

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 10/03/2022.

**Antonio Fernández Bobey**

**Ciclotídeos de *Noisettia orchidiflora* e *Anchietea pyrifolia*:  
Isolamento, caracterização e avaliação de atividades  
biológicas**

Tese apresentada ao Instituto de  
Química, Universidade Estadual Paulista  
Júlio de Mesquita Filho, como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de  
Doutor em Química

**Orientadora:** Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani

**Araraquara  
2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

F363c Fernández Bobey, Antonio  
Ciclotídeos das espécies *Noisettia orchidiflora* e  
*Anchietea pyrifolia*: isolamento, caracterização e avaliação  
das atividades biológicas / Antonio Fernández Bobey. –  
Araraquara: [s.n.], 2020  
156 p.: il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química  
Orientadora: Vanderlan da Silva Bolzani

1. Ciclotídeos. 2. Violaceae. 3. Espectrometria de  
massa. 4. LC-MS. 5. Peptídeos cíclicos. I. Título.

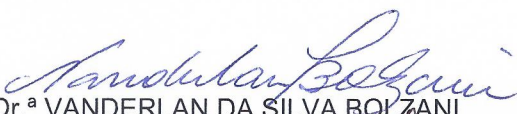
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**


TÍTULO DA TESE: "Ciclotídeos das espécies *Noisettia orchidiflora* e *Anchietea pyrifolia*: Isolamento, caracterização e avaliação das atividades biológicas"

**AUTOR: ANTONIO FERNÁNDEZ BOBEY**


**ORIENTADORA: VANDERLAN DA SILVA BOLZANI**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> VANDERLAN DA SILVA BOLZANI  
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Prof. Dr. HUMBERTO MARCIO SANTOS MILAGRE  
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO  
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> MÔNICA TALLARICO PUPO  
Departamento de Ciências Farmacêuticas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto

  
Prof. Dr. PAULO CÉZAR VIEIRA  
Departamento de Física e Química / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 10 de março de 2020

## DADOS CURRICULARES

**Nome:** Antonio Fernández Bobey

**Nome em citações bibliográficas:** BOBEY, A. F.; FERNANDEZ-BOBEY, A.

**Nascimento:** 14/03/1986

**Naturalidade:** La Habana/Cuba

**E-mail para contato:** tonyfdez23@gmail.com

**Endereço profissional:** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Instituto de Química de Araraquara. Departamento de Química Orgânica (NuBBE). Rua Prof. Francisco Degni, 55. CEP: 14800-060. Araraquara/SP-Brasil.

## FORMAÇÃO ACADÊMICA

**Doutorado em Química** UNESP- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara/SP. Período: março 2016- fevereiro 2020. Título da tese: Ciclotídeos de *Noisettia orchidiflora* e *Anchietea pyrifolia* (Violaceae): Isolamento, caracterização e avaliação de atividades biológicas. Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanderlan da Silva Bolzani. Bolsa: CNPq (Processo 142286/2016-8).

**Mestrado em Química** UNESP- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara/SP. Período: março 2014- fevereiro 2016. Título da dissertação: Isolamento e caracterização de ciclotídeos da espécie *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Ging. Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanderlan da Silva Bolzani, Co-orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro. Bolsa: CNPq (Processo 133418/2014-6).

**Graduação em Química** - Universidad de La Habana (UH), La Habana/Cuba. Período: setembro 2005- julho 2010. Título do trabalho de conclusão de curso: Triterpenos pentacíclicos con potencial actividad antiinflamatoria aislados de la especie *Maytenus elaeodendroides*. Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iraida Spengler Salabarría.

## PRODUÇÃO

### Artigos completos publicados em periódicos

1. CALIXTO, N. O.; PINTO, M. E. F.; RAMALHO, S. D.; BURGER, M. C. M.; BOBEY, A. F.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S.; PINTO, A. C. The Genus *Psychotria*: Phytochemistry, Chemotaxonomy, Ethnopharmacology and Biological Properties. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 27, p. 1355-1378, 2016.

2. PINTO, M. E. F.; GARAVITO, J. N. Z; MAGALHÃES, L. G.; BOBEY, A. F.; MENDONÇA, J. N.; LOPES, N. P.; LEME, F. M.; TEIXEIRA, S. P.; TROVÓ, M.; ANDRICOPULO, A. D.; KOEHBACH, J. GRUBER, C. W.; CILLI, E. M.; BOLZANI, V. S. Inhibition of Breast Cancer Cell Migration by Cyclotides Isolated from *Pombalia calceolaria*. **J. Nat. Prod.**, v. 81, p. 1203-1208, 2018.

3. BOBEY, A. F.; PINTO, M. E. F.; CILLI, E. M.; LOPES, N. P.; BOLZANI, V. S. A Cyclotide Isolated from *Noisettia orchidiflora* (Violaceae). **Planta Med.**, v. 84, p. 947-952, 2018.

4. QUEIROZ, S. A.; PINTO, M. E. F.; BOBEY, A. F.; RUSSO, H. M.; BATISTA, A. N. L.; BATISTA Jr, J. M.; CODO, A. C.; MEDEIROS, A. I.; BOLZANI, V. S. Diterpenoids with inhibitory activity of nitrite production from *Croton floribundus*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 249, p. 112320, 2020.

5. FERNANDEZ-BOBEY, A.; SOUZA, B. M.; PINTO, M. E. F.; MIOTELO, L.; DIAS, N. B.; PAULA-SOUZA, J.; CILLI, E. M.; LOPES, N. P.; MALASPINA, O.; PALMA, M. S.; BOLZANI, V. S. Insecticidal cyclotides from *Anchietea pyrifolia* a South American medicinal plant species. **J. Nat. Prod.**, submitted, 2020.

6. FERNANDEZ-BOBEY, A.; HERNANDEZ-TORRIENTE, A.; GARCIA-PEREZ, T.; SPENGLER-SALABARRIA, I. Triterpenes with anti-inflammatory activity isolated from the bark of the endemic species *Maytenus elaeodendroides*, Griseb. **Rev. Cubana Quim.**, ahead of print, 2020.

#### **Trabalhos recentes publicados em anais de eventos científicos**

1. PINTO, M. E. F.; BOBEY, A. F.; GARAVITO, J. N. Z; MAGALHÃES, L. G.; ANDRICOPULO, A. D.; LOPES, N. P.; BOLZANI, V. S. Biologically Active Cyclotides from Rubiaceae and Violaceae from the Brazilian Biodiversity. In: 46<sup>th</sup> World Chemistry Congress/ IUPAC 49<sup>th</sup> General Assembly, 2017, São Paulo, Brasil.

2. BOBEY, A. F.; PINTO, M. E. F.; BOLZANI, V. S. First cyclotides from *Anchietea pyrifolia*. In: 6th BCNP Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM, 2017, Vitória-ES, Brasil.

3. QUEIROZ, S.; BOBEY, A. F.; BOLZANI, V. S. Novel clerodane diterpenoid from *Croton floribundus* (Euphorbiaceae). In: 6th BCNP Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM, 2017, Vitória-ES, Brasil.

4. BOBEY, A. F.; QUEIROZ, S. A. S.; PINTO, M. E. F, CODO, A. C.; MEDEIROS, A. I.; BOLZANI, V. S. Diterpenos com potencial anti-inflamatório em *Croton floribundus* (Euphorbiaceae). XII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia/XVII Simpósio Latinoamericano de Farmacobotânica, 2019, Petrópolis-RJ, Brasil.

## **PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS**

- 9ª Reunião de Avaliação do PROGRAMA BIOTA-FAPESP, 2017, São Pedro-SP.
- 6th BCNP Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM, 2017, Vitória-ES, Brasil.
- Workshop: Uso Estratégico de Patentes em Projetos de P&D e Negócios, Foco em Informações Tecnológicas, 2018, FCFar-UNESP, Araraquara-SP, Brasil.
- XII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia/XVII Simpósio Latinoamericano de Farmacobotânica, 2019, Petrópolis-RJ, Brasil.
- 1ª Reunião de Avaliação do PROGRAMA INCT BioNat, 2019, São Pedro-SP.

## **Outros**

- Participação no curso: **Aplicação da Espectrometria de Massas em Interações Ecológicas** (Carga horária: 8h), 2017, BIOTA-FAPESP, São Pedro-SP, Brasil.
- Participação nas atividades relacionadas ao INCT BioNat, no contexto da Semana Nacional de Ciência e Tecnologia (SNCT), 2018, Araraquara-SP, Brasil.

## AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente aos meus pais, irmão e esposa pelo amor incondicional, apoio nos momentos difíceis e por serem minha inspiração para finalizar esta etapa. Amo vocês!!!

À minha orientadora Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani agradeço pela confiança, apoio e pelos bons momentos que tivemos no decorrer deste trabalho. Obrigado por tudo.

À Dra. Meri Emili Ferreira Pinto pelos ensinamentos, ajuda e amizade ao longo desses anos.

Ao professor Mario Sergio Palma pelas discussões, ensinamentos e amizade que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao professor Norberto Peporine Lopes, pelas análises de MALDI-TOF realizadas no seu laboratório.

Ao professor Eduardo Cilli pelos ensinamentos e ajuda durante a realização deste trabalho.

Às Dra. Bibiana Monson de Souza e Dra. Nathalia Baptista Dias pela ajuda nos momentos difíceis, os experimentos realizados e pela amizade.

À Dra. Jacqueline Nakau Mendonça pela amizade e ajuda na realização das análises de espectrometria de massas.

Aos professores Juliana de Paula-Souza e Marcelo Trovó pela colaboração na coleta e identificação das espécies vegetais.

Aos amigos da Pós-graduação Nathalia Vieira, Julia Monfardini, Ana Zanata, Vaninha, Paulo Sanches e Gustavo Monteiro pelos ensinamentos, amizade e pelos momentos de descontração.

A Vilma Pestana por me acolher como um filho adotivo e pela ajuda inestimável nos momentos difíceis. Muito obrigado!!!

À minha família brasileira (Dalva, Alcides e Rafael) pela amizade, ajuda incondicional e por me fazerem sentir em casa, a vocês minha eterna gratidão!!!

Aos professores do Instituto de Química pelos conhecimentos transmitidos.

Aos técnicos Juliana Rodrigues, João Bronzel e Nivaldo Borale pela ajuda inestimável.

Aos membros da banca pelas sugestões, correções e valiosas contribuições.

Aos funcionários da Biblioteca e da Pós-Graduação por serem tão gentis e eficientes.



Aos professores e alunos do grupo NuBBE pela amizade e ajuda para realização deste trabalho.

Às agências de fomento CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

À CNPq, pela bolsa de estudo concedida.

## RESUMO

Ciclotídeos são peptídeos cíclicos de fonte vegetal biossintetizados via ribossomal, apresentam massa molecular entre 2,8-3,7 kDa, contendo seis resíduos de cisteína conservados e envolvidos na formação de um arranjo único conhecido como nó de cistina cíclico (*cyclic cystine knot*, CCK). Esse arranjo é responsável por sua estabilidade térmica, química e enzimática. Diversas atividades biológicas foram relatadas para esta classe de peptídeos, incluindo propriedades inseticidas, anti-helmínticas e moluscidas, sugerindo que sua função biológica está relacionada à defesa de plantas. Até o momento, essas substâncias foram identificadas em cinco famílias vegetais: Violaceae, Rubiaceae, Cucurbitaceae, Solanaceae e Fabaceae. Neste trabalho foram realizados o isolamento, caracterização e avaliação das atividades biológicas dos ciclotídeos presentes em duas espécies vegetais da família Violaceae: *Anchietea pyrifolia* e *Noisettia orchidiflora*. Após o processo de extração dos constituintes químicos, foi realizada uma pré-purificação por meio de cromatografia em coluna com octadecilsilano, como fase estacionária, permitindo a obtenção das frações peptídicas de cada espécie. Estas frações enriquecidas foram analisadas por meio da técnica LC-ESI-IT-MS confirmando a presença de peptídeos na faixa de massa de 2,8-3,7 kDa e a análise dos resultados permitiu a anotação de 35 ciclotídeos na espécie *N. orchidiflora* e 48 na *A. pyrifolia*. Este resultado motivou o isolamento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de cinco substâncias da espécie *A. pyrifolia* (1-5) e quatro da *N. orchidiflora* (6-9). O sequenciamento *de novo* foi realizado por digestão enzimática com endoproteínase Glu-C, tripsina e quimiotripsina, seguido por análise de MALDI-TOF/TOF-MS. Os espectros foram cuidadosamente examinados e as sequências foram propostas, com base na presença das séries de íons *b* e *y* (fragmentos N e C-terminais); desta forma foi possível determinar a sequência dos ciclotídeos cyO4 (1), cyO17 (2), apy A (3), apy B (4), cter 15 (5), nor E (6), nor F (7), nor G (8) e vhr1 (9). Experimentos *in vivo* de injeção abdominal sobre a abelha africanizada *Apis mellifera* indicaram atividade inseticida para as substâncias 1 e 3. O nível de toxicidade destes ciclotídeos foi calculado de acordo com a análise dose-resposta pelo método Probit e expresso como concentração letal média (CL<sub>50</sub>), sendo suas CL<sub>50</sub> de 76 e 262 µM, respectivamente. Citotoxicidade dos ciclotídeos 1, 2, 3 e 4 também foi avaliada em eritrócitos humanos. Apy A (3) apresentou dose hemolítica média (DH<sub>50</sub>) de 22 µM, enquanto que 1, 2 e 4 apresentaram baixa atividade na máxima concentração testada, com DH<sub>50</sub> > 156 µM.

**Palavras-chave:** Ciclotídeos. *Apis mellifera*. Violaceae. Atividade inseticida. Atividade hemolítica. Sequenciamento *de novo*. *Noisettia orchidiflora*. *Anchietea pyrifolia*.

## ABSTRACT

Cyclotides are ribosomal cyclic peptides found only in some plant taxa, they have a molecular mass among 2.8-3.7 kDa, with six conserved cysteine residues involved in the formation of a unique arrangement known as cyclic cystine knot (CCK). This arrangement is responsible for its thermal, chemical and enzymatic stability. Several biological activities have been reported for this class of peptides, including insecticidal, anthelmintic and molluscicidal properties, suggesting that their biological functions are related to plant defense. To date, these compounds have been identified in five taxonomic groups: Violaceae, Rubiaceae, Cucurbitaceae, Solanaceae and Fabaceae. This research work deals on isolation, characterization and biological activities of cyclotides present in two plant species of the Violaceae: *Anchietea pyrifolia* and *Noisettia orchidiflora*. After initial extracting procedures, a pre-purification was performed by means of column chromatography with octadecylsilane, as a stationary phase, which allowed obtaining the peptide fractions of each species. These enriched fractions were analyzed using the LC-ESI-IT-MS technique to confirm the presence of peptides in the mass range of 2.8-3.7 kDa, the analysis of the results allowed the annotation of 35 cyclotides in species *N. orchidiflora* and 48 in *A. pyrifolia*. This result motivated the isolation by High Performance Liquid Chromatography of five compounds of the species *A. pyrifolia* (**1-5**) and four of *N. orchidiflora* (**6-9**). The *de novo* sequencing was performed by enzymatic digestion with endoproteinase Glu-C, trypsin and chymotrypsin, followed by MALDI-TOF/TOF-MS analysis. The spectra were carefully examined and the sequences were proposed, based on the presence of the series of ions *b* and *y* (fragments N and C-terminal); in this way it was possible to determine the sequence of the cyO4 (**1**), cyO17 (**2**), apy A (**3**), apy B (**4**), cter 15 (**5**), nor E (**6**), nor F (**7**), nor G (**8**) and vhr1 (**9**). *In vivo* experiments of abdominal injection on the Africanized bee *Apis mellifera* indicated insecticidal activity for compounds **1** and **3**. The toxicity level of these cyclotides were calculated according to the dose-response analysis by the Probit method and expressed as average lethal concentration (LC<sub>50</sub>), with its LC<sub>50</sub> of 76 and 262 μM, respectively. Cytotoxicity of cyclotides **1**, **2**, **3** and **4** was also evaluated in human erythrocytes. Apy A (**3**) had a mean hemolytic dose (HD<sub>50</sub>) of 22 μM, while **1**, **2** and **4** had low activity at the maximum concentration tested, with HD<sub>50</sub>> 156 μM.

**Keywords:** Cyclotides. *Apis mellifera*. Violaceae. Insecticidal activity. Hemolytic activity. *De novo* sequencing. *Noisettia orchidiflora*. *Anchietea pyrifolia*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Exemplos de peptídeos cíclicos aprovados pela FDA e empregados como agentes terapêuticos. ....	24
<b>Figura 2</b> - Estruturas representativas de cinco subfamílias da classe dos RIPP. As modificações pós-traducionais em cada estrutura estão ressaltadas em vermelho. ....	26
<b>Figura 3</b> - Classes de peptídeos cíclicos ribossomais de plantas. A) Representação esquemática de membros prototípicos da classe dos ciclotídeos (subfamílias Möbius, braceletes e inibidores de tripsina), dos PDPs ( <i>Paws-derived peptides</i> ) e dos orbitídeos. As ligações dissulfeto características de cada classe são mostradas com linhas. B) Representação <i>ribbon</i> das estruturas tridimensionais obtidas por RMN da kalata B1 (PDB: 1NB1), cyO2 (2KNM), MCoTI (1IB9) e SFTI-1 (1JBL). As ligações dissulfeto são mostradas em amarelo. ....	27
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática da estrutura tridimensional e da sequência do ciclotídeo kalata B1. Em amarelo estão ressaltados os seis resíduos de cisteínas conservados nos ciclotídeos. Os <i>loops</i> correspondem às sequências de aminoácidos entre dois resíduos de cisteína adjacentes (em azul). As linhas vermelhas representam as três ligações dissulfeto responsáveis pela formação do nó de cistina cíclico. ....	28
<b>Figura 5</b> - Ilustração esquemática das geometrias <i>trans</i> -Pro (A) e <i>cis</i> -Pro (B) que diferenciam às subfamílias de ciclotídeos braceletes e Möbius, respectivamente. No esqueleto peptídico, o ângulo $\omega$ só pode ter valores de 0° ( <i>cis</i> ) e 180° ( <i>trans</i> ). ....	29
<b>Figura 6</b> - Reações empregadas no sequenciamento dos ciclotídeos. A) Redução das ligações dissulfeto com ditiotreitol (DTT), e posterior alquilação com iodoacetamida (IAA) dos grupos tióis livres. B) após as reações de redução/alquilação o ciclotídeo é submetido separadamente a digestão enzimática com endoGlu-C (cliva seletivamente pelo extremo C-terminal do resíduo de Glu), tripsina (cliva pelos extremos C-terminais dos resíduos Lys e Arg) e quimiotripsina (cliva pelo extremo C-terminal de Leu). ....	32
<b>Figura 7</b> - A) Estrutura química geral de um peptídeo apresentando a nomenclatura proposta por Roepstorff-Fohlmann-Biemann dos fragmentos formados devido à transferência de energia para o peptídeo. B) os íons formados são enumerados a partir do aminoácido N-terminal. ....	33
<b>Figura 8</b> - Ilustrações da espécie <i>Anchietea pyrifolia</i> (Mart.) G. Don. ....	40
<b>Figura 9</b> - Distribuição geográfica da espécie <i>Anchietea pyrifolia</i> no Brasil. ....	40
<b>Figura 10</b> - Triterpenos pentacíclicos fridelina (A), epifridelanol (B), $\alpha$ -amirina (C) e $\beta$ -amirina (D) isolados da espécie <i>A. pyrifolia</i> . ....	41
<b>Figura 11</b> - Ilustrações da espécie <i>Noisettia orchidiflora</i> (Rudge) Ging. ....	42
<b>Figura 12</b> - Distribuição geográfica da espécie <i>Noisettia orchidiflora</i> no Brasil. ....	42
<b>Figura 13</b> - Ilustração de uma abelha da espécie <i>Apis mellifera</i> . A seta vermelha aponta para o local de injeção. ....	63
<b>Figura 14</b> - Procedimentos para realização do experimento. A) Gaiola plástica descartável com alimentador do tipo <i>ependorf</i> . B) Gaiolas plásticas acondicionadas em estufa DBO durante a realização dos experimentos. ....	64
<b>Figura 15</b> - Cromatogramas das frações AP_C_35 (preto), AP_C_80 (vermelho) e AP_C_100 (azul) ....	67
<b>Figura 16</b> - Espectro de massas DI-ESI-(+)-IT-MS das frações AP_C_80 (preto) e AP_C_100 (vermelho) na faixa de $m/z$ 900-1300. ....	68
<b>Figura 17</b> - Comparação dos perfis cromatográficos das frações AP_C_80 (preto) e AP_C_80_P_F <sub>1</sub> (vermelho). ....	69
<b>Figura 18</b> - Cromatogramas das frações AP_C_80_P_F <sub>0</sub> (preto), AP_C_80_P_F <sub>1</sub> (vermelho) e AP_C_80_P_F <sub>2</sub> (azul) ....	69

<b>Figura 19</b> - Perfis cromatográficos das frações T <sub>3</sub> (preto), T <sub>4</sub> (vermelho), T <sub>5</sub> (azul), T <sub>8</sub> (verde), T <sub>9</sub> (rosa), T <sub>12</sub> (laranja) e T <sub>13</sub> (roxo) .....	75
<b>Figura 20</b> - Espectros de massas DI-ESI-(+)-IT-MS das frações T <sub>3</sub> (preto), T <sub>4</sub> (vermelho), T <sub>5</sub> (azul), T <sub>8</sub> (verde), T <sub>9</sub> (rosa), T <sub>12</sub> (laranja) e T <sub>13</sub> (roxo) na faixa de <i>m/z</i> 900-1400. As rações <i>m/z</i> mostradas correspondem aos íons triplamente carregados. ....	76
<b>Figura 21</b> - Perfis cromatográficos de AP_R_80 (preto) e das subfrações advindas do seu fracionamento, F <sub>1</sub> (azul), F <sub>2</sub> (vermelho), F <sub>3</sub> (laranja), F <sub>4</sub> (verde), F <sub>5</sub> (rosa), F <sub>6</sub> (roxo), F <sub>7</sub> (preto) F <sub>8</sub> (azul claro), F <sub>9</sub> (lilás escuro) e F <sub>10</sub> (marrom) .....	77
<b>Figura 22</b> - Espectros de massas DI-ESI-(+)-IT-MS das frações F <sub>1</sub> (azul), F <sub>2</sub> (vermelho), F <sub>3</sub> (laranja), F <sub>4</sub> (verde), F <sub>5</sub> (rosa), F <sub>6</sub> (roxo), F <sub>7</sub> (preto) F <sub>8</sub> (cinza), F <sub>9</sub> (lilás escuro) e F <sub>10</sub> (marrom) na faixa de <i>m/z</i> 900-1300. As rações <i>m/z</i> mostradas correspondem aos íons triplamente carregados. ....	77
<b>Figura 23</b> - Perfis cromatográficos de NO_R_80 (preto) e das subfrações advindas do seu fracionamento, F <sub>3</sub> (laranja), F <sub>4</sub> (roxo), F <sub>5</sub> (vermelho), F <sub>7</sub> (azul claro) F <sub>8</sub> (azul) e F <sub>9</sub> (verde).....	78
<b>Figura 24</b> - Perfis cromatográficos de NO_F_80 (preto) e da subfração NO_F_80_F <sub>16</sub> (vermelho) advinda do seu fracionamento. ....	79
<b>Figura 25</b> - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância <b>1</b> . ....	81
<b>Figura 26</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon <i>m/z</i> 3530,840, obtido após digestão com endoGlu-C da substância <b>1</b> . Os valores de <i>m/z</i> mostrados são monoisotópicos.....	82
<b>Figura 27</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon <i>m/z</i> 839,491, obtido após digestão enzimática da substância <b>1</b> com tripsina. Os valores de <i>m/z</i> mostrados são monoisotópicos. .	83
<b>Figura 28</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon <i>m/z</i> 1434,686, obtido após digestão enzimática da substância <b>1</b> com quimiotripsina. Os valores de <i>m/z</i> mostrados são monoisotópicos.....	84
<b>Figura 29</b> - Estrutura de <i>Collier de perles</i> do ciclotídeo cicloviolacina O4 ( <b>1</b> ).....	86
<b>Figura 30</b> - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância <b>2</b> . ....	87
<b>Figura 31</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon <i>m/z</i> 3514,840, obtido após digestão enzimática da substância <b>2</b> com endoGlu-C. Os valores de <i>m/z</i> mostrados são monoisotópicos. ....	88
<b>Figura 32</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon <i>m/z</i> 2694,739, obtido após digestão enzimática da substância <b>2</b> com tripsina. Os valores de <i>m/z</i> mostrados são monoisotópicos. .	89
<b>Figura 33</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon <i>m/z</i> 1434,686, obtido após digestão enzimática da substância <b>2</b> com quimiotripsina. Os valores de <i>m/z</i> mostrados são monoisotópicos.....	89
<b>Figura 34</b> - Estrutura de <i>Collier de perles</i> do ciclotídeo cicloviolacina O17 ( <b>2</b> ).....	90
<b>Figura 35</b> - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância <b>3</b> .....	92
<b>Figura 36</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon <i>m/z</i> 3583,021, oriundo da digestão com endoGlu-C da substância <b>3</b> . Os íons <i>-b</i> e <i>-y</i> estão atribuídos. As massas mostradas são monoisotópicas. ....	93
<b>Figura 37</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon <i>m/z</i> 3583,011, advindo da digestão com tripsina da substância <b>3</b> . Os íons <i>-b</i> e <i>-y</i> estão atribuídos. As massas mostradas são monoisotópicas. ....	93
<b>Figura 38</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon <i>m/z</i> 872,127 oriundo da digestão com quimiotripsina da substância <b>3</b> . Os valores <i>m/z</i> mostrados são monoisotópicos. ....	94
<b>Figura 39</b> - Estrutura de <i>Collier de perles</i> do ciclotídeo apy A ( <b>3</b> ). ....	96
<b>Figura 40</b> - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância <b>4</b> . ....	98
<b>Figura 41</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon <i>m/z</i> 3619,180, advindo da digestão da substância <b>4</b> com a enzima endoGlu-C. ....	98

<b>Figura 42</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon $m/z$ 2826,925, oriundo da digestão com tripsina da substância 4. Os valores $m/z$ mostrados são monoisotópicos. ....	99
<b>Figura 43</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon $m/z$ 874,468, advindo da digestão com quimiotripsina da substância 4. Os valores $m/z$ mostrados são monoisotópicos. ....	99
<b>Figura 44</b> - Estrutura de <i>Collier de perles</i> do ciclotídeo apy B (4). ....	101
<b>Figura 45</b> - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância 5. ....	103
<b>Figura 46</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon $m/z$ 3565,683, advindo da digestão da substância 5 com a enzima endoGlu-C. ....	103
<b>Figura 47</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon $m/z$ 2800,436, oriundo da digestão com tripsina da substância 5. Os valores $m/z$ mostrados são monoisotópicos. ....	104
<b>Figura 48</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon $m/z$ 1350,616, oriundo da digestão com quimiotripsina da substância 5. Os valores $m/z$ mostrados são monoisotópicos. ....	104
<b>Figura 49</b> - Estrutura de <i>Collier de perles</i> do ciclotídeo cter 15 (substância 5).....	106
<b>Figura 50</b> - A) Alinhamento múltiplo das sequências gerado com a ferramenta ClustalW dos ciclotídeos cyO4 (1), cyO17 (2), apy A (3), apy B (4) e cter 15 (5) isolados neste estudo das raízes e caule da espécie <i>Anchietea pyrifolia</i> (Violaceae), em vermelho os seis resíduos de cisteína característicos dos ciclotídeos e em azul o resíduo de ácido glutâmico conservado no <i>loop</i> 1. B) Representação <i>Sequence Diversity Wheel</i> . Os resíduos de aminoácidos estão representados com cores diferentes baseados nas propriedades físico-químicas. Neste tipo de representação a frequência com que os resíduos aparecem nas sequências aumenta à medida que se tornam mais internos.....	107
<b>Figura 51</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon $m/z$ 789,420, oriundo da digestão com quimiotripsina da substância 6. Os valores $m/z$ mostrados são monoisotópicos. ....	110
<b>Figura 52</b> - Estrutura de <i>Collier de perles</i> do ciclotídeo nor E (6).....	110
<b>Figura 53</b> - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância 7. ....	111
<b>Figura 54</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon $m/z$ 3480,387 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância 7. Os valores $m/z$ mostrados são monoisotópicos. ....	112
<b>Figura 55</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon $m/z$ 2902,260 oriundo da digestão com tripsina da substância 7. Os valores $m/z$ mostrados são monoisotópicos. ....	112
<b>Figura 56</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon $m/z$ 597,326 oriundo da digestão com tripsina da substância 7. Os valores $m/z$ mostrados são monoisotópicos. ....	113
<b>Figura 57</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon $m/z$ 1395,641 advindo da digestão com quimiotripsina da substância 7. Os valores $m/z$ mostrados são monoisotópicos. ....	114
<b>Figura 58</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon $m/z$ 888,476 advindo da digestão com quimiotripsina da substância 7. Os valores $m/z$ mostrados são monoisotópicos. ....	114
<b>Figura 59</b> - Estrutura de <i>Collier de perles</i> do ciclotídeo inédito nor F (7), isolado das raízes da espécie <i>Noisettia orchidiflora</i> . ....	115
<b>Figura 60</b> - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância 8. ....	117
<b>Figura 61</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon $m/z$ 3294,417 oriundo da digestão com tripsina da substância 8. Os valores $m/z$ mostrados são monoisotópicos. ....	117
<b>Figura 62</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon $m/z$ 3509,563 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância 8. Os valores $m/z$ mostrados são monoisotópicos. ....	118
<b>Figura 63</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon $m/z$ 1269,514 advindo da digestão com quimiotripsina da substância 8. Os valores $m/z$ mostrados são monoisotópicos. ....	118
<b>Figura 64</b> - Estrutura de <i>Collier de perles</i> do ciclotídeo inédito nor G (8), isolado das raízes da espécie <i>Noisettia orchidiflora</i> . ....	119
<b>Figura 65</b> - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância 9. ....	121

<b>Figura 66</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon $m/z$ 3476,453 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância <b>9</b> . Os valores $m/z$ mostrados são monoisotópicos. ....	121
<b>Figura 67</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon $m/z$ 3476,411 oriundo da digestão com tripsina da substância <b>9</b> . Os valores $m/z$ mostrados são monoisotópicos. ....	122
<b>Figura 68</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon $m/z$ 1292,548 advindo da digestão com quimiotripsina da substância <b>9</b> . Os valores $m/z$ mostrados são monoisotópicos. ....	122
<b>Figura 69</b> - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon $m/z$ 1234,465 advindo da digestão com quimiotripsina da substância <b>9</b> . Os valores $m/z$ mostrados são monoisotópicos. ....	123
<b>Figura 70</b> - Estrutura de Collier de perles do ciclotídeo vhr 1 ( <b>9</b> ), isolado das raízes da espécie <i>Noisettia orchidiflora</i> . Este ciclotídeo já foi reportado na espécie <i>Viola hederacea</i> (Violaceae) (TRABI; CRAIK, 2004). ....	124
<b>Figura 71</b> - A) Alinhamento múltiplo das sequências gerado com a ferramenta ClustalW dos ciclotídeos nor E ( <b>6</b> ), nor F ( <b>7</b> ), nor G ( <b>8</b> ) e vhr 1 ( <b>9</b> ) isolados neste estudo das raízes da espécie <i>Noisettia orchidiflora</i> (Violaceae), em vermelho os seis resíduos de cisteína característicos dos ciclotídeos e em azul o resíduo de ácido glutâmico conservado no <i>loop</i> 1. A letra X representa os resíduos isóbaros de leucina e isoleucina. B) Representação <i>Sequence Diversity Wheel</i> . Os resíduos de aminoácidos estão representados com cores diferentes baseados nas propriedades físico-químicas. Neste tipo de representação a frequência com que os resíduos aparecem nas sequências aumenta à medida que se tornam mais internos. ....	125
<b>Figura 72</b> - Atividade hemolítica dos ciclotídeos apy A, apy B, cyO4 e cyO17, isolados da raiz da espécie <i>A. pyrifolia</i> , em doze concentrações diferentes (0,1 - 156 $\mu$ M). Os valores $DH_{50}$ (intervalo de confiança de 95%) foram calculados no software GraphPad Prism. O peptídeo melitina foi empregado como controle positivo. Teste foi realizado empregando-se eritrócitos humanos. ....	129

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Alguns dos peptídeos cíclicos aprovados pela FDA nas últimas décadas. ....	25
<b>Tabela 2</b> - Ciclotídeos reportados na família Violaceae .....	(Continua) 34
<b>Tabela 3</b> - Ciclotídeos com atividades relevantes para agricultura. ....	36
<b>Tabela 4</b> - Ciclotídeos com atividade hemolítica reportados na literatura. ....	37
<b>Tabela 5</b> - Alguns dos ciclotídeos reportados por grupos de pesquisa brasileiros em espécies das famílias Violaceae e Rubiaceae. ....	38
<b>Tabela 6</b> - Dados de coleta e cadastro das espécies estudadas. ....	45
<b>Tabela 7</b> - Massa das frações 80% das espécies em estudo, obtidas após pré-purificação dos extratos aquosos. <sup>1</sup> Massa de material vegetal seco e moído. *Frações obtidas em trabalho prévio (BOBEY, 2016). ....	48
<b>Tabela 8</b> - Possíveis ciclotídeos anotados por LC-ESI-IT-MS no caule, folha e raiz da espécie <i>N. orchidiflora</i> . Gradiente no linear: 5 a 34% B em 10 min; 34 a 41% B em 28 min; 41 a 100 % B em 2 min; 100% B por 3 min (A: H <sub>2</sub> O/0.1% HCO <sub>2</sub> H (v/v); B: CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O/HCO <sub>2</sub> H 90/10/0,1% (v/v/v). *Massas moleculares mostradas foram calculadas a partir dos valores de <i>m/z</i> monoisotópicos. ** As massas moleculares foram comparadas com aquelas de ciclotídeos reportados (www.cybase.org.au) e o nome anotado quando a diferença foi de ± 0,5 Da. ....	71
<b>Tabela 9</b> - Possíveis ciclotídeos anotados por LC-ESI-IT-MS na fração AP_C_80_P_F <sub>0</sub> do caule de <i>A. pyrifolia</i> . Gradiente linear: 20 a 45% B em 76 min; 45 a 100 % B em 5 min; 100% B por 5 min (A: H <sub>2</sub> O/0.1% HCO <sub>2</sub> H (v/v); B: CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O/HCO <sub>2</sub> H 90/10/0,1% (v/v/v). * As massas moleculares mostradas foram calculadas a partir dos valores de <i>m/z</i> monoisotópicos. ** As massas moleculares foram comparadas com aquelas de ciclotídeos reportados (www.cybase.org.au) e o nome anotado quando a diferença foi de ± 0,5 Da. ....	73
<b>Tabela 10</b> - Sequências de aminoácidos identificados por MALDI-TOF-MS/MS nos fragmentos da digestão enzimática da substância 1. A letra X representa os resíduos isóbaros Ile/Leu (grifada em verde/amarelo quando é/não é possível a diferenciação por meio da digestão com quimiotripsina, respectivamente). ....	85
<b>Tabela 11</b> - Aminoácidos identificados por meio da técnica de análise de aminoácidos na substância 3. *Por meio do sequenciamento de novo não foi possível identificar os resíduos isóbaros de leucina/isoleucina (ver Tabela 10). ....	85
<b>Tabela 12</b> - Comparação das sequências dos ciclotídeos cicloviolacina O4 e chassatida C3. * Táxons onde foram isolados pela primeira vez. ....	86
<b>Tabela 13</b> - Sequências de aminoácidos identificados por MALDI-TOF-MS/MS nos fragmentos da digestão enzimática da substância 2. A letra X representa os resíduos isóbaros Ile/Leu que não foram determinados através do sequenciamento <i>de novo</i> . ....	90
<b>Tabela 14</b> - Comparação das sequências de aminoácidos dos ciclotídeos cicloviolacina O17 e circulina A com a sequência da substância 2 obtida através da análise de aminoácidos e do sequenciamento <i>de novo</i> . ....	90
<b>Tabela 15</b> - Comparação das sequências de aminoácidos dos ciclotídeos cicloviolacina O4 (1) e O17 (2), ressaltando em azul a única diferença entre elas. ....	91
<b>Tabela 16</b> - Sequências de aminoácidos identificados por MALDI-TOF-MS/MS nos fragmentos da digestão enzimática da substância 3. A letra X representa os resíduos isóbaros Ile/Leu. Ressaltados em vermelho os seis resíduos de cisteína característicos dos ciclotídeos. ....	95
<b>Tabela 17</b> - Aminoácidos identificados por meio da técnica de análise de aminoácidos na substância 3. *Por meio do sequenciamento de novo só foi possível identificar as isoleucinas	



(Ile <sup>15</sup> e Ile <sup>18</sup> ) o resíduo da posição X <sup>12</sup> (ver Tabela 16) por estar do lado de prolina não foi identificado através da digestão com quimiotripsina.....	95
<b>Tabela 18</b> - Comparação das sequências de aminoácidos dos ciclotídeos apy A (3) e vitri peptídeo 2, ressaltando em azul as diferenças entre elas. ....	96
<b>Tabela 19</b> - Sequências de aminoácidos identificados por MALDI-TOF-MS/MS nos fragmentos da digestão enzimática da substância 4. A letra X representa os resíduos isóbaros Ile/Leu.....	100
<b>Tabela 20</b> - Aminoácidos identificados na substância 4 por meio da técnica de análise de aminoácidos. *Por meio do sequenciamento <i>de novo</i> não foi possível identificar os resíduos de isoleucina (Ile <sup>2</sup> e Ile <sup>11</sup> ) (ver Tabela 19) através da digestão com quimiotripsina por eles estarem do lado de prolina. ....	100
<b>Tabela 21</b> - Comparação das sequências dos ciclotídeos apy B (4), isolado das raízes da espécie <i>A. pyrifolia</i> e vigno 7, isolado das partes aéreas da <i>Viola ignobilis</i> . Ressaltando em azul as diferenças nas sequências de aminoácidos. ....	101
<b>Tabela 22</b> - Sequências de aminoácidos identificados por MALDI-TOF-MS/MS nos fragmentos da digestão enzimática da substância 5. A letra X em azul/verde representa os resíduos isóbaros Ile/Leu quando é/não é possível diferenciá-los com quimiotripsina, respectivamente.....	105
<b>Tabela 23</b> - Aminoácidos identificados na substância 5 por meio da técnica de análise de aminoácidos. *Por meio do sequenciamento <i>de novo</i> não foi possível identificar os resíduos isóbaros (X <sup>2</sup> , X <sup>11</sup> , X <sup>18</sup> e X <sup>19</sup> ) (ver Tabela 22).....	106
<b>Tabela 24</b> - Comparação das sequências dos ciclotídeos 5, isolado das raízes da espécie <i>A. pyrifolia</i> (Violaceae) e cter 15, isolado das raízes e sementes da espécie <i>Clitoria ternatea</i> (Fabaceae). Ressaltando em amarelo os resíduos de leucina/isoleucina, que seriam as únicas diferenças nas sequências de aminoácidos. ....	106
<b>Tabela 25</b> - Sequências de aminoácidos identificados por MALDI-TOF-MS/MS nos fragmentos da digestão enzimática do ciclotídeo nor E, isolado dos galhos e folhas da espécie <i>N. orchidiflora</i> . A letra X representa os resíduos isóbaros Ile/Leu que não foram identificados (ressaltados em verde) (BOBEY, 2016). *Sequência obtida neste trabalho após análise de aminoácidos e nova digestão da substância 6 com quimiotripsina.....	109
<b>Tabela 26</b> - Aminoácidos identificados na substância 6 por meio da técnica de análise de aminoácidos. *Por meio do sequenciamento <i>de novo</i> não foi possível identificar os resíduos de leucina (L <sup>3</sup> e L <sup>12</sup> ) (ver Tabela 25). ....	109
<b>Tabela 27</b> - Sequências de aminoácidos identificados por MALDI-TOF-MS/MS nos fragmentos da digestão enzimática da substância 7. A letra X representa os resíduos isóbaros Ile/Leu.....	115
<b>Tabela 28</b> - Comparação das sequências dos ciclotídeos 7, isolado das raízes da espécie <i>N. orchidiflora</i> (Violaceae), chassatida C5 e C6, isolados da espécie <i>Chassalia chartacea</i> (Rubiaceae). Ressaltando em amarelo as diferenças nas sequências de aminoácidos. ....	115
<b>Tabela 29</b> - Sequências de aminoácidos identificados por MALDI-TOF-MS/MS nos fragmentos da digestão enzimática da substância 8. A letra X representa os resíduos isóbaros Ile/Leu. Ressaltados em vermelho os seis resíduos de cisteína característicos dos ciclotídeos. Em verde os resíduos isóbaros (Leu/Ile) que poderiam ser identificados na digestão com quimiotripsina. ....	119
<b>Tabela 30</b> - Comparação das sequências dos ciclotídeos nor G (8), isolado neste estudo das raízes da espécie <i>N. orchidiflora</i> e hypa A, isolado da espécie <i>Hybanthus parviflorus</i> (BROUSSALIS <i>et al.</i> 2001). Ressaltando em amarelo as diferenças confirmadas nas sequências de aminoácidos. Em azul os resíduos isóbaros que não foram determinados na sequência de nor G. ....	119
<b>Tabela 31</b> - Sequências de aminoácidos identificados por MALDI-TOF-MS/MS nos fragmentos da digestão enzimática da substância 9. A letra X representa os resíduos isóbaros Ile/Leu. Em azul	

o resíduo de leucina ( <b>L</b> <sup>19</sup> ) identificado indiretamente através do fragmento de <i>m/z</i> 1234,465. Em verde os resíduos isóbaros que não foram identificados no sequenciamento <i>de novo</i> .....	123
<b>Tabela 32</b> - Atividade inibitória na concentração de 50 µg/mL das frações ricas em ciclotídeos obtidas das espécies <i>A. pyrifolia</i> e <i>N. orchidiflora</i> contra <i>P. falciparum</i> , cepa 3d7, sensível a cloroquina. ....	126
<b>Tabela 33</b> - Concentração inibitória de 50% (IC <sub>50</sub> ) das frações NO_C_80 e AP_C_3_80 contra <i>P. falciparum</i> , cepa 3d7, sensível a cloroquina. ....	126
<b>Tabela 34</b> - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) expressos em µg/mL, das frações ricas em ciclotídeos das espécies <i>N. orchidiflora</i> e <i>A. pyrifolia</i> e dos padrões do experimento (cloranfenicol e melitina) frente às bactérias <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. pneumoniae</i> ....	127
<b>Tabela 35</b> - Concentração letal de 50% (CL <sub>50</sub> ) obtida através do método de injeção, dos ciclotídeos apy A ( <b>3</b> ) e cyO4 ( <b>1</b> ) isolados da raiz de <i>A. pyrifolia</i> , contra a abelha Africanizada <i>Apis mellifera</i> , depois de 24 h de exposição. O inseticida comercial dimetoato foi empregado como controle positivo. ....	128
<b>Tabela 36</b> - Comparação das sequências de aminoácidos dos ciclotídeos cyO4 ( <b>1</b> ) e apy A ( <b>3</b> ), isolados da raiz da espécie <i>A. pyrifolia</i> . Ressaltando em vermelho os resíduos de aminoácido com carga positiva e em azul os seis resíduos de cisteína característicos dos ciclotídeos.....	128
<b>Tabela 37</b> - Comparação das sequências de aminoácidos, DH <sub>50</sub> e massa molecular dos ciclotídeos cyO2 e cyO4. Ressaltando em azul, o único resíduo de aminoácido que varia entre eles. ....	130

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

<i>A. mellifera</i>	<i>Apis mellifera</i>
<i>A. pyrifolia</i>	<i>Anchietea pyrifolia</i>
aa	Aminoácido
ACN	Acetonitrila
AF	Ácido fórmico
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BOD	<i>Biochemical oxygen demand</i>
BPC	<i>Base peak chromatogram</i>
C <sub>18</sub>	Octadecilsilano
CCK	<i>Cyclic cystine knot</i>
CEIS	Centro de Estudos de Insetos Sociais
CEPID-CIBFar	Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos
CID	<i>Collision induced dissociation</i>
CL <sub>50</sub>	Concentração letal de 50%
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCM	diclorometano
DH <sub>50</sub>	Dose hemolítica de 50%
DTT	Ditiotreitol
EndoGlu-C	Endoproteinase de ácido glutâmico
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GPCRs	<i>G protein-coupled receptors</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IAA	Iodoacetamida
IBRC	Instituto de Biociências de Rio Claro
IC <sub>50</sub>	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
INCT-BioNat	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biodiversidade e Produtos Naturais
IT	<i>Ion trap</i>
JBRJ	Jardim Botânico do Rio de Janeiro
kDa	Kilodalton
kV	Kilovoltio
L.	Linnaeus
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LIFT	<i>Laser induced fragmentation technique</i>
M	Molar

MA	Massachusetts
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
[M+H] <sup>+</sup>	Molécula protonada
[M+Na] <sup>+</sup>	Molécula cationizada com sódio
[M+K] <sup>+</sup>	Molécula cationizada com potássio
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
mM	Milimolar
M.M	Massa molecular
MS	<i>Mass spectrometry</i>
<i>m/z</i>	Raço massa/carga
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>N. orchidiflora</i>	<i>Noisettia orchidiflora</i>
NPPNS	Núcleo de Pesquisa Produtos Naturais e Sintéticos
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
OPA	Orto-ftalaldeído
OUPR	Herbário da Universidade Federal de Ouro Preto
PDPs	<i>PawS-Derived Peptides</i>
PIE	<i>Pulse ion extraction</i>
psi	<i>Pound force per square inch</i>
RIPPs	<i>Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Peptides</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotação por minuto
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
<i>spp.</i>	Espécies
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
SFTI	<i>Sunflower trypsin inhibitor</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	<i>Time of flight</i>
t <sub>R</sub>	Tempo de retenção
TTC	Trifeniltetrazonium
u.a.	Unidades arbitrárias
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
USA	<i>United States of America</i>
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta

## LISTA DE ABREVIATURAS DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS

<b>NOME</b>	<b>ABREVIÇÃO</b>		<b>MASSA DO RESÍDUO (Da)</b>
Alanina	Ala	A	71.079
Arginina	Arg	R	156.188
Asparagina	Asn	N	114.104
Aspartato	Asp	D	115.089
Cisteína	Cys	C	103.145
Fenilalanina	Phe	F	147.177
Glicina	Gly	G	57.05
Glutamato	Glu	E	129.116
Glutamina	Gln	Q	128.131
Histidina	His	H	137.141
Isoleucina	Ile	I	113.160
Leucina	Leu	L	113.160
Lisina	Lys	K	128.174
Metionina	Met	M	131.199
Prolina	Pro	P	97.117
Serina	Ser	S	87.078
Tirosina	Tyr	Y	163.176
Treonina	Thr	T	101.105
Triptofano	Trp	W	186.213
Valina	Val	V	99.133

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
1.1 PEPTÍDEOS CÍCLICOS RIBOSSOMAIS DE PLANTAS.....	26
1.2 CICLOTÍDEOS .....	27
1.2.1 Caracterização estrutural: sequenciamento <i>de novo</i> .....	<b>30</b>
<b>1.2.2 Ciclotídeos na família Violaceae</b> .....	<b>33</b>
<b>1.2.3 Atividades biológicas dos ciclotídeos</b> .....	<b>35</b>
1.2.3.1 Atividades relacionadas à defesa das plantas.....	36
1.2.3.2 Atividade hemolítica .....	37
<b>1.2.4 Pesquisa sobre Ciclotídeos realizada no Brasil</b> .....	<b>37</b>
1.3 DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS.....	39
<b>1.3.1 O gênero <i>Anchietea</i> e a espécie <i>A. pyrifolia</i></b> .....	<b>39</b>
<b>1.3.2 O gênero <i>Noisettia</i> e a espécie <i>N. orchidiflora</i></b> .....	<b>41</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>44</b>
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>45</b>
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	45
<b>3.1.1 Extração dos constituintes químicos</b> .....	<b>45</b>
<b>3.1.2 Pré-purificação dos extratos aquosos</b> .....	<b>48</b>
3.2 PROCEDIMENTOS CROMATOGRÁFICOS GERAIS.....	49
<b>3.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</b> .....	<b>49</b>
3.2.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em escala analítica.....	49
3.2.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em escala semipreparativa .....	49
3.2.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em escala preparativa.....	49
<b>3.2.2 Filtração com poliamida</b> .....	<b>50</b>
3.3 IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DE CICLOTÍDEOS.....	50
<b>3.3.1 Análise por DI-ESI-IT-MS</b> .....	<b>50</b>
<b>3.3.2 Análise por HPLC-ESI-IT-MS</b> .....	<b>50</b>
3.4 FRACIONAMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS NA PRÉ-PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS .....	51
<b>3.4.1 Fração AP_C_80_P_F<sub>0</sub></b> .....	<b>51</b>
<b>3.4.2 Fração AP_R_80</b> .....	<b>52</b>
<b>3.4.3 Fração NO_F_80</b> .....	<b>52</b>
<b>3.4.4 Fração NO_R_80</b> .....	<b>52</b>

3.5 ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS .....	53
<b>3.5.1 Isolamento das substâncias produzidas pela espécie <i>Anchietea pyrifolia</i></b> .....	<b>53</b>
3.5.1.1 Isolamento das substâncias presentes no caule .....	53
3.5.1.2 Isolamento das substâncias presentes nas raízes .....	54
<b>3.5.2 Isolamento das substâncias produzidas pela espécie <i>Noisettia orchidiflora</i></b> .....	<b>55</b>
3.5.2.1 Isolamento das substâncias presentes nas folhas .....	55
3.5.2.2 Isolamento das substâncias presentes nas raízes .....	56
3.6 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL .....	57
<b>3.6.1 Redução e Alquilação</b> .....	<b>57</b>
<b>3.6.2 Digestão Enzimática</b> .....	<b>58</b>
<b>3.6.3 Espectrometria de Massas MALDI-TOF</b> .....	<b>58</b>
<b>3.6.4 Análise de Aminoácidos</b> .....	<b>59</b>
<b>3.6.5 Alinhamento das Sequências</b> .....	<b>60</b>
3.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS .....	60
<b>3.7.1 Avaliação da atividade antiplasmodial</b> .....	<b>60</b>
<b>3.7.2 Prova de sensibilidade bacteriana</b> .....	<b>60</b>
<b>3.7.3 Avaliação da atividade inseticida</b> .....	<b>61</b>
3.7.3.1 Obtenção das abelhas recém-emergidas.....	62
3.7.3.2 Teste de injeção na hemolinfa .....	62
3.7.3.3 Análise estatística.....	64
<b>3.7.4 Avaliação da atividade hemolítica</b> .....	<b>64</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>66</b>
4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DO CAULE DE <i>A. PYRIFOLIA</i> .....	66
4.2 PRÉ-PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS .....	66
4.3 FILTRAÇÃO COM POLIAMIDA DA FRAÇÃO AP_C_80.....	68
4.4 IDENTIFICAÇÃO DE CICLOTÍDEOS POR LC-DAD-ESI-IT-MS .....	70
4.5 FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DAS FRAÇÕES ENRIQUECIDAS EM PEPTÍDEOS .....	74
<b>4.5.1 Caule de <i>A. pyrifolia</i></b> .....	<b>75</b>
<b>4.5.2 Raiz de <i>A. pyrifolia</i></b> .....	<b>76</b>
<b>4.5.3 Raiz de <i>N. orchidiflora</i></b> .....	<b>78</b>
<b>4.5.4 Folha de <i>N. orchidiflora</i></b> .....	<b>79</b>
4.6 SEQUENCIAMENTO <i>DE NOVO</i> DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS .....	80
<b>4.6.1 Sequenciamento das substâncias obtidas da espécie <i>A. pyrifolia</i></b> .....	<b>80</b>
4.6.1.1 Sequenciamento da substância 1.....	81
4.6.1.2 Sequenciamento da substância 2.....	86

4.6.1.3 Sequenciamento da substância 3.....	92
4.6.1.4 Sequenciamento da substância 4.....	97
4.6.1.5 Sequenciamento da substância 5.....	102
<b>4.6.2 Sequenciamento das substâncias isoladas da espécie <i>N. orchidiflora</i> .....</b>	<b>108</b>
4.6.2.1 Sequenciamento da substância 6.....	108
4.6.2.2 Sequenciamento da substância 7.....	111
4.6.2.3 Sequenciamento da substância 8.....	116
4.6.2.4 Sequenciamento da substância 9.....	120
4.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....	126
<b>4.7.1 Atividade antiplasmodial .....</b>	<b>126</b>
<b>4.7.2 Atividade antibacteriana .....</b>	<b>126</b>
<b>4.7.3 Atividade inseticida .....</b>	<b>127</b>
<b>4.7.4 Atividade hemolítica.....</b>	<b>129</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>131</b>
REFERÊNCIAS.....	132
APÊNDICES .....	147



## 1 INTRODUÇÃO

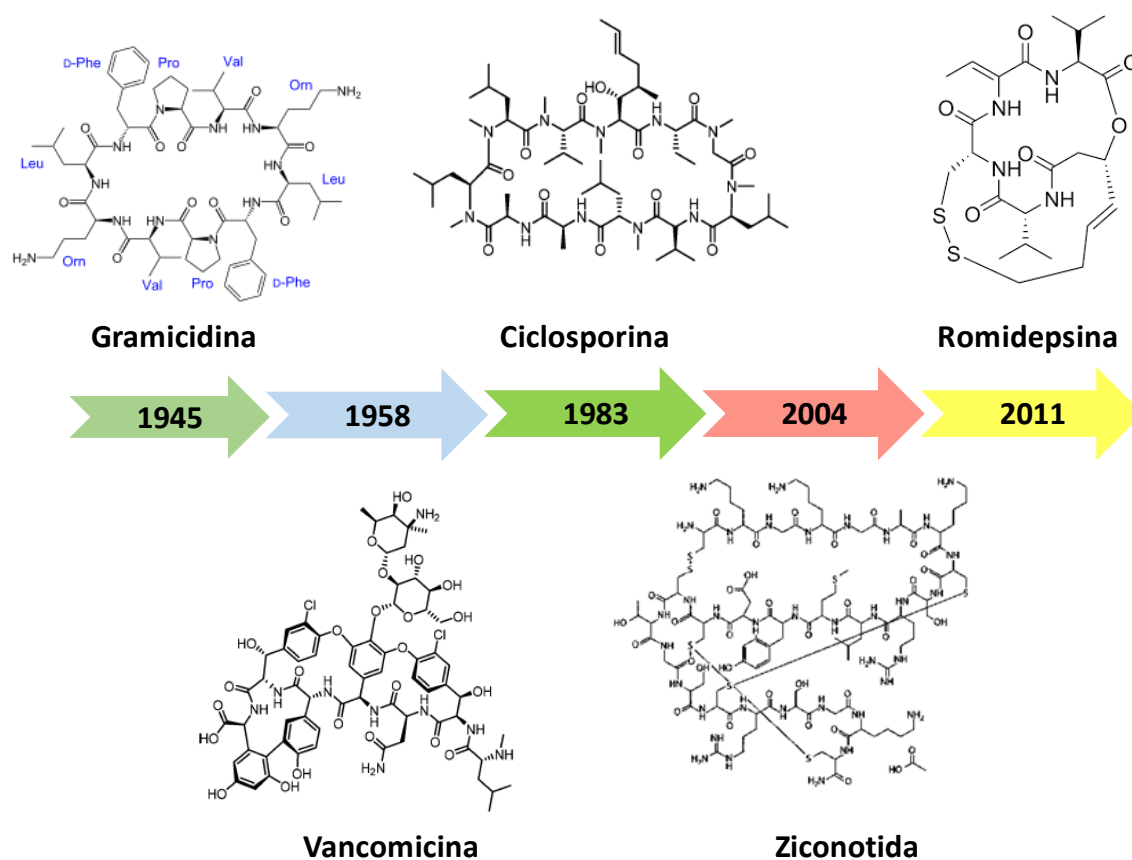
Os Produtos Naturais (PNs) têm sido empregados pela humanidade desde seus primórdios para o tratamento de inúmeras doenças e ainda hoje desempenham um papel de destaque na descoberta de novos fármacos (CRAGG; NEWMAN, 2013; BERNARDINI *et al.* 2018; CALIXTO, 2019). Inúmeros metabólitos secundários ou essenciais, segundo Gottlieb, de diversas classes de PNs como os alcaloides, terpenoides, lignoides, flavonoides e policetideos, entre outros, destacam-se devido a suas propriedades farmacológicas. Alguns deles marcaram verdadeiros marcos na história da medicina moderna. Os peptídeos cíclicos, uma classe de produtos naturais importante para as espécies onde são acumulados, vem ganhando destaque recentemente devido a suas propriedades biológicas e farmacológicas (FRANCO, 2011; KASPAR, REICHERT, 2013). Os peptídeos cíclicos são cadeias polipeptídicas compostas por aminoácidos proteinogênicos e/ou não proteinogênicos que formam uma estrutura cíclica (ABDALLA; MCGAW, 2018). A ciclização destes peptídeos pode ser formada a partir de reações que levam a quatro tipos de ligações (WHITE; YUDIN, 2011; JING; JIN, 2020) descritas a seguir:

- ✓ *Cabeça-cauda* - O grupo carboxila terminal reage via reação de condensação com o grupo amino terminal do próprio peptídeo formando uma ligação amida;
- ✓ *Ligação por meio das cadeias laterais* - Os grupos funcionais de dois resíduos de aminoácidos podem reagir para dar lugar a formação de pontes, geralmente grupos sulfidrilas oriundos de resíduos de cisteína reagem para formar ligações dissulfeto. Também pode existir a formação de um éster entre serina/treonina (Ser/Thr) e ácido aspártico/ácido glutâmico (Asp/Glu);
- ✓ *Ligação cadeia lateral-cabeça; cadeia lateral-cauda* - Para este tipo de ciclização acontecer é preciso a formação de uma lactama, lactona ou tiolactona pelas reações entre os grupos amino terminal ou carboxila terminal e os grupos funcionais das cadeias laterais de aminoácidos como ácido glutâmico (Glu), cisteína (Cys), lisina (Lys), treonina (Thr) entre outros.

Alguns peptídeos cíclicos foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) recentemente (Tabela 1), e são empregados hoje como medicamentos para o

tratamento de muitas doenças: a) antibióticos: vancomicina, daptomicina e polimixina B, b) imunossupressor: ciclosporina, c) agentes antitumorais: romidepsina e lanreotida (ZORZI *et al.* 2017; JING; JIN, 2020) e ziconotida, isolado da toxina do caramujo do mar *Conus magus* (MCGIVERNS, 2007) que apresenta extraordinárias propriedades analgésicas no combate da dor neuropática crônica (WEBSTER, 2015; BROOKES; ELDABE; BATTERHAM, 2017) (Figura 1).

**Figura 1** - Exemplos de peptídeos cíclicos aprovados pela FDA e empregados como agentes terapêuticos.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.

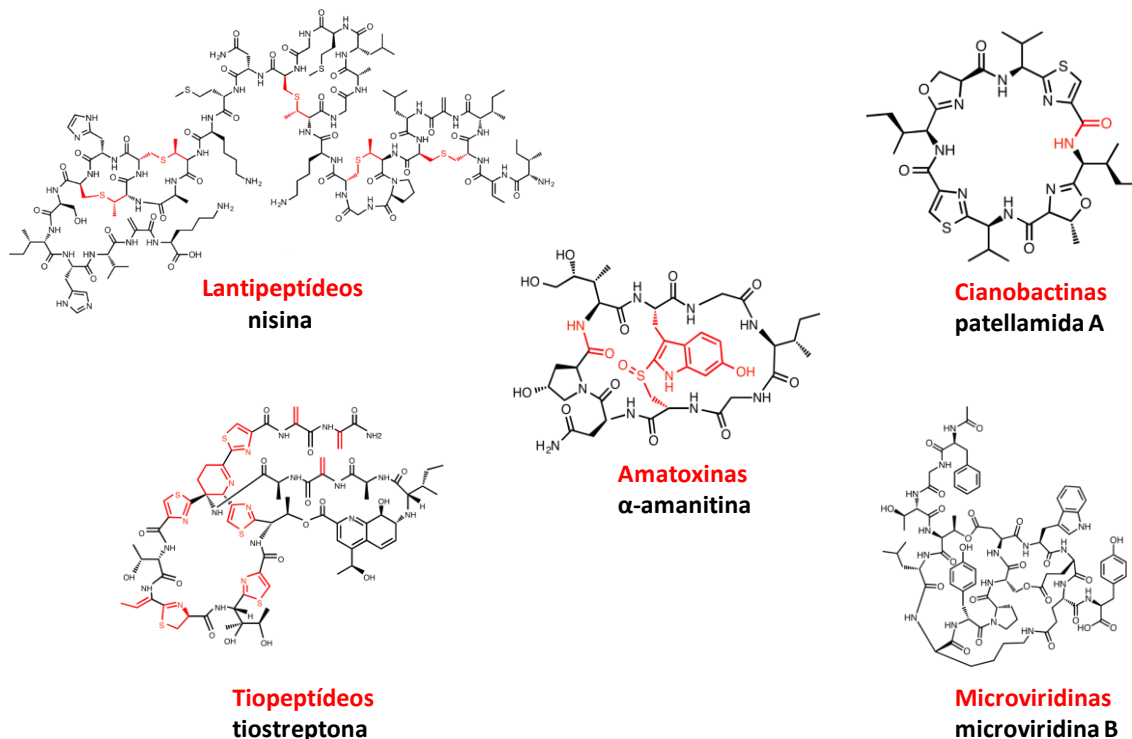
**Tabela 1** - Alguns dos peptídeos cíclicos aprovados pela FDA nas últimas décadas

Peptídeo cíclico	Fonte Natural	Aplicação Clínica	Referência
Vancomicina	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	Antibiótico	LEVINE, 2006
Ciclosporina A	<i>Tolypocladium inflatum</i>	Imunossupressor	RÜEGGER <i>et al.</i> 1976
Romidepsina	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Antitumoral	UEDA <i>et al.</i> 1994; JAIN; ZAIN, 2011
Ziconotida	<i>Conus magus</i>	Analgésico	PATEL <i>et al.</i> 2018

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

Os estudos sobre origem biossintética desta classe de substâncias permitem classificá-las como ribossomais e não-ribossomais. Recentemente, foi publicada uma revisão que introduziu uma nova classe de Produtos Naturais os RIPPes (*Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Peptides*) (ARNISON *et al.* 2013). Esta nova classe encontra-se distribuída nos três domínios da vida (ARNISON *et al.* 2013, FISHER *et al.* 2018) e compreende um grande grupo de PNs, com mais de 20 subfamílias, alto grau de diversidade estrutural e ampla variedade de atividades biológicas (ORTEGA; VAN DER DONK, 2016; ZHANG *et al.* 2018). Alguns de seus membros mais conhecidos são a nisina, um conservante de alimentos, a tiostreptona, um antibiótico utilizado na medicina veterinária, e o analgésico ziconotida (Figura 2) (TAN *et al.* 2019).

**Figura 2** - Estruturas representativas de cinco subfamílias da classe dos RIPP's. As modificações pós-traducionais em cada estrutura estão ressaltadas em vermelho.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

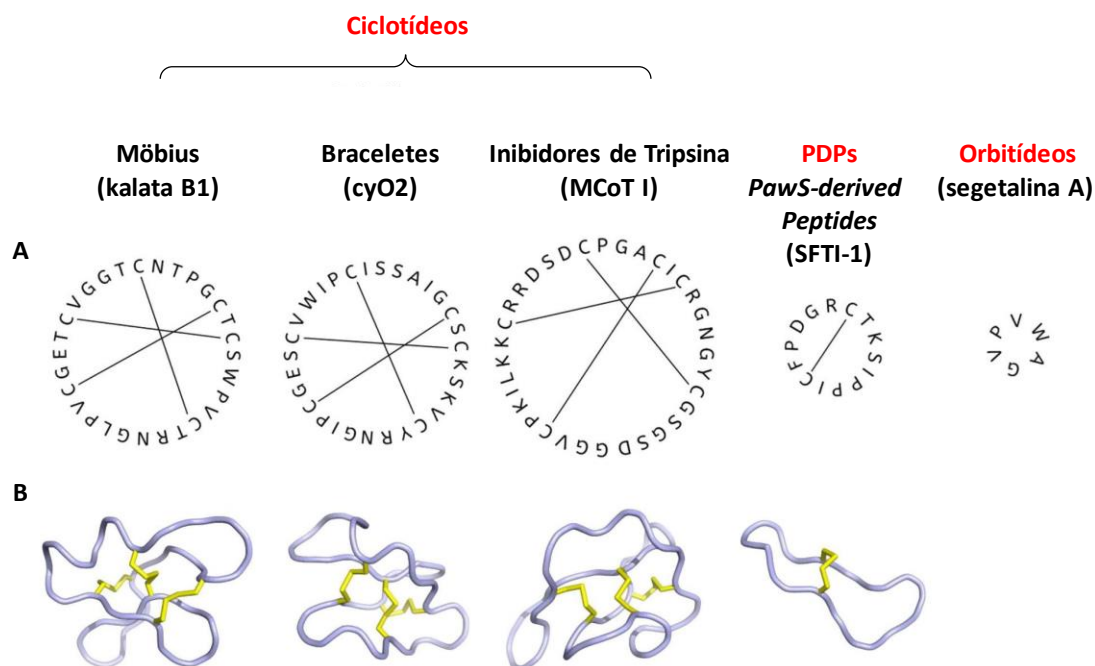
### 1.1 PEPTÍDEOS CÍCLICOS RIBOSSOMAIS DE PLANTAS

As plantas produzem uma grande variedade de peptídeos cíclicos (TAN; ZHOU, 2006), entre eles as defensinas, tioninas, inibidores de proteases, *snakins*, entre outros (GUZMÁN-RODRÍGUEZ *et al.* 2015). No caso específico das plantas, os RIPP's, são divididos em três grandes classes (Figura 3) (CRAIK *et al.* 2018; KERSTEN; WENG, 2018):

- ✓ **Orbitídeos** - possuem de 5 a 12 resíduos de aminoácidos, sem ligação dissulfeto, já descritos nas famílias Annonaceae, Caryophyllaceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae, Linaceae, Phytolaccaceae, Rutaceae, Schisandraceae, Verbenaceae e Asteraceae (RAMALHO *et al.* 2018; FISHER *et al.* 2018);
- ✓ **PDPs** (*PawS-derived peptides*) - encontrados no gênero *Helianthus* (Asteraceae), possuem de 12-14 resíduos de aminoácidos com uma única ligação dissulfeto, (LUCKETT *et al.* 1999; MYLNE *et al.* 2011);
- ✓ **Ciclotídeos** - objeto de estudo deste trabalho, serão abordados com mais profundidade na seção 1.2.

Eles apresentam diversas atividades biológicas, incluindo anti-HIV, citotóxica e imunossupressora (CRAIK *et al.* 2018).

**Figura 3** - Classes de peptídeos cíclicos ribossomais de plantas. A) Representação esquemática de membros prototípicos da classe dos ciclotídeos (subfamílias Möbius, braceletes e inibidores de tripsina), dos PDPs (*Paws-derived peptides*) e dos orbitídeos. As ligações dissulfeto características de cada classe são mostradas com linhas. B) Representação *ribbon* das estruturas tridimensionais obtidas por RMN da kalata B1 (PDB: 1NB1), cyO2 (2KNM), MCoT1 (1IB9) e SFTI-1 (1JBL). As ligações dissulfeto são mostradas em amarelo.



Fonte: Traduzido de CRAIK *et al.* 2018

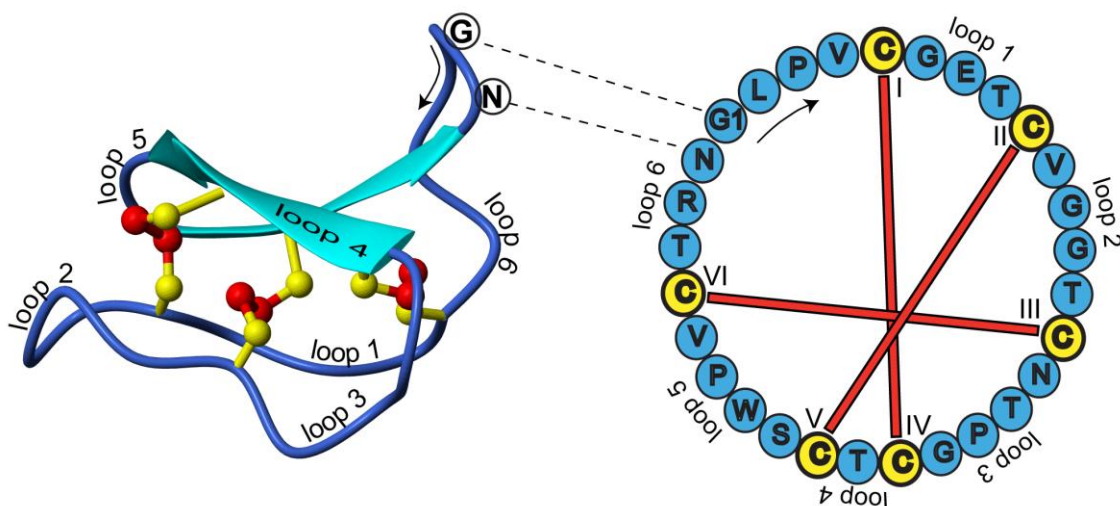
## 1.2 CICLOTÍDEOS

Ciclotídeos compreendem uma família de peptídeos vegetais que possuem de 28 a 37 resíduos de aminoácidos proteinogênicos encerrados em uma estrutura cíclica cabeça-cauda e com três ligações dissulfeto formando um arranjo característico denominado CCK (*Cyclic Cystine Knot* - Nó de cistina cíclico) (CRAIK *et al.* 1999, 2001). Esse arranjo é responsável pela alta estabilidade química, térmica e enzimática que esta classe possui (COLGRAVE; CRAIK, 2004).

Os ciclotídeos conhecidos até o presente se alinham em função dos seis resíduos de cisteína conservados (nomeados de I a VI) (Figura 4). Os *loops* dos seus esqueletos

correspondem às regiões (sequências de aminoácidos) entre dois resíduos de cisteína adjacentes e eles são numerados de 1-6 (Figura 4).

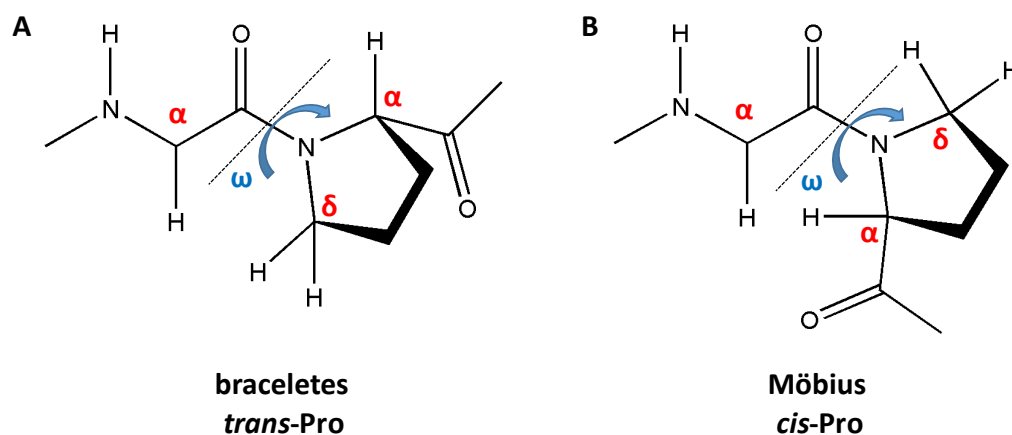
**Figura 4** - Representação esquemática da estrutura tridimensional e da sequência do ciclótideo kalata B1. Em amarelo estão ressaltados os seis resíduos de cisteínas conservados nos ciclótídeos. Os *loops* correspondem às sequências de aminoácidos entre dois resíduos de cisteína adjacentes (em azul). As linhas vermelhas representam as três ligações dissulfeto responsáveis pela formação do nó de cistina cíclico.



Fonte: IRELAND *et al.* 2010.

Até o presente, aproximadamente 450 ciclótídeos foram descritos na literatura. Eles são classificados em três subfamílias: Möbius, bracelete e inibidores de tripsina. As duas primeiras são diferenciadas pela presença ou ausência, respectivamente, de um resíduo de *cis*-prolina no *loop* 5, responsável pela torção de 180° no *loop* (CRAIK *et al.* 2004; CRAIK *et al.* 2017) (Figura 5). Elas se diferenciam também no tamanho e tipo de aminoácidos, sendo a subfamília bracelete a mais estruturalmente diversa. Segundo a base de dados Cybase ([www.cybase.org.au](http://www.cybase.org.au)) 2/3 de todas as sequências reportadas são braceletes (WANG *et al.* 2008a). A terceira subfamília, inibidores de tripsina, foi introduzida após o descobrimento das estruturas MCoTI-I e MCoTI-II, na espécie *Momordica cochinchinensis* (Cucurbitaceae) (HERNANDEZ *et al.* 2000), e apesar das diferenças marcadas na sequência quando comparada às outras duas subfamílias, ela possui o arranjo *CCK* característico dos ciclótídeos, por isso a sua inclusão é feita nesta classe (FELIZMENIO-QUIMIO *et al.* 2001).

**Figura 5** - Ilustração esquemática das geometrias *trans*-Pro (A) e *cis*-Pro (B) que diferenciam às subfamílias de ciclotídeos braceletes e Möbius, respectivamente. No esqueleto peptídico, o ângulo  $\omega$  só pode ter valores de  $0^\circ$  (*cis*) e  $180^\circ$  (*trans*).



Fonte: Adaptado de PINTO, 2010.

Os ciclotídeos são produtos gênicos, cujas sequências são codificadas no genoma da planta. Ainda existem muitas lacunas a respeito da sua biossíntese, sendo esta uma área de pesquisa de vanguarda. Sabe-se que eles são biossintetizados por via ribossomal através de precursores proteicos, que posteriormente, pela ação de diversas enzimas, sofrem uma série de modificações pós-traducionais (clivagem, ciclização dos extremos N e C-terminais, formação das ligações dissulfeto) dando lugar ao ciclotídeo (CRAIK; MALIK, 2013; SHAFEE; HARRIS; ANDERSON, 2015).

Para extração desta classe de substâncias da matriz vegetal, duas abordagens têm sido empregadas com bons resultados (GÖRANSSON *et al.* 2015). A primeira utiliza misturas de diclorometano/metanol 1:1 (v/v) (CRAIK *et al.* 2012), e a segunda emprega misturas hidroalcoólicas de média polaridade (YESHAK *et al.* 2012). No geral, o isolamento destes compostos se dá mediante cromatografia líquida de alta eficiência preparativa e/ou semipreparativa em gradiente, empregando octadecilsilano como fase estacionária. No entanto, trabalhos empregando outras técnicas cromatográficas como exclusão por tamanho (CLAESON *et al.* 1998), troca iônica (LINDHOLM *et al.* 2002; SVANGÅRD *et al.* 2004) e eletroforese capilar (SAETHER *et al.* 1995) já foram relatados.

Uma revisão dos ciclotídeos isolados até o momento pode ser encontrada no site <http://www.cybase.org.au> (WANG *et al.* 2008a). Uma listagem atual sobre revisões em

distintos tópicos sobre ciclotídeos foi publicada recentemente (CRAIK *et al.* 2017; HUANG; DU; CRAIK, 2019).

### **1.2.1 Caracterização estrutural: sequenciamento *de novo***

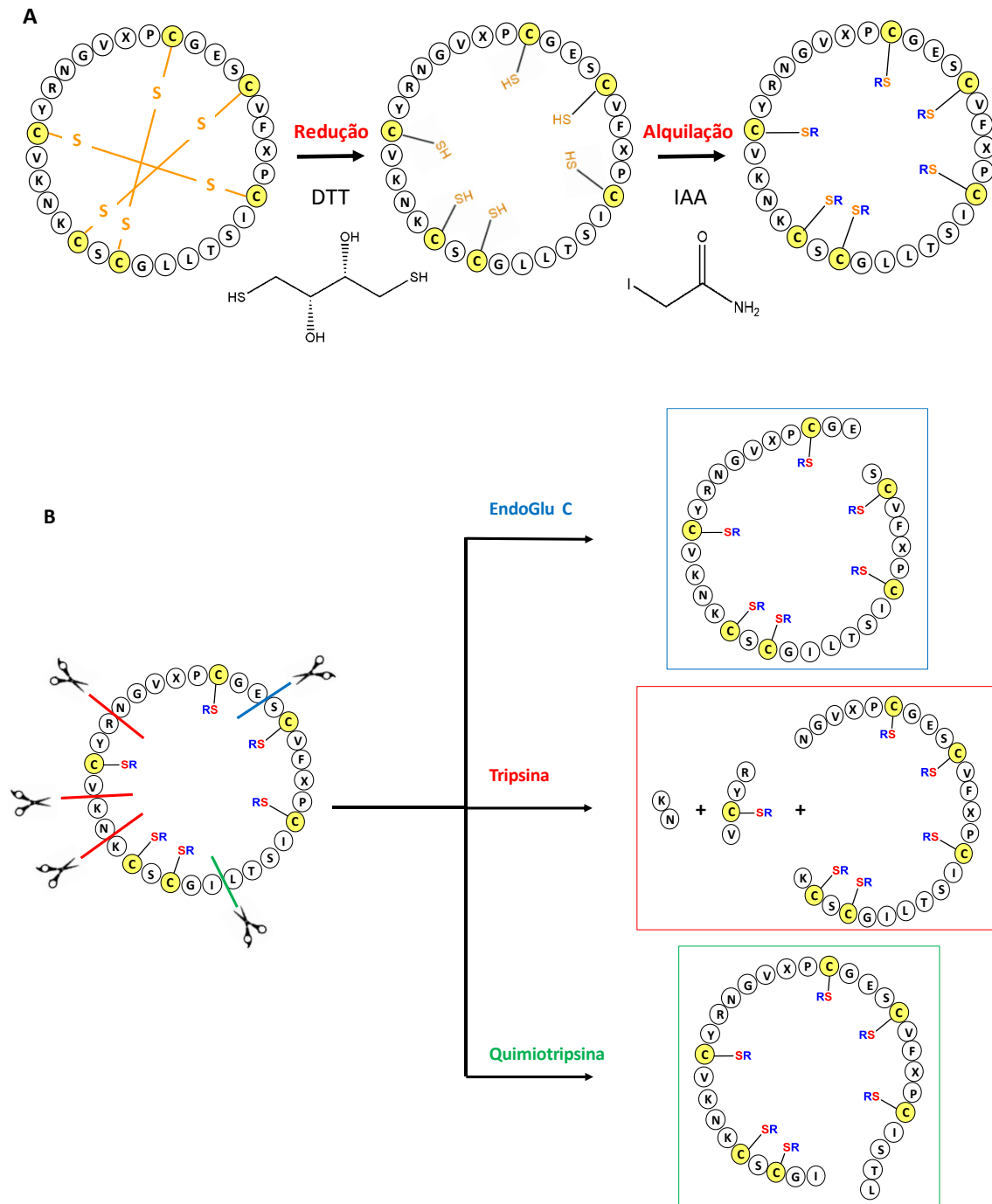
A elucidação estrutural dos ciclotídeos, *in natura*, não pode ser realizada diretamente por técnicas convencionais de análise de peptídeos e proteínas, como degradação de Edman ou espectrometria de massas sequencial, pois as características estruturais que eles possuem (ciclização cabeça-cauda e ligações dissulfeto) os tornam extremamente estáveis (COLGRAVE, 2015). Para resolver esse problema várias abordagens têm sido publicadas (GÖRANSSON *et al.* 2003; SZE *et al.* 2009; COLGRAVE *et al.* 2010; HASHEMPOUR *et al.* 2013; FOREMAN *et al.* 2019). Algumas delas empregam reações de redução, alquilação e digestão enzimática com diferentes enzimas: endoproteinase-GluC, tripsina e quimiotripsina com o objetivo de obter extremos N e C terminais livres necessários para o sequenciamento (CONIBEAR *et al.* 2011). A reação de redução cliva as ligações dissulfeto, permitindo obter seis grupos tióis livres, que posteriormente são alquilados com iodoacetamida (Figura 6A). Desta forma, os ciclotídeos ficam com suas seis cisteínas, acetoamidadas, o que confere um acréscimo de 348 Da, na massa molecular dos compostos em discussão. Após estas reações, vem a etapa da digestão enzimática (Figura 6B). No geral, os ciclotídeos têm um único resíduo de ácido glutâmico na sua estrutura, conservado no *loop* 1. Espera-se que com o uso da enzima endoGlu-C haja uma clivagem na ligação C-terminal do resíduo de ácido glutâmico (Glu, E), produzindo a abertura do anel e o incremento de 18 Da à massa do peptídeo. Por outro lado, a tripsina cliva os resíduos de lisina (Lys, K) e arginina (Arg, R), pelo seu extremo C-terminal, que não antecedam a prolina (Pro, P) produzindo, de duas a três clivagens na estrutura (Figura 6B). Já a quimiotripsina é empregada principalmente para diferenciar leucina de isoleucina, as quais têm a mesma massa molecular e não podem ser diferenciadas facilmente por espectrometria de massas. A diferenciação é possível devido à especificidade que esta enzima tem de clivar os resíduos de fenilalanina, tirosina, triptofano, metionina e leucina que não estejam adjacentes de prolina. Assim, no caso de dúvida entre isoleucina e leucina, se esta não anteceder prolina e for clivada após a digestão com quimiotripsina, significa que o resíduo é uma leucina (Figura 6B).



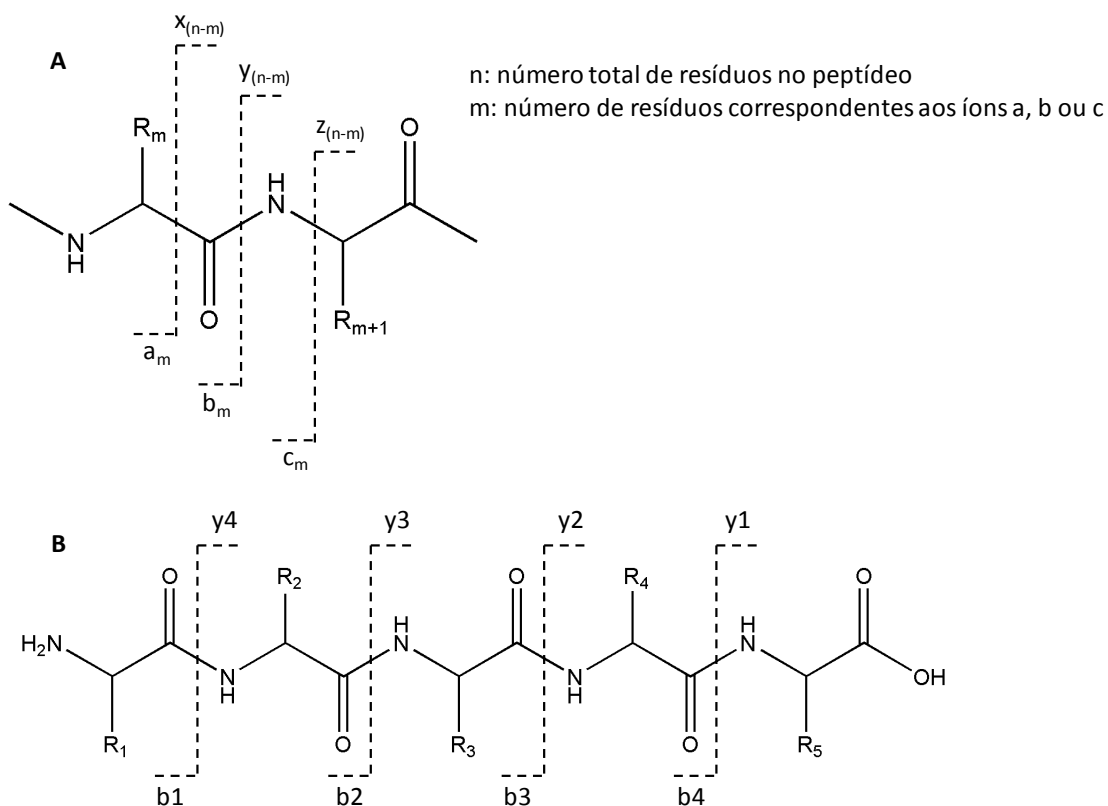
Após obtenção dos extremos N e C-terminais livres, a técnica por excelência para o sequenciamento dos ciclótídeos é a espectrometria de massas. Cada um dos fragmentos advindos da digestão enzimática é reanalisado por espectrometria de massas sequencial. Os dados obtidos são analisados manualmente, ou seja, sem recorrer a bancos de dados (sequenciamento *de novo*) (STEEN; MANN, 2004), sendo possível desta forma obter informações sobre as séries de íons *b* e *y* (Figura 7) (ROEPSTORFF; FOHLMAN, 1984; BIEMANN, 1990). Neste trabalho a identificação das sequências de aminoácidos da estrutura primária foi realizada seguindo a metodologia descrita por Cantú e colaboradores (2008).

Outras técnicas como a ressonância magnética nuclear (1D e 2D), análise de aminoácidos e degradação de Edman também podem ser utilizadas (COLGRAVE, 2015).

**Figura 6** - Reações empregadas no sequenciamento dos ciclótídeos. A) Redução das ligações dissulfeto com ditioneitol (DTT), e posterior alquilação com iodoacetamida (IAA) dos grupos tióis livres. B) Após as reações de redução/alquilação, o ciclótídeo é submetido separadamente a digestão enzimática com endoGlu-C (cliva seletivamente pelo extremo C-terminal do resíduo de Glu), tripsina (cliva pelos extremos C-terminais dos resíduos Lys e Arg) e quimiotripsina (cliva pelo extremo C-terminal de Leu).



**Figura 7** - A) Estrutura química geral de um peptídeo apresentando a nomenclatura proposta por Roepstorff-Fohlmann-Biemann dos fragmentos formados devido à transferência de energia para o peptídeo. B) os íons formados são enumerados a partir do aminoácido N-terminal.



Fonte: CANTÚ *et al.* 2008.

### 1.2.2 Ciclotídeos na família Violaceae

Dados da literatura descritos até o momento indicam que estes compostos ocorrem em cinco famílias de plantas superiores: Violaceae, Rubiaceae, Cucurbitaceae (HERNANDEZ *et al.* 2000), Fabaceae (POTH *et al.* 2011) e Solanaceae (POTH *et al.* 2012; BURMAN *et al.* 2014). Recentemente, uma série de sequências parciais, com certo grau de homologia com os ciclotídeos, foi reportada na espécie *Sambucus nigra* (Adoxaceae) (ALVAREZ *et al.* 2018). No entanto, os dados da pesquisa são insuficientes para demonstrar que este táxon é capaz de biossintetizar essa classe.

O primeiro estudo sobre ciclotídeos na família Violaceae foi no ano 1993 (SCHÖPKE *et al.* 1993). Após esse estudo inicial inúmeros outros trabalhos foram publicados (Tabela 2). O mais abrangente foi realizado por Burman e colaboradores (2015), com exemplares depositados em herbário (alguns deles com mais de 200 anos). Nesse estudo

chegaram à conclusão que os ciclotídeos são ubíquos na família Violaceae. Até o momento os estudos foram realizados somente em 10 gêneros (*Viola* spp., *Gloeospermum* spp., *Leonia* spp., *Hybanthus* spp., *Melicytus* spp., *Rinorea* spp., *Pombalia* sp., *Noisettia* sp., *Orthion* sp., e *Allexis* sp.) (BURMAN *et al.* 2015; BOBEY *et al.* 2018; ZONDEGOUMBA *et al.* 2019) (Tabela 2). Estimativas indicam que na família existam entre 5000-89000 ciclotídeos (BURMAN *et al.* 2015; STERNBERGER *et al.* 2019).

**Tabela 2** - Ciclotídeos reportados na família Violaceae (Continua)

Ciclotídeo	Espécie	Referência
varv A-H	<i>Viola arvensis</i>	CLAESON <i>et al.</i> 1998; GÖRANSSON <i>et al.</i> 1999; SVANGÅRD <i>et al.</i> 2004
cyO1-12	<i>Viola odorata</i>	CRAIK <i>et al.</i> 1999
cicloviolinas A-D	<i>Leonia cymosa</i>	HALLOCK <i>et al.</i> 2000
hypa A	<i>Hybanthus parvifolius</i>	BROUSSALIS <i>et al.</i> 2001
vico A-B	<i>Viola cotyledon</i>	GÖRANSSON <i>et al.</i> 2003
vodo M-N	<i>Viola odorata</i>	SVANGÅRD <i>et al.</i> 2003
vhl 1-2, cyH2-H3	<i>Viola hederaceae</i>	CHEN <i>et al.</i> 2005
hyfl A-M	<i>Hybanthus floribundus</i>	SIMONSEN <i>et al.</i> 2005
tricolor A	<i>Viola tricolor</i>	MULVENNA <i>et al.</i> 2005
cyO14-25	<i>Viola odorata</i>	IRELAND <i>et al.</i> 2006a
cicloviolacina Y1-Y5	<i>Viola yedoensis</i>	WANG <i>et al.</i> 2008b
vibi A-K	<i>Viola biflora</i>	HERRMANN <i>et al.</i> 2008
mra 1-5	<i>Melicytus ramiflorus</i>	TRABI <i>et al.</i> 2009
glopa A-E	<i>Gloeospermum pauciflorum</i>	BURMAN <i>et al.</i> 2010
globa A-G	<i>Gloeospermum blakeanum</i>	BURMAN <i>et al.</i> 2010
cicloviolacina T1	<i>Viola tianshanica</i>	XIANG <i>et al.</i> 2010
vila A-D	<i>Viola labridorica</i>	TANG <i>et al.</i> 2010a
vitri A-F	<i>Viola tricolor</i>	SVANGÅRD <i>et al.</i> 2003; TANG <i>et al.</i> 2010b
cyO26-35	<i>Viola odorata</i>	COLGRAVE <i>et al.</i> 2010
viphi A-H	<i>Viola philippica</i>	HE <i>et al.</i> 2011
varv A, cyO8, cyB2	<i>Viola ignobilis</i>	HASHEMPOUR <i>et al.</i> 2011
vaby A-E	<i>Viola abyssinica</i>	YESHAK <i>et al.</i> 2011
vigno 1-10, cyO2, cyO9	<i>Viola ignobilis</i>	HASHEMPOUR <i>et al.</i> 2013
glopa F-G	<i>Gloeospermum pauciflorum</i>	BURMAN <i>et al.</i> 2015
hyde A	<i>Hybanthus denticulatus</i>	BURMAN <i>et al.</i> 2015
mema A-B	<i>Melicytus macrophyllus</i>	BURMAN <i>et al.</i> 2015
rili A-B	<i>Rinorea lindeniana</i>	BURMAN <i>et al.</i> 2015
vide A	<i>Viola decumbens</i>	BURMAN <i>et al.</i> 2015
vini A	<i>Viola nivalis</i>	BURMAN <i>et al.</i> 2015
orto A	<i>Orthion oblanceolatum</i>	BURMAN <i>et al.</i> 2015
vitri 1-4, 8, 9a/53, 14, 17-18a, 20, 21, 23, 24/28, 27a, 29, 30, 36-38, 42a, 50	<i>Viola tricolor</i>	HELLINGER <i>et al.</i> 2015
mech 1-7	<i>Melicytus chathamicus</i>	RAVIPATI <i>et al.</i> 2015
mela 1-7	<i>Melicytus latifolius</i>	RAVIPATI <i>et al.</i> 2015

**Tabela - 2** Ciclotídeos reportados na família Violaceae (Conclusão)

Ciclotídeo	Espécie	Referência
riden A	<i>Rinorea dentata</i>	ATTAH <i>et al.</i> 2016
visu 1-2	<i>Viola sumatrana</i>	NIYOMPLOY <i>et al.</i> 2016
mden A-N	<i>Melicytus dentatus</i>	RAVIPATI <i>et al.</i> 2017
itri A	<i>Leonia triandra</i>	RAVIPATI <i>et al.</i> 2017
vodo l1-3	<i>Viola odorata</i>	NARAYANI <i>et al.</i> 2017
rivi 1-7	<i>Rinorea virgata</i>	NIYOMPLOY <i>et al.</i> 2018
cT10	<i>Rinorea bengalensis</i>	NIYOMPLOY <i>et al.</i> 2018
nor A	<i>Noisettia orchidiflora</i>	BOBEY <i>et al.</i> 2018
poca A-B e cyO4	<i>Pombalia calecolaria</i>	PINTO <i>et al.</i> 2018
alba 1-4	<i>Allexis batangae</i>	ZONDEGOUNBA <i>et al.</i> 2019
cyl 1-6	<i>Viola inconspicua</i>	PARSLEY <i>et al.</i> 2019

Fonte: elaborada pelo autor, 2020.

### 1.2.3 Atividades biológicas dos ciclotídeos

Esta classe de compostos vem atraindo a atenção de pesquisadores, devido não só a sua topologia estrutural única e estável, mas também por suas propriedades biológicas e/ou farmacológicas, entre as quais se destacam as atividades uterotônica (GRAN, 1973a, 1973b; SAETHER *et al.* 1995; GRAN *et al.* 2008), antibacteriana (TAM *et al.* 1999; PRANTING *et al.* 2010; OVESEN *et al.* 2011; FENSTERSEIFER *et al.* 2015; STRÖMSTEDT *et al.* 2017; PARSLEY *et al.* 2019), antifúngica (PARSLEY *et al.* 2018; SLAZAK *et al.* 2018), anti-HIV (GUSTAFSON *et al.* 1994, 2000; DALY *et al.* 2004; CHEN *et al.* 2005; WANG *et al.* 2008b), citotóxica (LINDHOLM *et al.* 2002; SVANGÅRD *et al.* 2004; HERRMANN *et al.* 2008; YESHAK *et al.* 2011; PARK *et al.* 2014; HU *et al.* 2015; PINTO *et al.* 2018; SILVA *et al.* 2019) e de inibição de proteases (HELLINGER *et al.* 2015).

Recentemente suas propriedades imunossupressoras ganharam destaque, e evidências sugerem uma possível aplicação no tratamento da esclerose múltipla por via oral (GRÜNDEMAN *et al.* 2012, 2013; THELL *et al.* 2016; GRÜNDEMAN *et al.* 2019). Outra propriedade interessante, recentemente descoberta, é a capacidade de modulação dos receptores acoplados à proteína G, especificamente os receptores de oxitocina e vasopressina V1A (KOEHBACH *et al.* 2013; FAHRADPOUR *et al.* 2017).

Acredita-se que o mecanismo de ação de muitas destas atividades esteja relacionado à capacidade de interação/ruptura dos ciclotídeos com as membranas das células (BURMAN *et al.* 2011; HENRIQUES *et al.* 2015). Recentemente, um estudo com

o ciclotídeo cyO2, fez uso desta propriedade para potencializar a eficácia de medicamentos antirretrovirais contra o HIV (GERLACH *et al.* 2019).

### 1.2.3.1 Atividades relacionadas à defesa das plantas

Acredita-se que sua função biológica está relacionada com o sistema de defesa das plantas (GRUBER *et al.* 2007; CRAIK, 2009; PINTO *et al.* 2012). Essa hipótese sustenta-se nas potentes atividades inseticida (JENNINGS *et al.* 2001, 2005; PINTO *et al.* 2012; MATSUURA *et al.* 2016), anti-helmíntica (COLGRAVE *et al.* 2008a, 2008b, 2009; MALAGÓN *et al.* 2013), moluscicida (PLAN *et al.* 2008) e antiincrustante (GÖRANSSON *et al.* 2004) descritas para esta importante classe de produtos naturais (Tabela 3). No caso da atividade inseticida, acredita-se que seu mecanismo de ação esteja relacionado com a ruptura de membranas do intestino médio dos insetos após ingestão, segundo evidências obtidas por microscopia eletrônica (BARBETA *et al.* 2008).

**Tabela 3** - Ciclotídeos com atividades relevantes para agricultura

Ciclotídeo	Alvo biológico	Aplicação	Referência
kalata B1	<i>Helicoverpa punctigera</i>	Inseticida	JENNINGS <i>et al.</i> 2001
kalata B2	<i>Helicoverpa armigera</i>	Inseticida	JENNINGS <i>et al.</i> 2005
cter M	<i>Helicoverpa armigera</i>	Inseticida	POTH <i>et al.</i> 2011
paragidina-br1	<i>Diatrea saccharalis</i>	Inseticida	PINTO <i>et al.</i> 2012
cyO1, kB1 e kB2	<i>Pomacea canaliculata</i>	Moluscicida	PLAN <i>et al.</i> 2008
kB1, kB2, kB3, kB5, kB6 e kB7	<i>Hemonchus contortus/ Trichostrongylus colubriformis</i>	Nematicida	COLGRAVE <i>et al.</i> 2008b
Extrato <sup>a</sup>	<i>Ceratitidis capitata</i>	Inseticida	BROUSSALIS <i>et al.</i> 2010
Extrato da raiz <sup>b</sup>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nematicida	GILDING <i>et al.</i> 2016
Extrato <sup>c</sup>	-	Inseticida	OGUIS <i>et al.</i> 2019

<sup>a</sup>Extrato butanólico enriquecido em ciclotídeos obtido de *Hybanthus parviflorus*

<sup>b</sup>Extrato enriquecido em ciclotídeos obtido da raiz da espécie *Clitoria ternatea*

<sup>c</sup>Extrato enriquecido em ciclotídeos, obtido da espécie *Clitoria ternatea*

Fonte: Adaptado de WEIDMANN; CRAIK, 2016.

Devido às suas peculiaridades moleculares, os ciclotídeos são considerados moléculas promissoras para aplicações farmacêuticas e agrícolas (PINTO *et al.* 2012; CUNHA *et al.* 2016; OJEDA; CARDOSO; FRANCO, 2019). Recentemente, a empresa australiana Innovate AG lançou o Sero-X<sup>®</sup>, um bioinseticida ecologicamente “amigável” a base de *Clitoria ternatea* (Fabaceae) (<http://innovate-ag.com.au>), uma planta produtora de ciclotídeos (POTH *et al.* 2011). Este produto mostrou-se efetivo no

combate a várias pragas que atacam lavouras de interesse comercial e provavelmente seu mecanismo de ação envolve a presença dos ciclotídeos (OGUIS *et al.* 2019).

### 1.2.3.2 Atividade hemolítica

Uma das primeiras atividades biológicas avaliadas para os ciclotídeos foi a atividade hemolítica (SCHÖPKE *et al.* 1993 *apud* CRAIK, 2012), que é a destruição dos glóbulos vermelhos (eritrócitos) pela ruptura da membrana plasmática. Os ciclotídeos possuem uma atividade hemolítica moderada, com doses hemolíticas de 50% (DH<sub>50</sub>) na faixa de 7-1510 µM (Tabela 4), quando comparados com a melitina (DH<sub>50</sub> ~ 1 µM), um potente agente hemolítico isolado do veneno da abelha *Apis mellifera* (HABERMANN, 1972; CHEN *et al.* 2016). Acredita-se que o possível mecanismo seja por interação com a membrana da célula e que a ciclização (ausência de extremos N e C-terminais livres) seja fundamental para manter esta atividade (DALY; CRAIK, 2000; BARRY *et al.* 2003).

**Tabela 4** - Ciclotídeos com atividade hemolítica reportados na literatura

Ciclotídeo	DH <sub>50</sub> (µM)	Referência
circulina A	1020	TAM <i>et al.</i> 1999
circulina B	550	JENNINGS <i>et al.</i> 2005
ciclopsicotrídeo A	405	TAM <i>et al.</i> 1999
cyO2	36	IRELAND <i>et al.</i> 2006a
cyO13	11	IRELAND <i>et al.</i> 2006a
cyO14	25	IRELAND <i>et al.</i> 2006a
cyO15		IRELAND <i>et al.</i> 2006a
cyO24	25	IRELAND <i>et al.</i> 2006a
kalata B1	11,7-1510	DALY <i>et al.</i> 1999; TAM <i>et al.</i> 1999; BARRY <i>et al.</i> 2003; WANG <i>et al.</i> 2008b
varv A		IRELAND <i>et al.</i> 2006a
violacin A		IRELAND <i>et al.</i> 2006b
kB2 e kB7		GRAN <i>et al.</i> 2008
cicloviolacina Y4 e Y5	9,3 e 8,7	WANG <i>et al.</i> 2008b
cter 1, cter 3 e cter 4	7,1; 13,1 e 8,4	NGUYEN <i>et al.</i> 2011
rivi 1, rivi 2 e rivi 3	»10	NIYOMPLOY <i>et al.</i> 2018

Fonte: elaborada pelo autor, 2020.

### 1.2.4 Pesquisa sobre Ciclotídeos realizada no Brasil

Esta linha de pesquisa é muito recente no Brasil. O primeiro relato de um composto desta classe foi realizado pelo Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas da Universidade Católica de Brasília sob supervisão do professor Otavio L. Franco. Nesse

trabalho foi possível isolar da espécie *Palicourea rigida* (Rubiaceae) um novo ciclotídeo, pertencente à família dos braceletes e nomeado parigidina-br1 (PINTO, 2010; PINTO *et al.* 2012). Posteriormente o mesmo grupo publicou outros artigos sobre esta classe (FENSTERSEIFER *et al.* 2015; CUNHA *et al.* 2016; PINTO *et al.* 2016).

Outro grupo de pesquisa, pioneiro no estudo desta classe de compostos, é o grupo NuBBE (Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais) da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Eles têm feito estudos com vários gêneros da família Violaceae (PINTO, 2013; NAJAS, 2014; BOBEY, 2016; PINTO *et al.* 2018; BOBEY *et al.* 2018). Recentemente, foram isolados e caracterizados das raízes da espécie *Pombalia calceolaria* três ciclotídeos (poca A, poca B e cyO4) com atividade antitumoral (PINTO *et al.* 2018) (Tabela 5).

**Tabela 5** - Alguns dos ciclotídeos reportados por grupos de pesquisa brasileiros em espécies das famílias Violaceae e Rubiaceae

Ciclotídeo	Espécie	Sequência de aminoácidos	Referência
pg-br1	<i>P. rigida</i> <sup>1</sup>	CGESCVFIPCTISLAGCSCKNKVCYYDGGVSP	PINTO <i>et al.</i> 2012
nor A	<i>N. orchidiflora</i> <sup>2</sup>	CAESCVYLPCTITAIIGCSCRSKVCYDGLP	NAJAS, 2014
nor B	<i>N. orchidiflora</i> <sup>2</sup>	CGESCVWXPCTXSAXGCSCKNKVCYRNGXP	BOBEY, 2016
nor C	<i>N. orchidiflora</i> <sup>2</sup>	CGESCVFIPCTISTLIGCSCKNKVCYRNGVIP	BOBEY, 2016
nor D	<i>N. orchidiflora</i> <sup>2</sup>	CGESCVWXP CISAAIGCSCKNKVCYRNGVXP	BOBEY, 2016
nor E	<i>N. orchidiflora</i> <sup>2</sup>	CGESCVFXPCXSSXAGCSCKNKVCYIDGSXP	BOBEY, 2016
poca A	<i>P. calceolaria</i> <sup>3</sup>	CAESCVFIPCTITAILGCSCRDRVCYDGLP	PINTO <i>et al.</i> 2018
poca B	<i>P. calceolaria</i> <sup>3</sup>	CAESCVFIPCV-TAILGCCKDRVCYNGIP	PINTO <i>et al.</i> 2018
psyleio A	<i>P. leiocarpa</i> <sup>4</sup>	CGETCFTGTCNTPGCSTYPICTRDGLPI	MATSUURA <i>et al.</i> 2016
cyO2	<i>V. odorata</i> <sup>5</sup>	CGESCVWIPCISAAIGCCKSKVCYRNGIP	FENSTERSEIFER <i>et al.</i> 2015

Legenda: <sup>1</sup> *Palicourea rigida* (Rubiaceae); <sup>2</sup> *Noisettia orchidiflora* (Violaceae); <sup>3</sup> *Pombalia calceolaria* (Violaceae); <sup>4</sup> *Psychotria leiocarpa* (Rubiaceae); <sup>5</sup> *Viola odorata* (Violaceae)

Fonte: elaborada pelo autor, 2020



### 1.3 DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS

A família Violaceae Batsch (ordem Malpighiales) possui 26 gêneros e aproximadamente 1100 espécies de distribuição cosmopolita (WAHLERT *et al.* 2018). Esta família apresenta ampla distribuição geográfica e tipos diferenciados de vegetação e variação de hábito (ervas anuais, subarbusto, arbustos, árvores e lianas). No Brasil, são encontradas 75 espécies, distribuídas em 14 gêneros, amplamente distribuídas nos mais variados ecossistemas como a Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal e Cerrado. Os gêneros presentes no país são: *Amphirrhox*, *Anchietea*, *Calypttrion*, *Gloespermum*, *Hybanthopsis*, *Hybanthus*, *Leonia*, *Noisettia*, *Paypayrola*, *Pombalia*, *Rinorea*, *Rinoreocarpus*, *Schweiggeria* e *Viola* (PAULA-SOUZA, 2015).

Do ponto de vista químico, nesta família, já foram reportados flavonoides (flavonas C e O-glicosiladas, antocianinas, flavonols), terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos e triterpenos), fenilpropanóides (cumarinas, neolignaninas) e esteroides (MUHAMMAD *et al.* 2012; ZHU *et al.* 2015; CHANDRA *et al.* 2015).

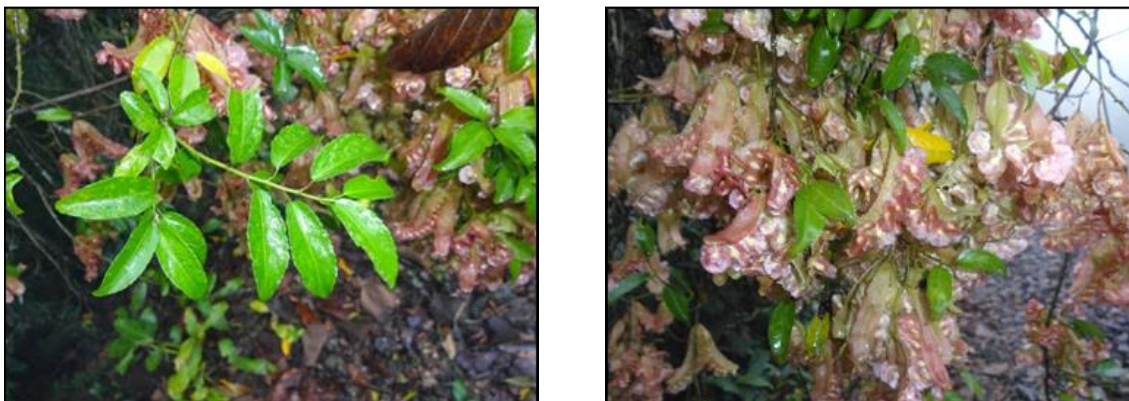
#### 1.3.1 O gênero *Anchietea* e a espécie *A. pyrifolia*

O gênero *Anchietea* A. St.-Hil. foi descrito pela primeira vez na obra *Plantes Usuelles des Brésiliens*, do botânico Auguste de Saint-Hilaire; o nome foi uma homenagem ao missionário jesuíta José de Anchieta (SAINT-HILAIRE, 2009). O gênero possui seis espécies distribuídas pela América do Sul. No Brasil, existem cinco espécies (*A. ballardii*, *A. exalata*, *A. ferrucciae*, *A. selloviana* e *A. pyrifolia*), encontradas nos Estados de Goiás, Ceará, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (PAULA-SOUZA, 2015).

A espécie *A. pyrifolia* (Mart.) G. Don. (Figura 8) (sinônimos *A. salutaris* A. St. Hilaire; *A. parvifolia* Hallier f.), comumente conhecida como cipó-suma, piriguaia e suma (PAULA-SOUZA *et al.* 2012), já foi descrita na Primeira Edição da Farmacopeia Brasileira devido a suas propriedades medicinais (BRANDÃO *et al.* 2009). Esta espécie tem relatos de uso medicinal no estado de Rio de Janeiro (AZEVEDO *et al.* 2006). Suas folhas e caule têm sido empregados no tratamento de alergias, doenças da pele e como antiasmática (DI STASI *et al.* 1994; DI STASI *et al.* 1999; SILVA *et al.* 2004). As raízes são utilizadas como depurativas e antissifilíticas (GRANDI, 2014; MESSIAS *et al.* 2015). No Brasil a espécie

está distribuída principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país, com reportes de ocorrência também na Bahia, Pernambuco, Mato Grosso do Sul e Goiás (Figura 9).

**Figura 8** - Ilustrações da espécie *Anchietea pyrifolia* (Mart.) G. Don.



Fonte: Fototeca Paulo Schwirkowski

**Figura 9** - Distribuição geográfica da espécie *Anchietea pyrifolia* no Brasil.

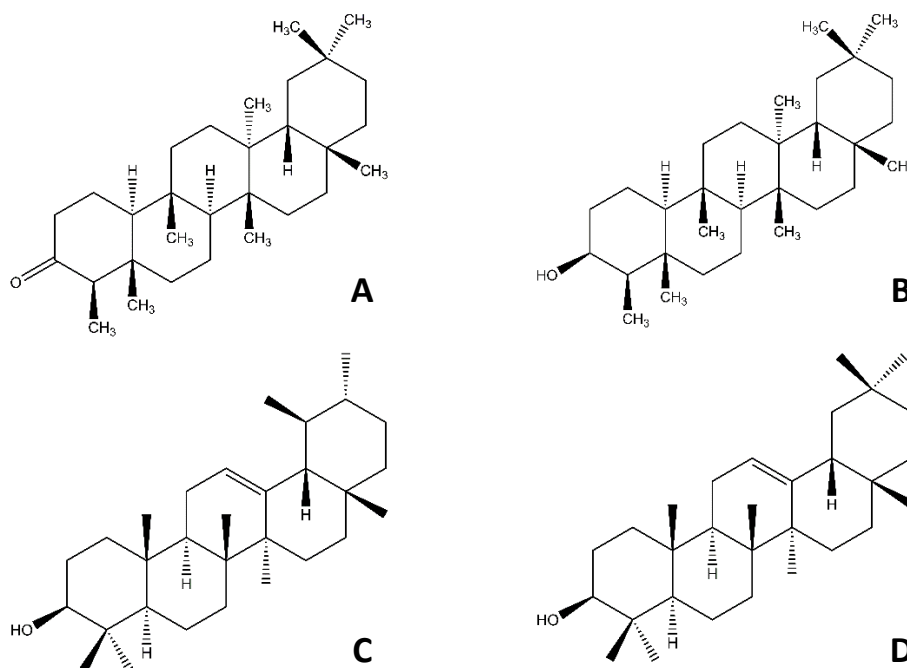


Fonte: Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15223>. Acesso em: 17 Dez. 2019

Uma busca na literatura mostrou alguns estudos fitoquímicos envolvendo essa espécie. No trabalho de Matida e colaboradores (1992), foi reportada a presença dos triterpenos pentacíclicos friedelina e epifridelanol (Figura 10) (MATIDA *et al.* 1992) e posteriormente foram reportadas outras duas substâncias da mesma classe:  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina (Figura 10), assim como hidrocarbonetos alifáticos e ésteres de ácidos graxos (palmítico, oleico, linoleico e linolênico) (DI STASI *et al.* 1999). Recentemente, nas folhas foram identificados, por LC-MS, flavonoides O-glicosilados, ácidos clorogênicos e

outros derivados de fenilpropanóides (TOLOUEI *et al.* 2019), assim como quatro novos triterpenos pentacíclicos da classe dos friedelanos (FUNASAKI *et al.* 2019).

**Figura 10** - Triterpenos pentacíclicos friedelina (A), epifriedelanol (B),  $\alpha$ -amirina (C) e  $\beta$ -amirina (D) isolados da espécie *A. pyrifolia*.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

### 1.3.2 O gênero *Noisettia* e a espécie *N. orchidiflora*

*Noisettia* Kunth é um gênero monotípico da família Violaceae (WAHLERT *et al.* 2014); sua distribuição está majoritariamente na região tropical da América do Sul (Peru, Brasil e Guianas).

*Noisettia orchidiflora* (Figura 11) é uma espécie nativa do Brasil, mas não endêmica. Há descrições desta espécie em países da Europa (Suécia, França e Inglaterra) e América do Sul (Peru, Suriname, e Guiana Francesa). No Brasil, a espécie tem como domínio fitogeográfico a Amazônia e Mata Atlântica, e está distribuída geograficamente nas regiões Norte (Acre, Amazonas e Pará), Nordeste (Alagoas, Bahia, Maranhão e Pernambuco), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Paraná e Santa Catarina) do país (PAULA-SOUZA, 2015) (Figura 12).

**Figura 11** - Ilustrações da espécie *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Ging.



Fonte: Najas, 2014

**Figura 12** - Distribuição geográfica da espécie *Noisettia orchidiflora* no Brasil



Fonte: Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15237>. Acesso em: 17 Dez. 2019

Nas comunidades indígenas de Acre, a espécie é conhecida como “*tatum rau*”, sendo empregada na medicina tradicional para o tratamento de inchaço (DALY; SILVEIRA; FERREIRA, 2004). Igualmente, existem descrições do uso da raiz como vomitivo em comunidades da Guiana Francesa, usando-se também como substituto de *Ipeca* (*Hybanthus calceolaria*) cujas raízes são usadas pelas propriedades anti-helmínticas (DEFILIPPS *et al.* 2004). Para *N. orchidiflora* foi confirmada através da espectrometria de massas MALDI-TOF a presença de ciclotídeos em galhos, folhas e raízes, no entanto, apenas um ciclotídeo foi descrito nas raízes desta espécie (NAJAS,

2014) (Tabela 5). Posteriormente, em outro trabalho, a partir das folhas e caules desta espécie, foram reportadas as sequências de quatro ciclotídeos, denominados por B-E (BOBEY, 2016) (Tabela 5, página 38).

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados mostrados e discutidos neste estudo contribuem com as pesquisas recentes em peptídeos cíclicos de espécies de plantas brasileiras. O estudo destas mini-proteínas vegetais é um tema de vanguarda a nível internacional e no Brasil encontra-se nos seus primórdios. Portanto, os dados deste trabalho e de outros em andamento serão importantes para entender a função ecológica destes produtos naturais nos táxons que os biossintetizam, especialmente em ambientes tropicais, onde os relatos são escassos. Contudo, neste trabalho a técnica LC-ESI-IT-MS mostrou-se eficaz na anotação de 83 ciclótídeos nos diferentes órgãos das espécies em questão. Este resultado motivou o isolamento por meio de cromatografia líquida de alta eficiência de nove substâncias, quatro das folhas e raízes da espécie *N. orchidiflora* (nor E (6), nor F (7), nor G (8) e vhr 1 (9) e cinco dos caules e raízes da espécie *A. pyrifolia* (cyO4 (1), cyO17 (2), apy A (3), apy B (4) e cter 15 (5), que tiveram suas estruturas primárias sequenciadas. Este resultado contribui para o número de ciclótídeos reportados da biodiversidade brasileira, visto que atinge o dobro de substâncias já descritas.

Adicionalmente, as frações ricas em ciclótídeos, das espécies em estudos, foram avaliadas nos ensaios de atividade antiplasmodial e antibacteriana, e mostraram-se inativas. Por outro lado, os ciclótídeos cyO4 (1) e apy A (3) mostraram atividade inseticida *in vivo* contra abelha africanizada *Apis mellifera*, através do ensaio de inoculação, com CL<sub>50</sub> de 76 e 262 µM, respectivamente. Este é o primeiro estudo que avalia a toxicidade dos ciclótídeos frente um polinizador. Além disso, foi avaliada a atividade hemolítica dos ciclótídeos apy A, apy B, cyO4 e cyO17 frente a eritrócitos humanos. Apy A (3) foi o mais hemolítico com DH<sub>50</sub> de 22 µM. Na máxima concentração avaliada (156 µM) os outros três foram menos ativos, não atingindo o 50 % de destruição dos eritrócitos, o que de fato é um resultado alentador tendo em consideração que do ponto de vista farmacológico esta não é uma atividade desejada.

## REFERÊNCIAS

ABDALLA, M. A.; MCGAW, L. J. Natural cyclic peptides as an attractive modality for therapeutics: a mini review. **Molecules**, v. 23, p. 2080, 2018.

ÁLVAREZ, C. A. et al. Identification of peptides in flowers of *Sambucus nigra* with antimicrobial activity against aquaculture pathogens. **Molecules**, v. 23, p. 1033, 2018.

ARNISON, P. G. et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. **Nat. Prod. Rep.**, v. 30, p. 108-160, 2013.

ATTAH, A. F. et al. Ethnobotanical survey of *Rinorea dentata* (Violaceae) used in South-Western Nigerian ethnomedicine and detection of cyclotides. **J. Ethnopharmacol.**, v. 179, p. 83-91, 2016.

AZEVEDO, S. K. S.; SILVA, I. M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 20, p. 185-194, 2006.

BARBETA, B. L. Plant cyclotides disrupt epithelial cells in the midgut of lepidopteran larvae. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, p. 1221-1225, 2008.

BARRY, D. G. et al. Linearization of a naturally occurring circular protein maintains structure but eliminates hemolytic activity. **Biochemistry**, v. 42, p. 6688-6695, 2003.

BERNARDI, C. R. et al. Preparo de hidrolisados protéicos para a análise de aminoácidos. **Cienc. Tecnol. Aliment. (Campinas, Braz.)**, v. 23, p. 317-322, 2003.

BERNARDINI, S. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Nat. Prod. Res.**, v. 32, p. 1926-1950, 2018.

BIEMANN, K.; Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). **Methods Enzymol.**, v. 193, p. 886-887, 1990.

BOBEY, A. F. **Isolamento e caracterização de ciclotídeos da espécie *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Ging.** 2016. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

BOBEY, A. F. et al. A cyclotide isolated from *Noisettia orchidiflora* (Violaceae). **Planta Med.**, v. 84, p. 947-952, 2018.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Traditional uses of American plant species from the 1<sup>st</sup> edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 19, p. 478-487, 2009.

- BROOKES, M. E. et al. Ziconotide monotherapy: A systematic review of randomized controlled trials. **Curr. Neuropharmacol.**, v. 15, p. 217-231, 2017.
- BROUSSALIS, A. M. et al. First cyclotide from *Hybanthus* (Violaceae). **Phytochemistry**, v. 58, p. 47-51, 2001.
- BROUSSALIS, A. M. et al. *Hybanthus parvifolius* (Violaceae): Insecticidal activity of a South American plant. **Crop Prot.**, v. 29, p. 953-956, 2010.
- BURMAN, R. et al. Cyclotide proteins and precursors from the genus *Gloeospermum*: Filling a blank spot in the cyclotide map of Violaceae. **Phytochemistry**, v. 71, p. 13-20, 2010.
- BURMAN, R. et al. Cytotoxic potency of small macrocyclic knot proteins: Structure-activity and mechanistic studies of native and chemically modified cyclotides. **Org. Biomol. Chem.**, v. 9, p. 4306-4314, 2011.
- BURMAN, R. et al. Chemistry and biology of cyclotides: circular plant peptides outside the box. **J. Nat. Prod.**, v. 77, p. 724-736, 2014.
- BURMAN, R. et al. Distribution of circular proteins in plants: large-scale mapping of cyclotides in the Violaceae. **Front. Plant. Sci.**, v. 6, p. 855, 2015.
- CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 91, p. e20190105, 2019.
- CANTÚ, M. D. et al. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Quim. Nova**, v. 31, p. 669-675, 2008.
- CHANDRA, D. et al. Phytochemical and ethnomedicinal uses of family Violaceae. **Curr. Res. Chem.**, v. 7, p. 44-52, 2015.
- CHEN, B. et al. Isolation and characterization of novel cyclotides from *Viola hederaceae*: solution structure and anti-HIV activity of vhl-1, a leaf-specific expressed cyclotide. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 22395-22405, 2005.
- CHEN, B. et al. Cycloviolacin H4, a hydrophobic cyclotide from *Viola hederaceae*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 23-28, 2006.
- CHEN, J. et al. Melittin, the major pain-producing substance of bee venom. **Neurosci. Bull.**, v. 32, p. 265-272, 2016.
- CLAESON, P. et al. Fractionation protocol for the isolation of polypeptides from plant biomass. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p. 77-81, 1998.



- COLGRAVE, M. L.; CRAIK, D. J. Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: the importance of the cyclic cystine knot. **Biochemistry**, v. 43, p. 5965- 5975, 2004.
- COLGRAVE, M. L. et al. The anthelmintic activity of the cyclotides: natural variants with enhanced activity. **ChemBioChem**, v. 9, p. 1939-1945, 2008a.
- COLGRAVE, M. L. et al. Cyclotides: natural, circular plant peptides with possess significant activity against gastrointestinal nematode parasites of sheep. **Biochemistry**, v. 47, p. 5581-5589, 2008b.
- COLGRAVE, M. L. et al. 2009 Anthelmintic activity of cyclotides: *in vitro* studies with canine and human hookworms. **Acta Trop.**, v. 109, p.163-166, 2009.
- COLGRAVE, M. L. et al. A new "era" for cyclotide sequencing. **Biopolymers**, v. 94, p. 592-601, 2010.
- COLGRAVE, M. L. Primary structural analysis of cyclotides. **Adv. Bot. Res.**, v. 76, p. 113-154, 2015.
- CONIBEAR, A. C. et al. Chemical synthesis of naturally-occurring cyclic mini-proteins from plants and animals. **Isr. J. Chem.**, v. 51, p. 908-916, 2011.
- COYLE, B. et al. Mode of anti-fungal activity of 1,10-phenanthroline and its Cu(II), Mn(II) and Ag(I) complexes. **Biometals**, v. 16, p. 321-329, 2003.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.
- CRAIK, D. J. et al. Plant cyclotides: a unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. **J. Mol. Biol.**, v. 294, p. 1327-1336, 1999.
- CRAIK, D. J. et al. The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. **Toxicon**, v. 39, p. 43-60, 2001.
- CRAIK, D. J. et al. Discovery, structure and biological activities of the cyclotides. **Curr. Prot. Pept. Sci.**, v. 5, p. 297-315, 2004.
- CRAIK, D. J. Circling the enemy: cyclic proteins in plant defence. **Trends Plant Sci.**, v. 14, p. 328-335, 2009.
- CRAIK, D. J. Host-defense activities of cyclotides. **Toxins**, v. 4, p. 139-156, 2012.
- CRAIK, D. J. et al. Cyclotide isolation and characterization. **Methods Enzymol.**, v. 516, p. 37-62, 2012.

CRAIK DJ, MALIK U. Cyclotide biosynthesis. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 17, p. 546-554, 2013.

CRAIK, D. J. et al. Cyclotides as drug design scaffolds. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 38, p. 8-16, 2017.

CRAIK, D. J. et al. Ribossomally-synthesised cyclic peptides from plants as drug leads and pharmaceutical scaffolds. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 26, p. 2727-2737, 2018.

CUNHA, N. B. et al. Cloning and characterization of novel cyclotide genes from South American plants. **J. Pept. Sci.**, v. 106, p. 784-795, 2016.

DALY, N. et al. Chemical synthesis and folding pathways of large cyclic polypeptides: studies of the cystine knot polypeptide kalata B1. **Biochemistry**, v. 38, p. 10606-10614, 1999.

DALY, N.; CRAIK, D. J. Acyclic permutants of naturally occurring cyclic proteins. Characterization of cystine knot and  $\beta$ -sheet formation in the macrocyclic polypeptide kalata B1. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 19068-19075, 2000.

DALY, N. L. et al. The role of the cyclic peptide backbone in the anti-HIV activity of the cyclotide kalata B1. **FEBS Lett.**, v. 574, p. 69-72, Aug. 2004.

DALY, N. L. et al. Structure and activity of the leaf-specific cyclotide vhl-2. **Aust. J. Chem.**, v. 63, p. 771-778, 2010.

DALY, D. C. et al. Floristics and economic botany of Acre, Brazil. Disponível em: [https://www.nybg.org/bsci/acre/www2/vname\\_t.html](https://www.nybg.org/bsci/acre/www2/vname_t.html). Acesso em: 17 dezembro 2019.

DECIO, P. et al. Acute thiamethoxam toxicity in honeybees is not enhanced by common fungicide and herbicide and lacks stress-induced changes in mRNA splicing. **Sci. Rep.**, v. 9, p. 19196, 2019.

DEFILIPPS, R. A. et al. Medicinal plants of the Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana). Disponível em: [http://botany.si.edu/bdg/medicinal/Medicinal\\_plants\\_master.pdf](http://botany.si.edu/bdg/medicinal/Medicinal_plants_master.pdf). Acesso em: 15 dezembro 2019.

DI STASI, L. C. et al. Plantas medicinais da medicina popular no município de Botucatu (SP). Anais do XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Fortaleza, CE, p. 320, 1994.

DI STASI, L. C. et al. Studies on anti-allergic constituents in the leaves and stems of *Anchietia salutaris* var. *martiana* (Violaceae). **Chem. Pharm. Bull.**, v. 47, p. 890-893, 1999.

FAHRADPOUR, M. et al. Cyclotides isolated from an ipecac root extract antagonize the corticotropin releasing factor type 1 receptor. **Front. Pharmacol.**, v. 8, p. 616, 2017.

FELIZMENIO-QUIMIO, M.E. et al. Circular proteins in plants: solution structure of a novel macrocyclic trypsin inhibitor from *Momordica cochinchinensis*. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 22875-22882. 2001.

FENSTERSEIFER, C. M. et al. Effects of cyclotides against cutaneous infections caused by *Staphylococcus aureus*. **Peptides**, v. 63, p. 38-42, 2015.

FISHER, M. F. et al. A family of small, cyclic peptides buried in preproalbumin since the Eocene epoch. **Plant Direct**, v. 2, p. 1-17, 2018.

FOREMAN, D. J. et al. Gas-phase sequencing of cyclotides: introduction of selective ring opening at dehydroalanine via ion/ion reaction. **Anal. Chem.**, v. 91, p. 15608-15616, 2019.

Fototeca Paulo Schwirkowski (FPS). Disponível em:  
<http://www.splink.org.br/search?lang=pt&collectioncode=FPS&images=withimages>.  
Acesso em: 18 Setembro 2019.

FRANCO, O. L. Peptide promiscuity: an evolutionary concept for plant defense. **FEBS Lett.**, v. 585, p. 995-1000, 2011.

FUNASAKI, M. et al. New friedelane triterpenes from *Anchietea pyrifolia*. **Phytochem. Lett.**, v. 32, p. 42-46, 2019.

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

GERLACH, S. L. et al. The membrane-active phytopeptide cycloviolacin O2 simultaneously targets HIV-1-infected cells and infectious viral particles to potentiate the efficacy of antiretroviral drugs. **Medicines**, v. 6, p. 1-21, 2019.

GILDING, E. K. et al. Gene coevolution and regulation lock cyclic plant defence peptides to their targets. **New Phytol.**, v. 210, p. 717-730, 2016.

GÖRANSSON, U. et al. Seven novel macrocyclic polypeptides from *Viola arvensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 62, p. 283-286, 1999.

GÖRANSSON, U. et al. Expression of *Viola* cyclotides by liquid chromatography-mass spectrometry and tandem mass spectrometry sequencing of intercysteine loops after introduction of charges and cleavage sites by aminoethylation. **Anal. Biochem.**, v. 318, p. 107-117, 2003.

GÖRANSSON, U. et al. Reversible antifouling effect of the cyclotide cycloviolacion O2 against barnacles. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 1287-1290, 2004.

- GÖRANSSON, U.; MALIK, S.; SLAZAK, B. Cyclotides in the Violaceae. **Adv. Bot. Res.**, v. 76, p. 15-49, 2015.
- GRAN, L. Oxytotic principles of *Oldenlandia affinis*. **Lloydia**, v. 36, p. 174-178, 1973a.
- 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, p. 400-408, 1973b.
- GRAN, L. et al. Cyclic peptides from *Oldenlandia affinis* DC. Molecular and biological properties. **Chem. Biodivers.**, v. 5, p. 2014-2022, 2008.
- GRANDI, T. S. M. In **Tratado das Plantas Mediciniais: mineiras, nativas e cultivadas**; Ed.; Adaequatio Estúdio: Belo Horizonte, 2014; pp 449-451.
- GRUBER, C. W. et al. Insecticidal plant cyclotides and related cysteine knot toxins. **Toxicon**, v. 49, p. 561-575, 2007.
- GRÜNDEMANN, C. et al. Do plant cyclotides have potential as immunosuppressant peptides? **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 167-174, 2012.
- GRÜNDEMANN, C. et al. Cyclotides suppress human T-lymphocyte proliferation by an interleukin 2-dependent mechanism. **PLoS One**, v. 8, p. e68016, 2013.
- GRÜNDEMANN, C. et al. T20K: an immunomodulatory cyclotide on its way to the clinic. **Int. J. Pept. Res. Ther.**, v. 25, p. 9-13, 2019.
- GUSTAFSON, K. R. et al. Circulins A and B: novel HIV-inhibitory macrocyclic peptides from the tropical tree *Chassalia parvifolia*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 116, p. 9337-9338, 1994.
- GUSTAFSON, K. R. et al. New circulin macrocyclic polypeptides form *Chassalia parvifolia*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 176-178, 2000.
- GUZMÁN-RODRÍGUEZ *et al.* Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents. **BioMed Res. Int.**, v. 2015, p. 1-11, 2015.
- HABERMANN, E. Bee and wasp venoms. **Science**, v. 177, p. 314-322, 1972.
- HALLOCK, Y. F. et al. Cycloviolins A-D, anti-HIV macrocyclic peptides from *Leonia cymosa*. **J. Org. Chem.**, v. 65, p. 124-128, 2000.
- HASHEMPOUR, H. et al. Analysis of cyclotides in *Viola ignobilis* by nano liquid chromatography fourier transform mass spectrometry. **Prot. Pept. Lett.**, v. 18, p. 747-752, 2011.

- HASHEMPOUR, H. et al. 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.
- HE, W. et al. Isolation and characterization of cytotoxic cyclotides from *Viola philippica*. **Peptides**, v. 32, p. 1719-1723, 2011.
- HELLINGER, R. et al. Peptidomics of circular cysteine-rich plant peptides: analysis of the diversity of cyclotides from *Viola tricolor* by transcriptome and proteome mining. **J. Proteome Res.**, v. 14, p. 4851-4862, 2015.
- HENRIQUES, S. et al. The prototypic cyclotide kalata b1 has a unique mechanism of entering cells. **Chem. Biol.**, v. 22, p. 1087-1097, 2015.
- HERNANDEZ, J. F. et al. Squash trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* exhibit an atypical macrocyclic structure. **Biochemistry**, v. 39, p. 5722- 5730, 2000.
- HERRMANN, A. et al. The alpine violet, *Viola biflora*, is a rich source of cyclotides with potent cytotoxicity. **Phytochemistry**, v. 69, p. 939-952, 2008.
- HU, E. et al. Novel cyclotides from *Hedyotis diffusa* induce apoptosis and inhibit proliferation and migration of prostate cancer cells. **Int. J. Clin. Exp. Med.**, v. 8, p. 4059-4065, 2015.
- HUANG, Y-H. et al. Cyclotides: Disulfide-rich peptide toxins in plants. **Toxicon**, v. 172, p. 33-44, 2019
- IOSET, K. et al. Metabolic profiling of *Rhodiola rosea* rhizomes by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Phytochem. Anal.**, v. 22, p. 158-165, 2011.
- IRELAND, D. C. et al. A novel suite of cyclotides from *Viola odorata*: sequence variation and the implications for structure, function and stability. **Biochem. J.**, v. 400, p. 1-12, 2006a.
- IRELAND, D. C. et al. Discovery and characterization of a linear cyclotide from *Viola odorata*: implications for the processing of circular proteins. **J. Mol. Biol.**, v. 357, p. 1522-1535, 2006b.
- IRELAND, D. C. et al. Isolation, sequencing, and structure-activity relationships of cyclotides. **J. Nat. Prod.**, v. 73, p. 1610-1622, 2010.
- JAIN, S.; ZAIN, J. Romidepsin in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. **J. Blood Med.**, v. 2, p. 37-47, 2011.
- JENNINGS, C. et al. Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: The cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 10614-10619, 2001.

JENNINGS, C. V. et al. Isolation, solution structure, and insecticidal activity of kalata B2, a circular protein with a twist: do Möbius strips exist in nature? **Biochemistry**, v. 44, p. 851-860, 2005.

JING, X.; JIN, K. A gold mine for drug discovery: Strategies to develop cyclic peptides into therapies. **Med. Res. Rev.**, v. 40, p. 753-810, 2020.

KASPAR, A. A.; REICHERT, J. M. Future directions for peptide therapeutics development. **Drug Discov. Today**, v. 18, p. 807-817, 2013.

KERSTEN, R. D.; WENG, J-K. Gene-guided discovery and engineering of branched cyclic peptides in plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 115, p. E10961-10969, 2018.

KOEHBACH, J. et al. Cyclotide discovery in Gentianales revisited - identification and characterization of cyclic cystine-knot peptides and their phylogenetic distribution in Rubiaceae plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 438-451, 2013.

LEVINE, D. P. Vancomycin: A history. **Clin. Infect. Dis.**, v. 42, p. S5-12, 2006.

LINDHOLM, P. et al. Cyclotides: a novel type of cytotoxic agents. **Mol. Cancer Ther.**, v. 1, p. 365-369, 2002.

LUCKETT, S. et al. High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds. **J. Mol. Biol.**, v. 290, 525-533, 1999.

MALAGÓN, D. et al. Anthelmintic activity of the cyclotides (Kalata B1 and B2) against schistosome parasites. **Peptide Science**, v. 100, p. 461-470, 2013.

MATIDA, A. K. et al. Triterpenoids from *Anchietea salutaris*. **Fitoterapia**, v. 63, p. 271, 1992.

MATSUURA, H. N. et al. Isolation and Characterization of Cyclotides from Brazilian *Psychotria*: Significance in Plant Defense and Co-occurrence with Antioxidants Alkaloids. **J. Nat. Prod.**, v. 79, p. 3006-3013, 2016.

MCGIVERNS, J. G. Ziconotide: A review of its pharmacology and use in the treatment of pain. **Neuropsych. Dis. Treat.**, v. 3, p. 69-85, 2007.

MELETIADIS, J. et al. Comparison of NCCLS and 3-(4,5-dimethyl-2-thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazoliumbromide (MTT) methods of in vitro susceptibility testing of filamentous fungi and development of a new simplified method. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2949-2954, 2000.

MESSIAS, M. C. T. B. et al. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 17, p. 76-104, 2015.

MORAL, R. A.; HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. G. B. Half-normal plots and overdispersed models in R: The hnp package **J. Stat. Softw.**, v. 81, p. 1-23, 2017.

MUHAMMAD, N. et al. Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological profile of genus *Viola*. **Phytopharmacology**, v. 3, p. 214-226, 2012.

MULVENNA, J. P.; et al. Processing of a 22 kDa precursor protein to produce the circular protein tricyclon A. **Structure**, v. 13, p. 691-701, 2005.

MURRAY, K. K. et al. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). **Pure Appl. Chem.**, v. 85, p. 1515-1609, 2013.

MYLNE, J. S. et al. Albumins and their processing machinery are hijacked for cyclic peptides in sunflower. **Nat. Chem. Biol.**, v. 7, p. 257-259, 2011.

NAJAS, G. Z. J. **Estudo de ciclótídeos em Violaceae da Mata Atlântica do estado de Rio de Janeiro**: isolamento e caracterização estrutural, 2014, 158 f, Dissertação (Mestrado em Ciências-Químicas) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

NARAYANI et al. Cyclotides from the Indian medicinal plant *Viola odorata* (Banafsha): identification and characterization. **J. Nat. Prod.**, v. 80, p. 1972-1980, 2017.

NCBI Resource Coordinators. **Nucleic Acids Res.**, v. 46, p. D8-D13, 2018.

NGUYEN, G. K. et al, Discovery and characterization of novel cyclotides originated from chimeric precursors consisting of albumin-1 chain A and cyclotide domains in the Fabaceae family. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 24275- 24287, 2011.

NGUYEN, G. K. et al. Novel cyclotides and uncyclotides with highly shortened precursors from *Chassalia chartacea* and effects of methionine oxidation on bioactivities. **J. Biol. Chem.**, v. 287, p. 17598-17607, 2012.

NIYOMPLOY, P. et al. Discovery, isolation, and structural characterization of cyclotides from *Viola sumatrana* Miq. **Peptide Science**, v. 106, p. 796-805, 2016.

NIYOMPLOY, P. et al. Discovery and characterization of cyclotides from *Rinorea* species. **J. Nat. Prod.**, v. 81, p. 2512-2520, 2018.

OECD, Guidelines for the testing of chemicals. **Honeybees, acute oral toxicity test**, n. 213, 1998a.

OECD, Guidelines for the testing of chemicals. **Honeybees, acute contact toxicity test**, n. 214, 1998b.

OGUIS, G. K. et al. Butterfly Pea (*Clitoria ternatea*), a cyclotide-bearing plant with applications in agriculture and medicine. **Front. Plant Sci.**, v. 10, p. 645, 2019.

OJEDA, P. G. et al. Pharmaceutical applications of cyclotides. **Drug Discov. Today**, v. 24, p. 2152-2161, 2019.

ORTEGA, M. A.; VAN DER DONK, W. A. New Insights into the biosynthetic logic of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products. **Cell Chem. Biol.**, v. 23, p. 31-44, 2016.

OVESEN, R. G. et al. Biomedicine in the environment: Cyclotides constitute potent natural toxins in plants and soil bacteria. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 30, p. 1190-1196, 2011.

PARK, S. et al. Cyclotide structure-activity relationships: qualitative and quantitative approaches linking cytotoxic and anthelmintic activity to the clustering of physicochemical forces. **PLoS One**, v. 9, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0091430.

PARSLEY, N. C. et al. PepSAVI-MS reveals anticancer and antifungal cycloviolacins in *Viola odorata*. **Phytochemistry**, v. 152, p. 61-70, 2018.

PARSLEY, N. C. et al. *Viola "inconspicua"* no more: an analysis of antibacterial cyclotides. **J. Nat. Prod.**, v. 82, p. 2537-2543, 2019.

PATEL, R.; MONTAGUT-BORDAS, C.; DICKENSON, A. H. Calcium channel modulation as a target in chronic pain control. **Br. J. Pharmacol.**, v. 175, p. 2173-2184, 2018.

PAULA-SOUZA, J. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Violaceae. **Bol. Bot. Univ. São Paulo**, v. 30, p. 57-61, 2012.

PAULA-SOUZA, J. 2015. Violaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro.  
Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB247>. Acesso em: 12 setembro 2019.

PÉREZ-PAYÁ, E. et al. Structural characterisation of the natural membrane-bound state of melittin: a fluorescence study of a dansylated analogue. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1329, p. 223-236, 1997.

PINTO, M. E. F. **Peptídeos cíclicos em espécies do semiárido brasileiro e uma cultivada**: caracterização e atividade biológica. 2013. 169 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

PINTO, M. E. F. et al. Inhibition of breast cancer cell migration by cyclotides isolated from *Pombalia calceolaria*. **J. Nat. Prod.**, v. 81, p. 1203-1208, 2018.



PINTO, M. F. S. **Identificação molecular e caracterização de ciclotídeo de *Palicourea rigida* com potencial inseticida**. 2010. 144 f. Dissertação (Mestrado Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2010.

PINTO, M. F. S. et al. Identification and structural characterization of novel cyclotide with activity against an insect pest of sugar cane. **J. Biol. Chem.**, v. 287, p. 134-147, 2012.

PINTO, M. F. S. et al. Characterization of a bioactive acyclotide from *Palicourea rigida*. **J. Nat. Prod.**, v. 79, p. 2767-2773, 2016.

PLAN, M. R. R. et al. Backbone cyclised peptides from plants show molluscicidal activity against the rice pest *Pomacea canaliculata* (golden apple snail). **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 5237-5241, 2008.

POTH, A. G. et al. Discovery of cyclotides in the Fabaceae plant family provides new insights into the cyclization, evolution, and distribution of circular proteins. **ACS Chem. Biol.**, v. 6, p. 345-355, 2011.

POTH, A. G. et al. Cyclotides associate with leaf vasculature and are the products of a novel precursor in petunia (Solanaceae), **J. Biol. Chem.**, v. 287, p. 27033- 27046, 2012.

PRANTING, M. et al. The cyclotide cycloviolacin O2 from *Viola odorata* has potent bactericidal activity against Gram-negative bacteria. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 65, p. 1964-1971, 2010.

QUEIROZ, M. M. F. **Identificação dos inibidores de acetilcolinesterase em *Tetrapteryx mucronata* Cav. (Malpighiaceae) e comparação quali e quantitativa dos derivados triptamínicos presentes na espécie em estudo e Ayahuasca**. 2013. 179 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

RAMALHO, S. D. et al. Biologically active orbitides from the Euphorbiaceae family. **Planta Med.**, v. 84, p. 558-567, 2018.

RAVIPATI, A. S. et al. Lysine-rich cyclotides: A new subclass of circular knotted proteins from Violaceae. **ACS Chem. Biol.**, v. 10, p. 2491-2500, 2015.

RAVIPATI, A. S. et al. Understanding the diversity and distribution of cyclotides from plants of varied genetic origin. **J. Nat. Prod.**, v. 80, p. 1522-1530, 2017.

R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing**. Vienna. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.Rproject.org/>, 2019.

ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. **Biomed. Mass Spectrom.**, v. 11, p. 601, 1984.

- RORTAIS, A. et al. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, v. 36, p. 71-83, 2005.
- RÜEGGER, A. et al. Cyclosporin A, ein immunsuppressiv wirksamer Peptidmetabolit aus *Trichoderma polysporum* (LINKex PERS.) Rifai. **Helv. Chim. Acta**, v. 59, p. 1075-1092, 1976.
- SAETHER, O. et al. Elucidation of the primary and three dimensional structure of the uterotonic polypeptide Kalata B1. **Biochemistry**, v. 34, p. 4147-4158, 1995.
- SAINT-HILARIE, A. **Plantas usuais dos brasileiros**. In: PIGNAL, M.; BRANDÃO. M. G. L. (Org.). Belo Horizonte: IDM Composição e arte Ltda., 2009. p. 392.
- SCHÖPKE, T. et al. Hämolytisch aktive komponenten aus *Viola tricolor* L. und *Viola arvensis* Murray. **Sci. Pharm.**, v. 61, p. 145-153, 1993.
- SHAFFE, T. et al. Biosynthesis of cyclotides. **Adv. Bot. Res.**, v. 76, p. 227-269, 2015.
- SILVA, G. L. C. et al. An ethno-pharmacobotanical survey in Salto Caxias hydroelectric power plant in Parana State, Brazil, before the flooding. **Acta Farm. Bonaer.**, v. 23, p. 148-153, 2004.
- SILVA, O. N. et al. Evaluation of the *in vitro* antitumor activity of nanostructured cyclotides in polymers of Eudragit® L 100-55 and RS 30 D. **Lett. Drug Des. Discovery**, v. 16, p. 437-445, 2019.
- SIMONSEN, S. M. et al. A continent of plant defense peptide diversity: cyclotides in Australian *Hybanthus* (Violaceae). **Plant Cell**, v. 17, p. 3176-3189, 2005.
- SLAZAK, B. et al. How does the sweet violet (*Viola odorata* L.) fight pathogens and pests-cyclotides as a comprehensive plant host defense system? **Front. Plant. Sci.**, v. 9, p. 1296, 2018.
- SOUZA, B. M. et al. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v. 26, p. 2157-2164, 2005.
- STEEN, H.; MANN, M. The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 5, p. 699-711, 2004.
- STERNBERGER, A. L. et al. Transcriptomics identifies modules of differentially expressed genes and novel cyclotides in *Viola pubescens*. **Front. Plant Sci.**, v. 10, p. 156, 2019.

- STRÖMSTEDT, A. A. et al. Bactericidal activity of cyclotides where phosphatidylethanolamine-lipid selectivity determines antimicrobial spectra. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1859, p. 1986-2000, 2017.
- SVANGÅRD, E. et al. Primary and 3-D modelled structures of two cyclotides from *Viola odorata*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 135-142, 2003.
- SVANGÅRD, E. et al. Cytotoxic cyclotides from *Viola tricolor*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 144-147, 2004.
- SZE, S. K. et al. Elucidating the structure of cyclotides by partial acid hydrolysis and LC-MS/MS analysis. **Anal. Chem.**, v. 81, p. 1079-1088, 2009.
- TAM, J. P. et al. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 8913-8918, 1999.
- TAN, N. H.; ZHOU, J. Plant cyclopeptides. **Chem. Rev.**, v. 106, p. 840-895, 2006.
- TAN, S. et al. Put a bow on it: knotted antibiotics take center stage. **Antibiotics (Basel, Switz.)**, v. 8, 2019. DOI: 10.3390/antibiotics8030117.
- TANG, J. et al. Isolation and characterization of bioactive cyclotides from *Viola labridorica*. **Helv. Chim. Acta**, v. 93, p. 2287-2295, 2010a.
- TANG, J. et al. Isolation and characterization of cytotoxic cyclotides from *Viola tricolor*. **Peptides**, v. 31, p. 1434-1440, 2010b.
- THELL, K. et al. Oral activity of a nature-derived cyclic peptide for the treatment of multiple sclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 113, p. 3960-3965, 2016.
- TOLOUEI, S. E. L. et al. *Anchietea pyrifolia* A. St.-Hil. as a cardiovascular-endowed species: A whole-biological investigation. **J. Med. Food**, v. 22, p. 393-407, 2019.
- 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.
- TRABI, M. et al. Circular proteins from *Melicytus* (Violaceae) refine the conserved protein and gene architecture of cyclotides. **Org. Biomol. Chem.**, v. 7, p. 2378-2388, 2009.
- UEDA, H. et al. FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* No.968. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties, and antitumor activity. **J. Antibiot.**, v. 47, p. 301-310, 1994.

- VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. **Modern Applied Statistics with S**; 4.ed. New York: Springer, 2002.
- WAHLERT, G. A. et al. A phylogeny of the Violaceae (Malpighiales) inferred from plastid DNA sequences: implications for generic diversity and intrafamilial classification. **Syst. Bot.**, v. 39, p. 239-252, 2014.
- WAHLERT, G. A. et al. Systematic studies in Neotropical Rinorea (Violaceae): Two new sections and a new generic segregate. **Brittonia**, v. 70, p. 140-147, 2018.
- WALKER, C. H.; SIBLY, R. M.; HOPKIN, S. P.; PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**. 4. Ed. CRC Press, 2012.
- WANG, C. K. et al. APD: The Antimicrobial Peptide Database. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, p. D590-D592, 2004.
- WANG, C. K. et al. Cybase: a database of cyclic protein sequences and structures, with applications in protein discovery and engineering. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p. D206-D210, 2008a.
- WANG, C. K. et al. Anti-HIV cyclotides from the chinese medicinal herb *Viola yedoensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 47-52, 2008b.
- WEBSTER, L. R. The relationship between the mechanism of action and safety profiles of intrathecal morphine and ziconotide: A review of the literature. **Pain Med.**, v. 16, p. 1265-1277, 2015.
- WEIDMANN, J.; CRAIK, D. J. Discovery, structure, function, and applications of cyclotides: circular proteins from plants. **J. Exp. Bot.**, v. 67, p. 4801-4812, 2016.
- WHITE, C. J.; YUDIN, A. J. Contemporary strategies for peptide macrocyclization. **Nat. Chem.**, v. 3, p. 509-524, 2011.
- XIANG, B. et al. Elucidating the structure of two cyclotides of *Viola tianshanica* maxim by MALDI TOF/TOF MS analysis. **Acta Pharm. Sin.**, v. 45, p. 1402-1409, 2010.
- YESHAK, M. Y. et al. Cyclotides from an extreme habitat: characterization of cyclic peptides from *Viola abyssinica* of the Ethiopian highlands. **J. Nat. Prod.**, v. 74, p. 727-731, 2011.
- YESHAK, M. Y. et al. Optimization of cyclotide extraction parameters. **Phytochem. Lett.**, v. 5, p. 776-781, 2012.
- ZHANG, Y. et al. Heterologous production of microbial ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides. **Front. Microbiol.**, v. 9, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01801.

ZHU, H. et al. Chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Viola*. **Chem. Biodiversity**, v. 12, p. 1777-1808, 2015.

ZONDEGOUMBA, E. N. T. et al. New cyclotides isolated from roots of *Allexis batangae* (Violaceae). **Int. J. Sci.: Basic Appl. Res.**, v. 45, p. 154-174, 2019.

ZORZI, A. et al. Cyclic peptides therapeutics: past, present and future. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 38, p. 24-29, 2017.