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

Fernández Bobey, Antonio
F363c 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.

Bibliotecária Responsável: Ana Carolina Gonçalves Bet – CRB8/8315

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.ª Dr.ª 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

Profª. Drª. ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof.ª Dr.ª 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.ª Dr.ª 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.ª Dr.ª 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.ª Dr.ª Iraida Spengler Salabarria.

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-inflamatory 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 fom the Brazilian Biodiversity. In: 46th World Chemistry Congress/ IUPAC 49th 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 moluscicidas, 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 endoproteinase 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 media (CL_{50}), sendo suas CL_{50} 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_{50}) de 22 µM, enquanto que **1**, **2** e **4** apresentaram baixa atividade na máxima concentração testada, com $DH_{50} > 156$ 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_{50}), with its LC_{50} 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_{50}) of 22 µM, while **1**, **2** and **4** had low activity at the maximum concentration tested, with HD_{50}> 156 µM.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Exemplos de peptídeos cíclicos aprovados pela FDA e empregados como agentes terapêuticos. 24
Figura 2 - Estruturas representativas de cinco subfamílias da classe dos RIPPs. As modificações pós-traducionais em cada estrutura estão ressaltadas em vermelho. 26
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 líneas. B) Representação *ribbon* 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
Figura 4 - 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 *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. 28
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 ω só pode ter valores de 0° (cis) e 180° (trans)..... 29
Figura 6 - 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
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. 33
Figura 8 - Ilustrações da espécie *Anchietea pyrifolia* (Mart.) G. Don. 40
Figura 9 - Distribuição geográfica da espécie *Anchietea pyrifolia* no Brasil. 40
Figura 10 - Triterpenos pentacíclicos fridelina (A), epifridelanol (B), α-amirina (C) e β-amirina (D) isolados da espécie *A. pyrifolia*. 41
Figura 11 - Ilustrações da espécie *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Ging. 42
Figura 12 - Distribuição geográfica da espécie *Noisettia orchidiflora* no Brasil..... 42
Figura 13 - Ilustração de uma abelha da espécie *Apis mellifera*. A seta vermelha aponta para o local de injeção..... 63
Figura 14 - Procedimentos para realização do experimento. A) Gaiola plástica descartável com alimentador do tipo *eppendorf*. B) Gaiolas plásticas acondicionadas em estufa DBO durante a realização dos experimentos..... 64
Figura 15 - Cromatogramas das frações AP_C_35 (preto), AP_C_80 (vermelho) e AP_C_100 (azul) 67
Figura 16 - 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
Figura 17 - Comparação dos perfis cromatográficos das frações AP_C_80 (preto) e AP_C_80_P_F_1 (vermelho). 69
Figura 18 - Cromatogramas das frações AP_C_80_P_F_0 (preto), AP_C_80_P_F_1 (vermelho) e AP_C_80_P_F_2 (azul) 69

Figura 19 - Perfis cromatográficos das frações T_3 (preto), T_4 (vermelho), T_5 (azul), T_8 (verde), T_9 (rosa), T_{12} (laranja) e T_{13} (roxo) 75
Figura 20 - Espectros de massas DI-ESI-(+)-IT-MS das frações T_3 (preto), T_4 (vermelho), T_5 (azul), T_8 (verde), T_9 (rosa), T_{12} (laranja) e T_{13} (roxo) na faixa de *m*/*z* 900-1400. As rações *m*/*z* mostradas correspondem aos íons triplamente carregados. 76
Figura 21 - Perfis cromatográficos de AP_R_80 (preto) e das subfrações advindas do seu fracionamento, F_1 (azul), F2 (vermelho), F_3 (laranja), F_4 (verde), F_5 (rosa), F_6 (roxo), F_7 (preto) F_8 (azul claro), F_9 (lilás escuro)e F_{10} (marrom) 77
Figura 22 - Espectros de massas DI-ESI-(+)-IT-MS das frações F_1 (azul), F2 (vermelho), F_3 (laranja), F_4 (verde), F_5 (rosa), F_6 (roxo), F_7 (preto) F_8 (cinza), F_9 (lilás escuro)e F_{10} (marrom) na faixa de *m*/*z* 900-1300. As rações *m*/*z* mostradas correspondem aos íons triplamente carregados. 77
Figura 23 - Perfis cromatográficos de NO_R_80 (preto) e das subfrações advindas do seu fracionamento, F_3 (laranja), F_4 (roxo), F_5 (vermelho), F_7 (azul claro) F_8 (azul) e F_9 (verde)..... 78
Figura 24 - Perfis cromatográficos de NO_F_80 (preto) e da subfração NO_F_80_F_{16} (vermelho) advinda do seu fracionamento. 79
Figura 25 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **1**. 81
Figura 26 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 3530,840, obtido após digestão com endoGlu-C da substância **1**. Os valores de *m*/*z* mostrados são monoisotópicos..... 82
Figura 27 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 839,491, obtido após digestão enzimática da substância **1** com tripsina. Os valores de *m*/*z* mostrados são monoisotópicos. . 83
Figura 28 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/z 1434,686, obtido após digestão enzimática da substância **1** com quimiotripsina. Os valores de *m*/*z* mostrados são monoisotópicos. 84
Figura 29 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo cicloviolacina O4 (**1**). 86
Figura 30 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **2**. 87
Figura 31 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/z 3514,840, obtido após digestão enzimática da substância **2** com endoGlu-C. Os valores de *m*/*z* mostrados são monoisotópicos. 88
Figura 32 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 2694,739, obtido após digestão enzimática da substância **2** com tripsina. Os valores de *m*/*z* mostrados são monoisotópicos. . 89
Figura 33 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 1434,686, obtido após digestão enzimática da substância **2** com quimiotripsina. Os valores de *m*/*z* mostrados são monoisotópicos. 89
Figura 34 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo cicloviolacina O17 (**2**). 90
Figura 35 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **3** 92
Figura 36 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 3583,021, oriundo da digestão com endoGlu-C da substância **3**. Os íons -*b* e -*y* estão atribuídos. As massas mostradas são monoisotópicas. 93
Figura 37 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 3583,011, advindo da digestão com tripsina da substância **3**. Os íons -*b* e -*y* estão atribuídos. As massas mostradas são monoisotópicas. 93
Figura 38 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 872,127 oriundo da digestão com quimiotripsina da substância **3**. Os valores *m*/*z* mostrados são monoisotópicos. 94
Figura 39 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo apy A (**3**). 96
Figura 40 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **4**. 98
Figura 41 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 3619,180, advindo da digestão da substância **4** com a enzima endoGlu-C. 98

Figura 42 - 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
Figura 43 - 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
Figura 44 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo apy B (**4**). 101
Figura 45 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **5**. 103
Figura 46 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/z 3565,683, advindo da digestão da substância **5** com a enzima endoGlu-C. 103
Figura 47 - 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
Figura 48 - 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
Figura 49 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo cter 15 (substância **5**)..... 106
Figura 50 - 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 *Anchietea pyrifolia* (Violaceae), em vermelho os seis resíduos de cisteína característicos dos ciclotídeos e em azul o resíduo de ácido glutâmico conservado no *loop* 1. B) Representação *Sequence Diversity Wheel*. 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
Figura 51 - 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
Figura 52 - Estrutura de Collier de perles do ciclotídeo nor E (**6**). 110
Figura 53 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **7**. 111
Figura 54 - 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
Figura 55 - 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
Figura 56 - 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
Figura 57 - 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
Figura 58 - 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
Figura 59 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo inédito nor F (**7**), isolado das raízes da espécie *Noisettia orchidiflora*. 115
Figura 60 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **8**. 117
Figura 61 - 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
Figura 62 - 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
Figura 63 - 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
Figura 64 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo inédito nor G (**8**), isolado das raízes da espécie *Noisettia orchidiflora*. 119
Figura 65 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **9**. 121

Figura 66 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 3476,453 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância **9**. Os valores *m*/*z* mostrados são monoisotópicos. 121
Figura 67 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 3476,411 oriundo da digestão com tripsina da substância **9**. Os valores *m*/*z* mostrados são monoisotópicos. 122
Figura 68 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 1292,548 advindo da digestão com quimiotripsina da substância **9**. Os valores *m*/*z* mostrados são monoisotópicos. 122
Figura 69 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 1234,465 advindo da digestão com quimiotripsina da substância **9**. Os valores *m*/*z* mostrados são monoisotópicos. 123
Figura 70 - Estrutura de Collier de perles do ciclotídeo vhr 1 (**9**), isolado das raízes da espécie *Noisettia orchidiflora*. Este ciclotídeo já foi reportado na espécie *Viola hederacea* (Violaceae) (TRABI; CRAIK, 2004). 124
Figura 71 - A) Alinhamento múltiplo das sequências gerado com a ferramenta ClustalW dos ciclotídeos nor E (**6**), nor F (**7**), nor G (**8**) e vhr 1 (**9**) isolados neste estudo das raízes da espécie *Noisettia orchidiflora* (Violaceae), em vermelho os seis resíduos de cisteína característicos dos ciclotídeos e em azul o resíduo de ácido glutâmico conservado no *loop* 1. A letra X representa os resíduos isóbaros de leucina e isoleucina. B) Representação *Sequence Diversity Wheel*. 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
Figura 72 - Atividade hemolítica dos ciclotídeos apy A, apy B, cyO4 e cyO17, isolados da raiz da espécie *A. pyrifolia*, em doze concentrações diferentes (0,1 - 156 µM). 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

Tabela 1 - Alguns dos peptídeos cíclicos aprovados pela FDA nas últimas décadas. 25
Tabela 2 - Ciclotídeos reportados na família Violaceae (Continua)
..... 34
Tabela 3 - Ciclotídeos com atividades relevantes para agricultura. 36
Tabela 4 - Ciclotídeos com atividade hemolítica reportados na literatura. 37
Tabela 5 - Alguns dos ciclotídeos reportados por grupos de pesquisa brasileiros em espécies das famílias Violaceae e Rubiaceae. 38
Tabela 6 - Dados de coleta e cadastro das espécies estudadas. 45
Tabela 7 - Massa das frações 80% das espécies em estudo, obtidas após pré-purificação dos extratos aquosos. [1]Massa de material vegetal seco e moído. *Frações obtidas em trabalho prévio (BOBEY, 2016). 48
Tabela 8 - Possíveis ciclotídeos anotados por LC-ESI-IT-MS no caule, folha e raiz da espécie *N. orchidiflora*. 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_2O/0.1% HCO_2H (v/v); B: $CH_3CN/H_2O/HCO_2H$ 90/10/0,1% (v/v/v). *Massas moleculares mostradas foram calculadas a partir dos valores de *m*/*z* 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
Tabela 9 - Possíveis ciclotídeos anotados por LC-ESI-IT-MS na fração AP_C_80_P_F_0 do caule de *A. pyrifolia*. Gradiente linear: 20 a 45% B em 76 min; 45 a 100 % B em 5 min; 100% B por 5 min (A: H_2O/0.1% HCO_2H (v/v); B: $CH_3CN/H_2O/HCO_2H$ 90/10/0,1% (v/v/v). * As massas moleculares mostradas foram calculadas a partir dos valores de *m*/*z* 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
Tabela 10 - 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
Tabela 11 - 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
Tabela 12 - Comparação das sequências dos ciclotídeos cicloviolacina O4 e chassatida C3. * Táxons onde foram isolados pela primeira vez. 86
Tabela 13 - 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 *de novo*. 90
Tabela 14 - 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 *de novo*. 90
Tabela 15 - Comparação das sequências de aminoácidos dos ciclotídeos cicloviolacina O4 (**1**) e O17 (**2**), ressaltando em azul a única diferença entre elas. 91
Tabela 16 - 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
Tabela 17 - 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^{15} e Ile^{18}) o resíduo da posição X^{12} (ver Tabela 16) por estar do lado de prolina não foi identificado através da digestão com quimiotripsina. 95
Tabela 18 - Comparação das sequências de aminoácidos dos ciclotídeos apy A (**3**) e vitri peptídeo 2, ressaltando em azul as diferenças entre elas. 96
Tabela 19 - 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
Tabela 20 - Aminoácidos identificados na substância **4** por meio da técnica de análise de aminoácidos. *Por meio do sequenciamento *de novo* não foi possível identificar os resíduos de isoleucina (Ile^{2} e Ile^{11}) (ver Tabela 19) através da digestão com quimiotripsina por eles estarem do lado de prolina. 100
Tabela 21 - Comparação das sequências dos ciclotídeos apy B (**4**), isolado das raízes da espécie *A. pyrifolia* e vigno 7, isolado das partes aéreas da *Viola ignobilis*. Ressaltando em azul as diferenças nas sequências de aminoácidos. 101
Tabela 22 - 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
Tabela 23 - Aminoácidos identificados na substância **5** por meio da técnica de análise de aminoácidos. *Por meio do sequenciamento de novo não foi possível identificar os resíduos isóbaros (X^{2}, X^{11}, X^{18} e X^{19}) (ver Tabela 22). 106
Tabela 24 - Comparação das sequências dos ciclotídeos **5**, isolado das raízes da espécie *A. pyrifolia* (Violaceae) e cter 15, isolado das raízes e sementes da espécie *Clitoria ternatea* (Fabaceae). Ressaltando em amarelo os resíduos de leucina/isoleucina, que seriam as únicas diferenças nas sequencias de aminoácidos. 106
Tabela 25 - 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 *N. orchidiflora*. 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
Tabela 26 - Aminoácidos identificados na substância **6** por meio da técnica de análise de aminoácidos. *Por meio do sequenciamento *de novo* não foi possível identificar os resíduos de leucina (L^{3} e L^{12}) (ver Tabela 25). 109
Tabela 27 - 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
Tabela 28 - Comparação das sequências dos ciclotídeos **7**, isolado das raízes da espécie *N. orchidiflora* (Violaceae), chassatida C5 e C6, isolados da espécie *Chassalia chartacea* (Rubiaceae). Ressaltando em amarelo as diferenças nas sequências de aminoácidos. 115
Tabela 29 - 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
Tabela 30 - Comparação das sequências dos ciclotídeos nor G (**8**), isolado neste estudo das raízes da espécie *N. orchidiflora* e hypa A, isolado da espécie *Hybanthus parviflorus* (BROUSSALIS *et al.* 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
Tabela 31 - 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 (**L**^{19}) identificado indiretamente através do fragmento de *m*/*z* 1234,465. Em verde os resíduos isóbaros que não foram identificados no sequenciamento *de novo*..... 123
Tabela 32 - Atividade inibitória na concentração de 50 µg/mL das frações ricas em ciclotídeos obtidas das espécies *A. pyrifolia* e *N. orchidiflora* contra *P. falciparum*, cepa 3d7, sensível a cloroquina. 126
Tabela 33 - Concentração inibitória de 50% (IC_{50}) das frações NO_C_80 e AP_C_3_80 contra *P. falciparum*, cepa 3d7, sensível a cloroquina. 126
Tabela 34 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) expressos em µg/mL, das frações ricas em ciclotídeos das espécies *N. orchidiflora* e *A. pyrifolia* e dos padrões do experimento (cloranfenicol e melitina) frente às bactérias *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *S. pneumoniae*.... 127
Tabela 35 - Concentração letal de 50% (CL_{50}) obtida através do método de injeção, dos ciclotídeos apy A (**3**) e cyO4 (**1**) isolados da raiz de *A. pyrifolia*, contra a abelha Africanizada *Apis mellifera*, depois de 24 h de exposição. O inseticida comercial dimetoato foi empregado como controle positivo. 128
Tabela 36 - Comparação das sequências de aminoácidos dos ciclotídeos cyO4 (**1**) e apy A (**3**), isolados da raiz da espécie *A. pyrifolia*. Ressaltando em vermelho os resíduos de aminoácido com carga positiva e em azul os seis resíduos de cisteína característicos dos ciclotídeos..... 128
Tabela 37 - Comparação das sequências de aminoácidos, DH_{50} 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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS DOS RESIDUOS DE AMINOÁCIDOS

NOME	ABREVIAÇÃO		MASSA DO RESÍDUO (Da)
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

1 INTRODUÇÃO 23
1.1 PEPTÍDEOS CÍCLICOS RIBOSSOMAIS DE PLANTAS 26
1.2 CICLOTÍDEOS 27
1.2.1 Caracterização estrutural: sequenciamento *de novo* **30**
1.2.2 Ciclotídeos na família Violaceae 33
1.2.3 Atividades biológicas dos ciclotídeos 35
1.2.3.1 Atividades relacionadas à defesa das plantas 36
1.2.3.2 Atividade hemolítica 37
1.2.4 Pesquisa sobre Ciclotídeos realizada no Brasil 37
1.3 DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS 39
1.3.1 O gênero *Anchietea* e a espécie *A. pyrifolia* 39
1.3.2 O gênero *Noisettia* e a espécie *N. orchidiflora* 41
2 OBJETIVOS 44
3 PARTE EXPERIMENTAL 45
3.1 MATERIAL VEGETAL 45
3.1.1 Extração dos constituintes químicos 45
3.1.2 Pré-purificação dos extratos aquosos 48
3.2 PROCEDIMENTOS CROMATOGRÁFICOS GERAIS 49
3.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 49
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
3.2.2 Filtração com poliamida 50
3.3 IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DE CICLOTÍDEOS 50
3.3.1 Análise por DI-ESI-IT-MS 50
3.3.2 Análise por HPLC-ESI-IT-MS 50
3.4 FRACIONAMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS NA PRÉ-PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS 51
3.4.1 Fração AP_C_80_P_F_0 51
3.4.2 Fração AP_R_80 52
3.4.3 Fração NO_F_80 52
3.4.4 Fração NO_R_80 52

3.5 ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS 53
3.5.1 Isolamento das substâncias produzidas pela espécie *Anchietea pyrifolia*.....53
3.5.1.1 Isolamento das substâncias presentes no caule 53
3.5.1.2 Isolamento das substâncias presentes nas raízes 54
3.5.2 Isolamento das substâncias produzidas pela espécie *Noisettia orchidiflora* 55
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
3.6.1 Redução e Alquilação 57
3.6.2 Digestão Enzimática.....58
3.6.3 Espectrometria de Massas MALDI-TOF 58
3.6.4 Análise de Aminoácidos.....59
3.6.5 Alinhamento das Sequências 60
3.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS 60
3.7.1 Avaliação da atividade antiplasmodial 60
3.7.2 Prova de sensibilidade bacteriana.....60
3.7.3 Avaliação da atividade inseticida 61
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
3.7.4 Avaliação da atividade hemolítica.....64
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....66
4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DO CAULE DE *A. PYRIFOLIA* 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
4.5.1 Caule de *A. pyrifolia* 75
4.5.2 Raiz de *A. pyrifolia*.....76
4.5.3 Raiz de *N. orchidiflora*.....78
4.5.4 Folha de *N. orchidiflora* 79
4.6 SEQUENCIAMENTO *DE NOVO* DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS 80
4.6.1 Sequenciamento das substâncias obtidas da espécie *A. pyrifolia* 80
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
4.6.2 Sequenciamento das substâncias isoladas da espécie *N. orchidiflora* 108
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
4.7.1 Atividade antiplasmodial 126
4.7.2 Atividade antibacteriana 126
4.7.3 Atividade inseticida 127
4.7.4 Atividade hemolítica 129
5 CONCLUSÕES 131
REFERÊNCIAS 132
APÊNDICES 147

1 INTRODUÇÃO

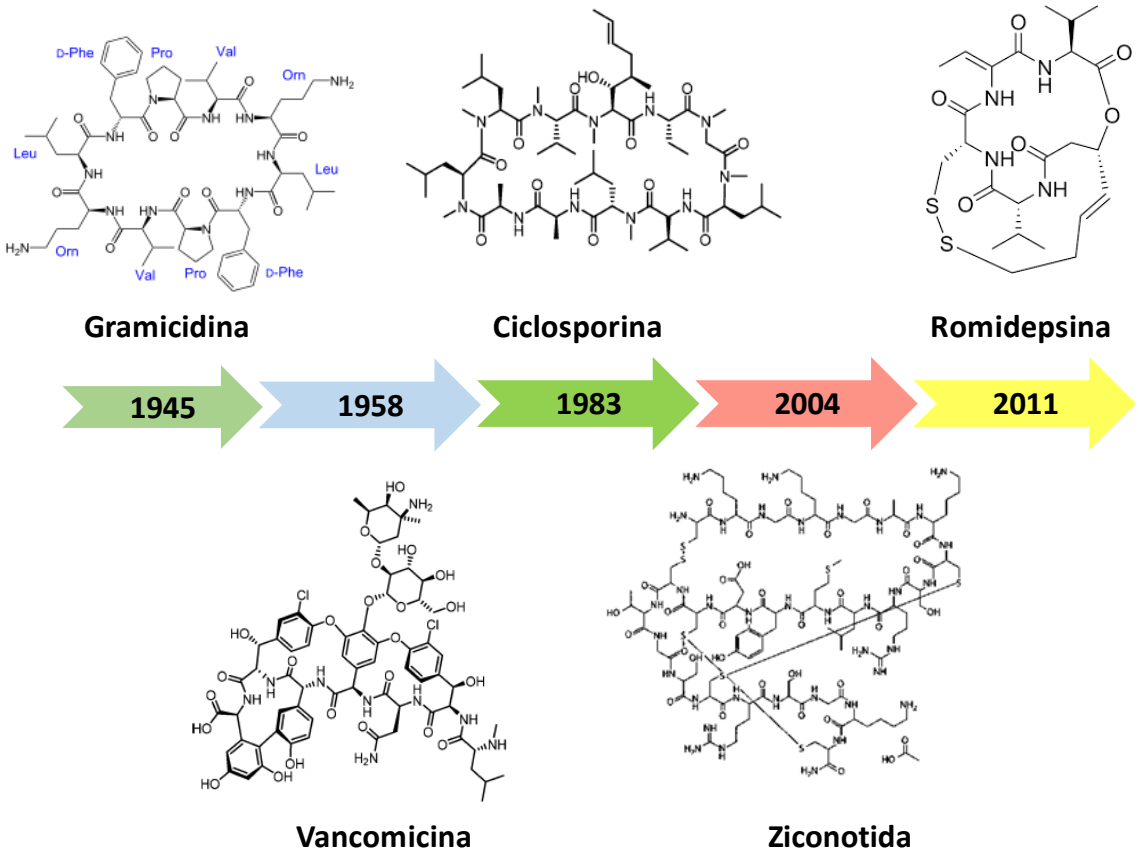
Os Produtos Naturais (PNs) têm sido empregados pela humanidade desde seus primórdios para o tratamento de inúmeras doenças e ainda hoje desempenham um papel de destaque na descoberta de novos fármacos (CRAGG; NEWMAN, 2013; BERNARDINI *et al.* 2018; CALIXTO, 2019). Inúmeros metabólitos secundários ou essenciais, segundo Gottlieb, de diversas classes de PNs como os alcaloides, terpenoides, lignoides, flavonoides e policetideos, entre outros, destacam-se devido as suas propriedades farmacológicas. Alguns deles marcaram verdadeiros marcos na história da medicina moderna. Os peptideos 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) immunossupressor: 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.

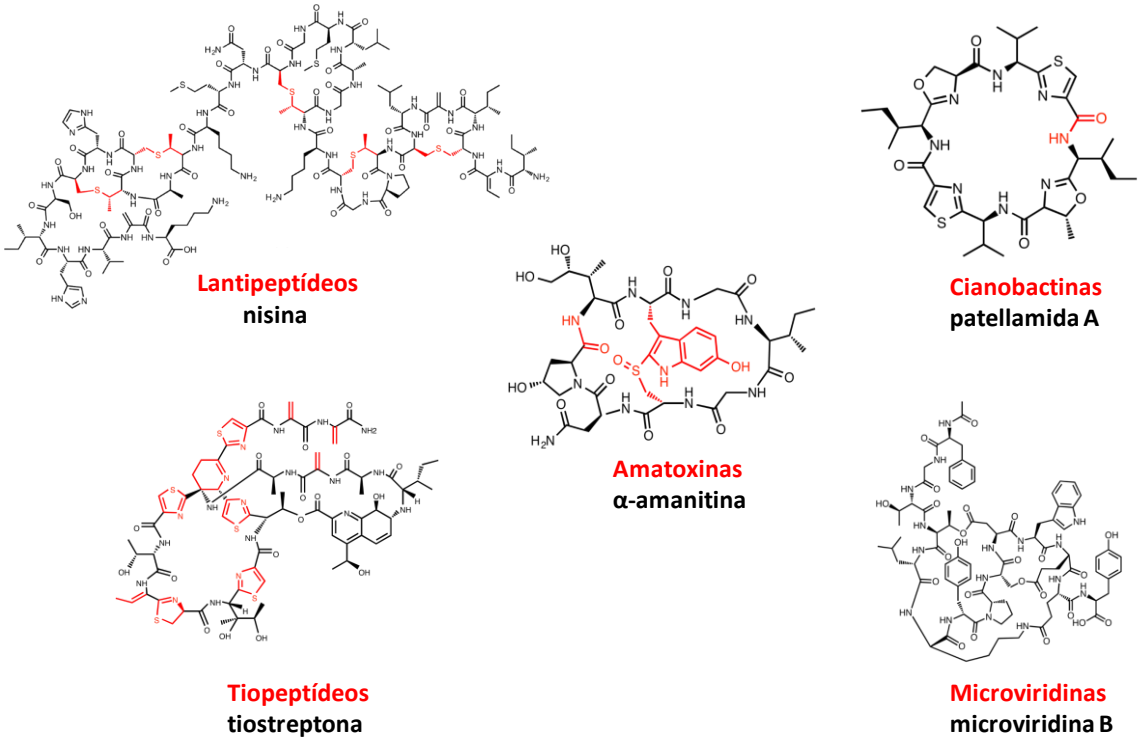
Tabela 1 - Alguns dos peptídeos cíclicos aprovados pela FDA nas últimas décadas

Peptídeo cíclico	Fonte Natural	Aplicação Clínica	Referência
Vancomicina	*Amycolatopsis orientalis*	Antibiótico	LEVINE, 2006
Ciclosporina A	*Tolypocladium inflatum*	Immunossupressor	RÜEGGER *et al.* 1976
Romidepsina	*Chromobacterium violaceum*	Antitumoral	UEDA *et al.* 1994; JAIN; ZAIN, 2011
Ziconotida	*Conus magus*	Analgésico	PATEL *et al*. 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 RIPPs (*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 comprende 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 RIPPs. As modificações pós-traducionais em cada estrutura estão ressaltadas em vermelho.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

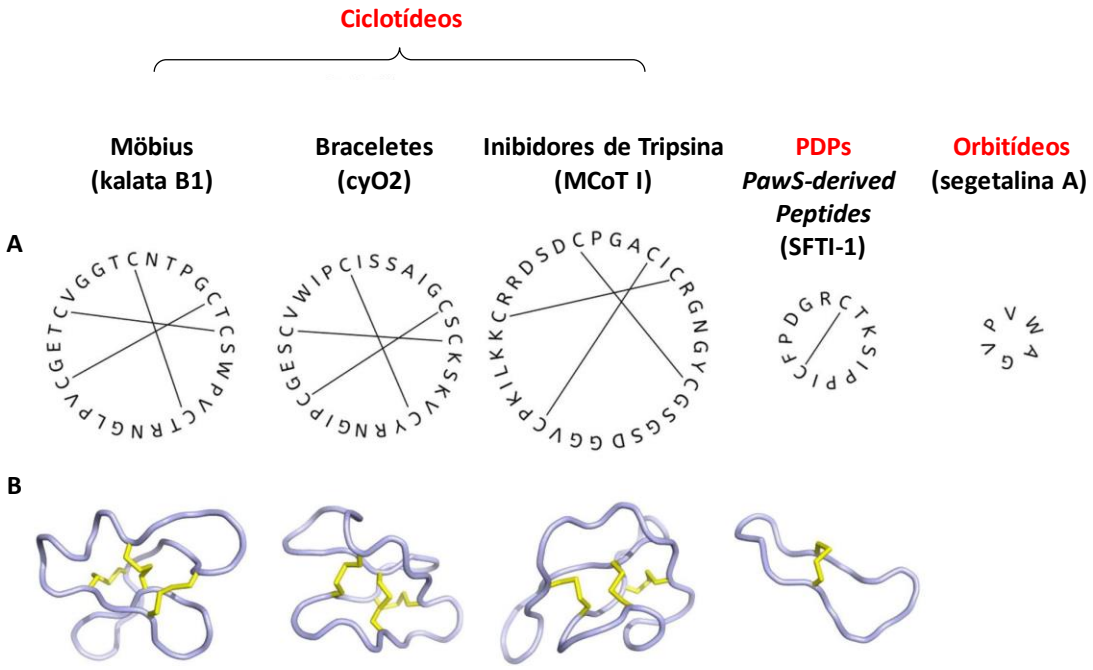
1.1 PEPTÍDEOS CÍCLICOS RIBOSSOMAIS DE PLANTAS

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 especifico das plantas, os *RIPPs*, 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 líneas. B) Representação *ribbon* 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.



Fonte: Traduzido de CRAIK *et al.* 2018

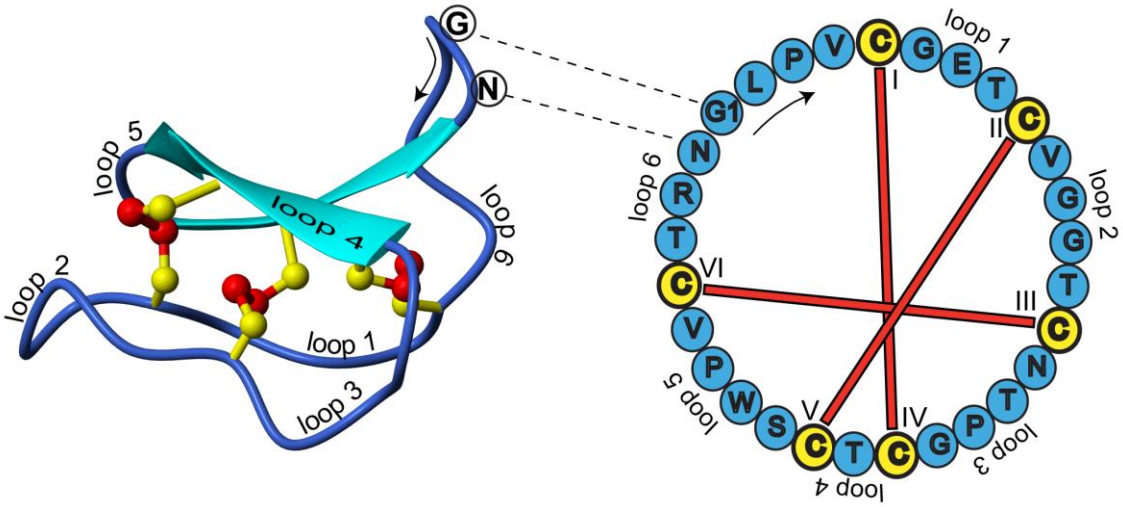
1.2 CICLOTÍDEOS

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 (***C**yclic **C**ystine **K**not* - 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).

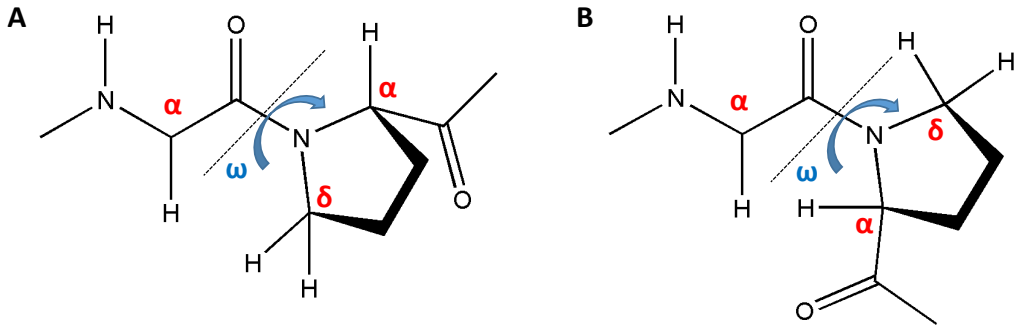
Figura 4 - Representação esquemática da estrutura tridimensional e da sequência do ciclotídeo kalata B1. Em amarelo estão ressaltados os seis resíduos de cisteínas conservados nos ciclotídeos. Os *loops* correspondem às sequencias de aminoácidos entre dois resíduos de cisteína adjacentes (em azul). As 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 ciclotídeos 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, respetivamente, 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) 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 ciclotídeos, 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 ω só pode ter valores de 0° (cis) e 180° (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).

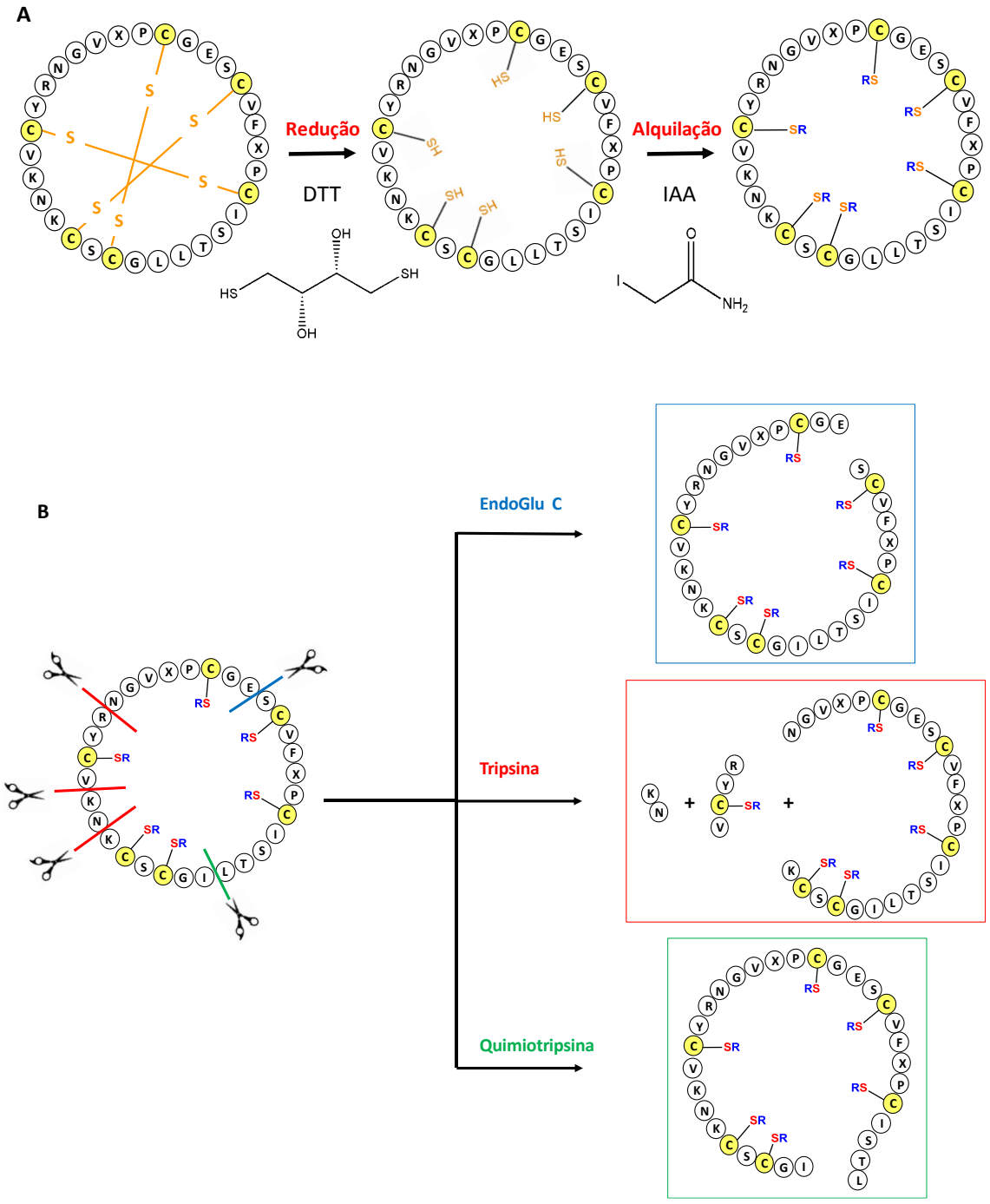
1.2.1 Caracterização estrutural: sequenciamento *de novo*

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 ciclotídeos 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).

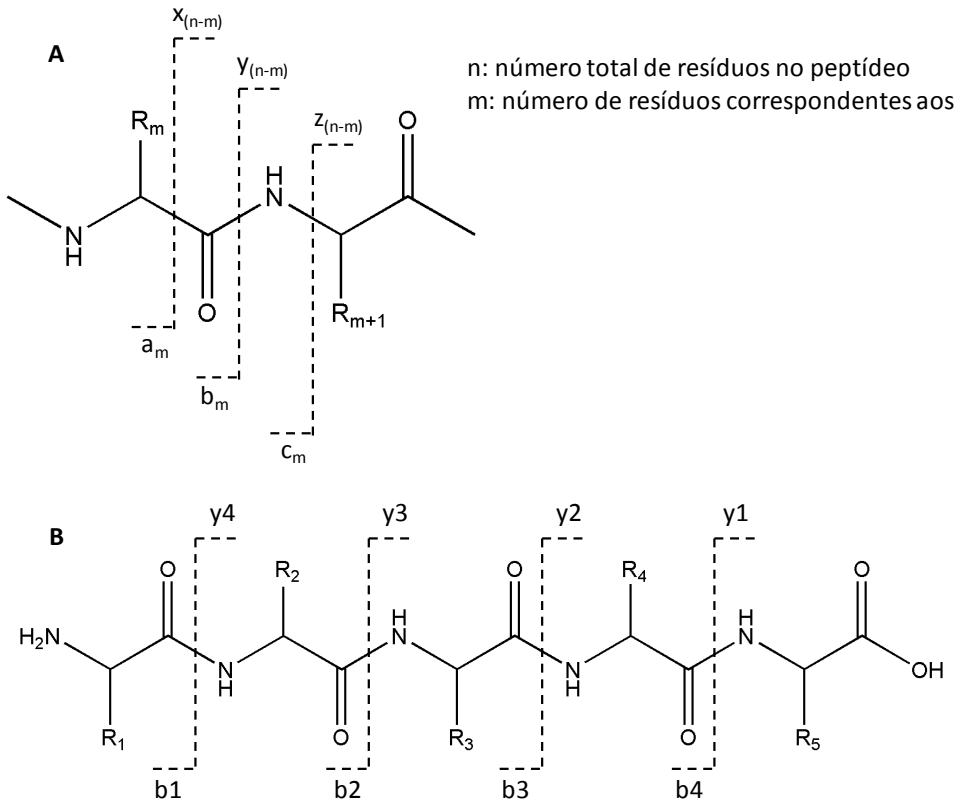
Outras técnicas como a ressonância magnética nuclear (1D e 2D), análise de aminoácidos e degradação de Edman também podem ser utilizadas (COLGRAVE, 2015).

Figura 6 - Reações empregadas no sequenciamento dos 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).



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor, 2020.

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

Tabela - 2 Ciclotídeos reportados na família Violaceae (Conclusão)

Ciclotídeo	Espécie	Referência
riden A	*Rinorea dentata*	ATTAH *et al.* 2016
visu 1-2	*Viola sumatrana*	NIYOMPLOY *et al.* 2016
mden A-N	*Melicytus dentatus*	RAVIPATI *et al.* 2017
itri A	*Leonia triandra*	RAVIPATI *et al.* 2017
vodo I1-3	*Viola odorata*	NARAYANI *et al.* 2017
rivi 1-7	*Rinorea virgata*	NIYOMPLOY *et al.* 2018
cT10	*Rinorea bengalensis*	NIYOMPLOY *et al.* 2018
nor A	*Noisettia orchidiflora*	BOBEY *et al.* 2018
poca A-B e cyO4	*Pombalia calecolaria*	PINTO *et al.* 2018
alba 1-4	*Allexis batangae*	ZONDEGOUMBA *et al.* 2019
cyl 1-6	*Viola inconspicua*	PARSLEY *et al.* 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	*Helicoverpa punctigera*	Inseticida	JENNINGS *et al.* 2001
kalata B2	*Helicoverpa armigera*	Inseticida	JENNINGS *et al.* 2005
cter M	*Helicoverpa armigera*	Inseticida	POTH *et al.* 2011
paragidina-br1	*Diatrea saccharalis*	Inseticida	PINTO *et al*. 2012
cyO1, kB1 e kB2	*Pomacea canaliculata*	Moluscicida	PLAN *et al.* 2008
kB1, kB2, kB3, kB5, kB6 e kB7	*Hemonchus contortus*/ *Trichostrongylus colubriformis*	Nematicida	COLGRAVE *et al.* 2008b
Extrato[a]	*Ceratitis capitata*	Inseticida	BROUSSALIS *et al.* 2010
Extrato da raiz[b]	*Caenorhabditis elegans*	Nematicida	GILDING *et al.* 2016
Extrato[c]	-	Inseticida	OGUIS *et al.* 2019

[a]Extrato butanólico enriquecido em ciclotídeos obtido de *Hybanthus parviflorus*
[b]Extrato enriquecido em ciclotídeos obtido da raiz da espécie *Clitoria ternatea*
[c]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®, 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_{50}) na faixa de 7-1510 µM (Tabela 4), quando comparados com a melitina (DH_{50} ~ 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_{50} (µM)	Referência
circulina A	1020	TAM *et al.* 1999
circulina B	550	JENNINGS *et al.* 2005
ciclopsicotrídeo A	405	TAM *et al.* 1999
cyO2	36	IRELAND *et al*. 2006a
cyO13	11	IRELAND *et al*. 2006a
cyO14	25	IRELAND *et al*. 2006a
cyO15		IRELAND *et al*. 2006a
cyO24	25	IRELAND *et al*. 2006a
kalata B1	11,7-1510	DALY *et al.* 1999; TAM *et al.* 1999; BARRY *et al.* 2003; WANG *et al.* 2008b
varv A		IRELAND *et al*. 2006a
violacin A		IRELAND *et al*. 2006b
kB2 e kB7		GRAN *et al.* 2008
cicloviolacina Y4 e Y5	9,3 e 8,7	WANG *et al.* 2008b
cter 1, cter 3 e cter 4	7,1; 13,1 e 8,4	NGUYEN *et al.* 2011
rivi 1, rivi 2 e rivi 3	»10	NIYOMPLOY *et al.* 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	*P. rigida*[1]	CGESCVFIPCITSLAGCSCKNKVCYYDGGSVP	PINTO *et al.* 2012
nor A	*N. orchidiflora*[2]	CAESCVYLPCTITAIIGCSCRSKVCYDGLP	NAJAS, 2014
nor B	*N. orchidiflora*[2]	CGESCVWXPCXTSAXGCSCKNKVCYRNGXP	BOBEY, 2016
nor C	*N. orchidiflora*[2]	CGESCVFIPCISTLIGCSCKNKVCYRNGVIP	BOBEY, 2016
nor D	*N. orchidiflora*[2]	CGESCVWXPCISAAIGCSCKNKVCYRNGVXP	BOBEY, 2016
nor E	*N. orchidiflora*[2]	CGESCVFXPCXSSXAGCSCKNKVCYIDGSXP	BOBEY, 2016
poca A	*P. calceolaria*[3]	CAESCVFIPCTITAILGCSCRDRVCYDGLP	PINTO *et al.* 2018
poca B	*P. calceolaria*[3]	CAESCVFIPCV-TAILGCSCKDRVCYNGIP	PINTO *et al.* 2018
psyleio A	*P. leiocarpa*[4]	CGETCFTGTCNTPGCSCTYPICTRDGLPI	MATSUURA *et al.* 2016
cyO2	*V. odorata*[5]	CGESCVWIPCISSAIGCSCKSKVCYRNGIP	FENSTERSEIFER *et al.* 2015

Legenda: [1] *Palicourea rigida* (Rubiaceae); [2] *Noisettia orchidiflora* (Violaceae); [3] *Pombalia calceolaria* (Violaceae); [4] *Psychotria leiocarpa* (Rubiaceae); [5] *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*, *Calyptrion*, *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, neolignanas) 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 Brasiliens*, 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

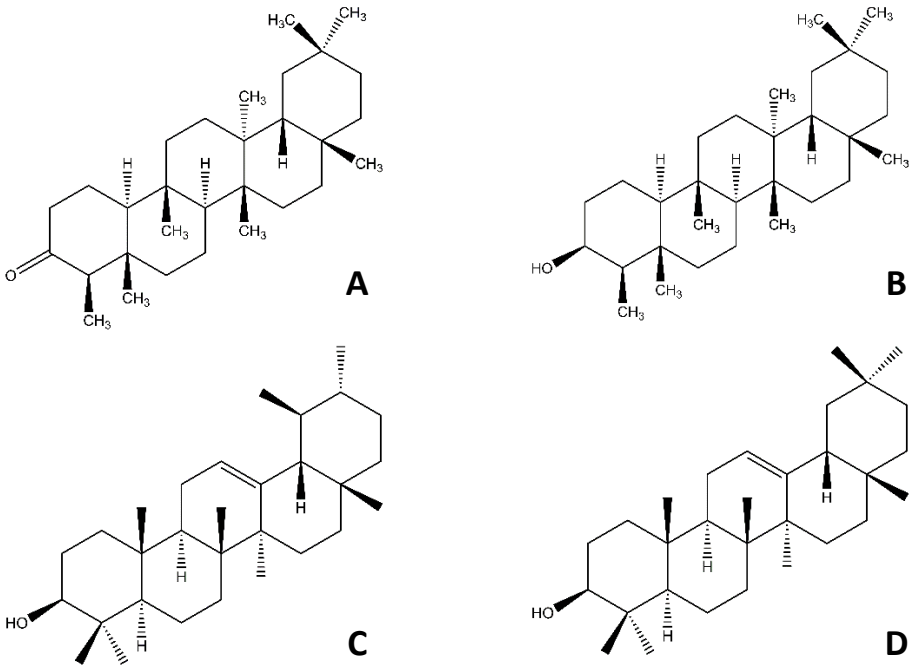
Figura 9 - Distribuição geográfica da espécie *Anchietea pyrifolia* no Brasil.

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: α-amirina e β-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 quatros novos triterpenos pentacíclicos da classe dos friedelanos (FUNASAKI *et al.* 2019).

Figura 10 - Triterpenos pentacíclicos fridelina (A), epifridelanol (B), α-amirina (C) e β-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 "*tətum 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 nor B-E (BOBEY, 2016) (Tabela 5, página 38).

2 OBJETIVOS

Como parte dos projetos temáticos: INCT-BioNat (CNPq #465637/2014-0 e FAPESP #2014/50926-0) e CEPID-CIBFar (FAPESP #2013/07600-3) este trabalho realizou o estudo de duas espécies vegetais da família Violaceae: *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Gingins e *Anchietea pyrifolia* (Mart.) G. Don. Para tanto, tiveram-se como objetivos principais:

- Identificar a presença de ciclotídeos nos diferentes órgãos das espécies em estudo;
- Isolar os peptídeos cíclicos presentes nas espécies em questão;
- Sequenciar a estrutura primária dos ciclotídeos;
- Avaliar o potencial biológico dos peptídeos isolados frente às atividades inseticida, hemolítica, antiplasmodial e antibacteriana.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAL VEGETAL

Para a realização deste estudo foram selecionadas duas espécies da família Violaceae. A espécie *Noisettia orchidiflora* foi coletada no Parque Nacional da Tijuca, Corcovado no Rio de Janeiro pelo Prof. Dr. Marcelo Trovó Lopes de Oliveira e um voucher foi depositado no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) (Tabela 6).

A espécie *Anchietea pyrifolia* foi coletada em Ouro Preto, Minas Gerais (20°22'20.8" S e 45°32'32.8" O). A identificação do espécimen foi realizada pela Profa. Dra. Juliana de Paula-Souza, um voucher foi depositado no herbário da Universidade Federal de Ouro Preto. Ambas espécies foram cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) (Tabela 6).

Tabela 6 - Dados de coleta e cadastro das espécies estudadas.

Espécie	Data de coleta	Cadastro SisGen	Exsicata
Noisettia orchidiflora	abril/2014	AF3BFC3	MT 591
Anchietea pyrifolia	outubro/2018	A1C1879	OUPR 32321

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

O material vegetal foi seco em estufa com ar circulante à temperatura de 40 °C durante quatro dias. Após a secagem, cada um dos órgãos das plantas foi separado manualmente e, subsequentemente, submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico (IKA, A11 basic) (Tabela 7, página 49). Neste trabalho foram estudados as folhas, caules e raízes da espécie *N. orchidiflora* e as raízes e caules da *A. pyrifolia*.

3.1.1 Extração dos constituintes químicos

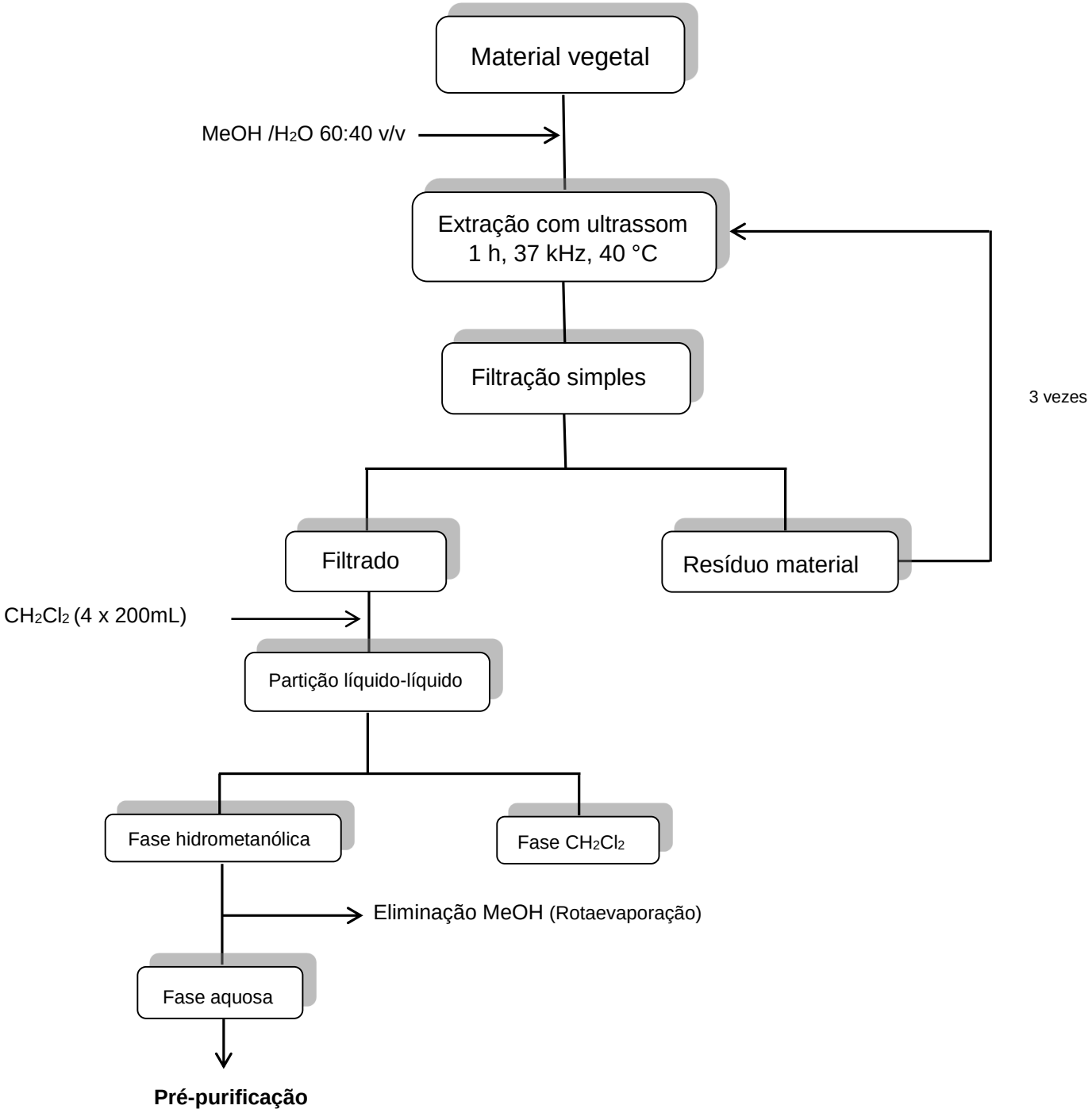
No caso da espécie *A. pyrifolia*, a extração dos constituintes químicos presentes no caule e a raiz foi assistida por ultrassom (banho ultrassônico Elmasonic S 60 H) com solução de MeOH/H_2O 60/40 (v/v) na proporção de 1:10 (por cada grama foram utilizados 10 mL de solução extratora). Neste experimento o material vegetal seco e triturado de cada órgão, separado, foi mantido em contato com a solução extratora por 1 h com frequência de 37 kHz a uma temperatura média de 40 °C, seguida de filtração

por gravidade, utilizando-se papel de filtro. Este procedimento foi repetido quatro vezes.

No final dessa etapa, as soluções filtradas foram reunidas e colocadas em funil de separação e adicionou-se a elas 800 mL de diclorometano (4 x 200 mL). A adição de diclorometano promoveu imiscibilidade entre os solventes, formando-se duas fases (hidrometanólica e CH_2Cl_2). Após a agitação branda, seguida de repouso (24 horas) com completa separação das fases, a fase CH_2Cl_2 foi armazenada e a fase hidrometanólica levada ao evaporador rotativo para remoção do metanol, restando desta forma uma fase majoritariamente aquosa (Esquema 1).

No caso das folhas, caules e raízes da espécie *N. orchidiflora* foi seguida a metodologia descrita em trabalhos prévios realizados no grupo de pesquisa (NAJAS, 2014; BOBEY, 2016). A diferença fundamental entre as duas abordagens foi na técnica empregada no processo de extração e no tempo do experimento, na metodologia anterior foi utilizada a maceração por um período de 24 horas.

Esquema 1 - Fluxograma de extração do material vegetal para a espécie *A. pyrifolia*



Fonte: Todos os esquemas foram elaborados pelo autor, 2020.

3.1.2 Pré-purificação dos extratos aquosos

A fase aquosa obtida na etapa de extração, para cada um dos órgãos das duas espécies em estudo, foi pré-purificada por meio de cromatografia em coluna utilizando como adsorvente octadecilsilano (C_{18}, Polygoprep®, 40-63 µm, 60 Å).

O empacotamento foi feito a seco. Uma vez colocada a fase estacionária (32 g) na coluna (diâmetro interno 4,5 cm) foram adicionados 150 mL (3 x 50 mL) de CH_3OH com o intuito de ativá-la, seguido de 150 mL (3 x 50 mL) de uma solução de $CH_3CN/H_2O/CF_3CO_2H$ 90/10/0,08 v/v/v (solvente B) e equilibrada com 200 mL H_2O/0,1% CF_3CO_2H (solvente A). Após o condicionamento cromatográfico, as frações aquosas obtidas no processo de extração foram aplicadas na coluna e eluídas com 200 mL de uma solução de 20 % (folha, caule e raiz de *N. orchidiflora* e raiz de *A. pyrifolia*) ou 35% (caule de *A. pyrifolia*) de solvente B em A, para remoção dos compostos polares, seguido da adição de 200 mL de solução 80 % de solvente B em A, que removeu os peptídeos de interesse (Apêndice 1, página 147). Esta última fração foi coletada e liofilizada, sendo considerada a fração "rica em ciclotídeos" (Fração 80 %). Para limpeza da coluna foram utilizados 100 % CH_3CN (200 mL) e CH_3OH (200 mL). Para a identificação dos extratos das espécies ***N. orchidiflora*** e ***A. pyrifolia*** foram empregados os códigos **NO** e **AP**, respectivamente, seguidos das letras C (caule), F (folha) e R (raiz) e por último acrescentado a porcentagem de solvente B na qual foi obtida a fração (20/35 e 80 %).

Considerando-se os órgãos em estudo, foram obtidas as frações de interesse (Tabela 7).

Tabela 7 - Massa das frações 80% das espécies em estudo, obtidas após pré-purificação dos extratos aquosos. [1]Massa de material vegetal seco e moído. [2]Massa da fração enriquecida em peptídeos. *Frações obtidas em trabalho prévio (BOBEY, 2016).

Espécie	Orgão	Massa[1] (g)	Código	Massa[2] (mg)
Noisettia orchidiflora	Caule	55,6	NO_C_80*	213
	Folha	15,1	NO_F_80*	208
	Raiz	13,3	NO_R_80	115
Anchietea pyrifolia	Caule	245,0	AP_C_80	499
	Raiz	277,0	AP_R_80	1045

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

3.2 PROCEDIMENTOS CROMATOGRÁFICOS GERAIS

3.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

3.2.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em escala analítica

As análises por HPLC-DAD em escala analítica foram feitas em um cromatógrafo da marca Shimadzu® LC-20A Prominence, equipado com bombas LC-6AD, detector DAD SPD-M20A, injetor automático SIL-10AF, controlador CBM-20A, forno CTO-20A e degaseificador DGU-20 A_{5R}, monitorando os comprimentos de onda 220 e 280 nm. Sendo as fases móveis: Solvente A: H_2O/0,1% HCO_2H e Solvente B: $H_2O/CH_3CN/HCO_2H$, 10/90/0,1 (v/v/v). Os dados foram adquiridos e processados com o auxílio do software LC-Solutions (Shimadzu) versão 5.56 SP1.

3.2.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em escala semipreparativa

As análises por HPLC-DAD em escala semipreparativa foram realizadas em equipamento Shimadzu® Prominence com detector de arranjo de diodos SPD-20A, bomba LC-20AT, degaseificador DGU-20 A_{5R} e controlador CBM-20A. A injeção da amostra foi manual por meio de válvula Rheodyne®. As fases móveis empregadas foram as mesmas descritas na seção anterior. Os dados foram adquiridos e processados com o auxílio do software LabSolutions (Shimadzu) versão 5.57 SP1.

3.2.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em escala preparativa

As análises por HPLC-DAD em escala preparativa foram feitas em cromatógrafo Shimadzu®, composto dos seguintes módulos: Bombas (LC-8A), degaseificador (DGU-14A), injetor automático (SIL-10AF), detector UV (SPD-10A), controlador (SCL-10A). Os dados foram adquiridos e processados com o auxílio do software *CLASS VP* (Shimadzu) versão 6.14 SP2. Foi monitorado o comprimento de onda 220 nm.

3.2.2 Filtração com poliamida

Foi empregada a técnica de extração em fase sólida (SPE) empregando Poliamida P6 (Fluka®, Sigma-Aldrich) como fase estacionária, em uma proporção de 500 mg de fase estacionária para cada 65 mg de massa de extrato. A poliamida foi deixada *overnight* em H_2O/CH_3CO_2H, 98/2 (v/v) e posteriormente colocada em coluna de vidro (h: 12,5 cm, Ø: 1,3 cm). Posteriormente, 450 mg da fração AP_C_80 foram dissolvidos em 40 mL de H_2O/CH_3CO_2H, 98/2 (v/v) e 20 mL de etanol absoluto e centrifugados por 15 min (3000 rpm). O sobrenadante foi aplicado na coluna. As frações obtidas após este procedimento foram coletadas manualmente e denominadas AP_C_80_P_Fx (x = 0-3) (Apêndice 2).

3.3 IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DE CICLOTÍDEOS

3.3.1 Análise por DI-ESI-IT-MS

A infusão direta (*Direct infusion* = DI) (MURRAY *et al.* 2013) das amostras foi feita em um espectrômetro de massas AmaZon-SL (Bruker Daltonics®) com analisador *ion trap* e equipado com uma fonte de ionização *electrospray* (ESI) em modo positivo. Os parâmetros da fonte de ionização foram: voltagem de saída do capilar 140 V, voltagem do capilar -3000 V, temperatura de dessolvatação 230 °C. Foi utilizado nitrogênio como gás de dessolvatação a uma pressão de 7 psi e vazão de 4 $L.min^{-1}$. As análises *full scan* foram adquiridas na faixa de *m*/*z* de 50-2000.

3.3.2 Análise por HPLC-ESI-IT-MS

A detecção dos ciclotídeos por meio da técnica de LC-MS foi feita em um cromatógrafo Shimadzu® acoplado a um espectrômetro de massas AmaZon-SL (Bruker Daltonics®). O HPLC estava composto dos seguintes módulos: Bombas (LC-20AD), forno (CTO-20A), degaseificador ($DGU\text{-}20A_{3R}$), módulo de comunicação (CBM-20A) e detector de arranjo de diodos (SPD-M20A). A injeção (5 µL) foi feita por meio de um injetor automático (SIL-20A HT). O extrato seco foi ressupendido em $H_2O/CH_3CN/HCO_2H$, 90/10/0,1 (v/v/v) e analisado por RP-HPLC a 55 °C em uma coluna Kromasil® C_{18} (250 × 4.6 mm i.d., 5 µm tamanho de partícula e tamanho de poro de 300 Å), com vazão de 1

mL.min^{-1} e um gradiente não linear: 5 a 34% B in 10 min; 34 a 41% B in 28 min; 41 a 100 % B in 2 min; 100% B por 3 min (A: H_2O/0,1% HCO_2H (v/v); B: $H_2O/CH_3CN/HCO_2H$, 10/90/0,1 (v/v/v). Foram monitorados dois comprimentos de onda: 220 e 280 nm. Os espectros de massas foram obtidos em modo positivo na faixa de aquisição de *m*/*z* 400-2000. Os parâmetros da fonte de ionização por *electrospray* (ESI) do espectrômetro de massas foram as seguintes: voltagem de saída do capilar 140 V, voltagem do capilar de -3,5 kV, temperatura de dessolvatação 300 °C. Foi utilizado nitrogênio como gás de secagem e dessolvatação (7 psi, 4 L.min^{-1}, 230 °C). Os dados foram processados com o auxílio do software *Data Analysis* versão 4.1.

3.4 FRACIONAMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS NA PRÉ-PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS

Nesta parte do estudo foram trabalhadas as frações ricas em ciclotídeos advindas do caule (AP_C_80_P_F_0) e das raízes (AP_R_80) da espécie *Anchietea pyrifolia* (seções 3.4.1 e 3.4.2, respectivamente). Assim como das folhas (NO_F_80) e raízes (NO_R_80) da espécie *Noisettia orchidiflora* (seções 3.4.3 e 3.4.4, respectivamente). A fração NO_C_80 já tinha sido estudada em um trabalho prévio (BOBEY, 2016).

3.4.1 Fração AP_C_80_P_F_0

Para a realização deste experimento 133 mg da fração AP_C_80_P_F_0 (ver seção 3.2.2) foram dissolvidos em 3 mL de $H_2O/CH_3CN/HCO_2H$, 10/90/0,1 (v/v/v) e 12 mL H_2O/ 0,1% HCO_2H, centrifugados por 10 min e o sobrenadante filtrado (Chromafil® Xtra, 0,22 µm, celulose). Posteriormente foi realizada uma injeção (9 mL) no cromatógrafo HPLC descrito na seção 3.2.1.2, o restante da amostra foi liofilizado e guardado em geladeira para análises posteriores. Utilizou-se uma variação linear de B em A de 20-40% em 120 min, com uma vazão de 3 mL.min^{-1} e uma coluna Kromasil®, C_{18}, com dimensões 250 x 10 mm, tamanho de partícula de 5 µm e poro de 300 Å. Foram coletadas manualmente 30 frações, nomeadas AP_C_80_P_F_0_T_x (x = 1,2, ..., 30) (Apêndice 3). As fases móveis empregadas foram: Solvente A: H_2O/0,1% HCO_2H e Solvente B: $H_2O/CH_3CN/HCO_2H$, 10/90/0,1 (v/v/v) (Esquema 2, página 54).

3.4.2 Fração AP_R_80

Neste experimento 300 mg da fração AP_R_80 foram dissolvidos em 6 mL de $H_2O/CH_3CN/HCO_2H$, 10/90/0,1 (v/v/v) e 6 mL H_2O/ 0,1% HCO_2H, centrifugados por 10 min e o sobrenadante filtrado (Chromafil® Xtra, 0,22 µm, celulose). Posteriormente foram realizadas injeções (1 mL) no cromatógrafo HPLC descrito na seção 3.2.1.3 utilizando um gradiente linear de B em A de 20-40% em 60 min, com uma vazão de 10 $mL.min^{-1}$. Foi utilizada uma coluna Phenomenex Luna, C_{18}, 150 x 21,2 mm, 5 µm, 100 Å. Foram empregadas as mesmas fases moveis descritas na seção 3.4.1. Foram coletadas manualmente 10 frações. Para identificação utilizou-se o código AP_R_80_Fx (x = 1,2, ..., 10) (Esquema 3, página 55).

3.4.3 Fração NO_F_80

Para a realização deste experimento 200 mg da amostra (fração 80% obtida das folhas de *N. orchidiflora*, descrita na seção 3.1.2) foram solubilizados em 10 mL de 20% B em A (A: H_2O/0,1% HCO_2H, B: $H_2O/CH_3CN/HCO_2H$, 10/90/0,1 (v/v/v), centrifugados por 10 min e o sobrenadante filtrado (Chromafil® Xtra, 0,22 µm, celulose). Posteriormente foi injetada manualmente no HPLC (seção 3.2.1.2), utilizando um gradiente linear de B em A de 20-40% em 60 min, com uma vazão de 3,5 $mL.min^{-1}$. Foram empregadas as mesmas fases moveis e coluna descritas na seção 3.4.1. Foram coletadas manualmente 35 frações que foram reunidas após análise por HPLC-DAD e espectrometria de massas. Para identificação utilizou-se o código NO_F_80_Fx (x = 1,2, ..., 35) (Esquema 4, página 56).

3.4.4 Fração NO_R_80

Para a realização deste experimento 205 mg da amostra foram dissolvidos em 5 mL de $H_2O/CH_3CN/HCO_2H$, 10/90/0,1 (v/v/v) e 5 mL H_2O/ 0,1% HCO_2H, centrifugados por 10 min e o sobrenadante filtrado (Whatman® UNIFLO 25/0,45 RC, 0,45 µm, celulose). Posteriormente foi fracionada no cromatógrafo HPLC da seção 3.2.1.3, utilizando uma variação linear de B em A de 30-40% em 60 min, com uma vazão de 5 $mL.min^{-1}$, sendo as fases moveis as mesmas empregadas na seção 3.2.1.1. Para tanto, empregou-se uma coluna Kromasil®, C_{18}, com dimensões 250 x 10 mm, tamanho de partícula de 5 µm e

poro de 300 Å. Foram coletadas manualmente 9 frações, buscando-se coletar cada banda individualmente. Para identificação foi utilizado o código NO_R_80_F_x (x = 1-9) (Esquema 5, página 57).

3.5 ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS

3.5.1 Isolamento das substâncias produzidas pela espécie *Anchietea pyrifolia*

As subfrações (T_3-T_4 e T_8-T_9), obtidas a partir do fracionamento de AP_C_80_P_F_0 (item 3.4.1), foram submetidas a purificação por cromatografia líquida de alta eficiência, resultando no isolamento de duas substâncias (**1** e **2**) (Esquema 2, seção 3.5.1.1).

As frações advindas do fracionamento da fração AP_R_80 (seção 3.4.2), foram repurificadas por HPLC-DAD em escala semipreparativa permitindo obter cinco substâncias (**1**-**5**) (Esquema 3, seção 3.5.1.2).

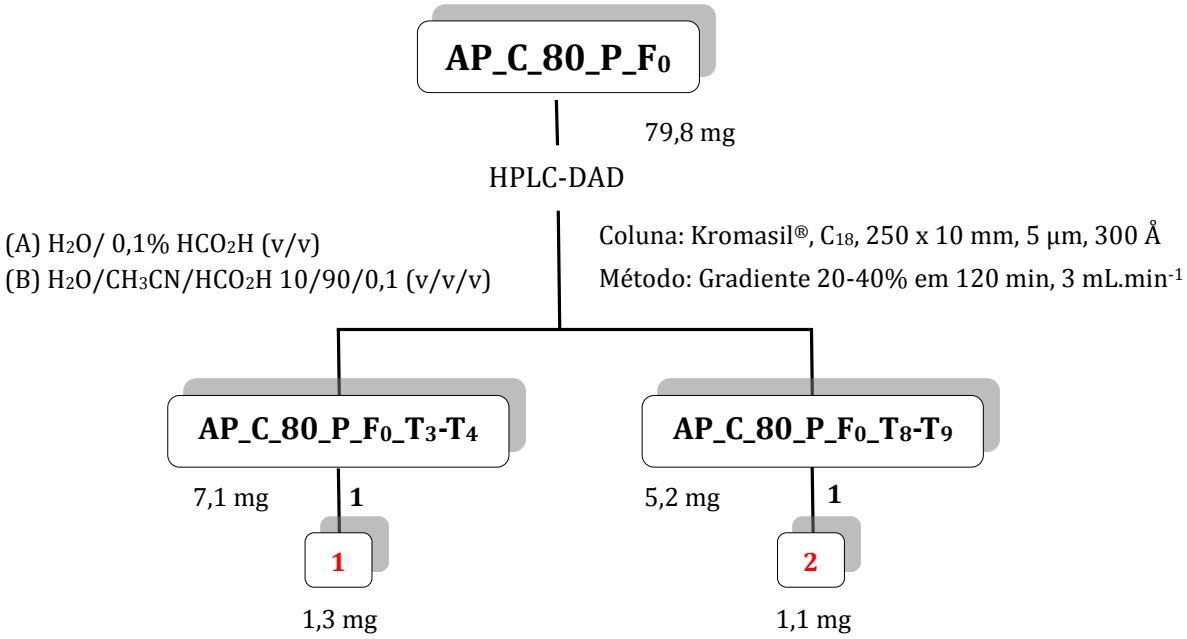
3.5.1.1 Isolamento das substâncias presentes no caule

Para a realização deste experimento, 7,1 mg da subfração AP_C_80_P_F_0_T_3-T_4 foi dissolvido em 1 mL de H_2O/CH_3CN/HCO_2H 10/90/0,1 (v/v/v) e 4 mL H_2O/ 0,1% HCO_2H, posteriormente foi filtrada em membrana (Chromafil® Xtra, 0,22 µm, celulose). Utilizou-se o mesmo aparelho HPLC, coluna e método descritos na seção 3.4.1.

Foram coletadas 17 frações e reanalisadas por HPLC-DAD e espectrometria de massas com o intuito de reunir aquelas que apresentassem semelhanças, resultando no isolamento da substância **1** (Esquema 2).

Para a separação cromatográfica da subfração AP_C_80_P_F_0_T_8-T_9, 5,2 mg foram preparados e analisados seguindo as mesmas condições descritas para à substância **1**. Foram coletadas 13 frações e reanalisadas por HPLC-DAD e espectrometria de massas. Aquelas que tiveram perfis semelhantes foram reunidas, dando lugar ao isolamento da substância **2** (Esquema 2).

Esquema 2 - Isolamento das substâncias **1** e **2** a partir das subfrações advindas do fracionamento de AP_C_80_P_F_0 (Fração obtida após remoção de taninos da fração 80% do caule de *A. pyrifolia*, AP_C_80).

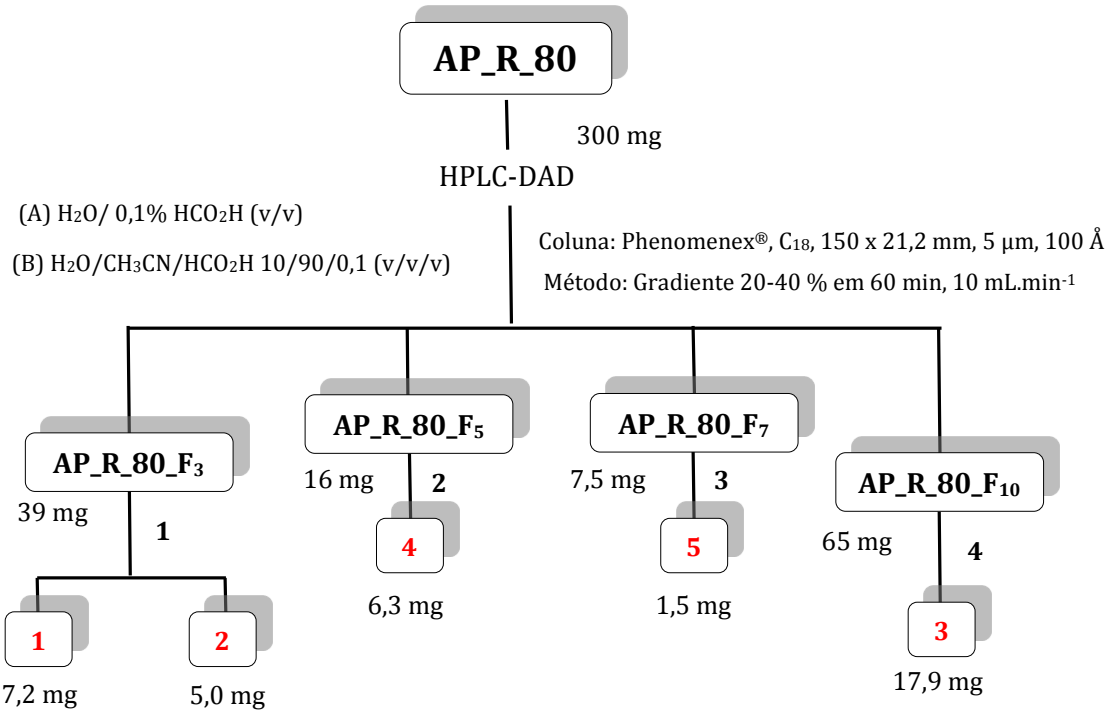


Legenda:
1) Método: Gradiente 20-40% em 60 min, 3 mL.min^{-1}, Coluna: Kromasil, C_{18}, 250 x 10 mm, 5 µm, 300 Å, 220 nm

3.5.1.2 Isolamento das substâncias presentes nas raízes

No isolamento das substâncias majoritárias presentes nas subfrações AP_R_80_F_3, F_5, F_7 e F_{10} advindas do fracionamento de AP_R_80 (ver seção 3.4.2) foi empregado o cromatógrafo descrito na seção 3.2.1.3, em todos os casos foi utilizada uma coluna Kromasil, C_{18}, 250 x 4,6 mm, 5 µm, 300 Å. Os métodos aplicados para cada uma delas estão descritos no esquema 3. O preparo das amostras para injeção no HPLC foi realizado seguindo o procedimento descrito na seção 3.5.1.1, as quantidades de solventes foram ajustadas à quantidade de material inicial (ver esquema 3) até atingir uma concentração de 10 mg/mL.

Esquema 3 - Isolamento das substâncias **1**, **2**, **3**, **4** e **5**, obtidas das subfrações advindas do fracionamento de AP_R_80 (Fração 80 % das raízes de *A. pyrifolia*).



Legenda:
1) Método: Isocrático 32% em 60 min, 5 mL.min^{-1}, Coluna: Kromasil, C_{18}, 250x10 mm, 5 µm, 300 Å
2) Método: Gradiente 32-35 % em 30 min, 5 mL.min^{-1}, Coluna: Kromasil, C_{18}, 250 x 10 mm, 5 µm, 300 Å
3) Método: Gradiente 36,5-40% em 60 min, 5 mL.min^{-1}, Coluna: Kromasil, C_{18}, 250 x 10 mm, 5 µm, 300 Å
4) Método: Gradiente 36,5-40 % em 60 min, 5 mL.min^{-1}, Coluna: Kromasil, C_{18}, 250 x 10 mm, 5 µm, 300 Å

3.5.2 Isolamento das substâncias produzidas pela espécie *Noisettia orchidiflora*

A substância **6** (Esquema 4, seção 3.5.2.1) foi obtida da subfração NO_F_80_F_{16} oriunda do fracionamento de NO_F_80 (item 3.4.3).

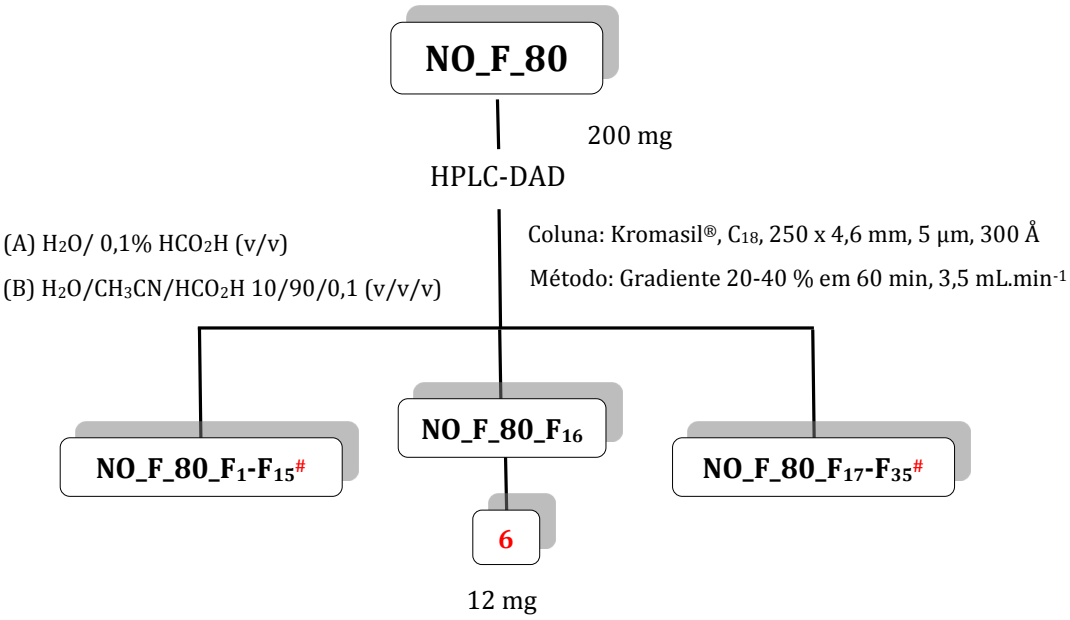
Das subfrações obtidas no fracionamento de NO_R_80 (seção 3.4.4) foi possível obter quatro substâncias (**7**, **8**, **9** e **10**) (Esquema 5). Detalhes do seu processo de purificação estão descritos na seção 3.5.2.2.

3.5.2.1 Isolamento das substâncias presentes nas folhas

Após ser reanalisada por HPLC-DAD, HPLC-ESI-IT-MS e espectrometria de massas MALDI-TOF foi possível concluir que a subfração NO_F_80_F_{16} tratava-se de uma substância pura (substância **6**) (Esquema 4). As outras subfrações mostraram perfis

cromatográficos de maior complexidade e pouca quantidade de massa, inviabilizando desta forma o processo de isolamento de outras substâncias.

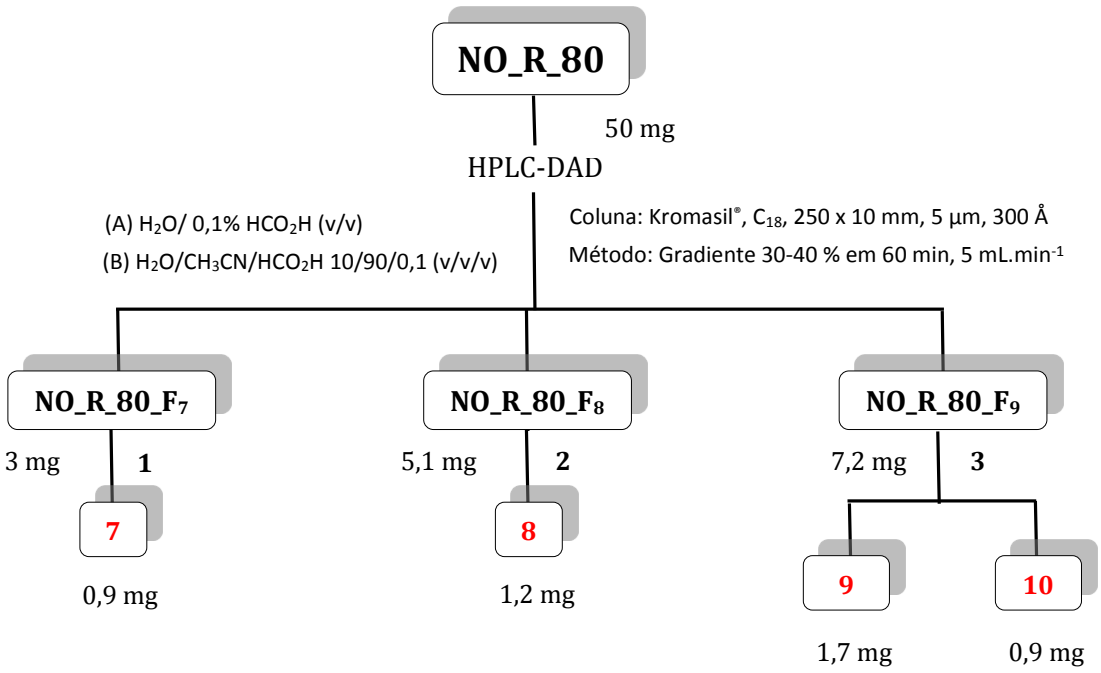
Esquema 4 - Isolamento da substância **6** obtida no fracionamento de NO_F_80 (fração 80% das folhas de *N. orchidiflora*). # Estas frações apresentaram perfis cromatográficos de maior complexidade e pouca quantidade de massa, motivo pelo qual decidiu-se não prosseguir com seu processo de purificação.



3.5.2.2 Isolamento das substâncias presentes nas raízes

As subfrações obtidas no fracionamento da amostra NO_R_80 (descrito na seção 3.4.4) foram avaliadas por HPLC-DAD e espectrometria de massas. No caso da subfração NO_R_80_F_7 foi realizada uma purificação por HPLC-DAD em escala analítica, na qual foi empregada uma coluna Phenomenex®, Luna-C_{18}, 250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å e um método isocrático 30% por 15 min com vazão de 1 mL.min^{-1} e temperatura de 55 °C, obtendo-se a substância **7** (Esquema 5). A separação cromatográfica da subfração NO_R_80_F_8 foi realizada com a mesma coluna descrita anteriormente e uma eluição isocrática 34% por 15 min com vazão de 1 mL.min^{-1} e temperatura de 55 °C, desta forma foi obtida a substância **8** (Esquema 5). No caso de NO_R_80_F_9 foi empregado um método isocrático 36% em 15 min a 55 °C e vazão de 1 mL.min^{-1}. Nas três purificações foram empregados o cromatógrafo e a fase móvel descritos no item 3.2.1.1.

Esquema 5 - Isolamento das substâncias **7**, **8**, **9** e **10**, advindas das subfrações obtidas no fracionamento de NO_R_80 (fração 80% das raízes de *N. orchidiflora*).



Legenda:

1) Método: Isocrático 30% 15 min, 1 mL.min^{-1}, 55°C, coluna: Phenomenex, C_{18}, 250 x 4,6 mm, 5µm, 100 Å
2) Método: Isocrático 34% 15 min, 1 mL.min^{-1}, 55°C, coluna: Phenomenex, C_{18}, 250 x 4,6 mm, 5µm, 100 Å
3) Método: Isocrático 36% 15 min, 1 mL.min^{-1}, 55°C, coluna: Phenomenex, C_{18}, 250 x 4,6 mm, 5µm, 100 Å

3.6 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

3.6.1 Redução e Alquilação

Para o sequenciamento, os ciclotídeos puros (0,5-1 mg) foram suspendidos em 200 µL de tampão bicarbonato de amônio (pH 8,2-8,4). Uma alíquota (20 µL) foi reduzida com 2 µL de ditiotreitol (Sigma-Aldrich) (3,2 mg em 100 µL de NH_4HCO_3 0,1 M) e incubada com agitação e ausência de luz por 30 minutos. A subsequente alquilação dos tióis livres foi feita através da adição de 4 µL de iodoacetamida (Sigma-Aldrich) (9.25 mg em 100 µL de NH_4HCO_3 0,1 M) a reação foi mantida a temperatura ambiente por 10 min em ausência de luz. Ao término, utilizou-se 1 µL de CF_3CO_2H 1% para interromper a reação.

3.6.2 Digestão Enzimática

Para digestão enzimática, cada substância foi reduzida/alquilada em triplicata conforme a seção 3.6.1. Porém, ao término, a reação não foi interrompida com ácido trifluoroacético, mas sim, feita a adição de 1 µL da solução de ditiotreitol com incubação de 10 minutos à temperatura ambiente.

Neste trabalho foram empregadas três enzimas: endoproteinase-GluC (endoGlu-C) (Promega, *sequencing grade*, V165A); tripsina (Promega, *sequencing grade*, V528A) e quimiotripsina (Promega, *sequencing grade*, V106A) preparadas a partir do material comercial liofilizado, seguindo o procedimento indicado pelos fornecedores.

A cada amostra reduzida e alquilada foram adicionadas uma alíquota de 2 µL de solução enzimática. As amostras foram incubadas no agitador de microplacas (Agimaxx®, modelo AG-100) com aquecimento e velocidade de agitação de 600 rpm durante 6 horas a 37 °C, em ausência de luz. Todas as amostras foram submetidas a ZipTip® (Millipore-Merck, Billerica, USA) seguindo o protocolo fornecido pelos fabricantes, antes de serem analisadas por espectrometria de massas.

3.6.3 Espectrometria de Massas MALDI-TOF

Os ciclotídeos puros, uma vez concluídas as reações de redução/alquilação e digestão enzimática, foram sequenciados por espectrometria de massas usando um espectrômetro MALDI-TOF/TOF Ultraflextreme (Bruker Daltonics) equipado com o sistema de laser Smartbeam II. Os parâmetros utilizados para a obtenção dos espectros foram: 1000-2000 pulsos por espectro, PIE (*Pulsed ion extraction*) de 120 ns, modo positivo, frequência de laser de 1000 Hz. As voltagens de IS1 (*ion source* 1) e IS2 aplicadas foram de 25 e 23 kV, respetivamente. Foi utilizado o modo refletor, sendo aplicadas as voltagens de 26.6 kV (RV1). A calibração foi feita com o padrão *Peptide Calibration Standard II* (Bruker). Para aquisição dos espetros dos ciclotídeos naturais, a substância seca foi dissolvida em 0,1% CF_3CO_2H e misturada em proporção 1:3 (v/v) com uma solução saturada de ácido-alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (Bruker Daltonics) em $H_2O/CH_3CN/CF_3CO_2H$, 50/50/0,1 (v/v/v). Uma alíquota (2 µL) desta mistura foi

diretamente aplicada na placa e seca. Os espectros MS/MS foram adquiridos no faixa de massas de *m*/*z* 500-4000.

A sequência de aminoácidos foi obtida por assinação manual dos íons correspondentes às series N-terminal (-*b*) e C-terminal (-*y*) através do software FlexAnalysis versão 3.3 (Bruker Daltonics).

Esta análise foi realizada na Universidade de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto, no Núcleo de Pesquisa Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), sob coordenação do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes.

3.6.4 Análise de Aminoácidos

Com a finalidade de ampliar as informações sobre os aminoácidos que constituem os ciclotídeos isolados, foi realizada a hidrólise dos peptídeos e posterior identificação e quantificação dos aminoácidos. Para tanto os ciclotídeos purificados (0,5-1 mg) foram hidrolisados em HCl 6 M (1 mL), na presença de 0,08 mL de hidroxibenzeno/H_2O 5:95 (v/v), sob atmosfera de nitrogênio a 110 °C durante 72 h. Depois da hidrólise, o HCl foi removido a pressão reduzida e o resíduo obtido foi ressupendido em solução tampão (Na^+-citrate, 0,2 M) (pH 2,2), filtrado (0,22 µm,) e analisado pelo método cromatográfico de troca iônica usando um analisador automático de aminoácidos (Shimadzu LC-10A/C-47A), coluna Shim-pack ISC-07/S1504 Na, 150 x 4,0 mm, 7 µm (Shimadzu) e derivatização pós-coluna por *orto*-ftalaldeído (Sigma-Aldrich).

A detecção foi realizada utilizando-se detector de fluorescência para excitação e emissão nos comprimentos de onda de 348 e 450 nm, respectivamente. O sistema foi calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos. Neste procedimento, calcula-se um fator de conversão que relaciona a concentração de cada aminoácido (no padrão) com a área do pico.

Esta análise foi realizada no departamento de Bioquímica e Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara (UNESP), sob coordenação do Prof. Dr. Eduardo Mafud Cilli.

3.6.5 Alinhamento das Sequências

Para realizar os alinhamentos múltiplos das sequências de aminoácidos dos ciclotídeos obtidos neste estudo e obter o grau de similaridade foram utilizados os softwares BLASTp (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins) e ClustalW (https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw). Foi empregado o código de uma letra para representar os aminoácidos. Os locais dos resíduos de Cys conservados, que estão envolvidos nas ligações dissulfeto, foram ressaltados em vermelho.

3.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.7.1 Avaliação da atividade antiplasmodial

Tanto as frações quanto as substâncias puras foram avaliadas quanto à atividade antiplasmodial contra a cepa de *Plasmodium falciparum* 3D7 (sensível a cloroquina), utilizando a técnica de SYBR Green I. Foram testadas em soluções seriadas de fator 2 as doses de 50-0,049 $\mu g.mL^{-1}$. Neste ensaio, as diluições dos ciclotídeos são incubadas com o parasita por 72 h, e em seguida é adicionado o reagente de SYBR green e ocorre a marcação do DNA dos parasitas viáveis. A redução de parasitemia em cada concentração é calculada em relação a controles de crescimento positivo (sem adição de ciclotídeos, 100% de viabilidade) e negativo (hemácias não-parasitadas, 0% de viabilidade). Gráficos dose-resposta desses dados são usados para determinar a concentração inibitória média (IC_{50}) de cada substância.

O ensaio foi realizado sob a supervisão do Prof. Dr. Rafael V. C. Guido- Instituto de Física de São Carlos/ Universidade de São Paulo (IFSC-USP).

3.7.2 Prova de sensibilidade bacteriana

Os testes para verificação de atividade antimicrobiana dos peptídeos foram realizados através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os experimentos foram montados em micro-placas de 96 canais e a visualização dos resultados foi feita utilizando-se o cromóforo cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) (Mallinckrodt), segundo metodologia descrita por Coyle e colaboradores (2003) e Meletiadis e colaboradores (2000).

Os peptídeos foram testados contra os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 117333) e *Escherichia coli* (ATCC 11775), obtidos no Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais - C.E.I.S. (IBRC/UNESP). Foram utilizados: meio de cultivo Müller-Hinton (Difco), meio de cultivo Müller-Hinton Broth (Difco) para manutenção e cultivo desses microrganismos. Toda a manipulação dos microrganismos foi feita em câmara de fluxo laminar vertical (Pachane) e todo material utilizado no cultivo foi esterilizado em autoclave vertical AV30 (Phoenix), por 20 minutos à 121 °C e 1 atm.

Para a realização do experimento, os inóculos foram preparados em solução salina (NaCl 0,9 %) a partir de colônias novas (colônias de 18 horas). A concentração desses inóculos foi ajustada para 0,5 da escala de McFarland. Foram adicionados 200 µL de inóculo em 20 mL de meio Müller-Hinton líquido, sendo essa suspensão utilizada para a montagem das micro-placas. Em cada orifício da placa foram colocados 10 µL de solução de peptídeo (diluído em água esterilizada em diferentes concentrações), 10 µL da suspensão de inóculo e 80 µL de meio Müller-Hinton líquido.

Para o valor de referência zero, foram colocados 80 µL de meio Müller-Hinton líquido, 10 µL de água bidestilada esterilizada e 10 µL de salina. Para o valor de referência 100%, foram colocados 10 µL de água e 10 µL da suspensão de inóculo e 80 µL de meio Müller-Hinton líquido. Foi montada uma placa para cada espécie de microrganismo mencionado acima. As placas foram incubadas em estufa de cultura a 34º C, por 18 horas. Após este período, acrescentou-se a cada orifício 10 µL de TTC 0,5 % (m/v) em água. As leituras foram realizadas após 1 hora de re-incubação das placas em estufa a 34 °C.

O ensaio foi realizado no Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica do Instituto de Biociências de Rio Claro/Universidade Estadual Paulista (IBRC-UNESP) sob a supervisão do Prof. Dr. Mário Sérgio Palma e da Dra. Bibiana Monson de Souza.

3.7.3 Avaliação da atividade inseticida

Os bioensaios para determinar a concentração letal média (CL_{50}) dos ciclotídeos cyO4 (**1**) e apy A (**3**) foram feitos seguindo os padrões da OECD (*Organization for*

Economic Cooperation and Development) (OECD, 1998a, 1998b) para avaliação de agrotóxicos em abelhas. Os experimentos foram realizados em abelhas recém-emergidas da espécie africanizada *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae), no Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA) radicado no Centro de Estudos de Insetos Sociais (UNESP/Rio Claro) em colaboração com o Lic. Lucas Miotelo e sob a supervisão do Prof. Dr. Osmar Malaspina.

3.7.3.1 Obtenção das abelhas recém-emergidas

Para realização dos testes, abelhas recém-emergidas foram obtidas de três colmeias saudáveis de *A. mellifera* africanizada, no apiário do Departamento de Biologia da UNESP, Rio Claro / Brasil. Para obter as abelhas recém-emergidas, três quadros com ninhadas seladas (próximas à emergência de adultos) foram coletados e mantidos em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) a 34 ± 2 °C, umidade relativa de 80 ± 10% e no escuro. Utilizando este procedimento, obtivemos espécimes de idade conhecida (0-24h).

3.7.3.2 Teste de injeção na hemolinfa

Os ciclotídeos liofilizados (**1** e **3**) foram solubilizados em água deionizada para uma concentração final de 1 $\mu g.\mu L^{-1}$. Posteriormente, a partir desta solução estoque, foi realizada uma diluição em cascata, obtendo-se sete concentrações de cyO4 (**1**) (0,025; 0,05; 0,125; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 $\mu g.\mu L^{-1}$) e seis concentrações de apy A (**3**) (0,05; 0,125; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 $\mu g.\mu L^{-1}$). As abelhas expostas receberam 1 µL dos ciclotídeos **1** e **3,** nas diferentes concentrações, por injeção na inserção entre o primeiro e o segundo tergum, diretamente na hemolinfa (Figura 13). A solução foi dispensada com o auxílio de uma seringa (Hamilton®) de 50 µL inserida em um dispensador de repetição PB600 (Hamilton®). Para verificar se a mortalidade está relacionada à inserção da agulha na abelha, foi aplicado 1 µL de água deionizada (controle negativo). Além disso, o inseticida comercial dimetoato foi utilizado como controle positivo, em seis concentrações (0,01; 0,04; 0,09; 0,20; 0,45 e 1,00 $\mu g.\mu L^{-1}$). Foram considerados apenas ensaios nos quais os grupos controles apresentaram mortalidade inferior a 10 % (OECD,

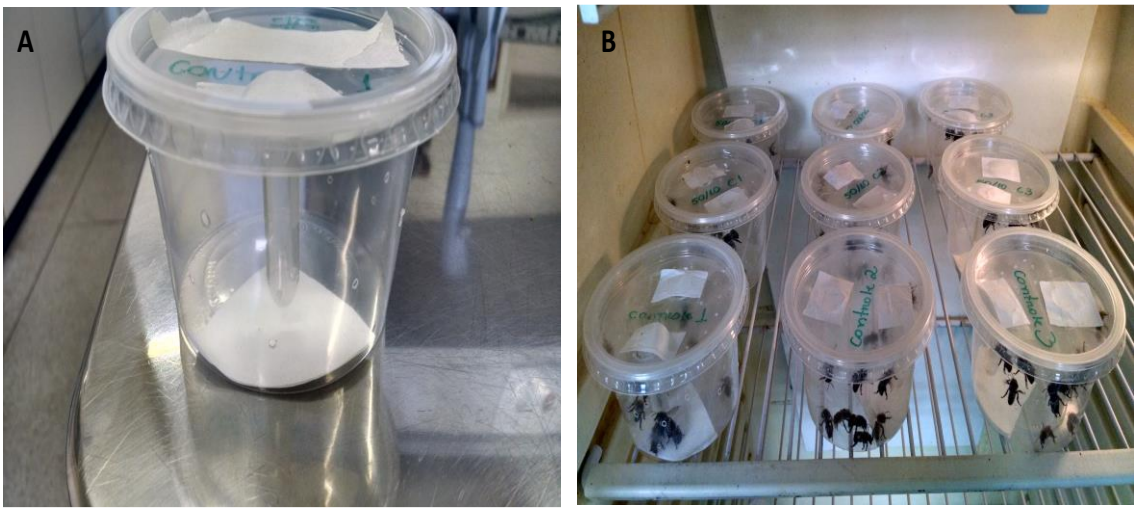
1998a, 1998b). Para cada concentração, foram utilizadas três repetições de 10 abelhas recém-emergidas e a mortalidade foi verificada após 24 horas de exposição.

Após a exposição, as abelhas recém-emergidas foram mantidas em gaiolas plásticas descartáveis de 250 mL e alimentadas através de micro tubos *eppendorf* (2 mL) perfurados nas extremidades (Figura 14A). A dieta utilizada foi composta por solução aquosa de açúcar a 50 % (p/v). Todos os grupos experimentais receberam alimento seguindo uma dieta *ad libitum* sem contaminação. Foram mantidos em DBO a 32 ± 2 ° C, umidade relativa de 60 ± 10% e em escuridão constante (Figura 14B).

Figura 13 - Ilustração de uma abelha da espécie *Apis mellifera*. A seta vermelha aponta para o local de injeção.

Fonte: DECIO *et al.* 2019.

Figura 14 - Procedimentos para realização do experimento. A) Gaiola plástica descartável com alimentador do tipo *eppendorf*. B) Gaiolas plásticas acondicionadas em estufa DBO durante a realização dos experimentos.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

3.7.3.3 Análise estatística

Com base na mortalidade de cada concentração testada, foi determinada a concentração letal média (CL_{50} - Concentração necessária para matar 50% da população testada). Os dados de dose-resposta foram analisados com modelos binomiais generalizados. As funções logit, probit, log-log complementar e ligação de cauchit foram testadas (VENABLES; RIPLEY, 2002; MORAL; HINDE; DEMÉTRIO, 2017). O modelo logístico binomial com a função de link cauchit foi o mais adequado para dados de mortalidade em 24 horas para os compostos **1**, **3** e dimetoato. O ajuste do modelo foi confirmado usando um envelope meio simulado normal usando o software R versão 3.5.0 com o pacote hnp (MORAL; HINDE; DEMÉTRIO, 2017; R Core Team, 2019).

3.7.4 Avaliação da atividade hemolítica

Os experimentos de atividade hemolítica foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (UNESP/Rio Claro) em colaboração com a Dra. Bibiana de Souza e sob a supervisão do Prof. Dr. Mario Palma, segundo método descrito por Souza e colaboradores (2005), com algumas modificações e número de repetições de n=5. Foram adicionados 500 µL de sangue humano tipo O+, extraído de doador sadio, em 50 mL de solução salina

(NaCl 0,85 %, $CaCl_2$ 10 mM) sob leve agitação por 15 minutos, em agitador magnético (MA-089 Marconi). A suspensão de eritrócitos foi centrifugada em presença de solução salina, em uma centrífuga clínica (Z-200A Hermle) a 3000 rpm durante 15 minutos para lavagem das células. Esta operação foi repetida por mais duas vezes.

O sobrenadante da última centrifugação foi descartado e o concentrado de hemácias obtido ao final das centrifugações foi considerado como sendo 100% de células. Foi preparada uma suspensão de eritrócitos a 4 % diluindo-se a suspensão concentrada descrita acima, com solução salina isotônica. Essa suspensão a 4 % foi utilizada nos testes de atividade hemolítica.

Foram montadas baterias de ensaios em microplacas (Costar), onde cada orifício foi preenchido com os diferentes peptídeos, solubilizados em solução salina. A cada orifício foram adicionados 90 µL da suspensão de eritrócitos perfazendo um volume final de 100 µL. Para o controle de 0 % de hemólise foram adicionados 10 µL de solução salina a 90 µL da suspensão de eritrócitos; para o controle de 100 % de hemólise, foram adicionados apenas 10 µL de solução salina acrescida de 1 % (v/v) de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) a 90 µL de suspensão de eritrócitos.

Cada placa foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas sob agitação. Após este período de incubação, o conteúdo de cada orifício foi centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm em uma centrífuga Compacta Avanti 30 (Beckman). O sobrenadante de cada preparação foi utilizado para a montagem de uma nova placa, para realização das leituras de absorbância (540 nm) em uma leitora de microplacas (VERSAmax Tunable Microplate Reader).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DO CAULE DE *A. PYRIFOLIA*

Para a preparação do extrato bruto, o presente estudo se baseou em parâmetros descritos no trabalho publicado em 2012 por Yeshak e colaboradores com algumas modificações. Segundo os autores, o emprego de misturas hidrometanólicas - de mediana polaridade (40% até 60%) permite uma extração com ampla diversidade e quantidade de ciclotídeos o que é justificado por seu caráter anfifílico.

A extração dos constituintes químicos presentes no caule de *A. pyrifolia* foi realizada por decocção com MeOH/H_2O 60/40% (v/v), empregando banho ultrassônico por 1 h a uma temperatura de 40 °C (4 vezes) (Esquema 1, página 47).

Com a finalidade da remoção de compostos de baixa polaridade da solução extraída, foi realizada uma partição líquido-líquido com diclorometano, o que resultou em um extrato hidrometanólico pobre em compostos apolares (Esquema 1, página 47). Nesta etapa, compostos hidrofóbicos como lipídios, clorofilas e substâncias de baixa massa molecular como fenilpropanóides, terpenóides, entre outros, migram para a fase diclorometânica, sendo então separados. Os ciclotídeos e polipeptídios em geral não são solúveis em diclorometano (PINTO, 2013).

4.2 PRÉ-PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS

No entanto, o extrato hidrometanólico, obtido após a partição líquido-líquido, pode ainda conter interferentes tais como polifenóis, taninos, flavonóides, catequinas, açúcares, entre outros (CLAESON *et al.* 1998) que podem gerar falsos positivos nas análises. Para tanto, se fez necessária a pré-purificação por cromatografia em coluna empregando octadecilsilano como fase estacionária (seção 3.1.2, página 48).

As frações obtidas foram analisadas por HPLC-DAD com o auxílio de um método de eluição em gradiente com variação linear da porcentagem do solvente orgânico de 5 a 100% em 45 minutos e vazão de 1 $mL.min^{-1}$ (Figura 15). Os perfis cromatográficos a 220 nm das frações AP_C_35 e AP_C_80 mostraram bandas largas e intensas, características da presença de polifenóis poliméricos (taninos). A presença desta classe de compostos interfere na identificação e isolamento dos ciclotídeos por HPLC-DAD, uma

vez que eles absorvem no mesmo comprimento de onda (a ligação peptídica absorve em 220 nm).

Devido as informações fornecidas pelo HPLC-DAD nesta etapa não serem conclusivas, decidiu-se fazer a infusão direta das frações em um espectrômetro de massas Amazon SL, Bruker® com fonte de ionização por *electrospray* com o intuito de obter os *fingerprints* das amostras (item 3.3.1, página 50). Uma vez concluída a análise foi possível detectar a presença de íons triplamente carregados com relação massa/carga na faixa de 900-1300 somente nas frações AP_C_80 e AP_C_100 (Figura 16), o que poderia indicar, de forma preliminar, a presença de ciclotídeos. No entanto, existem outras substâncias de natureza peptídica (por exemplo defensinas vegetais) que apresentam massas moleculares na mesma faixa, por isso se faz necessário o isolamento e sequenciamento das mesmas.

Figura 15 - Cromatogramas das frações AP_C_35 (preto), AP_C_80 (vermelho) e AP_C_100 (azul)
Método: Gradiente 5-100% em 45 min, 1 mL.min^{-1}, 23 ˚C, 220 nm.
Coluna: Kromasil®, C_{18}, 250 x 4,60 mm, 5 µm, 300 Å.

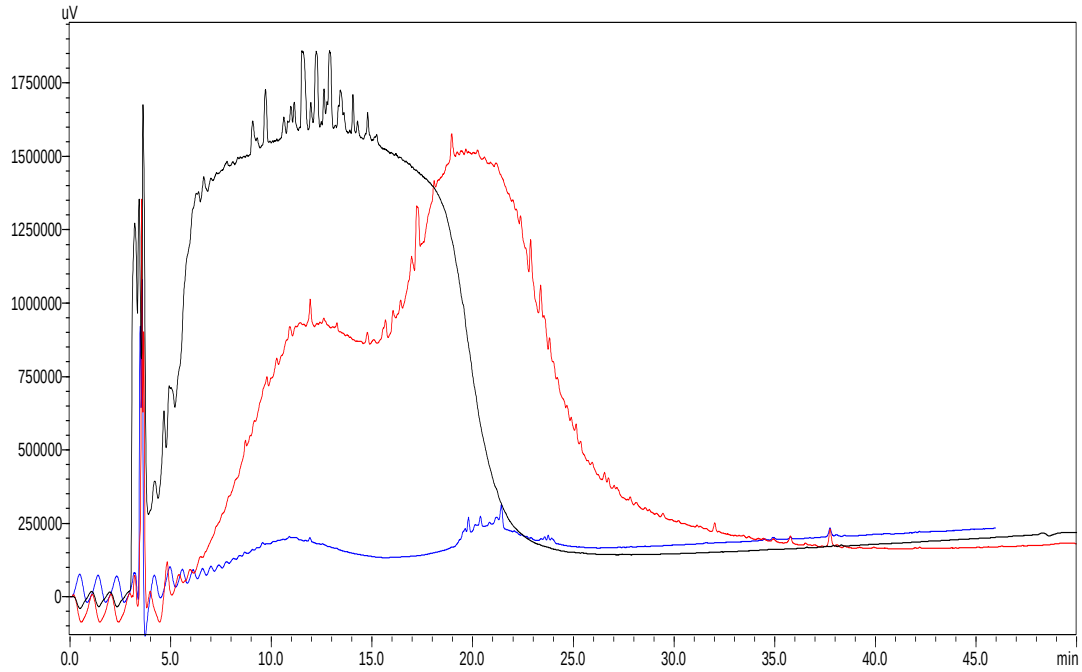
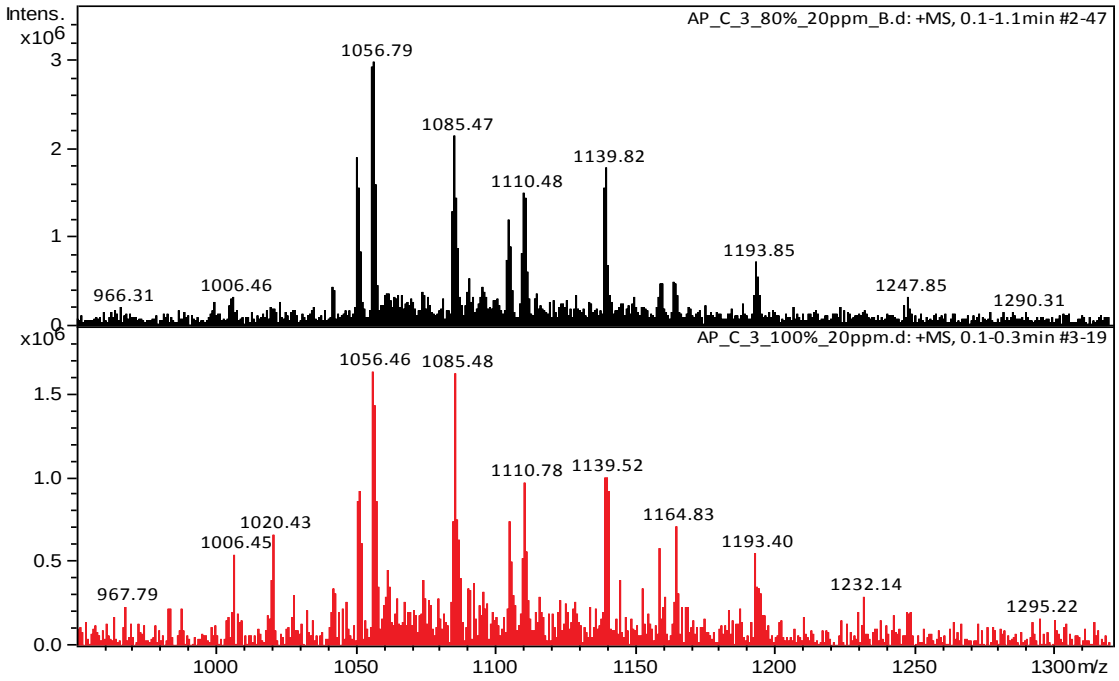


Figura 16 - Espectros de massas DI-ESI-(+)-IT-MS das frações AP_C_80 (preto) e AP_C_100 (vermelho) na faixa de *m/z* 900-1300.



4.3 FILTRAÇÃO COM POLIAMIDA DA FRAÇÃO AP_C_80

Com o intuito de remover os taninos foi realizada busca na literatura por métodos de extração destes interferentes. As metodologias descritas por Claeson e colaboradores (1998), Ioset e colaboradores (2011) e Queiroz (2013) demonstraram bons resultados na remoção de taninos em matrizes vegetais através da técnica de extração em fase sólida (SPE) utilizando poliamida como fase estacionária.

Decidiu-se escolher a primeira metodologia (CLAESON *et al.* 1998), pois era a única das três que tinha sido empregada em extratos contendo ciclotídeos. Uma vez realizado o experimento, descrito no item 3.2.2 (página 50), as frações coletadas (Apêndice 2) foram analisadas por HPLC-DAD, o que permitiu observar uma melhora significativa na obtenção dos novos perfis (Figura 17) evidenciando que o procedimento com poliamida se mostrou eficaz na remoção dos taninos presentes.

Figura 17 - Comparação dos perfis cromatográficos das frações AP_C_80 (preto) e AP_C_80_P_F_1 (vermelho).
Método: Gradiente 5-100% em 45 min, 1 mL.min^{-1}, 23 ˚C, 220 nm.
Coluna: Kromasil®, C_{18}, 250 x 4,60 mm, 5 µm, 300 Å.

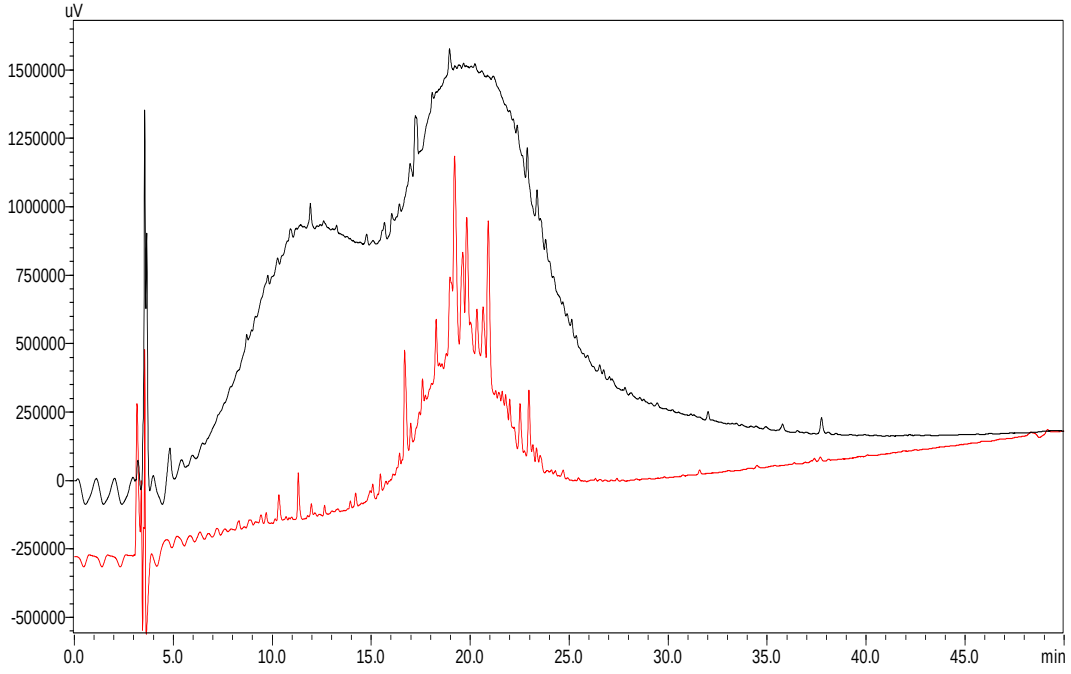
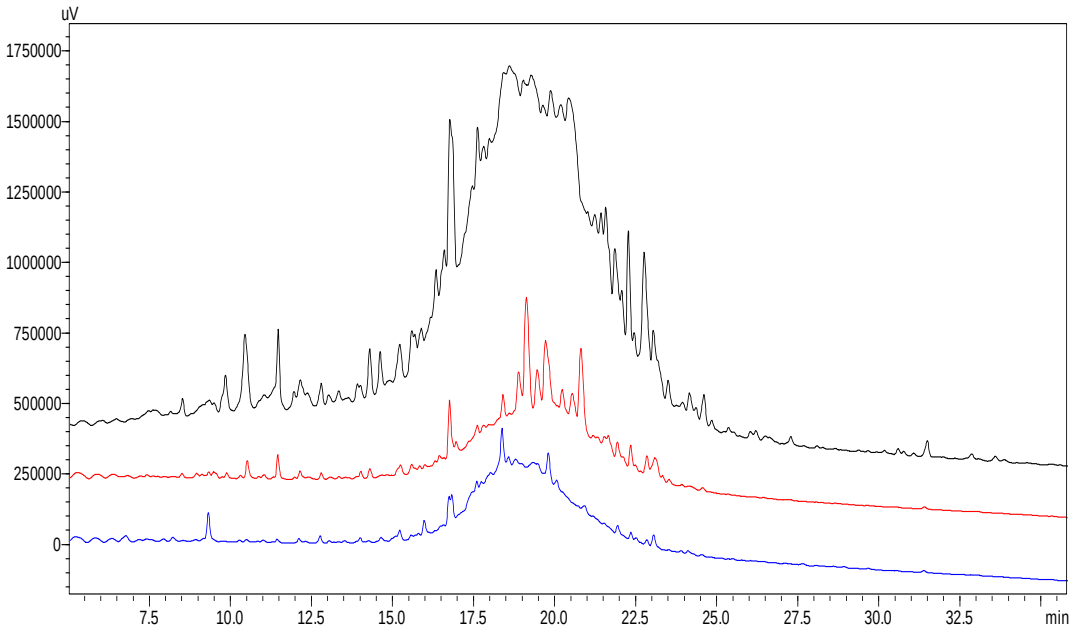


Figura 18 - Cromatogramas das frações AP_C_80_P_F_0 (preto), AP_C_80_P_F_1 (vermelho) e AP_C_80_P_F_2 (azul)
Método: Gradiente 5-100% em 45 min, 1 mL.min^{-1}, 23 ˚C, 220 nm.
Coluna: Kromasil®, C_{18}, 250 x 4,60 mm, 5 µm, 300 Å.



A comparação dos perfis cromatográficos por HPLC-DAD das frações obtidas na filtração, permitiu observar substâncias que eluem na faixa característica dos ciclotídeos (Figura 18), o que foi comprovado por espectrometria de massas (dados não mostrados). No entanto, decidiu-se não as reunir visando aprofundar o estudo.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DE CICLOTÍDEOS POR LC-DAD-ESI-IT-MS

Com o intuito de conhecer o perfil peptídico das frações 80%, obtidas na pré-purificação, e para minimizar os fenômenos de supressão de sinal observados na infusão direta, optou-se por realizar a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, esta última dotada de interface *electrospray* (ESI) e analisador *ion-trap* (IT). A utilização de ionização ESI gera íons de múltiplas cargas, tornando laboriosa a tarefa de identificar cada peptídeo presente. Para identificação das diferentes massas molares presentes em cada amostra, os cromatogramas de pico base (*Base peak chromatogram* = BPC) foram analisados minuto a minuto. Este procedimento de busca dos compostos peptídicos, foi realizado manualmente pela falta de um software específico para tal tipo de análise, e também para que não houvesse dúvidas quanto à deconvolução dos espectros de cada íon. As massas moleculares foram calculadas a partir dos valores *m*/*z* monoisotópicos. Considerou-se como substâncias diferentes aquelas que apresentaram valor de massa molar e tempo de retenção diferindo em ±1 Da e ± 0,5 min, respectivamente. Só foram consideradas íons com intensidade relativa maior que 20%. As massas moleculares foram comparadas com as de ciclotídeos já reportados (http://cybase.org.au) e anotadas quando a diferença foi de ± 0.5 Da.

As análises dos cromatogramas de massas (BPC), de cada uma das frações obtidas da espécie *N. orchidiflora*, permitiram identificar de forma preliminar a presença de 35 substâncias com massas moleculares características de ciclotídeos, ou seja, com massas moleculares entre 2,8 e 3,7 kDa (Tabela 8). Alguns deles só foram identificados em um único órgão, por exemplo, os ciclotídeos com massa molecular 3113,7, 3097,8, 3142,5, 3109,8, e 3110,7 Da encontrados somente na raiz. Por outro lado, o ciclotídeo com massa molecular 3281,5 Da foi identificado nos três órgãos estudados. Essa expressão diferenciada é extremamente interessante no que se refere à função biológica desta classe de produtos naturais. Qualitativamente o órgão com a maior quantidade de

ciclotídeos identificados foi o caule com 24 (68,6% do total), seguidos da folha e raiz com 9 (25,7%) e 16 (45,7%), respectivamente.

Por outro lado, a análise do caule da espécie *A. pyrifolia* permitiu identificar a presença de 48 possíveis ciclotídeos (Tabela 9), ou seja, o dobro dos que foram identificados no caule de *N. orchidiflora*. Uma comparação dos ciclotídeos identificados em ambas as espécies permitiu observar que aproximadamente 90% dos ciclotídeos expressos são únicos para cada espécie, com a única exceção dos ciclotídeos vigno 7, cter 27 e 28 encontrados em ambos táxons. Esta diferença poderia ser explicada desde o ponto de vista taxonômico, ambas pertencem à família Violaceae. No entanto, na classificação intrafamiliar os gêneros *Noisettia* e *Anchietea* não são próximos (PAULA-SOUZA *et al.* 2012). Outra possível explicação seria a diferença nos fatores bióticos e abióticos aos quais os indivíduos encontram-se expostos, assim como a variabilidade geográfica e sazonal.

No total foram anotados 83 possíveis ciclotídeos. É importante salientar que abordagens similares já foram empregadas anteriormente com sucesso na identificação de ciclotídeos (BURMAN *et al.* 2015; HELLINGER *et al.* 2015; RAVIAPATI *et al.* 2017). No entanto, a confirmação definitiva desta classe de substâncias só será possível uma vez concluído o processo de sequenciamento.

Tabela 8 - Possíveis ciclotídeos anotados por LC-ESI-IT-MS no caule, folha e raiz da espécie *N. orchidiflora*. Gradiente linear: 25 a 60% B em 60 min; 60 a 100 % B em 5 min; 100% B por 5 min (A: H_2O/0,1% HCO_2H (v/v); B: $CH_3CN/H_2O/HCO_2H$ 90/10/0,1% (v/v/v). *Massas moleculares mostradas foram calculadas a partir dos valores de *m/z* 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.

t_R (min)	Massa Molecular (Da)*	Folha	Caule	Raiz	Ciclotídeo**
18,0	3414,7		x	x	-
	3576,7		x	x	-
18,8	3252,6		x		vigno 7
	3414,7		x		-
19,9	3156,5		x	x	viphi E, mram 14, DC3
	3410,8		x	x	-
	3572,8		x		-

Tabela 8 - Possíveis ciclotídeos anotados por LC-ESI-IT-MS no caule, folha e raiz da espécie *N. orchidiflora*. Gradiente linear: 25 a 60% B em 60 min; 60 a 100 % B em 5 min; 100% B por 5 min (A: H_2O/0,1% HCO_2H (v/v); B: $CH_3CN/H_2O/HCO_2H$ 90/10/0,1% (v/v/v). *Massas moleculares mostradas foram calculadas a partir dos valores de *m*/*z* 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.

t_R (min)	Massa Molecular (Da)*	Folha	Caule	Raiz	Ciclotídeo**
20,7	3248,5		x	x	cter 27, cter28
	3410,5		x		-
22,0	3152,6		x		vitri A, cicloviolacina O3/O7
22,2	3101,6	x			cter 17, cT26
	3188,7	x			rigra A
22,9	3183,6		x	x	hyfl M, cter 4, kalata B17, poca A
	3345,6		x		phyb L
23,6	3294,6		x	x	glopa G
23,9	3341,7		x	x	-
24,4	3132,6	x			viba 2/26
	3246,5	x			viul L
24,6	3152,7		x		vitri A, cicloviolacina O3/O7
	3179,7		x	x	viba 9, cter 2
	3341,7		x		-
25,2	3443,7		x		-
	3605,6		x		-
26,4	3281,5	x	x	x	circulina B, kB8, caripe 11, nor A
	3443,6		x	x	-
27,1	3332,7	x			-
27,6	3186,7	x			vibi F, mra 14b, mra 29
27,9	3170,9	x	x		viphi A/G, mden I, viba 43
	3332,7	x	x		-
28,4	3170,9	x			viphi A/G, mden I, viba 43
28,7	3171,7	x			vitri peptide 27a, cT32, mela 5, viul E
29,4	3113,7			x	vide A, vdif A, mden E, mra 30
29,6	3153,7	x			cicloviolacina O20
32,2	3097,8			x	cter P, viba 4, hyfl I
41,5	3142,5			x	mden F
43,7	3109,8			x	cter L, rivi 3, vhr 1
44,2	3110,7			x	-

Tabela 9 - Possíveis ciclotídeos anotados por LC-ESI-IT-MS na fração AP_C_80_P_F_0 do caule de *A. pyrifolia*. Gradiente linear: 20 a 45% B em 76 min; 45 a 100 % B em 5 min; 100% B por 5 min (A: H_2O/0,1% HCO_2H (v/v); B: $CH_3CN/H_2O/HCO_2H$ 90/10/0,1% (v/v/v). * As massas moleculares mostradas foram calculadas a partir dos valores de *m*/*z* 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.

t_R (min)	Massa Molecular (Da)*	Ciclotídeo**
33,8	3146,4	-
	3181,5	cicloviolacina O6
34,6	3011,4	-
	3343,5	-
35,1	3011,4	-
	3181,5	cicloviolacina O6
	3197,7	-
37,3	3080,4	cicloviolacina O29, mra 24, caripe 4, kalata B3
38,4	3181,5	cicloviolacina O6
38,8	3127,5	cter H, chassatida C9
39,9	3328,5	-
	3489,6	-
	3135,6	-
41,0	3165,6	cicloviolacina O4, chassatida C3
	3327,6	-
43,3	3473,7	-
	3311,7	-
	3284,7	hyfl E
	3248,7	cter 27, cter 28
44,4	3311,7	-
	3284,7	-
	3262,8	-
	3223,5	-
	3185,4	cter 33
44,6	3149,7	cicloviolacina O17, circulina A
	3311,7	-
	3122,7	cicloviolacina O13
48,5	3207,6	-
	3576,6	-
	3738,6	-

Tabela 9 - Possíveis ciclotídeos anotados por LC-ESI-IT-MS na fração AP_C_80_P_F_0 do caule de *A. pyrifolia*. Gradiente linear: 20 a 45% B em 76 min; 45 a 100 % B em 5 min; 100% B por 5 min (A: H_2O/0,1% HCO_2H (v/v); B: $CH_3CN/H_2O/HCO_2H$ 90/10/0,1% (v/v/v). * As massas moleculares mostradas foram calculadas a partir dos valores de *m*/*z* 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.

Conclusão

t_R (min)	Massa Molecular (Da)*	Ciclotídeo**
49,9	3256,5	-
	3414,9	-
	3576,9	-
51,6	3414,9	-
	3576,9	-
52,8	3252,9	vigno 7
	3414,9	-
55,7	3188,4	-
61,9	3202,5	-
62,5	2902,5	-
	3266,4	-
65,8	3176,4	-
	3218,7	-
	3338,7	-
	3380,7	-
67,1	3014,7	-
	3056,7	cter M
	3176,4	-

4.5 FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DAS FRAÇÕES ENRIQUECIDAS EM PEPTÍDEOS

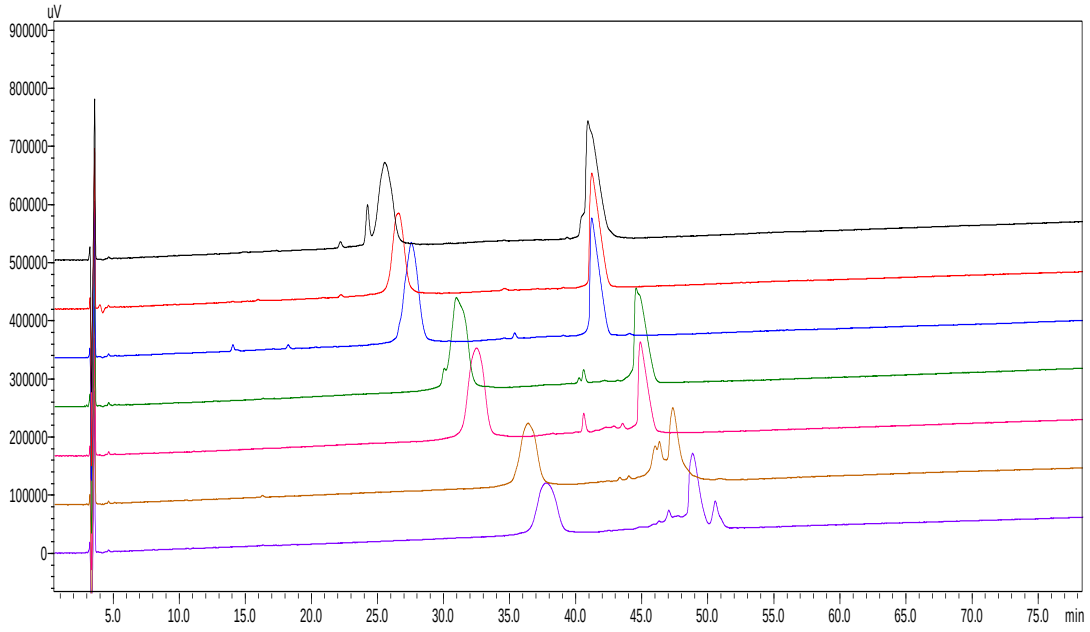
A identificação preliminar de uma grande quantidade de possíveis ciclotídeos, assim como a complexidade mostrada pelas frações peptídicas, nos motivou a prosseguir com o fracionamento das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência. Foram submetidas a este procedimento as frações AP_C_80_P_F_0 (seção 4.5.1), AP_R_80 (seção 4.5.2), NO_R_80 (seção 4.5.3) e NO_F_80 (4.5.4).

4.5.1 Caule de *A. pyrifolia*

A fração AP_C_80_P_F_0 foi fracionada por HPLC-DAD em escala semipreparativa, segundo a metodologia descrita no item 3.4.1 (página 51). As trinta frações obtidas (Apêndice 3) foram analisadas por HPLC-DAD e DI-ESI-(+)-IT-MS (Apêndice 4) com o intuito de reunir aquelas que apresentassem semelhanças.

As frações T_3, T_4, T_5, T_8, T_9, T_{12} e T_{13} destacaram-se pela quantidade de massa contida, assim como pela simplicidade dos perfis cromatográficos (Figura 19) e dos espectros de massas (Figura 20). As frações T_3, T_4, T_8 e T_9 foram reunidas e submetidas a repurificação por HPLC dando lugar ao isolamento das substâncias **1** e **2** (ver seção 3.5.1.1, página 53).

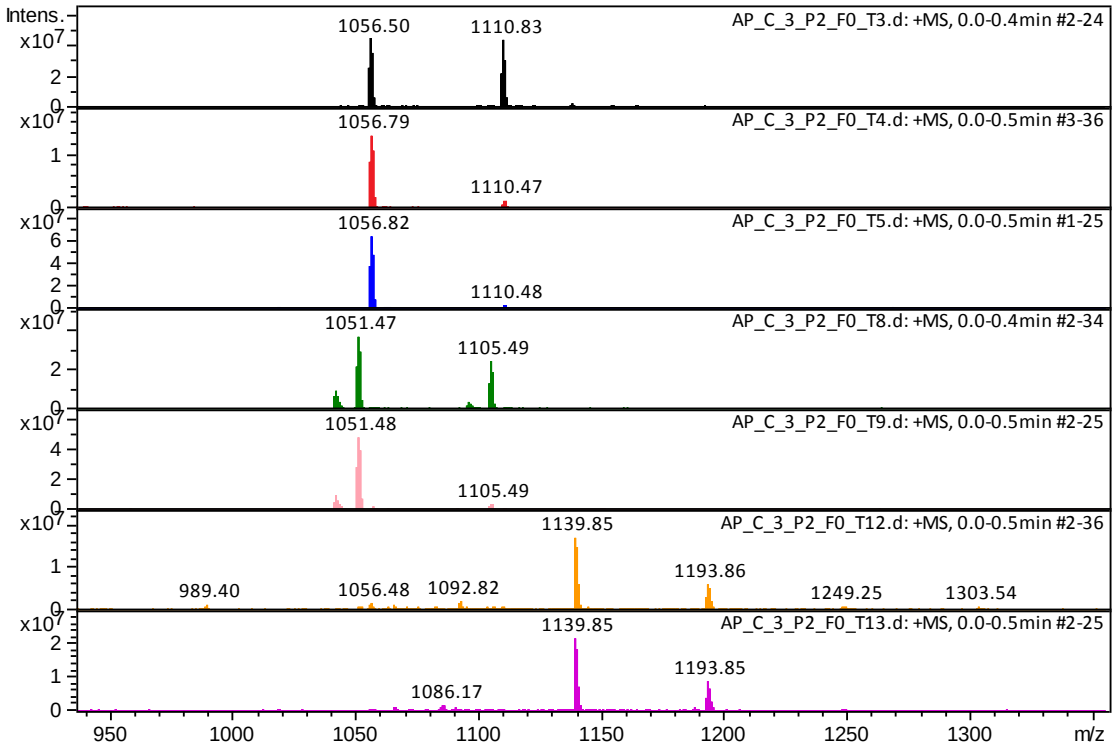
Figura 19 - Perfis cromatográficos das frações T_3 (preto), T_4 (vermelho), T_5 (azul), T_8 (verde), T_9 (rosa), T_{12} (laranja) e T_{13} (roxo)
Método: Gradiente 20-40% em 60 min, 1 $mL.min^{-1}$, 23 ˚C, 220 nm.
Coluna: Kromasil®, 250 x 4,60 mm, C_{18}, 5 µm, 300 Å.



Uma análise minuciosa dos dados obtidos por espectrometria de massas, permitiu observar que muitas das substâncias que compunham as frações apresentavam uma diferença de 162 Da entre si. Este fato já foi reportado anteriormente (BURMAN *et al.* 2015). Nesse estudo eles demostraram que esse acréscimo se devia a uma modificação pós-traducional por uma unidade de hexose (açúcar) que acontece no ciclotídeo. Esse

fenômeno pode ser observado nas frações AP_C_80_P_F_0_T_{12} e AP_C_80_P_F_0_T_{13} (Figura 20), pois nelas existem dois íons majoritários *m/z* 1139,85^{3+} (3416,55 Da) e 1193,85^{3+} (3578,55 Da), que correspondem aos ciclotídeos com/sem modificação pós-traducional, respectivamente.

Figura 20 - Espectros de massas DI-ESI-(+)-IT-MS das frações T_3 (preto), T_4 (vermelho), T_5 (azul), T_8 (verde), T_9 (rosa), T_{12} (laranja) e T_{13} (roxo) na faixa de *m/z* 900-1400. As rações *m/z* mostradas correspondem aos íons triplamente carregados.



4.5.2 Raiz de *A. pyrifolia*

A fração AP_R_80 foi fracionada por HPLC-DAD em escala preparativa, segundo a metodologia descrita (seção 3.4.2, página 52). As dez frações obtidas foram analisadas por HPLC-DAD (Figura 21) e DI-ESI-(+)-IT-MS (Figura 22). As frações F_3, F_5, F_7 e F_{10} ressaltaram pela quantidade de material (ver esquema 3, página 55). Além disso, a relativa simplicidade dos perfis cromatográficos permitiu a repurificação por HPLC em escala semipreparativa dando lugar ao isolamento das substâncias **1**-**5** (ver seção 3.5.1.2, página 54).

Figura 21 - Perfis cromatográficos de AP_R_80 (preto) e das subfrações advindas do seu fracionamento, F_1 (azul), F2 (vermelho), F_3 (laranja), F_4 (verde), F_5 (rosa), F_6 (roxo), F_7 (preto) F_8 (azul claro), F_9 (lilás escuro)e F_{10} (marrom)
Método: Gradiente 5-100% em 45 min, 1 mL.min^{-1}, 23 ˚C, 220 nm.
Coluna: Phenomenex®, 250 x 4,60 mm, C_{18}, 5 µm, 100 Å.

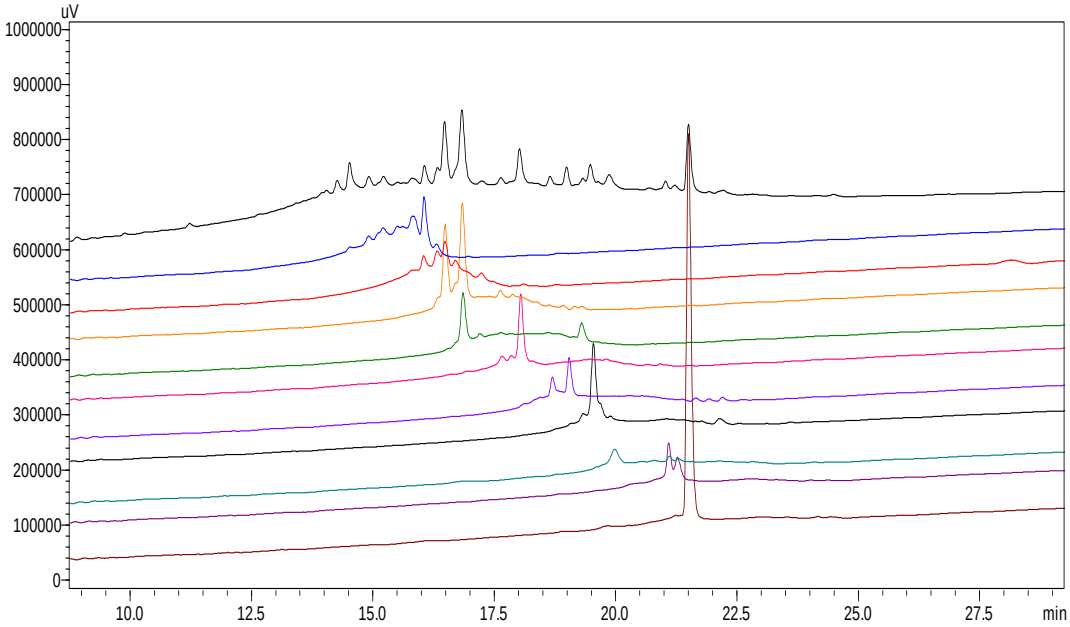
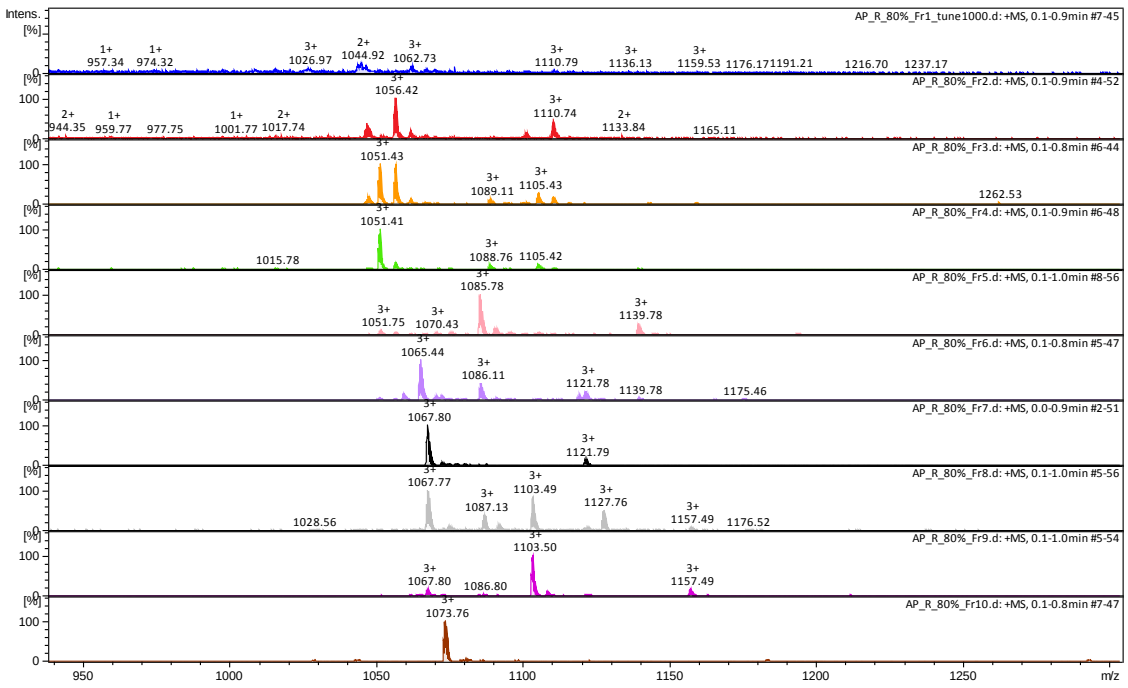


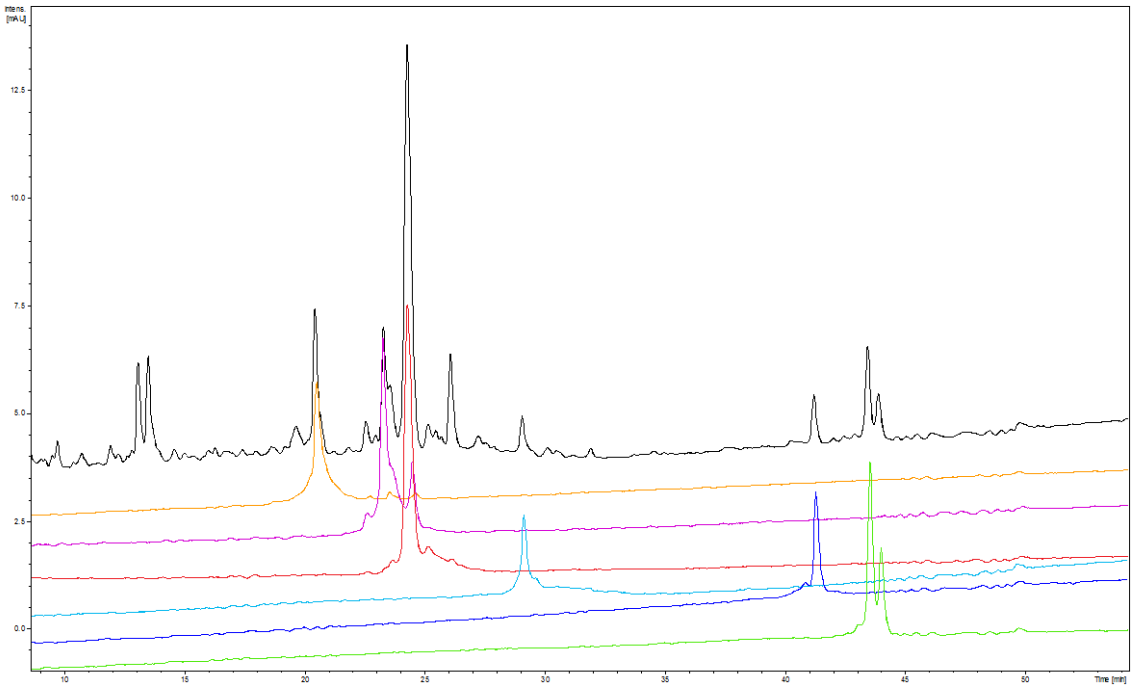
Figura 22 - Espectros de massas DI-ESI-(+)-IT-MS das frações F_1 (azul), F2 (vermelho), F_3 (laranja), F_4 (verde), F_5 (rosa), F_6 (roxo), F_7 (preto) F_8 (cinza), F_9 (lilás escuro)e F_{10} (marrom) na faixa de *m/z* 900-1300. As rações *m/z* mostradas correspondem aos íons triplamente carregados.



4.5.3 Raiz de *N. orchidiflora*

O fracionamento de NO_R_80 foi feito por HPLC-DAD em escala semipreparativa (metodologia descrita na seção 3.4.4, página 51). As subfrações foram analisadas por HPLC-DAD (Figura 23) e LC-ESI-IT-MS (ver seção 4.4). Após a comparação das massas moleculares das substâncias majoritárias, presentes em cada uma delas, com àquelas reportadas nas bases de dados (cybase.org.au, http://aps.unmc.edu/AP/main.php), decidiu-se prosseguir com a purificação das frações F_7, F_8 e F_9, resultando no isolamento de outras quatro substâncias (**7**, **8**, **9** e **10**) (Esquema 5, página 57).

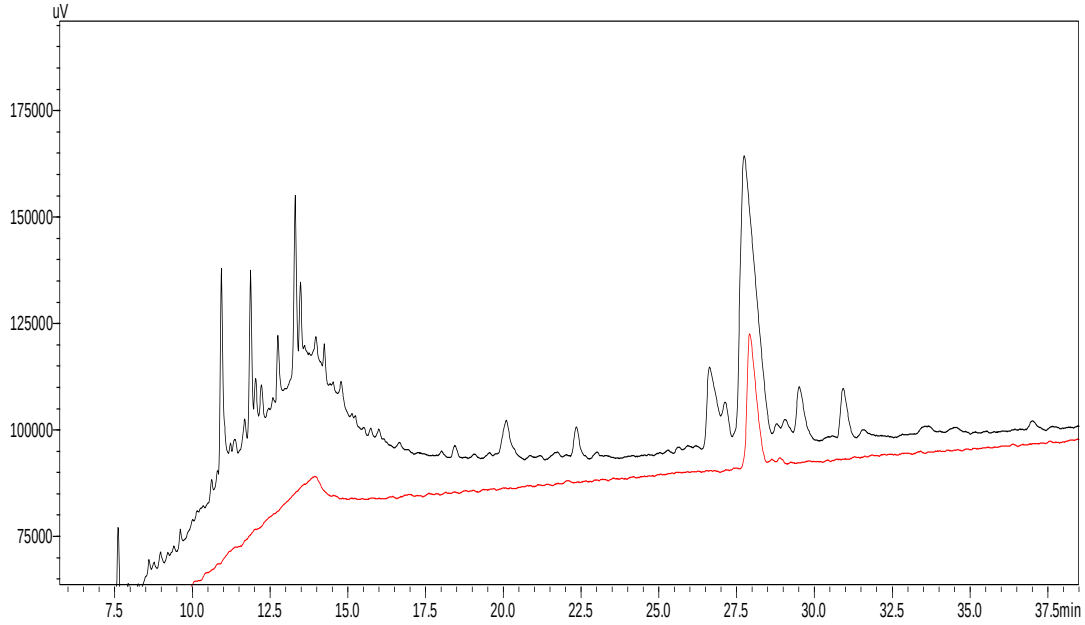
Figura 23 - Perfis cromatográficos de NO_R_80 (preto) e das subfrações advindas do seu fracionamento, F_3 (laranja), F_4 (roxo), F_5 (vermelho), F_7 (azul claro) F_8 (azul) e F_9 (verde).
Método: Gradiente 25-60% em 60 min, 1 mL.min^{-1}, 23 °C, 220 nm.
Coluna: Phenomenex®, 250 x 4,60 mm, C_{18}, 5 µm, 100 Å.



4.5.4 Folha de *N. orchidiflora*

A fração NO_F_80 já tinha sido estudada em um trabalho prévio (BOBEY, 2016). Neste estudo, o fracionamento foi direcionado para o isolamento do ciclotídeo majoritário das folhas, **nor E**, com o intuito de terminar sua elucidação estrutural e avaliar seu potencial biológico. O fracionamento foi realizado por HPLC-DAD em escala semipreparativa (metodologia descrita na seção 3.4.3, página 52). Após reanálise por HPLC-DAD e LC-ESI-IT-MS foi verificado que a subfração NO_F_80_F_{16} continha somente o ciclotídeo **nor E** (substância **6**) (Figura 24). As outras subfrações apresentaram perfis cromatográficos de maior complexidade e pouca quantidade de massa, motivo pelo qual decidiu-se não prosseguir com seu processo de purificação.

Figura 24 - Perfis cromatográficos de NO_F_80 (preto) e da subfração NO_F_80_F_{16} (vermelho) advinda do seu fracionamento.
Método: Gradiente 5-34% em 10 min, 34-41% em 28 min, 1 mL.min^{-1}, 55 °C, 220 nm.
Coluna: Kromasil®, 250 x 4,60 mm, C_{18}, 5 µm, 300 Å.



4.6 SEQUENCIAMENTO *DE NOVO* DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

A caracterização estrutural (sequenciamento *de novo*) das substâncias isoladas foi feita por espectrometria de massas MALDI-TOF (item 3.6.3, página 58) com auxílio das reações de redução, alquilação e digestão enzimática empregando três enzimas com finalidades distintas: a endoGlu-C, cliva especificamente pelo extremo C-terminal do resíduo de ácido glutâmico (Glu, E); a tripsina, cliva os extremos C-terminais dos resíduos de lisina (Lys, K) e arginina (Arg, R) e a quimiotripsina, cliva pelo extremo C-terminal dos aminoácidos aromáticos triptofano (Trp, W), fenilalanina (Phe, F) e tirosina (Tyr, Y) assim como os aminoácidos apolares metionina (Met, M) e leucina (Leu, L) sempre que eles não estejam ligados a prolina (Pro, P). O produto da digestão de cada enzima foi analisado por espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS) o qual permitiu identificar os fragmentos oriundos de cada uma delas. A reanálise desses fragmentos por espectrometria de massas sequencial (MALDI-TOF-MS/MS) permitiu estabelecer a sequência da estrutura primária verificando a existência de íons oriundos de C-terminal (íons -*y*) e N-terminal (íons -*b*). A união das informações proporcionadas por cada enzima possibilitou o sequenciamento do ciclotídeo. A atribuição dos espectros de massa foi realizada por meio do código de uma letra (convênio internacional) que representa cada um dos aminoácidos presentes na estrutura do peptídeo.

Outra técnica empregada foi a análise de aminoácidos (item 3.6.4, página 59) que permitiu a detecção qualitativa, assim como a quantificação dos resíduos de aminoácidos presentes em cada peptídeo, cujo intuito principal foi a diferenciação dos resíduos isóbaros leucina e isoleucina.

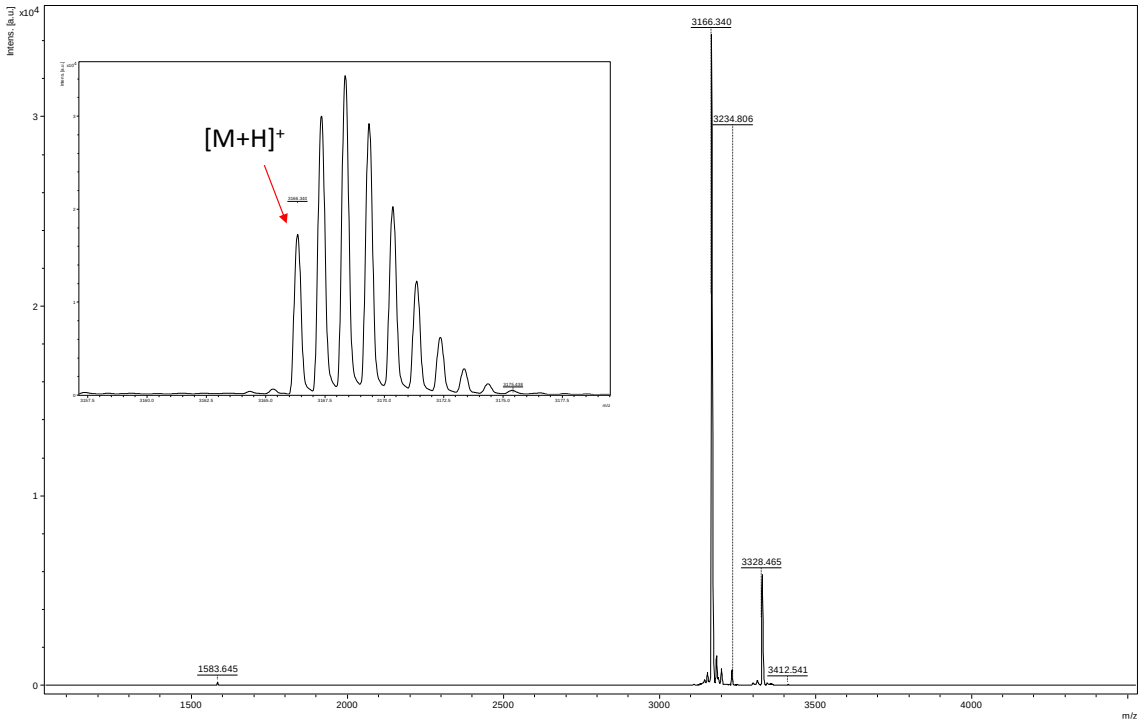
4.6.1 Sequenciamento das substâncias obtidas da espécie *A. pyrifolia*

Nesta seção será descrito o sequenciamento das substâncias **1**-**5**, isoladas das raízes e do caule da espécie *A. pyrifolia* (Violaceae). Dos cinco ciclotídeos sequenciados dois são inéditos: apy A (**3**) e apy B (**4**); e três conhecidos: cyO4 (**1**), cyO17 (**2**) e cter 15 (**5**).

4.6.1.1 Sequenciamento da substância **1**

A substância **1** foi obtida como um sólido branco (ver seção 3.5.1.1). Sua pureza foi comprovada por HPLC-DAD. Seu espectro de massas apresentou um íon *m*/*z* 3166,340, $[M+H]^+$ (Figura 25). A redução das três ligações dissulfeto e acetamidação (alquilação) foram confirmadas por meio do acréscimo de 348 Da (íon *m*/z 3514,6), este experimento permitiu comprovar a presença de seis resíduos de cisteína (Apêndice 5).

Figura 25 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **1**.



A fração digerida com endoGlu-C apresentou um íon *m*/*z* 3530,840 referente à abertura do anel pelo extremo C-terminal do resíduo de ácido glutâmico (Glu, E), característico do *loop* 1 dos ciclotídeos. O espectro de massas MS/MS deste íon permitiu propor a sequência SCVWXPCXSSAXGCSCKNKVCYRNGXPCGE (Figura 26, tabela 10). A letra X é colocada para representar os resíduos isóbaros leucina (Leu, L) e isoleucina (Ile, I) quando não é possível sua diferenciação.

A fração digerida com tripsina apresentou os íons *m*/*z* 839,477 e 1081,822. Os espectros MS/MS destes íons permitiram a identificação das sequências parciais NKVCYR (Figura 27) e XSSAXGCSCK, respectivamente (Tabela 10).

A enzima quimiotripsina foi empregada para diferenciar leucina (Leu, L) de isoleucina (Ile, I). No espectro de massas MALDI-TOF-MS da substância **1** digerida foi observado o íon *m*/z 1434,686. O espectro de massas MALDI-TOF-MS/MS deste íon mostrou-se indispensável no sequenciamento, pois, por meio dele, obteve-se informações sobre a sequência de aminoácidos dos *loops* 6, 1 e parte do 2.

O resíduo da posição 2 (**X**^{2}) não foi determinado devido à presença da prolina (**P**^{3}) ligado a ele (RNG**X**^{2}**P**^{3}CGESCVW) (Tabela 10, Figura 28). No entanto, o objetivo fundamental para o emprego desta enzima não foi atingido, pois não foi possível obter informações sobre os resíduos de leucina e isoleucina do *loop* 3 que são os que não estão ligados a prolina (grifados em verde na tabela 10). As posições dos aminoácidos são atribuídas/numeradas com base no ponto de ciclização, geneticamente estabelecido. Assim, neste caso, a posição 1 é tida na glicina do *loop* 6.

Figura 26 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 3530,840, obtido após digestão com endoGlu-C da substância **1**. Os valores de *m*/*z* mostrados são monoisotópicos.

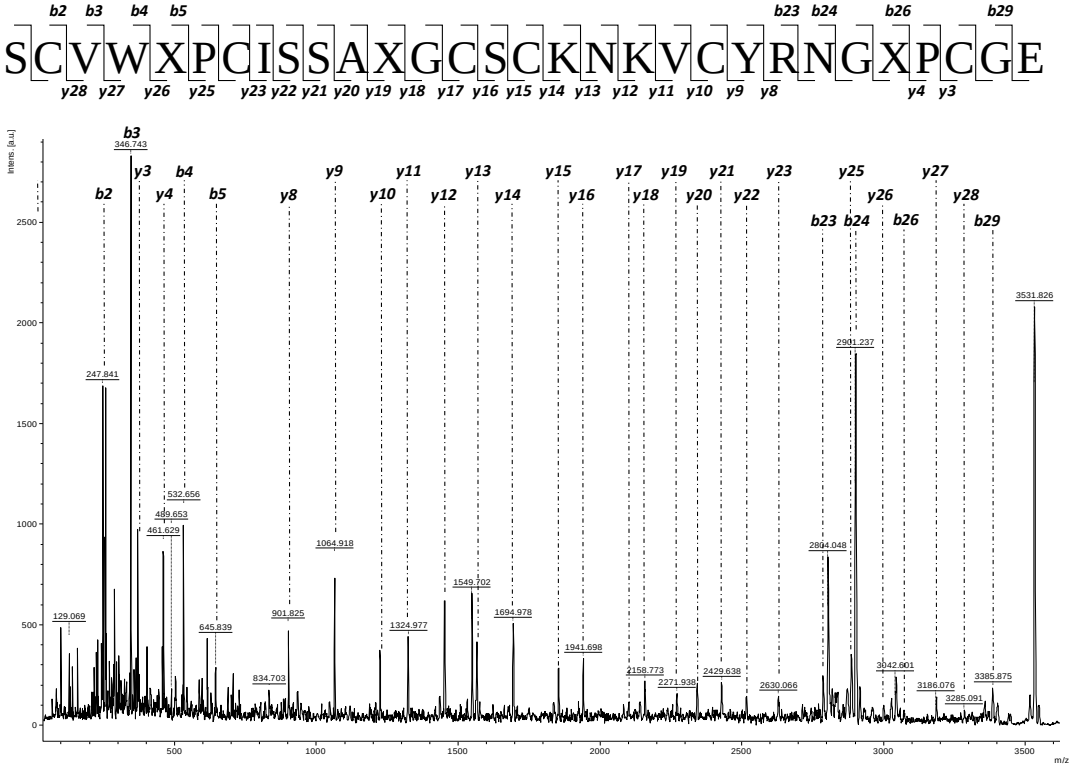
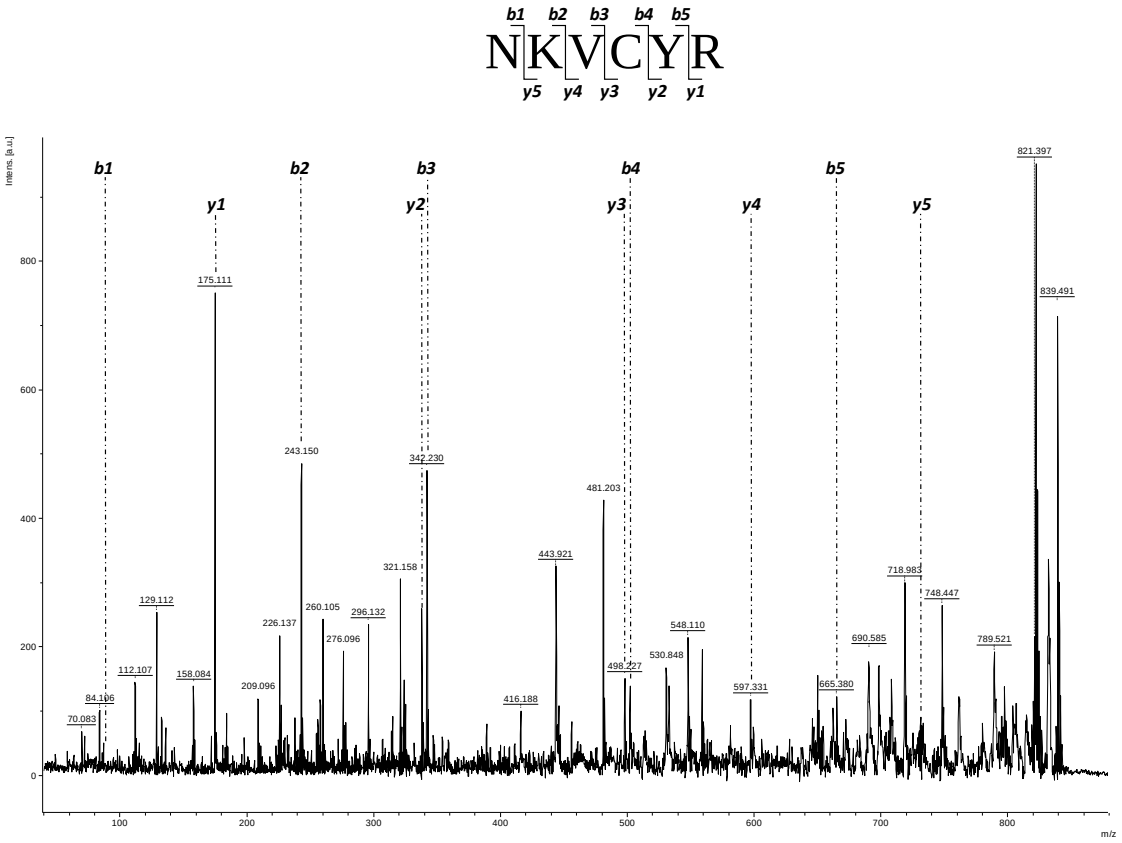
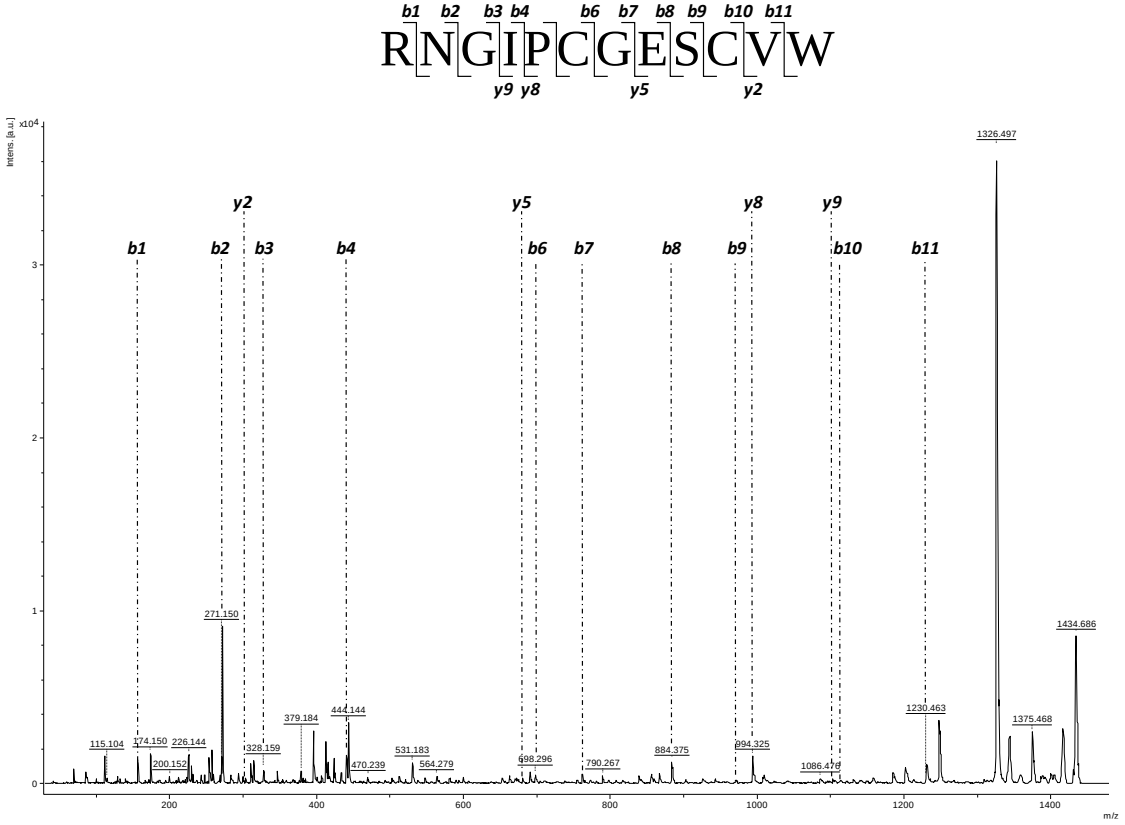


Figura 27 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 839,491, obtido após digestão enzimática da substância **1** com tripsina. Os valores de *m*/*z* mostrados são monoisotópicos.



Uma vez concluída a etapa de sequenciamento ainda não era possível conhecer a natureza dos resíduos das posições 2, 11, 14 e 18 (Tabela 10, grifados em verde e amarelo). Diante disto, foi necessário realizar a técnica de análise de aminoácidos. A substância foi tratada seguindo as especificações descritas na seção 3.6.4 (página 59) e o aminograma gerado permitiu confirmar qualitativamente a maior parte dos aminoácidos identificados pela análise de espectrometria de massas. Além disso, foi possível quantificá-los, conforme a tabela 11. É importante ressaltar que o método de hidrólise empregado, utilizando-se ácido clorídrico 6 mol.L^{-1} e 110 ˚C, promove a destruição parcial ou total de alguns dos aminoácidos, especialmente de cisteína, metionina e triptofano (BERNARDI *et al.* 2003). Isto permite explicar a ausência do sinal correspondente às cisteínas. No entanto, o intuito principal para utilizar essa técnica foi atingido, uma vez que permitiu determinar a presença de quatro resíduos de isoleucina e nenhum resíduo de leucina (Tabela 11).

Figura 28 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/z 1434,686, obtido após digestão enzimática da substância **1** com quimiotripsina. Os valores de *m*/*z* mostrados são monoisotópicos.



A junção dos resultados obtidos pelas duas técnicas permitiu determinar que a substância **1** é um ciclotídeo com 30 resíduos de aminoácidos, entre eles os seis resíduos de cisteína, responsáveis pela formação das três ligações dissulfeto, que formam parte do arranjo conhecido como nó de cistina cíclico (CRAIK *et al.* 1999). Na figura 29 apresenta-se a estrutura "*collier de perles*" gerada com a ferramenta da base de dados Cybase que facilita observar o arranjo CCK na estrutura primária. A ordem de conectividade das cisteínas (C_I-C_{IV}, C_{II}-C_V e C_{III}-C_{VI}) foi determinada por homologia com estruturas descritas na literatura (IRELAND *et al.* 2010).

Observando os resíduos presentes em seu *loop 5*, nota-se ausência de um resíduo de prolina precedida por triptofano, que é altamente conservada no ciclotídeos tipo Möbius, fato que permite classificá-lo como pertencente à subfamília dos braceletes.

Tabela 10 - 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).

Enzima	*m/z*	Sequência					
EndoGlu-C	3530,840	-S-C-V-W-X-P-C-X-S-S-A-X-G-C-S-C-K-N-K-V-C-Y-					
Tripsina	1081,822	-X-S-S-A-X-G-C-S-C-K-					
Tripsina	839,477	-N-K-V-C-Y-R-					
Quimiotripsina	1434,618	C-G-E-S-C-V-W-					-R-N-G-X-P
Sequência final		C-G-E-S-C-V-W-X-P-C-X-S-S-A-X-G-C-S-C-K-N-K-V-C-Y-R-N-G-X-P					
Loop		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

Tabela 11- 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).

Aminoácido	Símbolo	Anal. Aminoácidos	Sequenciamento
Asparagina/aspartato	Asn (N)/Asp(D)	2,0	2N
Valina	Val (V)	2,1	2
Glicina	Gly (G)	2,8	3
Glutamato/glutamina	Glu (E)/Gln(Q)	1,0	1E
Serina	Ser (S)	4,8	4
Tirosina	Tyr (Y)	2,1	1
Alanina	Ala (A)	1,0	1
Leucina	Leu (L)	0	-*
Isoleucina	Ile (I)	3,9	-*
Prolina	Pro (P)	1,9	2
Lisina	Lys (K)	n.d	2
Arginina	Arg (R)	n.d	1
Cisteína	Cys (C)	n.d	6
Triptofano	Trp W()	n.d	1

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020
Legenda: n.d não detectado

A busca nas bases de dados (cybase.org.au, Scifinder®, Web of Science®, Scopus®) mostrou dois ciclotídeos com a mesma massa molecular da substância **1**, a cicloviolacina O4 e o chassatida C3, que possuem como única diferença um resíduo de isoleucina e leucina, respectivamente, na posição 18 do *loop* 3 (Tabela 12, grifado em amarelo). Tendo em consideração os resultados, antes expostos, evidenciou-se que a substância **1** é a cicloviolacina O4 (Tabela 12). Este ciclotídeo foi isolado pela primeira vez da espécie *Viola odorata* (Violaceae) (IRELAND *et al.* 2006a), e recentemente foi reportada sua atividade citotóxica e de inibição da migração celular (ensaio *Wound-healing*) contra linhagem triplo negativo de câncer de mama (MDA-MB-231) (PINTO *et al.* 2018). Mesmo

sendo um ciclotídeo conhecido, este é o primeiro relato de um ciclotídeo sequenciado no gênero *Anchietea*. Anteriormente os ciclotídeos só tinham sido isolados e caracterizados em 10 dos 26 gêneros da família Violaceae (*Allexis, Leonia*, *Gloeospermum*, *Orthion*, *Viola*, *Melicytus*, *Rinorea*, *Hybanthus*, *Pombalia* e *Noisettia*) (BURMAN *et al.* 2015; PINTO *et al.* 2018; BOBEY *et al.* 2018; ZONDEGOUMBA *et al.* 2019), com isso este resultado faz uma contribuição sobre a distribuição taxonômica desta interessante classe de ciclopeptídeos vegetais.

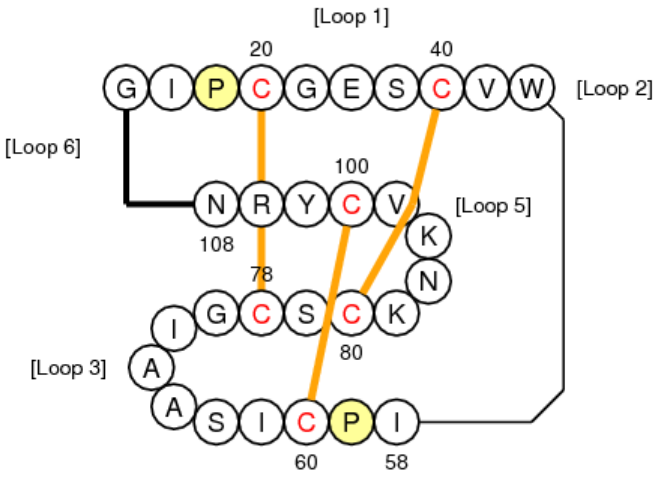
Tabela 12 - Comparação das sequências dos ciclotídeos cicloviolacina O4 e chassatida C3. * Táxons onde foram isolados pela primeira vez.

Ciclotídeo	M.M (Da)	Táxon*	Sequência
cicloviolacina O4	3165,38	Violaceae	CGESCVWIPCISSAIGCSCKNKVCYRNGIP
chassatida C3	3165,38	Rubiaceae	CGESCVWIPCISSALGCSCKNKVCYRNGIP

Legenda: M.M massa molecular

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

Figura 29 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo cicloviolacina O4 (**1**).



Fonte: Molécula desenhada *online* no *site* Cybase. (WANG *et al.* 2008a)

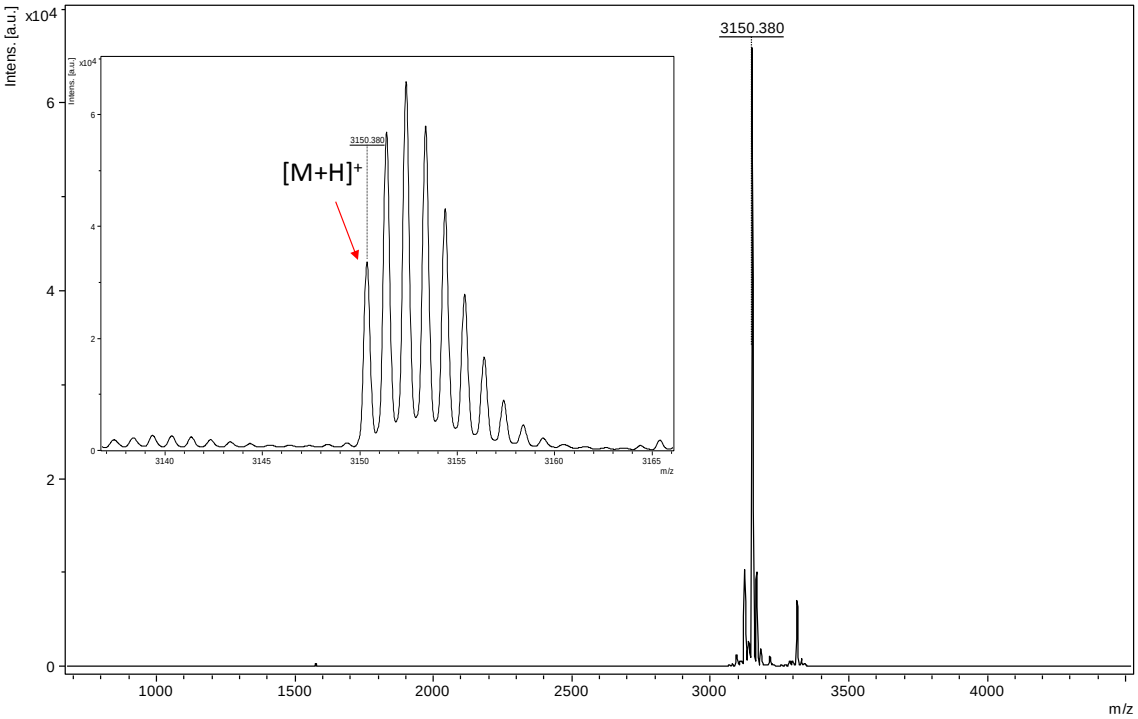
4.6.1.2 Sequenciamento da substância **2**

A substância **2** foi elucidada seguindo os mesmos procedimentos descritos para a substância **1** (seção 4.6.1.1). Seu espectro de massas apresentou um íon *m*/*z* 3150,362, correspondente à molécula protonada, $[M+H]^+$ (Figura 30). Uma vez concluída a reação de redução e alquilação, foi possível conferir por espectrometria de massas o acréscimo

de 348 Da que confirma a presença dos seis resíduos de cisteína característicos dos ciclotídeos (Apêndice 6, página 152).

Para o sequenciamento, as digestões com as três enzimas foram analisadas, conforme discutido na seção 4.6.1.1. O produto da digestão de cada enzima foi analisado por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF. Isto permitiu identificar os fragmentos oriundos de cada uma delas. A reanálise desses fragmentos por MS/MS permitiu estabelecer a sequência de aminoácidos (Figuras 31, 32 e 33). A união das informações proporcionadas por cada enzima possibilitou sequenciar a estrutura primária do ciclotídeo (Tabela 13). Os resíduos de leucina e isoleucina foram identificados através da análise de aminoácidos, sendo possível desta forma determinar que a substância **2** têm quatro resíduos de isoleucina e não possui leucinas, mesmo comportamento observado para a substância **1** (Tabela 11, Figura 29).

Figura 30 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **2**.



As análises anteriores corroboraram que a substância **2** trata-se de um ciclotídeo da subfamília dos braceletes, com 30 resíduos de aminoácidos (Figura 34) e massa molecular 3149,38 Da. A busca na base de dados Cybase (www.cybase.org.au) (WANG *et al.* 2008a) mostrou dois ciclotídeos com a mesma massa molecular, cicloviolacina

O17, predito da *Viola odorata* (Violaceae) (IRELAND *et al.* 2006a) e a circulina A, isolada da *Chassalia parvifolia* (Rubiaceae) (GUSTAFSON *et al.* 1994). A comparação das sequências de aminoácidos (Tabela 14) mostrou que a única diferença entre a cicloviolacina O17 e circulina A é a presença de um resíduo de isoleucina e leucina na posição 18 do *loop* 3, respectivamente (Tabela 14, grifados em amarelo). Após comparação é possível afirmar que a substância **2** é a cicloviolacina O17.

Figura 31 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/z 3514,853, obtido após digestão enzimática da substância **2** com endoGlu-C. Os valores de *m*/*z* mostrados são monoisotópicos.

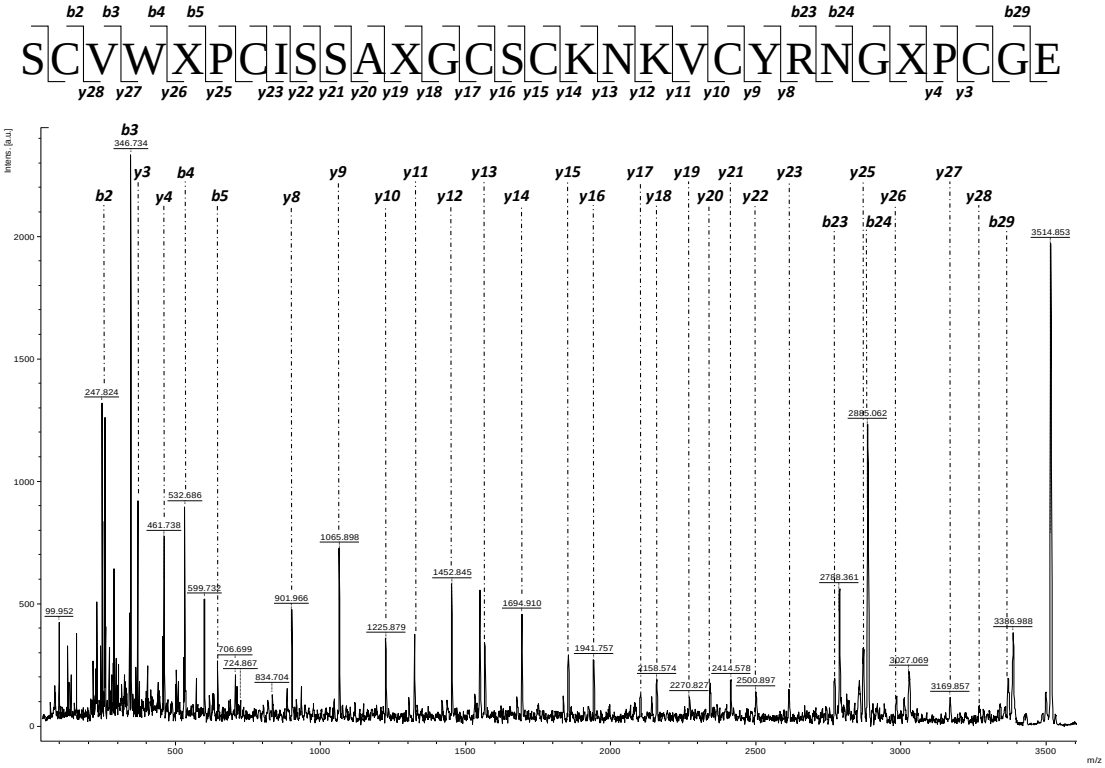


Figura 32 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 2696,237, obtido após digestão enzimática da substância **2** com tripsina. Os valores de *m*/*z* mostrados são monoisotópicos.

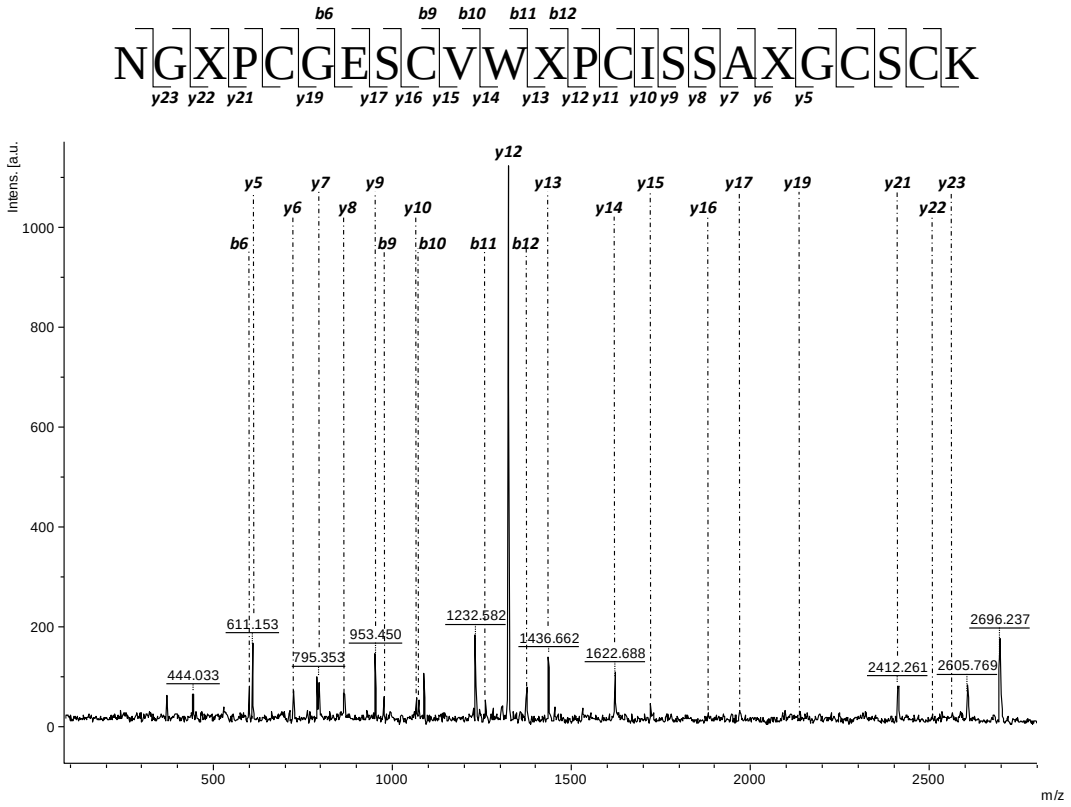


Figura 33 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 1434,686, obtido após digestão enzimática da substância **2** com quimiotripsina. Os valores de *m*/*z* mostrados são monoisotópicos.

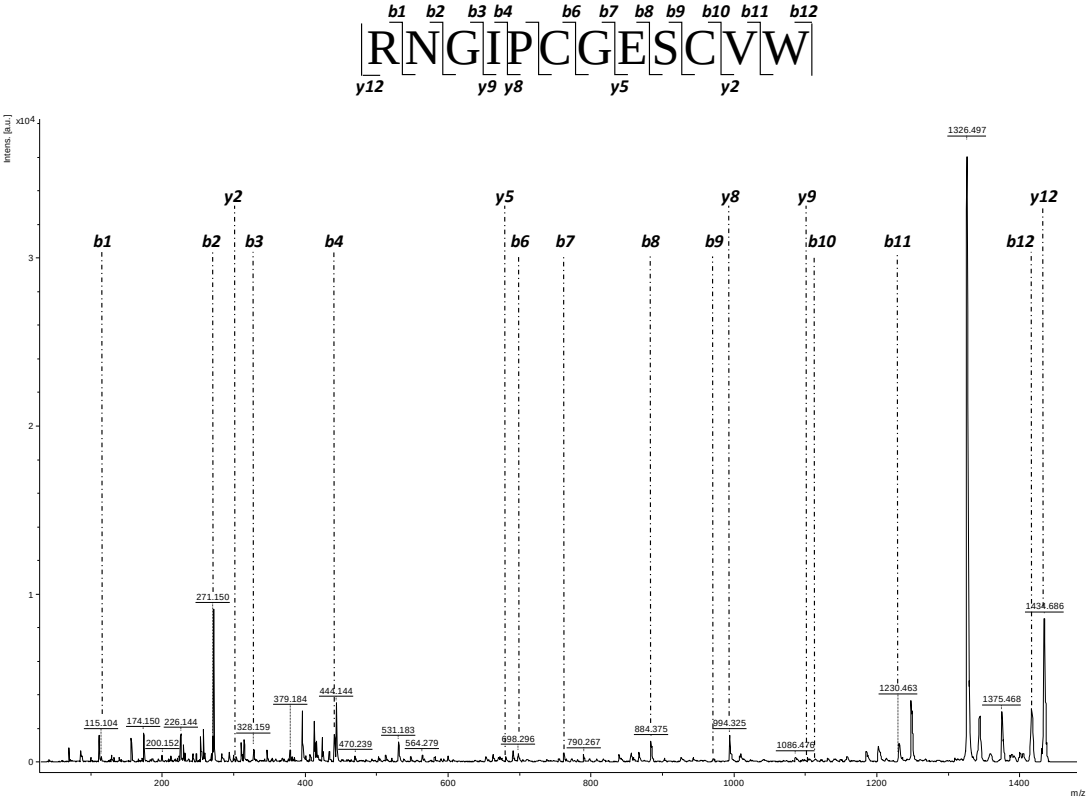


Tabela 13 - Sequências de aminoácidos identificados por MALDI-TOF-MS/MS nos fragmentos da digestão enzimática da substância **2**. A letra X representa os resíduos isóbaros Ile/Leu que não foram determinados através do sequenciamento *de novo*.

Enzima	*m/z*	Sequência						
EndoGlu-C	3514,853	-S-C-V-W-X-P-C-X-S-A-A-X-G-C-S-C-K-N-K-V-C-Y-R-						
Tripsina	1065,829			-X-S-A-A-X-G-C-S-C-K-				
Tripsina	2696,237	C-G-E-S-C-V-W-X-P-C-X-S-A-A-X-G-C-S-C-K-						-N-G-X-P
Quimiotripsina	1434,686	C-G-E-S-C-V-W-						-R-N-G-X-P
Quimiotripsina	1058,520					-S-C-K-N-K-V-C-Y-		
Quimiotripsina	811,433					-K-N-K-V-C-Y-		
Sequência final		C-G-E-S-C-V-W-X-P-C-X-S-A-A-X-G-C-S-C-K-N-K-V-C-Y-R-N-G-X-P						
Loop		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	

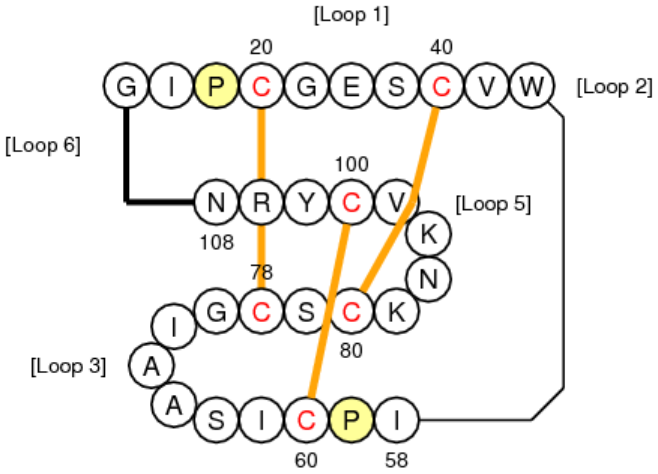
Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

Tabela 14 - 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 *de novo*.

Ciclotídeo	M.M (Da)	Sequência
cicloviolacina O17	3149,38	CGESCVWIPCISAAIGCSCKNKVCYRNGIP
Substância **2**	3149,38	CGESCVWIPCISAAIGCSCKNKVCYRNGIP
circulina A	3149,38	CGESCVWIPCISAALGCSCKNKVCYRNGIP

Legenda: M.M massa molecular
Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

Figura 34 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo cicloviolacina O17 (**2**).



Fonte: Molécula desenhada *online* no *site* Cybase (WANG *et al.* 2008a)

Uma comparação das sequências de aminoácidos das substâncias **1** (cicloviolacina O4) e **2** (cicloviolacina O17) permite observar que a diferença entre elas

é a presença de um resíduo de serina e alanina na posição 16 do *loop* 3, respectivamente (Tabela 15, grifados em azul).

Tabela 15 - Comparação das sequências de aminoácidos dos ciclotídeos cicloviolacina O4 (**1**) e O17 (**2**), ressaltando em azul a única diferença entre elas.

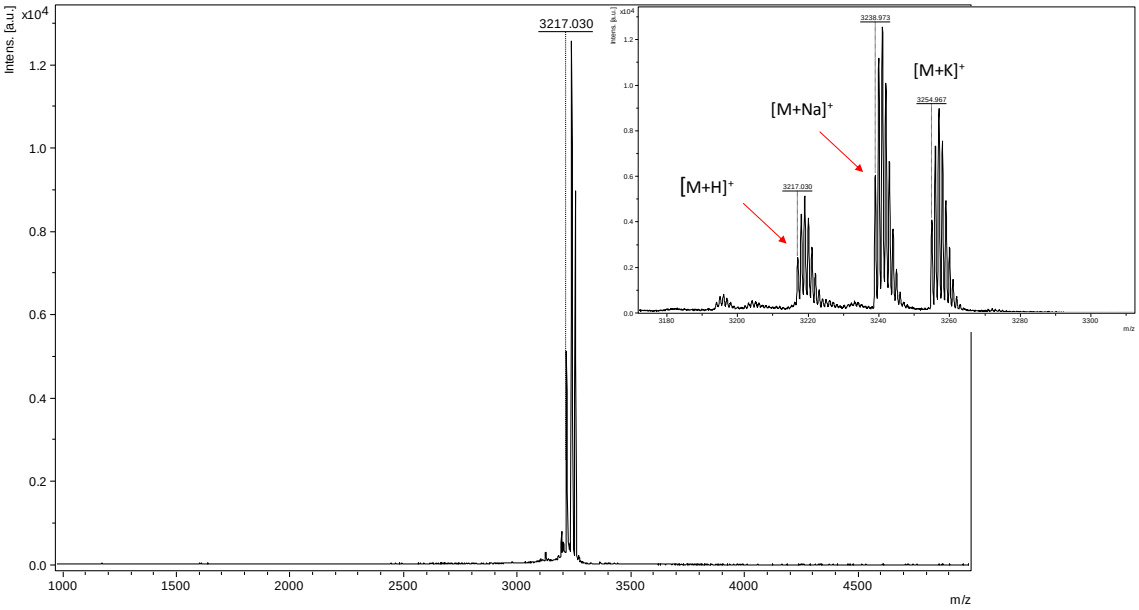
Ciclotídeo	M.M (Da)	Sequência
cicloviolacina O4	3165,38	CGESCVWIPCISSAIGCSCKNKVCYRNGIP
cicloviolacina O17	3149,38	CGESCVWIPCISAAIGCSCKNKVCYRNGIP

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020
Legenda: M.M massa molecular

4.6.1.3 Sequenciamento da substância **3**

A substância **3** foi isolada como um sólido branco das raízes da espécie *A. pyrifolia*, e seu espectro HPLC-DAD mostrou a presença de um único pico. A análise por espectrometria de massas MALDI-TOF, permitiu observar o íon correspondente à molécula protonada, *m*/*z* 3217,030 (Figura 35). Após as reações de redução e alquilação, foi observado no espectro de massas um acréscimo de 348 Da, íon *m*/*z* 3565,856 (Apêndice 7, página 153). Uma vez concluída esta etapa, a substância **3** foi submetida separadamente a digestão enzimática com endoproteinase Glu-C, tripsina e quimiotripsina.

Figura 35 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **3**



A clivagem pelo extremo C-terminal do resíduo de ácido glutâmico (Glu, E), caractere-stico da endoGlu-C em pH 8,3, resultou no íon *m*/*z* 3583,021. A análise deste íon por espectrometria de massas sequencial permitiu propor a sequência SCVWXPCXSGXXGCSCSNKVCYYNGSVPCGE (Figura 36). A letra X representa os resíduos isóbaros leucina/isoleucina (Leu/Ile). A análise da substância **3** digerida com tripsina permitiu a identificação da sequência VCYYNGSVPCGESCVWXPCXSGXXGCSCSNK a partir do íon *m*/*z* 3583,011 (Figure 37). A junção das informações obtidas a partir destas duas enzimas demonstrou a presença de um ciclotídeo com 31 resíduos de aminoácidos pertencente à subfamília dos braceletes.

Figura 36 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 3583,021, oriundo da digestão com endoGlu-C da substância **3**. Os íons -*b* e -*y* estão atribuídos. As massas mostradas são monoisotópicas.

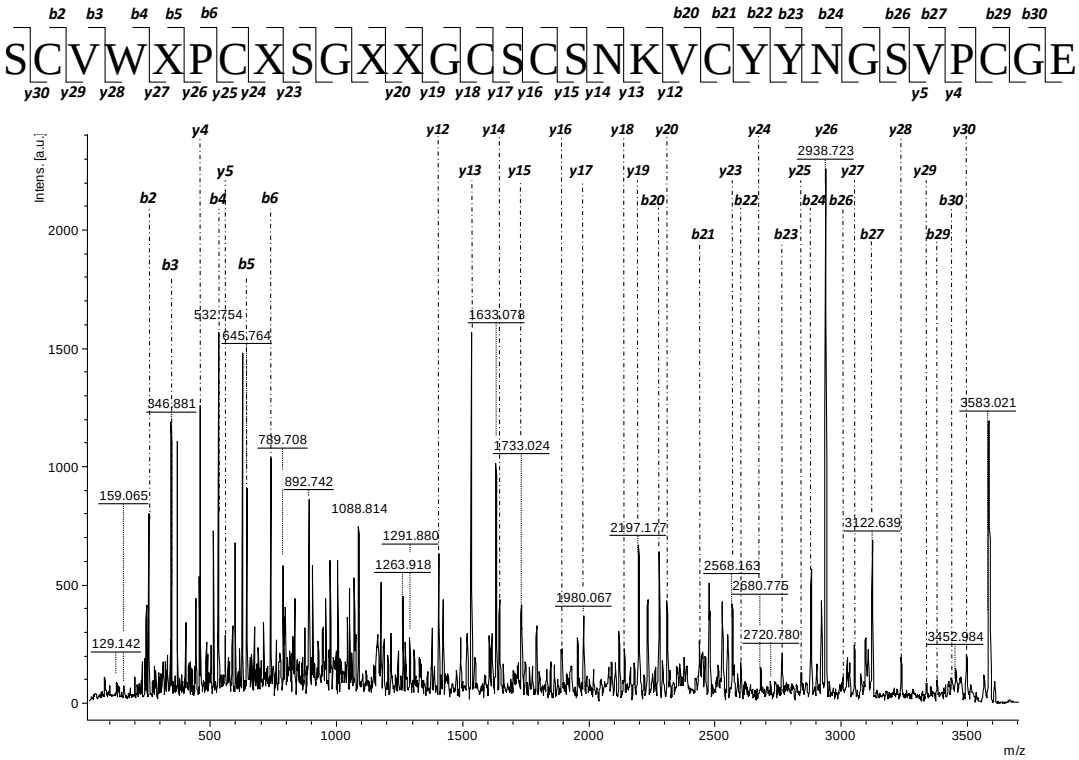
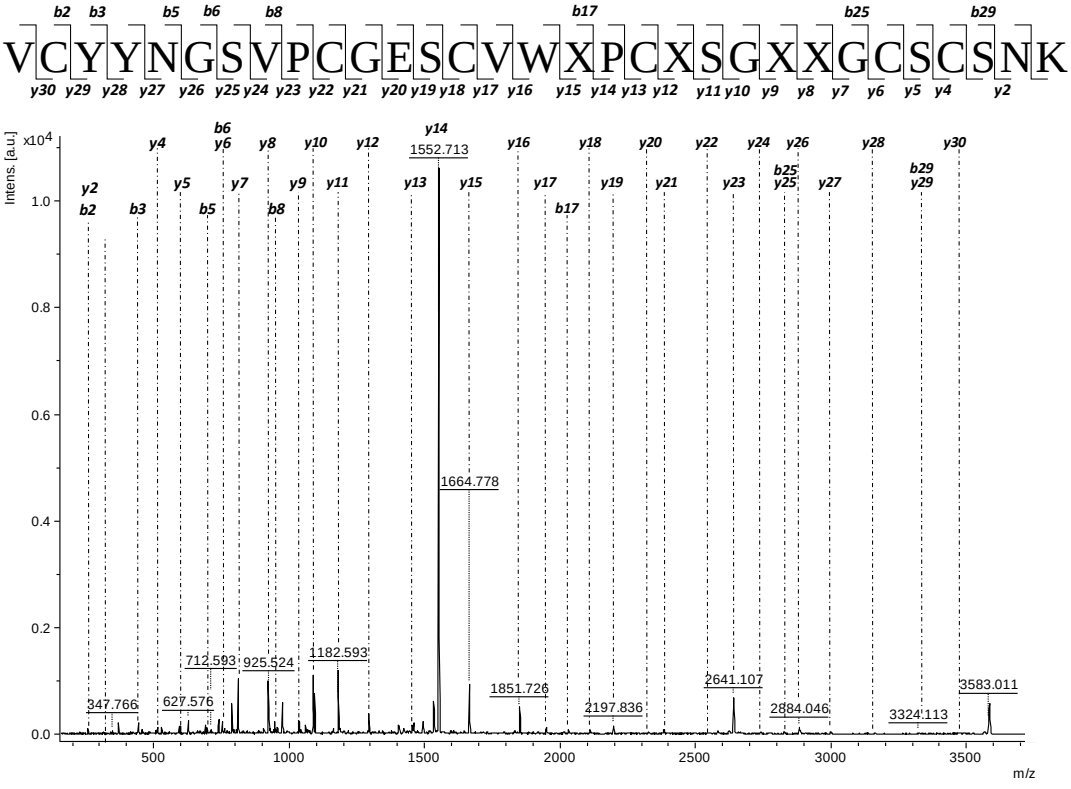
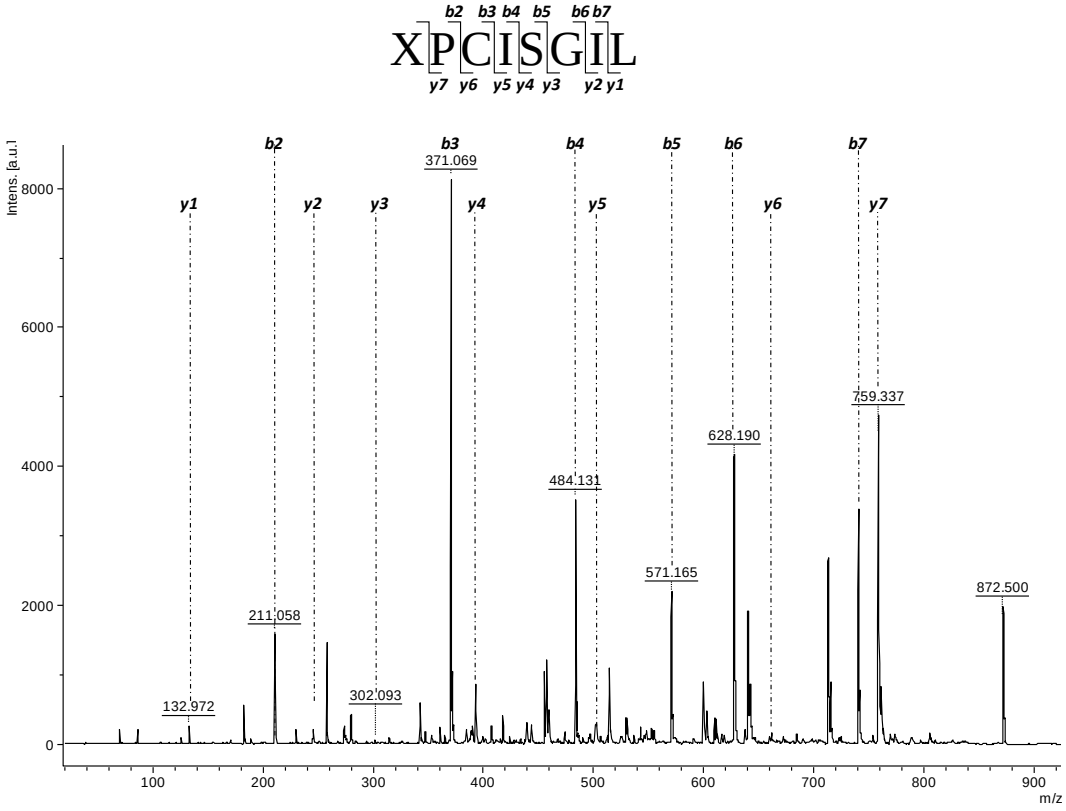


Figura 37 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 3583,011, advindo da digestão com tripsina da substância **3**. Os íons -*b* e -*y* estão atribuídos. As massas mostradas são monoisotópicas.



No entanto, não tínhamos nenhuma informação sobre a identidade dos 4 resíduos isóbaros presentes. A técnica de análise de aminoácidos nos auxiliou neste sentido, e revelou a presença de uma leucina e três isoleucinas (Tabela 17). Para determinar as posições destes resíduos, a digestão com quimiotripsina mostrou-se imprescindível, já que cliva as ligações peptídicas pelo extremo C-terminal dos resíduos de leucina. Uma análise detalhada da estrutura primária da substância **3** demonstra que existem três sítios de clivagem teóricos, todos eles no *loop 3* (**X**^{15}, **X**^{18} e **X**^{19}). A análise de espectrometria de massas sequencial do íon *m*/*z* 872,127, advindo da digestão com quimiotripsina, identificou a sequência XPC**I**^{15}SG**I**^{18}**L**^{19} (Figura 38). O quarto resíduo isóbaro (**I**^{12}, *Loop 2*) foi determinado através da junção dos resultados do sequenciamento e da análise de aminoácidos.

Figura 38 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 872,500 oriundo da digestão com quimiotripsina da substância **3**. Os valores *m*/*z* mostrados são monoisotópicos.



Após determinar a sequência peptídica, foi realizado um alinhamento da sequência com a ferramenta BlastP (NCBI). A busca comprovou que a substância **3** apresenta 90% de homologia com o vitri peptídeo 2, isolado da espécie *Viola tricolor* (Violaceae) (HELLINGER *et al.* 2015) (Tabela 18). Além do BlastP, a sequência foi

submetida a buscas no Cybase (http://cybase.org.au) e *The Antimicrobial Peptide Database* (APD) (http://aps.unmc.edu/AP/main.php) (WANG; WANG, 2004) que também corroboram com a ausência desta sequência. Todos os dados mostrados anteriormente nos permitiram chegar à conclusão da presença de um ciclotídeo inédito com massa molecular de 3216,34 Da. Seguindo o protocolo estabelecido (BROUSSALIS *et al.* 2001; ARNISON *et al.* 2013), a substância **3** foi nomeada **apy A** (Figura 39).

Tabela 16 - 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.

Enzima	***m/z***	**Sequência**					
EndoGlu-C	3583,021	C-G-E- -C-V-W-X-P-C-X-S-G-X-X-G-C-S-C-S-N-K-V-C-Y-Y-N-G-S-V-P					
Tripsina	3583,011	C-G-E-S-C-V-W-X-P-C-X-S-G-X-X-G-C-S-C-S-N- -V-C-Y-Y-N-G-S-V-P					
Quimiotripsina	872,500	-X-P-C-I-S-G-I-L-					
Quimiotripsina	1519,482	C-G-E-S-C-V-W-					-Y-N-G-S-V-P
Quimiotripsina	1971,932					-S-N-K-V-C-Y-	
Sequência final		**C-G-E-S-C-V-W-X-P-C-I-S-G-I-L-G-C-S-C-S-N-K-V-C-Y-Y-N-G-S-V-P**					
Loop		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

Tabela 17 - 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^{15} e Ile^{18}) o resíduo da posição X^{12} (ver Tabela 16) por estar do lado de prolina não foi identificado através da digestão com quimiotripsina.

Aminoácido	**Símbolo**	**Anal. Aminoácidos**	**Sequenciamento**
Asparagina/aspartato	Asn (N)/Asp(D)	2,0	2N
Valina	Val (V)	2,8	3
Glicina	Gly (G)	4,2	4
Glutamato/glutamina	Glu (E)/Gln(Q)	1,0	1E
Serina	Ser (S)	4,8	5
Tirosina	Tyr (Y)	2,1	2
Leucina	Leu (L)	1,0	1
Isoleucina	Ile (I)	2,9	2*
Prolina	Pro (P)	1,9	2
Lisina	Lys (K)	n.d	1
Cisteína	Cys (C)	n.d	6
Triptofano	Trp W()	n.d	1

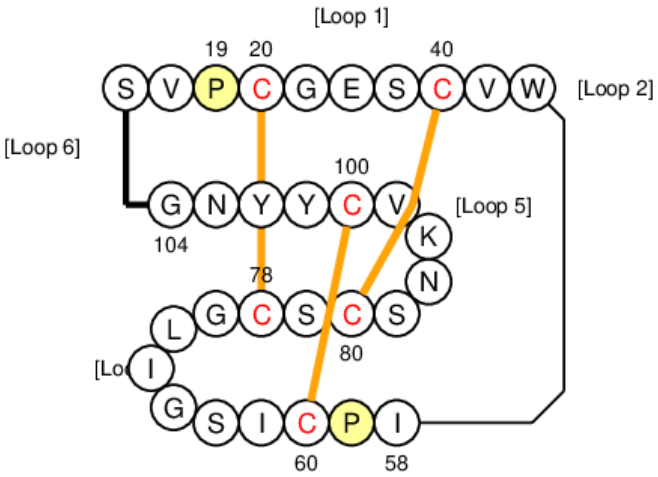
Fonte: Elaborada pelo autor, 2020
Legenda: n.d não detectado

Tabela 18 - Comparação das sequências de aminoácidos dos ciclotídeos apy A (**3**) e vitri peptídeo 2, ressaltando em azul as diferenças entre elas.

Ciclotídeo	M.M (Da)	Sequência
apy A (**3**)	3216,34	CGESCVWIPCISGILGCSCSNKVCYYNGSVP
vitri peptídeo 2	3138,32	CGESCVWIPCISGIAGCSCSNKVCYLNGSIP

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020
Legenda: M.M massa molecular

Figura 39 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo apy A (**3**).



Fonte: Molécula desenhada *online* no *site* Cybase (WANG *et al.* 2008a)

4.6.1.4 Sequenciamento da substância **4**

A substância **4** foi obtida como um sólido branco, seu cromatograma HPLC mostrou um único pico e seu espectro de massas apresentou um íon de *m*/*z* 3253,064 (Figura 40). Uma vez concluída esta etapa, a amostra foi submetida ao processo de redução e alquilação, sendo que o espectro de massas do produto permitiu observar o acréscimo característico de 348 Da (Apêndice 8, página 153). Para o sequenciamento, as digestões com as três enzimas foram analisadas, conforme discutido nas seções anteriores. O produto da digestão de cada enzima foi analisado por Espectrometria de Massas (MALDI-(+)-TOF-MS) o qual permitiu identificar os fragmentos oriundos de cada uma delas. A reanálise desses fragmentos por MS/MS permitiu estabelecer a sequência de aminoácidos. A união das informações proporcionadas por cada enzima possibilitou sequenciar a estrutura primária do ciclotídeo.

A fração digerida com endoGlu-C apresentou o íon *m*/z 3546,615 referente à linearização do peptídeo cíclico pelo extremo C-terminal do resíduo de ácido glutâmico (Glu, E) característico do *loop* 1 dos ciclotídeos. O espectro de massas MS/MS deste íon permitiu propor a sequência mostrada na figura 41 e na tabela 19. Já a fração digerida com tripsina apresentou o íon *m*/z 2826,925 que permitiu identificar a sequência NSXPCGESCVWXPCTVTAXAGCSCK (Figura 42). Como já foi mencionado anteriormente, a enzima quimiotripsina permitiu diferenciar os resíduos de leucina e isoleucina. No espectro de massas MALDI-TOF-MS da substância **4**, digerida com essa enzima, foi observado o íon de *m*/*z* 874,468 (Figura 43). Este íon possibilitou diferenciar o resíduo da posição 18 do *loop 3* como leucina (TVTA**L**^{18}AG). Os outros dois resíduos isóbaros (**I**^{2} e **I**^{10}) foram identificados através da análise de aminoácidos (Tabela 20).

Figura 40 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **4**.

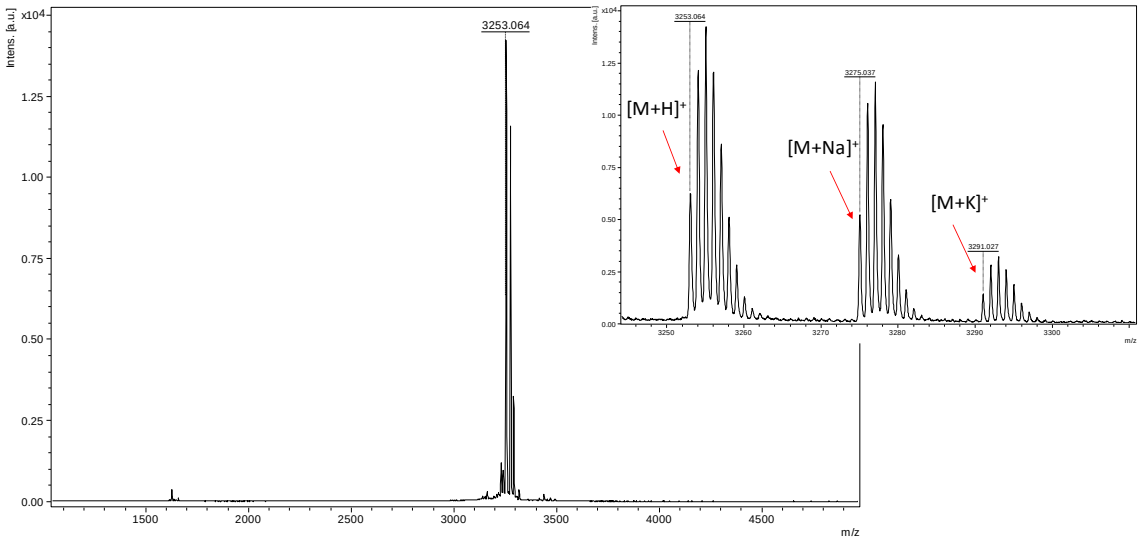


Figura 41 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m/z* 3619,180, advindo da digestão da substância **4** com a enzima endoGlu-C.

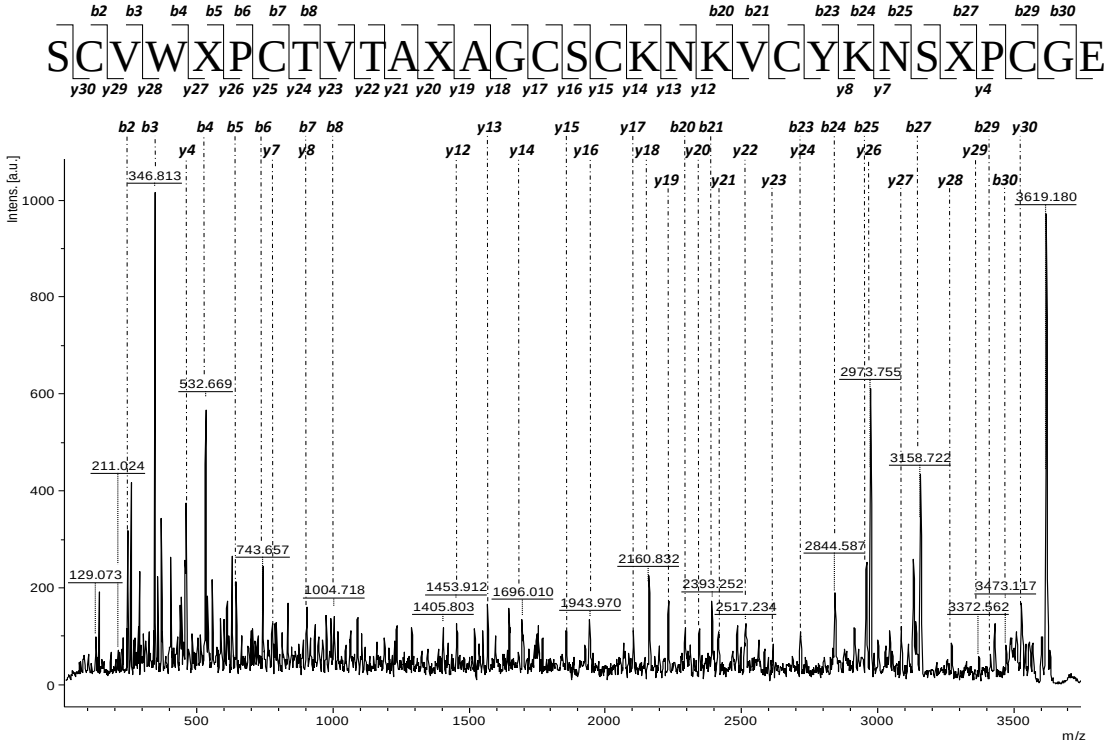


Figura 42 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 2826,925, oriundo da digestão com tripsina da substância **4**. Os valores *m*/*z* mostrados são monoisotópicos.

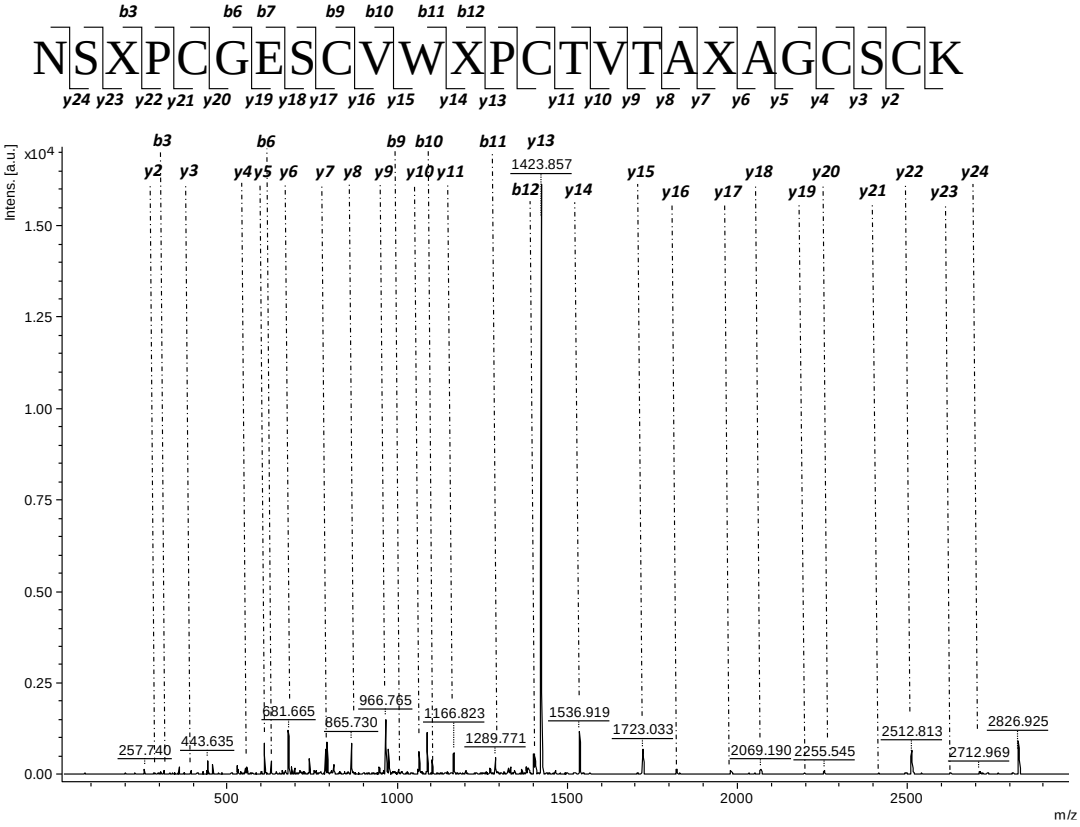


Figura 43 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 874,468, advindo da digestão com quimiotripsina da substância **4**. Os valores *m*/*z* mostrados são monoisotópicos.

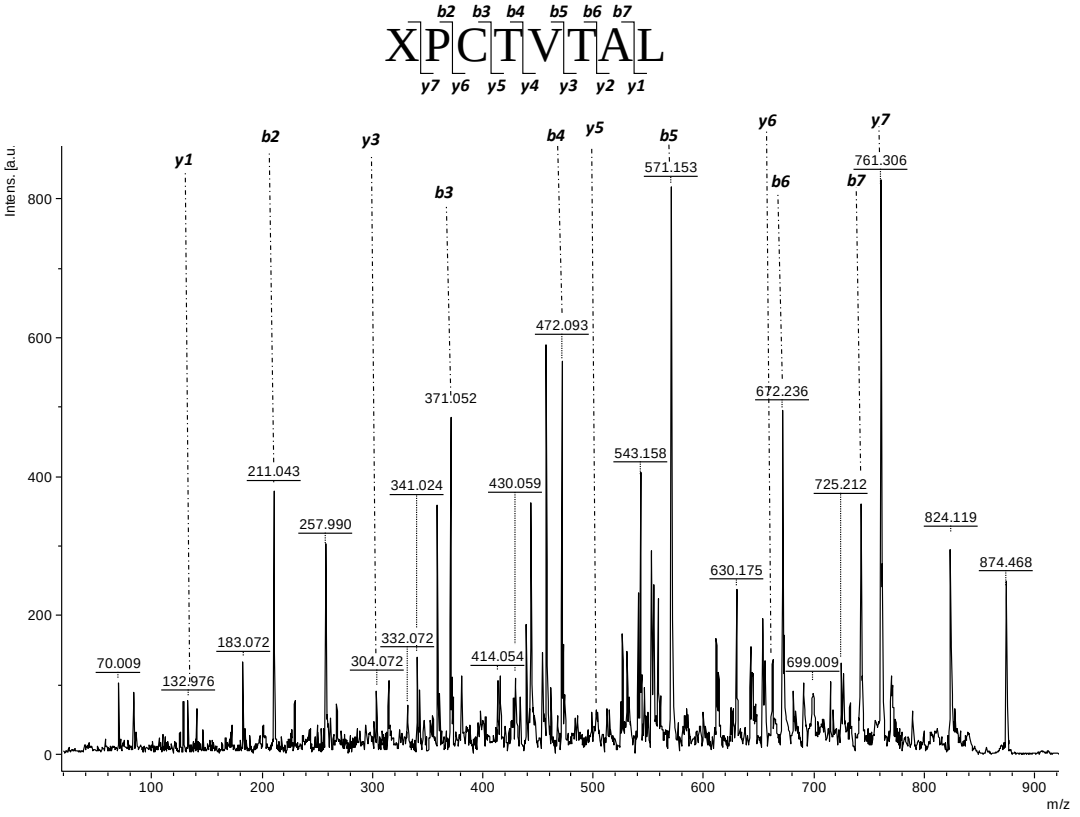


Tabela 19 - Sequências de aminoácidos identificados por MALDI-TOF-MS/MS nos fragmentos da digestão enzimática da substância **4**. A letra X representa os resíduos isóbaros Ile/Leu.

Enzima	***m/z***	**Sequência**					
EndoGlu-C	3619,180	C-G- -S-C-V-W-X-P-C-T-V-T-A-X-A-G-C-S-C-K-N-K-V-C-Y-K-N-S-X-P					
Tripsina	2826,925	C-G-E-S-C-V-W-X-P-C-T-V-T-A-X-A-G-C-S-C-K- -N-S-X-P					
EndoGlu+ Tripsina	2069,684	-S-C-V-W-X-P-C-T-V-T-A-X-A-G-C-S-C-K-					
Quimiotripsina	874,468	-X-P-C-T-V-T-A-L-					
Sequência final		C-G-E-S-C-V-W-X-P-C-T-V-T-A-L-A-G-C-S-C-K-N-K-V-C-Y-K-N-S-X-P					
Loop		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

Tabela 20 - Aminoácidos identificados na substância **4** por meio da técnica de análise de aminoácidos. *Por meio do sequenciamento *de novo* não foi possível identificar os resíduos de isoleucina (Ile^{2} e Ile^{11}) (ver Tabela 19) através da digestão com quimiotripsina por eles estarem do lado de prolina.

Aminoácido	**Símbolo**	**Anal. Aminoácidos**	**Sequenciamento**
Asparagina/aspartato	Asn (N)/Asp(D)	2,0	2N
Valina	Val (V)	2,0	2
Glicina	Gly (G)	3,1	3
Glutamato/glutamina	Glu (E)/Gln(Q)	0,9	1E
Serina	Ser (S)	4,9	5
Tirosina	Tyr (Y)	1,1	1
Leucina	Leu (L)	1,0	1
Isoleucina	Ile (I)	2,1	-*
Prolina	Pro (P)	2,1	2
Lisina	Lys (K)	n.d	3
Cisteína	Cys (C)	n.d	6
Triptofano	Trp W()	n.d	1

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020
Legenda: n.d não detectado

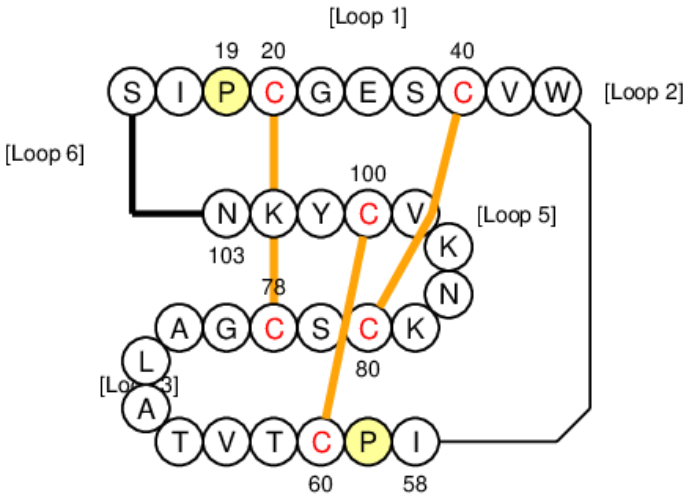
As análises anteriores corroboraram que a substância **4** é um ciclotídeo com 31 resíduos de aminoácidos (Figura 44) e massa molecular 3252,44 Da. A ausência do resíduo de prolina no *loop 5* indica que este pertence à subfamília dos braceletes. Uma procura na literatura (bases de dados: SciFinder®, Web of Science, Cybase e APD) mostrou um ciclotídeo com a mesma massa molecular, vigno 7, isolado da espécie *Viola ignobilis* (HASHEMPOUR *et al.* 2013). A comparação das sequências mostrou que são diferentes (Tabela 21). Tendo em consideração que se trata de um ciclotídeo inédito, ele foi nomeado **apy B**, seguindo o sistema internacionalmente aceito (BROUSSALIS *et al.* 2001).

Tabela 21 - Comparação das sequências dos ciclotídeos apy B (**4**), isolado das raízes da espécie *A. pyrifolia* e vigno 7, isolado das partes aéreas da *Viola ignobilis*. Ressaltando em azul as diferenças nas sequências de aminoácidos.

Ciclotídeo	M.M	Sequência
apy B (**4**)	3252,44 Da	**C**GES**C**VWIP**C**TVTALAG**C**S**C**KNKV**C**YKNS-IP
vigno 7	3252,44 Da	**C**GES**C**VWIP**C**ISSVV-G**C**S**C**KNKV**C**YKNGTLP

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

Figura 44 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo apy B (**4**).



Fonte: Molécula desenhada *online* no *site* Cybase (WANG *et al.* 2008a)

4.6.1.5 Sequenciamento da substância **5**

A substância **5** foi obtida como um sólido branco, e seu espectro de massas mostrou o íon correspondente à molécula protonada (*m*/*z* 3199,495) (Figura 45). Uma vez concluída esta etapa, a amostra foi submetida ao processo de redução (das ligações dissulfeto) e alquilação (dos resíduos de cisteína correspondentes), sendo que no espectro de massas observou-se o acréscimo característico de 348 Da (Apêndice 9, página 154). Para o sequenciamento, as digestões com as três enzimas foram analisadas, conforme discutido nas seções anteriores. O produto da digestão de cada enzima foi analisado por Espectrometria de Massas (MALDI-(+)-TOF-MS) o qual permitiu identificar os fragmentos oriundos de cada uma delas. A reanálise desses fragmentos por MS/MS permitiu, através do sequenciamento *de novo*, identificar as series *b* e *y*. A fração digerida com endoGlu-C apresentou o íon *m*/z 3546,615 referente à linearização do peptídeo cíclico pelo extremo C-terminal do resíduo de ácido glutâmico (Glu, E) característico do *loop* 1 dos ciclotídeos. O espectro de massas MS/MS deste íon permitiu propor a sequência SCVFXPCTVTAXXGCSCKSKVCYKNGXPCGE (Figura 46 e Tabela 22). Já a fração digerida com tripsina apresentou o íon *m*/z 2800,436 (Figura 47) que forneceu informações sobre os resíduos de aminoácidos dos *loops* 1, 2, 3, 4 e 6 (Tabela 22). Com as informações obtidas do sequenciamento dos fragmentos advindos da digestão destas duas enzimas foi possível propor a estrutura primária do ciclotídeo. Porém, a identificação dos resíduos isóbaros $\mathbf{X^{2}}$ (*loop* 6), $\mathbf{X^{11}}$ (*loop* 2) e $\mathbf{X^{18}}$, $\mathbf{X^{19}}$ (*loop* 3) não foi realizada (Tabela 22). Para responder esta questão a análise de aminoácidos foi realizada, comprovando-se a presença de dois resíduos de leucina e dois de isoleucina (Tabela 23), porém, suas posições na estrutura primária do ciclotídeo eram desconhecidas. Geralmente, a digestão com quimiotripsina auxilia neste sentido, mas no caso da substância **5**, não foi possível. As análises por tandem dos fragmentos oriundos da digestão com esta enzima não permitiram obter informações dos resíduos isóbaros do *loop* 3 (TVTA$\mathbf{X^{18}X^{19}}$G). Somente foi possível confirmar os aminoácidos dos *loops* 1, 6 e parte do 2 por meio do íon de *m*/*z* 1350,616 (Figura 48), no entanto, o resíduo isóbaro nesta parte da sequência (KNG$\mathbf{X^{2}}$PCGESVW) encontra-se ligado a prolina (não acontece a clivagem).

Figura 45 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **5**.

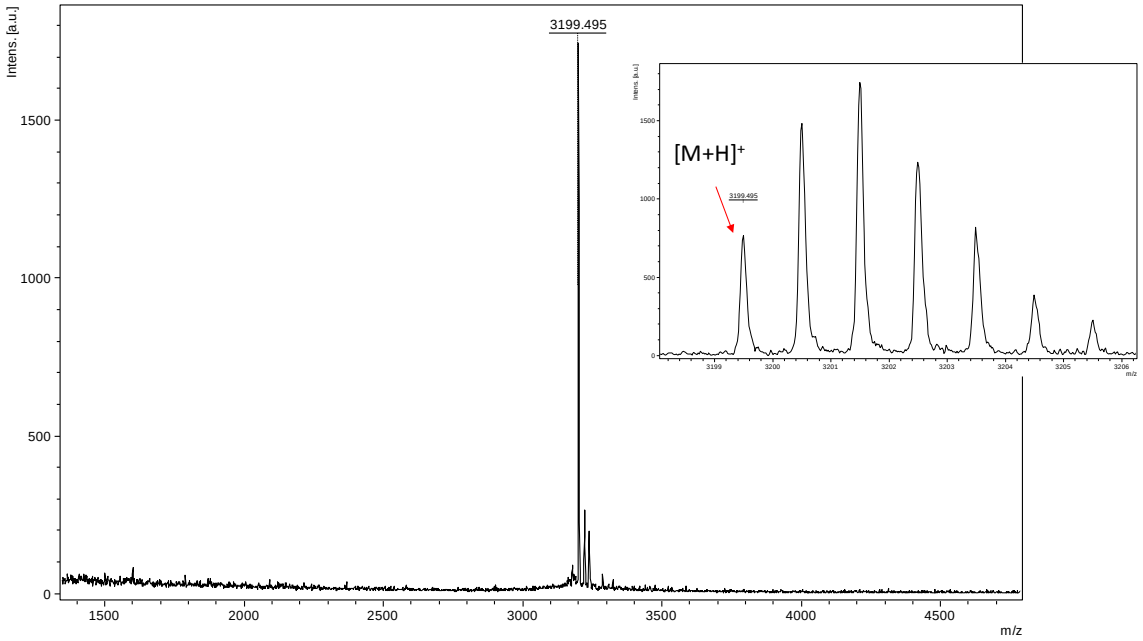


Figura 46 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/z 3565,683, advindo da digestão da substância **5** com a enzima endoGlu-C.

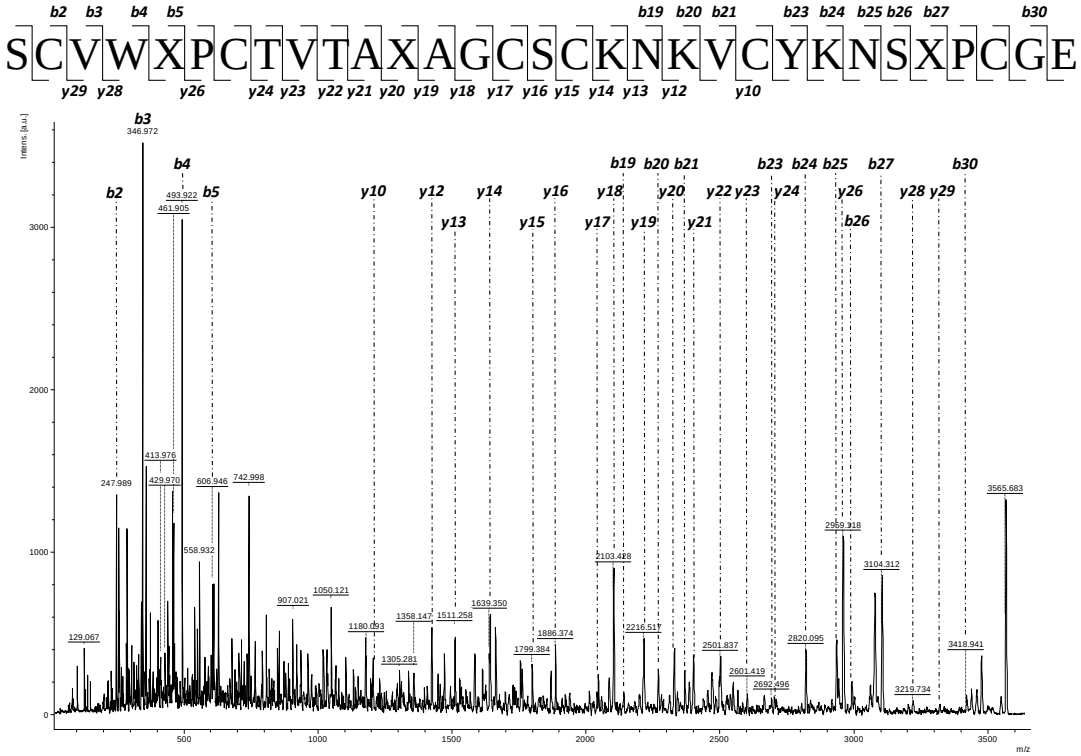


Figura 47 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 2800,436, oriundo da digestão com tripsina da substância **5**. Os valores *m*/*z* mostrados são monoisotópicos.

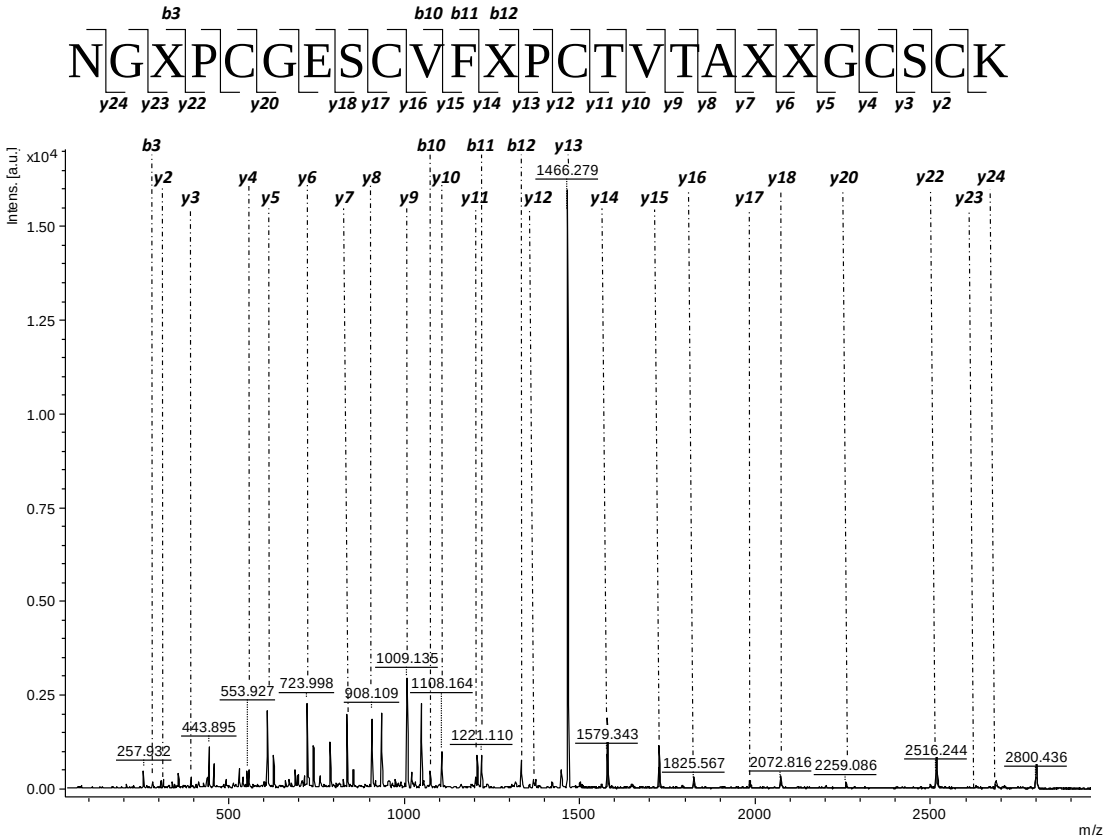


Figura 48 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 1350,616, oriundo da digestão com quimiotripsina da substância **5**. Os valores *m*/*z* mostrados são monoisotópicos.

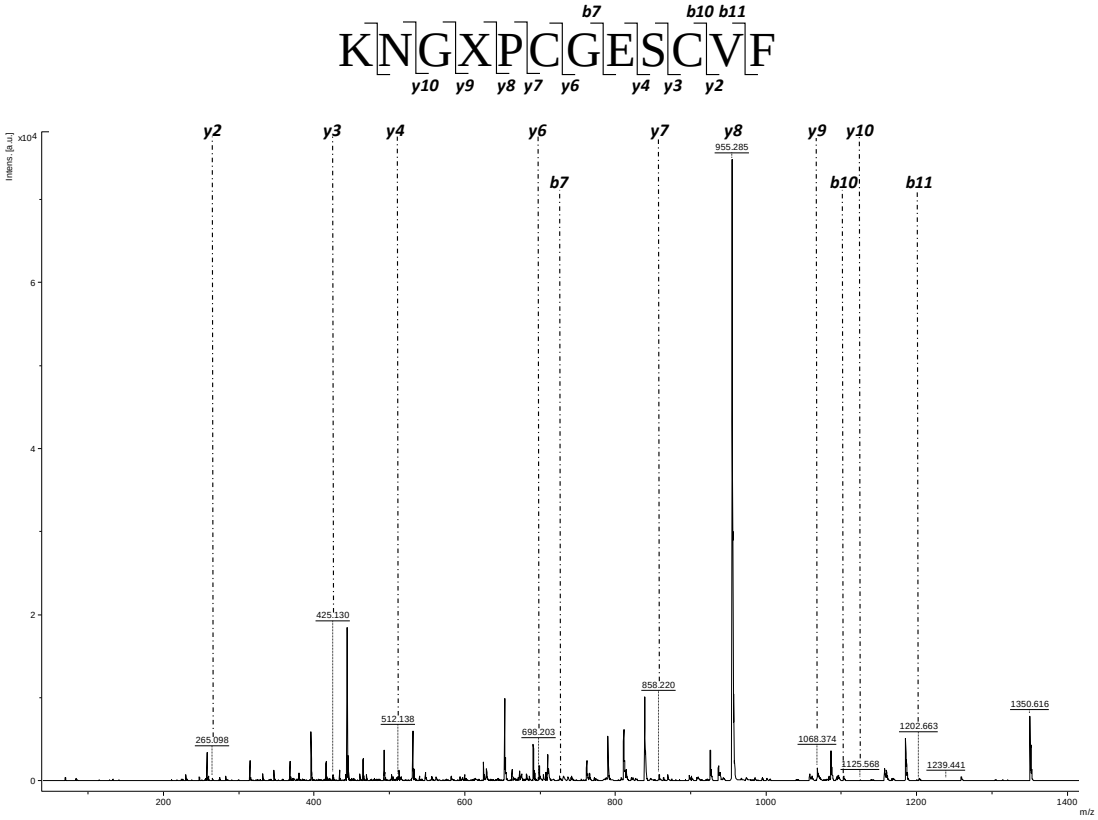


Tabela 22 - Sequências de aminoácidos identificados por MALDI-TOF-MS/MS nos fragmentos da digestão enzimática da substância **5**. A letra X em azul/verde representa os resíduos isóbaros Ile/Leu quando é/não é possível diferenciá-los com quimiotripsina, respectivamente.

Enzima	***m/z***	**Sequência**					
EndoGlu-C	3565,683	-S-C-V-F-X-P-C-T-V-T-A-X-X-G-C-S-C-K-S-K-V-C-Y-K-N-G-X-P					
Tripsina	2800,436	C-G-E-S-C-V-F-X-P-C-T-V-T-A-X-X-G-C-S-C-K-					-N-G-X-P
Quimiotripsina	1350,616	C-G-E-S-C-V-F-					-K-N-G-X-P
Sequência final		C-G-E-S-C-V-F-**X**-P-C-T-V-T-A-**X**-**X**-G-C-S-C-K-S-K-V-C-Y-K-N-G-**X**-P					
Loop		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

Tendo em consideração que esta substância foi isolada em pequenas quantidades, e que as abordagens empregadas neste estudo são destrutivas, a realização de técnicas como ressonância magnética nuclear ou degradação de Edman, que poderiam esclarecer a natureza dos resíduos isóbaros, foi descartada. Na literatura existem inúmeros estudos que identificam os resíduos isóbaros por homologia. Com este intuito, foi realizada uma busca nas principais bases de dados, e encontrou-se um ciclotídeo com a mesma massa molecular, cter 15, recentemente reportado nas raízes e sementes da espécie *Clitoria ternatea* (Fabaceae) (GILDING *et al.* 2016). Um alinhamento das sequências mostrou as similaridades (Tabela 24). No caso específico da sequência de aminoácidos do *loop* 3, TVTA**LL**G, uma busca com a ferramenta *Loop Search* (www.cybase.org.au) mostrou que existem 20 ciclotídeos reportados: 5 na família Violaceae (25 %), 4 na Rubiaceae (20 %) e 11 na Fabaceae (55 %) (Apêndice 13, página 156). Quando foram pesquisadas as outras três opções, TVTA**I**LG, TVTA**LI**G ou TVTA**II**G, não foi encontrada nenhuma sequência. Por tanto, por homologia, o ciclotídeo 5 já é conhecido e a sua sequência de aminoácidos é igual à de **cter 15** (Figura 49).

Tabela 23 - Aminoácidos identificados na substância **5** por meio da técnica de análise de aminoácidos. *Por meio do sequenciamento de novo não foi possível identificar os resíduos isóbaros (X^{2}, X^{11}, X^{18} e X^{19}) (ver Tabela 22).

Aminoácido	Símbolo	Análise Aminoácidos	Sequenciamento
Asparagina/aspartato	Asn (N)/Asp(D)	2,0	1N
Valina	Val (V)	2,0	3
Glicina	Gly (G)	3,1	3
Glutamato/glutamina	Glu (E)/Gln(Q)	0,9	1E
Serina	Ser (S)	2,9	3
Tirosina	Tyr (Y)	1,1	1
treonina	Thr (T)	2,2	2
Leucina	Leu (L)	2,0	-*
Isoleucina	Ile (I)	2,1	-*
Prolina	Pro (P)	2,1	2
Fenilalanina	Phe (F)	1,0	1
Lisina	Lys (K)	n.d	3
Cisteína	Cys (C)	n.d	6

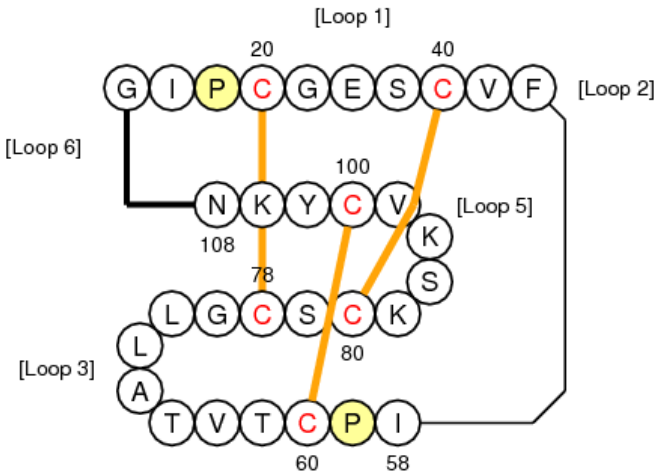
Fonte: Elaborada pelo autor, 2020
Legenda: n.d não detectado

Tabela 24 - Comparação das sequências dos ciclotídeos **5**, isolado das raízes da espécie *A. pyrifolia* (Violaceae) e cter 15, isolado das raízes e sementes da espécie *Clitoria ternatea* (Fabaceae). Ressaltando em amarelo os resíduos de leucina/isoleucina, que seriam as únicas diferenças nas sequencias de aminoácidos.

Ciclotídeo	M.M	Sequência
Substância **5**	3198,4 Da	**C**GES**C**VF**X**P**C**TVTA**XX**G**C**S**C**KSKV**C**YKNG**X**P
cter 15	3198,4 Da	**C**GES**C**VF**I**P**C**TVTA**LL**G**C**S**C**KSKV**C**YKNG**I**P

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

Figura 49 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo cter 15 (substância **5**).



Fonte: Molécula desenhada *online* no *site* Cybase (WANG *et al.* 2008a)

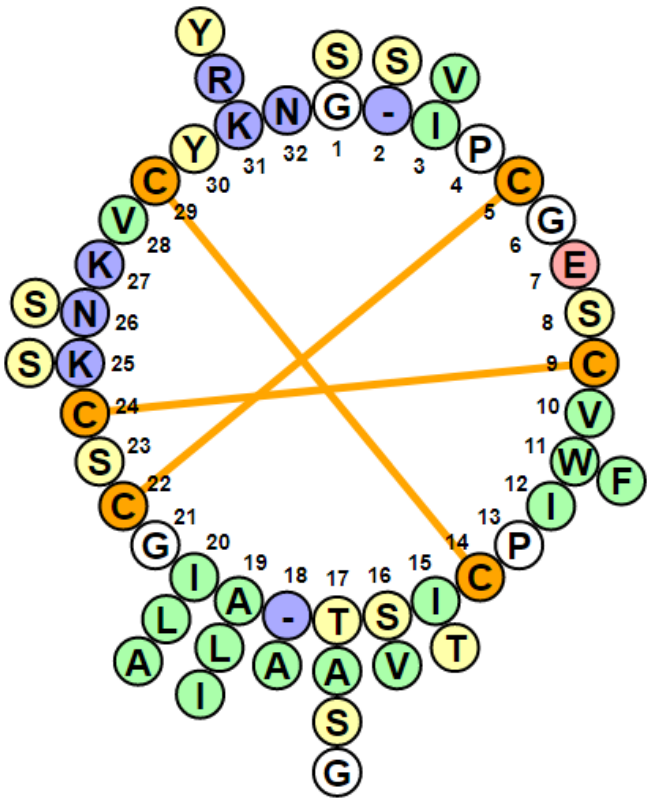
Um alinhamento das sequências de aminoácidos das substâncias **1**-**5**, isoladas das raízes e caules da espécie *A. pyrifolia* (Figura 50), permite observar as semelhanças e diferenças entre elas. Com destaque para os seis resíduos de cisteína (em vermelho) responsáveis pela formação do arranjo *CCK* e o resíduo de ácido glutâmico (em azul), característico do *loop* 1. Neste tipo de representação a frequência com que os resíduos aparecem nas sequências aumenta à medida que se tornam mais internos.

Figura 50 - 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 *Anchietea pyrifolia* (Violaceae), em vermelho os seis resíduos de cisteína característicos dos ciclotídeos e em azul o resíduo de ácido glutâmico conservado no *loop* 1.
B) Representação *Sequence Diversity Wheel*. Os resíduos de aminoácidos estão representados com cores diferentes baseados nas propriedades físico-químicas.

A

```
cyO4          G-IPCGESCVWIPC-ISSAIGCSCKNKVCYRN
cyO17         G-IPCGESCVWIPC-ISAAIGCSCKNKVCYRN
apy A         GSVPCGESCVWIPC-ISGILGCSCSNKVCY-N
apy B         -SIPCGESCVWIPCTVTALAGCSCKNKVCYKN
cter 15       -GIPCGESCVFIPCTVTALLGCSCKSKVCYKN
```

B



Fonte: A) genome.jp/tools-bin/clustalw B) desenhada *online* no *site* Cybase (WANG *et al.* 2008a)

4.6.2 Sequenciamento das substâncias isoladas da espécie *N. orchidiflora*

Nesta seção será descrito o sequenciamento das substâncias **6**, isolada das folhas (seção 4.6.2.1), e **7**-**9**, isoladas das raízes da espécie *N. orchidiflora* (Violaceae) (seções 4.6.2.2, 4.6.2.3 e 4.6.2.4, respetivamente). Três delas apresentaram sequências inéditas e foram nomeadas: nor E (**6**), nor F (**7**) e nor G (**8**). No caso da substância **9**, sua sequência já é conhecida e corresponde ao ciclotídeo vhr1 (**9**).

4.6.2.1 Sequenciamento da substância **6**

A substância **6**, já foi reportada em um trabalho prévio como sendo o ciclotídeo **nor E** (BOBEY, 2016). No entanto, naquele estudo a amostra digerida com quimiotripsina somente permitiu identificar um dos cinco resíduos isóbaros de Ile/Leu, o resíduo da posição 30 do *loop 6* (**I**^{30}) (Tabela 25, ressaltado em azul), não sendo possível diferenciar os resíduos das posições 3 (*Loop 6*), 12 (*Loop 3*), 15 (*Loop 6*) e 18 (*Loop 6*) (ressaltados em verde na tabela 25). Também, naquele estudo não foi realizada a técnica de análise de aminoácidos, devido à pouca quantidade de substância obtida. Nesse contexto, visando a publicação deste resultado, decidiu-se retomar o estudo desta substância.

Para tanto, decidiu-se refazer a digestão com quimiotripsina, tendo em consideração que as vezes durante o processo de digestão enzimática pode não acontecer a clivagem em uma posição esperada. A nova digestão com quimiotripsina forneceu o íon *m*/*z* 789,420. O espectro MS/MS deste íon permitiu identificar a sequência XPC**I**SS**L** (Figura 51), ou seja, determinou-se que os resíduos do *loop 3* eram uma isoleucina na posição 15 (**I**^{15}) e uma leucina na 18 (**L**^{18}) (Tabela 25). No entanto, por meio do sequenciamento *de novo*, não foram diferenciados os resíduos das posições 12 (*Loop 2*) e 3 (*Loop 6*), pois os mesmos encontram-se do lado de um resíduo de prolina, que impossibilita a clivagem da enzima. Neste sentido, a técnica de análise de aminoácidos permitiu esclarecer a natureza dos resíduos nestas posições como leucinas (**L**^{3} e **L**^{12}), pois foi observado que a substância **6** apresentava três leucinas e duas isoleucinas (**I**^{15} e **I**^{30}, assinadas no sequenciamento *de novo*) (Tabela 26). As análises anteriores permitiram concluir o sequenciamento da estrutura primária do ciclotídeo nor E (Figura 52).

Tabela 25 - 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 *N. orchidiflora*. 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.

Enzima	***m/z***	**Sequência**					
EndoGlu-C	3537,557	C-G-E-				-N-K-V-C-Y-X-D-G-S-X-P	
Tripsina	3295,574	C-G-E-S-C-V-F-X-P-C-X-S-S-X-A-G-C-S-C-K-				-X-D-G-S-X-P	
Quimiotripsina	2768,431	C-G-E-S-C-V-F-			-C-S-C-K-N-K-V-C-Y-I-D-G-S-X-P		
Quimiotripsina*	789,420		-X-P-C-I-S-S-L-				
Sequência prévia		C-G-E-S-C-V-F-X-P-C-X-S-S-X-A-G-C-S-C-K-N-K-V-C-Y-I-D-G-S-X-P					
Sequência final*		C-G-E-S-C-V-F-L-P-C- I-S-S- L-A-G-C-S-C-K-N-K-V-C-Y-I-N-G-S-L-P					
Loop	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	

Fonte: Adaptado de BOBEY, 2016.

Tabela 26 - Aminoácidos identificados na substância **6** por meio da técnica de análise de aminoácidos. *Por meio do sequenciamento *de novo* não foi possível identificar os resíduos de leucina (L^3 e L^{12}) (ver Tabela 25).

Aminoácido	**Símbolo**	**Análise Aminoácidos**	**Sequenciamento**
Asparagina/aspartato	Asn (N)/Asp(D)	2,0	2N
Valina	Val (V)	2,0	2
Glicina	Gly (G)	3,1	3
Glutamato/glutamina	Glu (E)/Gln(Q)	0,9	1E
Serina	Ser (S)	4,7	5
Tirosina	Tyr (Y)	1,1	1
Alanina	Ala (A)	0,8	1
Leucina	Leu (L)	3,0	1*
Isoleucina	Ile (I)	2,1	2
Prolina	Pro (P)	2,1	2
Fenilalanina	Phe (F)	1,0	1
Lisina	Lys (K)	n.d	2
Cisteína	Cys (C)	n.d	6

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

Legenda: n.d não detectado

Figura 51 - 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.

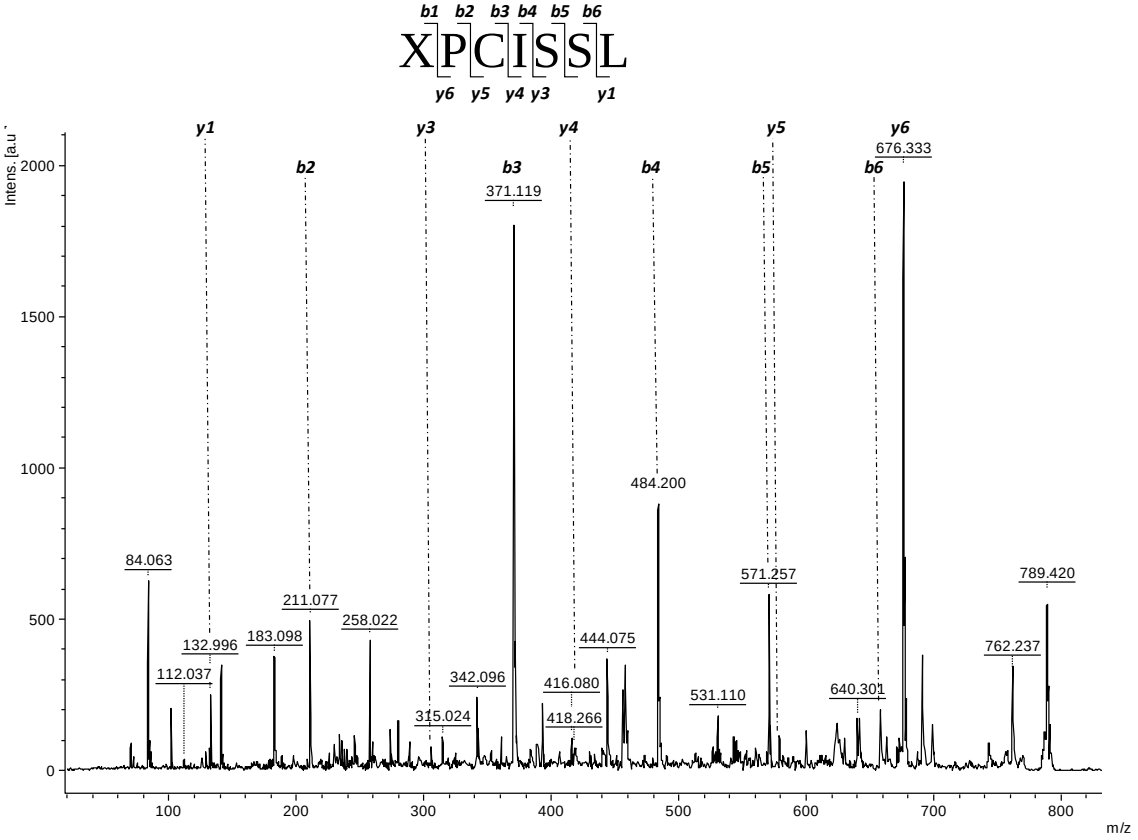
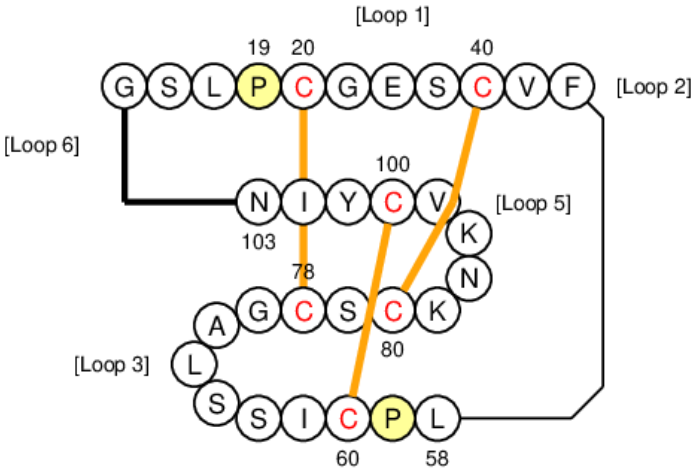


Figura 52 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo nor E (**6**).

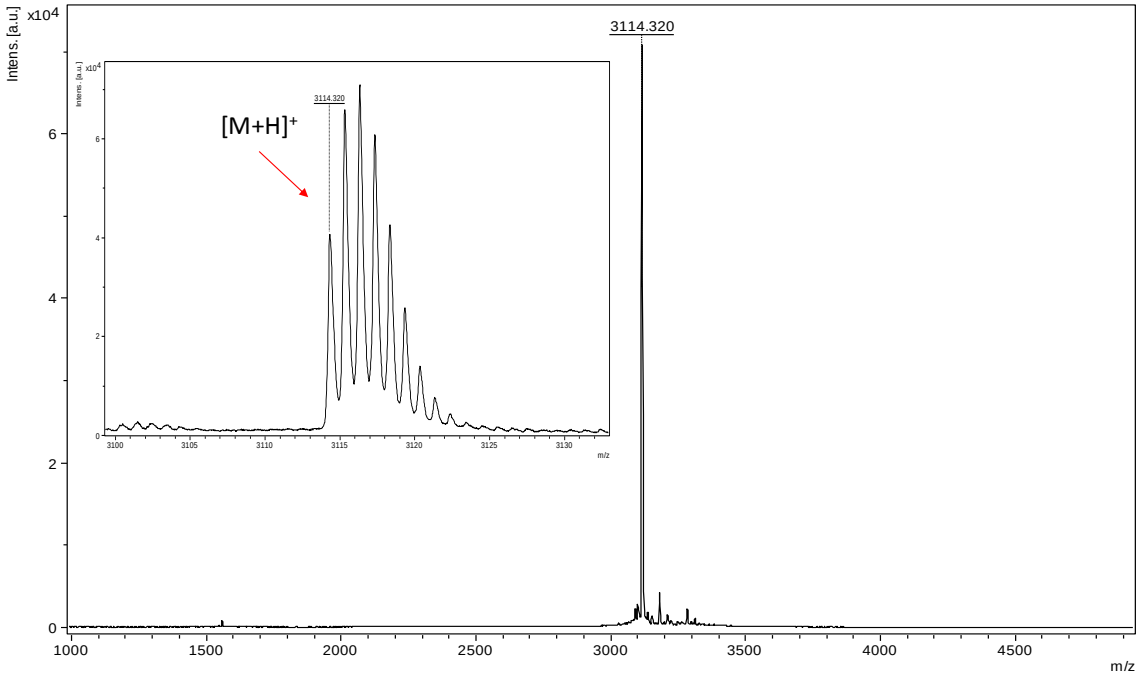


Fonte: Molécula desenhada *online* no *site* Cybase (Wang *et al.* 2008a).

4.6.2.2 Sequenciamento da substância **7**

A substância **7** foi obtida como um sólido branco, e seu cromatograma HPLC-ESI-IT-MS identificou a presença de um único pico. Seu espectro de massas apresentou um íon de *m*/*z* 3114,320 que corresponde à molécula protonada (Figura 53). Os seis resíduos de cisteína característicos dos ciclotídeos foram comprovados pelo acréscimo de 348 Da na massa do ciclotídeo natural após as reações de redução e alquilação (Apêndice 10, página 154).

Figura 53 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **7**.



A fração digerida com endoGlu-C apresentou o íon *m*/z 3480,387 referente à linearização do peptídeo cíclico pelo extremo C-terminal do resíduo de ácido glutâmico (Glu, E) característico do *loop* 1 dos ciclotídeos. O espectro de massas MS/MS deste íon permitiu propor a sequência SCVFXPCXSSVXGCSCSNKVCYRNGXPCGE (Figura 54 e Tabela 27). Por outro lado, a digestão com tripsina apresentou os íons complementares de *m*/z 2902,260 e 597,326, que, após MS/MS, permitiram identificar as sequências NGXPCGESCVFXPCXSSVXGCSCSNK (Figura 55) e VCYR (Figura 56), respectivamente.

Figura 54 - 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.

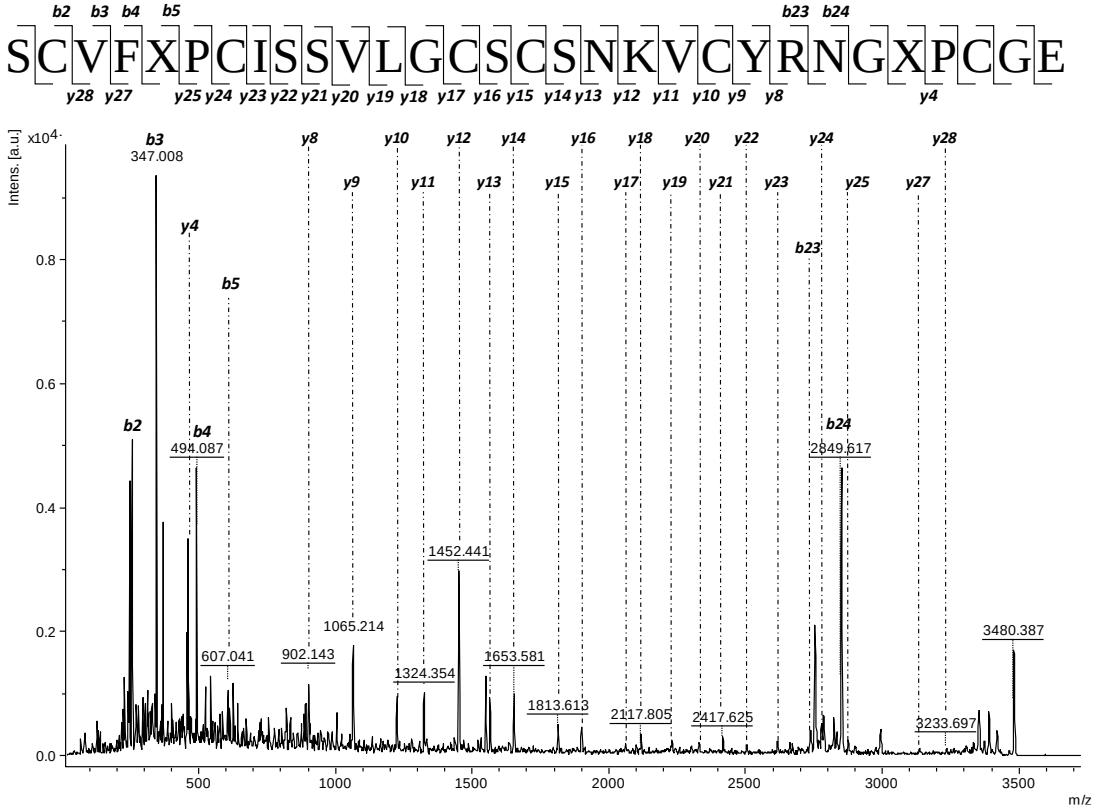


Figura 55 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 2902,260 oriundo da digestão com tripsina da substância **7**. Os valores *m*/*z* mostrados são monoisotópicos.

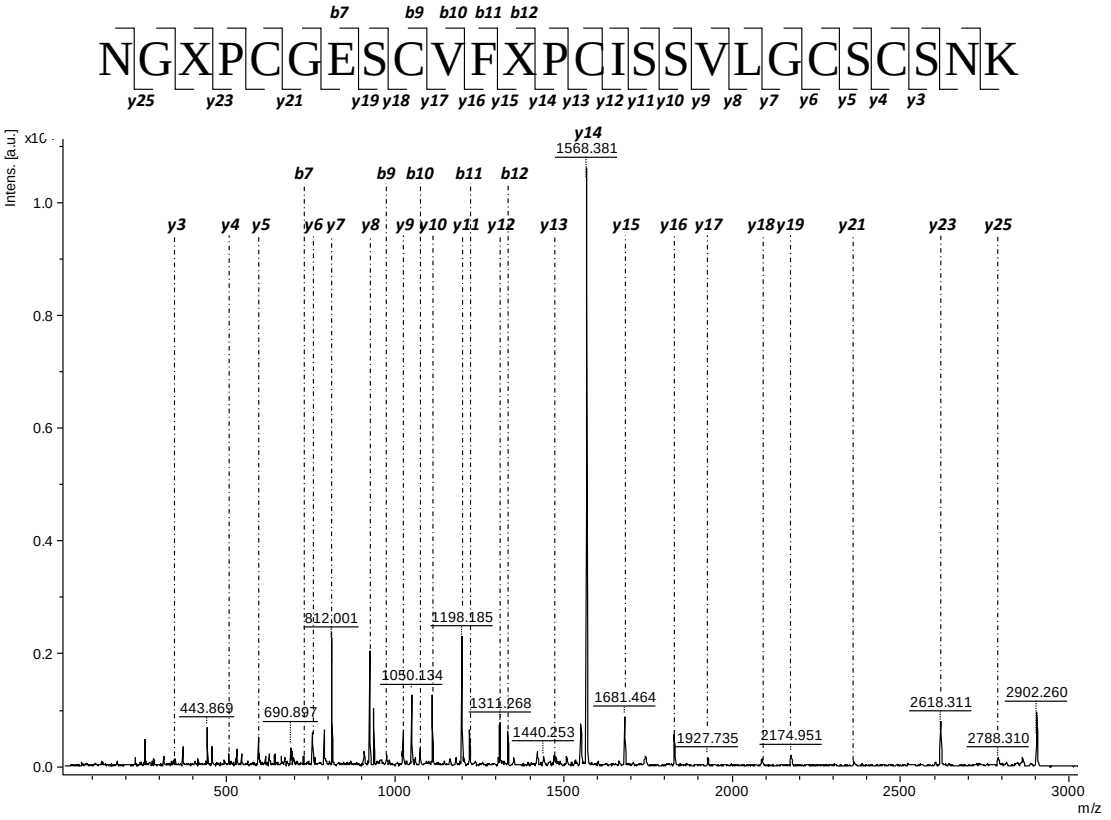
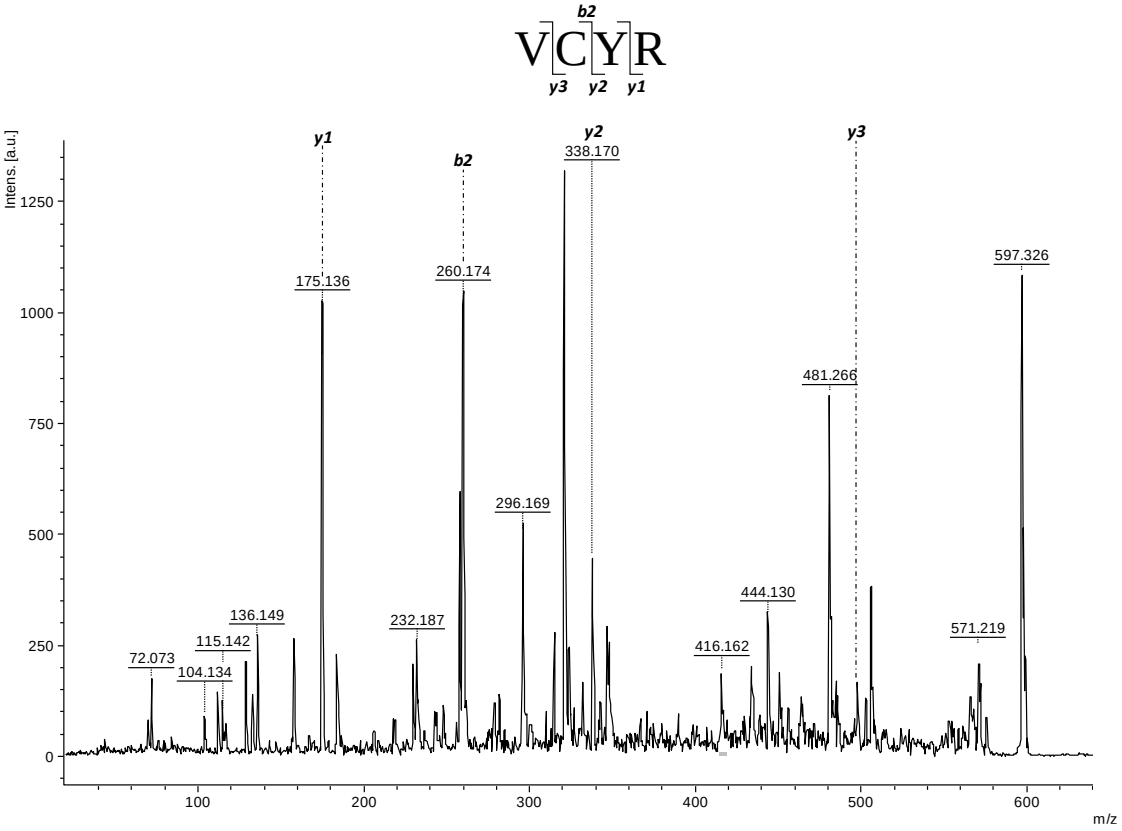


Figura 56 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 597,326 oriundo da digestão com tripsina da substância **7**. Os valores *m*/*z* mostrados são monoisotópicos.



Uma vez obtida a sequência primária de aminoácidos foi confirmado que a substância **7** é um ciclotídeo com 30 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 3113,33 Da. A ausência do resíduo de *cis*-prolina no *loop* 5 indica que ele pertence à subfamília dos braceletes (Figura 59). Uma pesquisa nas bases de dados, mostrou dois ciclotídeos que apresentam alta similaridade, as chassatida C5 e C6, isoladas da *Chassalia chartacea* (Rubiaceae) (NGUYEN *et al.* 2012) (Tabela 28). Mesmo não sendo possível esclarecer a natureza dos resíduos X^2 e X^{11} da substância **7** podemos afirmar que sua sequência é inédita e foi nomeada **nor F** (Figura 59).

Figura 57 - 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.

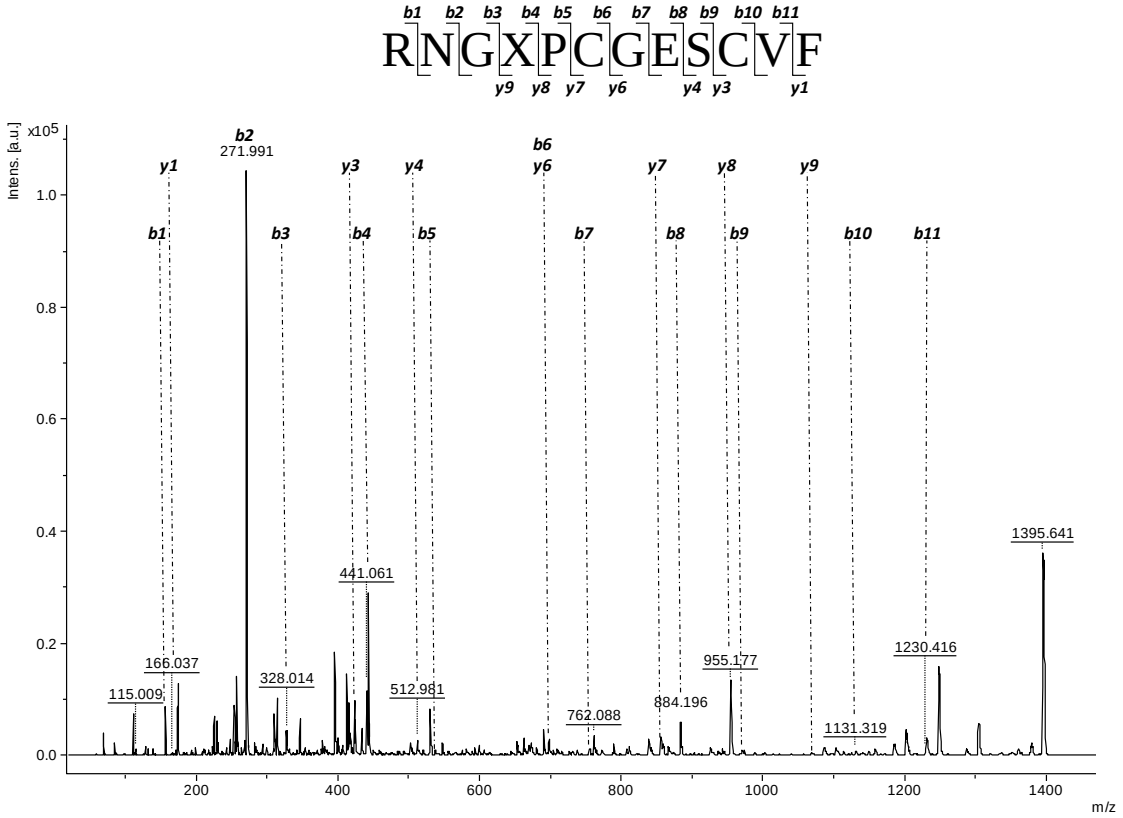


Figura 58 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 888,476 advindo da digestão com quimiotripsina da substância **7**. Os valores *m*/*z* mostrados são monoisotópicos.

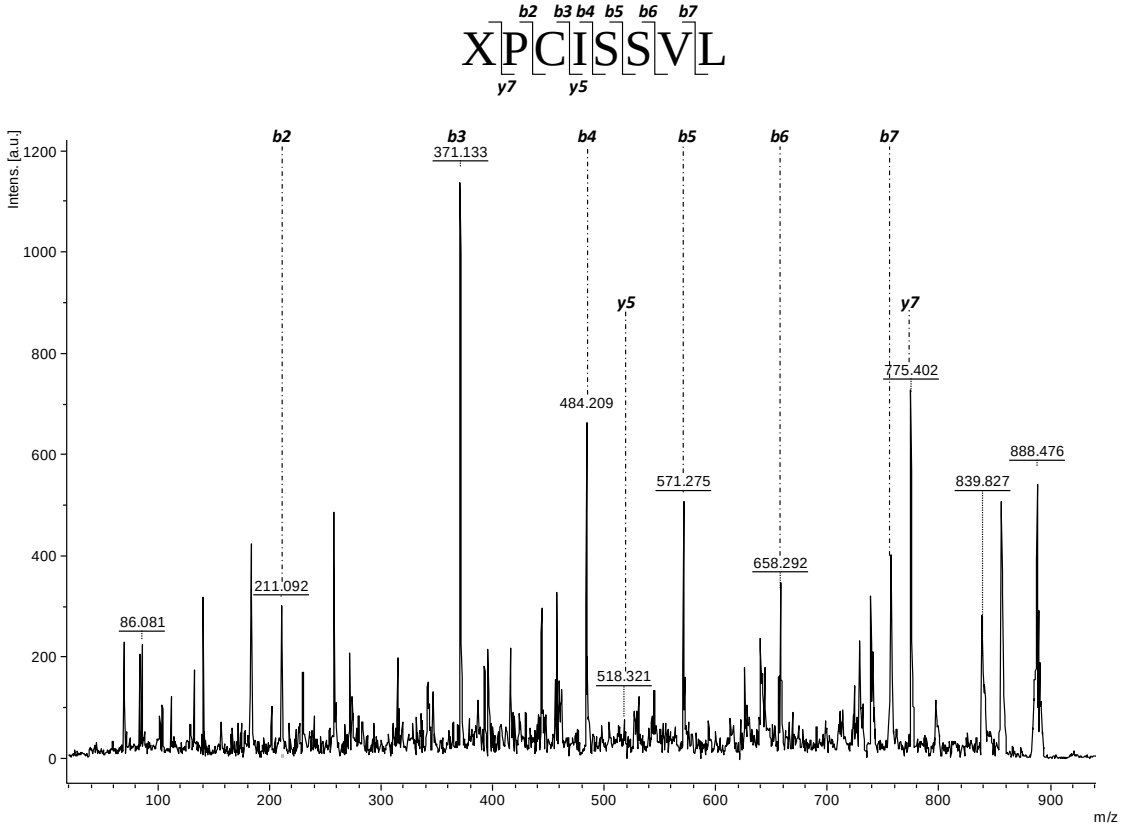


Tabela 27 - Sequências de aminoácidos identificados por MALDI-TOF-MS/MS nos fragmentos da digestão enzimática da substância **7**. A letra X representa os resíduos isóbaros Ile/Leu.

Enzima	*m/z*	Sequência					
EndoGlu-C	3480,387	C-G-E-S-C-V-F-X-P-C-X-S-S-V-X-G-C-S-C-S-N-K-V-C-Y-R-N-G-X-P					
Tripsina	2902,260	C-G-E-S-C-V-F-X-P-C-X-S-S-V-X-G-C-S-C-S-N-K-			-N-G-X-P		
Tripsina	597,326					-V-C-Y-R-	
Quimiotripsina	1395,641	C-G-E-S-C-V-F-					-R-N-G-X-P
Quimiotripsina	888,476			-X-P-C-I-S-S-V-L-			
Sequência final		C-G-E-S-C-V-F-X-P-C-I-S-S-V-L-G-C-S-C-S-N-K-V-C-Y-R-N-G-X-P					
Loop		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**

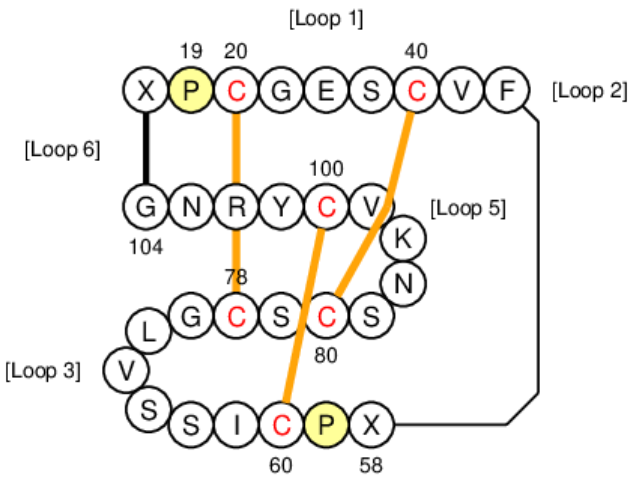
Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

Tabela 28 - Comparação das sequências dos ciclotídeos **7**, isolado das raízes da espécie *N. orchidiflora* (Violaceae), chassatida C5 e C6, isolados da espécie *Chassalia chartacea* (Rubiaceae). Ressaltando em amarelo as diferenças nas sequências de aminoácidos.

Ciclotídeo	M.M	Sequência
nor F (**7**)	3113,3 Da	**C**GES**C**VF**X**P**C**ISSV**L**G**C**S**C**SNKV**C**YRNG**-X**P
chassatida C5	3239,5 Da	**C**GES**C**VF**I**P**C**ISSV**V**G**C**S**C**KNKV**C**YRNG**VI**P
chassatida C6	3253,5 Da	**C**GES**C**VF**I**P**C**ISSV**I**G**C**S**C**KNKV**C**YRNG**VI**P

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

Figura 59 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo inédito nor F (**7**), isolado das raízes da espécie *Noisettia orchidiflora*.



Fonte: Molécula desenhada *online* no *site* Cybase (Wang *et al.* 2008a).

4.6.2.3 Sequenciamento da substância **8**

A substância **8** foi analisada por HPLC-ESI-IT-MS e espectrometria de massas MALDI-TOF (Figura 60). Estas análises demonstraram a presença de uma única substância com massa molecular de 3142,38 Da. Após as reações de redução e alquilação, confirmadas pelo acréscimo de 348 Da (Apêndice 11, página 155), a substância foi digerida separadamente com endoGlu-C, tripsina e quimiotripsina, conforme discutido na seção 4.6 (página 80). A digestão com tripsina apresentou o íon de *m*/*z* 3294,417 referente à linearização da sequência cíclica com perda de 215,25 Da (fragmento $S^{25}K^{26}$), além disso, podemos inferir que o resíduo de Ser^{25} está ligado pelo extremo N-terminal a um resíduo de lisina ou arginina (**K**/$\mathbf{R^{24}S^{25}K^{26}}$), fato que foi confirmado através do espectro MS/MS deste fragmento (VCYNGXPCAESCVYXPCTXTAXXGCSC$\mathbf{R^{24}}$) (Figura 61 e Tabela 29).

Por outro lado, a análise da substância **8**, após a digestão com endoproteinase de ácido glutâmico, mostrou o íon de *m*/*z* 3509,563. A reanálise deste íon por MS/MS permitiu propor a sequência da Figura 62. A junção das informações obtidas através do sequenciamento *de novo*, das enzimas anteriores, permitiu propor a sequência primária de aminoácidos do ciclotídeo (Tabela 29). No entanto, a natureza dos resíduos isóbaros, ($\mathbf{X^{15}}$, $\mathbf{X^{18}}$ e $\mathbf{X^{19}}$, *loop 3*) (Tabela 29) que poderia ser esclarecida após digestão com quimiotripsina, permaneceu desconhecida. Por meio desta enzima só foi possível obter informações dos aminoácidos dos *loops* 1, 2 e 6 (Figura 63 e Tabela 29). Devido à pouca quantidade de massa obtida durante o processo de purificação não foi realizada a técnica de análise de aminoácidos, que seria outra alternativa para confirmar a identidade destes resíduos.

No entanto, com as informações obtidas é possível afirmar que a substância **8** é um ciclotídeo da subfamília dos braceletes, com 30 resíduos de aminoácidos. Uma busca nas principais bases de dados mostrou uma sequência com 81,5 % de homologia, hypa A, isolado da espécie *Hybanthus parviflorus* (Violaceae) (BROUSSALIS *et al.* 2001) (Tabela 30). Considerando que se trata de um ciclotídeo inédito ele foi nomeado como **nor G** (Figura 64).

Figura 60 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **8**.

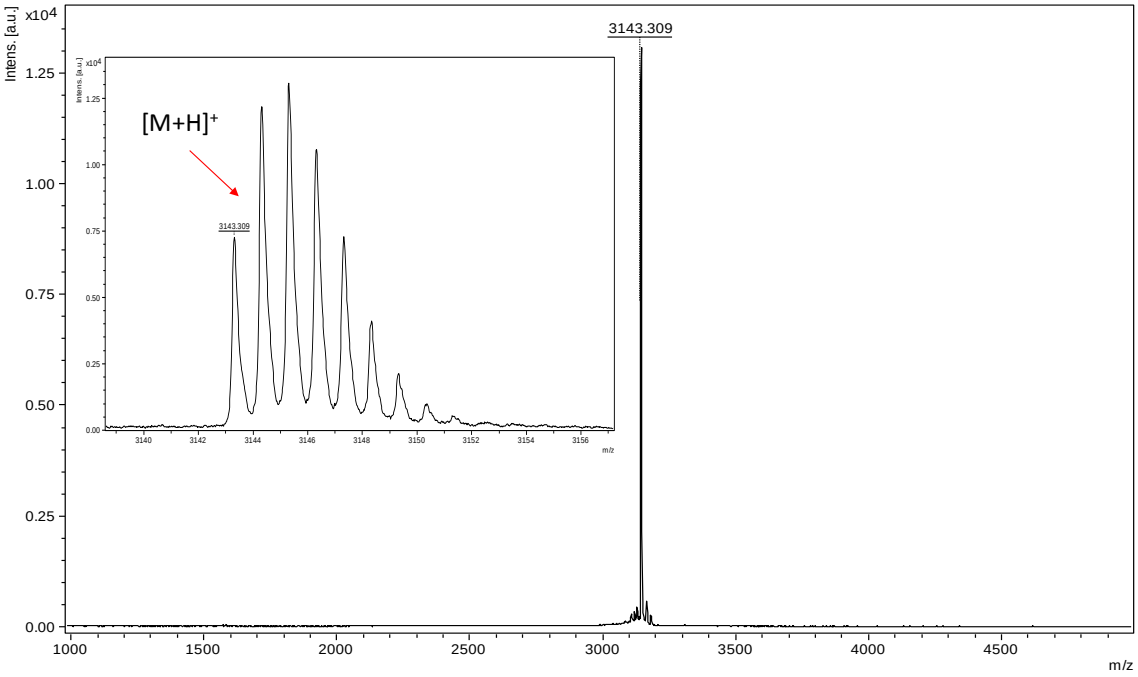


Figura 61 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m/z* 3294,417 oriundo da digestão com tripsina da substância **8**. Os valores *m/z* mostrados são monoisotópicos.

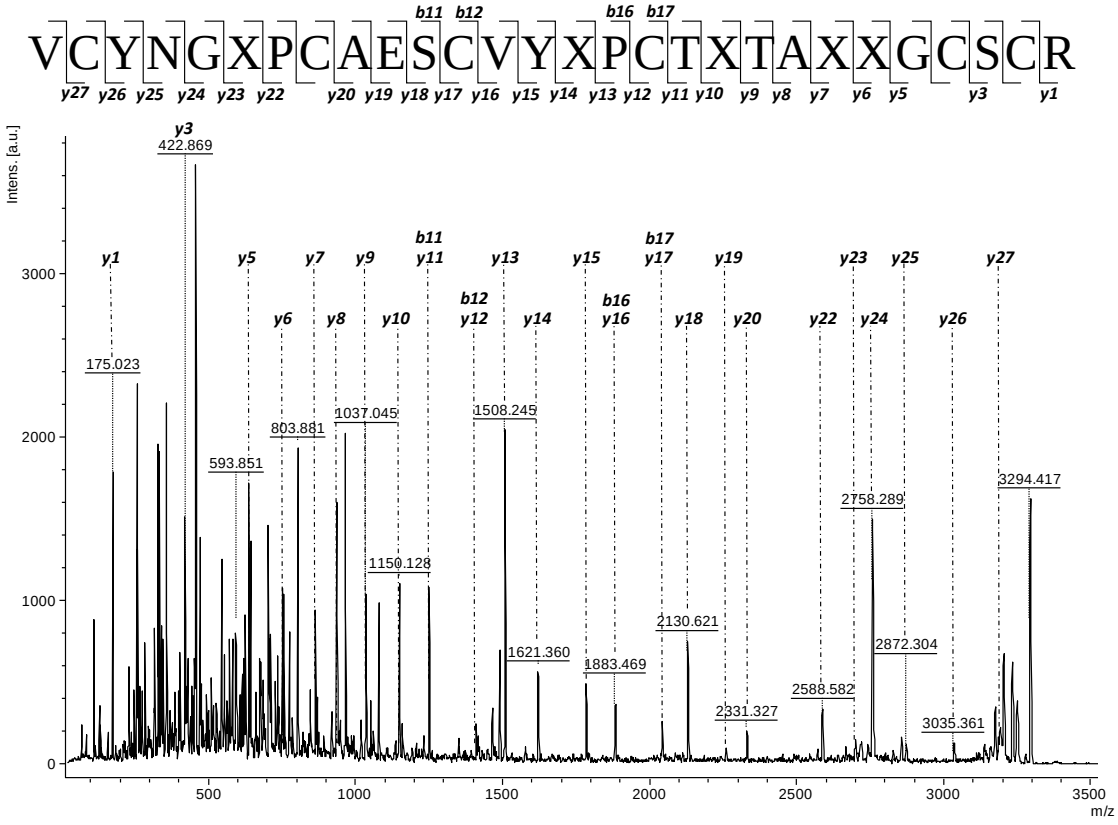


Figura 62 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 3509,563 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância **8**. Os valores *m*/*z* mostrados são monoisotópicos.

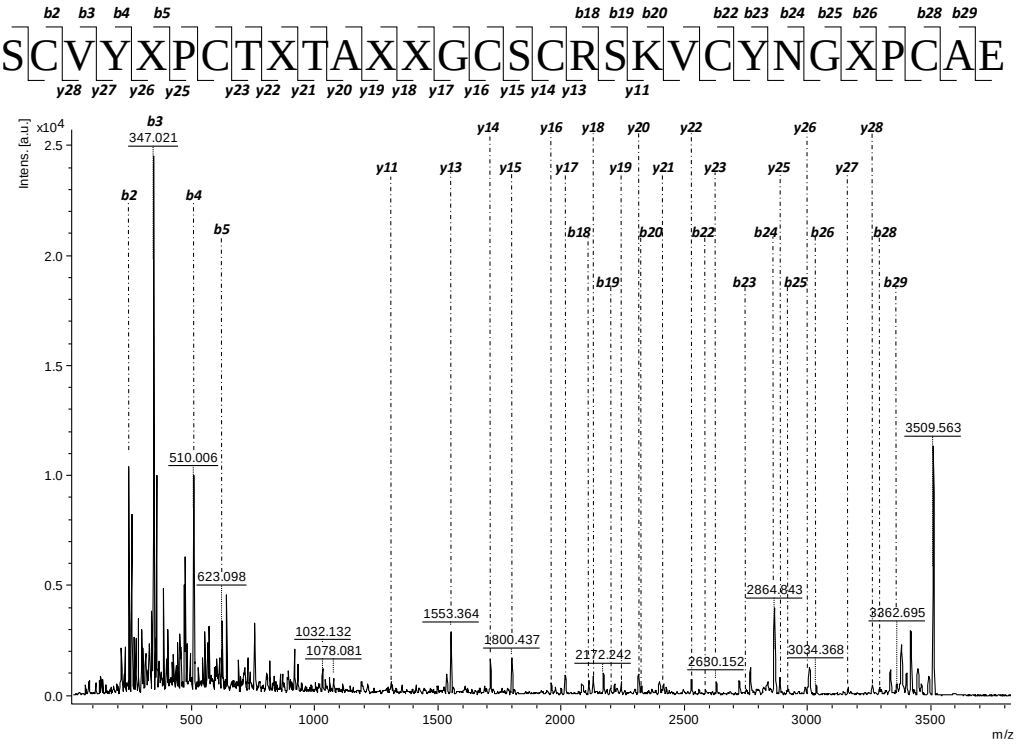


Figura 63 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 1269,514 advindo da digestão com quimiotripsina da substância **8**. Os valores *m*/*z* mostrados são monoisotópicos.

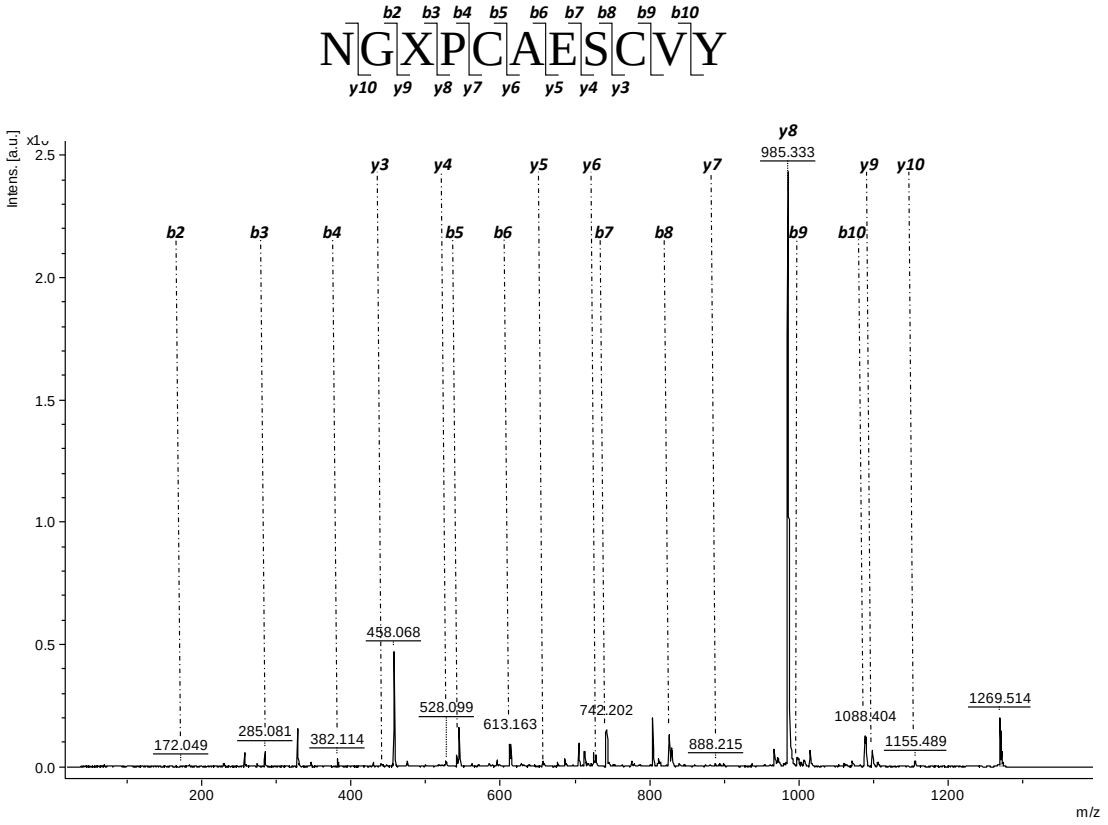


Tabela 29 - Sequências de aminoácidos identificados por MALDI-TOF-MS/MS nos fragmentos da digestão enzimática da substância **8**. A letra X representa os resíduos isóbaros Ile/Leu. Ressaltados em vermelho os seis resíduos de cisteína característicos dos ciclotídeos. Em verde os resíduos isóbaros (Leu/Ile) que poderiam ser identificados na digestão com quimiotripsina.

Enzima	*m/z*	Sequência					
EndoGlu-C	3509,563	-S-C-V-Y-X-P-C-T-V-T-A-X-X-G-C-S-C-R-S-K-V-C-Y-N-G-X-P					
Tripsina	3294,417	C-A-E-S-C-V-Y-X-P-C-T-X-T-A-X-X-G-C-S-C-R-			-V-C-Y-N-G-X-P		
Quimiotripsina	1269,514	C-A-E-S-C-V-Y-					-N-G-X-P
Sequência final		C-A-E-S-C-V-Y-X-P-C-T-X-T-A-X-X-G-C-S-C-R-S-K-V-C-Y-N-G-X-P					
Loop		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**

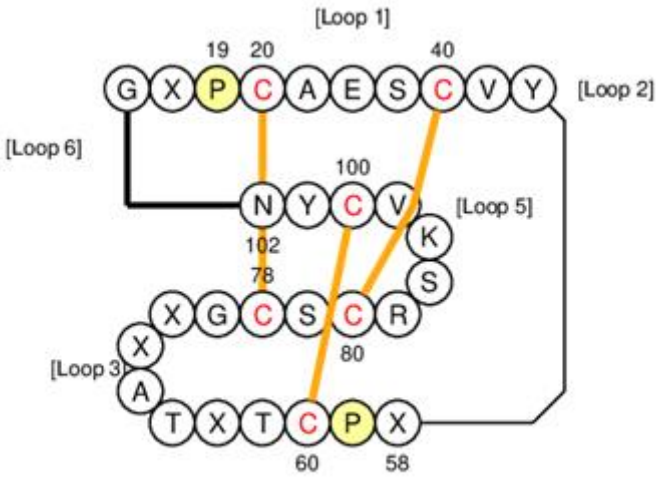
Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

Tabela 30 - Comparação das sequências dos ciclotídeos nor G (**8**), isolado neste estudo das raízes da espécie *N. orchidiflora* e hypa A, isolado da espécie *Hybanthus parviflorus* (BROUSSALIS *et al.* 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.

Ciclotídeo	M.M	Sequência
hypa A	3141,39 Da	**C**AES**C**VYIP**C**TITALLG**C**S**C**KNKV**C**YNGIP
nor G (**8**)	3142,38 Da	**C**AES**C**VYXP**C**TXTAXXG**C**S**C**RSKV**C**YNGXP

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

Figura 64 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo inédito nor G (**8**), isolado das raízes da espécie *Noisettia orchidiflora*.



Fonte: Molécula desenhada *online* no *site* Cybase (Wang *et al.* 2008a).

4.6.2.4 Sequenciamento da substância **9**

O espectro de massas da substância **9** mostrou o íon correspondente à molécula protonada (*m/z* 3110,347) (Figura 65). Posteriormente, a amostra foi submetida ao processo de redução (das ligações dissulfeto) e alquilação (dos resíduos de cisteína correspondentes), sendo que no espectro de massas observou-se o acréscimo característico de 348 Da (Apêndice 12, página 155). Para o sequenciamento, as digestões com as três enzimas foram analisadas, conforme discutido nas seções anteriores. O produto da digestão de cada enzima foi analisado por espectrometria de massas (MALDI-(+)-TOF-MS) o qual permitiu identificar os fragmentos oriundos de cada uma delas. A reanálise desses fragmentos por MS/MS permitiu, através do sequenciamento *de novo*, identificar as series *b* e *y*. A fração digerida com endoGlu-C apresentou o íon de *m*/z 3476,453 referente à linearização do peptídeo cíclico pelo extremo C-terminal do resíduo de ácido glutâmico (Glu, E) característico do *loop* 1 dos ciclotídeos. O espectro de massas MS/MS deste íon permitiu propor a sequência SCVWXPCTVTAXXGCSCSNKVCYNGXPCAE (Figura 66 e Tabela 31). Já a fração digerida com tripsina apresentou o íon *m*/z 3476,411 (Figura 67) que forneceu informações sobre os resíduos de aminoácidos dos *loops* 1, 2, 3, 4, 6 e parte do 5 (Tabela 31). Com as informações obtidas destas duas enzimas foi possível propor a estrutura primária do ciclotídeo. Porém, a identificação dos resíduos isóbaros **X**^{2} (*loop* 6), **X**^{11} (*loop* 2), **X**^{18} e **X**^{19} (*loop* 3) não foi realizada (Tabela 31). Através da digestão com quimiotripsina foram identificados os fragmentos NG**X**^{2}PCAESCVW (íon de *m/z* 1292,548, Figura 68) e GCSCSNKVCY (íon de *m/z* 1234,465, Figura 69), este último permitiu identificar que no extremo N-terminal da **G**^{20} tem um resíduo de **L**^{19} (Tabela 31). Devido à pequena quantidade isolada não foi possível realizar a técnica de análise de aminoácidos para esclarecer a natureza dos resíduos isóbaros restantes. Para tanto, foi feita uma atribuição por homologia. Uma busca nas principais bases de dados, mostrou um ciclotídeo com a mesma massa molecular, vhr-1, isolado das raízes da espécie *Viola hederacea* (Violaceae) (TRABI; CRAIK, 2004). Por tanto, o ciclotídeo **9** já é conhecido e sua sequência de aminoácidos é igual à de **vhr 1** (Figura 70).

Figura 65 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **9**.

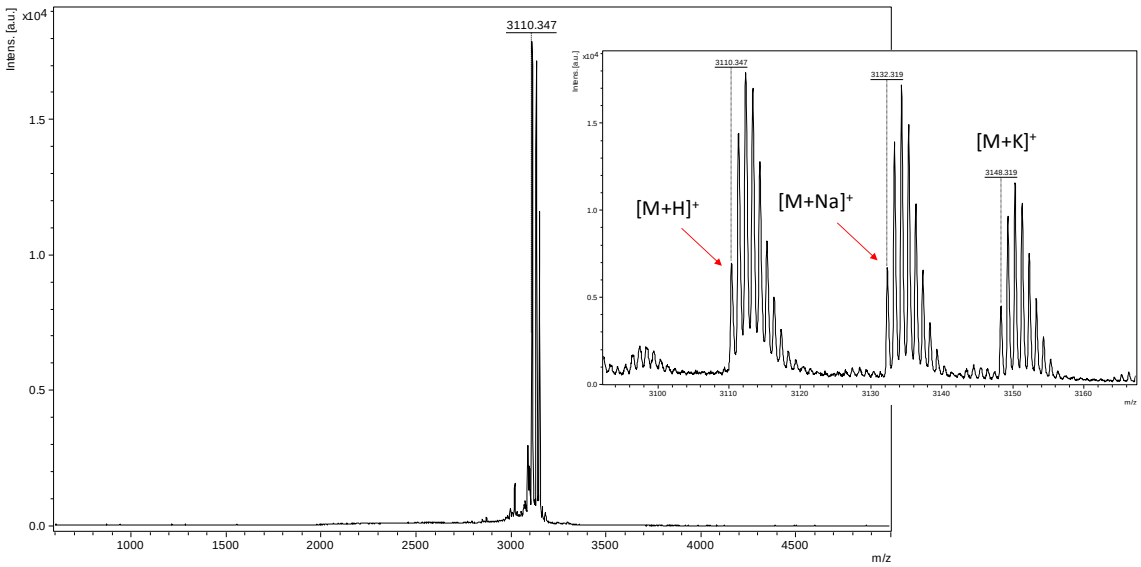


Figura 66 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m/z* 3476,453 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância **9**. Os valores *m/z* mostrados são monoisotópicos.

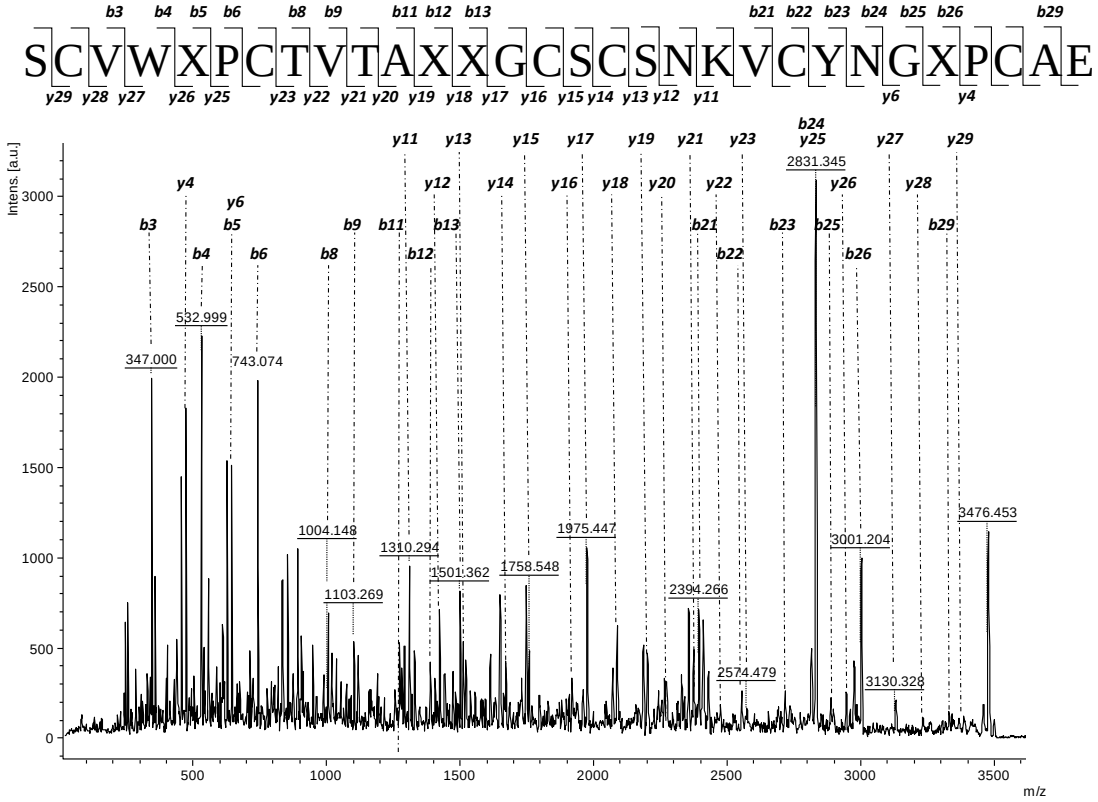


Figura 67 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 3476,411 oriundo da digestão com tripsina da substância **9**. Os valores *m*/*z* mostrados são monoisotópicos.

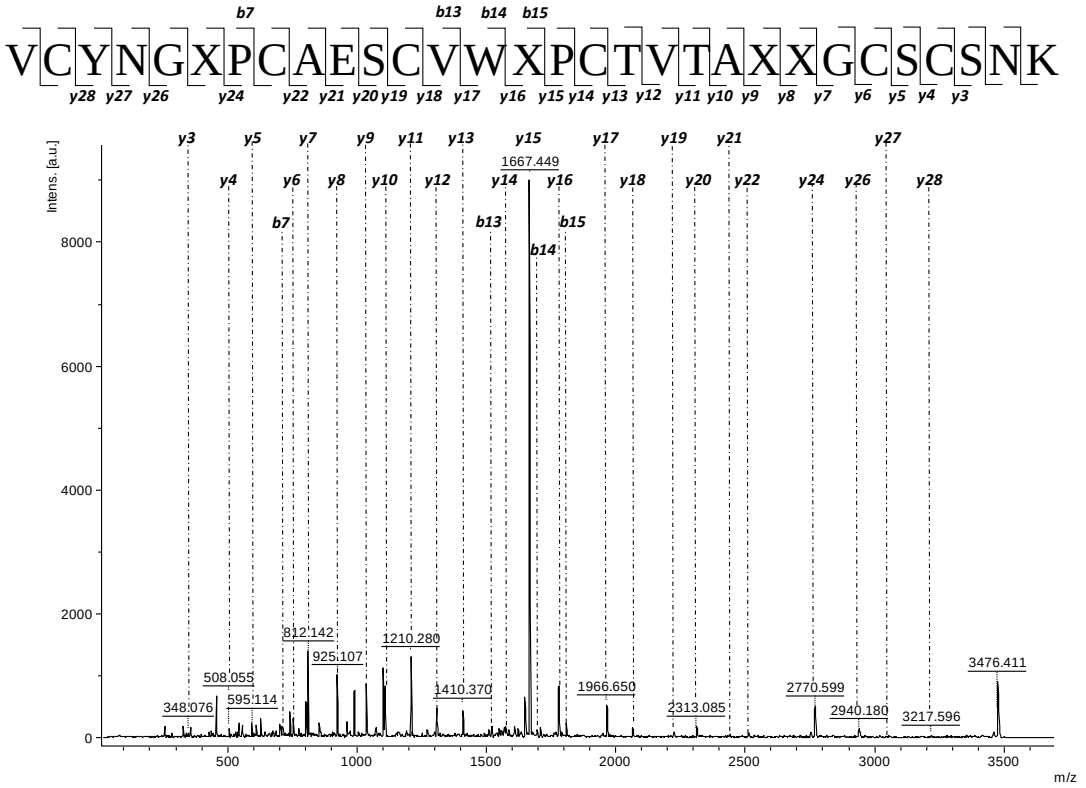


Figura 68 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m*/*z* 1292,548 advindo da digestão com quimiotripsina da substância **9**. Os valores *m*/*z* mostrados são monoisotópicos.

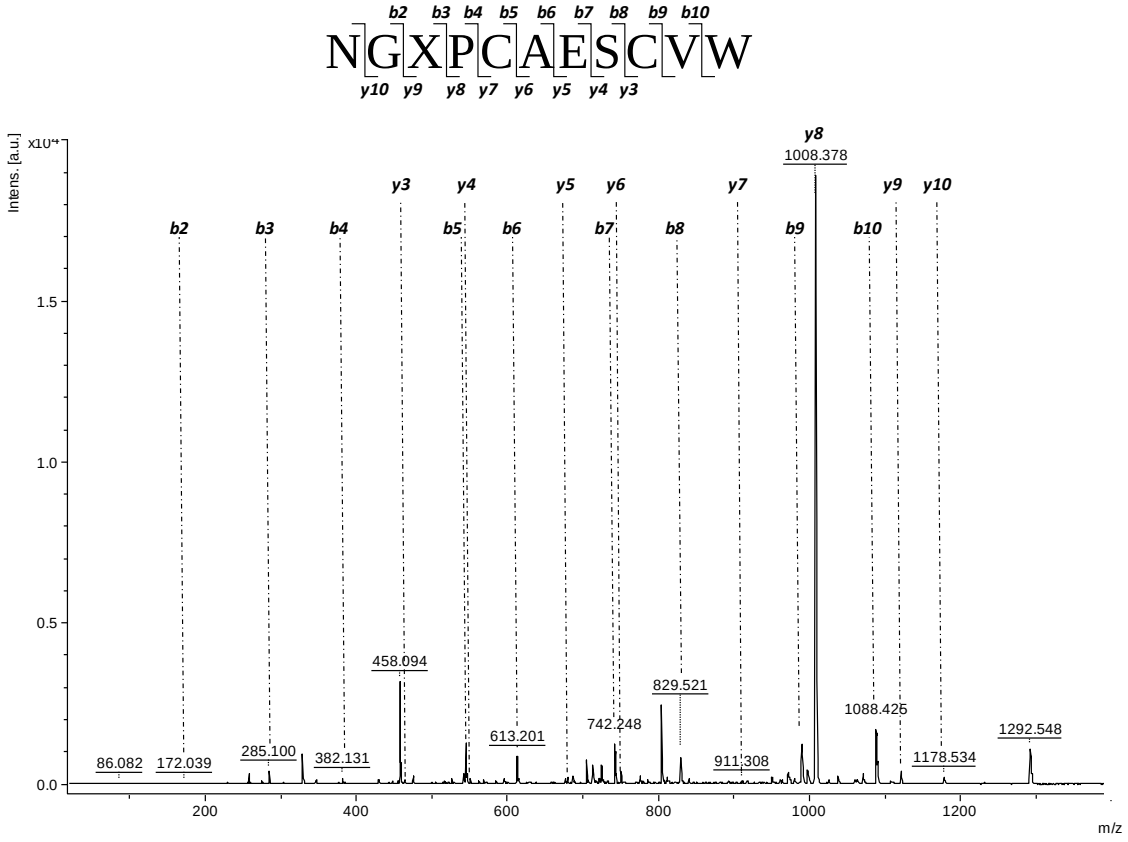


Figura 69 - Espectro MALDI-(+)-TOF-MS/MS do íon *m/z* 1234,465 advindo da digestão com quimiotripsina da substância **9**. Os valores *m/z* mostrados são monoisotópicos.

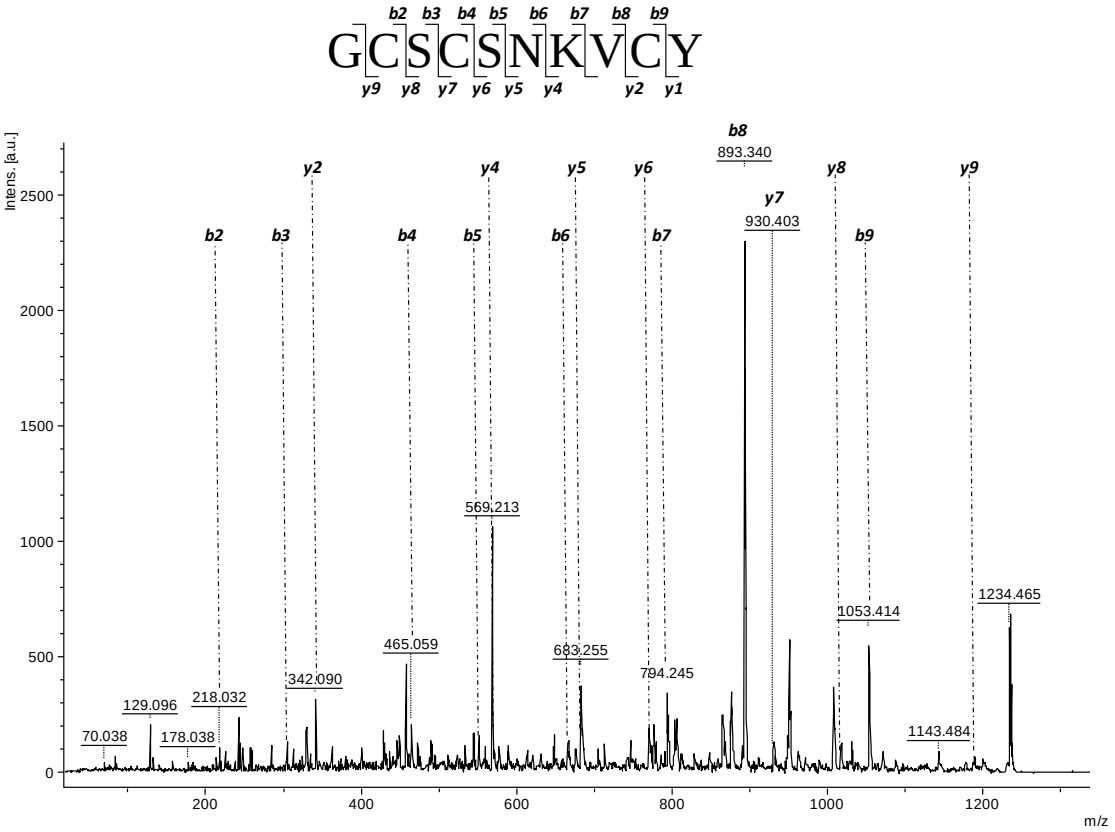


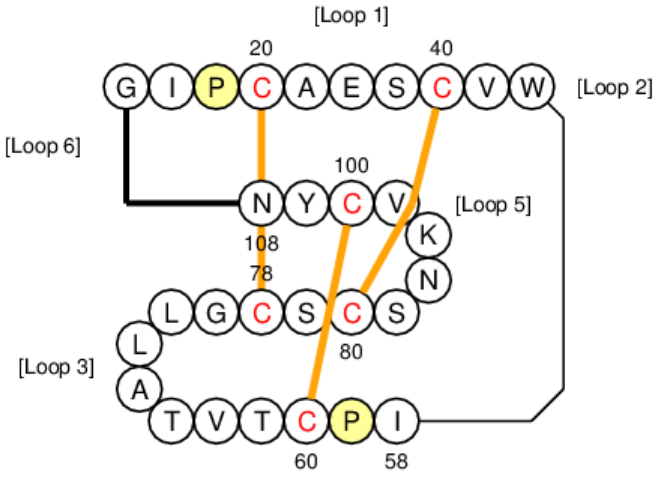
Tabela 31 - Sequências de aminoácidos identificados por MALDI-TOF-MS/MS nos fragmentos da digestão enzimática da substância **9**. A letra X representa os resíduos isóbaros Ile/Leu. Em azul o resíduo de leucina (L[19]) identificado indiretamente através do fragmento de *m/z* 1234,465. Em verde os resíduos isóbaros que não foram identificados no sequenciamento *de novo*.

Enzima	***m/z***	**Sequência**
EndoGlu-C	3476,453	C-A-E-S-C-V-W-X-P-C-T-V-T-A-X-X-G-C-S-C-S-N-K-V-C-Y-N-G-X-P
Tripsina	3476,411	C-A-E-S-C-V-W-X-P-C-T-V-T-A-X-X-G-C-S-C-S-N-K -C-Y-N-G-X-P
Quimiotripsina	1292,548	C-A-E-S-C-V-W- -N-G-X-P
Quimiotripsina	1234,465	(L)-G-C-S-C-S-N-K-V-C-Y-
Sequência final		C-A-E-S-C-V-W-X-P-C-T-V-T-A-X-L-G-C-S-C-S-N-K-V-C-Y-N-G-X-P

Loop	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

Figura 70 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo vhr 1 (**9**), isolado das raízes da espécie *Noisettia orchidiflora*. Este ciclotídeo já foi reportado na espécie *Viola hederacea* (Violaceae) (TRABI; CRAIK, 2004).



Fonte: Molécula desenhada *online* no *site* Cybase (Wang *et al.* 2008a).

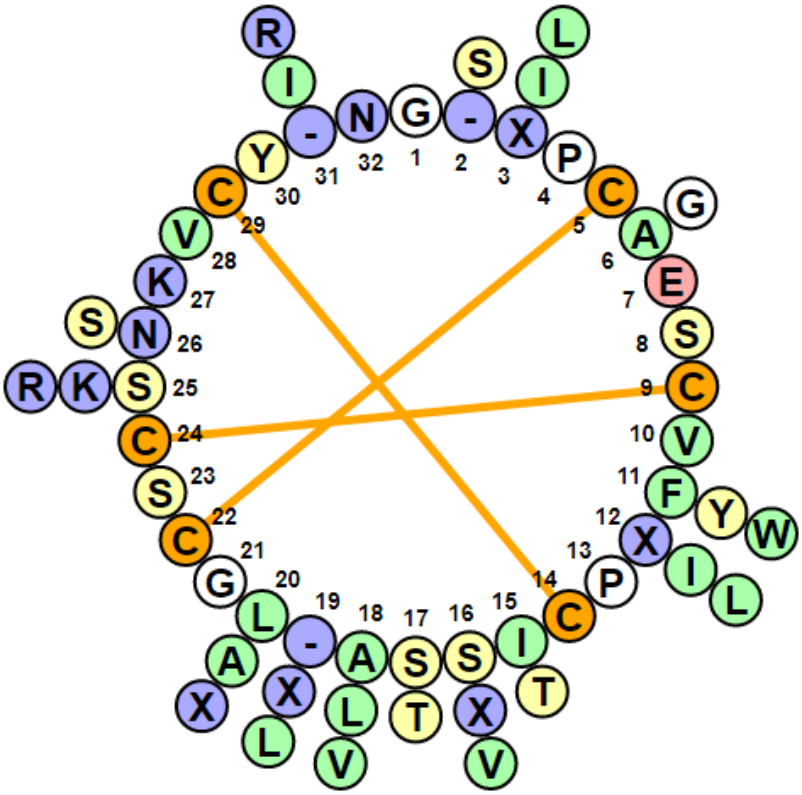
Um alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos das substâncias nor E (**6**), nor F (**7**), nor G (**8**) e vhr 1 (**9**) isoladas das raízes e folhas da espécie *N. orchidiflora* (Figura 71) permite observar as semelhanças e diferenças entre elas. Com destaque para os seis resíduos de cisteína (em vermelho) responsáveis pela formação do arranjo *CCK* e o resíduo de ácido glutâmico (em azul), característico do *loop* 1.

Figura 71 - A) Alinhamento múltiplo das sequências gerado com a ferramenta ClustalW dos ciclotídeos nor E (**6**), nor F (**7**), nor G (**8**) e vhr 1 (**9**) isolados neste estudo das raízes da espécie *Noisettia orchidiflora* (Violaceae), em vermelho os seis resíduos de cisteína característicos dos ciclotídeos e em azul o resíduo de ácido glutâmico conservado no *loop* 1. A letra X representa os resíduos isóbaros de leucina e isoleucina. B) Representação *Sequence Diversity Wheel*. 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.

A

```
nor G          G-XPCAESCVYXPCTXTAXXGCSCRSKVCY-N
vhr 1          G-IPCAESCVWIPCTVTALLGCSCSNKVCY-N
nor E          GSLPCGESCVFLPC-ISSLAGCSCKNKVCYIN
nor F          G-XPCGESCVFXPC-ISSVLGCSCSNKVCYRN
```

B



Fonte: A) genome.jp/tools-bin/clustalw B) desenhada *online* no *site* Cybase (WANG *et al.* 2008a)

4.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.7.1 Atividade antiplasmodial

As frações ricas em ciclotídeos (NO_C_80 e AP_C_80) apresentaram inibição acima de 50% na concentração de 50 $\mu g.mL^{-1}$ (Tabela 32). Estas frações foram tituladas (50-0,049 $\mu g.mL^{-1}$) em teste contra *Plasmodium falciparum* para determinação do valor de IC_{50}.

As primeiras concentrações das frações mostraram atividade hemolítica (50 e 25 $\mu g.mL^{-1}$), dessa forma não foi possível determinar o valor exato de seus respectivos IC_{50}.

Na concentração de 12,5 $\mu g.mL^{-1}$, que não causou hemólise, as frações não atingiram 50% de redução (Tabela 33). Dessa forma, as frações apresentaram valor de IC_{50} >12,5 $\mu g.mL^{-1}$, e foram consideradas inativas.

Tabela 32 - Atividade inibitória na concentração de 50 $\mu g.mL^{-1}$ das frações ricas em ciclotídeos obtidas das espécies *A. pyrifolia* e *N. orchidiflora* contra *P. falciparum*, cepa 3d7, sensível a cloroquina.

Amostra	% de Inibição
NO_C_80	76
NO_F_80	40
AP_C_3_80	64

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

Tabela 33 - Concentração inibitória de 50% (IC_{50}) das frações NO_C_80 e AP_C_80 contra *P. falciparum*, cepa 3d7, sensível a cloroquina.

Amostra	IC_{50}
NO_C_80	>12,5 $\mu g.mL^{-1}$
AP_C_80	>12,5 $\mu g.mL^{-1}$

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

4.7.2 Atividade antibacteriana

As frações ricas em ciclotídeos de ambas espécies (NO_C_80, NO_R_80, NO_F_80, AP_C_80 e AP_C_80_P_F_0), assim como os padrões cloranfenicol e melitina, foram testadas contras duas cepas de bactérias Gram-positiva (*S. aureus* e *S. pneumoniae*) e duas Gram-negativa (*E. coli* e *B. subtilis*). A Tabela 34 mostra os resultados obtidos nos ensaios de atividade antibiótica. Todas as frações avaliadas não

inibiram o crescimento bacteriano no ensaio escolhido. Nota-se ainda a alta atividade dos padrões testados.

Tabela 34 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) expressos em µg.mL^{-1}, das frações ricas em ciclotídeos das espécies *N. orchidiflora* e *A. pyrifolia* e dos padrões do experimento (cloranfenicol e melitina) frente às bactérias *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *S. pneumoniae.*

Amostra	Valores de CIM (µg.mL^{-1})			
	S. aureus	*B. subtilis*	*E. coli*	*S. pneumoniae*
NO_F_80	>500	>500	>500	>500
NO_C_80	>500	>500	>500	>500
NO_R_80	>500	>500	>500	>500
AP_C_80	>500	>500	>500	>500
AP_C_80_P_F_0	>500	>500	>500	>500
cloranfenicol	4	4	4	4
melitina	2	2	2	1

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

4.7.3 Atividade inseticida

Neste ensaio foi avaliada a atividade inseticida *in vivo* dos ciclotídeos cyO4 (**1**) e apy A (**3**) em abelhas recém-emergidas da espécie *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). O critério de seleção foi baseado na disponibilidade de massa para a realização dos testes.

Os testes de toxicidade aguda determinam a concentração em que uma substância tem efeitos deletérios sobre um grupo de organismos sob condições controladas durante um curto período de exposição em relação à vida útil do organismo testado (WALKER, 2012). Uma forma de realizar avaliações de risco é através da concentração letal média (CL_{50}), que permite avaliar a concentração de uma substância que causa a morte de 50% da população em 24 ou 48 horas, e é impossível estabelecer a quantidade absorvida pelo organismo (RORTAIS *et al.* 2005).

Após 24 horas de exposição, no ensaio de inoculação, a cyO4 (**1**) (CL_{50} 76,8 µM) apresentou uma toxicidade 3,5 vezes maior que apy A (**3**) (CL_{50} 262,4 µM) (Tabela 35).

A hidrofobicidade desempenha um papel fundamental na potência dos ciclotídeos, sendo considerada uma propriedade físico-química importante dos mesmos que está correlacionada à carga líquida global de peptídeos (GERLACH; MONDAL, 2012). Na literatura, várias atividades biológicas dos ciclotídeos mostraram correlação com a

hidrofobicidade, sendo observadas maiores bioatividades à medida que aumenta a superfície hidrofóbica (WANG *et al.* 2008b; DALY *et al.* 2010). Os resultados relatados neste estudo não condizem com esta observação, sendo o mais hidrofílico dos ciclotídeos avaliados (cyO4) o mais potente (Tabela 35). No entanto, em 2011, Ovesen e colaboradores observaram em um estudo sobre fitotoxicidade de ciclotídeos um resultado similar ao nosso.

Tabela 35 - Concentração letal de 50% (CL_{50}) obtida através do método de injeção, dos ciclotídeos apy A (**3**) e cyO4 (**1**) isolados da raiz de *A. pyrifolia*, contra a abelha Africanizada *Apis mellifera*, depois de 24 h de exposição. O inseticida comercial dimetoato foi empregado como controle positivo.

Ciclotídeo	Tempo	N[a]	CL_{50}[b](µM)	*Pr* (>χ^2)	Inclinação	Intercepto
cyO4 (**1**)	24	270	76,8 (38,9-118,8)	<0,0001	2,40	-0,52
apy A (**3**)	24	240	262,4 (169,5-355,5)	<0,0001	3,51	-2,05
dimetoato	24	240	444,9 (160,9-751,1)	<0,0001	3,54	-0,34

[a]Número de abelhas testadas. [b]Concentração que causa a morte de 50% da população em µM. O intervalo de confiança é de 95%.
Fonte: Dados da pesquisa, 2020

Do ponto de vista estrutural, os ciclotídeos avaliados mostram diferenças na sua sequência, sendo a cyO4 (carga neta +2), mais hidrofílico que apy A (neutro) (Tabela 36). Assim, acreditamos que a presença dos resíduos **K^{23}**, **K^{25}** (*loop 5*) e **R^{29}** (*loop 6*) no ciclotídeo cyO4 são importantes para aumentar a atividade inseticida contra *A. mellifera*. No entanto, outros estudos precisaram ser feitos para comprovar esta hipótese, assim como para desvendar seu mecanismo de ação.

Mesmo não sendo uma atividade desejada, tendo em consideração que *Apis mellifera* é um dos principais polinizadores a nível mundial, é um resultado relevante, pois na literatura só existiam estudos avaliando a atividade inseticida frente a pragas de lavouras (Tabela 3, página 36).

Tabela 36 - Comparação das sequências de aminoácidos dos ciclotídeos cyO4 (**1**) e apy A (**3**), isolados da raiz da espécie *A. pyrifolia*. Ressaltando em vermelho os resíduos de aminoácido com carga positiva e em azul os seis resíduos de cisteína característicos dos ciclotídeos.

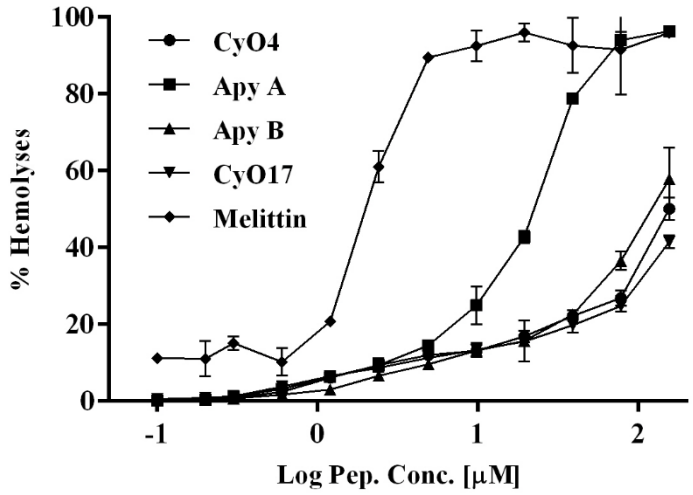
Ciclotídeo	**M.M (Da)**	**Carga Neta**	**Sequência**
cyO4	3165,38	+2	CGESCVWIPCISSAIGCSCKNKVCYRNGI--P
apy A	3216,38	0	CGESCVWIPCISGILGCSCSNKVCYYNGSVP

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020
Legenda: M.M massa molecular

4.7.4 Atividade hemolítica

Para pesquisar o potencial de bioatividades, os ciclotídeos puros **1**, **2**, **3** e **4**, isolados das raízes da espécie *A. pyrifolia*, foram submetidos a avaliação de sua atividade hemolítica (Figura 72). A melitina, um conhecido peptídeo hemolítico (PÉREZ-PAYÁ *et al.* 1997), foi utilizado como controle positivo e para comparação dos valores absolutos de hemólise nas condições estudadas.

Figura 72 - Atividade hemolítica dos ciclotídeos apy A, apy B, cyO4 e cyO17, isolados da raiz da espécie *A. pyrifolia*, em doze concentrações diferentes (0,1 - 156 µM). 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.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020

Apy A (**3**) é o mais hidrofóbico dos ciclotídeos avaliados e também o mais hemolítico, DH_{50} 22 µM; o que está de acordo com estudos anteriores que sugeriram que a atividade hemolítica dos ciclotídeos está correlacionada com a hidrofobicidade (CHEN *et al.* 2006). Nas mesmas condições, apy B (**4**), cyO4 (**1**) e cyO17 (**2**) foram menos ativos e não atingiram o 50% de destruição dos eritrócitos na máxima concentração testada, 156 µM.

Para comparação, na concentração de 78 µM, existe uma diferença superior a 3,5 vezes entre o ciclotídeo mais hemolítico, apy A (94% de hemólise) e o menos hemolítico, cyO17 (~ 24% de hemólise).

A sensibilidade da atividade hemolítica à variação na sequência dos ciclotídeos é evidente quando se compara a cyO2 (DH_{50} ~ 36 µM) (IRELAND *et al.* 2006a) e cyO4 (DH_{50} > 156 µM). Nas sequências de aminoácidos desses ciclotídeos só existe uma única diferença, a substituição de uma serina (Ser) no *loop 5* da cyO2 por uma asparagina (Asn) na mesma posição da cyO4 (Tabela 37). No entanto, a mudança estrutural da hidroxila na cadeia lateral da serina pela função amida, na asparagina, provoca uma diferença 4 vezes maior no DH_{50}.

Tabela 37 - Comparação das sequências de aminoácidos, DH_{50} e massa molecular dos ciclotídeos cyO2 e cyO4. Ressaltando em azul, o único resíduo de aminoácido que varia entre eles.

Ciclotídeo	M.M (Da)	DH_{50} (µM)	Sequência
cyO4	3165,4	> 156	CGESCVWIPCISSAIGCSCKNKVCYRNGIP
cyO2	3138,4	~ 36	CGESCVWIPCISSAIGCSCKSKVCYRNGIP

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.
Legenda: M.M, massa molecular; DH_{50}, dose hemolítica de 50%.

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 ciclotídeos 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 ciclotídeos reportados da biodiversidade brasileira, visto que atinge o dobro de substâncias já descritas.

Adicionalmente, as frações ricas em ciclotídeos, das espécies em estudos, foram avaliadas nos ensaios de atividade antiplasmodial e antibacteriana, e mostraram-se inativas. Por outro lado, os ciclotídeos cyO4 (**1**) e apy A (**3**) mostraram atividade inseticida *in vivo* contra abelha africanizada *Apis mellifera*, através do ensaio de inoculação, com CL_{50} de 76 e 262 µM, respectivamente. Este é o primeiro estudo que avalia a toxicidade dos ciclotídeos frente um polinizador. Além disso, foi avaliada a atividade hemolítica dos ciclotídeos apy A, apy B, cyO4 e cyO17 frente a eritrócitos humanos. Apy A (**3**) foi o mais hemolítico com DH_{50} 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 1st 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-ocurring 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 cyclotides 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 β-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. 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 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. Oxytocic 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 Medicinais: 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 b1has 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 ^{1}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. Anthelminthic 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 ciclotídeos 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/jornal.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 *Tetrapterys 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 byciclic 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.

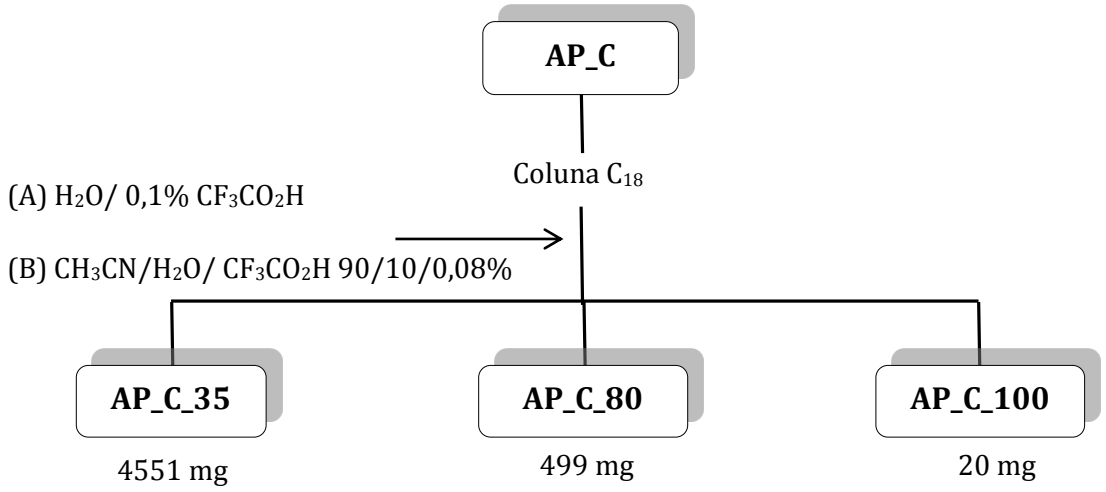
ZHU, H. et al. Chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Viola*. **Chem. Biodiversity**, v. 12, p. 1777-1808, 2015.

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.

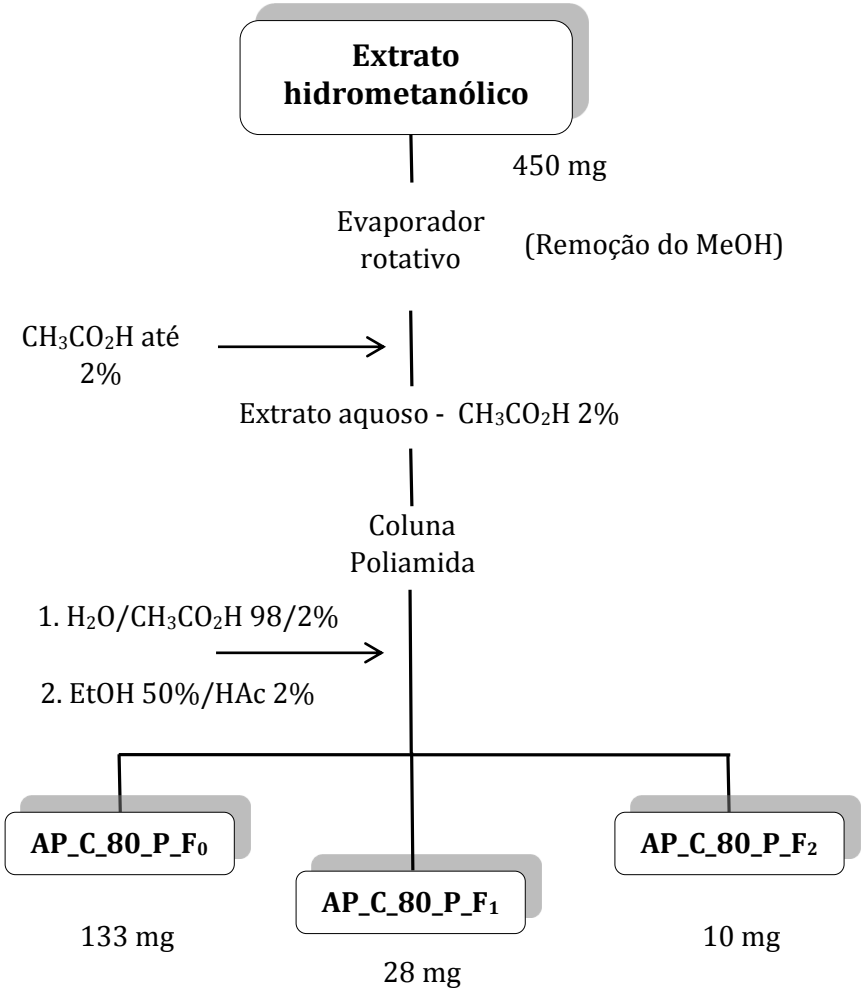
ZORZI, A. et al. Cyclic peptides therapeutics: past, present and future. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 38, p. 24-29, 2017.

APÊNDICES

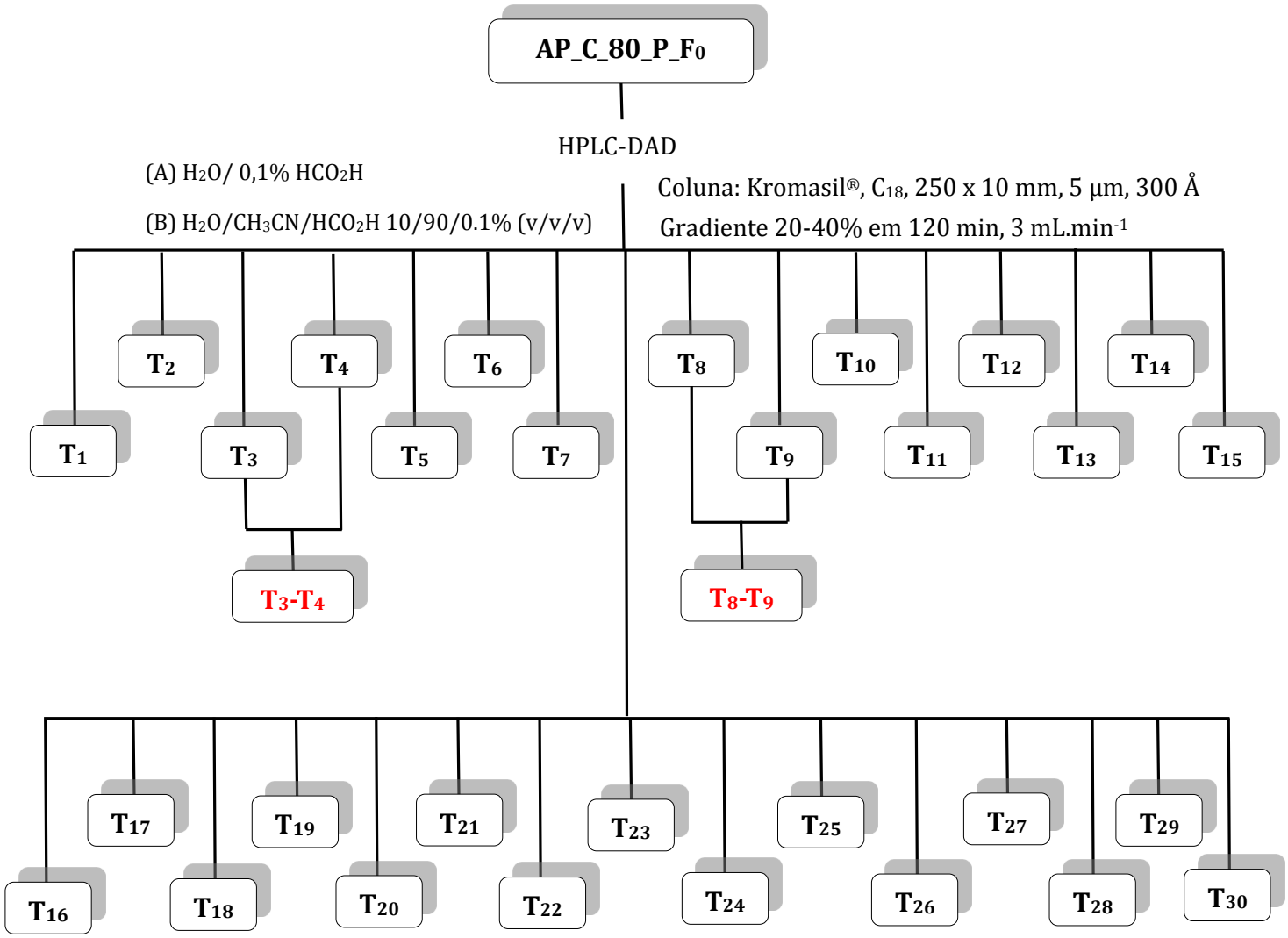
Apêndice 1 - Pré-purificação do extrato aquoso **AP_C** do caule da espécie *Anchietea pyrifolia*



Apêndice 2 - Metodologia empregada para remoção de taninos da fração AP_C_80 do caule de *A. pyrifolia*



Apêndice 3 - Fracionamento por HPLC-DAD em escala semipreparativa de AP_C_80_P_F_0 obtida do caule da espécie *Anchietea pyrifolia*. Ressaltadas em vermelho as frações que continham as substâncias majoritárias (**1** e **2**) (ver seção 3.5.1.1, página 52).



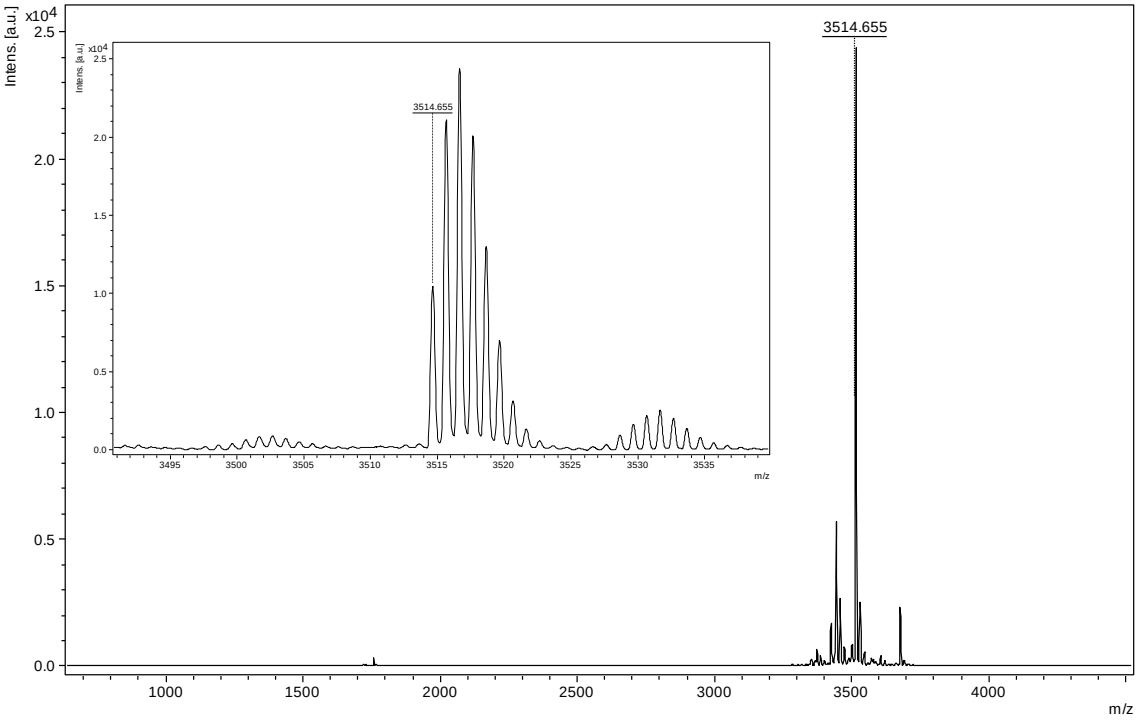
Apêndice 4 - Resumo dos íons (*m*/*z*) e suas respectivas massas moleculares identificados através da técnica DI-ESI-(+)-IT-MS nas frações obtidas no fracionamento de AP_C_80_P_F_0. *Massas moleculares mostradas foram calculadas a partir dos valores de *m*/*z* monoisotópicos. ** As massas moleculares foram comparadas com aquelas de ciclotídeos reportados (www.cybase.org.au, HELLINGER *et al.* 2015 e RAVIPATI *et al.* 2017) e o nome atribuído quando a diferença foi de ± 0,5 Da.

Fração	*m*/*z*	Massa Molecular (Da)*	Ciclotídeo**
T_2	1110,2	3327,6	-
	1164,2	3489,6	-
T_3	1056,2	3165,6	cicloviolacina O4, chaC3
	1110,2	3327,6	-
T_4	1056,2	3165,6	cicloviolacina O4, chaC3
	1110,2	3327,6	-
T_5	1056,2	3165,6	cicloviolacina O4, chaC3
	1110,2	3327,6	-
T_6	1056,2	3165,6	cicloviolacina O4, chaC3
	1083,8	3248,4	cter 27, cter 28
	1158,8	3473,4	-
T_7	1104,9	3311,7	-
	1158,9	3473,7	-
T_8	1041,8	3122,4	cicloviolacina O13
	1050,9	3149,7	cicloviolacina O17, circulina A
	1095,8	3284,4	hyfl E
	1104,8	3311,4	-
T_9	1041,8	3122,4	cicloviolacina O13
	1050,9	3149,7	cicloviolacina O17, circulina A
	1104,8	3311,4	-
T_{10}	1050,9	3149,7	cicloviolacina O17, circulina A
	1247,2	3738,6	-
	1075,5	3223,5	-
	1193,2	3576,6	-
T_{11}	1193,2	3576,6	-
	1247,2	3738,6	-

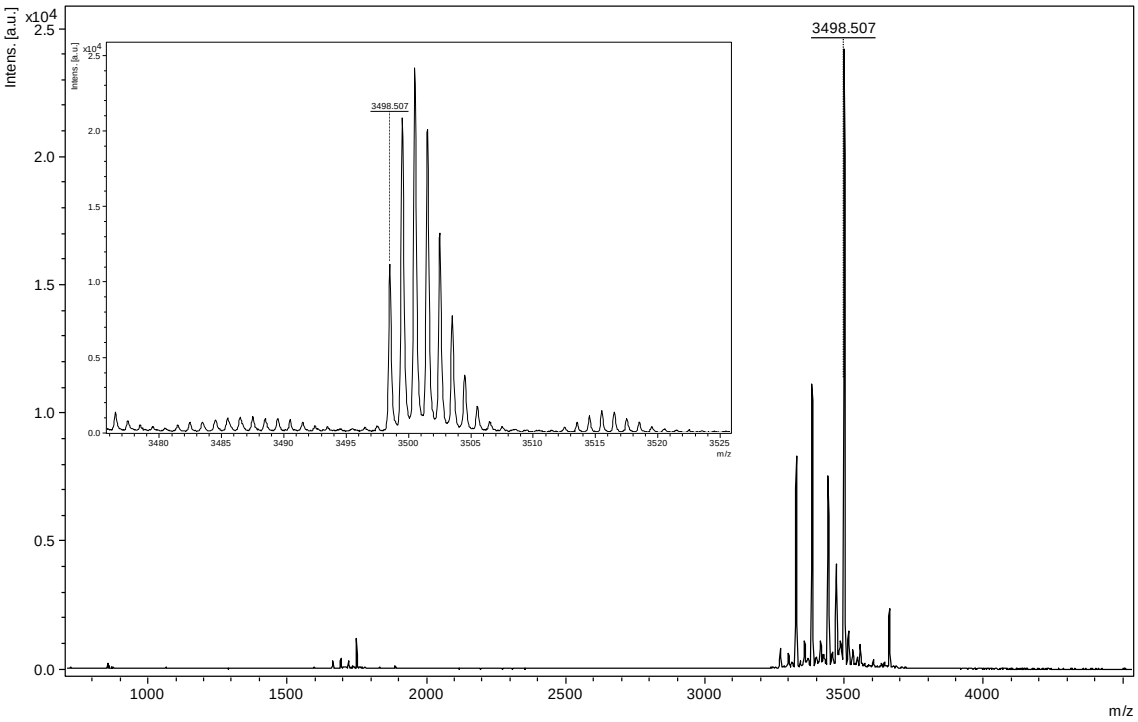
	1075,5	3223,5	-
	1062,8	3185,4	cter 33
T_{12}	1139,2	3414,6	-
	1193,2	3576,6	-
T_{13}	1139,2	3414,6	-
	1193,2	3576,6	-
T_{14}	1085,2	3252,6	vigno 7
	1139,1	3414,3	-
T_{15}	1085,2	3252,6	vigno 7
	1139,2	3414,6	-
T_{16}	1085,1	3252,3	vigno 7
	1070,1	3207,3	-
	1050,4	3148,2	hyfl k, vibi k
T_{17}	1060,2	3177,6	cicloviolacina O14
T_{18}	1085,1	3252,3	vigno 7
T_{19}	1104,5	3310,5	-
	1092,1	3273,3	-
T_{20}	1094,4	3280,2	-
	1104,4	3310,2	-
	1085,1	3252,3	vigno 7
T_{21}	1091,1	3270,3	kalata B9, vibi H, chaC15, cter 9
	1229,2	3384,6	-
T_{22}	1091,1	3270,3	kalata B9, vibi H, chaC15, cter 9
	998,0	2991,0	-
T_{23}	1063,8	3188,4	-
	998,0	2991,0	-
T_{24}	1063,7	3188,1	-
	1076,4	3226,2	cicloviolacina O19
T_{25}	1122,5	3364,5	-
	1018,4	3052,2	-
T_{26}	1068,4	3202,2	-
	1075,7	3224,1	-

T_{27}	1059,8	3176,4	-
	1113,8	3338,4	-
	1127,8	3380,4	-
	1073,8	3218,4	-
	999,4	2995,2	-
T_{28}	969,0	2904,0	vigno 4, chacur 1, riden A, psysol 2
	1005,8	3014,4	-
	1059,8	3176,4	-
	1073,8	3218,4	-
T_{29}	1005,8	3014,4	
	1019,8	3056,4	
	1073,8	3218,4	
T_{30}	968,4	2902,2	-
	1019,8	3056,4	-
	1089,7	3266,1	-

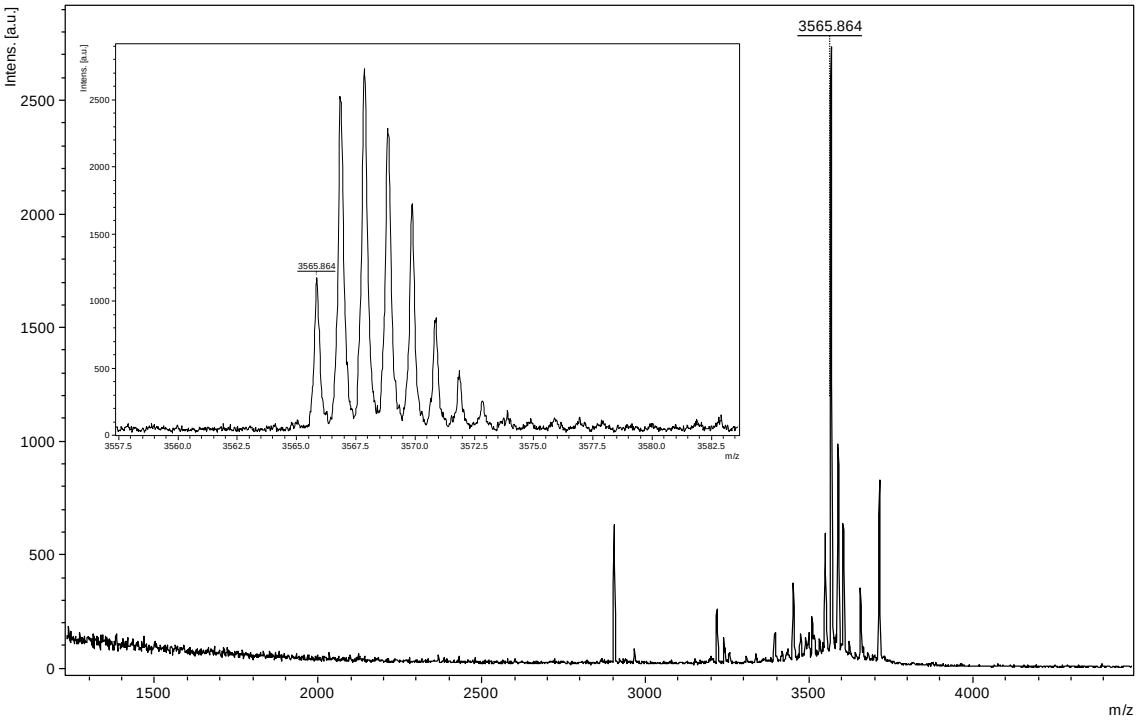
Apêndice 5 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **1**, após reações de redução e alquilação. O valor *m*/*z* mostrado é monoisotópico.



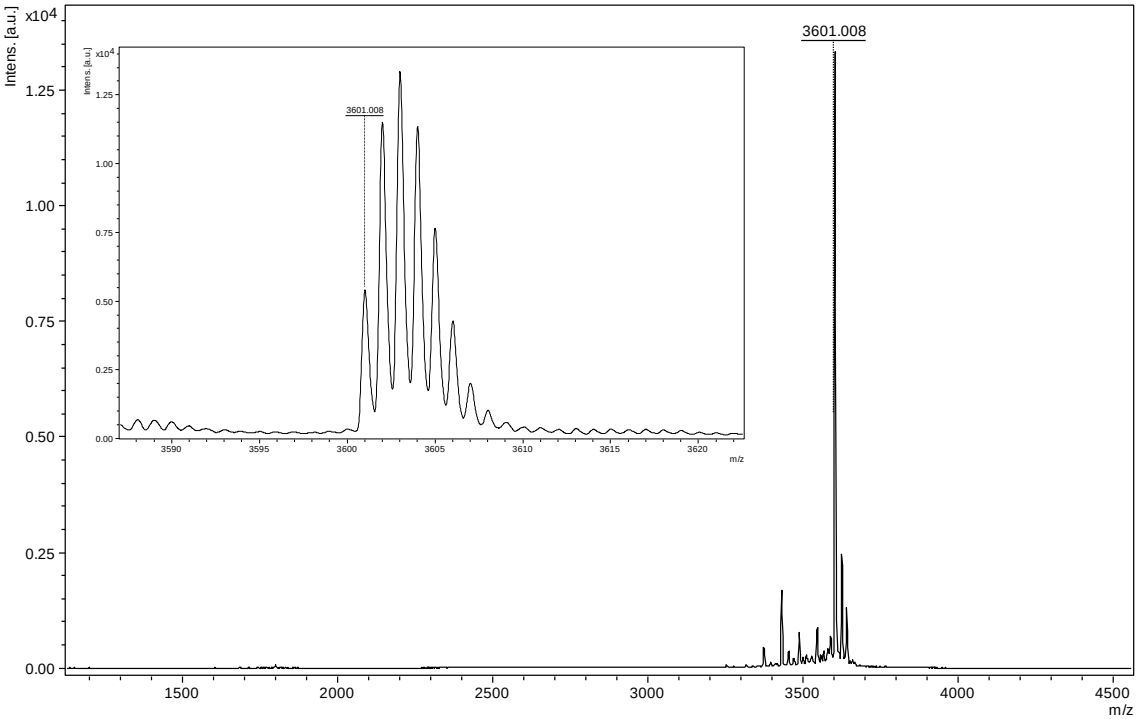
Apêndice 6 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **2**, após reações de redução e alquilação. O valor *m*/*z* mostrado é monoisotópico.



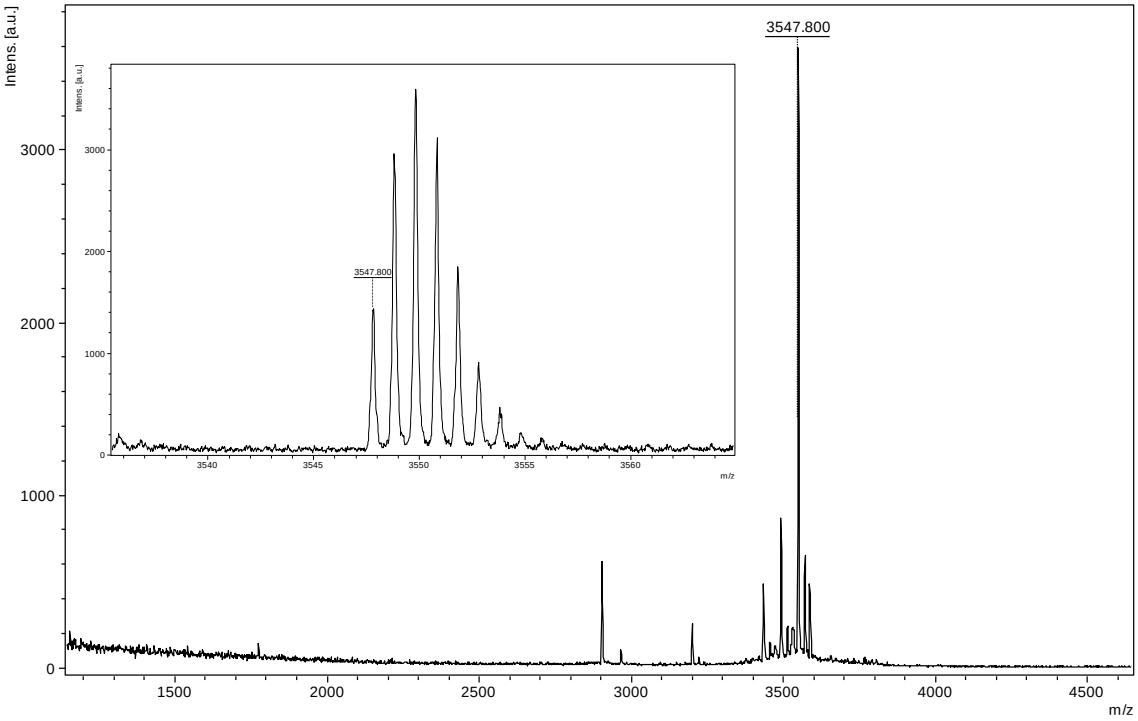
Apêndice 7 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **3**, após reações de redução e alquilação. O valor *m*/*z* mostrado é monoisotópico.



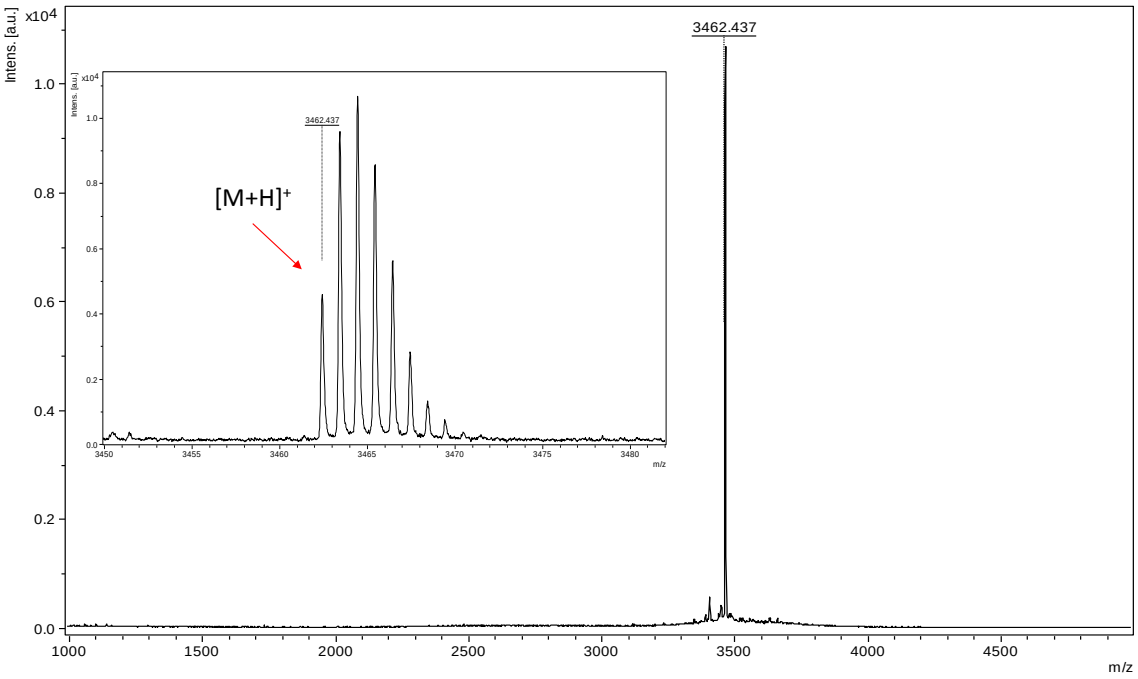
Apêndice 8 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **4**, após reações de redução e alquilação. O valor *m*/*z* mostrado é monoisotópico.



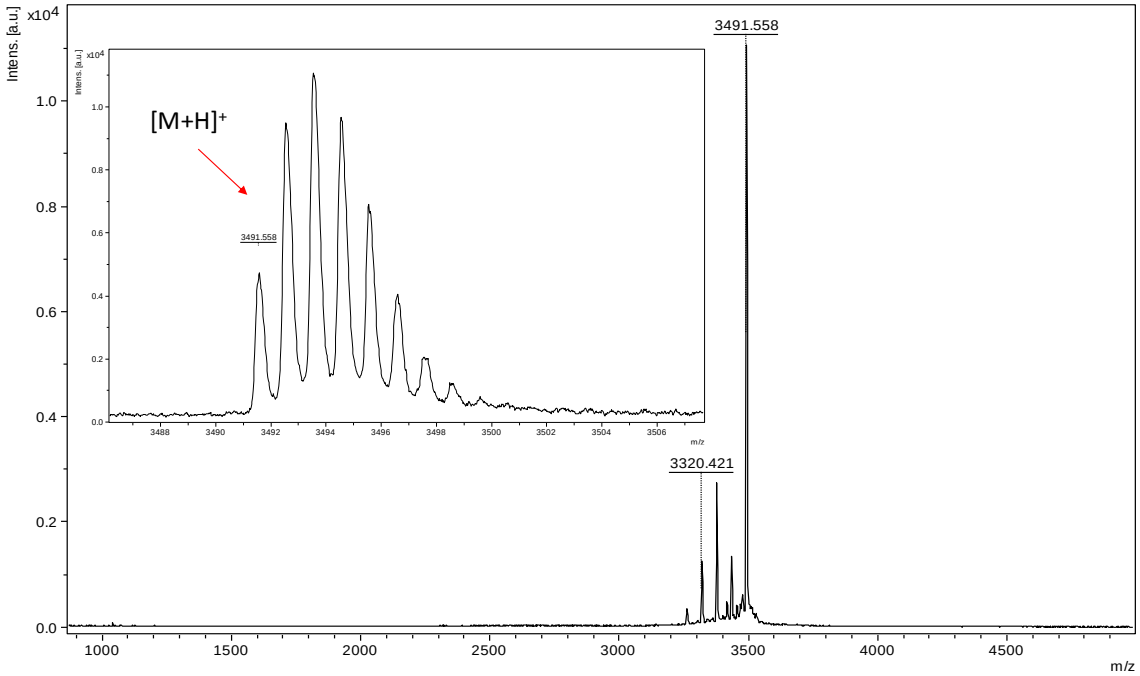
Apêndice 9 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **5**, após reações de redução e alquilação. O valor *m*/*z* mostrado é monoisotópico.



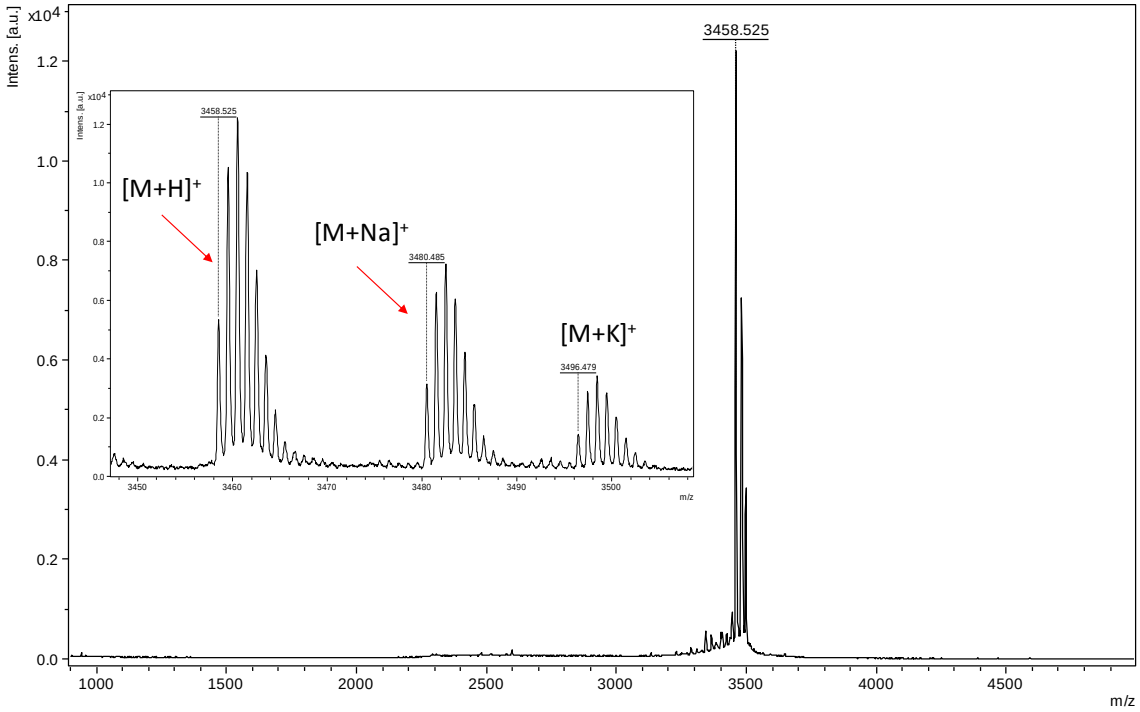
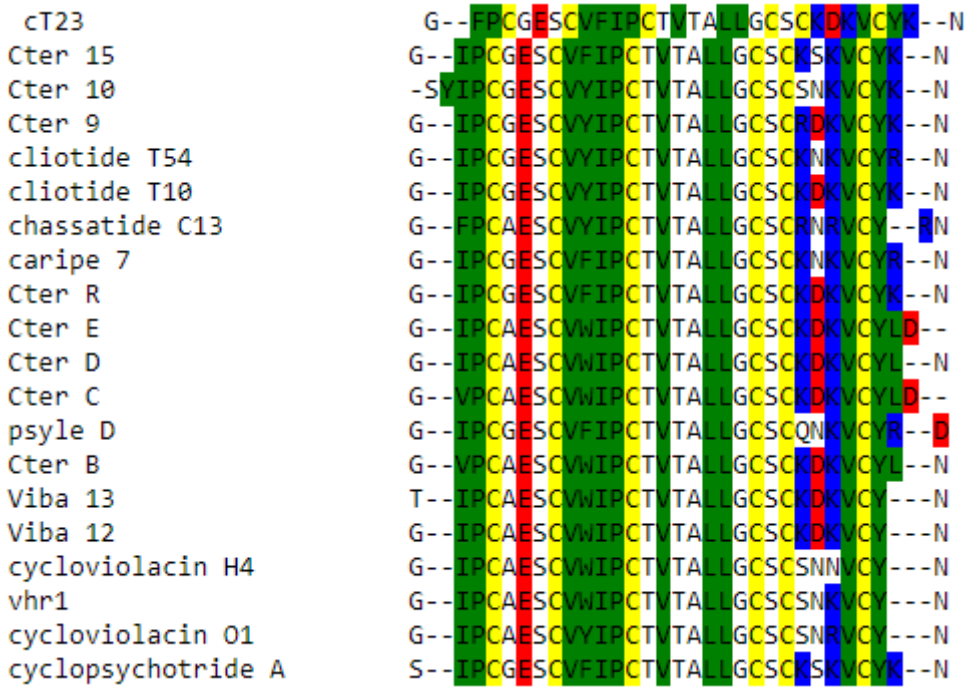
Apêndice 10 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **7**, após reações de redução e alquilação. O valor *m*/*z* mostrado é monoisotópico.



Apêndice 11 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **8**, após reações de redução e alquilação. O valor *m*/*z* mostrado é monoisotópico.



Apêndice 12 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância **9**, após reações de redução e alquilação. O valor *m*/*z* mostrado é monoisotópico.



Apêndice 13 - Alinhamento múltiplo dos ciclotídeos reportados na base de dados Cybase (www.cybase.org.au) que possuem a sequência TVTALLG no *loop* 3.