realizada no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará sob responsabilidade da profa. Cláudia do Ó Pessoa para 3 linhagens de células tumorais – SF295 (côlon), HCT-8 (côlon) e MDA-MB-435 (mama) e pelo Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia Geral da Universidade de São Paulo sob a responsabilidade da profa Célia Regina da Silva Garcia, para a linhagem de células HEK 293T (células de rim de embrião humano). As substâncias puras (ribifolina e linear ribifolina) foram submetidas ao ensaio *in vitro* de avaliação do potencial citotóxico segundo o método colorimétrico descrito por MOSMANN (1983). Esse método vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN et al., 1990). É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. Quimicamente, se baseia na conversão do sal de coloração amarela - 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)- 2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) – em formazan de coloração azul escura. O estudo citotóxico pelo método permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

4.9.1. CÉLULAS SF295, HCT-8 E MDA-MB-435

Células: As linhagens tumorais utilizadas, MDA-MB435 (mama - humano), HCT-8 (côlon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Amostras: Os peptídeos ribifolina e linear ribifolina foram diluídos em DMSO puro estéril para a concentração estoque de 5 mg/mL.

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél/mL para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295 e $0,7 \times 10^5$ cél/mL para a linhagem HCT-8. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium) e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm Somente as substâncias que apresentarem valores de inibição ≥ 75 % em pelo menos duas linhagens tumorais são consideradas ativas, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral.

4.9.2. CÉLULAS HEK 293T

Amostras: Os peptídeos ribifolina e linear ribifolina foram diluídos em PBS puro para a concentração estoque de 5 mg/mL.

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^4$ cel/mL em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina. As placas de foram incubadas por 24 horas em estufa. Após isso, o meio foi substituído e a um novo meio (100 µL por poço) foram adicionados os compostos nas concentrações 0,001, 0,010, 0,1, 1, 10, e 100 mM e realizou-se o re-incubação por 48 horas. Ao término deste, foram adicionados 20 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium) e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância (570 nm) foi avaliada em Flexstation (Molecular Conselhos Inc).

4.10. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA

Esse ensaio foi realizado no Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia Geral da Universidade de São Paulo sob a responsabilidade da Profa Célia Regina da Silva Garcia e Dra. Phatibha Gaur.

Cultivo do *Plasmodium falciparum*: os parasitas foram mantidos a 1-10% de parasitemia e 2% de hematócrito em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com eritrócitos, 10% de soro humano, 0,16% de glucose, hipoxantina 0,2 mM, 2,1 mM de L-

glutamina e 22 mg / mL gentamicina. As culturas foram incubadas a 37°C, 3% de O₂, 3% de CO₂ e 94% de N₂. A sincronização dos parasitas em cultura em estágio anelares foi realizado por tratamento repetitivo com 5% (os cultivos com predomínio de anéis utilizados nos ensaios foram obtidos através de sincronização com sorbitol 5% (peso/volume). O crescimento do parasita e parasitemia foram monitorizados pela avaliação esfregaços de sangue coradas com Giemsa sob o microscópio.

Análise de ribifolina e linear ribifolina: Esta foi realizada em placas de 96 poços com diferentes concentrações (100, 20, 4, 0,8, 0,16, 0,032, 0,0064 e 0,00128 µM), em triplicata cada. Para este ensaio, 1% de parasitemia e 2% de hematócrito, foram fixados em cada poço e 200 µL de RPMI com 10% de soro humano foram adicionados. Enfim, os compostos nas diferentes concentrações foram plaqueados e incubados por 48 horas.

Preparação de amostras para análise de citometria de fluxo (FACS): baseou-se na metodologia anteriormente publicada (SCHUCK et al., 2011). Após 48 h de incubação, as placas foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos e o meio RPMI foi removido. Quaisquer vestígios de droga foram lavados com PBS (pH 7,2-7,4). AS amostras foram incubadas durante a noite com 2% de formaldeído em PBS, para fixar o parasita e, após a fixação, as amostras foram lavadas com PBS mais uma vez. A permeabilização e coloração foi feita com 0,1% de Triton-X100-1 e o corante YoYo (*Molecular Probes*).

Análise FACS: instrumento FACS foi calibrado. As amostras foram executados sob condições pré-programadas para YoYo-1. A análise dos dados foi realizada por FACS com o software *Cylogic* (SCHUCK et al., 2011).

Análise estatística: software gráfico *Prism* foi utilizado para análise estatística. Todos os experimentos foram repetidos por três vezes em triplicata para obter os valores finais IC₅₀.

4.11. ESTUDO DE CICLOTÍDEOS

A pesquisa incluindo a análise e purificação de ciclotídeos foi realizada no laboratório *MS core facility*, Instituto de Farmacologia, Centro de Fisiologia e Farmacologia da Universidade de Medicina em Viena (MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN) na Áustria sob a supervisão do Prof. Dr. Christian W. Gruber. A bolsa de doutorado sanduíche no exterior foi financiada pelo governo brasileiro, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, N° do processo: 9875/11-5.

4.11.1. INVESTIGAÇÃO DE CICLOTÍDEOS NO BANCO DE EXTRATOS

Cerca de 1g dos extratos, elencados na Tabela 6, foram colocados em tubos falcon (50 mL), solubilizados em 30 mL de MeOH:CH₂Cl₂ (1:1; v/v) e deixados em repouso *overnight*. Em seguida, 15 mL de H₂O/0.1% TFA foram adicionados e a fase aquosa separada e pré-purificada em cartucho de extração em fase sólida C₁₈ Strata-Phenomenex C₁₈-E, 55 µm, 70 Å com 500 mg de fase estacionária e volume de 6 mL.

Estes cartuchos foram preconditionados com um volume de 6 mL de metanol, seguido de 6 mL de 90 % ACN/0,08% TFA (solvente B) e equilibrados com dois volumes (12 mL) de H₂O/0,1% TFA (solvente A). Após a ativação, as frações hidrometanólicas obtidas das partições dos extratos com MeOH:H₂O:DCM, foram aplicadas no cartucho. A pré-purificação das mesmas foi possível mediante a eluição de 12 mL de uma solução de 20% de B, seguida de uma re-eluição com uma solução de 80% de B. Sendo este último eluato liofilizado e considerado como a “fração C₁₈ rica em ciclotídeos”.

As frações obtidas por cartucho C₁₈ relativas aos 31 extratos foram encaminhadas para análises por massas utilizando o equipamento MALDI-TOF-TOF 4800 *Proteomics Analyzer* da *Applied Biosystems*, operado em modo refletor positivo, adquirindo um total de 2,000-3,600 pulsos por espectro e intensidade do laser entre 3,100-3,800. Para preparação dos *spots* nas placas do espectrômetro, foi utilizada a matrix ácido α-ciano-hidroxi-cinâmico (solução saturada) preparada na concentração de 5 mg/mL em acetonitrila 50%.

No preparo do *spot*, um volume de 3 µL de matrix foram misturados com 0,5 µL de cada amostra e então, 0,5 µL da mistura aplicados na placa. Os espectros de massas adquiridos com energia de laser de 1 kV sem uso de CID (*collision-induced dissociation*) e

processados em *Data Explorer Software*. As frações que apresentaram picos nas regiões 2600-4000 Da foram classificadas como positivas e encaminhadas para testes de confirmação da presença das cisteínas por reação de redução e acetamidação.

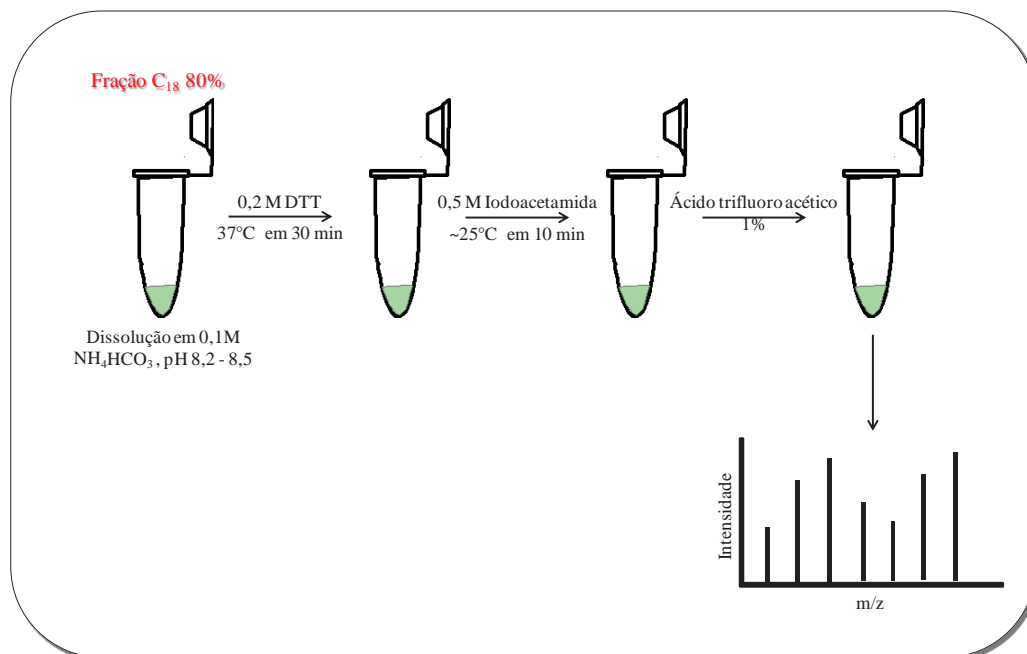
4.11.2. CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE CISTEÍNAS

Inicialmente foram preparadas as soluções:

- A1. Solução tampão 0,1 mol/L NH_4HCO_3 , pH 8,2-8,5;
- B1. 0,2 mol/L de Ditioneitol (3,2 mg/100 μL solução A);
- C1. 0,5 mol/L de Iodoacetamida (9,25 mg/100 μL solução A).

Cerca de 0,4 mg das frações C_{18} dos 31 extratos foram dissolvidas em 1 mL de solução A1. Alíquotas de 20 μL desses extratos foram separadas em *ependorfs* (1,5 mL) e adicionados 2 μL da solução B1 com posterior incubação por 30 minutos, no escuro e sob agitação. Ao término da reação de redução, o material foi alquilado com adição de 4 μL da solução C1 seguido de incubação por mais 10 minutos, em temperatura ambiente (SHEVCHENKO et al., 1996). Para estas reações utilizou-se agitador de Microplacas *Agimaxx* modelo AG-100, com aquecimento e bloco para microtubos de 1,5 mL, com velocidade de agitação aproximada de 600 rpm. Para parar a reação, foi adicionada 1 μL de ácido trifluoroacético 1% e enfim, as amostras foram então preparadas para análises por MALDI, para investigação do incremento de 348 Da referente à acetamidação das 6 cisteínas (6 x 58 Da). Abaixo a Figura 21 descreve mais claramente esse procedimento.

Dos 31 extratos investigados, foram classificados nessa etapa para os demais estudos a *H. calceolaria* e *B. vulgaris*.

Figura 21 - Procedimentos para o preparo das reações de redução e acetamidação.

Dos 31 extratos investigados, foram classificados nessa etapa: *H. calceolaria* e *B. vulgaris*.

4.11.3. ESTUDO DE CICLOTÍDEOS EM *HYBANTHUS CALCEOLARIA*.

As frações C₁₈ dos três órgãos de *H. calceolaria* (*HcA*, *HcB*, *HcC*) foram encaminhadas para purificação em HPLC preparativo e semipreparativo, sendo inicialmente redissolvidas em 10 % do solvente B em A, filtradas submetidas a um *clean-up*.

4.11.4. PURIFICAÇÃO POR HPLC E ANÁLISE DOS PICOS POR MALDI

As frações *HcA*, *HcB*, *HcC* foram purificadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Dionex Ultimate 3000 (Dionex, Holanda) usando modo semi-preparativa: *HcA* (7,0 mg), *HcB* (11,5 mg) e *HcC* (12,8 mg). A coluna utilizada pertencia à linha Kromasil, tamanho 250 x 10 mm com partículas de tamanho 5 µm e poro de 100 Å, sendo o fluxo da corrida fixado em 3 mL/min para as três análises.

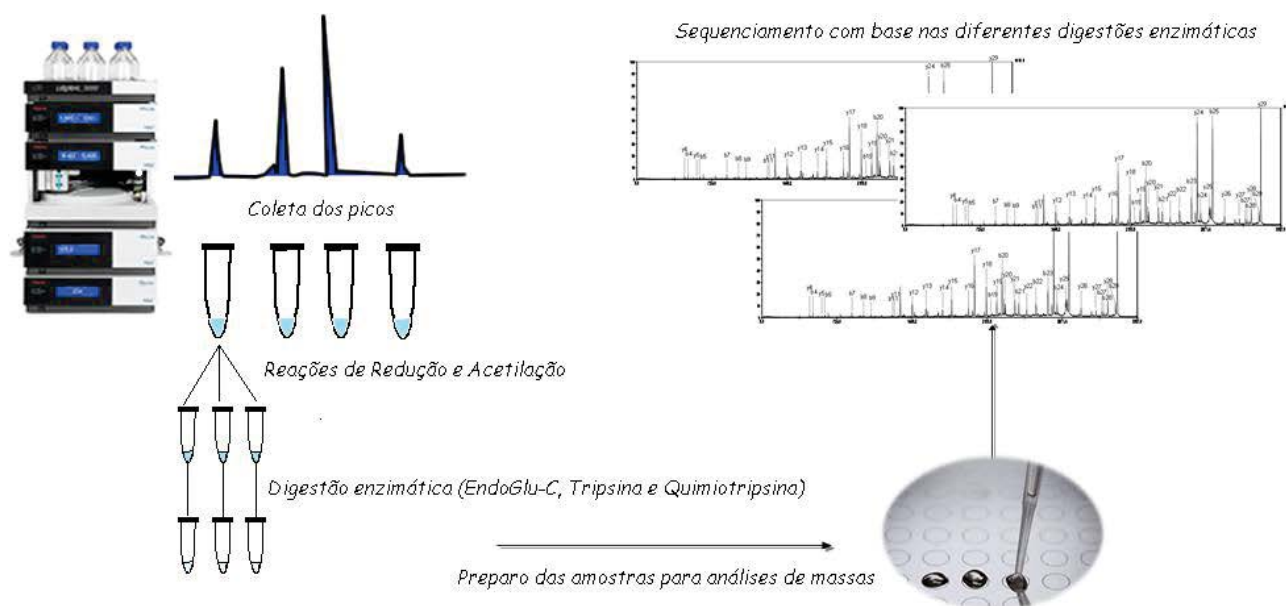
O programa aplicado para a separação dos peptídeos de *HcA* foi: 5-70% B em 45 min, detector UV monitorando à 214, 254 e 280 nm. Cada pico foi coletado e analisado por MALDI, sendo realizada a coleta de 53 frações.

Tanto para folhas quanto para caules (*HcB* e *HcC*, respectivamente) utilizou-se o mesmo programa: 30-80% de B (Solvente A – H₂O/ 0,1% TFA; Solvente B - 90 % ACN em H₂O/ 0,08 % TFA) em 100 min, monitorando também moléculas que absorvessem à 214, 254 e 280 nm. A coleta das frações iniciou-se transcorridos 10 min de análise em ambos os casos. Para folhas, coletou-se um total de 35 frações e para caules 40 frações, as quais foram monitoradas por MALDI.

Após a checagem das massas, as frações de interesse foram reduzidas, acetiladas em triplicata, conforme o tópico 4.11.2. No entanto, ao invés da adição de ácido para parar a reação, foi feita a adição de 1 µL da solução de DTT e as frações foram incubadas por 10 min. Para o sequenciamento dos peptídeos foi feita a digestão utilizando as enzimas endoprotease Glu-C (Roche – 11047817001), tripsina (Promega – V528A) e quimiotripsina (Sigma – C6423). Inicialmente o preparo das enzimas foi realizado, pois estas foram cedidas pela fabricante liofilizadas.

- ✓ Solução EndoGlu-C: 50 µg de endoprotease Glu-C foram ressuspensas em 100 µL de ácido acético 0,01%.
- ✓ Solução de tripsina: 100 µg de tripsina foram ressuspensas no tampão de ácido acético 50 mmol/L.
- ✓ Solução de Quimiotripsina: 25 µg de quimiotripsina foram dissolvidas em 50 µL de ácido acético 0,01%.

Às frações reduzidas e acetiladas (27 µL) foram preparadas em triplicata e 2 µL das soluções enzimáticas foram adicionadas a cada fração e incubadas de 3 a 12 h em atmosfera livre de luz, 37°C e agitação (Figura 22), os *spots* preparados e analisados por espectrometria de massas operando no modo MS/MS, e fazendo o uso de CID.

Figura 22- Resumo de atividades delineadas para o sequenciamento dos ciclotídeos.

4.11.5. COMPARAÇÃO DA DIVERSIDADE PEPTÍDICA NOS DIFERENTES ÓRGÃOS DE *H. CALCEOLARIA*

O estudo das diferenças da diversidade de peptídeos nos três órgãos de *H. calceolaria* consistiu na investigação dos seus perfis de eluição. Nesta análise foi utilizado um gradiente de 5-95% de B em 45 minutos, fluxo 1 mL/min, sendo a coluna modelo Kromasil, tamanho 250 x 4,6 mm, com partículas de tamanho 5 μm e poro de 100 \AA . Todos os picos foram coletados e as massas analisadas por MALDI. Os resultados foram elencados nas tabelas 16, 17 e 18 os quais relacionam o exato tempo de retenção no qual os picos foram coletados e as massas pertencentes aos mesmos.

4.12. ANÁLISE DE PEPTÍDEOS EM *BETA VULGARIS*

As frações C₁₈ dos três órgãos de *Beta vulgaris* (*BvA*, *BvB*, *BvC*) passaram pelo *screen* de ciclotídeos tópicos 4.11.1 e 4.11.2, porém somente a fração *BvA* foi encaminhada para purificação. 59,7 mg da fração foram redissolvidos em 10 % do solvente B em A, filtradas e submetidas a um processo de *clean-up*. A amostra foi injetada em HPLC preparativo, coluna Jupiter-Phenomenex, tamanho 250 x 21,2 mm, 10 µm, 300 Å. O fluxo da corrida foi fixado em 8 mL/min e a detecção feita na região do UV operando em 214, 254 e 280 nm.

No total, 29 frações foram coletadas manualmente e analisadas por MALDI. A fração 15 foi reduzida, acetilada e digerida conforme tópico 4.11.4.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO DE ORBITÍDEOS NO BANCO DE ESPÉCIES

A colaboração firmada com o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) permitiu a obtenção dos extratos vegetais 22 de espécies de várias famílias e gêneros, elencados na tabela 6, item 4. A avaliação da presença de orbitídeos nessas matrizes foi realizada, a priori, através de testes químicos de revelação, os quais deram indícios da presença destes compostos por reações químicas.

Sabe-se que peptídeos cíclicos reagem com Cl_2 formando *N*-halogênios, revelados por uma solução de *o*-tolidina/KI (HORSTEN et al., 1996), resultando no aparecimento de uma coloração azulada. Entretanto, para que esse resultado seja coerente, é necessário que o teste com ninidrina sejam negativos, uma vez que orbitídeos tipo cabeça-cauda não possuem grupamento amino-terminal livre.

Com base nesse consenso uma primeira placa montada segundo o item 4.4 foi borrifada com a solução de ninidrina. Este teste tem detecção na ordem de microgramas e pode ser considerado sensível para a análise em questão. Foram considerados positivos *spots* que se tornaram roxo-azulado. Logo, das 24 espécies analisadas nesse experimento, 12 foram positivas conforme a tabela 8, sendo possível afirmar que as mesmas apresentam aminoácidos, peptídeos, proteínas ou moléculas com $-\text{NH}_2$ livres em sua composição.

Observação: Em alguns casos, é previsto com base na literatura, que o teste resulta em falso negativo quando aminoácidos como prolina e hidroxiprolina (dois iminoácidos) estão na posição terminal, porém isso não foi observado nesse trabalho.

O teste de *o*-tolidina/KI (clorox) para uma segunda placa resultou na seleção de 13 espécies positivas, além dos controles. Notou-se uma gradação nas tonalidades de azul, o que é indicativo de concentração, considerando que as amostras foram preparadas nas mesmas condições. Foram adotadas as representações: +, ++ ou +++ para definir a intensidade das cores/concentração em ordem crescente.

Após analisar os dados de revelação para Cl_2 /*o*-tolidina e ninidrina (Tabela 8) e considerando que orbitídeos devem revelar apenas em clorox, foram selecionadas quatro

espécies como possíveis biossintetizadoras de orbitídeos: *Erytroxylum caatinga* (3), *Rolinia leptopetala* (18), *Erytroxylum revolutum* (24) e *Jatropha ribifolia* (25).

Com o intuito adicional de se investigar a existência de mini-proteínas nos extratos, o revelador G-250 (*Commassie Brilliant blue*) foi utilizado. A placa 3 foi então borrifada e, após a espera de cerca de 15 minutos de revelação, a placa exibiu fundo azul e alguns *spots* coloração avermelhados, sendo estes considerados positivos. Foram 10 espécies positivas para esse teste conforme a Tabela 8, o que pode ser indicativo da presença mini-proteínas cíclicas. Um testes mais cauteloso será relatado adiante. (item 5.8).

Tabela 8- Resultados Das Revelações.

<i>Spots</i>	Ninidrina	Clorox	G-250	<i>Spots</i>	Ninidrina	Clorox	G-250
1.	+	-	-	15.	-	-	-
2.	+	+	+	16.	+	++	-
3.	-	+	++	17.	+	+	+
4.	+	-	-	18.	-	++	+
5.	-	-	+	19.	+	-	-
6.	-	-	+++	20.	+	+	-
7.	-	-	-	21.	-	-	+
8.	+	++	-	22.	+	++	+
9.	+	+	-	23.	+	+	-
10.	-	-	-	24.	-	++	+
11.	-	-	-	25.	-	+	+
12.	+	++	-	26. <i>PC sintético</i>	-	++	+
13.	-	-	-	27. <i>Albumina</i>	+	+	++
14.	-	-	-				

Alguns extratos mostraram ser positivos, porém com diferenças na intensidade da cor. Mediante isso, os resultados positivos foram comparados e apontados em três níveis de coloração (+, ++ e +++).

Diante dos resultados, 4 espécies (3; 18; 24; 25) passaram no *screening*, porém concernente com os dados da literatura, os quais descrevem diversos peptídeos cíclicos para o gênero *Jatropha*, apenas a espécie *Jatropha ribifolia* foi selecionada para dar prosseguimento nos estudos de isolamento.

5.2. ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO DE RIBIFOLINA, UM NOVO ORBITÍDEO DE *JATROPHA RIBIFOLIA*

O processo de extração do pó de *J. ribifolia* utilizando etanol resultou em 93 g de extrato etanólico bruto, cerca de 3% do material vegetal seco. O processo de fracionamento se deu com solubilização de 2 g do extrato em acetato de etila o que resultou em 200 mg de fração acetato (FrAcOEt). Acetato de etila é o solvente comumente empregado na extração de peptídeos cíclicos (ALTEI, 2009). Entretanto, através dos testes de clorox e HPLC buscou-se verificar se a remoção dos compostos peptídicos estava sendo realmente efetiva. A Figura 23 evidencia que a fração acetato de etila apresentou teste positivo para clorox, confirmando a presença de peptídeos cíclicos. Além disso, a análise dos perfis cromatográficos do extrato etanólico bruto após a extração com acetato e da fração AcOEt obtida (Figura 24), corroboram os dados de clorox e confirmam que o processo de extração foi bem sucedido.

Figura 23- Teste positivo para a revelação da fração acetato de etila de *J.ribifolia*.

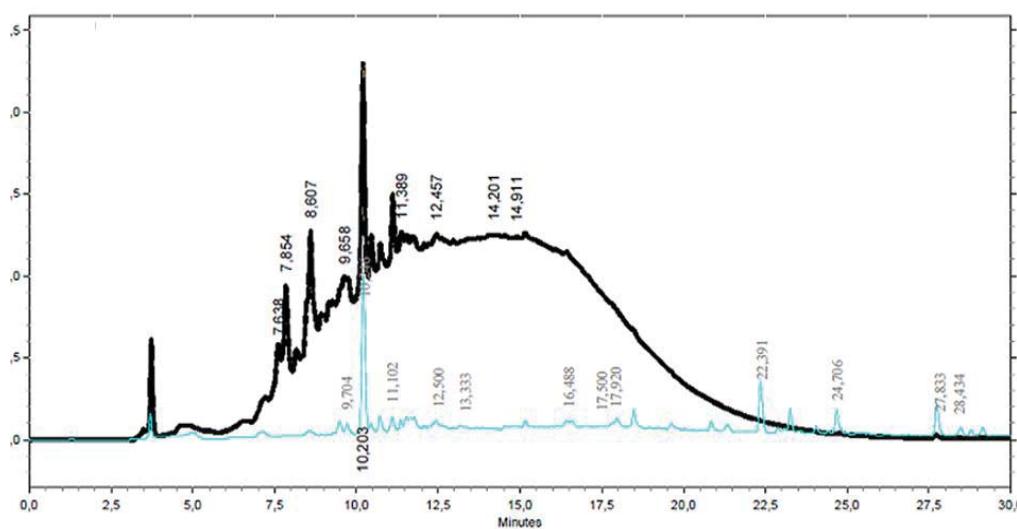


Considerando que a fração continha os peptídeos de interesse, seguiu-se com o estudo de purificação. FrAcOEt (200 mg) foi carregada em cartucho C₁₈ e eluída com diferentes concentrações de solvente A (H₂O/ 0,045% TFA) e B (95% ACN/ 0,036% TFA) em ordem decrescente de polaridade. As proporções foram estabelecidas com base geral na solubilidade dos orbitídeos. Sabe-se que essas moléculas eluem por volta de 50-80%, portanto o sistema foi eluído com: 100% A para limpeza de moléculas muito polares; 30% para aquelas com média polaridade, porém, não peptídica e enfim 70% de B para extração dos possíveis orbitídeos. Desse procedimento, obtiveram-se oito frações as quais foram secas e pesadas, conforme o Quadro 2.

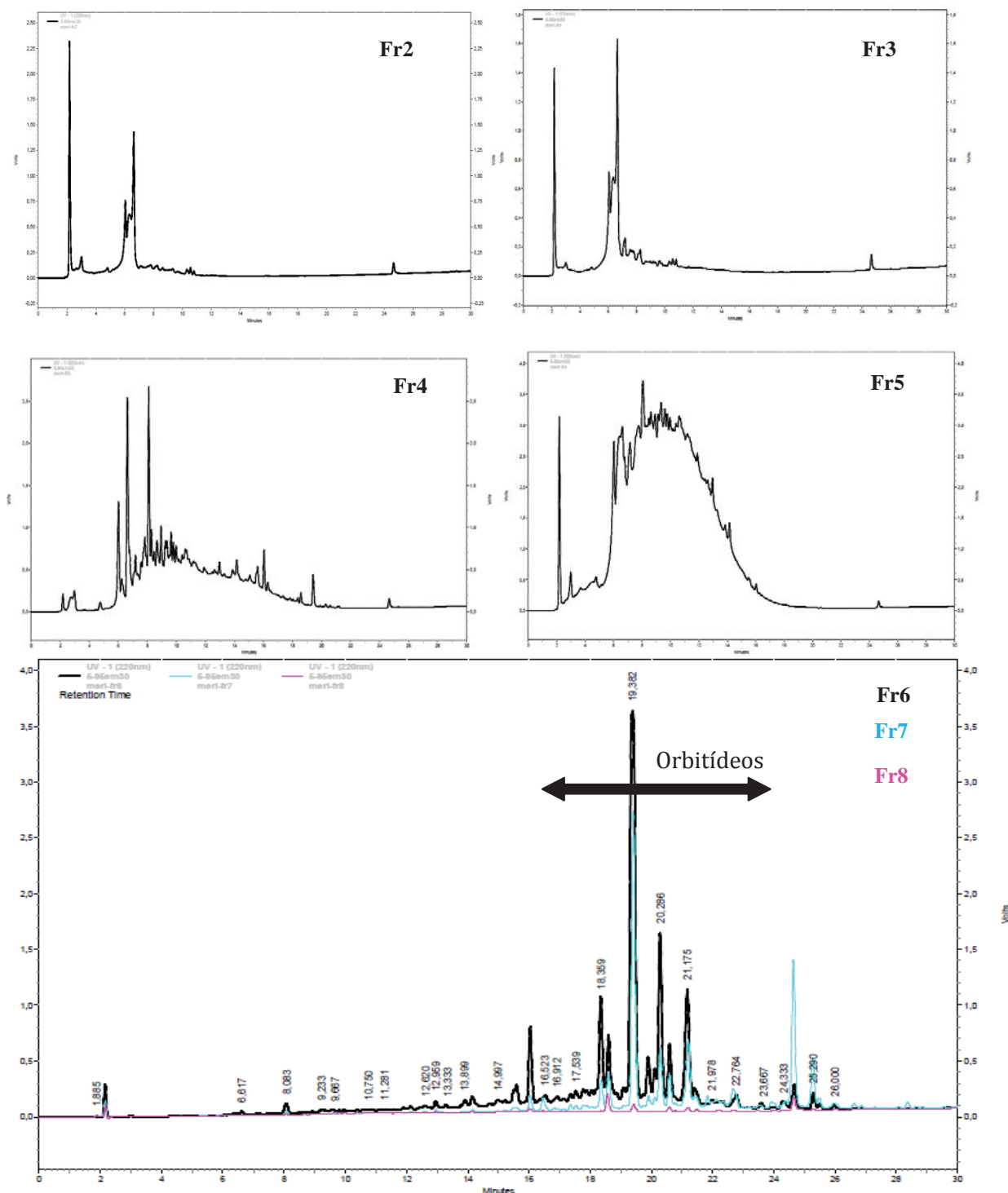
Quadro 2- Frações obtidas após eluição da fração acetato de etila em cartucho C₁₈.

Frações	Solvente A(%)	Solvente B(%)	Massas (mg)
Fr2	100	0	16
Fr3	100	0	8
Fr4	70	30	26
Fr5	70	30	74
Fr6	30	70	67
Fr7	30	70	29
Fr8	30	70	10

As frações obtidas em Sepack® foram injetadas em cromatógrafo líquido analítico de alta eficiência para a observância dos respectivos perfis de eluição. Os perfis cromatográficos de peptídeos cíclicos possuem características peculiares, pois eluem por volta de 50-70% de acetonitrila em água e são detectados no ultravioleta em comprimento de onda de 220 nm – referentes às transições $\pi - \pi^*$ de ligações peptídicas. A análise dos perfis obtidos nos fez inferir que as frações 6, 7 e 8 apresentavam possíveis peptídeos cíclicos em sua composição, na faixa estabelecida pela seta (Figura 25).

Figura 24 -Perfil cromatográfico da fração acetato (azul) e do extrato bruto sem a fração acetato (preto) de *J. ribifolia*.

Observações: Programa: 5 à 95 % de B em 30 minutos (B: ACN/0,036%TFA e A: H₂O/0,045%TFA), fluxo de 1,0 mL/min, coluna C18 Kromasil 5 μ m, 250 x 4,6 mm, e poro de 100Å.

Figura 25- Perfil cromatográfico das amostras Fr2-Fr8.

Observações: Programa: 5 à 95 % de B em 30 minutos (B: ACN/0,036%TFA e A: H₂O/0,045%TFA), fluxo de 1,0 mL/min, $\lambda = 220$, coluna C18 Kromasil 5 μm , 250 x 4,6 mm, e poro de 100Å.

Foi feita a reunião das frações Fr6-Fr7 promissoras nesta avaliação, sendo reunidas e encaminhadas para purificação. Optou-se por não reunir a fração 8, devido a sua pouca massa.

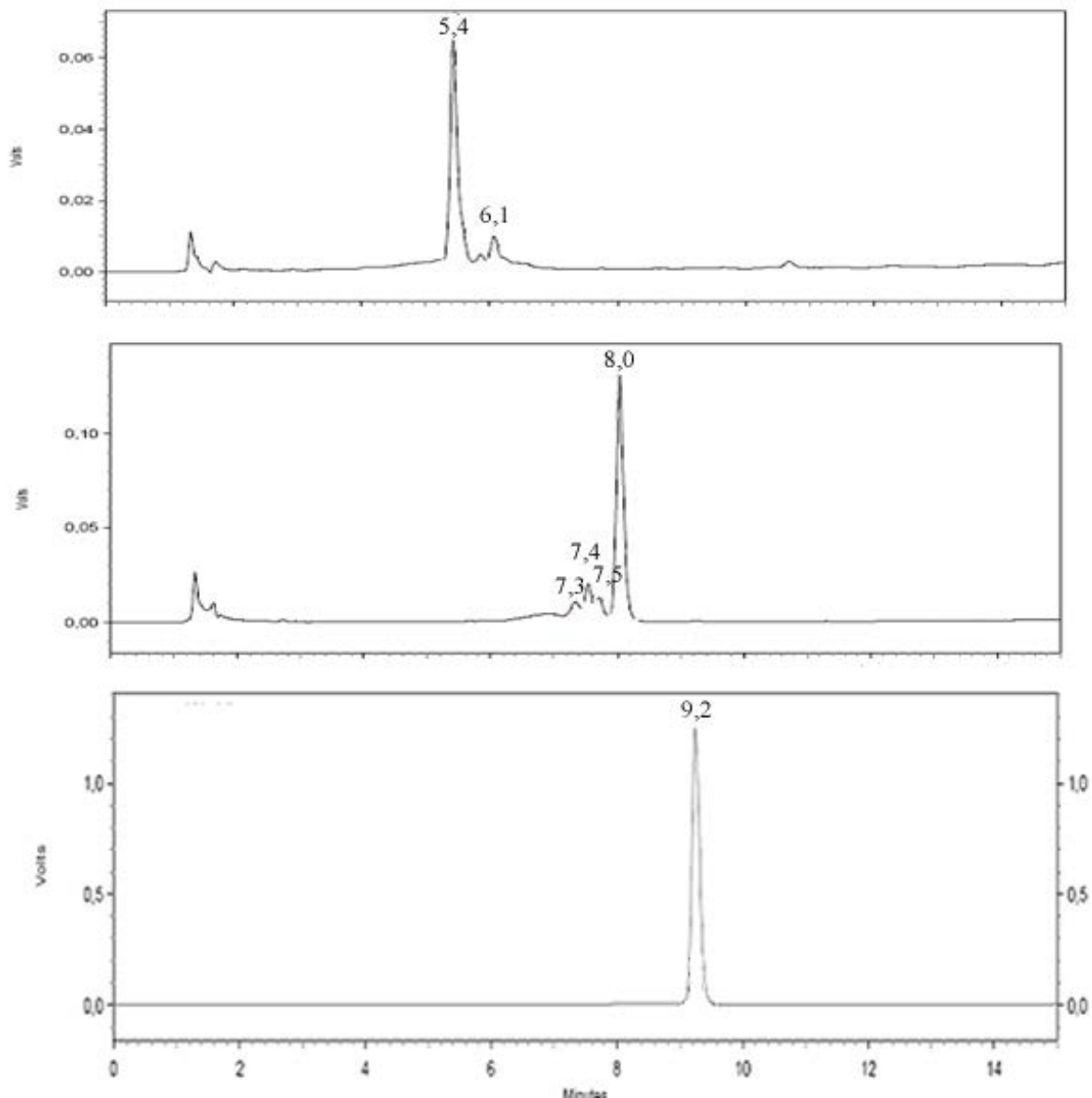
5.2.1. HPLC SEMI-PREPARATIVO FRAÇÕES FR6-FR7

A purificação dos analitos foi realizada num equipamento HPLC preparativo (System Gold BECKMAN), com detector UV-VIS em comprimento de onda de 220nm e coluna de fase reversa C₁₈ AXIA Packed LUNA, de dimensões 250 x 21,20mm, partículas de 5 µm de tamanho, com um programa de gradiente de 40 a 80% em 120 minutos e fluxo de 5 mL/min. Deste experimento obtivemos 128 tubos os quais foram reunidos de acordo com o perfil cromatográfico obtido em HPLC analítico (Tabela 9).

Tabela 9- Codificações e massas das frações obtidas por HPLC semi-preparativa.

Frações	Código	Massa
61	1A	0,2 mg
71 (61% de B)	1B	2,0 mg
81 (65% de B)	1C	0,4 mg
87-89 (67% de B)	1D	5,2 mg
90	1E	0,3 mg
95	1F	0,2 mg
96-97	1G	1,5 mg
98	1H	0,2 mg
100	1I	0,2 mg
123	1J	0,6 mg
124	1L	1,0 mg
128	1M	0,1 mg

Com base no tempo de eluição, três frações (1B, 1C e 1D) foram escolhidas para dar prosseguimento aos estudos de identificação. Essas amostras foram então liofilizadas e encaminhadas para experimentos de espectrometria de massas.

Figura 26- Perfil cromatográfico de 1B, 1C e 1D, Respectivamente.

Observações: Programa: 40-70% de B em 15 minutos (B: ACN/0,036%TFA e A: H₂O/0,045%TFA), fluxo de 1,0 mL/min, $\lambda=220$, coluna C18 Kromasil 5 μm , 250 x 4,6 mm, e poro de 100Å.

As amostras de 1B, 1C e 1D foram selecionadas, pois além de absorverem em comprimento de onda característico de ligações peptídicas, apresentavam um grau de pureza razoável (Figura 26).

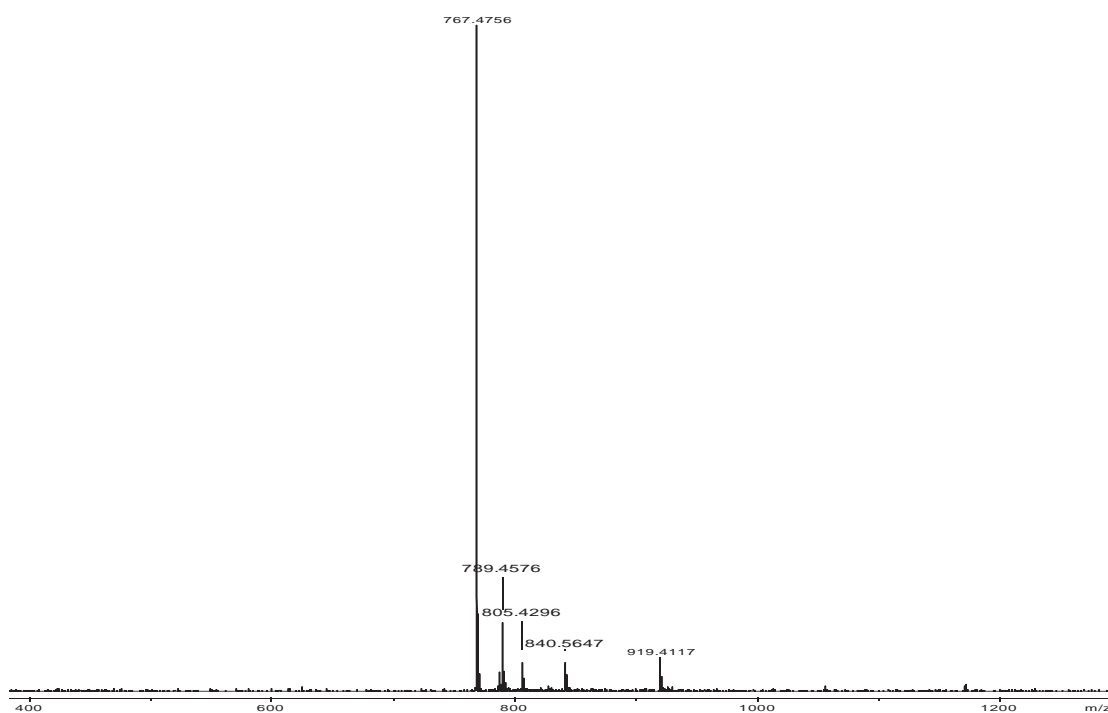
5.2.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A análise dos dados de espectrometria de massas foi realizada na Universidade de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto utilizando um espectrômetro MS UltrOTOF-Q (Brucker, Daltonics Billerica MA, USA). As amostras foram injetadas diretamente no sistema com um fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. O capilar foi aquecido a 250 $^{\circ}\text{C}$. O nitrogênio foi utilizado como gás de colisão e todos os experimentos foram realizados utilizando o modo positivo.

Peptídeos cíclicos isolados de plantas possuem massa molecular na faixa de 700g/mol, massas abaixo desse valor e padrões de fragmentação que não condizem com aminoácidos nos fizeram descartar a hipótese que as frações 1C e 1D continham peptídeos. Para termos convicção de que não se tratava de um peptídeo, optamos por fazer o teste de análise de aminoácidos dessas frações, o que comprovou a inexistência dos mesmos.

Porém análise da fração 1B apresentou massa molecular (M+H) 767,4756 g/mol (Figura 27) e fragmentações nas quais se observaram perdas de massas correspondentes a glicina e leucina ou isoleucina (Figura 28). Por ser uma estrutura cíclica, o anel poderá abrir em várias ligações entre os aminoácidos. Assim, a análise das do espectro MS/MS do peptídeos nos deu noção de composição, sendo o sequenciamento estabelecido com base nos dados de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, 2D.

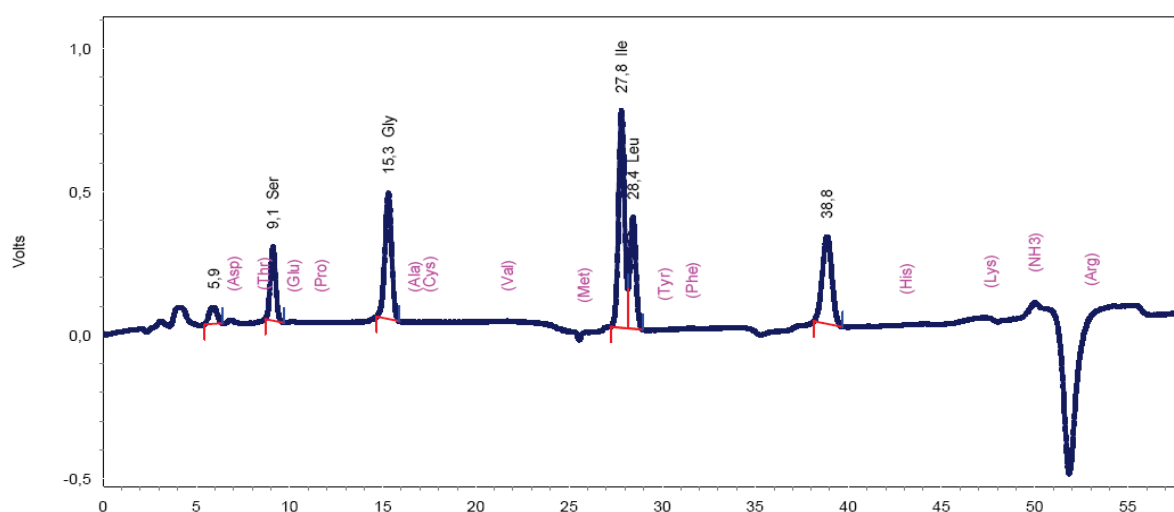
Figura 27- Espectro De Massas HR-MS/ESI da fração 1B, obtido em modo positivo.



5.2.3. ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos constituintes da amostra 1B foram hidrolisados com HCl 6 mol/L para romper as ligações peptídicas. O hidrolizado foi submetido à HPLC – troca iônica e derivatizado ao sair da coluna. O aminograma gerado através da quantificação dos picos, evidenciou 8 resíduos existentes na composição de 1B: 1 Ser, 2 Gly, 3 Ile e 2 Leu (Figura 29).

Figura 29 -Aminograma da fração 1B.



5.2.4. ELUCIDAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE 1B POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.

A amostra foi dissolvida em DMSO-*d*₆ (1 mg em 1,0 mL) submetida aos experimentos de RMN. Foram realizados os experimentos em 2D: TOCSY que revelou quais os hidrogênios presentes em cada aminoácido, NOESY que possibilitou a conexão dos aminoácidos observando a proximidade entre hidrogênios próximos, até 4 ligações e COSY em hidrogênios vicinais. Os dados foram plotados utilizando o *software* MestreNova.

O espectro de TOCSY evidenciou 8 correlações entre 7,3 e 8,7 referentes os hidrogênios α -amino e demais hidrogênios, inter-resíduos (Figura 30), sendo possível propor 3 aminoácidos (2 Gly e 1 Ser) e estabelecer que os demais se tratavam de leucina ou isoleucina. Esses puderam ser diferenciados na região de expansão do TOCSY (Figuras Figura 31 e Figura 32). Após a atribuição dos sinais a cada resíduo de aminoácido pertencente

ao peptídeo, foi realizado o seqüenciamento da cadeia peptídica pelo experimento de NOESY, no qual foi possível estabelecer os acoplamentos entre os hidrogênios NH- α H_{i-1} (Figura 33).

Figura 30 - Expansão do espectro de RMN TOCSY 2D, assinalando as correlações dos NH e H α dos aminoácidos.

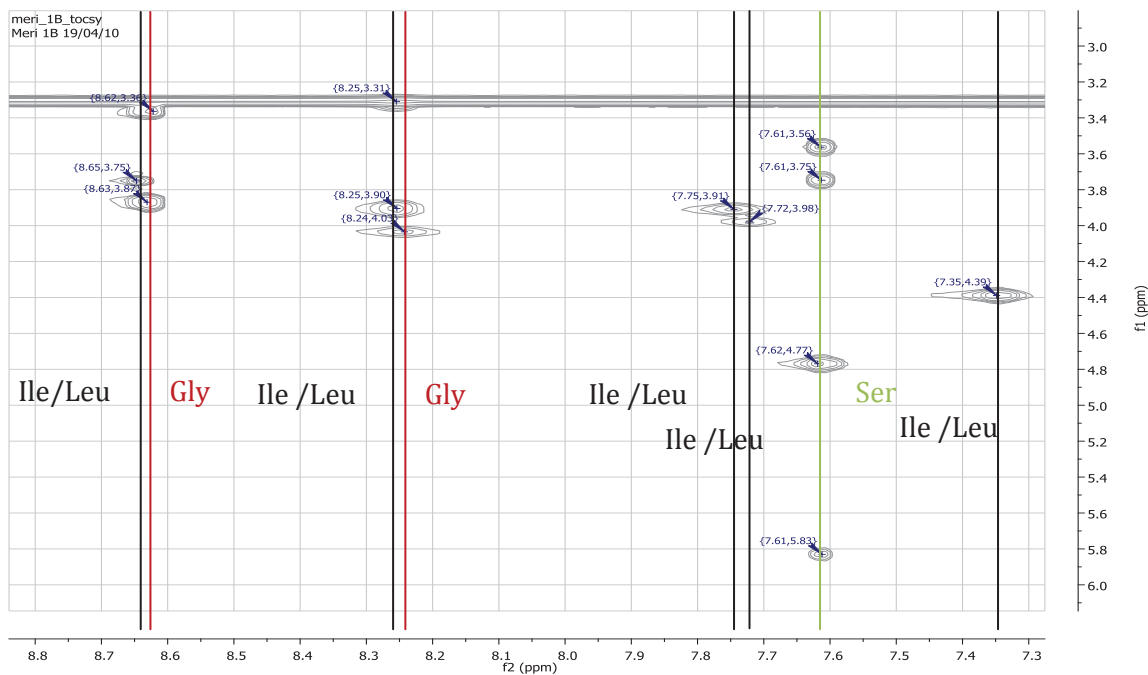


Figura 31- Expansão do espectro de RMN TOCSY 2D, na região de 5,1-3,3ppm.

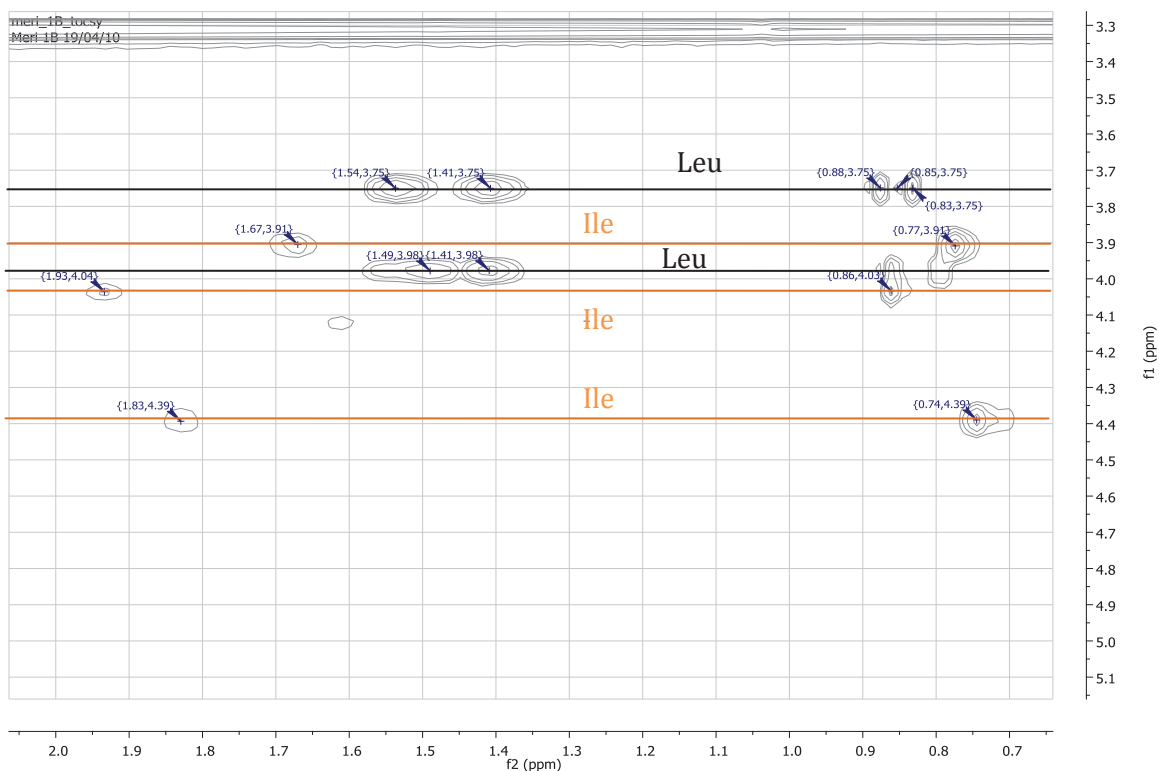


Figura 32 - Expansão do espectro de RMN TOCSY 2D, na região de 2,2-0,4 ppm.

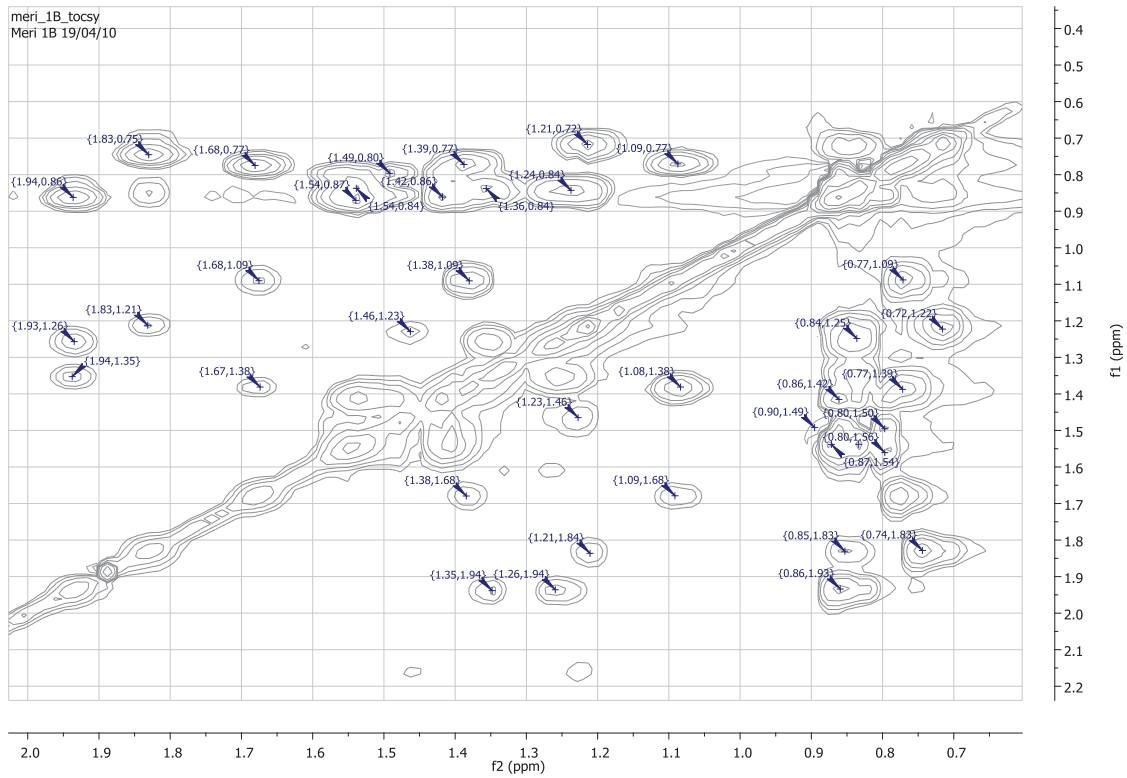
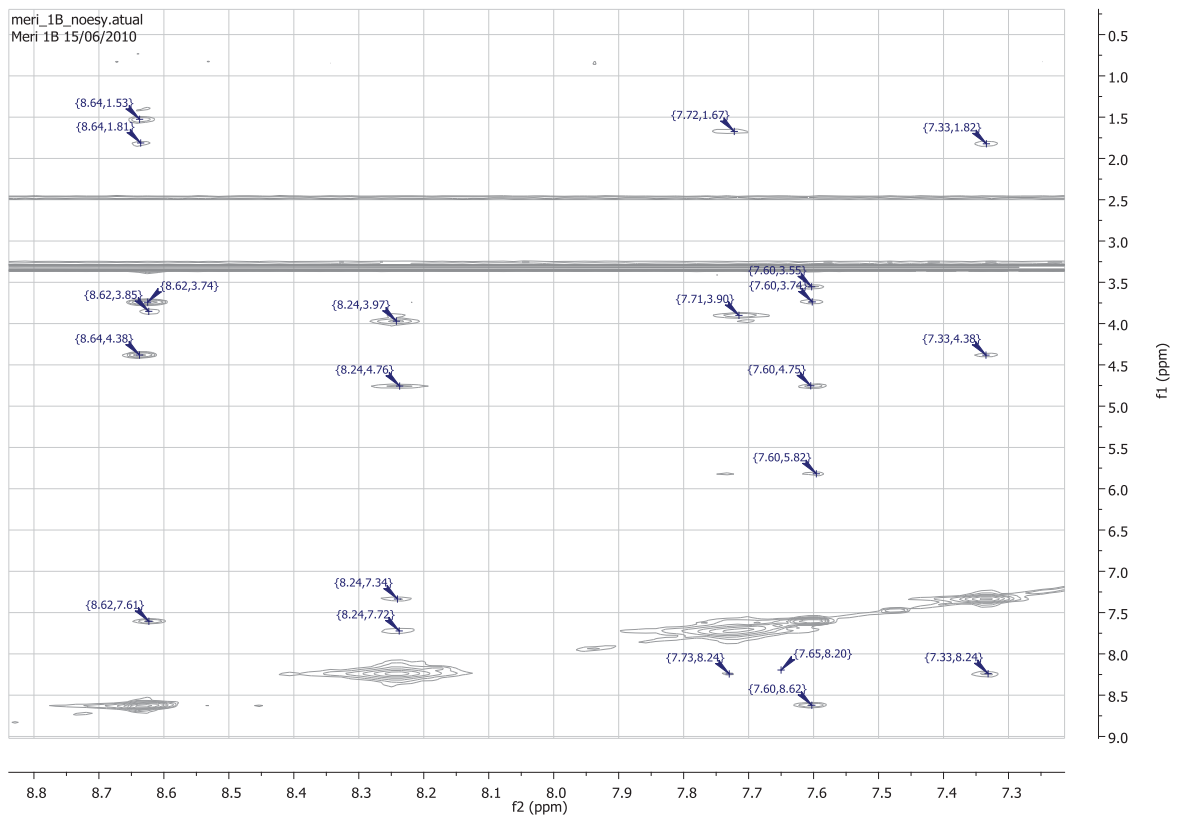
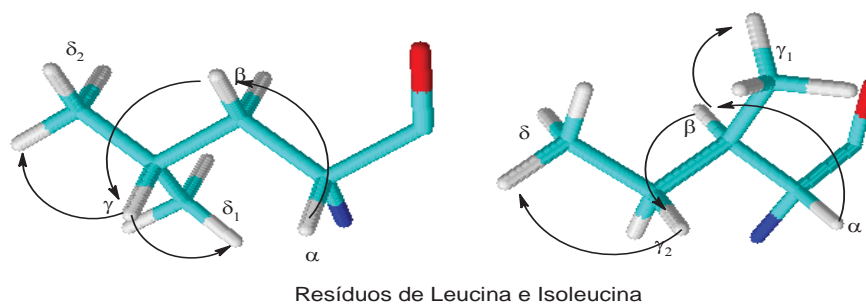


Figura 33- Expansão do espectro de NOESY 2D, mostrando as correlações entre hidrogênios NHi-NHi-1 e NHi-Hai-1.



Um terceiro experimento realizado foi o COSY, no qual foi possível diferenciar os resíduos de leucina e isoleucina, pelos acoplamentos entre os hidrogênios γ metílicos e os hidrogênios β , exemplificados na Figura 34.

Figura 34 - Resíduos dos aminoácidos mostrando os diferentes acoplamentos visualizados no espectro de COSY.



Por meio da análise dos espectros foi possível assinalar os hidrogênios de todos os resíduos de aminoácidos presentes no peptídeo existente na fração 1B (Tabela 10).

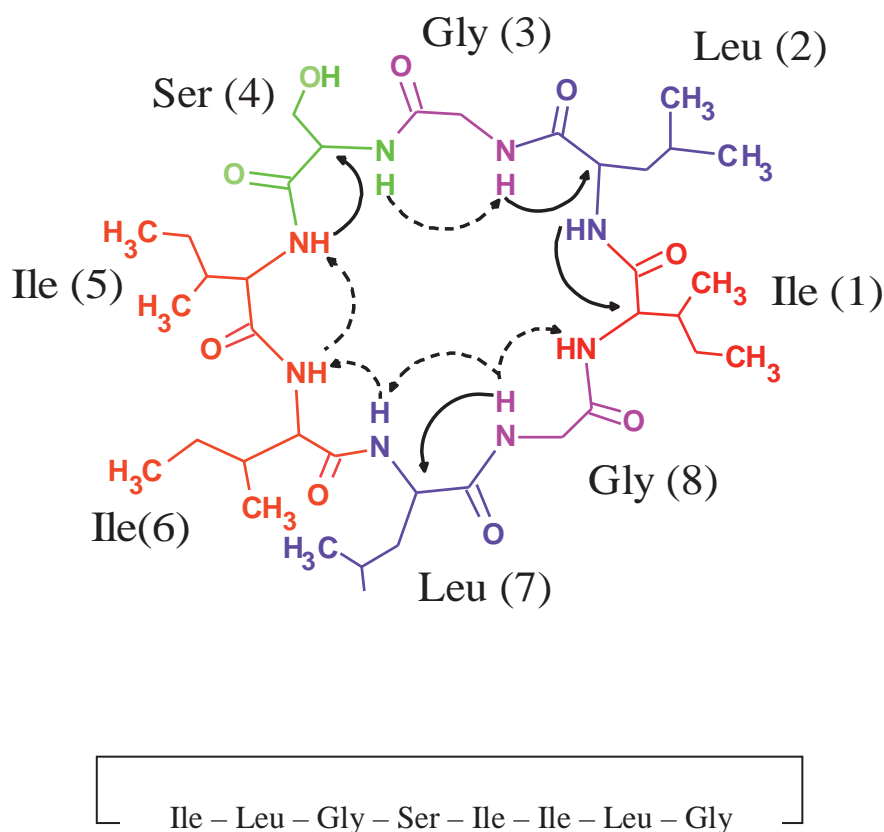
Tabela 10 -Dados do espectro de RMN ^1H , DMSO- d_6 , 500MHz.

Resíduo	H	δH	Resíduo	H	δH
Ile₁	NH	7,34	Leu₂	NH	8,65
	α	4,39		α	3,75
	β	1,84		β	1,54
	γ_1	0,85		γ	1,41
	γ_2	1,22		δ	0,79; 0,85
Gly₃	NH	8,63	Ser₄	NH	7,60
	α_1	3,87		α	4,77
	α_2	3,36		β	3,56; 3,75
		OH		5,83	
Ile₅	NH	8,23	Ile₆	NH	7,74
	α	4,03		α	3,91
	β	1,94		β	1,68
	γ_1	0,87		γ_1	1,38
	γ_2	1,25;1,36		γ_2	1,09
	δ	0,86		δ	0,78
Leu₇	NH	7,71	Gly₈	NH	8,24
	α	3,98		α_1	3,90
	β	1,42		α_2	3,32
	γ	1,49			
	δ_1	0,79			
	δ_2	0,86			

Congregando os dados de análise de aminoácidos, EM e RMN bidimensional foi possível propor que a estrutura do peptídeo isolado das partes aéreas de *Jatropha ribifolia* possui uma sequência peptídica ainda não descrita na literatura. A essa estrutura foi dada o nome de ribifolina (Figura 35).

Devido a reduzida quantidade de massa do peptídeo isolado o espectro de carbono e algumas correlações não foram evidenciadas nos experimentos em 2D. Complementarmente, sua síntese foi o recurso utilizado para comprovar a estrutura inédita proposta. Seguindo o protocolo usual, a reação em fase sólida foi obtida, objetivando uma maior massa da substância para os testes de atividade biológica.

Figura 35- Ribifolina, um novo peptídeo da *Jatropha ribifolia*.

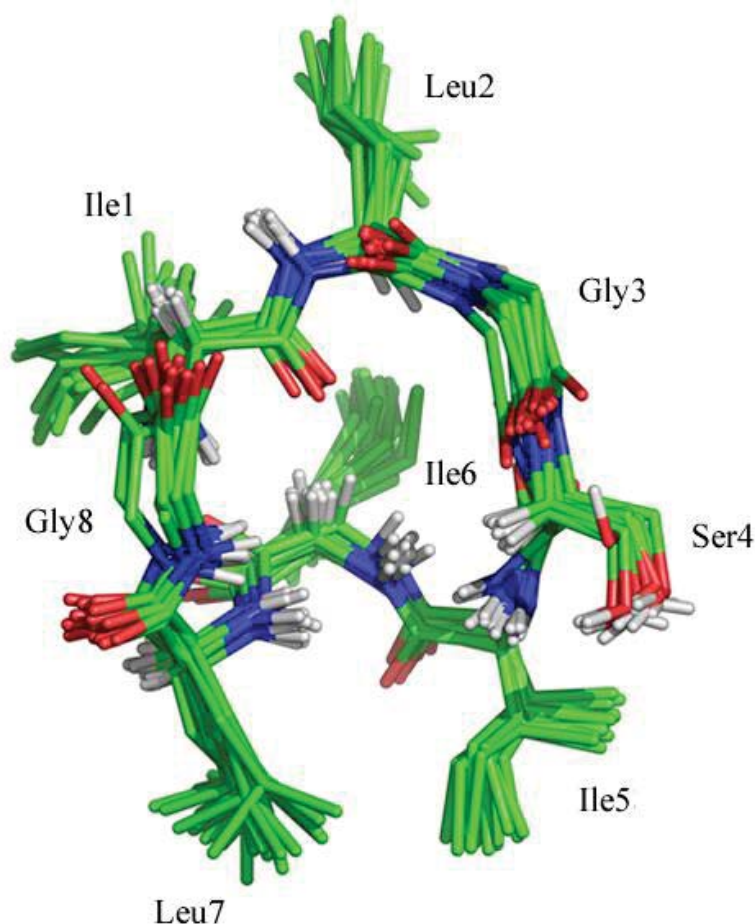


Obs: setas tracejadas referem-se à correlações NH-NH e setas cheias, referentes à correlações NH-H α .

5.2.5. DINÂMICA MOLECULAR (SIMULATED ANNEALING MOLECULAR DYNAMICS)

Análise de simulações de dinâmica molecular de ribifolina permitiu a geração de modelos multi-confômeros que puderam representar o movimento molecular e discreta desordem para a conformação da molécula. Neste sentido, a dinâmica estrutural de ribifolina em coerência com os dados NOESY, os quais descrevem as distâncias entre os prótons, pode ser obtida. O *cluster* majoritário formado, após a análise DM/SA possibilitou inferir que ribifolina apresenta uma estrutura assumindo uma forma de anel torcida. Além disso, todas as cadeias laterais de resíduos de aminoácidos são dirigidas para o exterior e confirmam os dados das medições de NOESY as quais demonstram que a maior parte dos átomos de hidrogênio está direcionada para o centro do peptídeo cíclico (Figura 36).

Figura 36– Confômeros obtidos por SA/MD de ribifolina.



5.3. SÍNTESE EM FASE SÓLIDA DE RIBIFOLINA.

Foi realizada a síntese de uma cadeia linear análoga à elucidada: **ILGSILG**

Utilizou-se a resina do tipo Fmoc-Gly-Wang, com grau de substituição de 0,55 mmol/g, o que significa que em 1 g de resina pesada haveria 421 mg de aminoácido/ peptídeo ligado. Entretanto, optamos por uma escala de 0,4 mmol/g, prevendo a obtenção de cerca de 100 mg, uma vez que o rendimento das sínteses de peptídeos cíclicos estão por volta de 30%:

$$0,40 \text{ mmol} \times 766 \text{ (massa molar do peptídeo)} = 306,4 \text{ mg} \text{ } \underline{\hspace{1cm}} \text{ } 30\% \sim 92 \text{ mg}$$

Para definir quanto da resina usar, foi realizado o simples cálculo:

$$\begin{array}{r} 0,55 \text{ mmol} \text{ } \underline{\hspace{1cm}} \text{ } 1 \text{ g} \\ 0,40 \text{ mmol} \text{ } \underline{\hspace{1cm}} \text{ } X \\ X = 0,7272 \text{ g (resina)} \end{array}$$

Determinada a quantidade de resina e a escala a ser usada, a quantidade de aminoácidos foi calculada em 0,8 mmol, visto que foi usado o excesso de aminoácidos de 2 vezes.

Definido quanto usar de cada reagente, a síntese foi realizada de acordo com a Figura 37. Ao término da síntese da cadeia linear, o suporte sólido foi separado do peptídeo por meio de clivagem ácida, utilizando-se o ácido trifluoroacético (TFA), que cliva simultaneamente a resina e os protetores das cadeias laterais. A massa do peptídeo linear obtido foi de 283 mg, que corresponde a um rendimento de 92%.

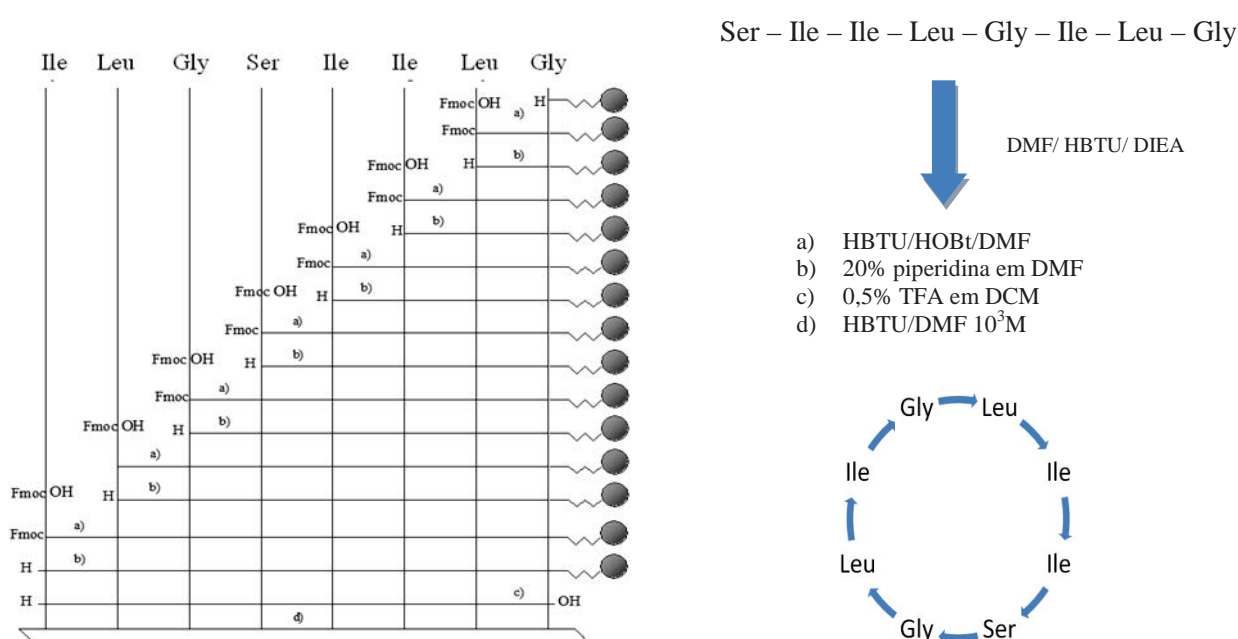
Após a obtenção do peptídeo linear, seguiu-se a etapa de ciclização da cadeia. Para auxiliar na reação, foram adicionados agentes de acoplamento em excesso. Somado a isto, foi utilizada uma solução bastante diluída. A diluição do meio reacional é importante para que a ciclização cabeça cauda seja a predominante, evitando que ocorram reações colaterais, por meio da formação de dímeros, trímeros, etc.

O peptídeo linear (150 mg) foi solubilizado em DMF formando uma solução de 0,001 mol/L, e posteriormente adicionado uma solução contendo os agentes acoplantes HOBt, HBTU e DIEA. Durante o tempo de reação (2 h) o pH foi monitorado e mantido por volta de 9,0, pois o HBTU é mais ativo em pH ligeiramente básico.

Ao término da reação, a solução foi transferida para um funil de separação e solubilizada 300 mL de AcOEt e 400 mL de água para particionamento. Após a primeira extração, fez-se cinco consecutivas extrações da fase orgânica utilizando-se 200 mL de água cada. Por fim, a fração AcOEt foi então concentrada e posteriormente purificada. Todo ciclo de síntese de ribifolina está descrito na Figura 37.

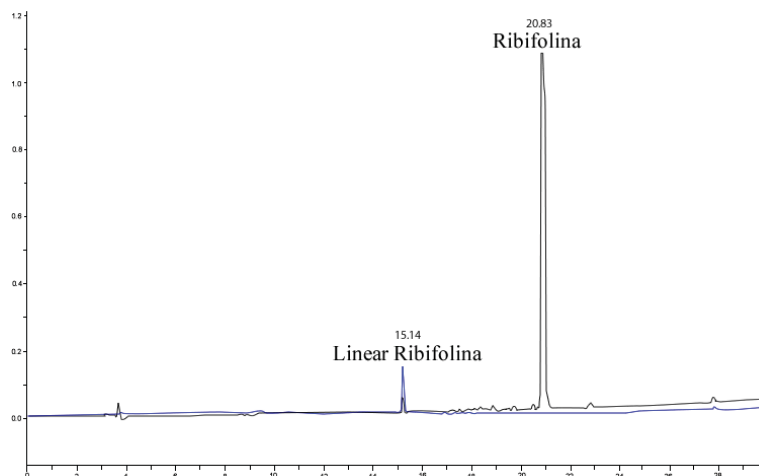
A massa de peptídeo cíclico bruto obtida foi de 106,1 mg, o que corresponde a 71% de rendimento da reação.

Figura 37- Síntese da cadeia linear do peptídeo e ciclização da cadeia.



A Figura 38 mostra a comparação do perfil cromatográfico dos peptídeos linear e cíclico obtidos. Pode-se observar que houve um aumento no tempo de retenção do peptídeo cíclico em relação ao linear, o que era de se esperar, pois neste caso, a ciclização diminui a polaridade do peptídeo, fazendo com que haja maior afinidade da estrutura com a fase estacionária - C18.

Figura 38 - Cromatograma dos peptídeos sintéticos ribifolina (preto) e seu análogo linear (azul).

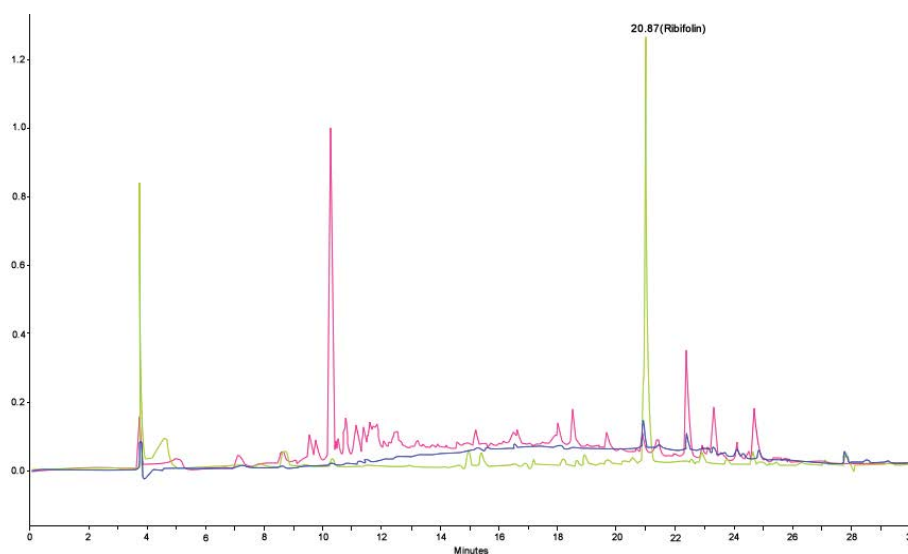


Coluna KROMASIL (250 × 4,6 mm), H₂O/0,045% TFA (solvente A) e ACN/0,036% TFA (solvente B). Gradiente linear (5 95% em 30 min), fluxo 1 mL/min e detecção em 220 nm.

Buscando comparar os perfil, os cromatogramas da fase acetato de etila de *J. ribifolia* (rosa) e o peptídeo natural isolado (azul) e o peptídeo cíclico sintetizado (rosa), demonstram claramente que todos eles possuem o mesmo tempo de retenção em 20,8 min (Figura 39). Com base nos dados de tempo de retenção obtido, somado a semelhança dos espectros de RMN, é possível afirmar que eles são o mesmo material (ver adendo).

Desta forma, o peptídeo sintético foi utilizado para os testes biológicos posteriores.

Figura 39 - Cromatograma da fração acetato (azul) e ribifolina natural (preto).



Coluna KROMASIL (250 × 4,6 mm), H₂O/0,045% TFA (solvente A) e ACN/0,036% TFA (solvente B). Gradiente linear (5 95% em 30 min), fluxo 1 mL/min e detecção em 220 nm.

5.4. IDENTIFICAÇÃO DO DITERPENO JATROFONA EM *JATROPHA RIBIFOLIA*

A substância codificada como SIOH 22 foi isolada na forma de um óleo esverdeado, 10,6 mg. Analisando o espectro de RMN ^{13}C - DEPT e APT (125 MHz, CDCl_3) (Figura 43) foi possível observar a presença de 20 sinais. Destes, oito foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, cinco a carbonos metínicos, dois a carbonos metilênicos e cinco a carbonos metílicos. O assinalamento dos carbonos em δ_{C} 42,4, 42,2 (CH_2) são característicos de esqueleto carbônico de diterpenos. Os sinais em δ_{C} 99,7 (C), 112,3, (C), 183,1 (C), 203,7 (C), e são característicos de anel diidrofuranona (TAYLOR et al., 1983), e os sinais em δ_{C} 42,4, 38,3, 123,7 e 137,1 referente à anel ciclopenteno.

No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) possível observar dois sinais em δ_{H} 6,38 (d, $J= 16\text{Hz}$) e 5,93 (d, $J= 16\text{Hz}$), característico de prótons olefínicos na conformação *trans* (Figura 41). Cinco sinais referentes a metilas sendo eles 1,67 (s), 1,02 (d, $J= 7\text{Hz}$), 1,80 (d, $J= 4\text{Hz}$), 1,16 (s) e 1,28 (s) (Figura 42) e, ainda, um sinal em 5,73 (m) e 5,74 (m) (Figura 40) integração para um hidrogênio cada, característicos de hidrogênios olefínicos de sistemas conjugados e vizinhos à metilas. Somando os dados experimentos obtidos e a comparação destes com os dados da literatura (Tabela 11), permitiu-se concluir que SIOH-22 tratava-se de um diterpeno chamado jatrofona, já descrito na literatura para o gênero *Jatropha*.

Tabela 11- Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) 1D SIOH-22 em CDCl_3 em comparação com dados da literatura.

C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}^* (Goulart et al., 1993)
1	42,4	1,70 (dd) 2,08 (dd)	41,8
2	38,3	2,85 (m)	37,7
3	147,0	5,73 (m)	146,3
4	137,1	-----	137,7
5	123,7	5,74 (m)	123,0
6	141,7	-----	141,3
7	201,8	-----	201,2
8	128,7	5,93 (d, $J=16\text{Hz}$)	128,1

9	158,7	6,38 (d, $J=16\text{Hz}$)	158,6
10	36,5	-----	36,1
11	41,2	2,79 (d, $J=15\text{Hz}$) 2,34 (d, $J=15\text{Hz}$)	40,6
12	183,1	-----	182,9
13	112,3	-----	111,8
14	203,7	-----	203,2
15	99,7	-----	99,1
16	18,9	1,02 (d, $J=7\text{Hz}$)	18,6
17	20,6	1,80 (s)	20,60
18	30,3	1,16 (s)	29,88
19	26,8	1,28 (s)	26,42
20	6,04	1,66 (s)	5,62

*Dados de ^{13}C (50,3 MHz), solvente CDCl_3 .

Figura 40- Espectro de RMN ^1H obtido em 500 MHz, CDCl_3 . Em destaque, expansão na região de 6,5-5,5ppm.

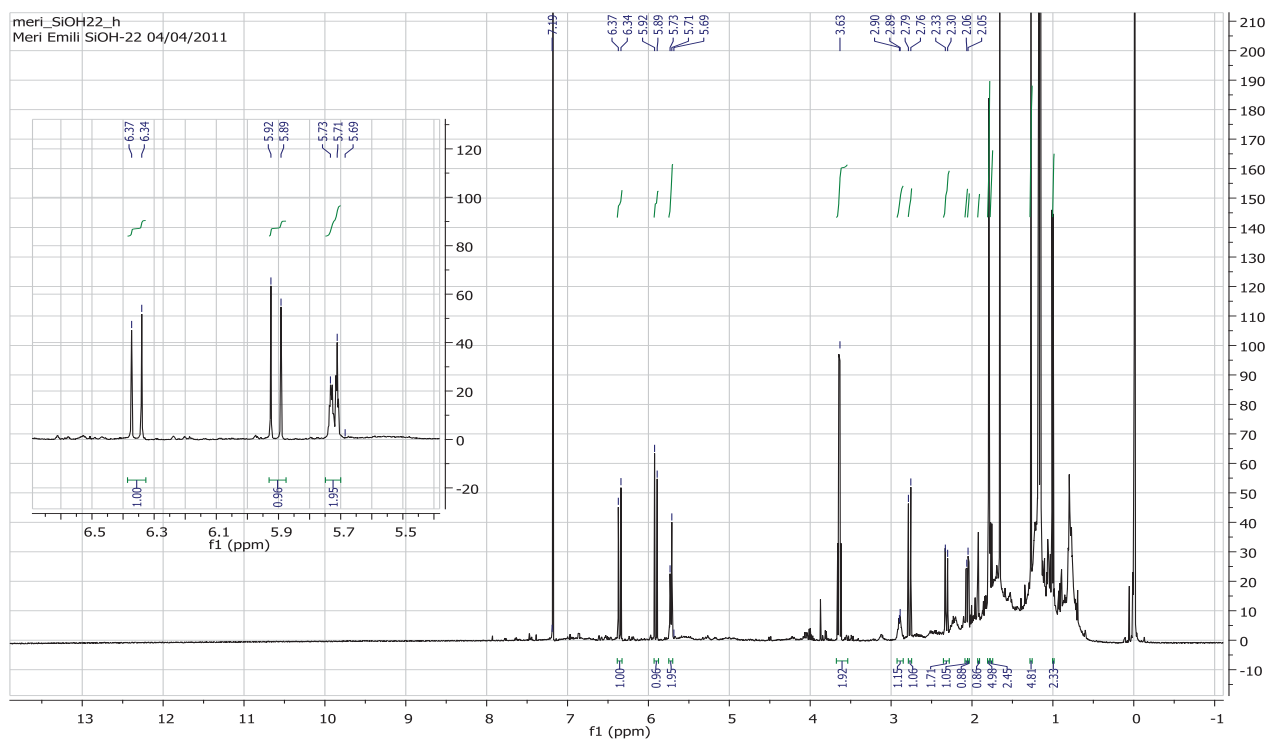


Figura 41 - Expansão do espectro de RMN ^1H obtido em 500 MHz, CDCl_3 na região de 3,1-1,7 ppm.

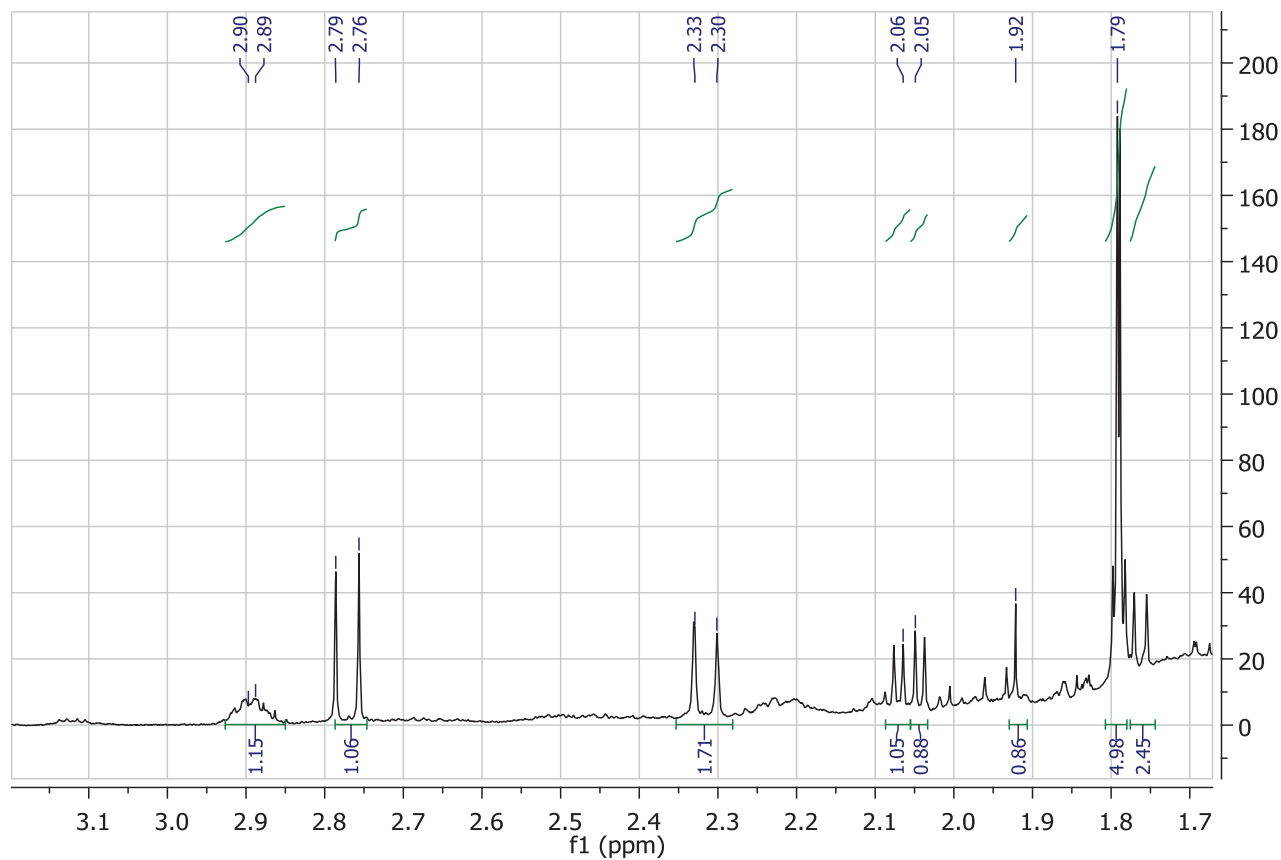


Figura 42- Expansão do espectro de RMN ^1H obtido em 500 MHz, CDCl_3 na região de 1,9-0,7 ppm.

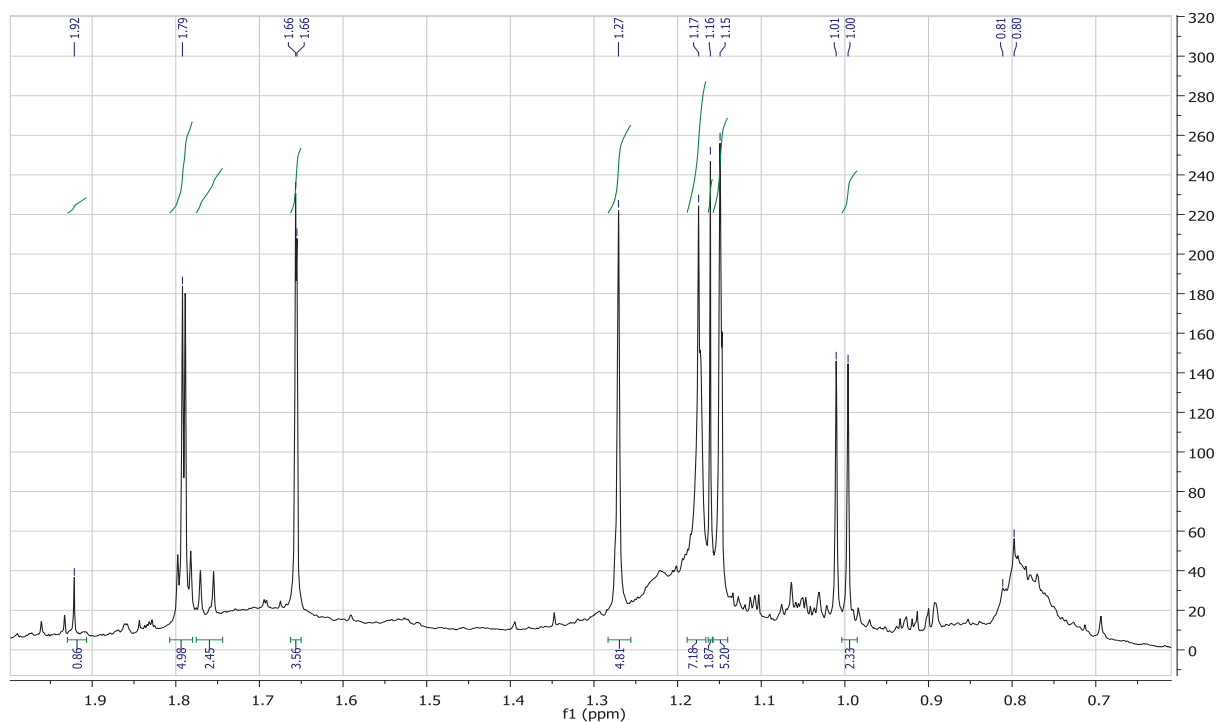
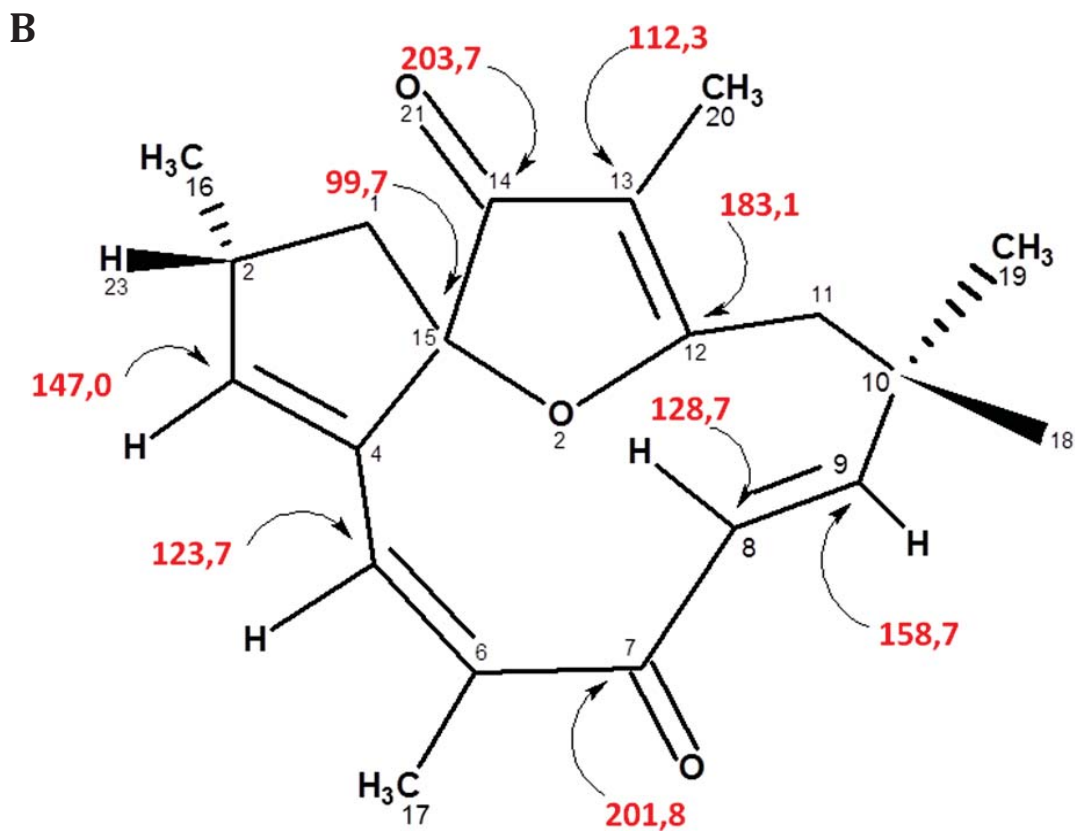
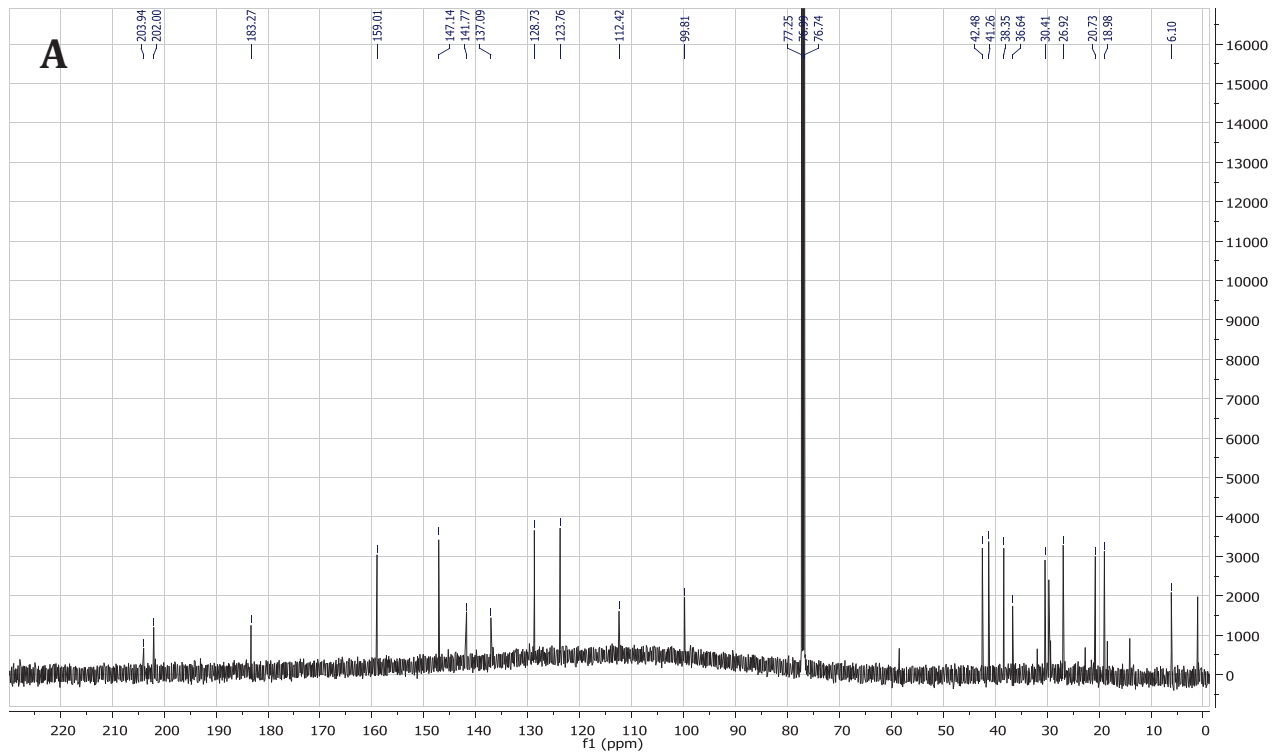


Figura 43- a) Espectro de RMN ^{13}C obtido em 125 MHz, b) diterpeno com assinalamentos.

5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada através da determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) pela técnica de microdiluição com adaptações, de acordo com os documentos M27-A e M27-A2 do CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institutes* (antigo NCCLS). O teste consistiu em examinar o quanto os compostos eram capazes de inibir os fungos do *Candida* (5 cepas) e *Cryptococcus* (1 cepa) para as frações EEB sem a fase acetato, Fração acetato, peptídeo cíclico e peptídeo linear.

Os resultados foram negativos para os peptídeos, pois a concentração inibitória mínima é alta quando comparada à substâncias comerciais, como por exemplo o fluconazol (de 0,5µg/mL a 15,9µg/mL). Entretanto, a fração acetato mostrou-se ativa nos fungos sendo interessante uma investigação mais acurada dos compostos responsáveis por essa atividade na fração (Tabela 12).

Tabela 12 -Valores de CIM* para as amostras testadas contra diferentes espécies de fungos.

AMOSTRAS	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida tropicais</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
EEB sem AcOEt	62,5	31,25	7,8	1,95	>250	31,25
Fr ACOEt	7,8	15,5	7,8	1,95	62,5	15,8
Peptídeo cíclico	250	>250	>250	>250	>250	125
Peptídeo linear	250	>250	>250	>250	>250	125

5.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

Em colaboração com o Laboratório Nacional de Oncologia Experimental foi possível a realização do teste de citotoxicidade para ribifolina e seu análogo linear. O estudo citotóxico pelo método de MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996). Assim, nosso objetivo foi realizar um *screening* inicial para determinação do potencial citotóxico e antitumoral de duas amostras (peptídeo cíclico e linear). Para tanto foram utilizadas 3 linhagens de células tumorais cultivadas: MDA-MB-435 (mama - humano), HCT-8 (cólon - humano) e SF-295 (glioblastoma – humano).

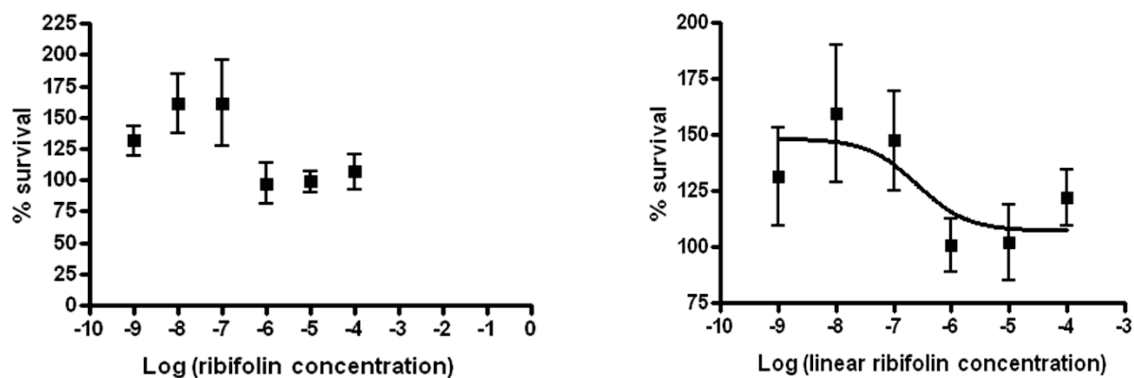
Após a preparação das placas conforme o item 4.10, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 595nm. Foram consideradas ativas as amostras que apresentarem valores de inibição $\geq 75\%$ em pelo menos duas linhagens tumorais são consideradas ativas, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral, o que não pode ser observado para as amostras peptídicas testadas. Os experimentos foram analisados segundo porcentagem de inibição do crescimento celular (GI), média \pm desvio padrão da média (SD) através do programa *GraphPad Prism*, resultando nos dados da tabela 13. Analisando os dados, infere-se que nem ribifolina nem linear ribifolina foram consideradas ativas ao teste.

Os testes de citotoxicidade para células HEK 293T também foram negativos para ambos os compostos (Figura 44).

Tabela 13- Porcentagem de inibição do crescimento celular (GI) e a média \pm desvio padrão da média (SD) das amostras.

Amostra		HCT-8		MDAMB-435		SF-295	
Nº	Identificação	GI% (média)	SD	GI% (média)	GI% (média)	SD	SD
1	Linear ribifolina	24,35%	6,87%	8,93%	36,10%	4,92%	
2	Ribifolina	39,41%	2,79%	11,54%	33,51%	0,00%	

Figura 44 - Porcentagem de inibição do crescimento celular de ribifolina e linear ribifolin para células HEX 293T. O *prism graph software* foi usado para as análises estatísticas.



5.7. AVALIAÇÃO ANTIMALÁRICA

Alguns orbitódeos de *Jatropha* apresentam de moderada à forte atividade antimalárica (SABANDAR et al., 2013), daí a importância da sua investigação nessa espécie.

Os testes foram realizados segundo item 4.11 sendo que após as análises dos dados, ribifolina ($IC_{50} = 41.92 \mu M$) apresentou-se moderadamente efetivo contra o *Plasmodium falciparum* 3D7, e seu correspondente linear ($IC_{50} = 519 \mu M$) demonstrou um fraco efeito em inibir a sobrevivência do parasita (Figura 45). A ciclização em peptídeos é responsável por minimizar a liberdade de conformação o que proporciona, no geral, uma maior afinidade pelo receptor e redução dos efeitos entrópicos desfavoráveis e, conseqüentemente, atividade biológica melhorada.

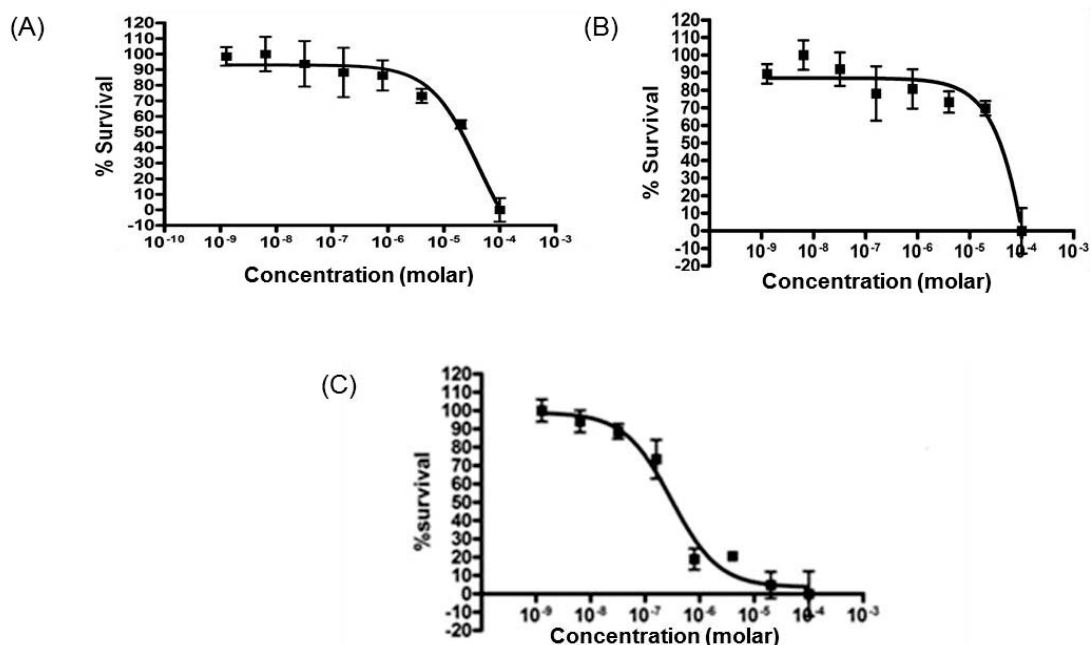
É interessante ressaltar que ribifolina apresentou maior atividade antimalárica que o nonapeptídeo curcaciclina B ($IC_{50} = 10 mM$) que possui similar estrutura, porém com apenas dois resíduos de diferenciação: prolina 4 and leucina 6 (Tabela 14). Podemos supor que o resíduo prolina adicional em curcaciclina B é prejudicial para a atividade antimalárica, em comparação com ribifolina 200 vezes mais ativa. De acordo com Auvin et al. (1997), a prolina de curcaciclina B está na configuração trans, e isto pode conduzir a diferentes dinâmicas estruturais em relação a ribifolina. Contudo, podemos afirmar que a adição de prolina na estrutura de ribifolina tem uma maior influência sobre a perda de atividade

antimalárica do que propriamente a abertura do anel, considerando que linear ribifolina é ~ 19 vezes mais ativo do que curcaciclina B.

Tabela 14- Orbitídeos isolados de espécies de *Jatropha* e suas atividades antimaláricas.

Espécies	Compostos	Sequências (Ciclo)	Atividade antimalárica (IC ₅₀ , [μM])	Referências
<i>J. ribifolia</i>	Ribifolina	--IILGILGS	42	
<i>J. curcas</i>	curcaciclina B	-PILLGILGS	10000	(AUVIN et al. 1997, 1999)
<i>J. chevalieri</i>	quevalierina A	-GIPILAIM-	9	(BARAGUEY et al. 1998)
<i>J. mahafalensis</i>	mahafaciclina A	-GTILGVF--	16	((BARAGUEY et al. 2000)
<i>J. mahafalensis</i>	mahafaciclina B	-GTFFGFF--	2	((BARAGUEY et al. 2001)
<i>J. pohliana</i>	pohlianina A	--YPLGVLL-	57	(AUVIN-GUETTE et al. 1999)
<i>J. pohliana</i>	pohlianina B	--YPLGLLL-	25	(AUVIN-GUETTE et al. 1999)
<i>J. pohliana</i>	pohlianina C	GGTIIIFGF--	16	(AUVIN-GUETTE et al. 1999)

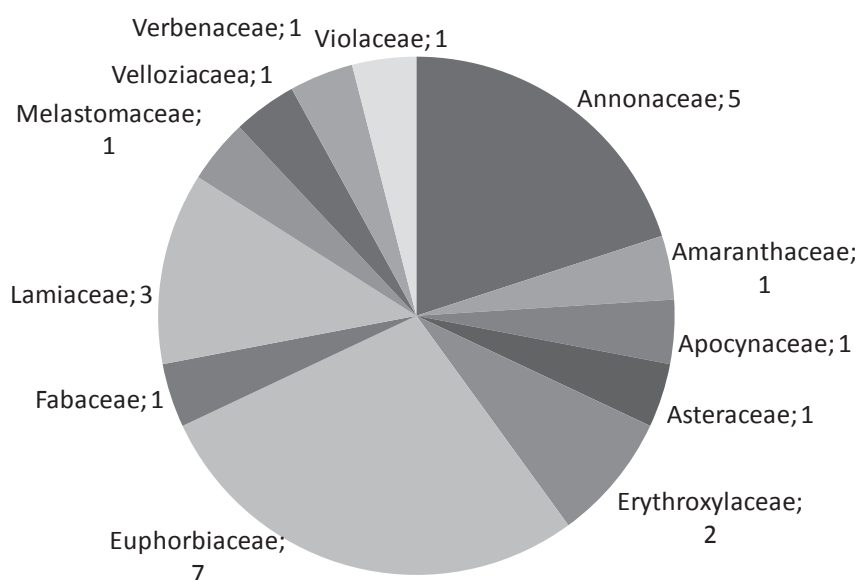
Figura 45 - Atividade antimalárica de ribifolina. Curva dose-resposta de (A) ribifolina, (B) linear ribifolina and (C) controle cloroquina. Os resultados são expressos em triplicata.



5.8. SCREEN DE CICLOTÍDEOS PARA O BANCO DE ESPÉCIES.

Nesse trabalho, também foi investigada a presença de peptídeos de 28 a 37 resíduos de aminoácidos contendo uma estrutura cíclica “*Cyclic cystine knot*” no banco de espécies (Tabela 6). A investigação foi realizada em várias espécies e suas famílias são demonstradas no gráfico (Figura 46).

Figura 46– Distribuição dos extratos e famílias botânicas investigadas.



Foram 31 extratos avaliados, pertencente a 24 espécies os quais passaram, inicialmente, por um teste de revelação preliminar para proteínas com G-250, resultados que já foram discutidos no item 5.1. Nesse tópico, foi possível determinar a presença desses compostos em um rápido *screening* através dos experimentos envolvendo espectrometria de massas (MALDI), os quais foram embasados nas análises de:

1. faixa de massa (2600-4000 Da) dos extratos C_{18} das espécies
2. Acréscimo de 348 Da à massa molecular de cada íon após as reações de redução e acetamidação (Figura 47).

Os experimentos de massas tornaram-se um método de análise de preferência na identificação de peptídeos, porém sua aplicação dependerá da protonação desses, o que ocorre

preferencialmente em locais básicos (Lys, Arg e His) e nos resíduos N-terminais, estes ausentes em ciclótídeos. Contudo, o uso de MALDI produzindo íons com uma carga faz dessa análise uma forma simplificada de identificação. Importante citar que o material a ser usado para esse *screening* poderá ter sido originado do vegetal seco, fresco ou até mesmo já extraído com etanol, em quantidades pequenas, na ordem de miligramas. Entretanto é imprescindível a etapa de pré-purificação em C₁₈, conforme descrito em 4.11.1.

Na etapa 1 do *screening*, os extratos que apresentaram pico de íons na faixa estabelecida foram classificados e encaminhados, posteriormente às reações de redução e acetamidação.

Os *spots* dos 31 extratos correspondentes, elencados na tabela 6, foram então preparados e aplicados na placa de MALDI. As análises das faixas de massas permitiram identificar íons similares à ciclótídeos em *Evolvulus linarioides*, nos três órgãos de *Hybanthus calceolaria* (sementes, folhas e caules) e nos três órgãos de *Beta vulgaris* (bulbos, folhas e caules) conforme os espectros (contidos nas Figuras 48-54). Essa etapa é simples, porém já pode identificar, mesmo que preliminarmente, essas interessantes moléculas.

Evolvulus linarioides apresentou um espectro um tanto diferenciado com valores menores que os normais encontrados para peptídeos dessa classe, apesar disso, optou-se por seleccionar essa espécie e seguir com a confirmação das cisteínas através das reações.

Os picos promissores foram identificados e, seguiu-se com a análise das sequências. Para tal, um prévio tratamento foi necessário, uma vez que ciclótídeos são muito estáveis à fragmentação por MS/MS. Somado a isto, eles possuem uma estrutura cíclica, que torna a degradação de Edman inviável, pois o peptídeo não possui extremidade N-terminal.

Figura 47– Representação da redução e acetamidação das cisteínas nos ciclótídeos.



Assim, a redução e acetamidação dos resíduos de cisteína, fortes nucleofílos, nos permite conferir, se o pico em questão trata-se ou não de um ciclotídeo. Nesse contexto a etapa 2 do *screening* das três espécies selecionadas, foi aplicado de forma à reacionar o peptídeos nativos e checar suas massas após às reações. O acréscimo de 348, referentes acetamidação das 6 cisteínas, o pico seria selecionado como possível ciclotídeo.

Essa constatação não é conclusiva, uma vez que pode haver a presença de outros arranjos peptídicos contendo 6 ligações dissulfeto. A confirmação só será validada após a análise das disposições das cisteínas nos loops, que acontece após o completo sequenciamento.

Evolvulus linarioides apesar de passar na etapa 1, foi desconsiderada após as a etapa 2. Isto, porque o espectro do material reduzido não é condizente com ciclotídeos. *Hybanthus calceolaria* como previsto, apresentou uma grande diversidade de possíveis peptídeos cíclicos (CCK). As sementes, folhas e caules apresentaram especificidades em sua composição, sendo de fundamental importância entender quais os papéis de cada ciclotídeo nos diferentes órgãos. *Beta vulgaris*, surpreendentemente apresentou moléculas com redução para 6 e 8 cisteínas, estas últimas características de defensinas. Os estudos de ciclotídeos na família Amaranthaceae são inéditos, o que remete a importância da profunda investigação dessa espécie.

Selecionadas as duas espécies, *H. calceolaria* e *B. vulgaris*, seguiram os estudos de isolamento para realização do sequenciamento das mini-proteínas (ciclotídeos).

Figura 48 – Espectros de massas dos compostos nativos e alquilados de *Evolvulus linarioides*.

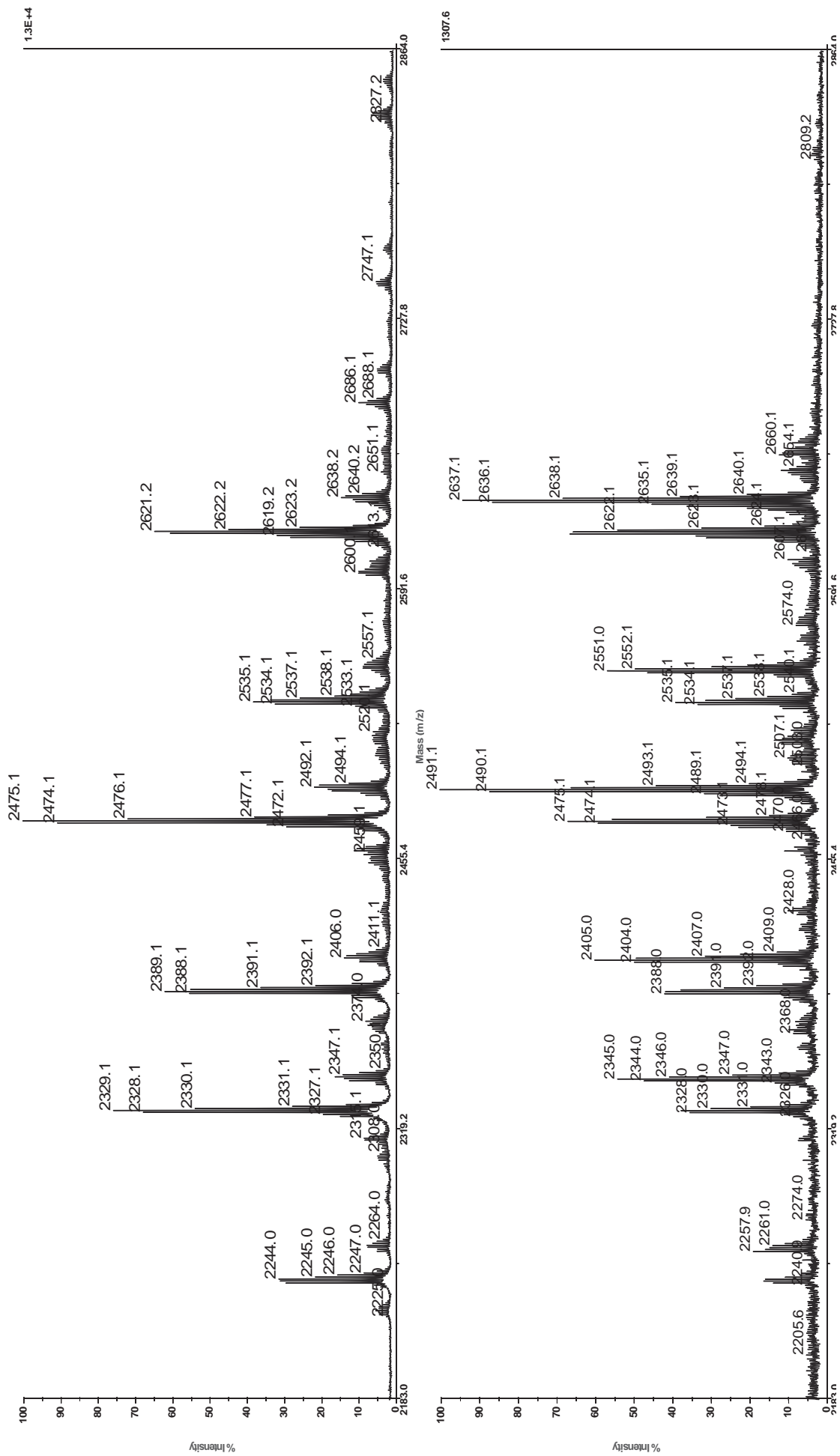


Figura 49 – Espectros de massas dos compostos nativos e alquilados de *Hybanthus calceolaria* (sementes).

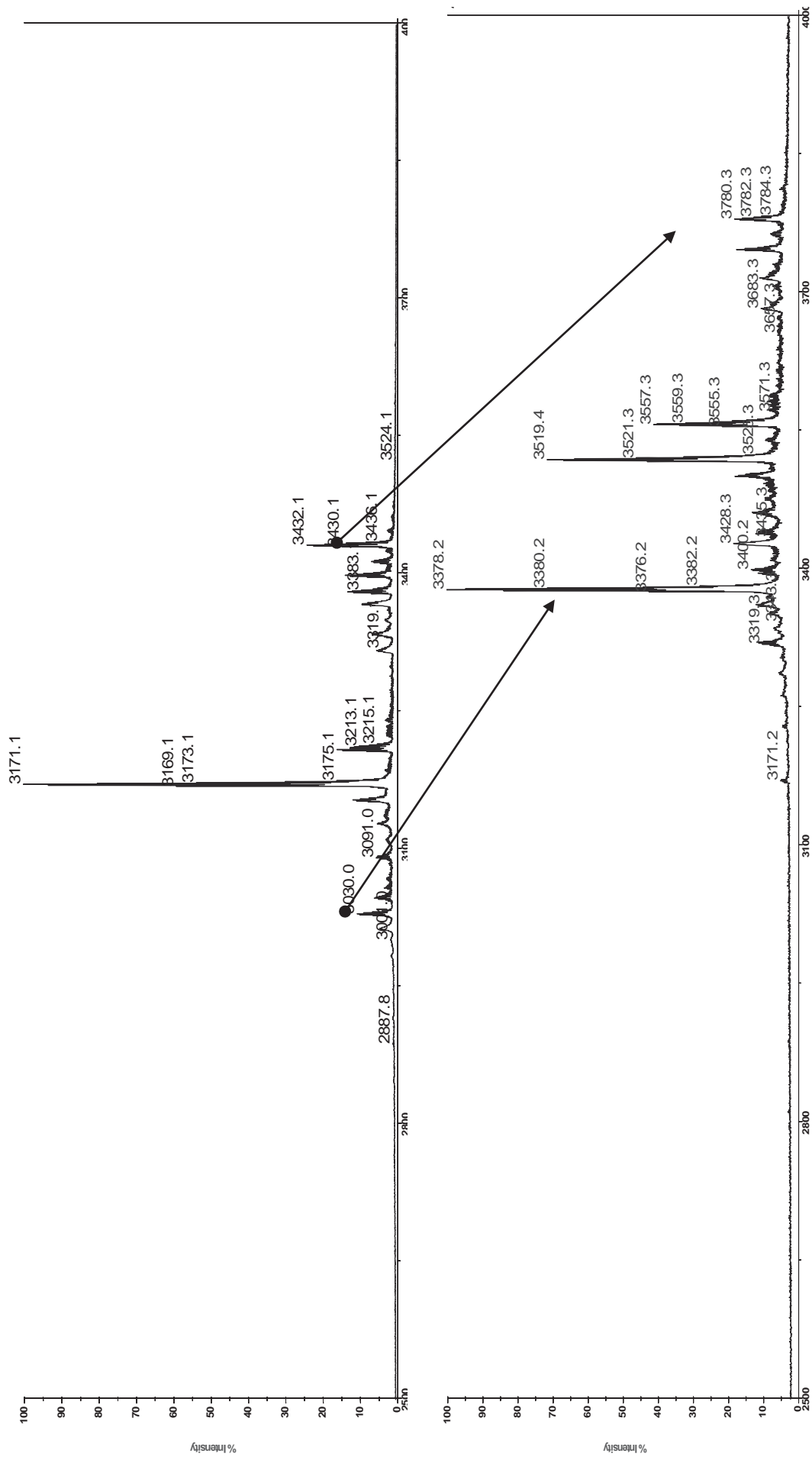


Figura 51– Espectros de massas dos compostos nativos e alquilados de *Hybanthus calceolaria* (caules).

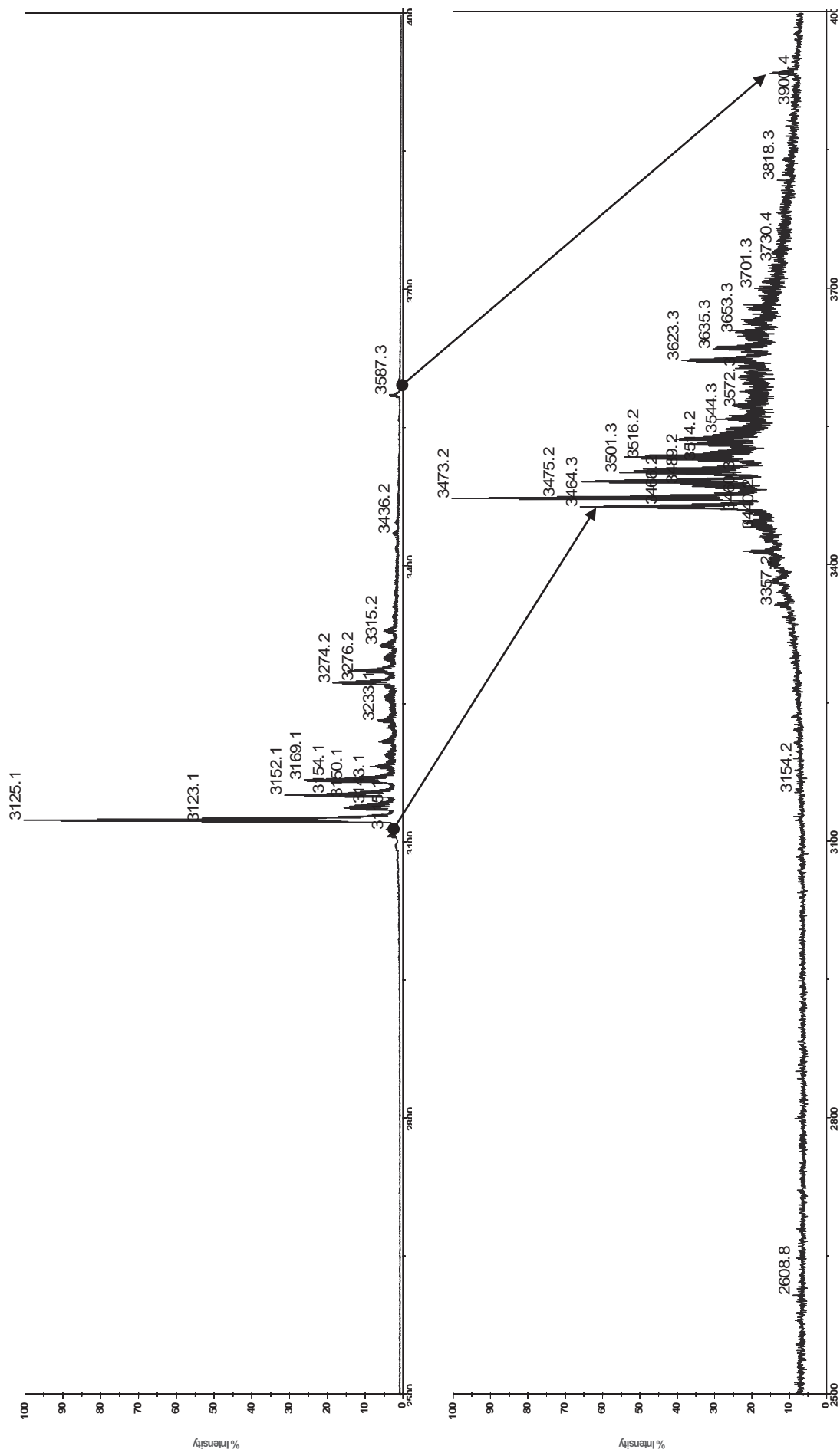
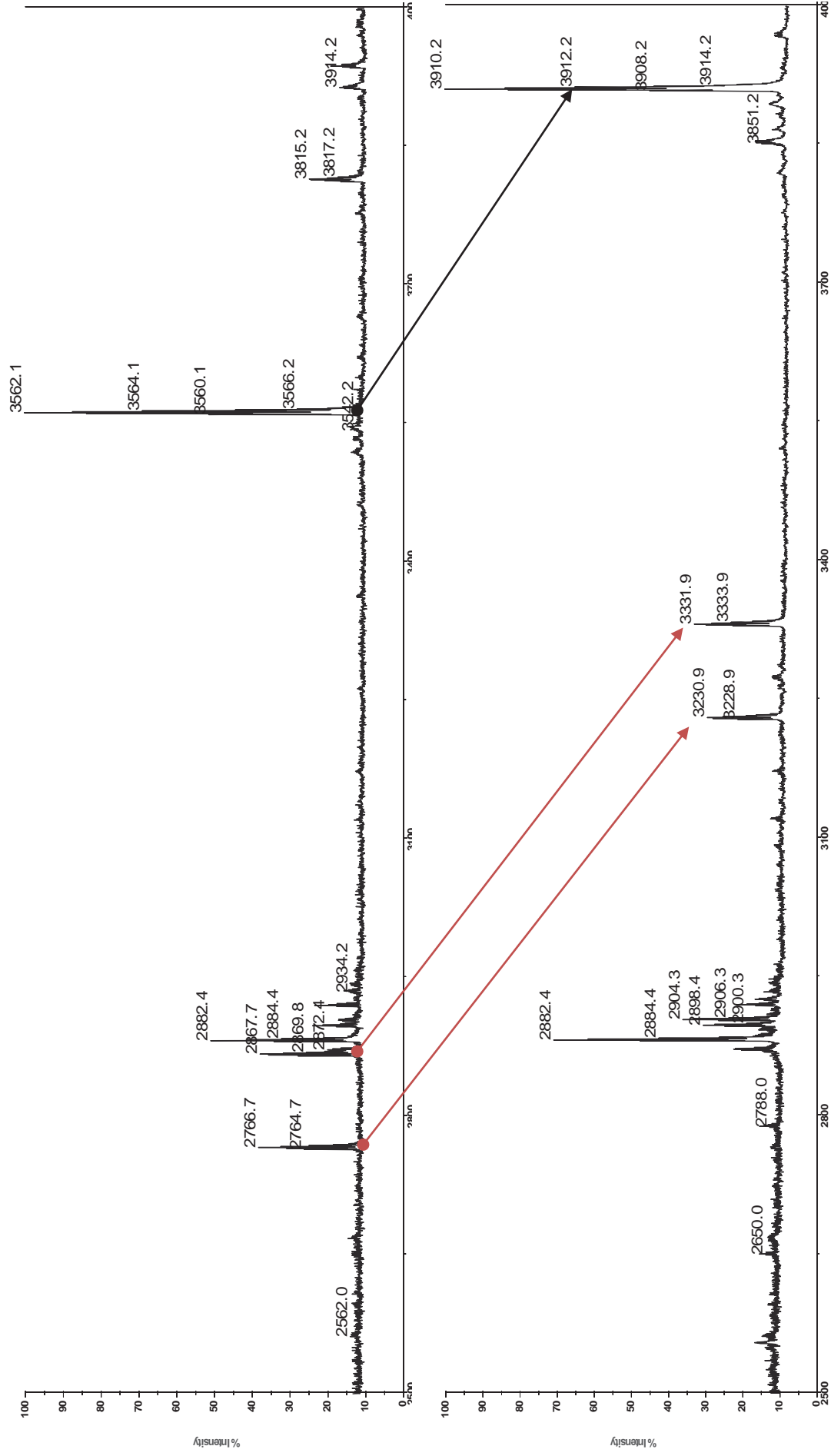
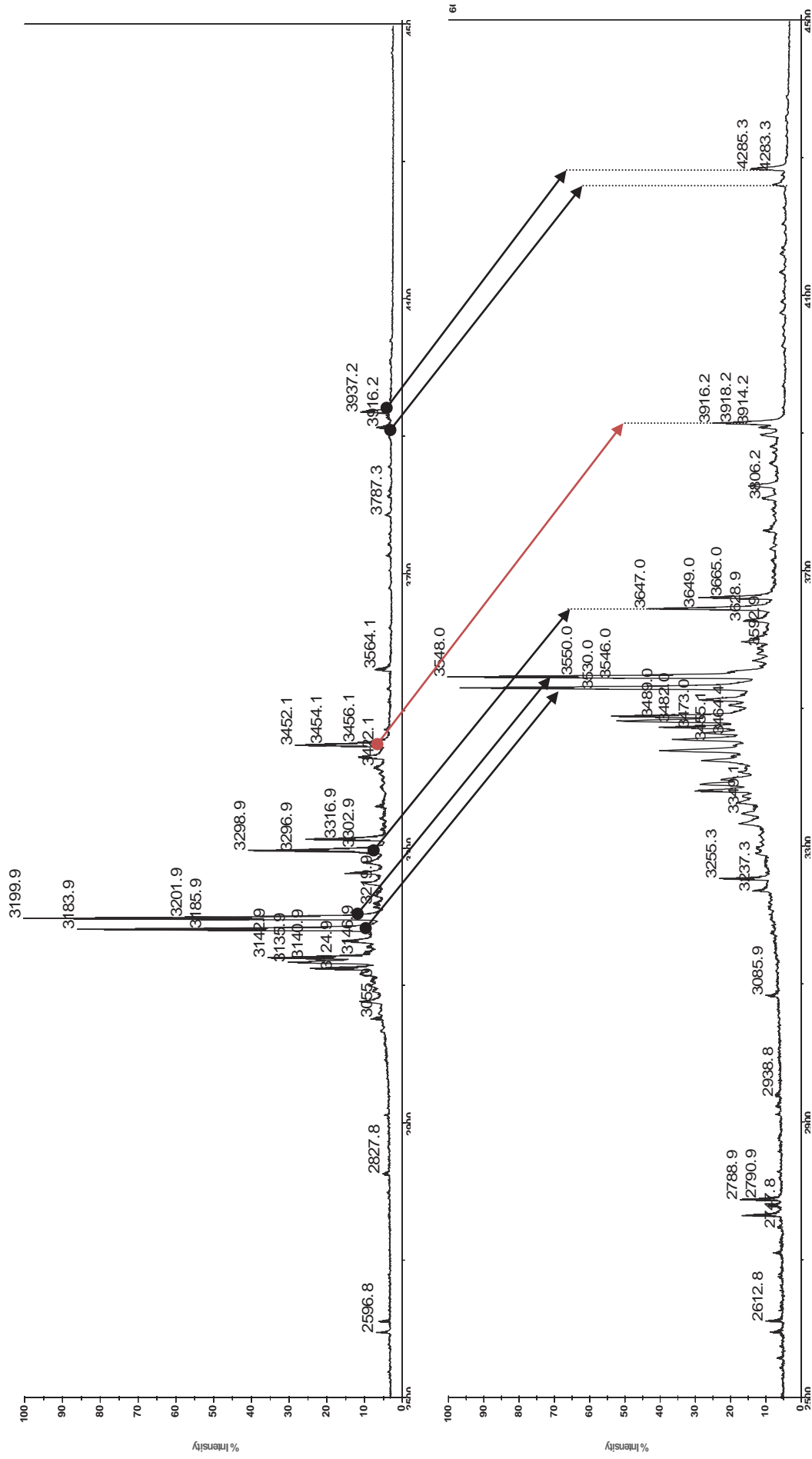


Figura 52- Espectros de massas dos compostos nativos e alquilados de *Beta vulgaris* (bulbos).

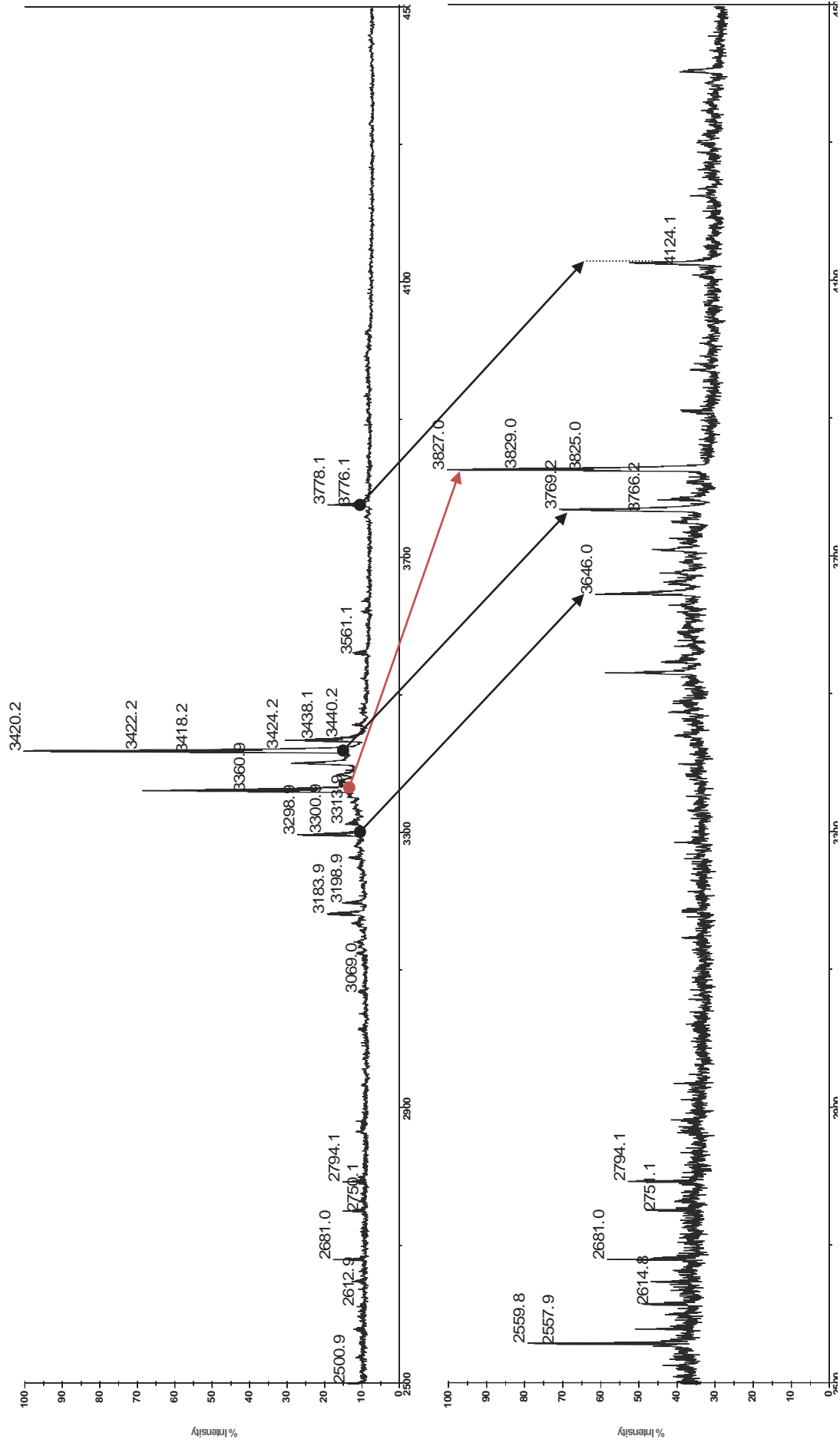


Observação: setas em vermelho: 8 cisteínas, setas em preto: 6 cisteínas

Figura 53- Espectros de massas dos compostos nativos e alquilados de *Beta vulgaris* (folhas).



Observação: setas em vermelho: 8 cisteínas, setas em preto: 6 cisteínas

Figura 54- Espectros de massas dos compostos nativos e alquilados de *Beta vulgaris* (caules).

Observação: setas em vermelho: 8 cisteínas, setas em preto: 6 cisteínas

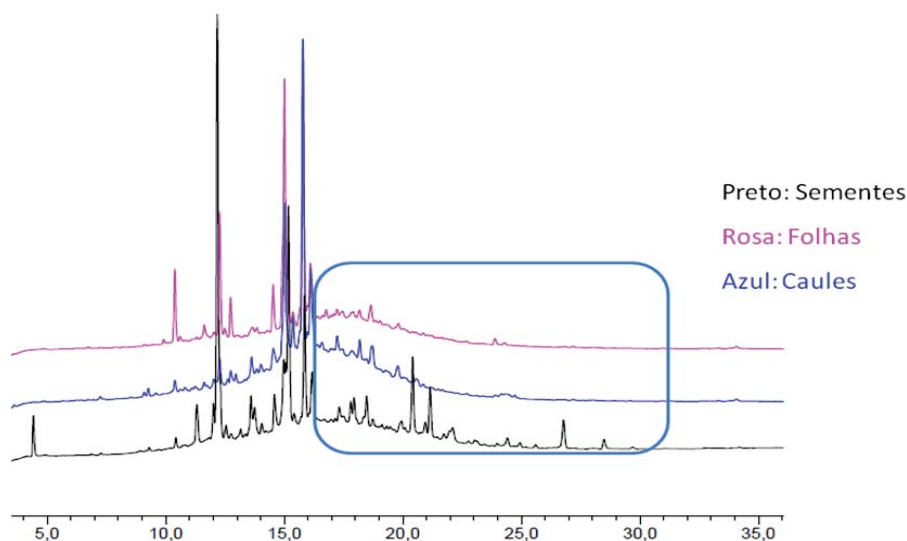
5.9. CICLOTÍDEOS DE *HYBANTHUS CALCEOLARIA*

Hybanthus calceolaria apresentou grande variedade de ciclotídeos em um *screening* inicial. Isso está de acordo com os dados da literatura, nos quais há afirmação de que todas espécies da família Violaceae são biossintetizadoras dessas moléculas (SIMONSEN et al., 2005).

Assim, os extratos dos três órgãos de *H.calceolaria* (sementes, folhas e caules) foram analisados por HPLC analítico, semi-preparativo e preparativo na perspectiva de investigar quais os picos e a faixa de eluição desses compostos.

Inicialmente, um perfil por HPLC analítico foi traçado para os três extratos, em condições semelhantes a fim de compará-los e buscar entender as especificidades de cada órgão. Para tanto foi utilizado um programa linear de 5-95% de B (A= água/TFA 0,1%; B= 90% ACN/ TFA 0,08%) em 45 minutos. Os perfis demonstraram-se bem diferenciados, de tal forma que as sementes destacaram pela maior variedade de picos, indicando maior diversidade peptídica. Cada pico foi coletado e analisado por massas, buscando entender a hidrofobicidade desses compostos nessa análise, para então prosseguir com o isolamento (Figura 55).

As análises de massas evidenciaram que a faixa de eluição desses ciclotídeos foi entre 48% - 60% de B, representado na Figura 55, em destaque. Baseados nos dados de HPLC foram desenvolvidos os protocolos de purificação no modo semi- e preparativo, para os três órgãos (*HcA*, *HcB* e *HcC*).

Figura 55- Cromatogramas dos três órgãos de *H. calceolaria*.

Programa: 5-95 em 45 min. Coluna Kromasil, C_{18} 5 μ m, 250 x 4.6mm, 100Å. Fluxo: 1mL/min. U.V 214 nm.
Solventes: A ($H_2O/0,1\%$ TFA) e B (90% ACN/0,08% TFA).

5.9.1. ANÁLISE DE HcA.

7,0 mg da fração obtida de HcA foram purificados em HPLC semi-preparativo, programa 5-70% B em 45 min, obtendo-se 53 frações. Essas frações foram coletadas com base em cada pico e, posteriormente analisadas por MALDI- TOF. As frações foram pesadas, porém a massa do frasco com e sem as amostras foram equivalentes. Por esse motivo, não foi possível precisar nesse trabalho as massas adquiridas.

Após a análise por MALDI, foram verificados espectros com muitos íons, ou seja, na maioria dos picos os ciclotídeos estão co-eluído. Analisar misturas de ciclotídeos é uma estratégia possível, uma vez que se pode traçar métodos de digestão enzimática juntamente com MS/MS *denovo* ou por comparação em banco de dados para elucidar a sequência. Entretanto, neste trabalho foram escolhidas apenas frações puras para serem elucidadas.

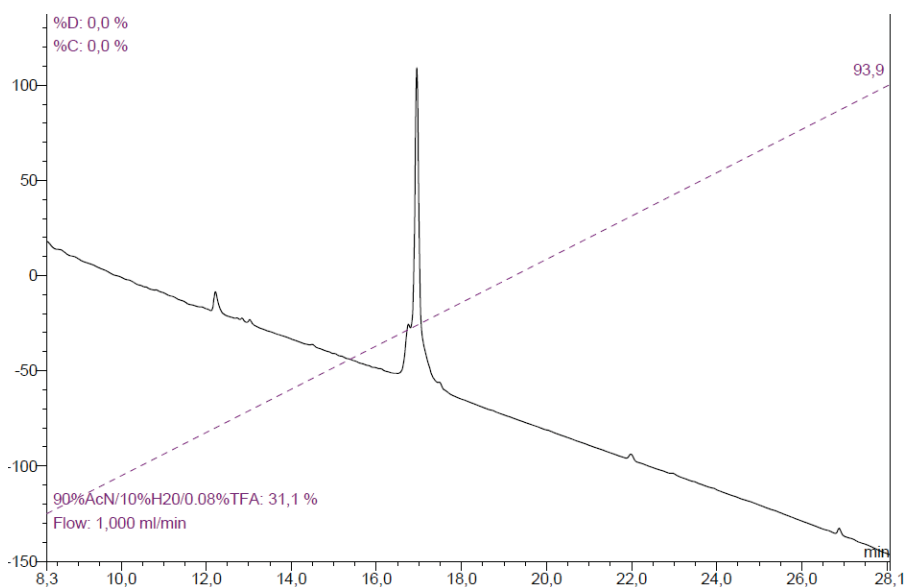
Das 53 frações obtidas, seguiu-se com a análise das frações AFr38 (coletada entre os minutos 34,57 e 34,82) e AFr51 (coletada entre os minutos 43,05 e 43,54) pois apresentaram relativa pureza nos experimentos por espectrometria de massas.

5.9.1.1. ANÁLISE DA FRAÇÃO AFR38 DE HCA

O espectro de massas de AFR38 apresentou um íon com grande intensidade m/z 3171,2 (Figura 57). Seu perfil cromatográfico exibiu-se relativamente puro (Figura 56), o que nos motivou a seguir com os estudos de sequenciamento. As reações de redução e acetamidação do composto puderam ser confirmadas com o acréscimo de 348 Da, referente as seis cisteínas – íon m/z 3519 (Figura 58). Além disso, a digestão enzimática foi realizada tanto para a enzima endoGlu-C quanto para tripsina, a fim de se obter íons, fragmentos menores para a realização do sequenciamento através de MS/MS. Essa reação/digestão se prolongou por 5 horas, e as amostras AFR38 digeridas para cada enzima foram analisadas por MALDI-TOF. A fração digerida com EndoGlu-C não apresentou o íon referente a abertura do anel, entretanto a digestão triptica evidenciou um intenso íon na região de 2000-3000, no valor de m/z 2697 o qual foi fragmentado (Figura 59).

Após o detalhamento dos espectros de MS/MS (Figura 60 e Figura 61), uma sequência parcial foi encontrada, para o ciclotídeo m/z 3171 isolado das sementes de *H. calceolaria*: RCSCGIVTTICPIFVCSWCPDA, nomeado aqui como, nomeado aqui como *Hycob*.

Figura 56- Cromatograma da fração AFR38.



Programa: 5-100 em 30 min. Coluna Kromasil, C_{18} 5 μ m, 250 x 4.6mm, 100Å. Fluxo: 1mL/min. U.V 214 nm.
Solventes: A ($H_2O/0,1\%$ TFA) e B (90% ACN/0,08% TFA).

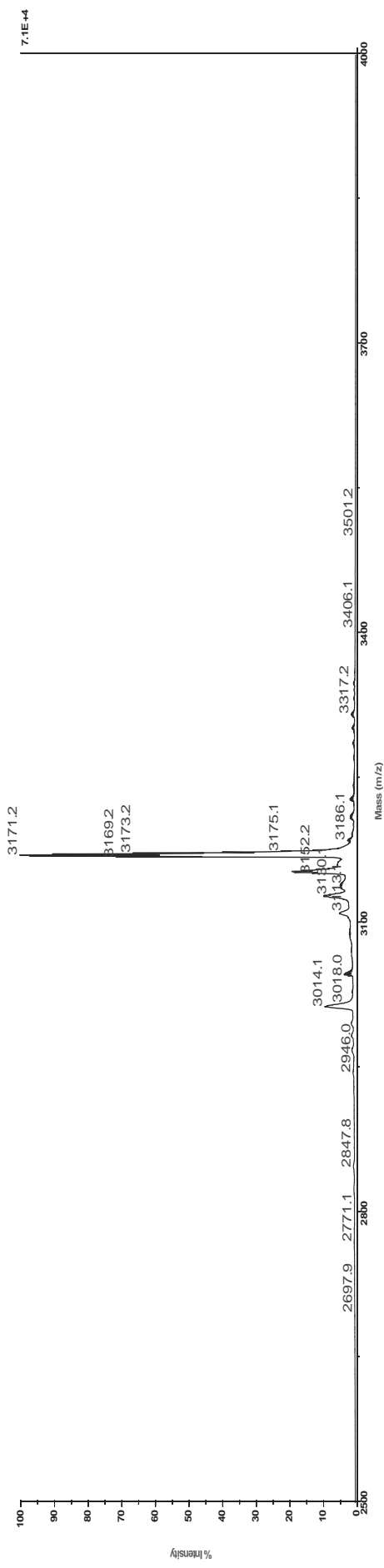
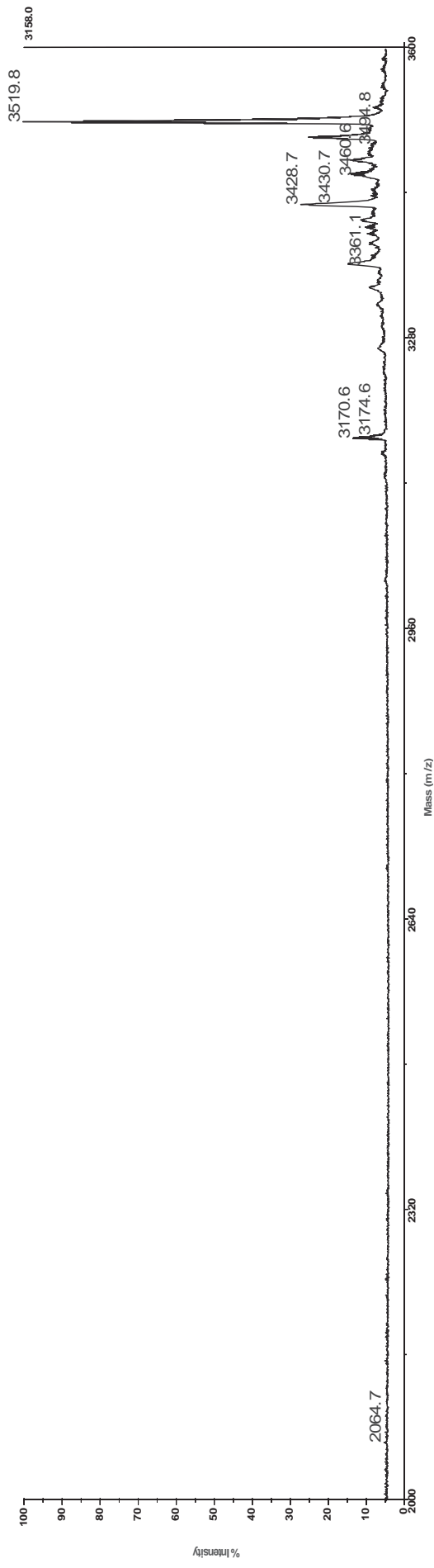
Figura 57- Espectro de massas da fração nativa AFr38.**Figura 58-** Espectro de massas da fração reduzida AFr38.

Figura 59- Espectro de massas da fração reduzida, alquilada e digerida AFr38. Enzima Tripsina.

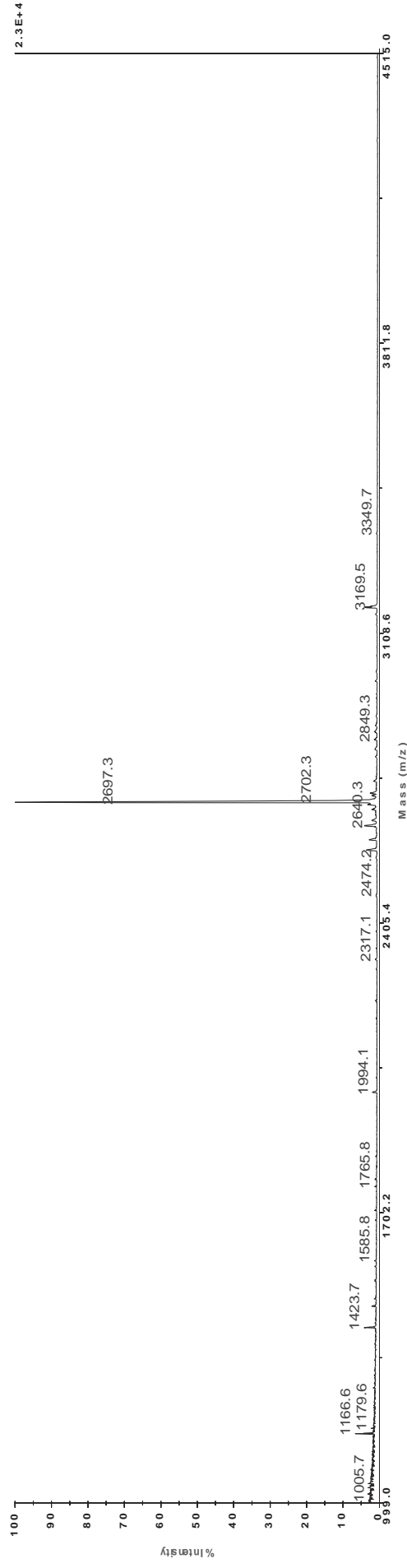
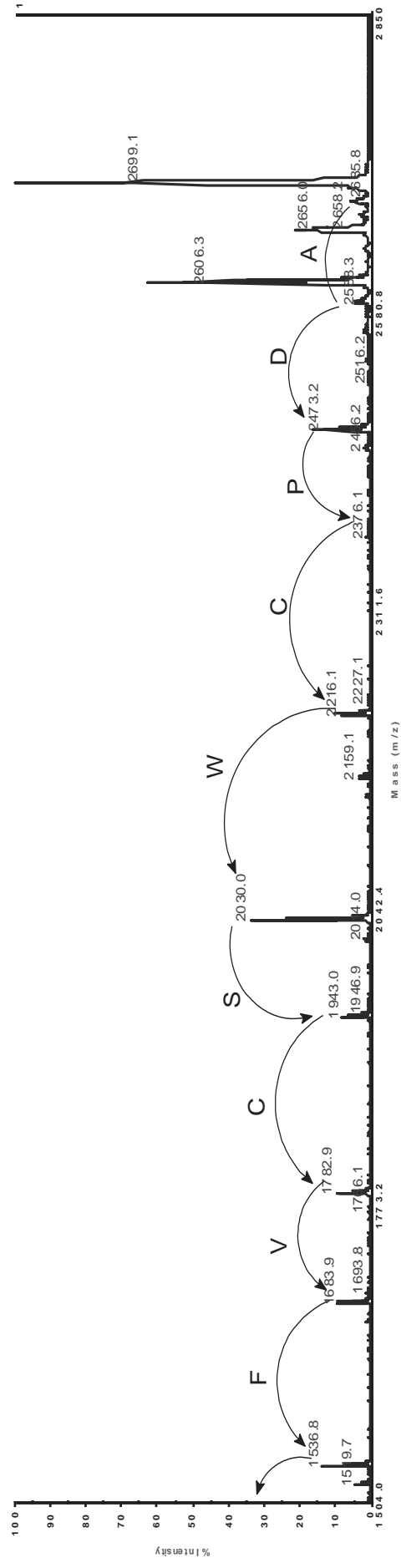


Figura 60- MS/MS do íon m/z 2697 da fração AFr38. Expansão da região entre 1504 e 2850.



5.9.1.2. ANÁLISE DA FRAÇÃO AFR51 DE HCA.

O espectro de massas da fração AFR51 apresentou um íon com relativa pureza e intensidade m/z 3030,4 (Figura 63). Além disso, por HPLC seu perfil demonstrou-se relativamente puro (Figura 62). A redução e acetamidação do composto foi confirmada com o acréscimo de 348 Da, referente as seis cisteínas – íon m/z 3378 (Figura 64).

A digestão enzimática foi realizada com o uso de associação de enzimas: endoGlu-C, tripsina e quimiotripsina a fim de se obter íons, partes do ciclotídeo os quais orientassem a realização do sequenciamento através de MS/MS. Essa reação/digestão se prolongou por 5 horas, e as amostras AFR51 digeridas para cada enzima foram analisadas por MALDI. A fração digerida com EndoGlu-C apresentou, um íon m/z 3396 (Figura 65) referente a abertura do anel. Esse íon foi fragmentado por MS/MS, conforme a Figura 66, 67 e 68. Dessas análises foi possível extrair informações sobre os íons $-b$ e $-y$ da sequência. Para melhor ilustrar a elucidação do composto são apresentadas fragmentações indicadas pelas cores cinza (sequência de íons y) e azul (íons $-b$).

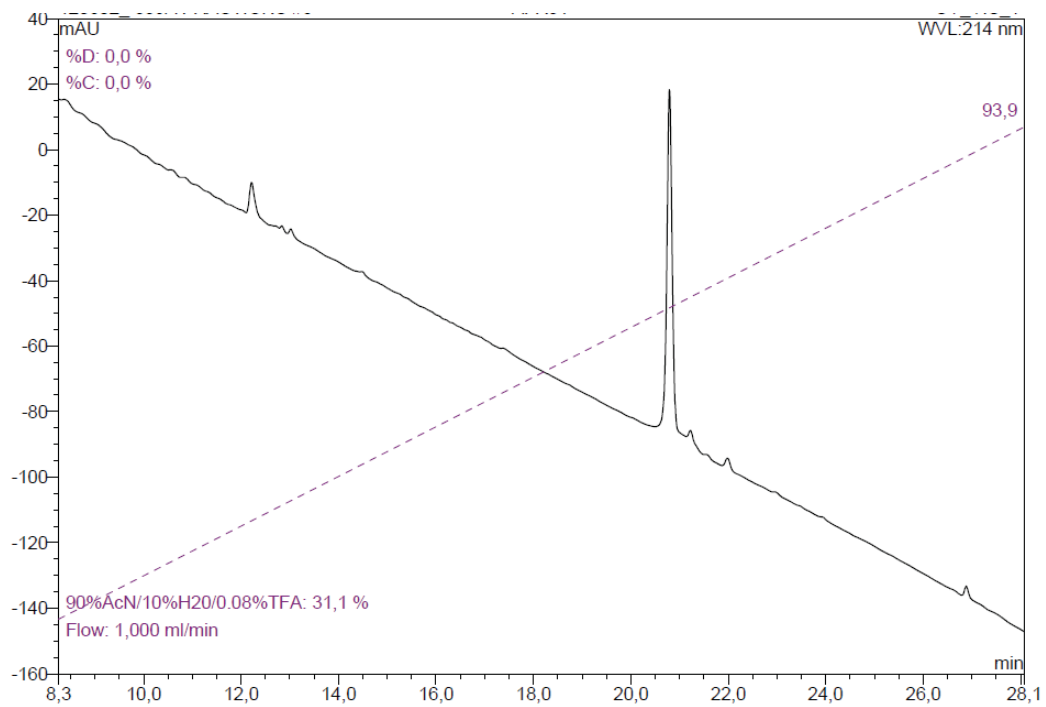
A digestão com tripsina originou os íons m/z 3396 e 2858 (Figura 69). O íon m/z 2858 foi analisado e demonstrou ser o mesmo íon que está contido no espectro MS/MS do íon m/z 3396. Isso infere que o íon menor não foi originado de uma clivagem enzimática. Além disso, os fragmentos gerados da análise do íon m/z 3396 de tripsina permitiu identificar apenas os fragmentos $-y$, uma vez que não a intensidade dos íons $-b$ gerados foram muito baixa (Figura 70, 71 e 72).

A enzima quimiotripsina foi usada para diferenciar aminoácidos, a exemplo de leucina e isoleucina. Em uma digestão desse tipo, aminoácidos aromáticos são clivados e, também os aminoácidos apolares metionina e leucina, contanto que não estejam ao lado de prolina. Na digestão do ciclotídeo AFR51 com quimiotripsina, foram observados os íon m/z 3396 e 2413 (Figura 73). Ambos foram fragmentados, sendo o íon m/z 2413 gerado da digestão/ clivagem dos aminoácidos aromáticos Y e F presentes na cadeia. Para este íon, a sequência observada foi: KDKCSCGIVATICPI (Figura 76 e 77). O fragmento característico da clivagem leucina deveria ser observado, entretanto ao checar regiões baixas do espectro, os íons característicos dessa quebra não foram identificados. Para o íon m/z 3396, foi observada uma clivagem incompleta, na qual apenas um de seus aminoácidos aromáticos clivou, mesmo havendo 2 na estrutura. Os aminoácidos obtidos dessa análise foram: KDKVCYDSIPCGESCVF (Figura 74 e 75).

De todos os espectros MS/MS obtidos foram encontrados os íons $-b$ e $-y$ o os quais possibilitaram elucidação da cadeia: CVYDSIPCGESCVFIPCITAVIGCSCKDK.

Diante da proposição apresentada para a quebra das leucinas por quimiotripsina, foi possível estabelecer os resíduos de isoleucina (em verde), pois não apresentaram formação dos fragmentos para as três partes do peptídeo em destaque (azul, cinza e rosa) **SIPCGESCVFIPCITAVIGCSCKDKVCYD**. Já os resíduos em vermelho, não foram comprovados, pois estão ao lado de prolina, logo a proposta apresentada, da presença das duas isoleucinas, é embasada na homologia dos ciclótídeos.

Contudo, foi possível elucidar a estrutura do ciclótídeo m/z 3030, nomeado *Hyc* A, isolado das sementes de *H.calceolaria* (Figura 78).

Figura 62- Cromatograma da fração AFr51.

Programa: 5-100 em 30 min. Coluna Kromasil, C₁₈ 5 μ m, 250 x 4.6mm, 100Å. Fluxo: 1mL/min. U.V 214 nm.
Solventes: A (H₂O/0,1% TFA) e B (90% ACN/0,08% TFA).

Figura 63- Espectro de massas da fração nativa AFr51.

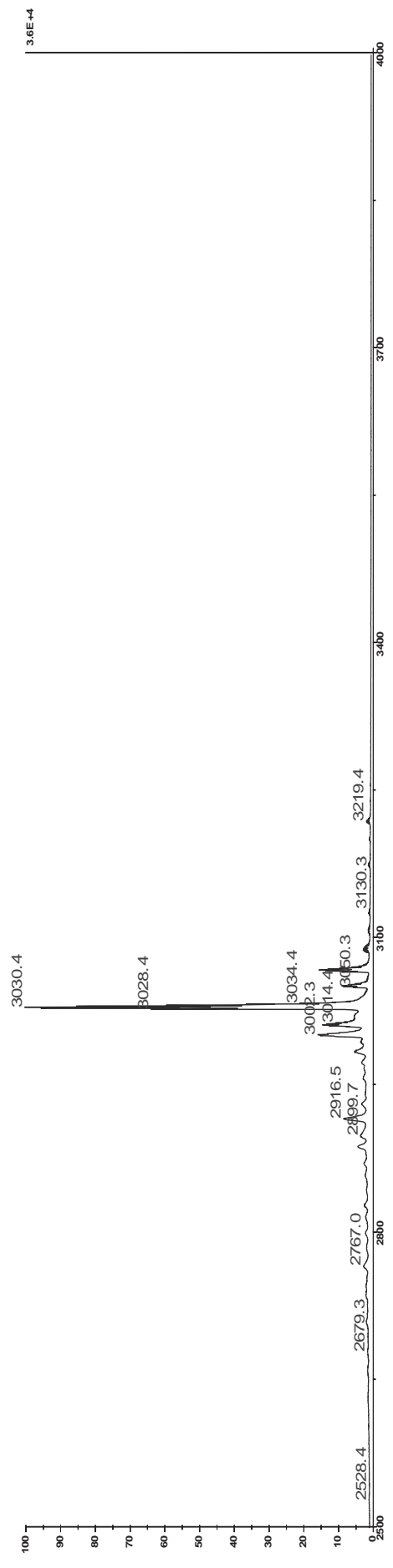


Figura 64- Espectro de massas da fração reduzida AFr51.

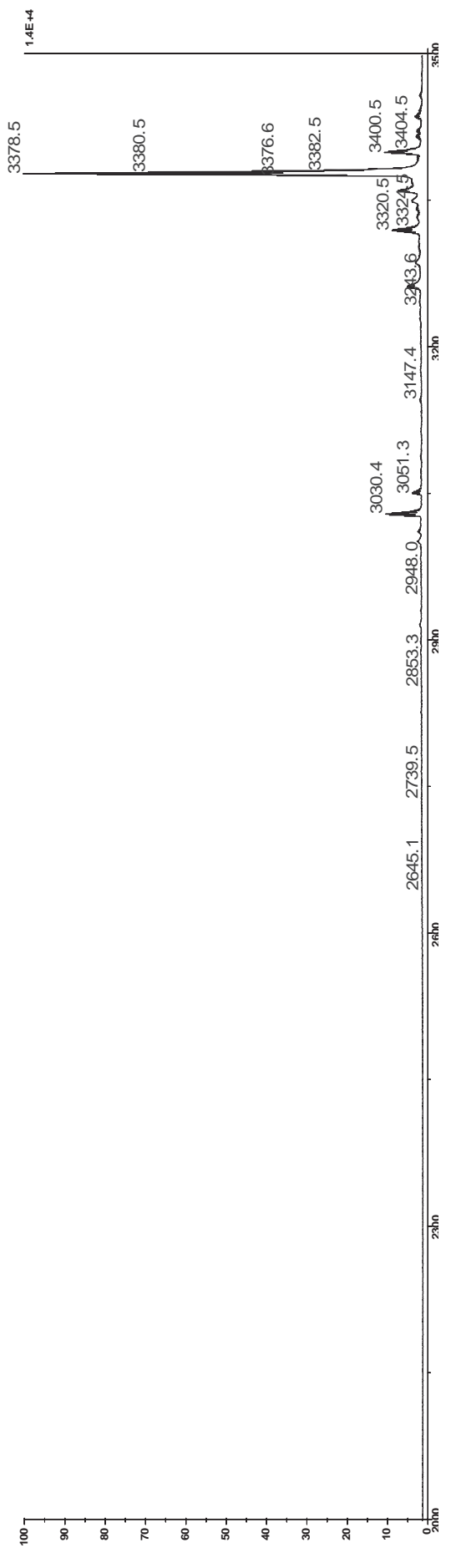


Figura 65- Espectro de massas da fração reduzida, alquilada e digerida AFr51. Enzima EndoGlu-C.

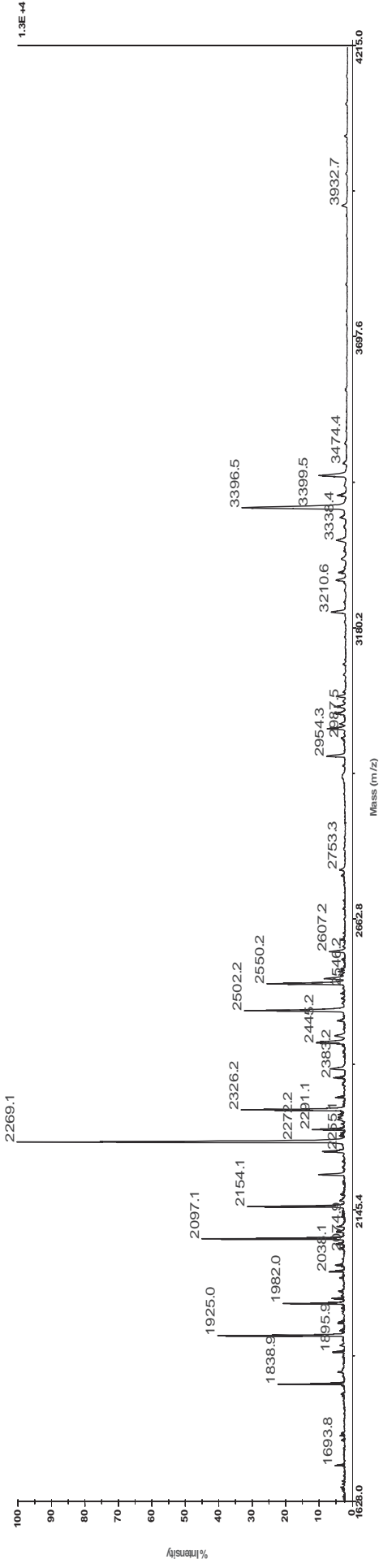


Figura 66- MS/MS do íon m/z 3396 da fração AFr51, oriunda da digestão EndoGlu-C. Expansão da região entre 2361 e 3396.

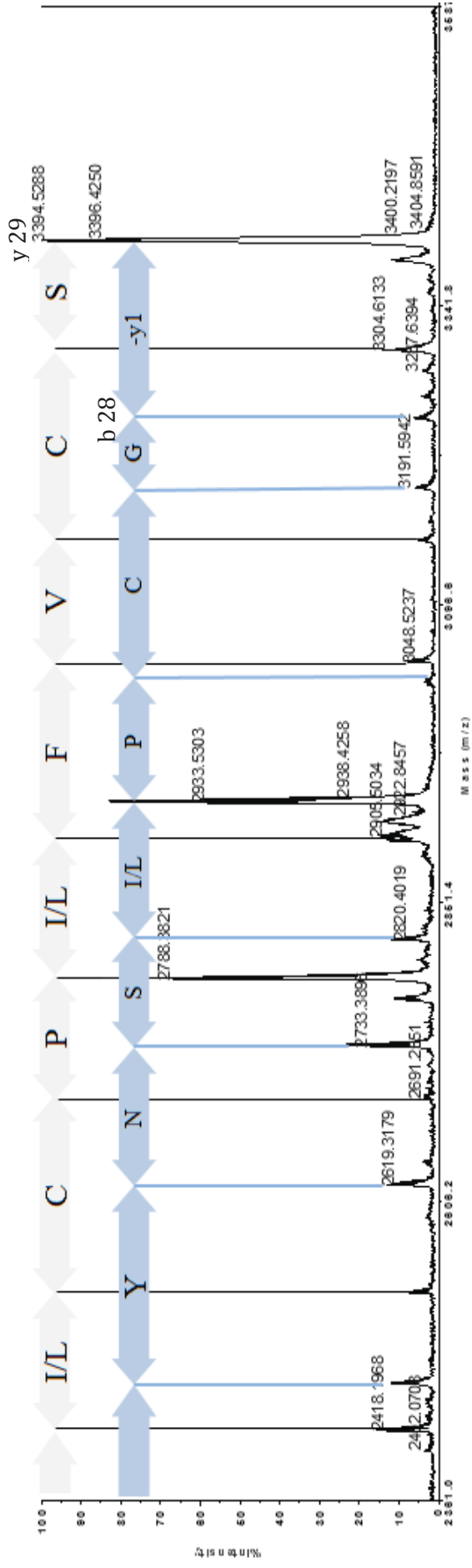


Figura 69– Espectro de massas da fração reduzida, alquilada e digerida AFR51. Enzima Tripsina.

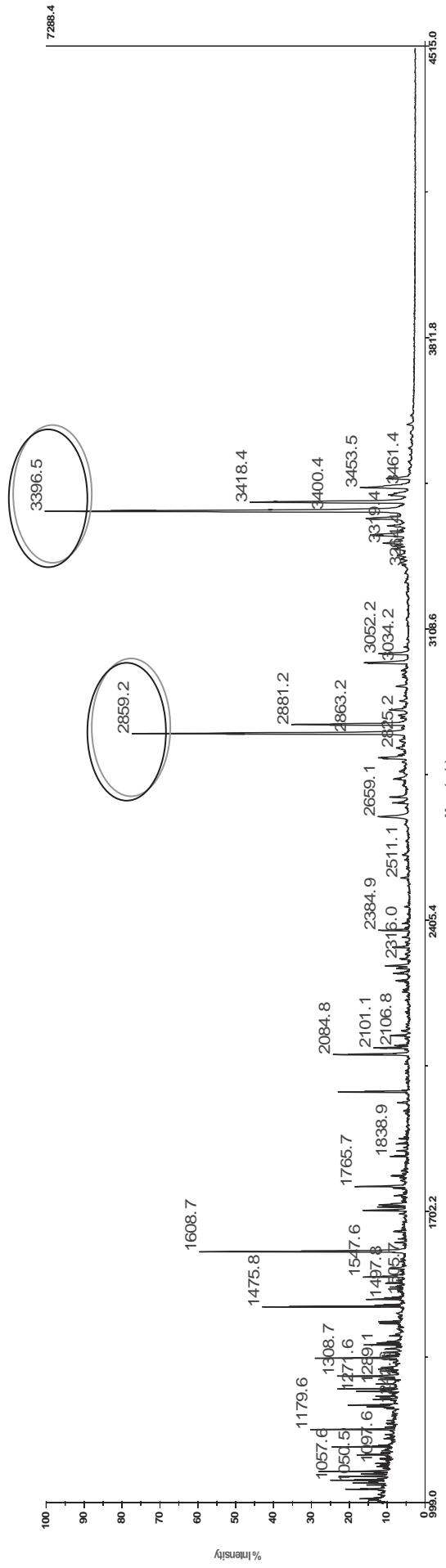


Figura 70– MS/MS do íon m/z 3396 da fração AFR51, oriunda da digestão tripsina. Expansão da região entre 2602 e 3396.

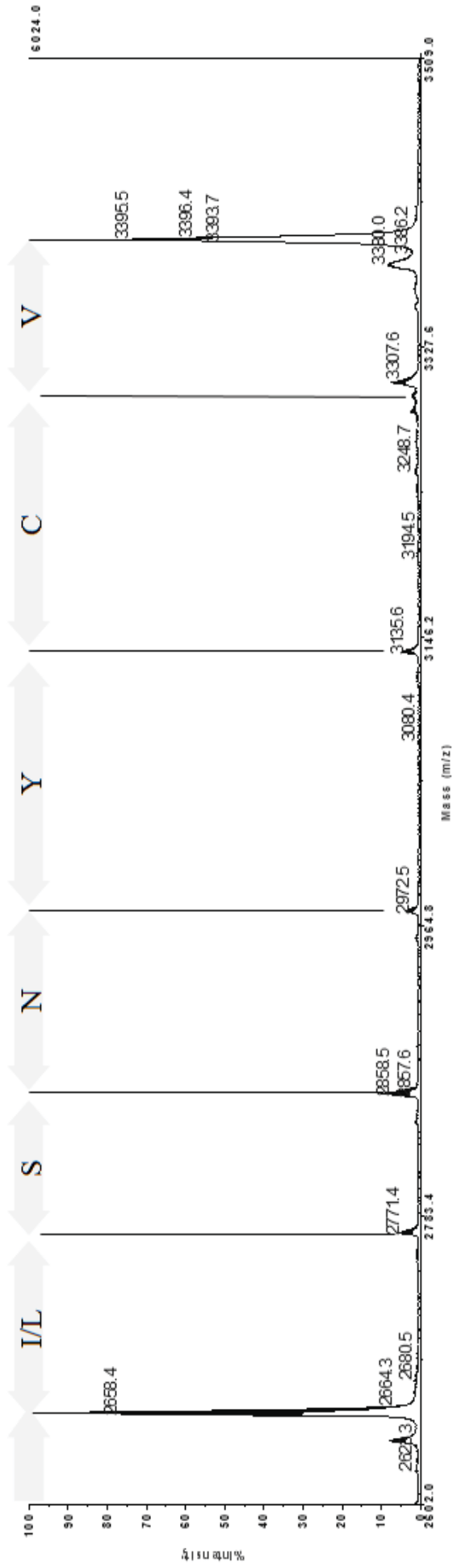


Figura 71- MS/MS do íon m/z 3396 da fração AFr51, oriunda da digestão tripsina. Expansão da região entre 1582 e 2585.

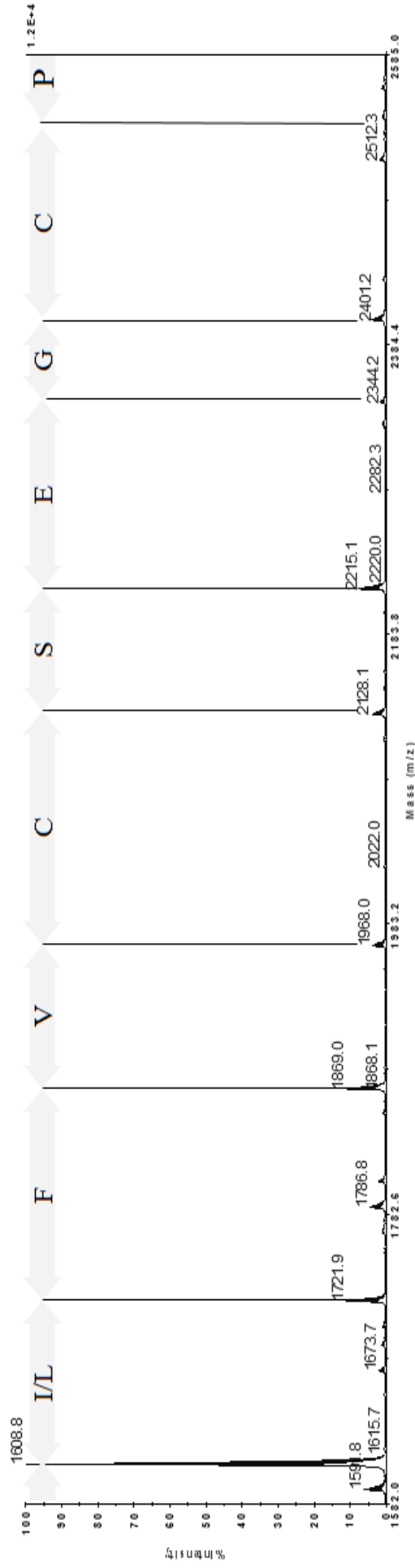


Figura 72- MS/MS do íon m/z 3396 da fração AFr51, oriunda da digestão tripsina. Expansão da região entre 0 e 1597.

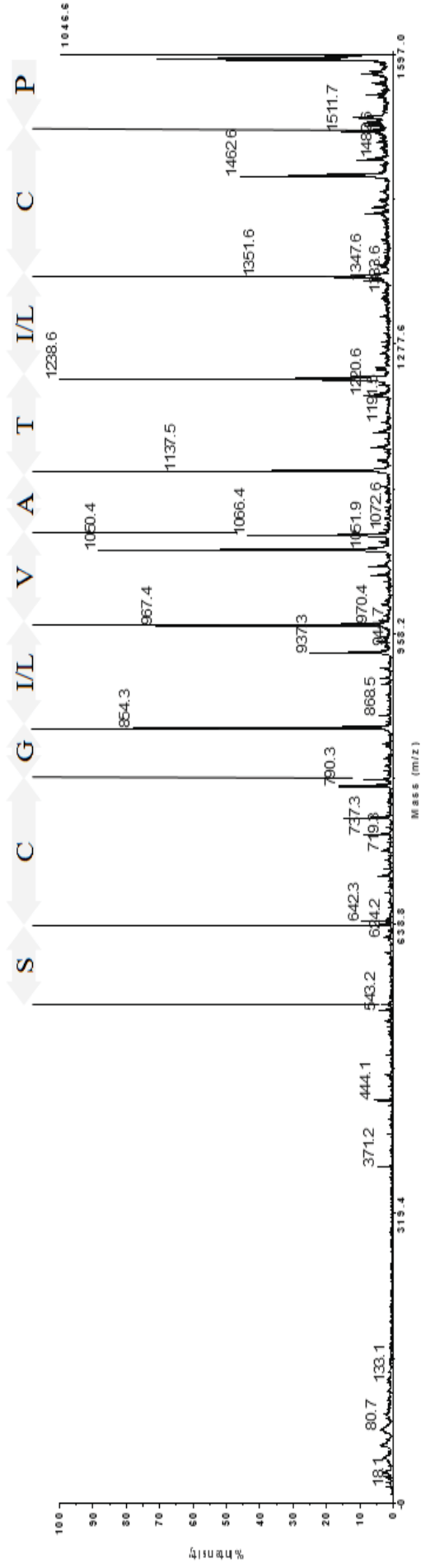


Figura 73 – Espectro de massas da fração reduzida, alquilada e digerida AFR51. Enzima Quimiotripsina.

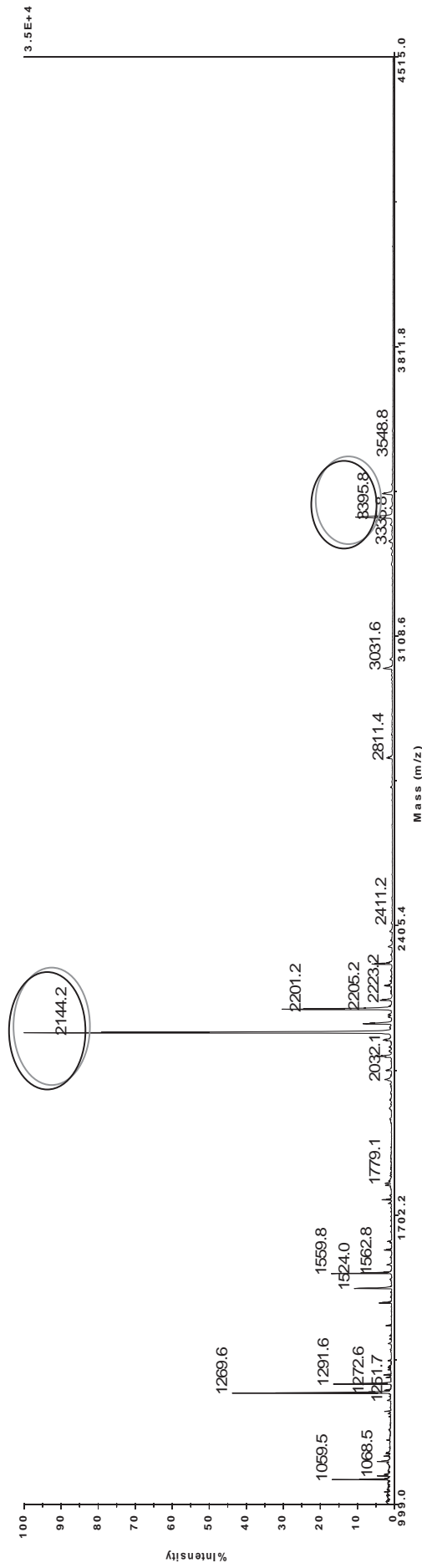


Figura 74– MS/MS do íon m/z 3396 da fração AFR51, oriunda da digestão quimiotripsina. Expansão da região entre 2107 e 3396.

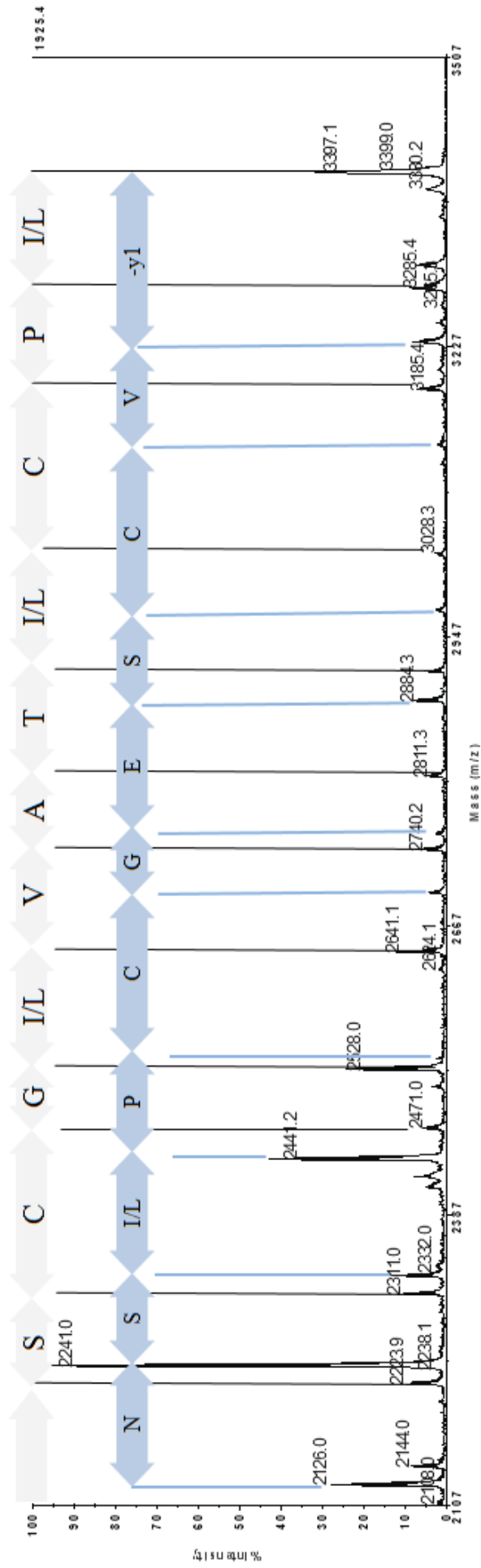


Figura 77 - MS/MS do íon m/z 2143 da fração AFr51, oriunda da digestão quimiotripsina. Expansão da região entre 0 e 1312.

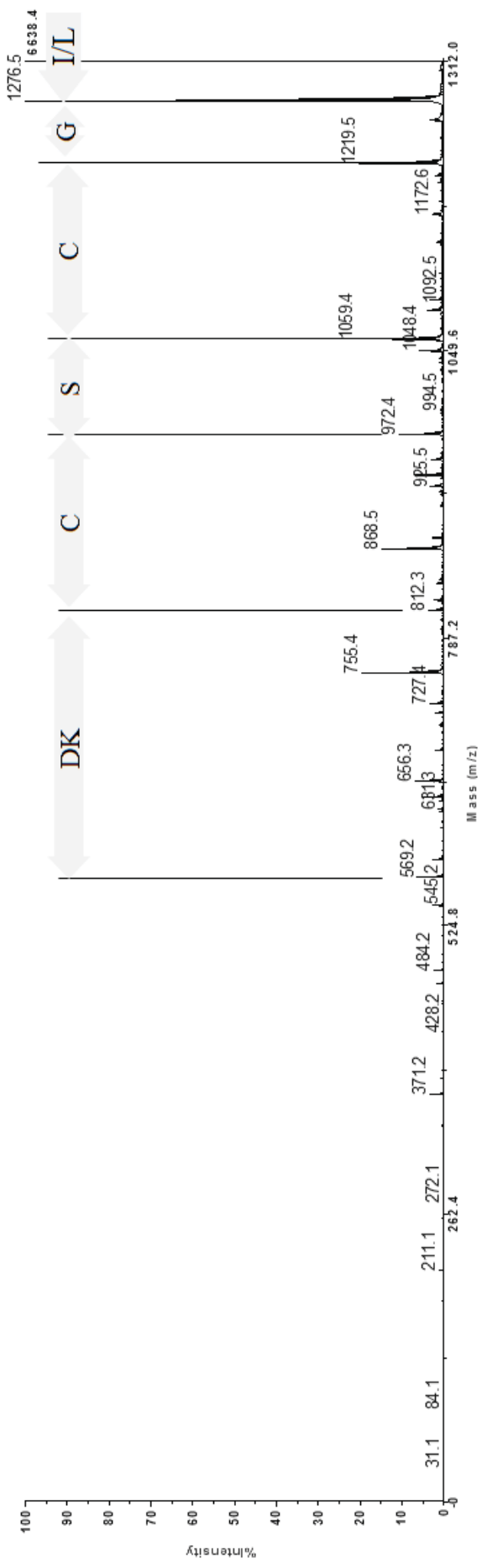
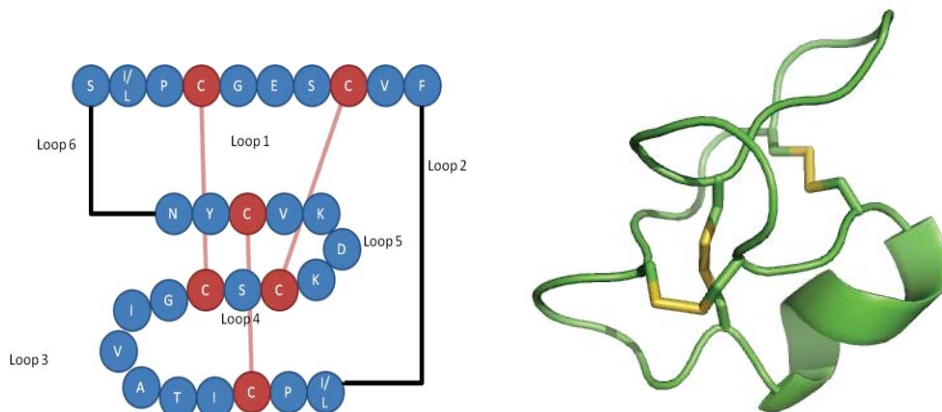


Figura 78 – *Hyco A*, evidenciando os *loops* e a estrutura CCK e a estrutura tridimensional.



Observação: 3D construído em *Pymol*. Em destaque amarelo, as pontes dissulfeto.

Figura 79 – Alinhamento de sequências integras e parciais de ciclótídeos de *Hybanthus*.

<i>Hyco_A</i>	--SIPCGESC	VFIP	PC	-ITAVIG	CSC	--KDKV	CY-N	29		
<i>Hyfl_B</i>	GSPIQCAET	CF	FIGK	-YTEELG	C	TC	--TAF	LCMKN 32		
<i>Hyfl_C</i>	GSPRQCAET	CF	FIGK	-YTEELG	C	TC	--TAF	LCMKN 32		
<i>Hyfl_D</i>	-GSVPCGESC	VYIP	PC	-FTGIAG	C	SC	--KSKV	CYYN 31		
<i>Hyfl_P</i>	-GSVPCGESC	VWIP	PC	-ISGIAG	C	SC	--KNKV	CYLN 31		
<i>Hyfl_I</i>	--GIPCGESC	VFIP	PC	-ISGVIG	C	SC	--KSKV	CYRN 30		
<i>Hyfl_A</i>	--SISCGESC	VYIP	CTVTAL	VG	C	TC	--KDKV	CYLN 31		
<i>Hyfl_K</i>	--GTPCGESC	VYIP	PC	-FTAVVG	C	TC	--KDKV	CYLN 30		
<i>Hyfl_L</i>	--GTPCAESC	VYLP	PC	-FTGVIG	C	TC	--KDKV	CYLN 30		
<i>Hyfl_F</i>	--SISCGET	CTTFNC	---	WIPNCK	C	NHHD	KVCYWN	30		
<i>Hyfl_J</i>	--GIACGESC	AYFG	---	WIPG	C	SC	--RNKV	CYFN 28		
<i>Hyfl_E</i>	-GEIPCGESC	VYLP	---	FLPNC	C	YC	--RNHV	CYLN 29		
<i>Hyfl_M</i>	-GNIPCGESC	IFFP	---	FNP	C	SC	--KDN	CYYN 29		
<i>Hyco_B_partial_</i>	--IFV	CSE	CPDYR	-----	C	SGIV	TTICP	-- 22		
<i>Hymo_B_partial_</i>	-----	CGETC	VTGT	---	C	YTPG	CAC	--DWPV	CKRD 25	
<i>Hymo_B_partial_</i>	-----	CGETC	VTGT	---	C	YTPG	CAC	--DWPV	CKRD 25	
<i>Hyca_A_partial_</i>	-----	CGETC	VVDTR	---	C	YTKK	C	SC	--AWPV	CMRN 26
<i>Hyen_B_partial_</i>	-----	CGETC	KVTKR	---	C	SGQG	C	SC	--LKGR	SCYD- 26
<i>Hyst_A_partial_</i>	-----	CGETC	IWGRC	-YSENIG	C	HC	--GFGI	CTLN 27		
<i>Hymo_A_partial_</i>	-----	CGETC	CLFIP	-IFS	V	VG	C	SC	--SSKV	CYRN 27
<i>Hyve_A_partial_</i>	-----	CGETC	CLFIP	-LTS	V	FG	C	SC	--KNRG	CYKI 27
<i>Hyde_A_partial_</i>	-----	---	CVWIP	-ISAA	I	G	C	SC	--KSKV	CYRN 23
<i>Hyen_A_partial_</i>	-----	CGESC	VYIP	CTVTALL	G	C	SC	--KDKV	CYKN 28	
<i>Hyfl_H_partial_</i>	-----	CAET	CIYIP	-FTEAVG	G	CK	--KDKV	CYKN 27		
<i>Hyep_B_partial_</i>	-----	CGET	CIYIP	-FTEAVG	G	CK	--KDKV	CYKN 27		
<i>Hyfl_N_partial_</i>	-----	CGET	CVILP	-ISAA	L	G	C	SC	--KDTV	CYKN 27
<i>Hyfl_O_partial_</i>	-----	CGET	CVIFP	-ISAA	F	G	C	SC	--KDTV	CYKN 27
<i>Hyfl_G_partial_</i>	-----	CAET	CVVLP	-FIV	P	G	C	SC	--KSSV	CYFN 26
<i>Hyep_A_partial_</i>	-----	CGET	CVVLP	-FIV	P	G	C	SC	--KSSV	CYFN 26

Observação: Os resíduos em verde não foram confirmados.

5.9.2. ANÁLISES DE *HcB* E *HCC*

11,5 mg da fração C₁₈ obtida de *HcB* foram cromatografados em HPLC semi-preparativo, programa 30-80% B em 135 min, obtendo-se 40 frações, coletadas a cada 2 minutos. As frações foram, posteriormente, analisadas por MALDI.

12,8 mg da fração C₁₈ obtida de *HcB* foram cromatografados em HPLC semi-preparativo, programa 30-80% B em 135 min, obtendo-se também 40 frações, coletadas a cada 2 minutos. As 80 frações foram, posteriormente, analisadas por MALDI.

As frações mais puras foram liofilizadas e encaminhadas para as reações de redução, acetamidação e digestão. Entretanto, até o momento as análises de ambos os órgãos não resultaram no sequenciamento de seus ciclotídeos. Isso porque, a massa necessária de ciclotídeo para o sequenciamento não tem sido alcançada. Algumas repetições foram realizadas, com aumento da massa, porém sem sucesso.

Mesmo diante do não sequenciamento, foi possível identificar algumas especificidades na produção de diferentes ciclotídeos em cada órgão, considerando tempo de eluição e massas. Esses dados serão descritos na seção 5.9.3.

5.9.3. COMPARAÇÃO DO CONTEÚDO DE CICLOTÍDEO ENTRE OS ÓRGÃOS DE *H. CALCEOLARIA*.

Entender a diversidade química dos órgãos no vegetal direciona o entendimento dos possíveis papéis que esses possam estar desempenhando na planta. Alguns estudos tem buscado entender como esses se diferenciam na produção de ciclotídeo. Por exemplo, Trabi & Craik em 2004, analisaram diferentes partes morfológicas de planta *Viola hederaceae* (flores, raízes, bulbos, folhas, pecíolos,), e notaram uma significativa diferença no perfil de expressão de ciclotídeos para cada parte da planta, indicando a existência de peptídeos que são expressos em tecidos específicos como a Vhr1, que foi observada somente em amostra da raiz de *V. hederaceae*, e ciclotídeos que são expressos em diferentes morfologias da planta como a Kalata B1 e a Varv peptide A que foram encontradas em extratos de folha, flor e raiz (CRAIK et al., 1999; TRABI; CRAIK, 2004 apud PINTO, 2010). Adicionalmente, Chen e colaboradores encontraram nessa mesma espécie outro ciclotídeo de expressão em tecidos

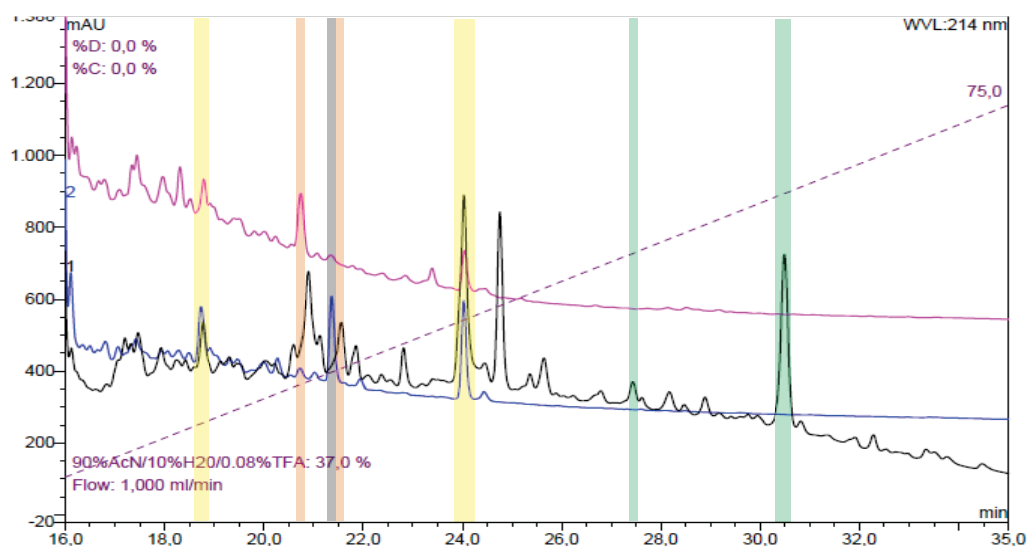
específicos, a Ciclovilacina H4, expressa apenas em raízes e bulbos de *V. Hedaraceae* (CHEN et al., 2005).

Nessa direção, buscou-se entender quais as expressões de ciclotídeos nos diferentes órgãos de *H.calceolaria*. Para tanto foram traçado os perfis em cromatografia reversa, utilizando para os três tecidos as mesmas condições de análises. No entanto, as amostras foram injetadas nas concentrações *HcA* (10 mg/mL), *HcB* (33,3 mg/mL) e *HcC* (33,3 mg/mL), em um volume de 30, 20 e 20 μ L, respectivamente. A figura 80 descreve os perfis de eluição dos ciclotídeos para as três frações, no tempo de 16 a 35 min usando um gradiente 5-95% em 45 min. Essa janela de eluição dos ciclotídeos de *Hybanthus calceolaria* foi estabelecida com base em experimentos de massas.

A comparação cromatográfica dos picos majoritários evidencia que há interseções entre eles demonstrando, a priori, ciclotídeos similares (em amarelo, Figura 80). No geral, os três órgãos apresentaram ter um perfil diferenciável, sendo possível traçar marcadores - ciclotídeos expressos apenas em um dos órgãos. Ainda sobre a Figura 80, são demonstrados colunas laranja para ciclotídeos presentes apenas em *HcC* e coluna roxa para *HcB*.

A análise da eluição das sementes - fração *HcA* - evidenciou expressar um maior conteúdo de ciclotídeos em massa. As colunas em verde mostram os tempos de eluição dos ciclotídeos elucidados *Hyco B* e *A*, da esquerda para direita. Esses podem ser claramente atribuídos como peptídeos unicamente presentes nas sementes, nessa comparação.

Figura 80- Comparação dos cromatograma das frações *HcA*, *HcB* e *HcC*.



Programa: 5-95 em 45 min. Coluna Kromasil, C_{18} 5 μ m, 250 x 4.6mm, 100 \AA . Fluxo: 1mL/min. U.V 214 nm. Solventes: A ($H_2O/0,1\%$ TFA) e B (90% ACN/0,08% TFA). Linha preta: sementes, linha azul: folhas e linha rosa: caules.

Para maior compreensão da natureza desses ciclotídeos, cada pico foi coletado e analisado por MALDI. As coletas foram realizadas por um coletor acoplado ao cromatógrafo, de forma que à medida que o pico eluía, o comando para troca de tubo era dado. Isso possibilitou precisar o tempo da mudança do tubo, estabelecendo o tempo de retenção (RT) e, após checagem das massas, a massa correspondente. Nas Tabela 15, TABELA 16 e TABELA 17 são elencados os tempos de retenção e as massas por pico. Os resultados tabelados evidenciam que ciclotídeos de sementes são mais lipofílicos que folhas e caules, pois eluem na faixa de 20-30 minutos, cerca de 45-65% de solvente B.

Examinando a Figura 81, podemos constatar que a fração *HcA* possui menor complexidade, permitindo isolar seus ciclotídeos quase puros ou, em mistura com peptídeos. As frações *HcB* e *HcC* se apresentaram mais complexas, com vários ciclotídeos co-eluinto entre si (Figura 78 e 83) e ainda, intensidades muito baixas na análises por massas. Somando as informações dos perfis de HPLC, pode-se inferir que a fração *HcA* maior concentração de ciclotídeos, porém menor diversidade.

Contudo, subtrae-se desse estudo que a análise dos tecidos de *Hybanthus calceolaria* permite traçar diferentes perfis para cada tecido, apresentando picos específicos (marcadores) para cada órgão, como se segue nas tabelas 15-17.

Figura 81– Gráfico relacionando os tempos de retenção e os fons dos picos de *HcA*.

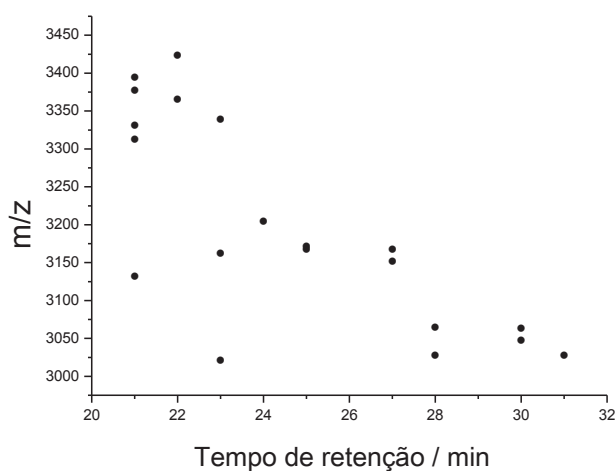


Tabela 15 – Massas e tempos de retenção das frações de *HcA*.

RT	Frações	Massas (m/z)			
20,53	31	3134.5	3315	3380	-
20,73	32	-	-	-	-
20,99	33	3334	3398	-	-
21,13	34	-	-	-	-
21,33	35	-	-	-	-
21,54	36	3368	3427	-	-
21,78	37	-	-	-	-
22,05	38	-	-	-	-
22,35	39	-	-	-	-
22,60	40	3024	3165	3342	3405
22,76	41	-	-	-	-
23,12	42	-	-	-	-
23,48	43	-	-	-	-
23,89	44	3207	-	-	-
24,23	45	-	-	-	-
24,43	46	-	-	-	-
24,66	47	3171	3174	-	-
25,03	48	-	-	-	-
25,36	49	-	-	-	-
25,56	50	-	-	-	-
26,64	51	-	-	-	-
27,08	52	3154	3171	-	-
27,34	53	3154	3171	-	-
27,61	54	-	-	-	-
27,89	55	-	-	-	-
28,08	56	-	-	-	-
28,43	57	3030	3068	-	-
28,81	58	-	-	-	-
29,16	59	-	-	-	-
30,33	60	3051	3067	-	-
30,74	61	3030	-	-	-
32,70					

Tabela 16– Massas e tempos de retenção das frações de *HcB*.

RT	Fração	Massa								
16.13	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16.47	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16.77	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17.19	4	2488	2870,4	3033,2	-	-	-	-	-	-
17.49	5	-	-	3033,2	-	-	-	-	-	-
17.94	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.10	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.29	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.54	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.69	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.92	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19.09	12	-	-	3087,3	-	-	-	-	-	-
19.31	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19.50	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19.71	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19.96	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20.21	17	3103,5	3289,4	3969,4	-	-	-	-	-	-
20.47	18	3092,2	3493,3	-	-	-	-	-	-	-
20.71	19	3090,6	-	-	-	-	-	-	-	-
20.96	20	2568,5	3091,5	3478,9	4358,6	-	-	-	-	-
21.17	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21.32	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21.44	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21.74	24	3195,4	3362,1	3582,8	-	-	-	-	-	-
21.94	25	3160,3	3178,5	-	-	-	-	-	-	-
22.31	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22.77	27	3162,4	3194,4	3166,4	3177,4	3217,3	-	-	-	-
23.36	28	3118,6	3142,2	3161,5	3166,5	3177,4	-	-	-	-
23.95	29	3188,4	3203,4	3268,4	3351,2	3559,4	3576,7	-	-	-
24.34	30	3132,5	3162,4	3179,5	3553,8	3581,8	-	-	-	-
24.69	31	3164,5	3184,5	3200,3	3241,3	3265,3	3284,3	3297,2	3430,1	-

Tabela 17 –Massas e tempos de retenção das frações de *HcC*.

RT	Fração	Massas							
14,34	1	2218,1	2562,5	2111,4	2478,9	-	-	-	-
14,94	2	2565,8	-	-	-	-	-	-	-
15,09	3	-	-	-	-	-	-	-	-
15,5	4	-	-	-	-	-	-	-	-
15,75	5	2218,1	2443,8	2330,1	-	-	-	-	-
15,89	6	-	-	-	-	-	-	-	-
16,16	7	-	-	-	-	-	-	-	-
16,25	8	-	-	-	-	-	-	-	-
16,44	9	-	-	-	-	-	-	-	-
16,66	10	-	-	-	-	-	-	-	-
16,79	11	-	-	-	-	-	-	-	-
16,98	12	3060,6	-	-	-	-	-	-	-
17,22	13	2488	-	-	-	-	-	-	-
17,32	14	2218,1	2488,2	-	-	-	-	-	-
17,43	15	3033,2	3642,5	-	-	-	-	-	-
17,69	16	-	-	-	-	-	-	-	-
17,86	17	-	-	-	-	-	-	-	-
18,1	18	3058,6	3133,5	-	-	-	-	-	-
18,25	19	3058,6	-	-	-	-	-	-	-
18,38	20	3058,6	-	-	-	-	-	-	-
18,54	21	3058,6	-	-	-	-	-	-	-
18,7	22	3058,6	-	-	-	-	-	-	-
18,92	23	3088,5	3307,2	-	-	-	-	-	-
19,17	24	3287,4	-	-	-	-	-	-	-
19,33	25	3048,8	3074,6	3160,5	3209,4	-	-	-	-
19,59	26	3044,7	3071,6	3161,5	4251,5	-	-	-	-
19,82	27	3131,5	3163,5	3190,5	3045,7	4248,6	-	-	-
19,99	28	3148,7	3190,9	3309,3	3175,4	-	-	-	-
20,22	29	3148,5	3177,4	3390,4	3310,2	-	-	-	-
20,54	30	3148,5	3177,4	3310	-	-	-	-	-
20,68	31	3131,5	3148,5	3163,4	3177,4	-	-	-	-
21,08	32	3134,5	3148,5	3163,2	3177,4	-	-	-	-
21,32	33	3132,6	-	-	-	-	-	-	-
21,67	34	3132,6	3293,2	-	-	-	-	-	-
22,53	35	3130,5	3160,5	332,2	3278,2	-	-	-	-
23,06	36	3115,6	3163,5	3280,3	3134,3	3262,3	3281,3	3308,6	-
23,39	37	3119,6	3146,5	3277,5	3307,3	-	-	-	-
23,69	38	3119,6	3146,5	3176,4	3204,4	3226,4	-	-	-
24	39	3099,6	3145,6	3225,3	3580,8	-	-	-	-
24,32	40	3115,6	3166,2	3203	3225,4	3426,1	3550,9	3577,8	-

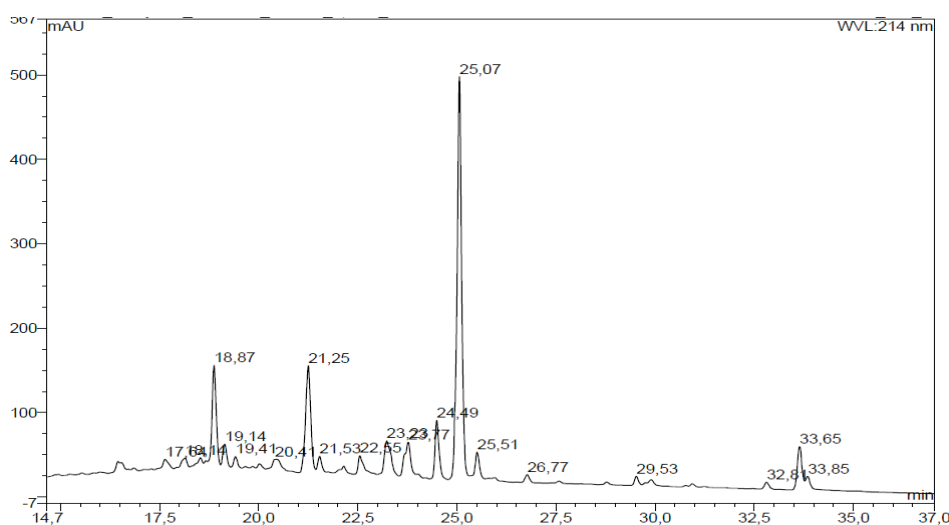
5.9.4. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO BVA - BETA VULGARIS

O *screening* para ciclotídeos confirmou que essa espécie possui compostos peptídicos com seis cisteínas, em seus três órgãos. Esses resultados possibilitaram selecionar essa espécie e continuar com o estudo de seus bulbos (*BvA*). Assim, a fração C₁₈ foi injetada em HPLC preparativo nas mesmas condições às frações de *Hybanthus* (item 4.11.4) obtendo-se desta eluição 29 frações, coletadas manualmente. A coleta foi performada no intuito de se coletar os picos individualmente (Figura 84). Todas as frações foram analisadas por HPLC e MALDI para constatar o quão puro as frações se apresentavam.

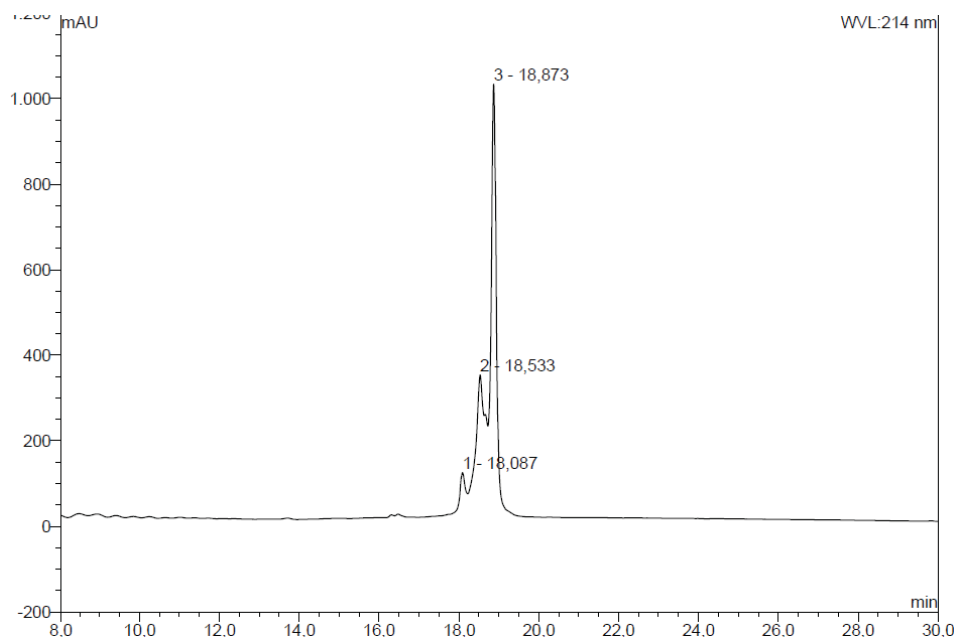
Entretanto, por meio dos resultados alcançados na seção 5.8, houve interesse na coleta do pico m/z 3562, o qual foi o único pico que reduziu 6 cisteínas. Assim, após checar as 29 frações por massas, a fração 15 (*Bva15*) foi identificada com aquela que continha o peptídeo de interesse.

O cromatograma analítico da fração apresenta um perfil com relativa pureza e, apesar da existência de três compostos co-eluindo, podemos inferir que os mesmo não atrapalharam na análise e sequenciamento. O composto eluindo em 18,87 trata-se de um peptídeo de massa m/z 3562 que após redução e acetamidação, apresentou um acréscimo de 348 Da, em sua estrutura (Figura 84 e 86).

Figura 84– Cromatograma da fração *BvA*.



Programa: 5-95 em 45 min. Coluna Kromasil, C₁₈ 5µm, 250 x 4.6mm, 100Å. Fluxo: 1mL/min. U.V 214 nm.
Solventes: A (H₂O/0,1% TFA) e B (90% ACN/0,08% TFA).

Figura 85 – Cromatograma da fração Bva15.

Programa: 5-95 em 45 min. Coluna Kromasil, C_{18} 5 μ m, 250 x 4.6mm, 100Å. Fluxo: 1mL/min. U.V 214 nm.
Solventes: A ($H_2O/0,1\%$ TFA) e B (90% ACN/0,08% TFA).

Para o sequenciamento utilizou-se novamente a digestão enzimática com o uso de associação de enzimas: endoGlu-C e tripsina, a fim de se obter íons - partes do peptídeo – e, enfim fragmentá-los por MS/MS. Essa reação/digestão se prolongou por 5 horas, e as amostras digeridas para cada enzima foram analisadas por MALDI. A fração 15 digerida com EndoGlu-C apresentou um íon m/z 3910,9 (Figura 84), o que evidencia o não acréscimo de 18u, ou seja, a estrutura trata-se em um peptídeo linear. Este íon corresponde a incompleta digestão com a endoprotease. Este, por sua vez, foi fragmentado por MS/MS, conforme a Figura 84. Além disso, os íons m/z 2480, 2 e 2423,2 puderam ser identificados como partes menores da digestão em questão (Figura 90).

A digestão com tripsina originou os íons m/z 3320,6 (Figura 84), e seus fragmentos estão elencados na Figura 84.

A análise de todos os espectros MS/MS permitiu chegar a uma estrutura diferenciada dos ciclótídeos. Apesar de apresentar seis cisteínas igualmente aos peptídeos CCK, o peptídeo m/z 3562 não é cíclico e com a disposição das cisteínas diferenciada dos ciclótídeos. Entretanto, é similar ao peptídeo 1WF4 isolado de *Beta vulgaris* (NIELSON et al., 1996).

Assim, a estrutura parcial proposta foi:

KSWRNCSNIA*GKCCSNSCVPHKWICIEG.

A parte verde ilustra a cadeia confirmada por ambas enzimas (tripsina e endoprotease Glu-C) e os demais resíduos necessitam de maior investigação para sua comprovação. Uma alternativa o uso de amostras digeridas em equipamentos com recurso de predição de sequência *online*.

Diante dos preliminares resultados, a estrutura do peptídeo contido em BvA15 necessita de novos estudos com inclusão de outras enzimas para determinação da estrutura completa. Ainda, pode-se determinar que o peptídeo em questão não se trata de um ciclotídeo.

Tabela 18– Sequências parciais obtidos para o peptídeo pertencente à Bva15.

Sequências	Enzimas	Íons
*SWRNCSNIA**KCCSNSCVPHKWICIEG	EndoGlu-C	3910
*****CCSNSCVPHKWICIEG	EndoGlu-C	2480
*****KCCSNSCVPHKWICIEG	EndoGlu-C	2423
KSWRNCSNIA**KCCSNSCVPHK*****	Tripsina	3320
KSWRNCSNIAG*K****CCSNS**CVPHKWICIEG		Sequencia parcial obtida

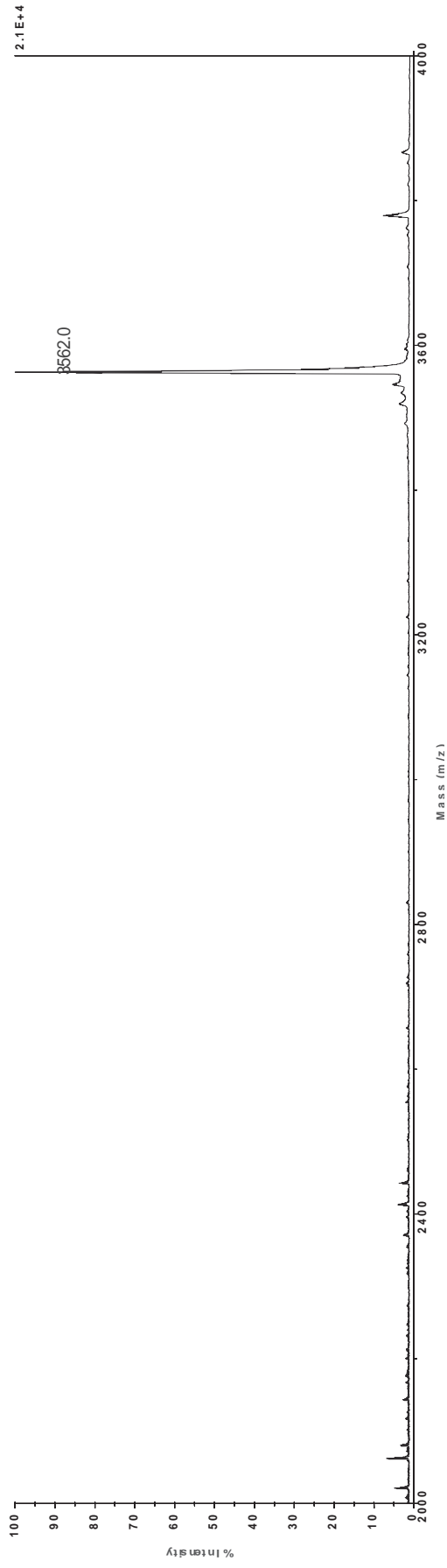
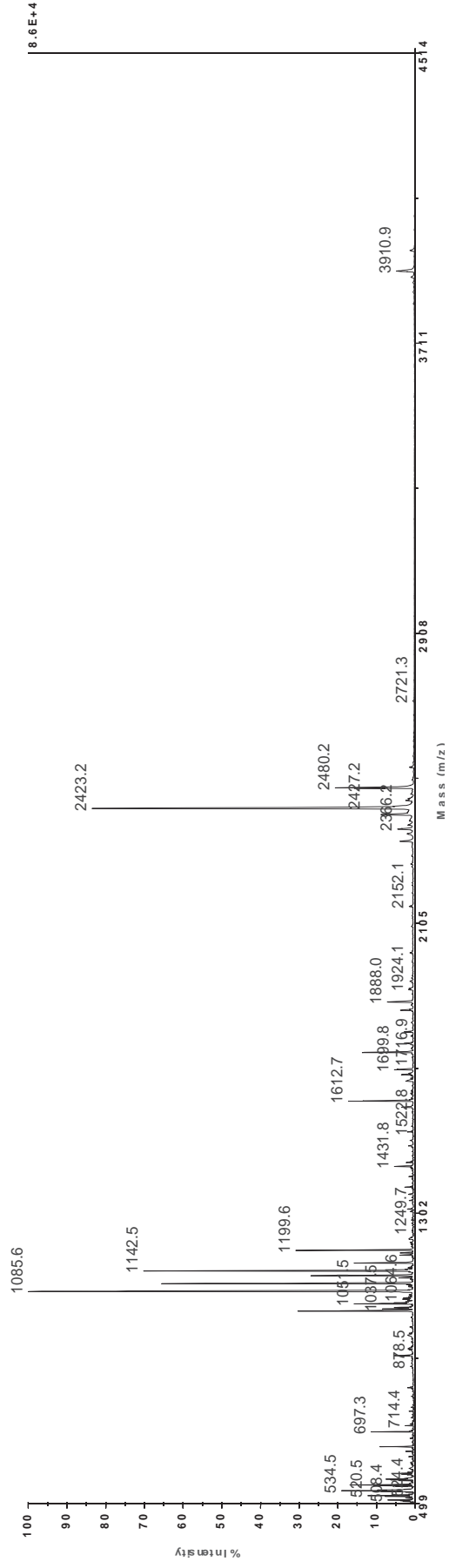
Figura 86 – Espectro de massas da fração pura de BvA15.**Figura 87** – Espectro de massas da fração reduzida, alquilada e digerida BvA15. Enzima EndoGlu-C.

Figura 88 – Espectro de massas da fração reduzida, alquilada e digerida BvA15. Enzima tripsina.

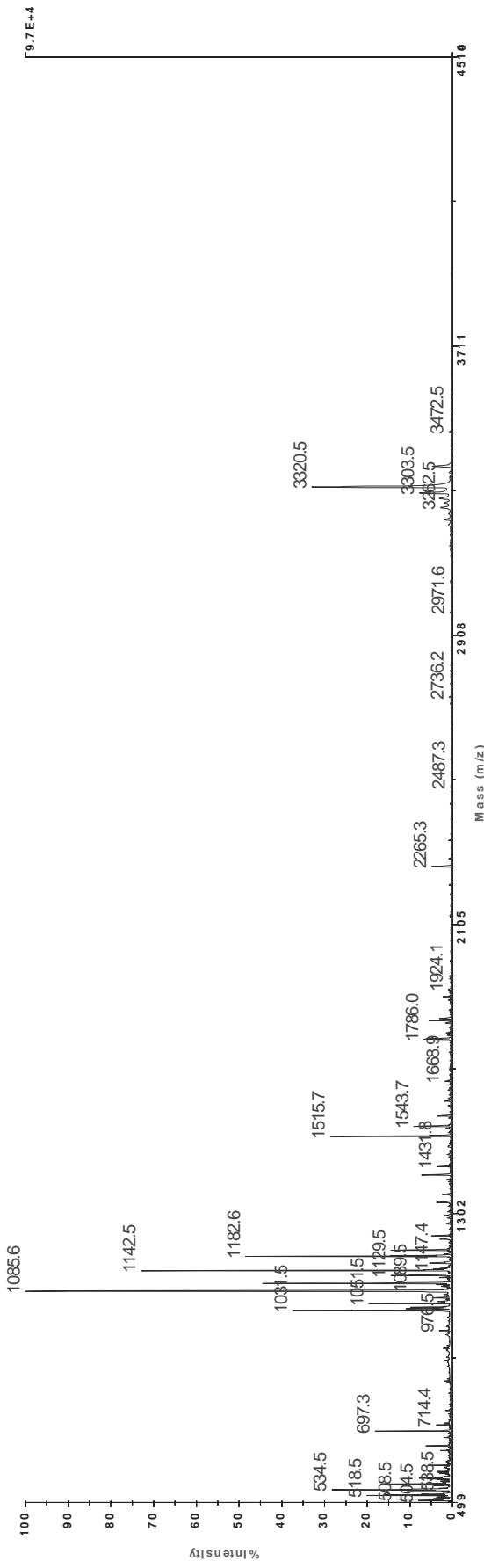


Figura 89 – MS/MS do íon m/z 3910 da fração BvA15, oriunda da digestão EndoGlu-C.

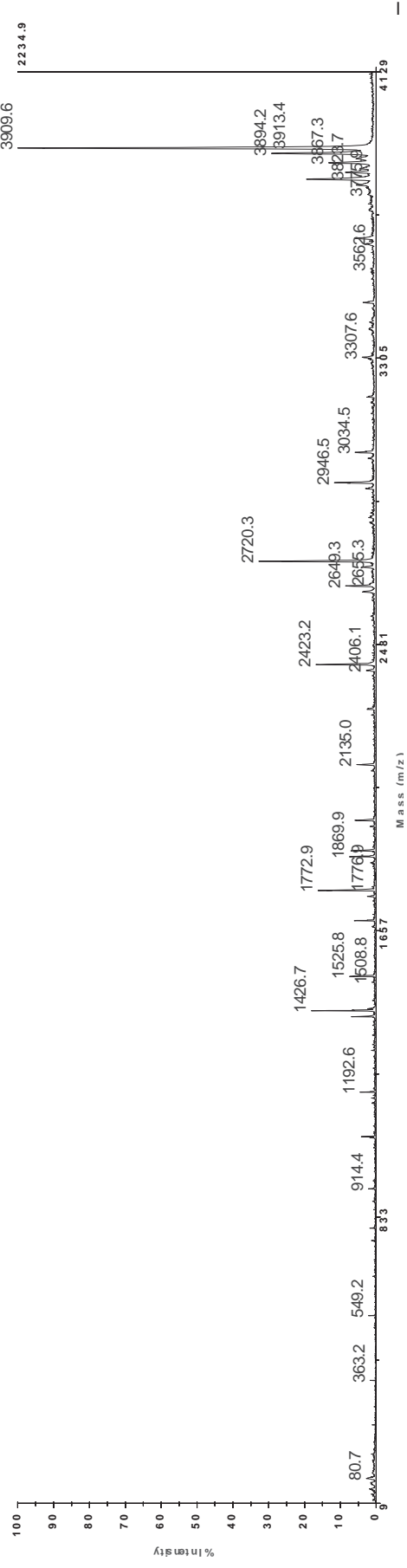
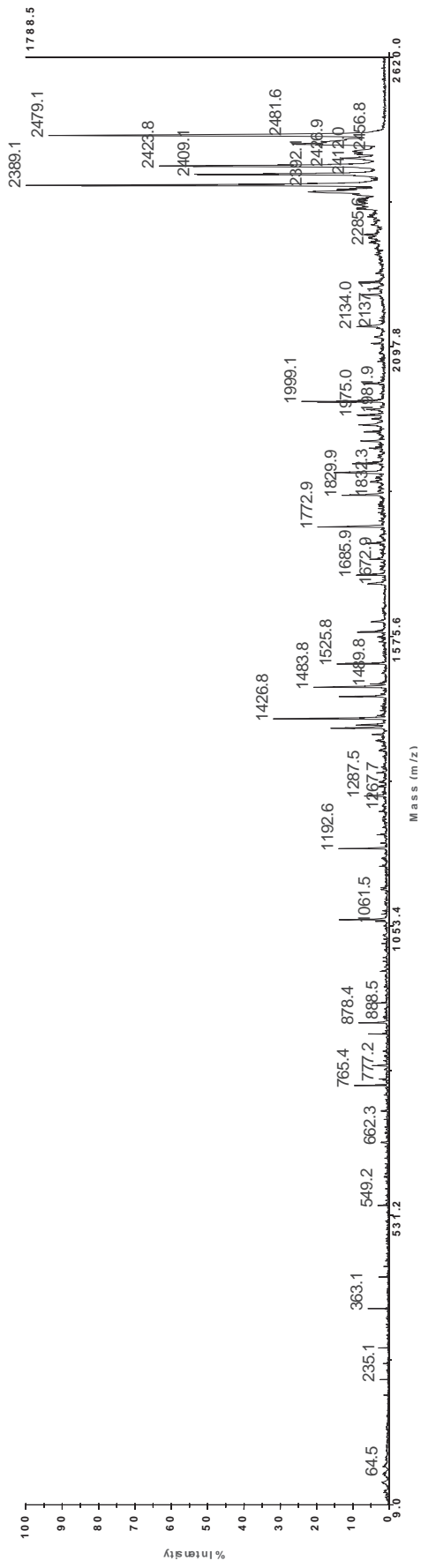
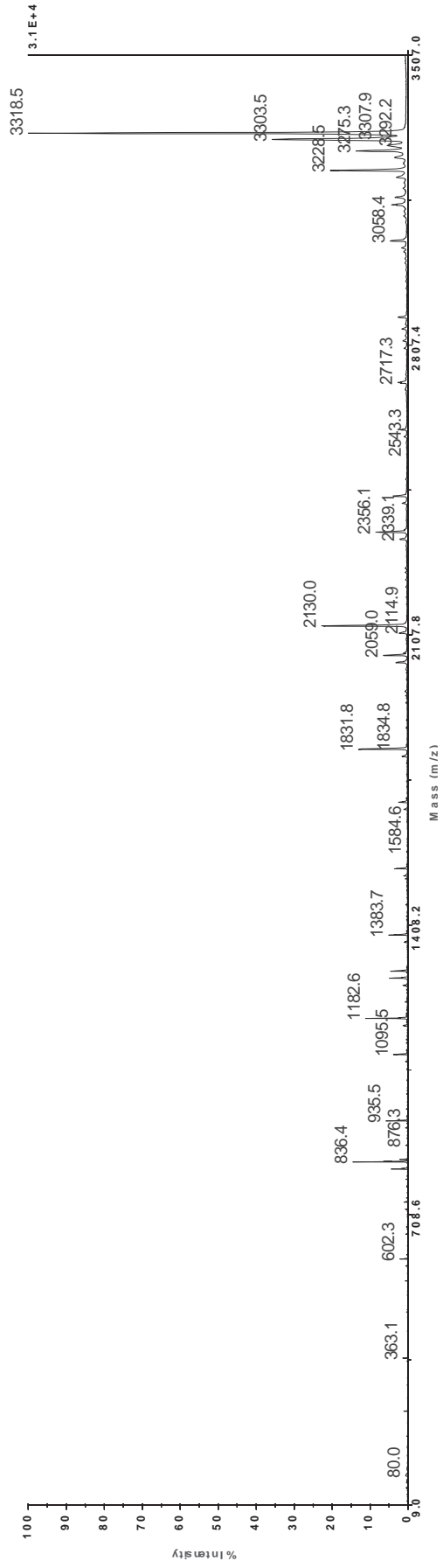


Figura 90 – MS/MS do íon m/z 2480 da fração BvA15, oriunda da digestão EndoGlu-C.**Figura 91** – MS/MS do íon m/z 3320 da fração BvA15, oriunda da digestão trypsina.

CONCLUSÕES

A avaliação de peptídeos cíclicos (orbitídeos) em 24 espécies (Tabela 6, item 4) através de métodos de revelação com os reveladores ninidrina e clorox, permitiu a seleção das espécies: *Erytroxylum caatinga*, *Rolinia leptopetala*, *Erytroxylum revolutum* e *Jatropha ribifolia*, como possíveis biossintetizadoras de peptídeos cíclicos. Entretanto, apenas a espécie *Jatropha ribifolia* foi selecionada para os procedimentos de isolamento.

Os métodos de extração e purificação voltados à orbitídeos permitiram isolar um octapeptídeo de *J. ribifolia* nomeado ribifolina, o qual foi caracterizado por análises de massas, aminoácidos e ressonância magnética nuclear. Sua estrutura demonstrou ser similar a um anel torcido, com base em dados de NOESY e dinâmica molecular. A estrutura de ribifolina, c(ILGSIILG) evidenciou aminoácidos essencialmente lipofílicos, com a ressalva da serina. Esta estrutura e seu análogo linear foram sintetizados por síntese em fase sólida para a realização das avaliações biológicas: antifúngica, citotóxica e antimalárica. Dentre as três atividades analisadas, ribifolina apresentou moderada atividade apenas contra o parasita *Plasmodium falciparum* 3D7. Em comparação ao seu análogo linear, ribifolina demonstrou-se 200 vezes mais ativa, o que evidencia a importância da ciclização desses compostos.

Paralelamente, na tentativa do re-isolamento de ribifolina, um diterpeno tem sido isolado do extrato etanólico de *J. ribifolia*. Após as análises por ressonância magnética nuclear ^1H e ^{13}C , foi determinada uma estrutura como sendo jatrofona, um diterpeno comum no gênero *Jatropha*, porém descrito aqui pela primeira vez nesta espécie.

O estudo de triagem ciclotídeos usando revelador (Tabela 6), permitiu indicar 14 espécies contendo mini-proteínas. Um estudo mais aprofundado utilizando a metodologia específica para extração e análise de ciclotídeos permitiu propor picos referentes à ciclotídeos nas espécies *Hybanthus calceolaria* e *Beta vulgaris*.

Os três órgãos de *Hybanthus* (sementes, folhas e caules) apresentaram ciclotídeos, confirmados pelas reações de redução/acetamidação e digestão. As sementes apresentaram maior concentração desses, quando comparados à folhas e caules.

A fração “rica em ciclotídeos” oriunda das sementes (*HcA*) foi purificada por cromatografia em fase sólida (HPLC, semipreparativa) permitindo o isolamento dos ciclotídeos *HycoA* e *Hyco B*.

HycoA foi identificado como um ciclotídeo da família bracelete, possuindo 29 resíduos de aminoácidos, o que representa uma massa molecular de 3030 kDa.

HycoB, massa molecular m/z 3171, foi elucidado parcialmente, chegando-se à apenas 22 resíduos de sua estrutura.

Os resultados para *Beta vulgaris* apontaram que esta espécie é rica em peptídeos com três e quatro pontes dissulfeto intermoleculares. Bulbo, semente e caule apresentaram íons característicos de ciclotídeos e defensinas.

O bulbo de *B. vulgaris* foi avaliado permitindo o isolamento e identificação da defensina m/z 3562, sequência KSWRNCSNIA*GKCCSNVCVPHKWICIEG, linear com três pontes dissulfeto. Esse estudo, apesar de ser negativo para ciclotídeos nos fornece um interessante caminho na busca por peptídeos do tipo defensinas.

REFERÊNCIAS

ADAMS, P. D.; PANUU, N. S.; READ, R. J.; BRUNGER, A. T. Cross-validated maximum likelihood enhances crystallographic simulated annealing refinement. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 5018-5023, 1997.

ALTEI, W. F. **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.** 2009. 125 f. Dissertação (Mestrado em Química)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

ARNISON, P. G.; BIBB, M. J.; BIERBAUM, G.; BOWERS, A. A.; BUGNI, T. S.; BULAJ, G.; CAMARERO, J. A.; CAMPOPIANO, D. J.; CHALLIS, G. L.; CLARDY, J.; COTTER, P. D.; CRAIK, D. J.; DAWSON, M.; DITTMANN, E.; DONADIO, S.; DORRESTEIN, P. C.; ENTIAN, K. D.; FISCHBACH, M. A.; GARAVELLI, J. S.; GÖRANSSON, U.; GRUBER, C. W.; HAFT, D. H.; HEMSCHEIDT, T. K.; HERTWECK, C.; HILL, C.; HORSWILL, A. R.; JASPARS, M.; KELLY, W. L.; KLINMAN, J. P.; KUIPERS, O. P.; LINK, A. J.; LIU, W.; MARAHIEL, M. A.; MITCHELL, D. A.; MOLL, G. N.; MOORE, B. S.; MÜLLER, R.; NAIR, S. K.; NES, I. F.; NORRIS, G. E.; OLIVERA, B. M.; ONAKA, H.; PATCHETT, M. L.; PIEL, J.; REANEY, M. J. T.; REBUFFAT, S.; ROSS, R. P.; SAHL, H.-G.; SCHMIDT, E. W.; SELSTED, M. E.; SEVERINOV, K.; SHEN, B.; SIVONEN, K.; SMITH, L.; STEIN, T.; SÜSSMUTH, R. D.; TAGG, J. R.; TANG, G. L.; TRUMAN, A. W.; VEDERAS, J. C.; WALSH, C. T.; WALTON, J. D.; WENZEL, S. C.; WILLEY, J. M.; VAN DER DONK, W. A. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. **Natural Products Report**, v. 30, p. 108-160, 2013.

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 cyclophHin. **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, n. 38, p. 11495-11510, 1999.

AVRUTINA, O.; SCHMOLDT, H. U.; GABRIJELCIC-GEIGER, D.; LE NGUYEN, D.; SOMMERHOFF, C. P.; DIEDERICHSEN, U.; KOLMAR, H. Trypsin inhibition by macrocyclic and open-chain variants of the squash inhibitor MCoTI-II. **Biological Chemistry**, v. 386, n. 12, p. 1301-1306, 2005.

BAKLEH, M. E.; SOL, V.; ESTIEU-GIONNET, K.; GRANET, R.; DÉLÉRIS, G.; KRAUSZ, P. An efficient route to VEGF-like peptide porphyrin conjugates via microwave-assisted 'click-chemistry'. **Tetrahedron**, v. 65, n. 36, p. 7385-7392, 2009.

BARAGUEY, C.; BLOND, A.; CAVELIER, F.; POUSSET, J. L.; BODO, B.; AUVIN-GUETTE, C. Isolation, structure and synthesis of chevalierins A, B and C, cyclic peptides from the latex of *Jatropha chevalieri*. **Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v. 18, p. 3033-3039, 1998.

BARAGUEY, C.; BLOND, A.; CAVELIER, F.; POUSSET, J. L.; BODO, B.; AUVIN-GUETTE, C. Isolation, structure and synthesis of mahafacyclin B, a cyclic heptapeptide from the latex of *Jatropha mahafalensis*. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1**, v. 17, p. 2098-2103, 2001.

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.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, A. C. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Editora UFV, 1991. p. 309.

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

BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W.; HERMANS, J. Interaction models for water in relation to protein hydration. In: PULLMAN, B. **Intermolecular forces**. Dordrecht: Springer Science, 1981. p. 331-342.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BOKESCH, H. R.; PANNELL, L. K.; COCHRAN, P. K.; SOWDER, R. C.; McKEE, T. C.; BOYD, M. R. A novel anti-HIV macrocyclic peptide from *Palicourea condensata*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 2, p. 249-250, 2001.

BOTURYN, D.; DEFRANCQ, E.; DOLPHIN, G. T.; GARCIA, J.; LABBE, P.; RENAUDET, O.; DUMY, P. RAFT Nanoconstructs: surfing to biological applications. **Journal of Peptide Science**, v. 14, n. 2, p. 224-240, 2008.

BRUNGER, A. T.; ADAMS, P. D. Molecular dynamics applied to X-ray structure refinement. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, p. 404-412, 2002.

CHUANG, P. H.; HSIEH, P. W.; YANG, Y. L.; HUA, K. F.; CHANG, F. R.; SHIEA, J.; WU, S. H.; WU, Y. C. Cyclopeptides with anti-inflammatory activity from seeds of *Annona montana*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 8, p. 1365-1370, 2008.

CLAESON, P.; GORANSSON, U.; JOHANSSON, S.; LUIJENDIJK, T.; BOHLIN, L. Fractionation protocol for the isolation of polypeptides from plant biomass. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 1, p. 77-81, 1998.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic chemistry**. New York: Oxford University Press, 2001.

COLGRAVE, M. L.; HUANG, Y. H.; CRAIK, D. J.; KOTZE, A. C. Cyclotide interactions with the nematode external surface. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 2160-2166, 2010.

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

CONDIE, J. A.; NOWAK, G.; REED, D. W.; BALSEVICH, J. J.; REANEY, M. J. T.; ARNISON, P. G.; COVELLO, P. S. The biosynthesis of Caryophyllaceae-like cyclic peptides in *Saponaria vaccaria* L. from DNA-encoded precursors. **Plant Journal**, v. 67, p. 682-690, 2011.

CRAIK, D. J. Circling the enemy: cyclic proteins in plant defence. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 328-335, 2009.

CRAIK, D. J. Discovery and applications of the plant cyclotides. **Toxicon**, v. 56, p. 1092-1102, 2010.

CRAIK, D. J.; SIMONSEN, S.; DALY, N. L. The cyclotides: novel macrocyclic peptides as scaffolds in drug design. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v. 5, p. 251-260, 2002.

CRAIK, D. J.; ANDERSON, M. A.; BARRY, D. G.; CLARK, R. J.; DALY, N. L.; JENNINGS, C. V.; MULVENNA, J. Discovery and structures of the cyclotides: novel macrocyclic peptides from plants. **Letters in Peptide Science**, v. 8, n. 3/5, p. 119-128, 2001.

DALY, N. L.; GUSTAFSON, K. R.; CRAIK, D. J. The role of the cyclic peptide backbone in the anti-HIV activity of the cyclotide kalata B1. **FEBS Letters**, v. 574, p. 69-72, 2004.

DALY, N. L.; ROSENGREN, K. J.; CRAIK, D. J. Discovery, structure and biological activities of cyclotides. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 918-30, 2009.

DALY, N. L.; CHEN, B.; NGUYENCONG, P.; CRAIK, D. J. Structure and activity of the leaf-specific cyclotide vhl-2. **Australian Journal of Chemistry**, v. 63, n. 5, p. 771-778, 2010.

DALY, N. L.; ROSENGREN, K. J.; HENRIQUES, S. T.; CRAIK, D. J. NMR and protein structure in drug design: application to cyclotides and conotoxins. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters**, v. 40, n. 4, p. 359-370, 2011.

DALY, N. L.; KOLTAY, A.; GUSTAFSON, K. R.; BOYD, M. R.; CASAS-FINET, J. R.; CRAIK, D. J. Solution structure by NMR of circulin A: a macrocyclic knotted peptide having anti-HIV activity. **Journal of Molecular Biology**, v. 285, p. 333-345, 1999.

DEPRISTO, M. A.; DE BAKKER, P. I. W.; JOHNSON, R. J. K.; BLUNDELL, T. L. Crystallographic refinement by knowledge-based exploration of complex energy landscapes. **Structure**, v. 13, p. 1311-1319, 2005.

DIEDERICH, F.; STANG, P. J.; TYKWINS, R. R. **Modern supramolecular chemistry: strategies for macrocycle synthesis**. Weinheim: Wiley-VCH, 2008.

FINKING, R.; MARAHIEL, M. A. Biosynthesis of nonribosomal peptides. **Annual Review of Microbiology**, v. 58, p. 453-88, 2004.

GERLACH, S. L.; MONDAL, D. The bountiful biological activities of cyclotides. **Chronicles of Young Scientists**, v. 3, p. 169-177, 2012.

GERLACH, S. L.; GÖRANSSON, U.; KAAS, Q.; CRAIK, D. J.; MONDAL, D.; GRUBER, C.W. A systematic approach to document cyclotide distribution in plant species from genomic, transcriptomic and peptidomic analysis. **Biopolymers Peptide Science**, 2013. In press.

GERLACH, S. L.; RATHINAKUMAR, R.; CHAKRAVARTY, G.; GÖRANSSON, U.; WIMLEY, W. C.; DARWIN, S. P.; MONDAL, D. Anticancer and chemosensitizing abilities of cycloviolacin O2 from *Viola odorata* and Psyle cyclotides from *Psychotria leptothyrsa*. **Biopolymers**, v. 94, n. 5, p. 617-625, 2010.

GOULART, M.; SANT'ANA, A. E. G.; LIMA, R. A.; CAVALCANTE, M. G., BRAZ-FILHO, R. Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrolonas A e B. **Química Nova**, v.16, p. 95-100, 1993.

GRAN, L. On the effect of a polypeptide isolated from "Kalata-Kalata" (*Oldenlandia affinis* DC) on the oestrogen dominated uterus. **Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)**, v. 33, n. 5, p. 400-408, 1973.

GRUBER, C. W.; CEMAZAR, M.; ANDERSON, M. A.; CRAIK, D. J. Insecticidal plant cyclotides and related cystine knot toxins. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 561-575, 2007.

GRUBER, C. W.; ELLIOTT, A. G.; IRELAND, D. C.; DELPRETE, P. G.; DESSEIN, S.; GÖRANSSON, U.; TRABI, M.; WANG, C. K.; KINGHORN, A. B.; ROBBRECHT, E.; CRAIK, D. J. Distribution and evolution of circular miniproteins in flowering plants. **The Plant Cell**, v. 2, p. 2471-2783, 2008.

HALLOCK, Y. F.; SOWDER, R. C.; PANNELL, L. K.; HUGHES, C. B.; JOHNSON, D. G.; GULAKOWSKI, R.; CARDELLINA, J. H.; BOYD, M. R. Cycloviolins A-D, anti-HIV macrocyclic peptides from *Leonia cymosa*. **Journal Organic Chemistry**, v. 65, p. 124-128, 2000.

HASHEMPOUR, H.; KOEHBACH, J.; DALY, N. L.; GHASSEMPOUR, A.; GRUBER, C. W. Characterizing circular peptides in mixtures: sequence fragment assembly of cyclotides from a violet plant by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. **Amino Acids**, v. 44, p. 581-595, 2013.

HENRIQUES, S. T.; HUANG, Y-H.; ROSENGREN, K. J.; FRANQUELIM, H. G.; CARVALHO, F. A.; JOHNSON, A.; SONZA, S.; TACHEDJIAN, G.; CASTANHO, M. A. R. B.; DALY, N. L.; CRAIK, D. J. Decoding the membrane activity of the cyclotide kalata B1: the importance of phosphatidylethanolamine phospholipids and lipid organization on hemolytic and anti-HIV activities. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 24231-24241, 2011.

HERNANDES, N. K.; CELI, R.; CONEGLIAN, C.; GODOY, R. L. O.; VITAL, H. C.; FREIRE JUNIOR, M. Testes sensoriais de aceitação da beterraba vermelha (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* L.), cv. Early Wonder, minimamente processada e irradiada. **Química Nova**, v. 27, p. 64-68, 2007.

HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C.; FRAAIJE, J. G. E. M. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computation Chemistry**, v. 18, p. 1463-1472, 1997.

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, n. 6, p. 525-529, 1999.

HORSTEN, S. F. A. J. **Cyclic peptides in the genus Jatropha**. Utrecht: Faculteit Farmacie Universiteit, 1995. p. 239.

HORSTEN, S. F.; VAN DEN BERG, A. J.; KETTENES-VAN DEN BOSCH, J. J.; LEEFLANG, B. R.; LABADIE, R. P. Cyclogossine A: a novel cyclic heptapeptide isolated from the latex of *Jatropha gossypifolia*. **Planta Medica**, v. 62, n. 1, p. 46-50, 1996.

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*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 3, p. 336-338, 2005.

HSIEH, P. W.; CHANG, F. R.; WU, C. C.; LI, C. M.; WU, K. Y.; CHEN, S. L.; YEN, H. F.; WU, Y. C. New cytotoxic cyclic peptides and dianthramide from *Dianthus superbus*. **Journal Natural Products**, v. 67, p. 522-1527, 2004.

HUANG, Y. H.; COLGRAVE, M. L.; DALY, N. L.; KELESHIAN, A.; MARTINAC, B.; CRAIK, D. J. The biological activity of the prototypic cyclotide Kalata B1 is modulated by the formation of multimeric pores. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 31, p. 20699-20707, 2009.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. **Journal Molecular Graphics**, v. 14, p. 33-38. 1996.

INTERNACIONAL 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.

JAGADISH, K.; CAMARERO, J. A. Cyclotides, a promising molecular scaffold for peptide-based therapeutics. **Biopolymers**, v. 94, n. 5, p. 611-616, 2010.

JENNINGS, C.; WEST, J.; WAINE, C.; CRAIK, D. J.; ANDERSON, M. Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. **The Proceedings of the National Academy of Sciences Online (USA)**, v. 98, p. 10614-10619, 2001.

- KAMIMORI, H.; HALL, K.; CRAIK, D. J.; AGUILAR, M. I. Studies on the membrane interactions of the cyclotides kalata B1 and kalata B6 on model membrane systems by surface plasmon resonance. **Analytical Biochemistry**, v. 337, n. 1, p. 149-153, 2005.
- KAUFMANN, H. P.; TOBSCHIRBEL, A. An oligopeptide from linseed. **Chemische Berichte**, v. 92, p. 2805-2809, 1959.
- KIRKPATRICK, S.; GELATT, C. D.; VECCHI, M. P. Optimization by simulated annealing. **Science**, v. 220, p. 671-680, 1983.
- KRAGH, K. M.; NIELSEN, J. E.; NIELSEN, K. K.; DREBOLDT, S.; MIKKELSEN, J. D. Characterization and localization of new antifungal cysteine-rich proteins from *Beta vulgaris*. **Molecular Plant: Microbe Interactions**, v. 8, p. 424-434, 1995.
- KUMAR, A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p. 1-10, 2008.
- LANGE, W.; BRANDENBURG, W. A.; DE BOCK, T. S. M. Taxonomy and cultonomy of beet (*Beta vulgaris* L.). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 130, p. 81-96, 1999.
- LEAL, C. K. A.; AGRA, M. F. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. e *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, p. 5-13, 2005.
- LEE, B.; KROKEN, S.; CHOU, D. Y. T.; ROBERTSE, B.; YODER, O. C.; TURGEON, B. G. Functional analysis of all nonribosomal peptide synthetases in *Cochliobolus heterostrophus* reveals a factor, NPS6, involved in virulence and resistance to oxidative stress. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 3, p. 545-555, 2005.
- LINDHOLM, P.; GORÄNSSON, U.; JOHANSSON, S.; CLAESON, P.; GULLBO, J.; LARSSON, R.; BOHLIN, L.; BACKLUND, A. Cyclotides: a novel type of cytotoxic agents. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, n. 6, p. 365-369, 2002.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil, nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. p. 512.
- LUO, J. G.; WANG, X. B.; MA, L.; KONG, L. Y. Gypsophin: a novel alpha-glucosidase inhibitory cyclic peptide from the roots of *Gypsophila oldhamiana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 4460-4463, 2007.
- MONGKOLVISUT, W.; SUTTHIVAIYAKIT, S.; LEUTBECHER, H.; MIKA, S.; KLAIBER, I.; MOELLER, W.; ROESNER, 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.
- MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cyclic octapeptides from *Stellaria dichotoma* var. *Lanceolata*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 841-845, 1997.
- MORITA, H.; KAYASHITA, T.; SHIMOMURA, M.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cyclic peptides from higher plants. Part 24. Yunnanin C, a novel cyclic heptapeptide from *Stellaria yunnanensis*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 3, p. 280-282, 1996.

MORITA, H.; SHISHIDO, A.; KAYASHITA, S.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cyclic peptides from higher plants. Part 39. Dichotomins F and G, cyclic peptides from *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 4, p. 404-407, 1997.

MORITA, H.; LIZUKA, 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, n. 11, p. 1686-1688, 2005.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAPOLITANO, A.; RODRIGUEZ, M.; BRUNO, I.; MARZOCCO, S.; AUTORE, G.; RICCIO, R.; GOMEZ P. L. Synthesis, structural aspects and cytotoxicity of the natural cyclopeptides yunnanins A, C and phakellistatins 1, 10. **Tetrahedron**, v. 59, n. 51, p. 10203-10211, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NGUYEN, G. K.; ZHANG, S. Z.; NGUYEN, T. K.; NGUYEN, P. Q. T.; CHIU, M. S.; HARDJOJO, A.; TAM, J. P. Discovery and characterization of novel cyclotides originated from chimeric precursors consisting of albumin-1 chain a and cyclotide domains in the Fabaceae family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 24275-24287, 2011.

NIELSEN, K. K.; NIELSEN, J. E.; MADRID, S. M.; MIKKELSEN, J. D. New antifungal proteins from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) showing homology to non-specific lipid transfer proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 31, p. 539-552, 1996.

OLIVEIRA, L. I.; JABOUR, F. F.; NOGUEIRA, V. A.; YAMASAKI, E. M. Intoxicação experimental com as folhas de *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae) em ovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v. 28, p. 275-278, 2008.

OVESEN, R.; GÖRANSSON, U.; HANSEN, S.; NIELSEN, J.; HANSEN, H. A liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method for quantification of cyclotides in plants avoiding sorption during sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7964-7970, 2012.

PESTANA-CALSA, M. C.; CALSA, T. Jr. In silico identification of plant-derived antimicrobial peptides. In: YANG, M-S. **Systems and computational biology: molecular and cellular experimental systems**. Shangai: Intech, 2011. Cap. 17, p. 249-272.

PICCHI, D. G. **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.

PICCHI, D. G.; ALTEI, W. F.; SAITO, M. S.; BOLZANI, V. S.; CILLI, E. M. Cyclic peptide from plant biomass: chemical features and diversity, biosynthesis and biological activities. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1262-1277, 2009.

PIMENTEL, L. A.; RIET-CORREA, B.; DANTAS, A. F.; MEDEIROS, R. M. T.; RIET-CORREA, F. Poisoning by *Jatropha ribifolia* in goats. **Toxicon**, v. 59, p. 587-591, 2012.

PINTO, M. F.; FENSTERSEIFER, I. C.; MIGLIOLO, L.; SOUSA, D. A.; DE CAPDVILLE, G.; ARBOLEDA-VALENCIA, J. W.; COLGRAVE, M. L.; CRAIK, D. J.; MAGALHÃES, B. S.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Identification and structural characterization of novel cyclotide with activity against an insect pest of sugar cane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 134-147, 2012.

PINTO, M. S. **Identificação molecular e caracterização estrutural de ciclótideo de *Palicourea Rigida* com potencial inseticida**. 2010. 144 f. Dissertação (Mestrado Ciência Genômica e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF., 2010.

PLAN, M. R.; ROSENGREN, K. J.; SANDO, L.; DALY, N. L.; CRAIK, D. J. Structural and biochemical characteristics of the cyclotide kalata B5 from *Oldenlandia affinis*. **Biopolymers**, v. 94, n. 5, p. 647-658, 2010.

PLAN, M. R. R.; GÖRANSSON, U.; CLARK, R. J.; DALY, N. L.; COLGRAVE, M. L.; CRAIK, D. J. The cyclotide fingerprint in *Oldenlandia affinis*: elucidation of chemically modified, linear and novel macrocyclic peptides. **ChemBiochem**, v. 8, p. 1001-1111, 2007.

PRANTING, M.; LOOV, C.; BURMAN, R.; GÖRANSSON, U.; ANDRESSON, D. I. The cyclotide cycloviolacin O2 from *Viola odorata* has potent bactericidal activity against Gram-negative bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 9, p. 1964-1971, 2010.

ROSENGREN, K. J.; DALY, N. L.; PLAN, M. R.; WAINE, C.; CRAIK, D. J. Twists, knots, and rings in proteins. Structural definition of the cyclotide framework. **Journal Biology Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8606-8616, 2003.

SABANDAR, C. W.; AHMAT, N.; JAAFAR, F. M.; SAHIDIN, I. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): a review. **Phytochemistry**, v. 85, p. 7-29, 2013.

SAETHER, O.; CRAIK, D. J.; CAMPBELL, I. D.; SLETTEN, K.; JUUL, J.; NORMAN, D. G. Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. **Biochemistry**, v. 4, p. 4147-4158, 1995.

SAKAKIBARA, S. Synthesis of large peptides in solution. **Biopolymers** 1, v. 37, p. 17-28, 1995.

SANDBERG, F. Étude sur les plantes médicinales et toxiques d'Afrique Équatoriale. **Cahiers de la Maboké**, v. 3, n. 1, p. 5-49, 1965.

SCHUCK, D. C.; RIBEIRO, R. Y.; NERY, A. A.; ULRICH, H.; GARCIA, C. R. S. Flow cytometry as a tool for analyzing changes in *Plasmodium falciparum* cell cycle following treatment with indol compounds. **Cytometry Part A**, v. 79A, p. 959-964, 2011.

- SHEVCHENKO, A.; JENSEN, O. N.; PODTELEJNIKOV, A. V.; SAGLIOCCO, F.; WILM, M.; VORM, O.; MORTENSEN, P.; SHEVCHENKO, A.; BOUCHERIE, H.; MANN, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 25, p. 14440-14445, 1996.
- SIEMION, I. Z.; CEBRAT, M.; WIECZOREK, Z. Cyclolinopeptides and their analogs a new family of peptide immunosuppressants affecting the calcineurin system. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 47, n. 3, p. 143-53, 1999.
- SILVA, R. C. P.; MAIA, S. S. S.; COELHO, M. F. B.; SILVA, F. N.; CANDIDO, W. S. Propagação vegetativa de ipeca-branca (*Hybanthus calceolaria* (L.) Schulze-Menz - Violaceae) utilizando diferentes substratos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 6, p. 186-191, 2011.
- SIMONSEN, S. M.; SANDO, L.; IRELAND, D. C.; COLGRAVE, M. L.; BHARATHI, R.; GÖRANSSON, U.; CRAIK, D. J. A continent of plant defense peptide diversity: cyclotides in Australian *Hybanthus* (Violaceae). **The Plant Cell**, v. 17, p. 3176-3189, 2005.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer - drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.
- SLETTEN, K.; GRAN, L. Some molecular properties of kalata peptide B-1. A uterotonic polypeptide from *Oldenlandia affinis* DC. **Meddelelser fra Norsk Farmaceutisk Selskap**, v. 7, n. 8, p. 69-82, 1973.
- STEVENS, P. F. **Angiosperm phylogeny website**. Version 12., 2012 . Disponível em : < <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em: 07 jul. 2013.
- SVANGARD, E.; GÖRANSSON, U.; HOCAOGLU, Z.; GULLBO, J.; LARSSON, R.; CLAESON, P.; BOHLIN, L. Cytotoxic cyclotides from *Viola tricolor*. **Journal of Natural Product**, v. 67, n. 2, p. 144-147, 2004.
- TAM, J. P.; LU, Y. A.; YANG, J. L.; CHIU, K. W. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. **The Proceedings of the National Academy of Sciences Online (USA)**, v. 96, n. 16, p. 8913-8918, 1999.
- TAN, N. H.; ZHOU, J. Plant cyclopeptides. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 3, p. 840-895, 2006.
- TANG, J.; WANG, C. K.; PAN, X.; YAN, H.; ZENG, G.; XU, W.; HE, W.; DALY, N. L.; CRAIK, D. J.; TAN, N. Isolation and characterization of bioactive cyclotides from *Viola labrilarica*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, n. 11, p. 2287-2295, 2010a.
- TANG, J.; WANG, C. K.; PAN, X.; YAN, H.; ZENG, G.; XU, W.; HE, W.; DALY, N. L.; CRAIK, D. J.; TAN, N. Isolation and characterization of cytotoxic cyclotides from *Viola tricolor*. **Peptides**, v. 31, n. 8, p. 1434-1440, 2010b.

TIAN, J. M.; SHEN, Y. H.; YANG, X. W.; LIANG, S.; TANG, J.; SHAN, L.; ZHANG, W. D. Tunicyclin A, the first plant tricyclic ring cycloheptapeptide from *Psammosilene tunicoides*. **Organic Letters**, v. 11, n. 5, p. 1131-1133, 2009.

TRABI, M.; CRAIK, D. J. Tissue-specific expression of head-to-tail cyclized miniproteins in Violaceae and structure determination of the root cyclotide *Viola hederacea* root cyclotide1. **Plant Cell**, v. 16, p. 2204-2216, 2004.

TYNDALL, J. D. A.; NALL, T.; FAIRLIE, D. P. Proteases universally recognize beta strands in their active sites. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 973-999, 2005.

VAN DEN BERG, A. J.; HORSTEN, S. F.; 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. 215-218, 1995.

VAN DEN BERG, A. J.; HORSTEN, S. F.; KETTENES-VAN DEN BOSCH, J. J.; BEUKELMAN, C. J.; KROES, B. H.; LEEFLANG, B. R.; LABADIE, R. P. Podacycline A and B, two cyclic peptides in the latex of *Jatropha podagrica*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 129-133, 1996.

WANG, C. K.; KAAS, Q.; CHICHE, L.; CRAIK, D. J. CyBase: a database of cyclic protein sequences and structures, with applications in protein discovery and engineering. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. D206-D210, Jan. 2008.

WANG, C. K. L.; CLARK, R. J.; HARVEY P. J.; ROSENGREN, K. J.; CEMAZAR, M.; CRAIK, D. J. The role of conserved glu residue on cyclotide stability and activity: a structural and functional study of kalata B12, a naturally occurring Glu to Asp mutant. **Biochemistry**, v. 50, n. 19, p. 4077-4086, 2011.

WEBSTER, G.L. Classification of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, p. 3-143, 1994.

WÉLÉ, A.; NDOYE, I.; ZHANG, Y.; BROUARD, J-P.; POUSETT, J-L.; BODO, B. Glaucacyclopeptide A from the seeds of *Annona glauca*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 10, p. 1154-1157, 2005.

WHITE, C. J.; YUDIN A. K. Contemporary strategies for peptide macrocyclization. **Nature Chemistry**, v. 3, p. 509-524, 2011.

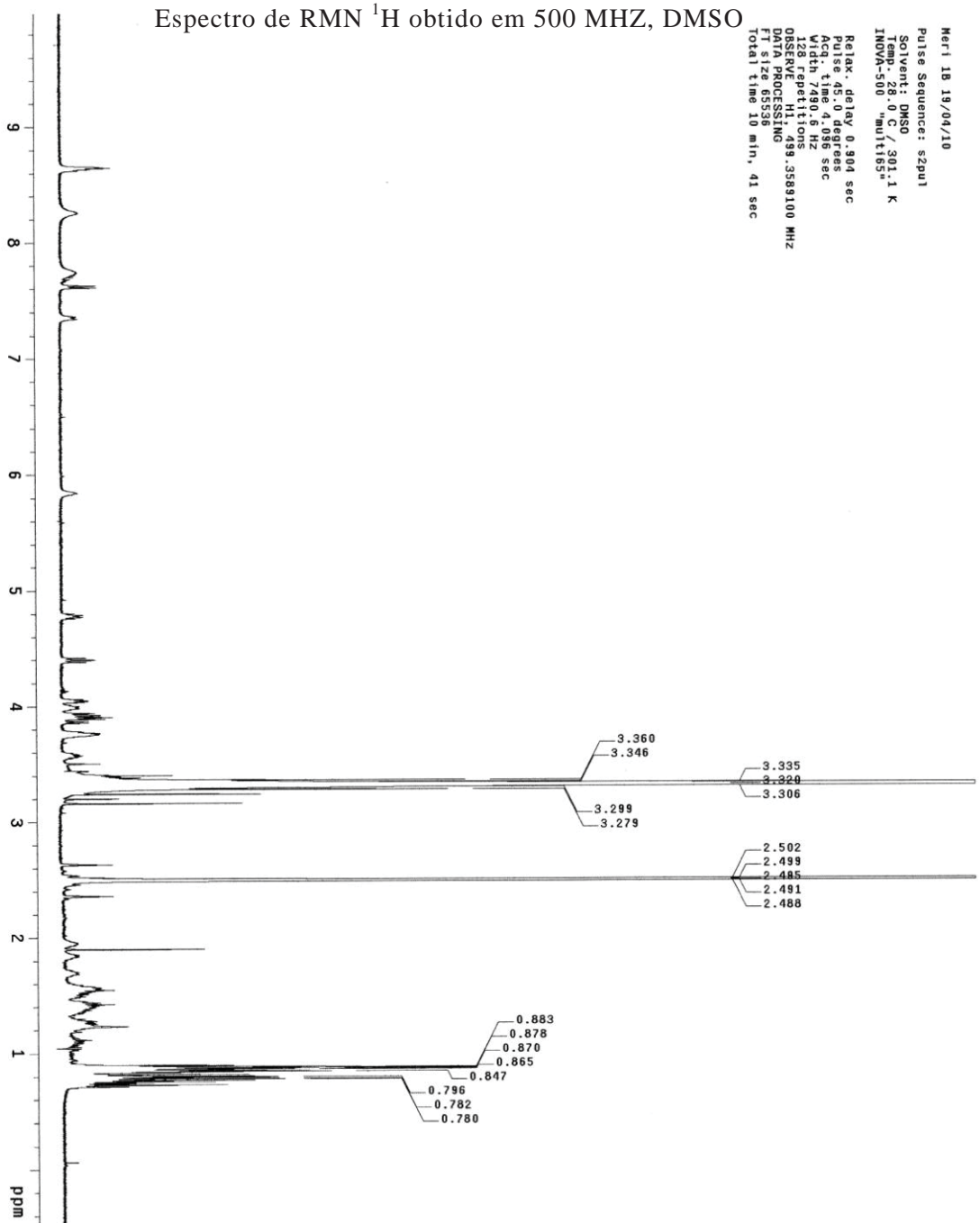
WIECZOREK, Z.; BENGTSSON, B.; TROJNAR, J.; SIEMION, I. Z. Immunosuppressive activity of cyclolinopeptide A. **Peptide Research**, v. 4, p. 275-283, 1991.

WITHERUP, K. M.; BOGUSKY, M. J.; ANDERSON, P. S.; RAMJIT, H.; RANSOM, R. W.; WOOD, T.; SARDANA, M. Cyclopsychotride A, a biologically active, 31-residue cyclic peptide isolated from *Psychotria longipes*. **Journal of Natural Product**, v. 57, n. 12, p. 1619-1625, 1994.

YAMANAKA, K.; MARUYAMA, C.; TAKAGI, H.; HAMANO, Y. ϵ -Poly-L-lysine dispersity is controlled by a highly unusual nonribosomal peptide synthetase. **Nature Chemical Biology**, v. 4, p. 766-772, 2008.

YUN, Y. S.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cyclic peptides from higher plants. 34. Segetalins G and H, structures and estrogen-like activity of cyclic pentapeptides from *Vaccaria segetalis*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 3, p. 216-218, 1997.

ANEXOS I. RIBIFOLINA NATURAL



ANEXOS II. RIBIFOLINA SINTÉTICA

Espectro de RMN ¹H obtido em 500 MHz, DMSO

