

JHENNIFER PRISCILA NASTRI

**Orbitídeos de Euphorbiaceae, caracterização química e síntese:  
prospecção racional de peptídeos cíclicos com potencial  
antitumoral**

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

Orientadora: Profa Dra Vanderlan da Silva Bolzani

Araraquara  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

N269o NASTRI, Jhennifer Priscila  
Orbitídeos de Euphorbiaceae, caracterização química e síntese: prospecção racional de peptídeos cíclicos com potencial antitumoral / Jhennifer Priscila NASTRI. – Araraquara : [s.n.], 2019  
87 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Vanderlan da Silva Bolzani

1. Peptídeos cíclicos. 2. Peptídeos - Síntese. 3. Fármacos. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. 5. Espectrometria de massa. I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação  
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

NASTRI, J. P. **Orbitídeos de Euphorbiaceae, caracterização química e síntese: prospecção racional de peptídeos cíclicos com potencial antitumoral.** 2019. 87 f. Dissertação (mestrado em Biotecnologia). Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 2019.

<b>Página</b>	<b>Linha</b>	<b>Onde se lê</b>	<b>Leia-se</b>
9	18	A FAPESP pela bolsa concedida.	A Fundação de Amparo de Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado (2017/12326-9) concedida.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Orbitídeos de Euphorbiaceae, caracterização química e síntese: prospecção racional de peptídeos cíclicos com potencial antitumoral"

AUTORA: JHENNIFER PRISCILA NASTRI

ORIENTADORA: VANDERLAN DA SILVA BOLZANI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof.º Dr.º VANDERLAN DA SILVA BOLZANI  
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI  
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Prof. Dr. LUIS OCTÁVIO REGASINI  
Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP - São José do Rio Preto

Araraquara, 02 de abril de 2019

## **Dados curriculares**

Jhennifer Priscila Natri

### **Nome em citações bibliográficas**

Natri, J. P.

### **Endereço Profissional**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara.

Unesp - Campus de Araraquara

Jardim Quitandinha

14800900 - Araraquara, SP – Brasil

### **Formação acadêmica/titulação**

#### **2017 – 2019**

Mestrado em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanderlan da Silva Bolzani.

Bolsista: Fapesp

#### **2011 – 2017**

Graduação em Farmácia-bioquímica

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanderlan da Silva Bolzani.

Bolsista: Fapesp

#### **2016 – 2016**

Estágio de Pesquisa no Exterior

Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), Paris – França.

Orientadoras: Prof<sup>a</sup> Chahrazade El Amri e Prof<sup>a</sup> Michèle Reboud-Ravaux.

Bolsista: BEPE-FAPESP

## **Formação complementar**

### **2017**

Estagio docência em Química Orgânica Experimental para o curso de bacharelado em Química, pelo programa de pós-graduação em biotecnologia, sob a supervisão da Profª Drª Maysa Furlan (Instituto de Química - UNESP).

### **2013-2016**

Bolsista de iniciação científica FAPESP (Processo 2014/07823-5). Título do projeto: “Ressonância Magnética Nuclear aplicada ao estudo metabólico de *Casearia sylvestris*, variedade *C. sylvestris*, conhecida tradicionalmente como antiúlcero gênica, e da variedade *C. língua*” sob orientação da Profª. Drª. Vanderlan da Silva Bolzani.

### **2015**

Participação no treinamento “Thomson Reuters”, realizada em Araraquara-SP.

### **2013**

Participação no curso “Proteases and protease inhibitors: structural, mechanistic and physiopathological aspects”, realizada em Araraquara-SP.

### **2013**

Participação no curso “São Paulo Advanced School on Bioorganic Chemistry”, realizada em Araraquara-SP.

### **2013**

Participação da “Conferencias USP “Modern Topics in Magnetic Resonance”, realizada em São Paulo-SP.

### **2012**

Participação do “Mini-curso introdução à instrumentação para RMN” realizada em São Carlos-SP, com carga horária de 16h.

### **2012**

Participação da “XII Jornada Brasileira de Ressonância Magnética”, realizada na USP/São Carlos-SP.

### **2012-2012**

Bolsista de estágio técnico do Programa de Apoio ao Projetos Temáticos e Multiusuários da UNESP, no projeto “RMN Heteronuclear Multidimensional (16,4 T): Uma nova concepção na pesquisa em química estrutural de materiais naturais e sintético”, sob orientação da Profª. Drª. Vanderlan da Silva Bolzani. Edital 02/2012 da Pró-Reitoria de Pesquisa.

### **2011**

Participação na “I Mostra da Sustentabilidade” como monitora das oficinas “Transformando óleo de cozinha em sabão” e “Reciclagem de papel”, realizada em Bauru-SP com carga horária de 6h.

## 2011

Participação da “XIII Semana de Assistência Farmacêutica estudantil” como voluntária no estande de “Primeiros socorros e prevenção de Acidentes”, com carga horária de 17h.

## 2011

Participação da “Feira de Profissões da UNESP” realizada em Araraquara-SP.

## 2011-2011

Ciência Viva – Programa de visitação ao Centro de Ciências de alunos de escolas públicas, particulares e comunidade em geral. Atuava como monitora da sala de biologia, bolsista na modalidade de Bolsa de Apoio Acadêmico e Extensão II, sob a orientação de prof. Dr. Luiz Antônio Andrade de Oliveira.

## Produção bibliográfica

Elodie Bosc, Jhennifer Nastri, Valerie Lefort, Marilia Valli, Fernando Contiguiba, Renan Pioli, Maysa Furlan, Vanderlan da Silva Bolzani, Chahrazade El Amri, Michele Reboud-Ravaux. Piperlongumine and some of its analogs inhibit selectively the human immunoproteasome over the constitutive proteasome. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 496 (1), 1-6, 2018.

## Apresentações de trabalho

### 2015

O trabalho “Análise de amostras comerciais de *Casearia sylvestris* através de espectrometria de RMN<sup>1</sup>H e quimiometria” foi apresentado na forma de painel na 38<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

### 2015

O trabalho "Principal Component Analysis (PCA) of <sup>1</sup>H NRM and antifungal assay of *Hedyosmum brasiliense* male and female extracts from Cerrado and Atlantic Forest” foi apresentado na forma de painel no 5th Brazilian Conference on Natural Products - BCNP" and "XXXI Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology - RESEM".

### 2015

O trabalho “Classificação química de amostras de *Casearia sylvestris* por RMN<sup>1</sup>H” foi apresentado na forma de painel no XXVII Congresso de Iniciação Científica (CIC) da UNESP.

### 2014

O trabalho “Estudo metabolômico de *Casearia sylvestris* por ressonância magnética nuclear (RMN)” foi apresentado na forma de painel na 37<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

**2014**

O trabalho “Análise diferencial das variedades de *Casearia sylvestris* por RMN<sup>1</sup>H” foi apresentado na forma de painel no XXVI Congresso de Iniciação Científica (CIC) da UNESP.

Dedico este trabalho aos meus pais,  
por todo amor e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me sustentar.

A UNESP e ao Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química-Araraquara, pelo desenvolvimento deste trabalho e por ter sido um cenário importante de uma etapa da minha vida.

À professora Dr.<sup>a</sup> Vanderlan por brilhar os meus olhos para ciências, orientação, dedicação, compreensão, carinho, muito obrigada pela confiança, sabedoria e apoio.

Ao professor Dr. Eduardo Maffud Cilli pela amizade, discussões e dúvidas esclarecidas.

À Dr. Meri Emili Pinto por todos os ensinamentos, amizade e por estar sempre disposta a compartilhar os seus conhecimentos.

A prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leticia Lotufo pela realização dos ensaios biológicos.

A todos os meus amigos, em especial, Alana, Iatã, Natalia, Wellington, Isabella, Maria e Mariana.

Às equipes Bolzani e Cilli.

Aos técnicos Marquinhos, João, Juliana, Nivaldo e Lucineia por serem tão prestativos.

A minha família pelo apoio.

A FAPESP pela bolsa concedida.

A todos os funcionários do IQ da Unesp.

***Meus sinceros agradecimentos!***

A mente que se abre a uma nova ideia jamais retornará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

## RESUMO

Peptídeos cíclicos compreendem uma classe de substâncias que ocorrem em algumas plantas superiores e que exibem uma ampla quantidade de atividades biológicas. Estes compostos bioativos vem despertando o interesse de setores estratégicos no desenvolvimento de fármacos e cosméticos devido sua característica cíclica, o que gera maior afinidade e seletividade para determinado alvo, isso ocorre pela restrição de rotação de suas ligações químicas. O estudo de orbitídeos presentes em *Jatropha ribifolia* e *Croton sphaerogynus* (Euphorbiaceae) foi dividido nas seguintes etapas: identificação e caracterização química dos compostos, síntese dos orbitídeos e atividade antitumoral. Neste estudo foi isolado e caracterizado o peptídeo ribifolina oriunda de *J. ribifolia*. Visando avaliar a polaridade e a carga da extremidade amino-terminal foi planejada a síntese de três peptídeos análogos, visto que substâncias com maior hidrofobicidade possuem maior atividade antitumoral de acordo com a literatura. Para tanto, o aminoácido serina foi substituído por alanina (não possui grupo hidroxila), treonina (possui um grupo metila adicional) e lisina (possui uma carga positiva na sua cadeia lateral). Os peptídeos foram sintetizados, purificados e avaliados em função anticâncer. Contudo, apenas o análogo da lisina cíclica gerou uma boa inibição de crescimento para as linhagens celulares de HCT-116 e MCF-7. Paralelamente, foi realizada a coleta da espécie *C. sphaerogynus* (caule e folhas) na cidade do Rio de Janeiro-RJ, o material vegetal foi extraído em etanol e fracionado em sílica de fase-reversa, o que permitiu obter uma fração enriquecida de peptídeos. A partir dessa fração foi possível assinalar, pela técnica de LC-MS, possíveis poli-Leu/Ile orbitídeos nas folhas e caules de *C. sphaerogynus*. Os espectros de MS<sup>2</sup> permitiram observar perdas de massas de 113 Da, as quais foram atribuídas aos peptídeos tetraleucil (ou tetraisoleucil), pentaleucil (ou pentaisoleucil), hexaleucil (ou hexaisoleucil) e heptaleucil (ou heptaisoleucil). A análise por HPLC preparativo das folhas desta espécie, permitiu ainda isolar dois flavonoides que foram caracterizados como sendo campferol triglicosilado e rutina. Os estudos apresentados mostraram que a *C. sphaerogynus* possui uma baixa diversidade de peptídeos. Somado a isso, os nossos resultados mostraram, que ao contrário da literatura, a presença de uma carga positiva em orbitídeos é importante para sua atividade anticâncer, como observado para a ribifolina.

**Palavras-chave:** orbitídeos, *Jatropha ribifolia* e *Croton sphaerogynus*.

## ABSTRACT

Cyclic peptides comprise a class of naturally occurring compounds in some higher plants and exhibit a wide range of biological activities. These bioactive compounds have aroused the interest from strategic sectors for drugs and cosmetics development due to their cyclic characteristic, which generates greater affinity and selectivity used to determine target, due the restriction of rotation of their chemical bonds. The study on orbitides present in *Jatropha ribifolia* and *Croton sphaerogynus* (Euphorbiaceae) was divided into the following stages: identification and chemical characterization of compounds, synthesis of orbitides and antitumor activity. In this study, ribifoline peptide from *J. ribifolia* was isolated and characterized. In order to evaluate the polarity and the charged at the amino terminus, the synthesis of three analogous peptides was planned, since substances with higher hydrophobicity have higher antitumor activity according to the literature. Therefore, the serine amino acid has been replaced by alanine (no hydroxyl group), threonine (has an additional methyl group) and lysine (has a positive charge on its side chain). The peptides were synthesized, purified and evaluated in anticancer activity. However, only the cyclic lysine analog generated good growth inhibition for the HCT-116 and MCF-7 cell lines. At the same time, the specie *C. sphaerogynus* (stem and leaves) was collected in the city Rio de Janeiro-RJ, the vegetal material was extracted in ethanol and fractionated in phase-reversed silica, which allowed to obtain an enriched peptides fraction. From this fraction, it was identify, by the LC-MS technique, possible poly-Leu / Ile orbitides in the leaves and stems of *C. sphaerogynus*. The spectra MS<sup>2</sup> allowed to observe mass losses of 113 Da, which allowed to indicate the peptides tetraleucil (or tetraisleucil), pentaleucil (or pentaisleucil), hexaleucil (or hexaisleucil) and heptaleucil (or heptaisleucil). Preparative HPLC analysis of the leaves from this specie also allowed to isolate two flavonoids that were characterized as triglycosylated campperol and rutin. The studies presented showed that *C. sphaerogynus* has a low diversity of peptides. Added to this, our results showed that unlike the literature, the presence of a positive charge in orbitids is important for its anticancer activity, as observed for ribifoline.

**Keywords:** orbitides, *Jatropha ribifolia* e *Croton sphaerogynus*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Classificação de ciclopeptídeos de plantas superiores proposto por Zhou e Tan (2000).....	21
<b>Figura 2:</b> Comparação entre os peptídeos linear e cíclico no sítio ativo de integrinas. ....	22
<b>Figura 3:</b> Mapa de distribuição de espécies de <i>Croton</i> . ....	24
<b>Figura 4:</b> Exemplos de substâncias presentes em espécies de <i>Croton</i> . ....	25
<b>Figura 5:</b> Mapa de distribuição mundial do gênero <i>Jatropha</i> .....	27
<b>Figura 6:</b> Estrutura química dos linoorbitídeos LOB2 e LOB3.....	29
<b>Figura 7:</b> Protocolo empregado para a síntese do peptídeo linear ribifolina e análogos utilizando resina Fmoc-Gly-Wang. ....	34
<b>Figura 8:</b> Fluxograma do estudo envolvendo <i>C. sphaerogynus</i> . ....	37
<b>Figura 9:</b> Cromatograma da fração ACN/H <sub>2</sub> O (4:1) de <i>J. ribifolia</i> , utilizando método gradiente de 5-95% de B, em 45 min. ....	40
<b>Figura 10:</b> Cromatograma da fração ACN/H <sub>2</sub> O (4:1) de <i>J. ribifolia</i> , utilizando método gradiente de 30-90% de B, em 60 min e 220 nm. ....	40
<b>Figura 11:</b> Espectro de massas referente ao peptídeo ribifolina. ....	41
<b>Figura 12:</b> Estrutura do último aminoácido de cada série de peptídeos sintetizados. ....	42
<b>Figura 13:</b> Estrutura química de ribifolina e seus análogos.....	44
<b>Figura 14:</b> Espectro de massas referente aos peptídeos SIILGILG linear (a) e SIILGILG cíclico (b). ....	45
<b>Figura 15:</b> Perfil cromatográfico do peptídeo bruto SIILGILG linear (a) com tempo de retenção de 14,35 min e do peptídeo bruto SIILGILG cíclico (b) com tempo de retenção 18,44 min.....	46
<b>Figura 16:</b> Perfil cromatográfico dos peptídeos SIILGILG linear (a) e cíclico (b) puros. ....	47
<b>Figura 17:</b> Espectro de massas referente aos peptídeos AILGILG linear (a) e AILGILG cíclico (b). ....	48
<b>Figura 18:</b> Perfil cromatográfico do peptídeo bruto AILGILG linear (a) com tempo de retenção de 14 min e do peptídeo bruto AILGILG cíclico (b) com tempo de retenção 20 min. ....	49
<b>Figura 19:</b> Perfil cromatográfico dos peptídeos AILGILG linear (a) e cíclico (b) puros. ....	50
<b>Figura 20:</b> Espectro de massas referente aos peptídeos TIILGILG linear (a) e TIILGILG cíclico (b). ....	51
<b>Figura 21:</b> Perfil cromatográfico do peptídeo bruto TIILGILG linear (a) com tempo de retenção de 14,24 min e do peptídeo bruto TIILGILG cíclico (b) com tempo de retenção 20,17 min.....	52

<b>Figura 22:</b> Perfil cromatográfico dos peptídeos TIILGILG linear (a) e cíclico (b) puros. ....	53
<b>Figura 23:</b> Espectro de massas referente aos peptídeos KIILGILG linear (a) e KIILGILG cíclico (b). ....	54
<b>Figura 24:</b> Perfil cromatográfico do peptídeo bruto KIILGILG linear (a) com tempo de retenção de 19 min e do peptídeo bruto KIILGILG cíclico (b) com tempo de retenção 24 min. ....	55
<b>Figura 25:</b> Perfil cromatográfico dos peptídeos KIILGILG linear (a) e cíclico (b) puros. ....	56
<b>Figura 26:</b> Perfil cromatográfico dos peptídeos KIILGILG linear (a) e cíclico (b) puros. ....	59
<b>Figura 27:</b> Cromatograma de íons das frações FR80F (a) e FR80C (b) de <i>C. sphaerogynus</i> . Os números dos picos estão identificados na Tabela 2. Legenda: orbitídeos (vermelho) e flavonoides (preto). As condições experimentais foram descritas na metodologia. Programa: 15-40% de solvente B em A, em 45 min (B: 0,1% ác. fórmico / 90% ACN e A: 0,1% ác. fórmico /H <sub>2</sub> O). ....	60
<b>Figura 28:</b> Espectro MS <sup>2</sup> e proposta de fragmentação para cicloheptaleucil (pico 13). ....	61
<b>Figura 29:</b> Espectro MS <sup>2</sup> e proposta de fragmentação para ciclohexaleucil (pico 12). ....	61
<b>Figura 30:</b> Espectro MS <sup>2</sup> e proposta de fragmentação para ciclopentaleucil (pico 10). ....	61
<b>Figura 31:</b> Espectro MS <sup>2</sup> e proposta de fragmentação para ciclotetraleucil (pico 6). ....	62
<b>Figura 32:</b> Cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas (a) e dos caules (b) de <i>C. sphaerogynus</i> , utilizando método exploratório gradiente de 5-95% de B, em 55 min e 220 nm. ....	63
<b>Figura 33:</b> Cromatogramas das frações metanólicas das folhas (a) e dos caules (b) de <i>C. sphaerogynus</i> , utilizando método exploratório gradiente de 5-95% de B, em 45 min e 220 nm. ....	64
<b>Figura 34:</b> Cromatogramas das frações FR20 de folhas (a) e caules (b) de <i>C. sphaerogynus</i> , utilizando método exploratório gradiente de 5-95% de B, em 45 min e 220 nm. ....	65
<b>Figura 35:</b> Cromatogramas das frações FR80 de folhas (a) e caules (b) de <i>C. sphaerogynus</i> , utilizando método exploratório gradiente de 5-95% de B, em 45 min e 220 nm. ....	65
<b>Figura 36:</b> Cromatograma da fração FR80 das folhas de <i>C. sphaerogynus</i> , utilizando método gradiente de 30-90% de B, em 60 min e 220 nm. ....	66
<b>Figura 37:</b> Cromatograma das frações FR1 a FR14 de <i>C. sphaerogynus</i> , utilizando método exploratório gradiente de 5-95% de B, em 40 min. Superior 220 nm e inferior 280 nm. ....	67
<b>Figura 38:</b> Numeração da estrutura básica dos flavonoides. ....	68
<b>Figura 39:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do composto B1. ....	69

<b>Figura 40:</b> Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a substância B1.....	69
<b>Figura 41:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto B1. ....	70
<b>Figura 42:</b> Espectro $\text{MS}^2$ de $m/z$ 739, $[\text{M}-\text{H}]^-$ , da substância B1.....	71
<b>Figura 43:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância B2. ....	73
<b>Figura 44:</b> Principais correlações observadas no mapa e contornos HMBC para a substancia B2.....	73
<b>Figura 45:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância B2.....	73
<b>Figura 46:</b> Espectro $\text{MS}^2$ de $m/z$ 611, $[\text{M}-\text{H}]^+$ , da substância B2. ....	74

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Relação de orbitídeos já isolados em espécies de <i>Jatropha</i> . .....	27
<b>Tabela 2:</b> Massas obtidas dos extratos etanólicos das espécies estudadas. ....	39
<b>Tabela 3:</b> Revelação dos ensaios de ninidrina e clorox. ....	39
<b>Tabela 4:</b> Dados da síntese dos peptídeos. ....	42
<b>Tabela 5:</b> Dados da síntese dos peptídeos. ....	42
<b>Tabela 6:</b> Rendimentos das clivagens dos peptídeos sintetizados. ....	43
<b>Tabela 7:</b> Rendimentos das ciclização dos peptídeos sintetizados. ....	43
<b>Tabela 8:</b> Condições de purificação dos peptídeos e quantidade de material puro. .	46
<b>Tabela 9:</b> Condições de purificação dos peptídeos e quantidade de material puro. .	49
<b>Tabela 10:</b> Condições de purificação dos peptídeos e quantidade de material puro .....	52
<b>Tabela 11:</b> Condições de purificação dos peptídeos e quantidade de material puro. .....	55
<b>Tabela 12:</b> Avaliação da inibição de crescimento para a linhagem celular HCT-116. .....	57
<b>Tabela 13:</b> Avaliação da inibição de crescimento para a linhagem celular MCF-7. ...	58
<b>Tabela 14:</b> Caracterização dos constituintes de FR80F e FR80C <i>C. sphaerogynus</i> por HPLC-DAD-ESI-MS/MS. Orbitídeos (vermelho) e flavonoides (preto). ....	60
<b>Tabela 15:</b> Massas obtidas da partição do extrato etanólico das folhas e dos caules de <i>C. sphaerogynus</i> . ....	63
<b>Tabela 16:</b> Massas obtidas do fracionamento das frações metanólicas das folhas e caules de <i>C. sphaerogynus</i> . ....	64
<b>Tabela 17:</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H (600 MHz) em CD <sub>3</sub> OD do composto B1 em comparação com dados da literatura. ....	70
<b>Tabela 18:</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H (600 MHz) em CD <sub>3</sub> OD do composto B2 em comparação com dados da literatura. ....	73

## LISTA DE SÍMBOLOS

AA – aminoácido

ACN – acetonitrila

AcOEt – Acetato de etila

Boc – terc-butiloxicarbonil

CCDA – Cromatografia em Camada Delgada

HPLC – High Pressure Liquid Chromatography

DCM – Diclorometano

DIC – N, N-diisopropilcarbodiimida

DIEA – N,N-diisopropiletilamina

DMF – Dimetilformamida

Fmoc – 9-fluorenilmetiloxicarbonila

HBTU – Fosfato de hexafluor 2-(1H- benzotriazol-1-il)-1,1,3,3- tetrametilurônio

HOBt – N- hidroxibenzotriazol

*J* – constante de acoplamento

MS – Mass Spectrometry

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio.

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

TFA – Ácido Trifluoracético

TIS – triisopropilsilano

TOCSY – Total Correlation Spectroscopy

UV – Ultravioleta

Vis – visível

## ABREVIATURA DOS AMINOÁCIDOS-PADRÃO DAS PROTEÍNAS

Nome	Símbolos		Aminoácido		Resíduo (-H <sub>2</sub> O)	
	3 letras	1 letra	Fórmula Molecular	Massa Molar (g/mol)	Fórmula Molecular	Massa Molar (g/mol)
Com cadeia lateral apolar						
Glicina	Gly	G	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	75,068	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NO	57,052
Alanina	Ala	A	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	89,095	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> NO	71,079
Valina	Val	V	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	117,149	C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> NO	99,134
Leucina	Leu	L	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131,176	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO	113,161
Isoleucina	Ile	I	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131,176	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO	113,161
Metionina	Met	M	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	149,23	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NOS	131,198
Prolina	Pro	P	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	115,133	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO	97,118
Fenilalanina	Phe	F	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	165,194	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO	147,178
Triptofano	Trp	W	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	204,230	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O	186,215
Com cadeia lateral apolar						
Serina	Ser	S	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	105,094	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	87,079
Treonina	Thr	T	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	119,094	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	101,106
Asparagina	Asn	N	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	132,20	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	114,104
Glutamina	Gln	Q	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	146,147	C <sub>5</sub> H <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	128,132
Tirosina	Tyr	Y	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	181,193	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO	163,178
Cisteína	Cys	C	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	121,159	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O	103,145
Com cadeia lateral apolar						
Lisina	Lys	K	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	146,191	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	128,175
Arginina	Arg	R	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	174,204	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O	156,189
Histidina	His	H	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	155,158	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O	137,142
Ácido Aspártico	Asp	D	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	133,105	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	115,089
Ácido Glutâmico	Glu	E	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	147,132	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	129,116

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	20
1.1 <i>Peptídeos cíclicos e classificação em plantas superiores</i>	20
1.2 <i>Atividades biológicas de orbitídeos de Euphorbiaceae</i>	21
1.3 <i>Euphorbiaceae: os gêneros Croton e Jatropha</i>	23
1.3.1 <i>O gênero Croton</i>	24
1.3.2 <i>O gênero Jatropha</i>	26
1.4 <i>Câncer e metástase</i>	28
1.5 <i>Síntese de peptídeos em fase sólida</i>	29
<b>2. OBJETIVOS</b>	30
1.1 <i>Objetivos gerais</i>	30
1.2 <i>Objetivos específicos</i>	30
<b>3. METODOLOGIA</b>	31
3.1 <i>Coleta, identificação e obtenção dos extratos etanólicos</i>	31
3.1.1 <i>Croton sphaerogynus</i>	31
3.1.2 <i>Jatropha ribifolia</i>	31
3.2 <i>Triagem química (screening) dos orbitídeos</i>	31
3.3 <i>Isolamento de ribifolina de Jatropha ribifolia</i>	32
3.4 <i>Síntese de ribifolina e seus análogos</i>	33
3.5 <i>Avaliação antitumoral de ribifolina e seus análogos sintéticos</i>	35
3.6 <i>Triagem de peptídeos de C. sphaerogynus por LC-MS</i>	36
3.7 <i>Partição do extrato etanólico bruto de C. sphaerogynus</i>	36
3.8 <i>Extração em fase sólida das frações metanólicas de C. sphaerogynus</i>	37
3.8.1 <i>Da folha e do caule</i>	37
3.8.2 <i>Purificação da fração FR80F do extrato de folhas</i>	37
3.8.3 <i>Caracterização dos compostos B1 e B2</i>	38
3.9 <i>Espectrometria de massas (EM)</i>	38
3.10 <i>Ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	38
<b>4. RESULTADOS</b>	38
4.1 <i>Preparação do material vegetal e extratos etanólicos brutos</i>	38
4.2 <i>Triagem química (Screening) de orbitídeos</i>	39
4.2.1 <i>Cromatografia em camada delgada comparativa</i>	39
4.3 <i>Isolamento de ribifolina de Jatropha ribifolia</i>	39
4.4 <i>Síntese de ribifolina e seus análogos</i>	41

4.4.1	<i>Obtenção do peptídeo SIILGILG</i>	44
4.4.2	<i>Obtenção do peptídeo AIILGILG</i>	47
4.4.3	<i>Obtenção do peptídeo TIILGILG</i>	50
4.4.4	<i>Obtenção do peptídeo KIILGILG</i>	53
4.5	<i>Avaliação antitumoral de ribifolina e seus análogos sintéticos</i>	56
4.6	<i>Cromatografia Líquida de alta eficiência para C. sphaerogynus</i>	58
4.7	<i>Partição do extrato bruto etanólico</i>	62
4.8	<i>Extração em fase sólida das frações metanólicas</i>	64
4.8.1	<i>Da folha e do caule</i>	64
4.8.2	<i>Purificação da fração FR80 do extrato de folhas</i>	66
4.8.3	<i>Caracterização do composto B1</i>	68
4.3.4	<i>Caracterização da substância B2</i>	71
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	75

## 1. INTRODUÇÃO

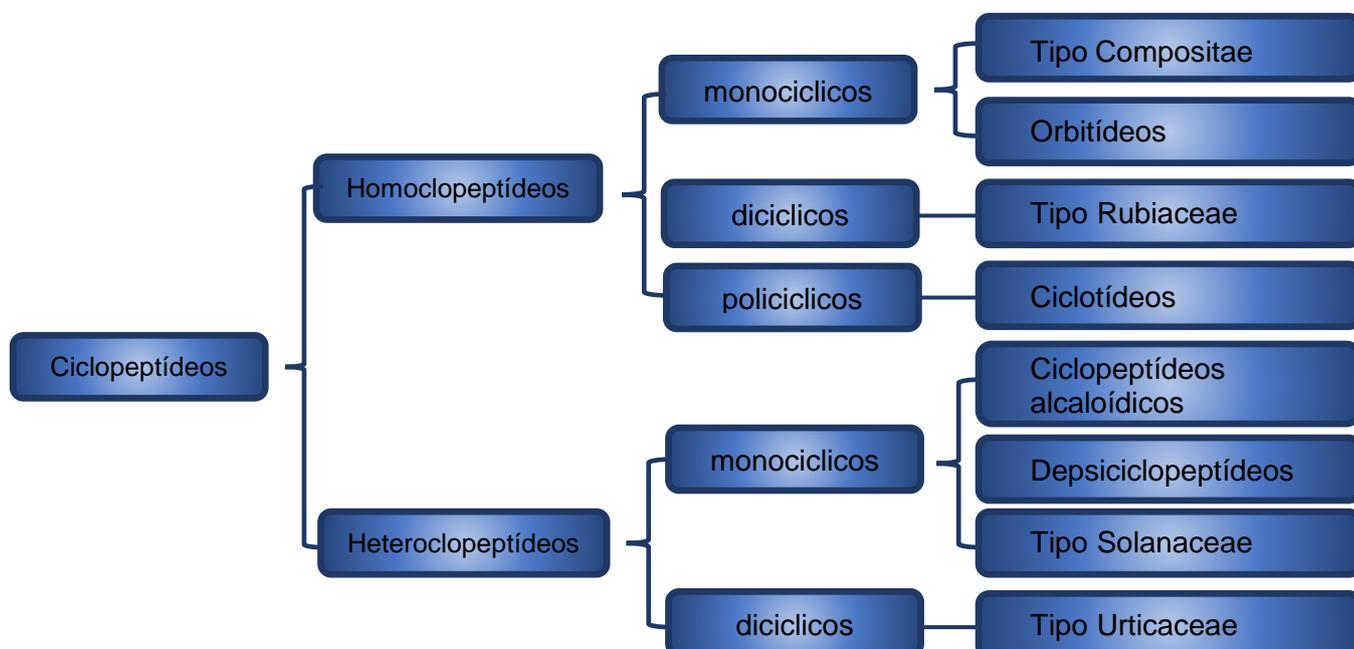
### 1.1 *Peptídeos cíclicos e classificação em plantas superiores*

Espécies de plantas superiores são uma importante fonte de substâncias bioativas devido sua capacidade em biossintetizar uma grande variabilidade de produtos naturais de classes e estruturas diversas. Estas substâncias podem inspirar a busca racional de novos protótipos à fármacos na sua forma natural ou via síntese de análogos estruturais com maior atividade farmacológica e/ou menor toxicidade (NEWMAN & CRAGG, 2016). A Química de Produtos Naturais, como área que se dedica a essa busca, por um longo tempo teve como enfoque em substâncias comumente estudadas, como alcaloides e diterpenos, oriundas das vias biossintéticas do mevalonato e/ou chiquimato. Nas últimas décadas, com o advento de técnicas analíticas mais sensíveis, foi possível identificar e isolar uma nova classe de substâncias: os peptídeos cíclicos bioativos. Estes compostos ainda são pouco explorados pela comunidade científica, bem como, pelas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, que vem direcionando esforços para compreender melhor o papel biológico dessas moléculas.

A ocorrência dos peptídeos cíclicos vegetais se restringe a algumas famílias de plantas superiores: Violaceae, Rubiaceae, Annonaceae, Fabaceae, Euphorbiaceae, Caryophyllaceae, Solanaceae, Rutaceae, Linaceae, Amaranthaceae, Annonaceae, Compositae, Linaceae e Agavaceae (MORITA & TAKEYA, 2010; CONDIE et al., 2011; JI et al., 2017).

Devido ao aumento crescente de pesquisas em peptídeos de espécies vegetais houve a necessidade de classificação e nomenclatura adequada, conforme a descoberta de moléculas mais complexas, podendo assim, subdividir os peptídeos conforme suas características estruturais, biossintéticas e conformacionais (PICCHI et al., 2009). Zhou & Tan (2000) foram os pioneiros a propor uma classificação destes peptídeos, contudo, no sistema proposto havia uma evidente ausência de dados taxonômicos, necessitando de uma divisão mais acurada destes dados (Figura 1). Posteriormente, estes autores revisaram o esquema de divisão de peptídeos de espécies vegetais, assim, foram compilados 455 compostos isolados de 26 famílias botânicas. A ampla diversidade estrutural foi dividida em 8 grupos: ciclopeptídeos alcaloídicos, depsiciclopeptídeos, ciclopeptídeos tipo-Solanaceae, tipo-Urticaceae, tipo-Compositae, tipo-Rubiaceae, tipo-Caryophyllaceae e os ciclotídeos (THAN &

ZHOU, 2006). Contudo, esta nova organização aplica a nomenclatura baseada nas famílias botânicas, sendo novamente revista, posto que peptídeos descritos em uma família botânica não ocorrem exclusivamente neste táxon.



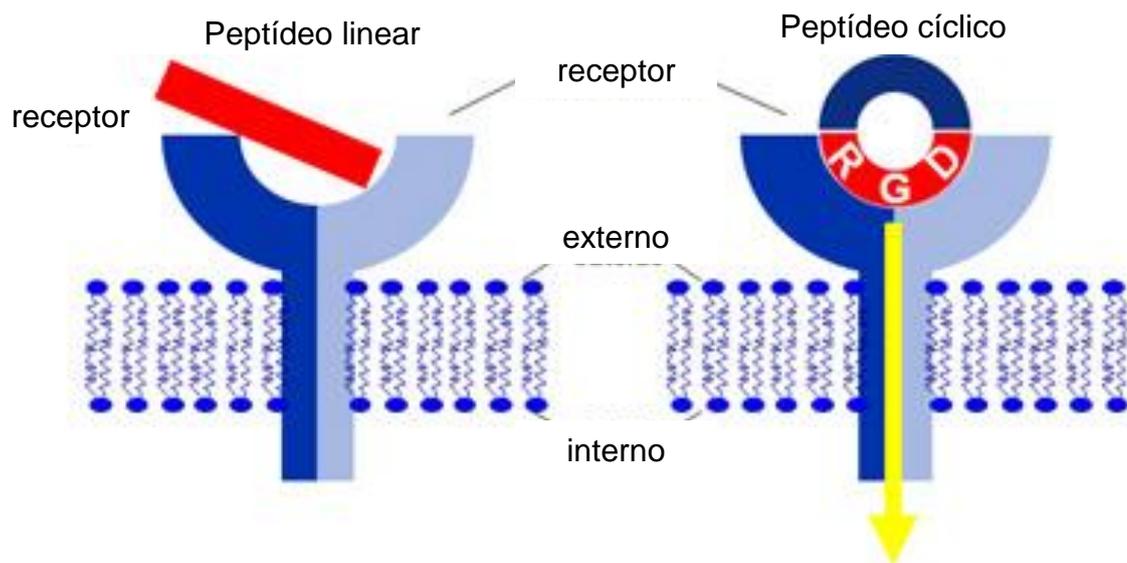
**Figura 1:** Classificação de ciclopeptídeos de plantas superiores proposto por Zhou e Tan (2000).

Mais recentemente, Mahatmanto (2015) apresentou uma nova reorganização, sugerindo classificar os peptídeos vegetais em 3 grupos: orbitídeos, ciclotídeos e PDPs (peptídeos derivados de Paws). Orbitídeos não contém ligação de dissulfeto e são processados em duas etapas, clivagem e ciclização. Em contraste, os ciclotídeos e os PDPs apresentam nós de cisteína e são dobradas por enzimas que catalisam a formação e isomerização de ligações dissulfeto, antes de serem ciclizados “cabeça-cauda” via “transpeptidação”.

### 1.2 Atividades biológicas de orbitídeos de *Euphorbiaceae*

Os peptídeos cíclicos ganham destaque na busca de novos fármacos por serem mais estáveis, enquanto que peptídeos lineares maior probabilidade de sofrer clivagem proteolítica, possuem menor biodisponibilidade e apresentam captação celular dificultada quando comparada com seu análogo linear (CRAIK et al., 2012; FERRIE et al., 2013). A título de exemplo de uma aplicação industrial para estes compostos, podemos citar o Ronacare® cyclopeptide 5 da Merck, que atua como um

cosmético pela sua ação anti-envelhecimento. A forma cíclica possui maior rigidez, estabilidade e seletividade para o alvo desejado (integrinas) do que a forma linear (Figura 2). A sequência de aminoácidos arginina, glicina e aspartato mimetiza processos naturais estimulando a síntese de colágeno e elastina, gerando uma maior hidratação na pele e diminuindo a profundidade das rugas (DERMACCESSITYGOLD, 2019).



**Figura 2:** Comparação entre os peptídeos linear e cíclico no sítio ativo de integrinas. Fonte: Dermacessitygold.

O termo orbitídeo define os peptídeos cíclicos oriundo de angiospermas, possuindo de 5 a 12 resíduos de aminoácidos, apresentando ciclização “cabeça-cauda”, ausência de ligação dissulfeto e biossintetizados via ribossomal (ARNISON et al., 2013).

Quanto à distribuição na família Euphorbiaceae, até o presente momento, foram descritos orbitídeos em apenas 2 gêneros: *Croton* e *Jatropha*. Baseadas na diversidade estrutural bem como funcional, estas substâncias apresentam grande potencial biológico, dentre as atividades citadas na literatura estão a citotóxica, antibacteriana, antifúngica, antimalárica, imunossupressora e inibição enzimática (RAMALHO et al., 2018).

Jatroidina I, peptídeo cíclico isolado do látex de *Jatropha curcas*, apresentou atividade inibitória seletiva para o ensaio fluorimétrico de inibição da protease aspártica, obtendo-se  $IC_{50}$  de  $0,88 \mu M$  para a pepsina como modelo molecular, e para a protease serina subtilisina não houve inibição (Altei et al., 2014). Insanu e colaboradores (2012) demonstraram que Curcaciolina A apresentou atividade

antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como atividade citotóxica frente a OVCAR 3 (linhagem celular de câncer de ovário), e que tanto Curcaciolina A como Curcaciolina B não apresentaram efeito mutagênicos contra *Salmonella* Typhimurium TA-98 e TA-100. Ambos peptídeos também foram isolados de *J. curcas*.

Integerrimidas A e B, isoladas de *Jatropha integerrima*, inibiram significativamente o crescimento de neurite na cultura de células neuronais, e também, inibiram parcialmente a proliferação de células de melanoma IPC-298 humana (MONGKOLVISUT et al., 2006). Thell et al (2013) esclarece que os peptídeos sintetizados por via ribossômica apresentam maior seletividade e menor citotoxicidade do que pequenas moléculas, a exemplo de alguns orbitídeos com essa propriedade imunossupressora pode-se citar ciclolinopeptídeos, cicloleonurinis e hymenistatins.

Ribifolina, isolada de *J. ribifolia*, apresentou moderada atividade antimalárica ( $IC_{50} = 42 \mu M$ ), quando testada contra *Plasmodium falciparum*, enquanto que seu análogo linear sintetizado apresentou baixa inibição ( $IC_{50} = 519 \mu M$ ), evidenciando assim a importância da ciclização para a atividade (PINTO et al., 2015). O orbitídeo [1–9-NaC]-crouorb A1, isolado de *Croton urucurana*, apresentou atividade citotóxica para NCI- ADR/RES (adenocarcinoma de ovário, fenótipo resistente a múltiplos fármacos), contudo o mecanismo de ação ainda não foi elucidado (CÂNDIDO-BACANI et al., 2015).

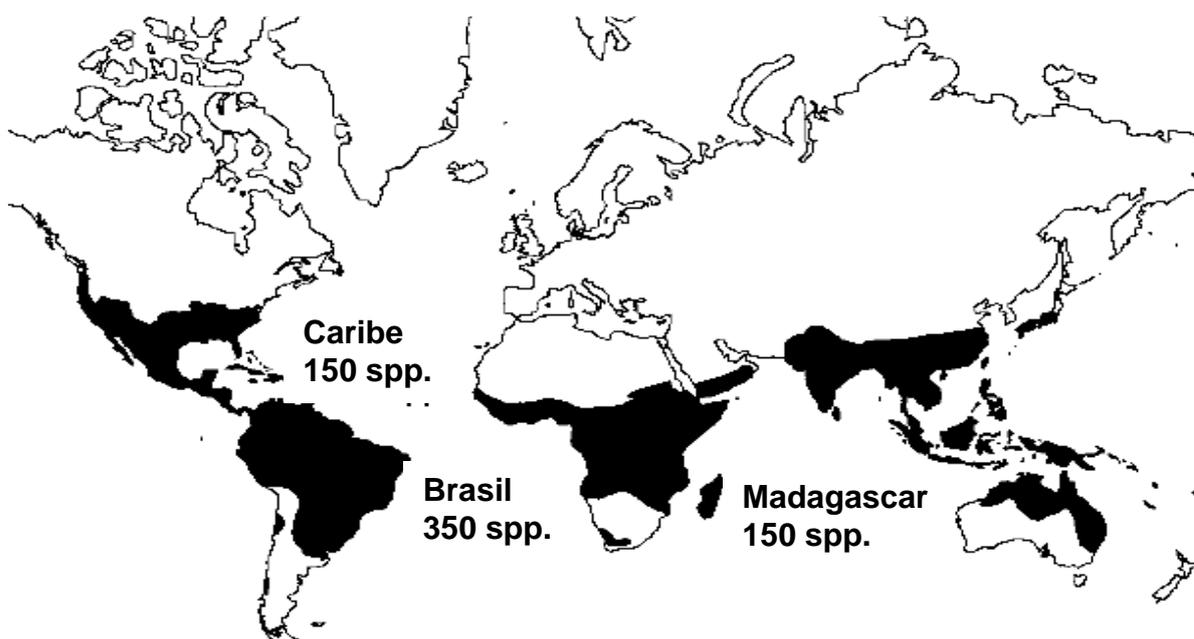
### 1.3 *Euphorbiaceae*: os gêneros *Croton* e *Jatropha*

A família Euphorbiaceae compreende aproximadamente 300 gêneros e 8000 espécies. Representantes desta família possuem grande importância econômica agregada, referente a seus efeitos tóxicos e potencial medicinal (MWINE et al., 2011). Algumas espécies desta família são consideradas tóxicas a humanos, como a *Euphorbia heterophylla* que pode gerar anemia hipocrômica macrocítica, destacando a raiz e o látex (ADEDAPPO et al., 2005), enquanto dados publicados sobre *Euphorbia tirucalli* associam casos de conjuntivite quando manipulação da espécie tóxica, contaminam os olhos (SHLAMOVITZ et al., 2009). Entretanto, outras espécies são reconhecidas pela sua capacidade curativa, como *Croton oblongifolius* Roxb. e *Croton tiglium* Willd. que são usadas para convulsão, asma e reumatismo, dentre outras (KAPPOR et al., 1989).

Outras aplicações de espécies da família Euphorbiaceae incluem produção de biodiesel, podendo-se citar *Jatropha curcas* (ABDULLA et al., 2011), fontes de alimentos como *Manihot esculenta* (SANCHES et al., 2009), e também, são empregadas como plantas ornamentais, a exemplo *Euphorbia mili* (VAN DAMME et al., 2001).

### 1.3.1 O gênero *Croton*

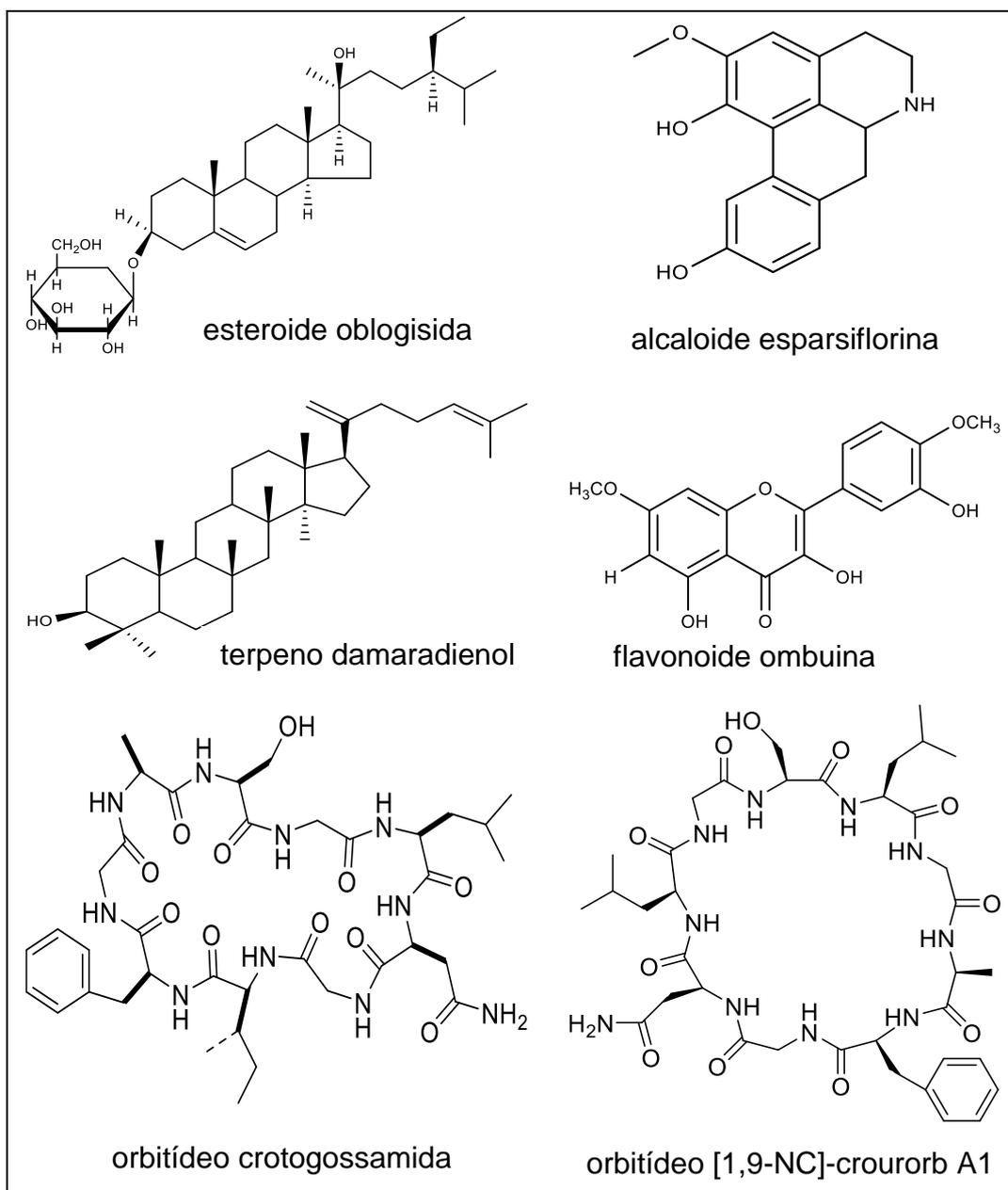
*Croton*, segundo maior gênero da família Euphorbiaceae, apresenta distribuição pantropical e subtropical (Figura 3), são espécies herbáceas, arbustivas, arbóreas e lianas (BERRY et al., 2005). Devido à alta plasticidade fenotípica que este gênero apresenta frente as condições climáticas, as espécies de *Croton* estão bem representadas em todo território brasileiro, apresentando mais de 300 espécies, das quais 253 são endêmicas (MOTTA et al., 2013; SANTOS et al., 2015).



**Figura 3:** Mapa de distribuição de espécies de *Croton*.  
Fonte: Berry et al., 2005.

Dentre a ampla variedade de substâncias químicas relatadas em espécies de *Croton*, estão os esteroides, alcaloides, terpenos (Figura 4) e compostos fenólicos, sendo dentro desta última classe, os flavonoides, lignanas e proantocianidinas os mais abundantes em diversidade de tipos e ocorrência (SANTOS et al., 2015; AHMED et al., 2016; BURGOS et al., 2015; BARRETO et al., 2013). Também foi identificada uma

nova classe de metabólitos secundários presentes neste gênero, os peptídeos cíclicos, tipo orbitídeos (Figura 4) (CÂNDIDO-BACANI et al., 2015; QUINTYNE-WALCOTT et al., 2007).



**Figura 4:** Exemplos de substâncias presentes em espécies de *Croton*.

Estes dados vêm despertando a atenção para estudos químicos e biológicos sobre outras espécies do gênero, devido ao interesse crescente por orbitídeos, substâncias pouco exploradas e conhecidas na flora brasileira. O interesse científico por este tipo de peptídeo vem aumentando devido ao interesse e se investigar seu

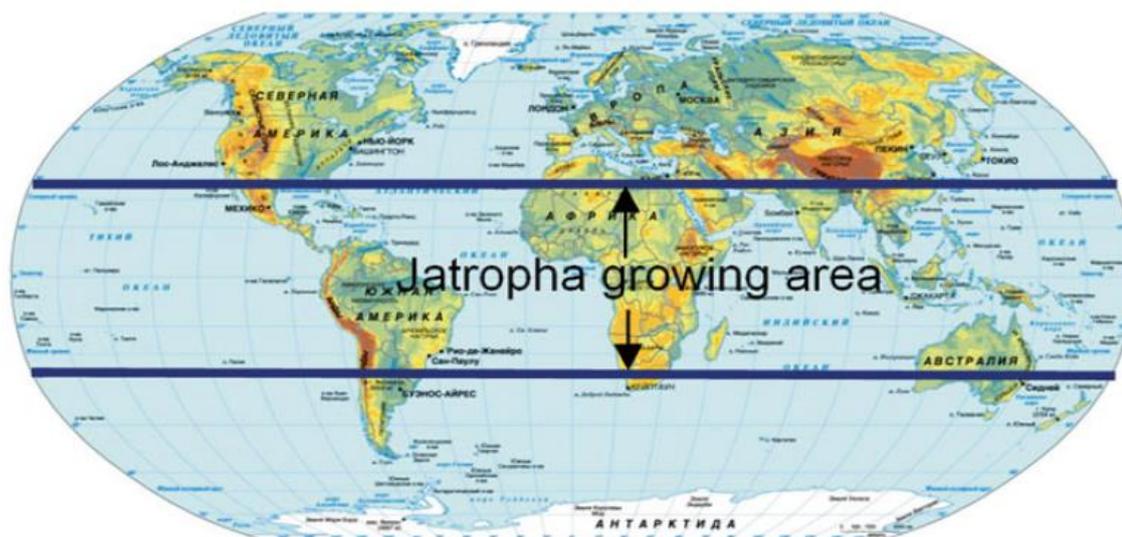
papel funcional nas espécies em que ocorrem e por possuírem algumas propriedades farmacológicas de interesse farmacêutico como antimalárico e imunossupressivo.

*Croton sphaerogynus* Baill é um arbusto da Mata Atlântica do sudeste do Brasil, pertencente a secção Cleodora (Klotzsch) Baill. (CARUZO et al., 2011). Motta (2013) reportou que o extrato diclorometano das folhas de *C. sphaerogynus* apresentou promissora atividade antiproliferativa contra a linhagem celular NCI-H460 (pulmão), possivelmente devido aos diterpenos abietano e/ou podocarpano. Santos (2015) também comprovou a atividade antiproliferativa de *C. sphaerogynus*, porém, neste caso, os testes realizados envolveram o estudo do extrato etanólico, focando em compostos flavonoidicos.

Righi e colaboradores (2013) demonstraram que o extrato diclorometano das folhas de *C. sphaerogynus* apresentaram atividade acaricida contra carrapato *Rhipicephalus microplus*, que causam um grande impacto na produção de gado. Neste extrato foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas os diterpenos clerodânico tipo furano, abietano e podocarpano. No entanto, há poucos relatos na literatura sobre a presença de orbitódeos nestas espécies. Estudos para esta espécie com este enfoque não foram reportados anteriormente, sendo, portanto, um dos escopos desse trabalho de pesquisa.

### 1.3.2 O gênero *Jatropha*

*Jatropha* abrange cerca de 170 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (Figura 5) das Américas e da África. Sendo um dos gêneros mais importantes e conhecidos desta família. Suas espécies são amplamente utilizadas para as atividades anti-inflamatória, antifúngica, diurética, antiparasitária e antioxidante (ALTEI et al., 2014; ISLAN et al., 2014). Além de suas propriedades medicinais, a *Jatropha* também possui relevância econômica considerável. A extração de biomassa de espécies de *Jatropha* L. pode ser aplicada em diversas áreas, como recuperação de terras degradadas, produção de pesticidas, produção de sabão de alta qualidade a partir do óleo das sementes, extração de resina para a produção de tintas devido ao seu baixo custo, e as proteínas das sementes são empregadas como emulsificante ou agente espumante (KHALIL et al., 2013; KAMUSOKO et al., 2017).



**Figura 5:** Mapa de distribuição mundial do gênero *Jatropha*.

Fonte: Islan et al., 2014.

Espécies de *Jatropha* são produtoras em potencial de metabólitos secundários bioativos como terpenos, esteroides, alcaloides, saponinas, taninos, lignanas, flavonoides e peptídeos cíclicos do tipo orbitídeos (BATISTA et al., 2014; DAS et al., 2018). Dentre as espécies já reconhecidas de *Jatropha* L. que possuem orbitídeos pode-se citar *J. curcas*, *J. multifida*, *J. gossypifolia*, *J. podagrica*, *J. ribifolia*, *J. mahafalensis*, *J. chevalieri*, *J. integerrima*, *J. poliana* (JUCA et al., 2017). A série de peptídeos cíclicos já isolados deste gênero está relacionada na Tabela 1.

**Tabela 1:** Relação de orbitídeos já isolados em espécies de *Jatropha*.

<b>Orbitídeo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Referência</b>
Chevalierina A	<i>Jatropha chevalieri</i>	Baraguey et al., 1998
Chevalierina B	<i>Jatropha chevalieri</i>	Baraguey et al., 1998
Chevalierina C	<i>Jatropha chevalieri</i>	Baraguey et al., 1998
Cyclogossina A	<i>Jatropha gossypifolia</i>	Horsten et al., 1995
Cyclogossina B	<i>Jatropha gossypifolia</i>	Auvin-Guette et al., 1997
Curcaciclina A	<i>Jatropha curcas</i>	Van Den Berg et al., 1995
Curcaciclina B	<i>Jatropha curcas</i>	Auvin et al., 1997
Integerrimide A	<i>Jatropha integerrima</i>	Mongkolvisut et al., 2006
Integerrimide B	<i>Jatropha integerrima</i>	Mongkolvisut et al., 2006
Jatroidina I	<i>Jatropha curcas</i>	Altei et al., 2014
Mahafacyclin A	<i>Jatropha mahafalensis</i>	Baraguey et al., 2001
Mahafacyclin B	<i>Jatropha mahafalensis</i>	Baraguey et al., 1998
Podacyclina A	<i>Jatropha podagrica</i>	Van Den Berg et al., 1995
Podacyclina B	<i>Jatropha podagrica</i>	Van Den Berg et al., 1995
Pohlianina A	<i>Jatropha pohliana</i>	Auvin-Guette et al., 1999
Pohlianina B	<i>Jatropha pohliana</i>	Auvin-Guette et al., 1999
Pohlianina C	<i>Jatropha pohliana</i>	Auvin-Guette et al., 1999
Ribifolina	<i>Jatropha ribifolia</i>	Pinto et al., 2015

*J. ribifolia* (Pohl) Baill., popularmente conhecida como pinhão-de-purga, é encontrada no nordeste do Brasil. Seu látex é usado na medicina popular para o tratamento de picadas de cobra e descongestionamento do trato digestivo (SILVA et al., 2015). Selecionou-se esta espécie para a busca de orbitídeos pois a literatura indica apenas um orbitídeo isolado desta planta, e como comumente as espécies de *Jatropha* possuem mais de um peptídeo cíclico, *J. ribifolia* foi escolhida para o escopo deste trabalho de pesquisa.

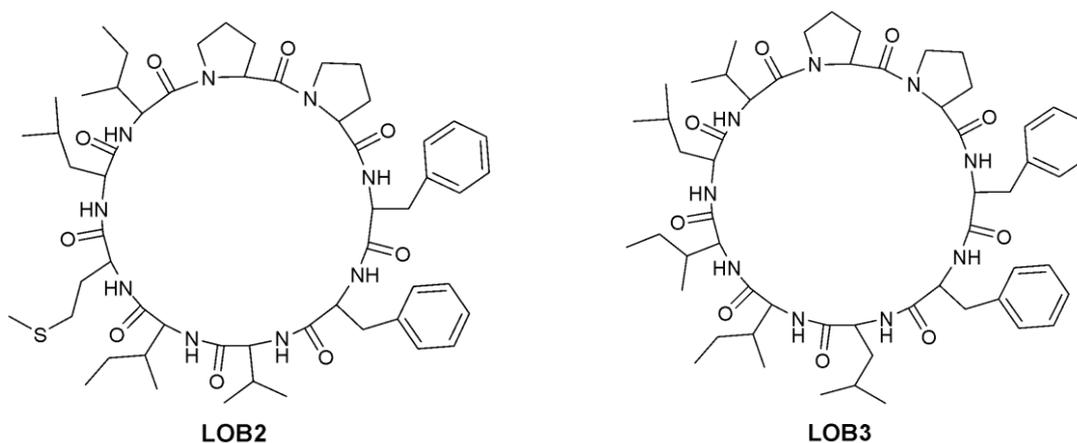
#### 1.4 Câncer e metástase

Câncer é definido como um grupo de doenças caracterizadas por crescimento desordenado e anormal das células do organismo, que podem migrar para órgãos distantes, processo conhecido como metástase. De acordo com a Global Burden of Disease Cancer Collaboration (2015) é a segunda causa de morte no mundo. Dentre os fatores que contribuem para o risco de seu desenvolvimento pode-se citar os intrínsecos, como mutações que ocorrem no genoma, e os extrínsecos, como a obesidade, tabagismo, imunossupressão, vírus e dieta (WU et al., 2016).

Para que a metástase possa se desenvolver é necessária uma cascata de eventos: desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, destacamento das células neoplásicas do tumor primário, a migração para o sangue ou vasos linfáticos, adesão no endotélio dos capilares do tecido alvo, extravasamento para o tecido alvo e crescimento do tumor secundário. O câncer secundário, ocasionado pela metástase, é responsável por 90% dos casos de morte por câncer (SPANIO et al., 2012). Em vista da complexidade desta doença multifatorial e o alto índice de mortalidade, a prevenção, bem como o desenvolvimento de fármacos com maior eficácia e segurança para tratamento, são alvo de pesquisa e desafio para a comunidade acadêmica.

Diante deste cenário, os produtos naturais originados da rica biodiversidade brasileira, ainda pouco explorada, constituem-se uma fonte potencial de modelos moleculares úteis ao desenho de novos protótipos de fármacos. Como a vincristina e vimblastina que são capazes de estimular a despolarização dos microtúbulos, ligando-se as  $\beta$ -tubulinas impedindo a polimerização. Estes compostos foram extraídos da espécie *Catharanthus roseus*, conhecida popularmente como vinca rosa (MARQUES et al., 2015). A diversidade estrutural dos metabólitos secundários e o interesse dos

peptídeos de plantas é mais que um incentivo à pesquisa com produtos naturais no Brasil, mas também uma forma de contribuir para que num futuro existam fármacos aprovados com selo brasileiro. Ao longo do período de 1940 até o final de 2014, das 175 substâncias aprovadas para tratamento de câncer, 131 ou 75%, são inspiradas em produtos naturais (síntese total, semi-síntese), com 85 ou 49% de produtos naturais, representando uma fonte valiosa de fármacos para tratamento de doenças ainda sem qualquer cura (NEWMAN & CRAGG, 2016). Os orbitídeos são uma nova classe de substâncias que ganha destaque como possíveis protótipos para tratamento contra o câncer, mas ainda são pouco explorados com este enfoque. Um estudo recente realizado por Okinyo-Owiti e colaboradores (2015) demonstrou a atividade antitumoral dos linoorbitídeos [1-9-NαC]-linusorb-B2 (LOB 2) e [1-9-NαC]-linusorb-B3 (LOB 3) (Figura 6) isolados de *Linum usitatissimum* L. (linhaça), testados frente às linhagens celulares de melanoma humano e de câncer de mama, assim como sua alta especificidade para as células cancerígenas.



**Figura 6:** Estrutura química dos linoorbitídeos LOB2 e LOB3.

### 1.5 Síntese de peptídeos em fase sólida

As plantas são fonte de muitos metabólitos secundários de natureza química complexa que inspiram a síntese orgânica, bem como a produção de novos análogos a partir de compostos líderes, gerando uma grande variedade de produtos farmacêuticos, cosméticos e agroquímicos (CRAGG et al., 2013; NEWMAN & CRAGG, 2016). Assim, como os orbitídeos são biossintetizados nas plantas em pequenas quantidades, a síntese peptídica no laboratório possui grande relevância. Inicialmente, a abordagem empregada para a síntese de peptídeos era via clássica

(realizada em solução) até uma inovadora metodologia para síntese de peptídeos ser apresentada à comunidade científica por Bruce Merrifield (1997). Tal metodologia introduzindo o uso de polímeros insolúveis como suporte, ligados covalentemente aos substratos (geralmente peptídeos ou aminoácidos). Esta metodologia trouxe diversas vantagens, como procedimento de síntese rápida e purificação simplificada (DATTA et al., 2011). O processo geral de síntese em fase sólida para peptídeos pode ser dividido em quatro etapas: desproteção do grupo de protetor  $\alpha$ -amino, etapas de lavagem para remover o reagente de clivagem, acoplamento do aminoácido e etapas de lavagem para remover o material excessivo (MERRIFIELD et al., 1997).

Para a síntese de orbitídeos, o primeiro passo é o alongamento da cadeia linear, seguida da fase de ciclização do peptídeo linear. Os peptídeos lineares são sintetizados pela técnica de síntese em fase sólida com bons rendimentos (DATTA et al., 2011). Sendo assim, a síntese e avaliação biológica de orbitídeo isolado da espécie *Jatropha L.*, bem como a produção de novos análogos estruturais é o objetivo deste trabalho, que visa contribuir também com as bibliotecas peptídicas internacionais existentes.

## **2. OBJETIVOS**

### *1.1 Objetivos gerais*

- Isolar, caracterizar e sintetizar orbitídeos presentes nas espécies *C. sphaerogynus* e *J. ribifolia* que ocorrem na Mata Atlântica e Caatinga, respectivamente.

### *1.2 Objetivos específicos*

- Identificar, purificar e caracterizar os orbitídeos das espécies *C. sphaerogynus* e *J. ribifolia*;
- Sintetizar, purificar e caracterizar os peptídeos idênticos aos naturais e análogos (cíclicos e lineares), através da metodologia de síntese em fase sólida;
- Encaminhar os peptídeos sintetizados para os ensaios de inibição de proliferação celular.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Coleta, identificação e obtenção dos extratos etanólicos

##### 3.1.1 *Croton sphaerogynus*

A espécie *C. sphaerogynus* foi coletada no município do Rio de Janeiro (RJ - Brasil), em Maio de 2017. A espécie foi identificada pelo botânico Dr. Marcelo Trovó (UFRJ). Sua exsicata foi depositada no herbário Jardim Botânico do Rio de Janeiro, voucher n° RB00598039. Registro SisGen A1A04AB.

Folhas e caules foram separados manualmente e secos em estufa de ar circulante à 40 °C por 72 h. Após a secagem, as amostras (400 g) foram pulverizadas em moinho de facas e extraídos por maceração com 2 L de etanol 95%, durante 24h. O processo de extração foi repetido três vezes. Em seguida, os filtrados obtidos foram concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida.

##### 3.1.2 *Jatropha ribifolia*

O extrato etanólico das partes aéreas de *J. ribifolia* foi cedido pela Dra Meri Emili F. Pinto (PINTO et al., 2015). A espécie foi coletada na cidade de Serra Branca (PB), em setembro de 2009. O material botânico foi identificado pela profa Maria de Fátima Agra, e uma exsicata foi depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), da Universidade Federal da Paraíba, sob identificação AGRA et. al. 7243. Registro SisGen AF70AA.

#### 3.2 Triagem química (screening) dos orbitídeos

Para identificar orbitídeos no extrato em estudo, inicialmente, foi realizado o *screening* e mapeamento destes compostos nos extratos estudados. Para tanto, utilizou-se 50 mg de extrato bruto etanólico das folhas e dos caules de *C. sphaerogynus*, das folhas de *C. reganenses* e das partes aéreas de *J. ribifolia*. Cada extrato foi solubilizado em 2 mL de ACN/H<sub>2</sub>O (3:7), em seguida fracionados em cartuchos SPE C18 (Chromabond C18 ec, 500 mg), previamente ativado com 5 mL de ACN e condicionados com 5 mL de ACN/H<sub>2</sub>O (1:4). As amostras foram eluídas com 8 mL ACN/H<sub>2</sub>O (1:4) e 8 mL de ACN/H<sub>2</sub>O (4:1). As frações provenientes da eluição

ACN/H<sub>2</sub>O (8:2) de cada uma das amostras foram liofilizadas, aplicadas em CCD para serem borrifadas com reveladores químicos sugerindo-se a presença ou ausência de peptídeos nessas matrizes.

Para se pré-avaliar a presença de peptídeos lineares ou compostos com aminas, utilizou-se uma solução de ninidrina (0,2 g de ninidrina em 100 mL de etanol a 95%). Esta solução foi borrifada em placa que teve as amostras em análise aplicadas. A ninidrina reage com o grupo amino do  $\alpha$ -aminoácido terminal da cadeia peptídica, resultando em um composto de coloração púrpura (KAISER et al., 1970).

Na avaliação de peptídeos cíclicos, utilizou-se o método Cl<sub>2</sub> /*o*-tolidina (clorox), que consiste na nebulização da placa com uma solução de hipoclorito de sódio a 6%, etanol e por último uma solução de *o*-tolidina/KI (160 mg de *o*-tolidina em 30 mL de ácido acético glacial, 470 mL de água e 1 g de KI), com intervalo de secagem entre as nebulizações. O grupo amida das ligações peptídicas reage com Cl<sub>2</sub> formando N-halogênios, que são revelados por solução de *o*-tolidina/KI (HORSTEN et al., 1995), e assim apresenta uma coloração azulada, indicando a presença de peptídeos cíclicos.

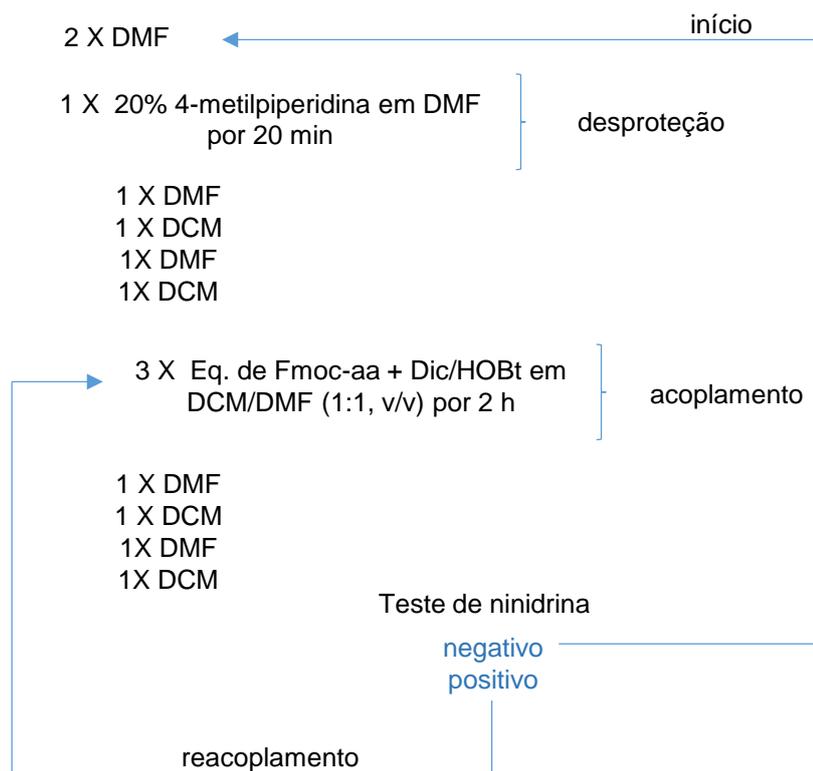
### 3.3 Isolamento de ribifolina de *Jatropha ribifolia*

O extrato etanólico bruto de *J. ribifolia* foi fracionado, obtendo-se uma fração enriquecida de peptídeos cíclicos (PINTO et al., 2015). Para tanto, três gramas do extrato foram fracionados em equipamento Manifold (multiválvulas) a vácuo utilizando-se 10 cartuchos de C18 da marca Strata C18 – E Phenomenex – 500 mg. Cada cartucho foi pré-condicionado com ACN 100% e equilibrado com ACN 20%, e então adicionado 50 mg de extrato etanólico diluído em 1 mL de ACN 20% para obtenção de duas frações: ACN/H<sub>2</sub>O (1:4) e ACN/H<sub>2</sub>O (4:1), sendo esta última de interesse (rica em peptídeos cíclicos). Este procedimento foi repetido 6 vezes. Em seguida, as frações obtidas em extração em fase sólida foram injetadas em cromatógrafo líquido analítico Shimadzu, com detector UV-VIS, em comprimento de onda de 220 e 280 nm. As condições cromatográficas utilizadas foram solventes A (0,1% TFA/H<sub>2</sub>O) e B (0,08%TFA/ 90% ACN) com vazão de 1,0 mL/min, em método exploratório, de 5 a 95% de solvente B em 45 min. Utilizou-se a coluna de fase reversa C18 AXIA Packed LUNA, de dimensões 250 x 21,20 mm, partículas de 5  $\mu$ m de tamanho. A fração ACN/H<sub>2</sub>O (4:1) foi submetida à purificação de seus analitos. Foi empregado o

equipamento HPLC semipreparativo (Shimadzu), com detector UV-VIS em comprimento de onda de 220 nm e coluna de fase reversa C-18 Phenomenex Luna (150 x 21,20 nm, partículas de 5 µm), o programa gradiente utilizado foi 30 à 90% de B em 60 min e fluxo de 5 mL/min. Deste experimento obteve-se 20 tubos. A pureza de cada analito foi confirmada por HPLC analítico.

#### 3.4 Síntese de ribifolina e seus análogos

O peptídeo ribifolina e seus análogos foram sintetizados através da técnica síntese peptídica em fase sólida (SPFS), protocolo apresentado na Figura 7. Para tanto, utilizou-se a resina Wang-Gly-Fmoc (grau de substituição de 0,47 mMol), sendo que o grupo Fmoc base-lábil foi retirado pela lavagem com uma solução de 20% 4-metilpiperidina/DMF durante 20 min – etapa de desproteção. Os acoplamentos dos Fmoc-aminoácidos foram realizados pela ativação dos grupos carboxilas com diisopropilcarbodmida (Dic) e N-hidroxibenzotriazol (HOBT). Todos os reagentes, bem como os Fmoc-aminoácidos foram empregados com 3 vezes de excesso em relação à quantidade de grupos reativos na resina inicial. Cada etapa de acoplamento foi realizada sob agitação branda durante 2 h. Com o intuito de eliminar os reagentes em excesso e subprodutos, entre cada etapa foram realizadas lavagem com DMF e DCM. Para o monitoramento do acoplamento de cada resíduo de aminoácido e para a desproteção da porção α-amino antes da próxima etapa de acoplamento, foi realizada a reação de uma alíquota da resina com ninidrina, em temperatura elevada (KAISER et al., 1970). Esta substância reage com grupos aminos livres, formando uma cor azulada, indicando a eficiência da síntese.



**Figura 7:** Protocolo empregado para a síntese do peptídeo linear ribifolina e análogos utilizando resina Fmoc-Gly-Wang.

Primeiramente foi sintetizado o precursor linear de ribifolina sem o último aminoácido (IIILGILG). Após isso, a resina foi dividida em 4 partes iguais e então adicionado o último aminoácido da ribifolina, sendo a Ser, ou de cada análogo (Ala, Thr e Lys). Em seguida, realizou-se a clivagem de cada peptídeo através da adição de TFA e supressores de reações colaterais: TIS e água ultra-pura (95% de TFA, 2,5% de TIS e 2,5 % de H<sub>2</sub>O v/v), na proporção 1 mL de solução para 100 mg de peptidil-resina, sob agitação branda durante 2 h. Entretanto, para a síntese do peptídeo contendo um resíduo de lisina substituindo a Serina foi utilizado o aminoácido Boc-Lys(Fmoc). A cadeia lateral desse aminoácido, está protegida pelo grupo Fmoc que somente é retirado em meio básico. Após o acoplamento deste aminoácido, o peptídeo foi clivado da resina utilizando TFA, que além de retirar o peptídeo da resina também desprotege o grupo Boc do alfa-amino da Lys, mantendo o grupo epsolon-amino protegido com Fmoc. Após a ciclização do peptídeo entre as extremidades amino e carboxi terminal o grupamento Fmoc foi retirado em solução contendo 20% 4-metil-piperidina em DMF. Após esse período, realizou-se a precipitação com éter gelado, sendo o peptídeo sonicado, centrifugado e sobrenadante, posteriormente, descartado. Esta etapa foi repetida 2 vezes para retirada dos subprodutos e reagentes

utilizados. Na sua forma livre, cada peptídeo linear foi analisado, afim de se verificar a pureza e rendimento da reação. Feito isso, cada peptídeo linear sintetizado foi encaminhado para a reação de ciclização.

O processo de ciclização foi realizado em solução diluída com DMF (0,001 mol), contendo 1 equivalente de HBTU e 1 equivalente de DIEA sob agitação por 2 h. Após esse período, a solução foi diluída em 50 mL de água e submetida à partição 50 mL de acetato de etila, processo repetido 3 vezes. A fração orgânica, que contém o peptídeo cíclico, foi concentrada e direcionada para etapas posteriores de purificação. Os peptídeos cíclicos sintéticos e seus análogos lineares foram purificados em HPLC semipreparativa e caracterizados por espectrometria de massas.

A purificação dos produtos obtidos foi feita em HPLC em modo semipreparativo, com solvente A (0,045% de TFA em H<sub>2</sub>O) e solvente B (0,036% TFA em ACN), fluxo de 5 mL/min, comprimento de onda de detecção de 220 nm, e uma coluna C18 da marca Phenomenex (tamanho 250 mm x 10 mm, 300 Å, tamanho da partícula de 5 µm). Após a purificação e liofilização dos materiais obtidos, a análise de pureza de cada fração foi realizada por meio de HPLC em modo analítico, utilizando espectrômetro Shimadzu, com coluna Ultrasphere Phenomenex de fase reversa C18 (4,6 mm x 150 mm, 300 Å, tamanho da partícula de 5 µm), detecção em 220 nm, com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. As análises das massas moleculares dos peptídeos foram realizadas por espectrometria de massas com aparelho Bruker injeção ion trap, modo eletrospray positivo (M+H)<sup>+</sup> na faixa de 200-2000 g/mol, para confirmar a obtenção do material desejado.

### 3.5 Avaliação antitumoral de ribifolina e seus análogos sintéticos

Para analisar a viabilidade celular foi realizado o ensaio colorimétrico MTT. O ensaio fundamenta-se na capacidade das células vivas em reduzir o substrato MTT através da enzima mitocondrial desidrogenase succínica, e assim, acumulando no citoplasma cristais de formazan de cor azul escuro (Mosmann., 1983).

Tanto a ribifolina como seus análogos foram diluídas em DMSO na concentração de 10 mg/mL. Para este ensaio foram utilizadas as linhagens celulares HCT-116 (carcinoma cólon-retal), MCF-7 (adenocarcinoma de mama). Para tanto, foram plaqueadas  $0,6 \times 10^4$  células por poço, em placas de 96 poços ( $5 \times 10^4$  células/ml em 200 µL de meio). Após 24 horas, as substâncias foram adicionadas em

concentrações de 5 µM e 50 µM, cada concentração em duplicata, e incubadas por 72 h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO) com controle negativo. Após 72 horas de incubação, o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo MTT (0,5 mg/mL). Três horas mais tarde, o sobrenadante foi removido, e após secagem da placa, o precipitado contendo azul de formazan de MTT foi dissolvido em 150 µL de DMSO, e a absorbância foi medida a 570 nm (Mosmann, 1983).

### 3.6 Triagem de peptídeos de *C. sphaerogynus* por LC-MS

Para a análise destas frações, 5 µL das soluções preparadas foram injetados em cromatógrafo Shimadzu UFLC (Kyoto, Japão), acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) e um espectrômetro de massa de retenção de íons (amaZon SL, Bruker, Billerica, MA, EUA) com ionização por *eletrospray* (ESI) em modo íon positivo, em cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massas. Neste procedimento experimental foi usado uma coluna de fase reversa C18 AXIA Packed LUNA, de dimensões 250 x 21,20 mm, partículas de 5 µm de tamanho, em temperatura ambiente, com vazão de 1,0 mL/min. As fases móveis utilizadas foram, água 0,1% ác. fórmico e ACN90% com 0,1% de ác. fórmico, com gradiente de 15 a 40% de solvente B em A.

A tentativa de identificação dos compostos foi realizada utilizando dados de massas moleculares, juntamente com os padrões de fragmentação, espectros UV e dados da literatura.

### 3.7 Partição do extrato etanólico bruto de *C. sphaerogynus*

Foram realizadas partições líquido-líquido para cada órgão da planta. Para tanto, os extratos etanólicos obtidos para o caule e as folhas, foram dissolvidos em 150 mL de metanol e particionados com 300 mL de hexano em funil de separação, procedimento repetido três vezes para o caule e seis vezes para a folha. Ao final, tanto a fração metanólica como a fração hexânica foram concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida. A Figura 8 apresenta o fluxograma demonstrativo do estudo envolvendo a extração proposta para *C. sphaerogynus*.



**Figura 8:** Fluxograma do estudo envolvendo *C. sphaerogynus*.

As análises cromatográficas do extrato etanólico e da fração metanólica foram analisadas em HPLC analítico (Shimadzu Prominence), com coluna da marca C<sub>18</sub> Phenomenex Luna, dimensões de 25,0 cm x 0,46 cm, e partículas de 5 µm. As condições cromatográficas utilizadas foram solventes A (0,1% TFA/H<sub>2</sub>O) e B (0,08%TFA/ 90% ACN) com vazão de 1,0 mL/min, em método exploratório, de 5 a 95% de solvente B em 45 min.

### 3.8 Extração em fase sólida das frações metanólicas de *C. sphaerogynus*

#### 3.8.1 Da folha e do caule

Cerca de 6 g da fração metanólica, tanto da folha como do caule, foram submetidas à cromatografia em coluna sob pressão reduzida, utilizando sílica de fase reversa C-18 (40-75 µm, Merk) como fase estacionária. Duas frações foram obtidas: ACN/H<sub>2</sub>O (1:4) e ACN/H<sub>2</sub>O (4:1), sendo esta última de interesse (rica em peptídeos circulares), como comprovado pelo *screening* de orbitídeos. As condições para análises cromatográficas exploratórias estão de acordo com as descritas na seção 3.6.

#### 3.8.2 Purificação da fração FR80F do extrato de folhas

Para análise em modo analítico, a FR80F foi injetada em cromatógrafo líquido (Shimadzu), com detector UV-VÍS, com monitoramento em 220 e 280 nm, com gradiente exploratório de 5 a 95 % de B em A (B: 0,08%TFA/ 90% ACN e A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O), com duração de 45 min, com vazão de 1 mL/min e volume de injeção de 20 µL. Foi empregado a coluna da marca C<sub>18</sub> Phenomenex Luna, dimensões de 25,0 cm x 0,46 cm, e partículas de 5 µm. Os fracionamentos cromatográficos foram

realizados no equipamento HPLC preparativa (Shimadzu), com detector UV-VIS em comprimento de onda de 220 e 280 nm e coluna de fase reversa C18 AXIA Packed LUNA, de dimensões 250 x 21,20 mm, partículas de 5 µm de tamanho, com um programa de gradiente de 30 a 90% em 60 min e vazão de 10 mL/min. A pureza das frações e analito isolados foi confirmada em HPLC analítico.

### 3.8.3 *Caracterização dos compostos B1 e B2*

A fração FR2 foi submetida à purificação pelos métodos usuais do laboratório. Em síntese, foi utilizado o equipamento HPLC semipreparativo (Shimadzu), com detector UV-VIS em comprimento de onda de 220 e 280 nm e coluna de fase reversa coluna C-18 Phenomenex Luna (150 x 21,20 nm, partículas de 5 µm). A corrida se deu em modo isocrático de 25% de B (B: 0,08%TFA/ 90% ACN e A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O), em 40 min, com vazão de 5 mL/min. A coleta das frações foi feita manualmente, o que permitiu obter as substâncias B1 e B2.

### 3.9 *Espectrometria de massas (EM)*

As análises de peso molar dos compostos, bem como o sequenciamento de peptídeos foram e analisados por espectrômetro Bruker Maxis Impact Q-TOF (Daltonics Billerica MA, USA).

### 3.10 *Ressonância magnética nuclear (RMN)*

Para obtenção dos espectros de RMN uni e bidimensionais foi utilizado espectrômetro Bruker Avance III<sup>®</sup> 600 (Fahrenheitstr, Bremen, Alemanha) operando à 600.13 MHz equipado com crioprobe, estes experimentos foram feitos no comando automação à temperatura de 299 K.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 *Preparação do material vegetal e extratos etanólicos brutos*

As massas obtidas para os extratos etanólicos das espécies estudadas, bem como seus rendimentos, estão representadas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Massas obtidas dos extratos etanólicos das espécies estudadas.

<b>Espécie vegetal</b>	<b>Material vegetal</b>	<b>Massa dos extratos</b>	<b>Rendimento</b>
<i>C. sphaerogynus</i>	Folha (400 g)	41,1 g	10,2 %
	Caule (400 g)	17,2 g	4,3 %

## 4.2 Triagem química (Screening) de orbitídeos

### 4.2.1 Cromatografia em camada delgada comparativa

A avaliação de peptídeos cíclicos nas espécies de *J. ribifolia* e *C. sphaerogynus* foi realizada, a priori, por ensaios químicos de revelação, como ninidrina e clorox. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos.

**Tabela 3:** Revelação dos ensaios de ninidrina e clorox.

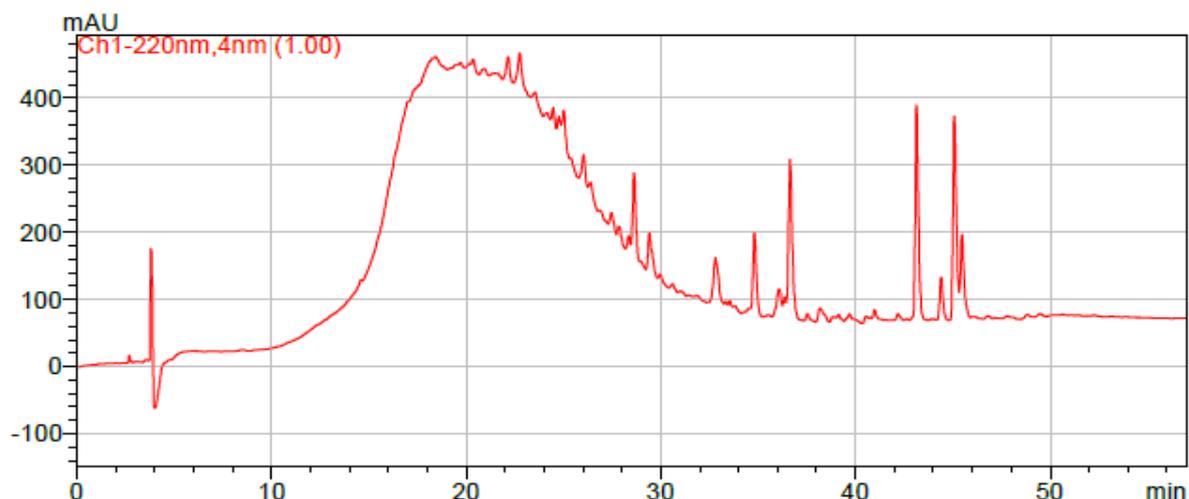
<b>Espécie</b>	<b>Órgão da espécie</b>	<b>Ninidrina</b>	<b>Clorox</b>
<i>J. ribifolia</i>	Folha	+	+
<i>C. sphaerogynus</i>	Folha	+	-
	Caule	+	-

O ensaio de clorox permite observar a formação de *N*-halogênios através da reação de peptídeos cíclicos com Cl<sub>2</sub> (Horsten et al., 1995), gerando uma coloração púrpura. A espécie *J. ribifolia* foi a única que apresentou resultado positivo. Um segundo ensaio, de ninidrina, foi utilizado para averiguar a presença de grupamento amino-terminal livre (KAISER et al., 1970). É desejável que as amostras analisadas apresentem resultado negativo, uma vez que orbitídeos não possuem agrupamento terminal livre. Contudo, devido a complexidade das matrizes, é esperado que as amostras possam apresentar resultado positivo pela presença de outros metabólitos, como alcaloides. Todas as espécies apresentaram resultado positivo para este ensaio. Assim, para o isolamento de orbitídeos, selecionou-se a espécie *J. ribifolia* para prosseguir com os estudos.

### 4.3 Isolamento de ribifolina de *Jatropha ribifolia*

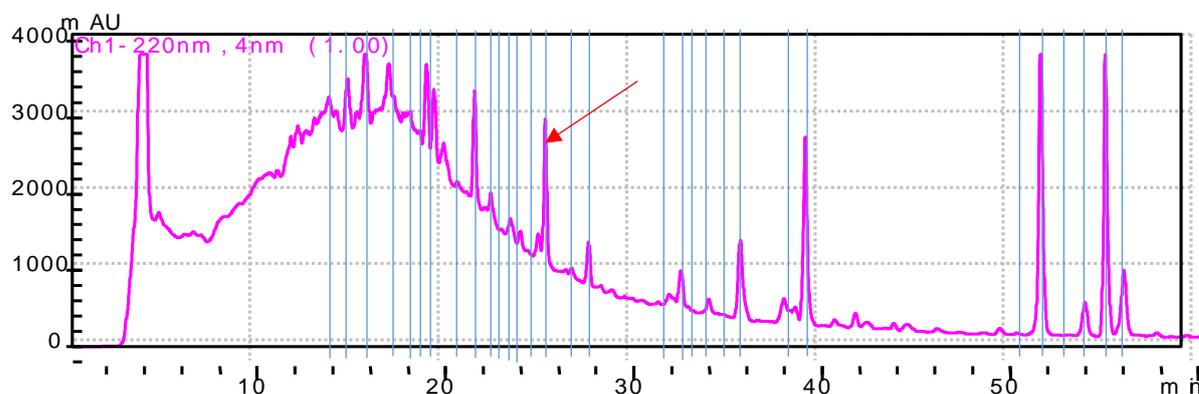
O processo de fracionamento de três gramas do extrato bruto etanólico de *J. ribifolia* gerou 1,87 g da fração ACN/H<sub>2</sub>O (1:4) e 0,35 g da fração ACN/H<sub>2</sub>O (4:1) após

lioofilizados. A fração ACN/H<sub>2</sub>O (4:1) foi selecionada para o isolamento de peptídeos cíclicos após a confirmação positiva do ensaio de clorox. A análise do perfil cromatográfico da fração enriquecida foi obtida e apresentada da Figura 9.



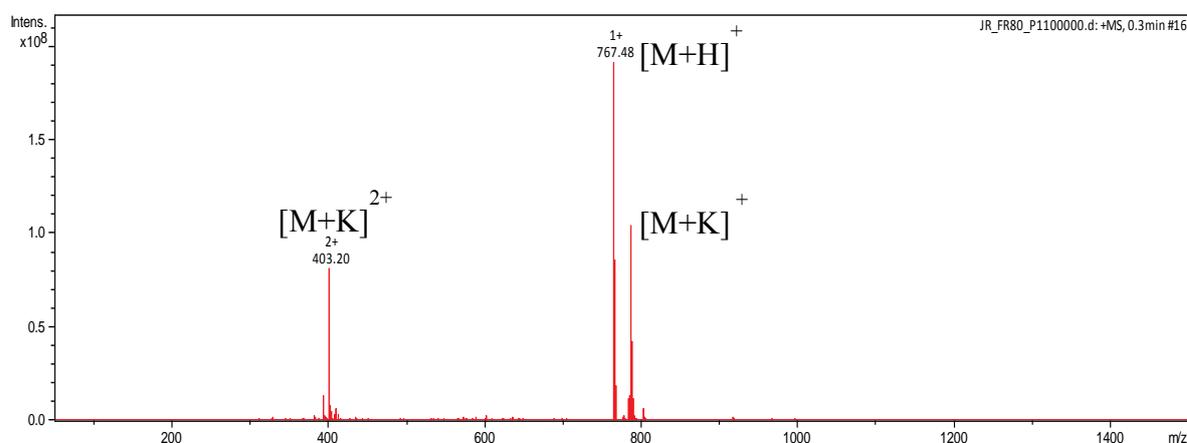
**Figura 9:** Cromatograma da fração ACN/H<sub>2</sub>O (4:1) de *J. ribifolia*, utilizando método gradiente de 5-95% de B, em 45 min.

Os orbitídeos eluem em torno de 60-70% de solvente B, e são detectados no ultravioleta em comprimento de onda de 220 nm (ALTEI et al., 2014). Assim, a região de eluição de 22 – 35 minutos apresentou algumas bandas de interesse. A purificação dos analitos foi realizada num equipamento HPLC semipreparativo (Shimadzu) com detector UV-VIS em comprimento de onda de 220nm e coluna de fase reversa C18 AXIA Packed LUNA, de dimensões 250 x 21,20mm, partículas de 5 µm de tamanho, com um programa de gradiente de 30 a 90% de solvente B em A (B: 0,08%TFA/ 90% ACN e A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O) em 60 minutos e fluxo de 5 mL/min. A Figura 10 apresenta o cromatograma obtido.



**Figura 10:** Cromatograma da fração ACN/H<sub>2</sub>O (4:1) de *J. ribifolia*, utilizando método gradiente de 30-90% de B, em 60 min e 220 nm.

Deste experimento foram obtidos 20 tubos coletados manualmente, conforme a figura 9. As frações foram então re-analisadas por HPLC analítico e injetadas em espectrômetro de massas, buscando-se avaliar a pureza e se as massas moleculares obtidas se estavam na faixa de 500-1000 Da, massas características de orbitídeos. Das substâncias isoladas foi possível identificar apenas a ribifolina, não sendo isolado e caracterizado um novo orbitídeo. A Figura 11 apresenta o espectro de massas ribifolina (PINTO et al., 2015).

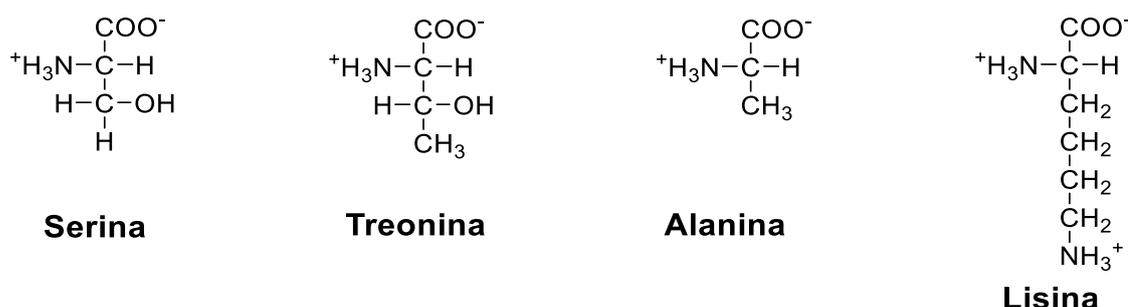


**Figura 11:** Espectro de massas referente ao peptídeo ribifolina.

#### 4.4 Síntese de ribifolina e seus análogos

O peptídeo ribifolina e seus análogos foram sintetizados por meio da técnica de síntese de peptídeos em fase sólida. Conforme dados da literatura, acredita-se que orbitídeos com caráter mais hidrofóbico possam estar correlacionados com uma maior atividade anticâncer (OKINYO-OWITI et al., 2015), sendo assim, a síntese dos análogos foi planejada sem o último aminoácido da ribifolina e adicionando aminoácidos mais hidrofóbicos, como Ala e Thr. O terceiro análogo foi planejado considerando-se a carga positiva da cadeia lateral da lisina. Sabe-se que há prevalência de cargas negativas em membranas de células cancerígenas, pela grande quantidade de fosfatidilserina (ALVES et al., 2016). Considerando isso, e esperando uma possível ligação entre o aminoácido e a membrana externa das células cancerígenas selecionou-se o aminoácido Lys para compor o terceiro análogo, qual apresenta carga positiva em sua cadeia lateral. A Figura 12 apresenta as estruturas do último aminoácido de cada série de peptídeo sintetizado. É possível observar

através das estruturas que o aminoácido treonina possui uma metila a mais na cadeia lateral do que a serina, e este, por sua vez, apresenta uma hidroxila e uma metila a mais em sua cadeia lateral do que a alanina. Por último, a lisina possui em sua cadeia lateral uma carga positiva no grupo amino. As mudanças pontuais permitem um melhor estudo da relação estrutura atividade dos peptídeos.



**Figura 12:** Estrutura do último aminoácido de cada série de peptídeos sintetizados.

Para tanto, foi sintetizado o precursor linear de ribifolina sem o último aminoácido (IILGILG). Partindo-se de uma massa inicial de 1,7 g de resina, obteve-se ao final da síntese 2,060 g de massa de resina, havendo um ganho de massa de 359 mg com rendimento de 91,79 %. A Tabela 4 apresenta os dados da síntese dos peptídeos.

**Tabela 4:** Dados da síntese dos peptídeos.

Peptidil-resina	Ganho de massa (mg)	Ganho de massa teórico (mg)	Rendimento (%)
IILGILG	359	543	91,79

Em seguida, dividiu-se a massa 2,060 em 4 partes iguais, obtendo-se 515 mg de resina para adicionar o último aminoácido de cada análogo e foi calculado os novos rendimentos. A Tabela 5 apresenta os dados da síntese dos peptídeos.

**Tabela 5:** Dados da síntese dos peptídeos.

Peptidil-resina	Massa obtida (mg)	Massa esperada teórica (mg)	Rendimento (%)
SIILGILG	491,3	683,4	71,9
AIILGILG	471,4	668,	70,5
TIILGILG	490,2	686,2	71,4
KIILGILG	482,0	700,4	68,8

Após as sínteses, os peptídeos foram clivados com uma solução contendo TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2,5/2,5). As massas de peptídeos brutos obtidas estão descritas na Tabela 6. Todos os aminoácidos utilizados foram Fmoc-AA-OH, com exceção do aminoácido lisina, que possui como grupos protetores Boc-Lys(Fmoc). Selecionou-se este aminoácido pois o protetor Boc ligado a amina do carbono  $\alpha$  é ácido-lábil, e assim no processo de clivagem ele será retirado do peptídeo, porém, o protetor Fmoc do grupo amino da cadeia lateral continuará protegido. Após a clivagem e o processo de ciclização, foi empregado a solução de 20% 4-metilpiperidina/DMF durante 20 min para a desproteção do grupo amino da cadeia lateral.

**Tabela 6:** Rendimentos das clivagens dos peptídeos sintetizados.

Peptidil-resina	Massa de peptídeo bruto (mg)	Massa de peptídeo bruto teórico (mg)	Redimento de clivagem (%)
SIILGILG	126,4	157	80,5
AiILGILG	128,5	153,8	83,5
TIILGILG	137,2	159,8	85,8
KIILGILG	121,7	165,2	73,6

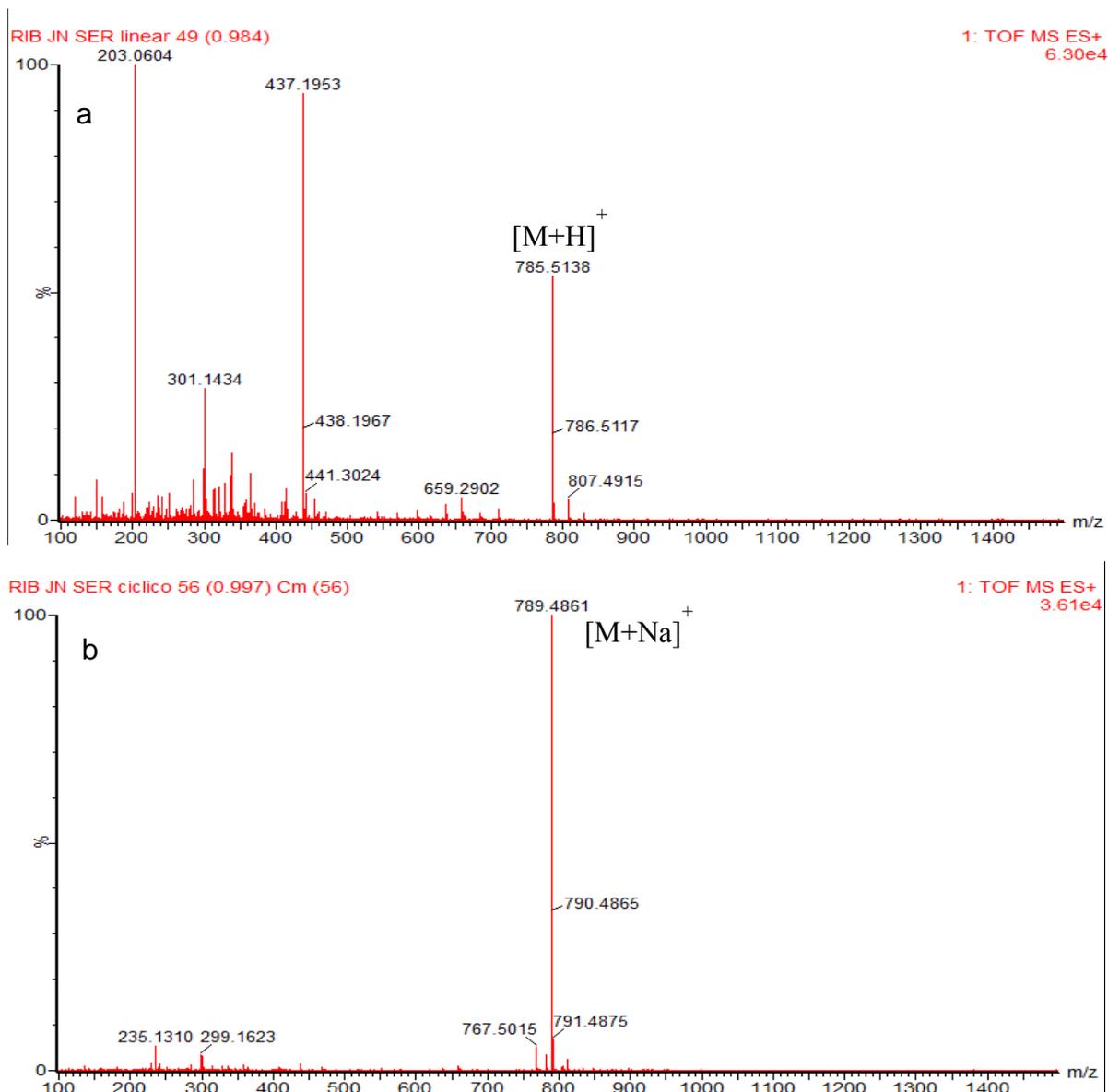
Para a ribifolina e cada análogo, 40 mg foram purificados para obter os peptídeos lineares. A massa restante dos peptídeos foi submetida ao processo de ciclização de acordo com a metodologia descrita nos métodos item 3.4. A Tabela 7 mostra a quantidade de massa obtida de cada análogo ao final do processo de ciclização.

**Tabela 7:** Rendimentos das ciclização dos peptídeos sintetizados.

Peptídeos	Massa inicial do processo de ciclização (mg)	Massa obtida dos peptídeos ciclizados (mg)
SIILGILG	86	65
AiILGILG	88,7	60,3
TIILGILG	97,2	69,8
KIILGILG	81,5	59,9

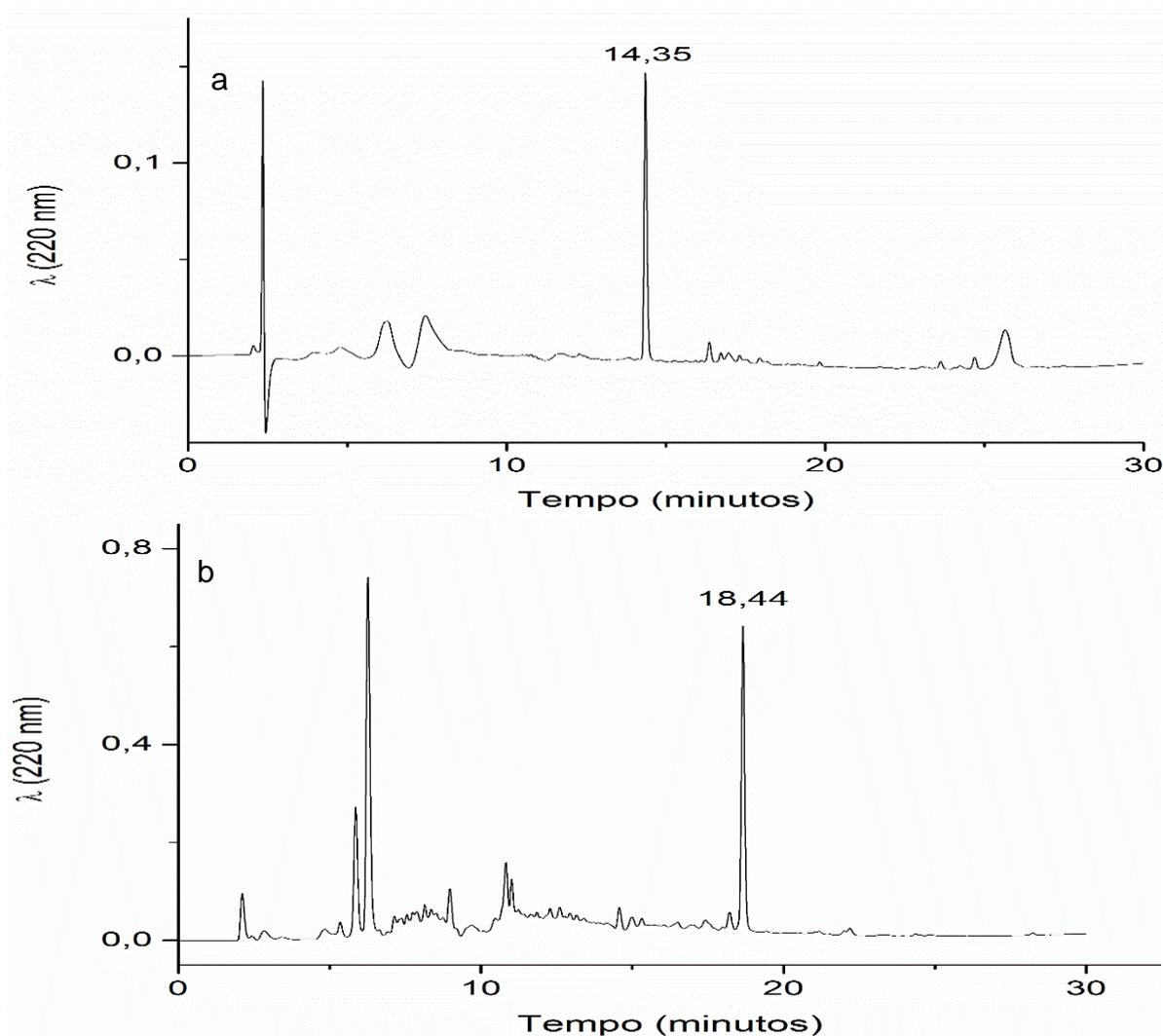
A Figura 13 mostra a estrutura química de ribifolina e de seus análogos sintetizados.





**Figura 14:** Espectro de massas referente aos peptídeos SIIIGILG linear (a) e SIIIGILG cíclico (b).

O perfil cromatográfico dos peptídeos brutos de SIIIGILG foi obtido em cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizando um programa gradiente de 5 a 95% de B em 30 min e tempo de retenção de 14 min para o linear (Figura 15a) e para o peptídeo SIIIGILG cíclico bruto o tempo de retenção foi de 18 min (Figura 15b). Isso ocorre pelo peptídeo linear ser mais apolar do que seu análogo cíclico.



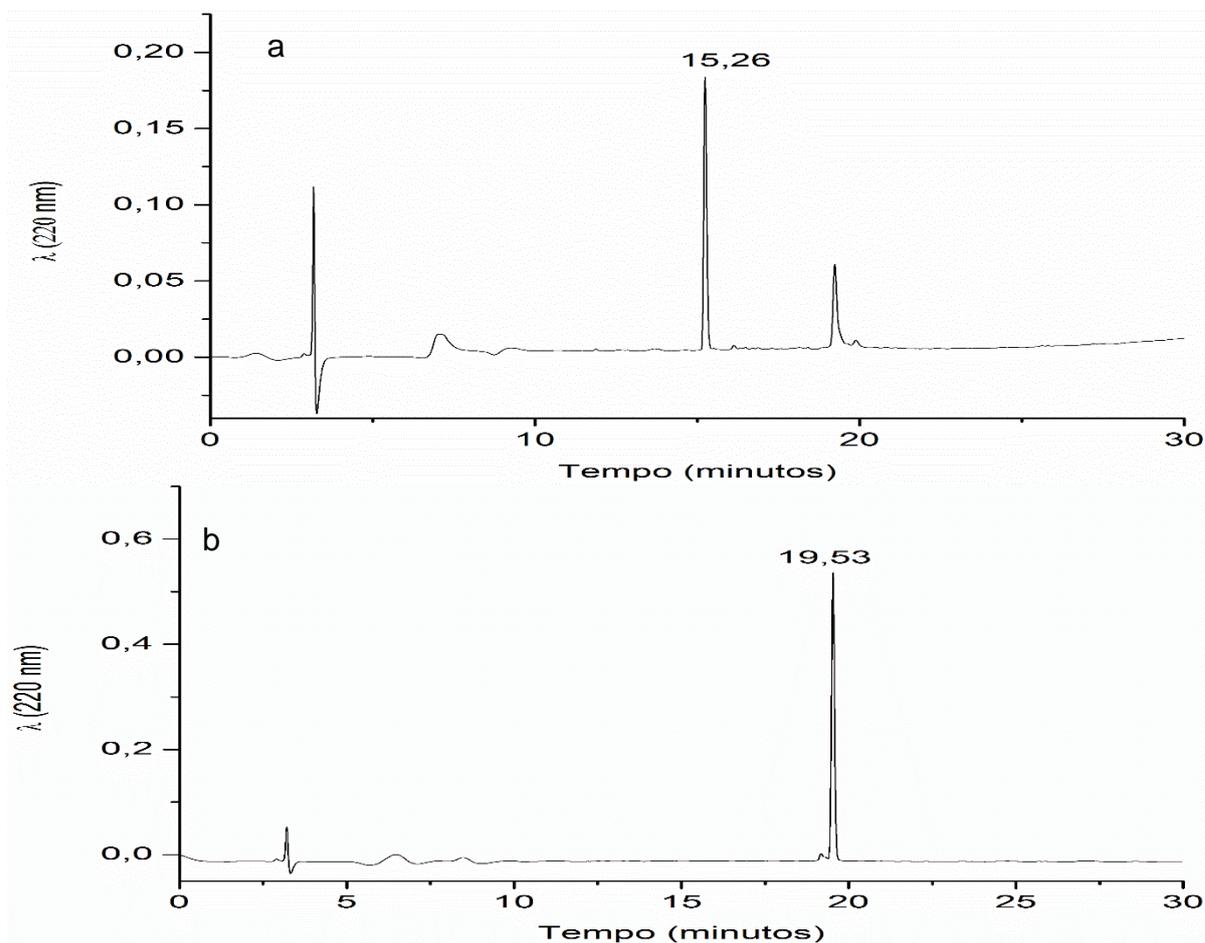
**Figura 15:** Perfil cromatográfico do peptídeo bruto SIILGILG linear (a) com tempo de retenção de 14,35 min e do peptídeo bruto SIILGILG cíclico (b) com tempo de retenção 18,44 min.

Os peptídeos sintetizados foram purificados em um sistema HPLC semipreparativo. E as frações obtidas da purificação foram avaliadas em um sistema HPLC analítico. As frações contendo os peptídeos puros foram juntadas. As condições de purificação estão descritas na Tabela 8. Os perfis cromatográficos dos peptídeos puros podem ser vistos na Figura 16.

**Tabela 8:** Condições de purificação dos peptídeos e quantidade de material puro.

Peptidil-resina	HPLC semipreparativo	HPLC analítico	Frações puras (mg)	Pureza (%)
SIILGILG linear	20-60% de solvente B em 90 min	20-60% de solvente B em 30 min	4,9	96,04

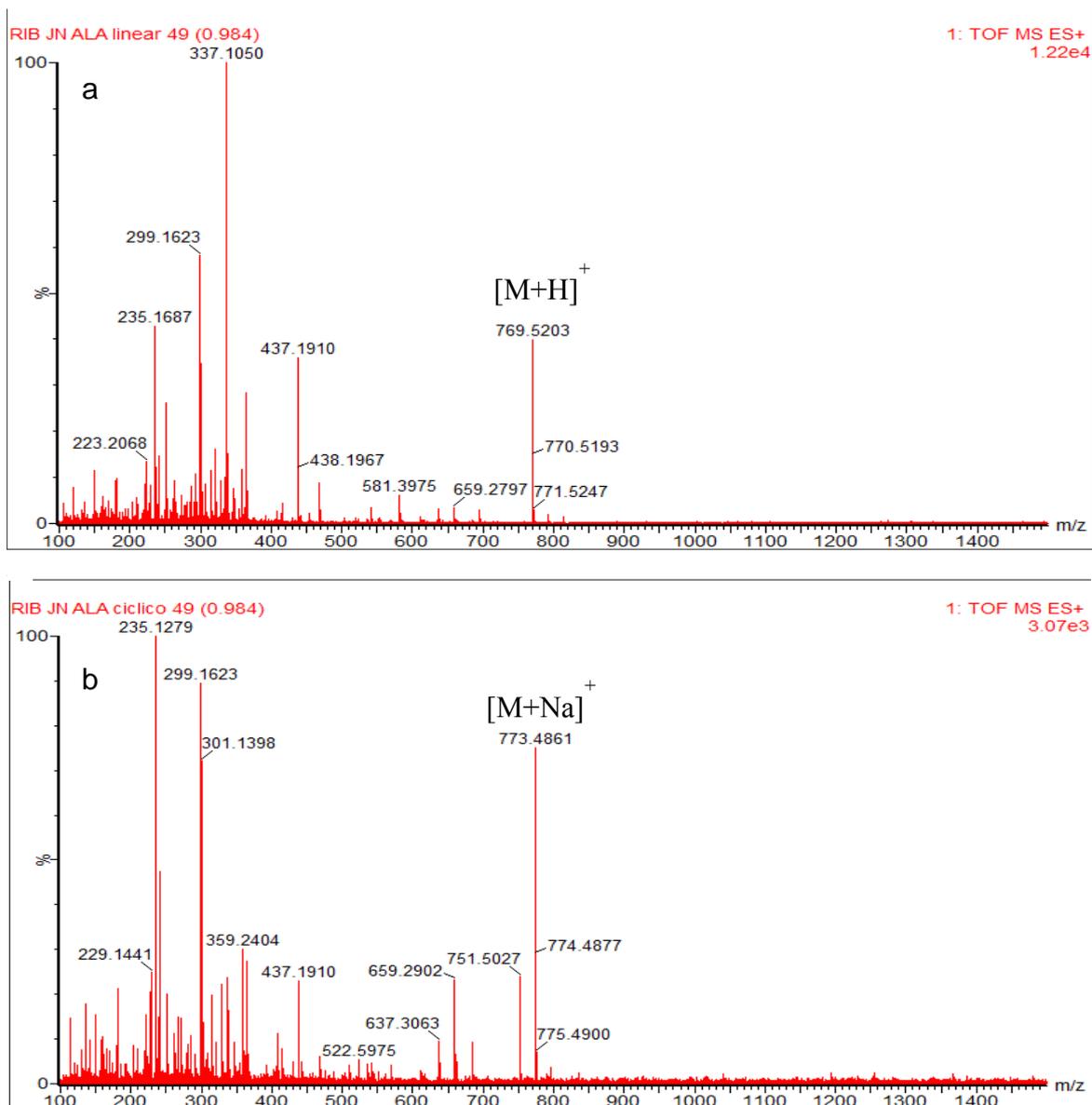
SIILGILG cíclico	40-70% de solvente B em 90 min	5-95% de solvente B em 30 min	5,9	96,59
---------------------	--------------------------------------	-------------------------------------	-----	-------



**Figura 16:** Perfil cromatográfico dos peptídeos SIILGILG linear (a) e cíclico (b) puros.

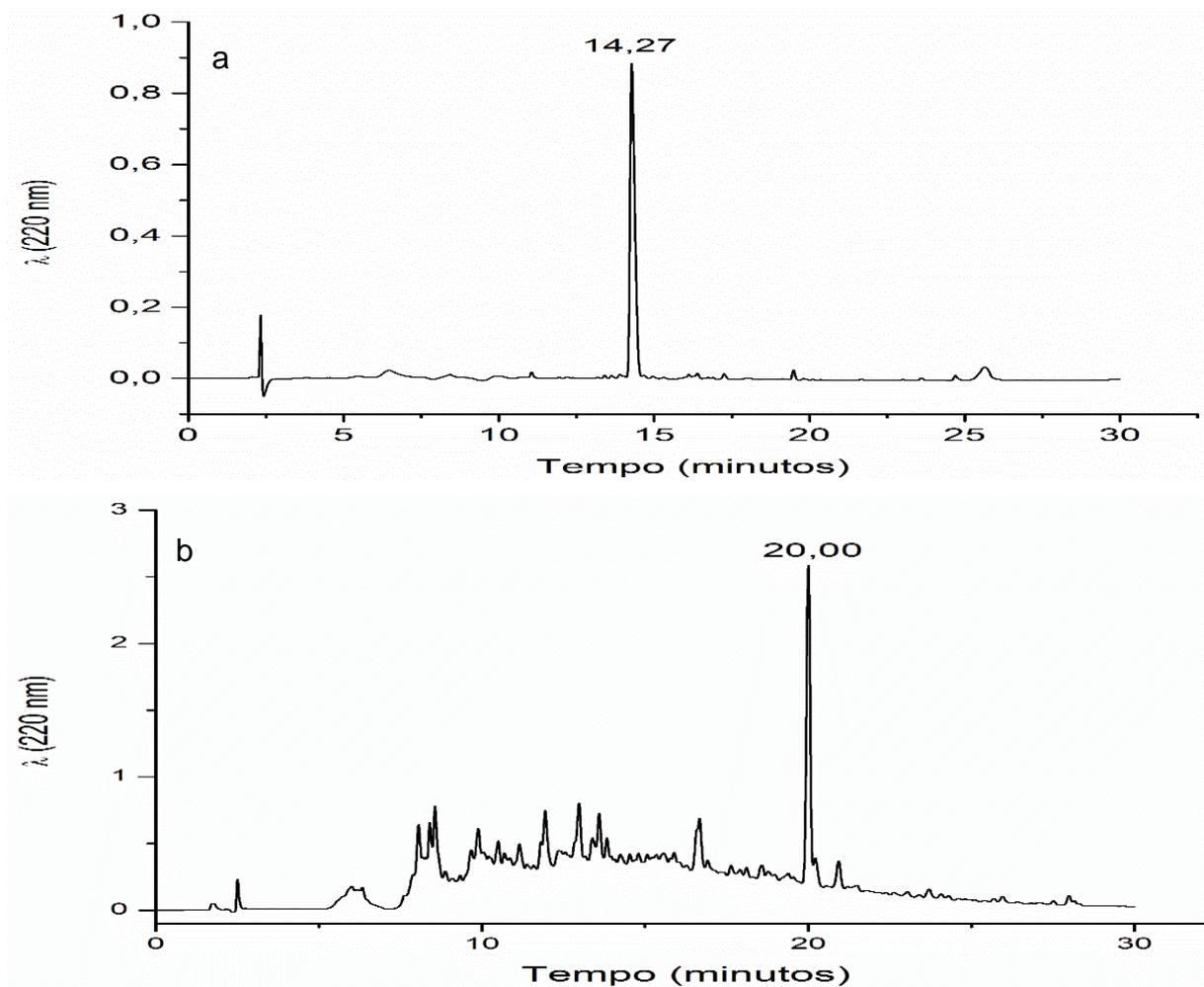
#### 4.4.2 Obtenção do peptídeo AILGILG

O espectro de massas do peptídeo AILGILG linear apresentou massa molecular 769 Da do íon protonado (Figura 17a), o que confirmou a obtenção do material desejado. A partir disso, foi realizado o processo de ciclização, e o material desejado foi confirmado por espectrometria de massas obtendo-se massa molecular 751 Da do aduto de sódio do peptídeo AILGILG cíclico (Figura 17b).



**Figura 17:** Espectro de massas referente aos peptídeos AILGILG linear (a) e AILGILG cíclico (b).

O perfil cromatográfico dos peptídeos brutos de AILGILG foi obtido em cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizando um programa gradiente de 5 a 95% de B em 30 min e tempo de retenção de 14,27 min para o linear (Figura 18a) e para o peptídeo AILGILG cíclico bruto o tempo de retenção foi 20,00 min (Figura 18b).

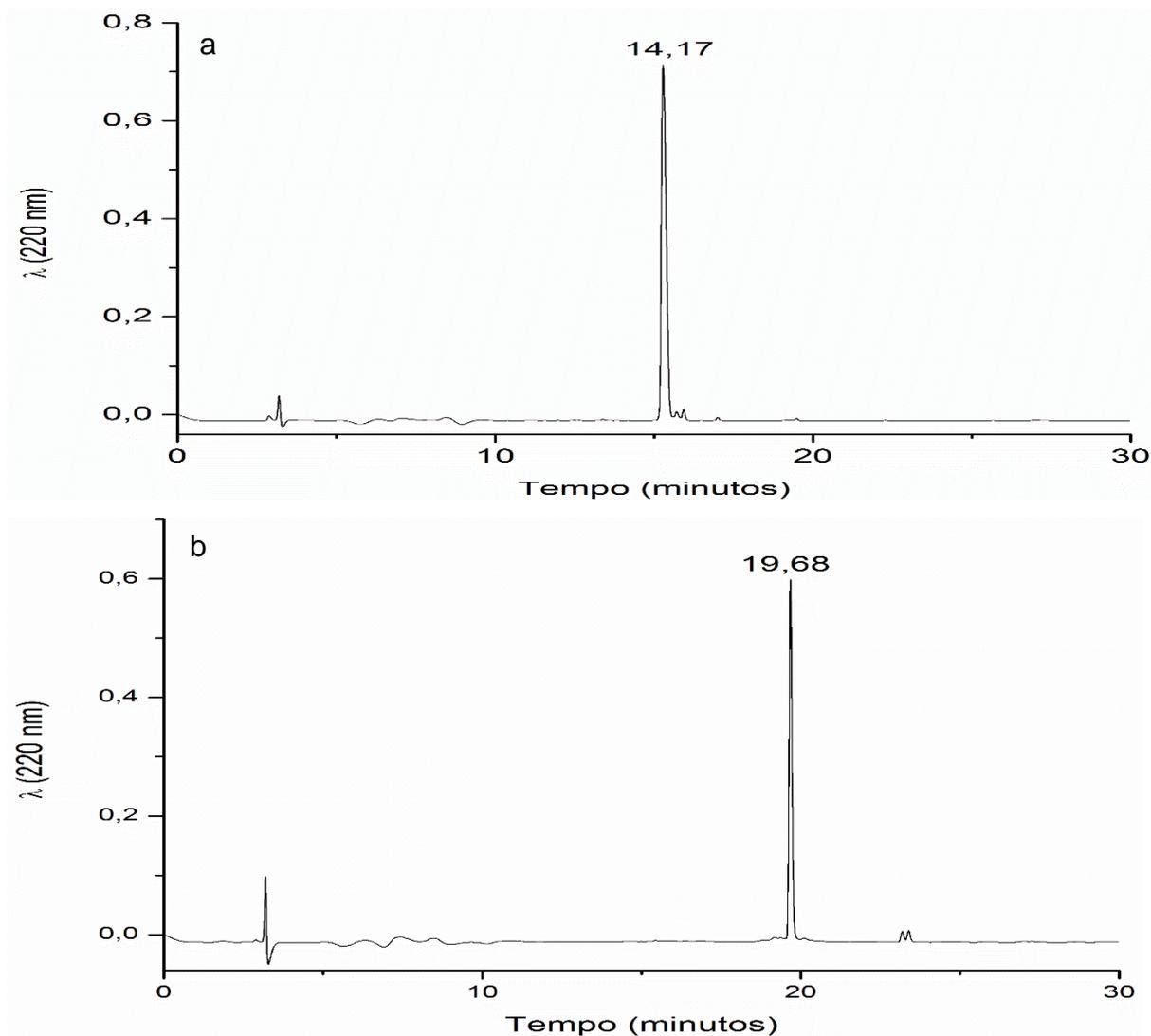


**Figura 18:** Perfil cromatográfico do peptídeo bruto AILGILG linear (a) com tempo de retenção de 14 min e do peptídeo bruto AILGILG cíclico (b) com tempo de retenção 20 min.

Os peptídeos sintetizados foram purificados em um sistema HPLC semipreparativo. E as frações obtidas da purificação foram avaliadas em um sistema HPLC analítico. As frações contendo os peptídeos purificados foram juntadas. As condições de purificação estão descritas na Tabela 9. Os perfis cromatográficos dos peptídeos puros podem ser vistos na Figura 19.

**Tabela 9:** Condições de purificação dos peptídeos e quantidade de material puro.

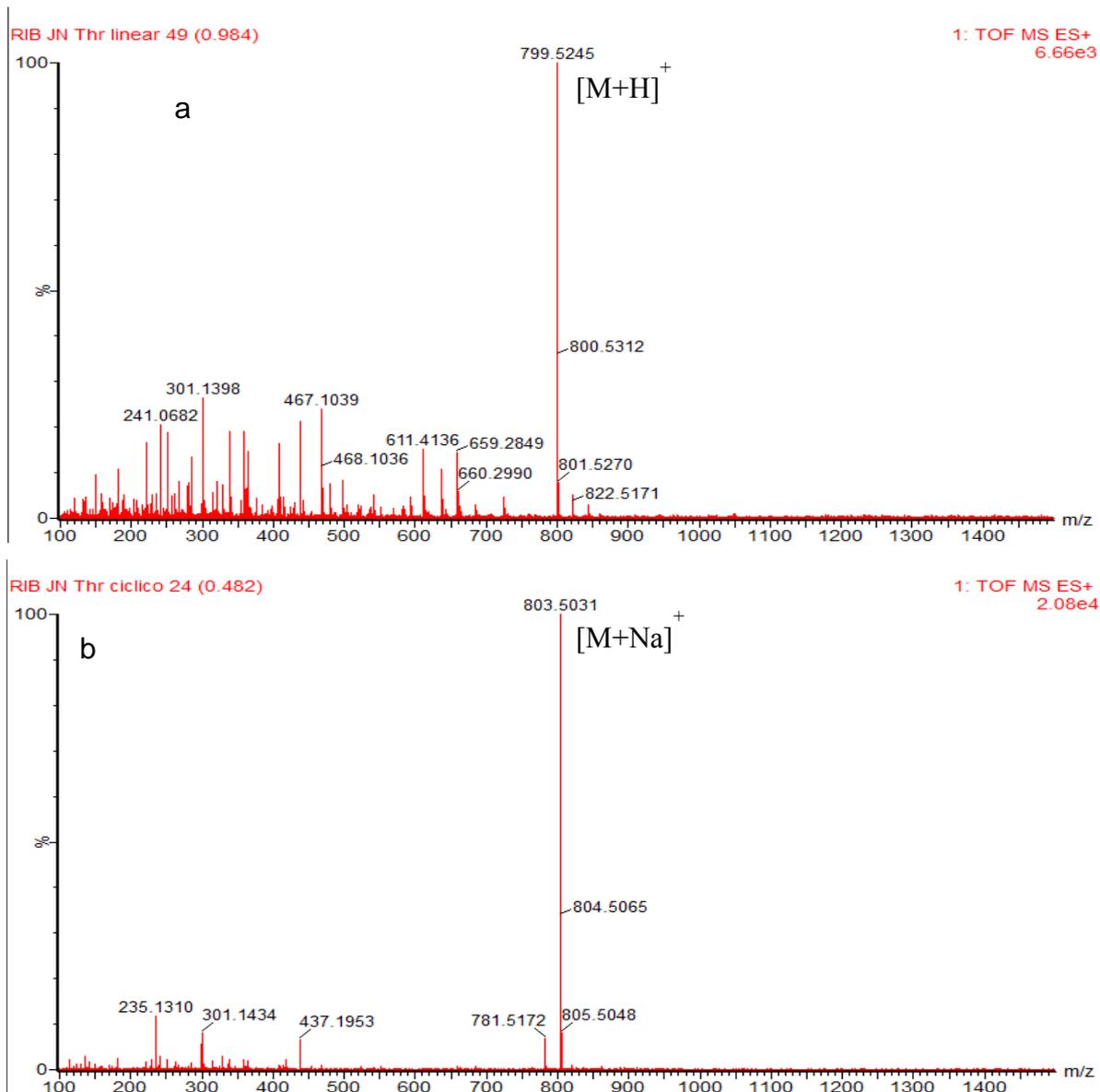
Peptidil-resina	HPLC semipreparativo	HPLC analítico	Frações puras (mg)	Pureza (%)
AILGILG linear	25-55% de solvente B em 90 min	5-95 % de solvente B em 30 min	2,0	92,26
AILGILG cíclico	35-65% de solvente B em 90 min	5-95% de solvente B em 30 min	3,0	95,98



**Figura 19:** Perfil cromatográfico dos peptídeos AILGILG linear (a) e cíclico (b) puros.

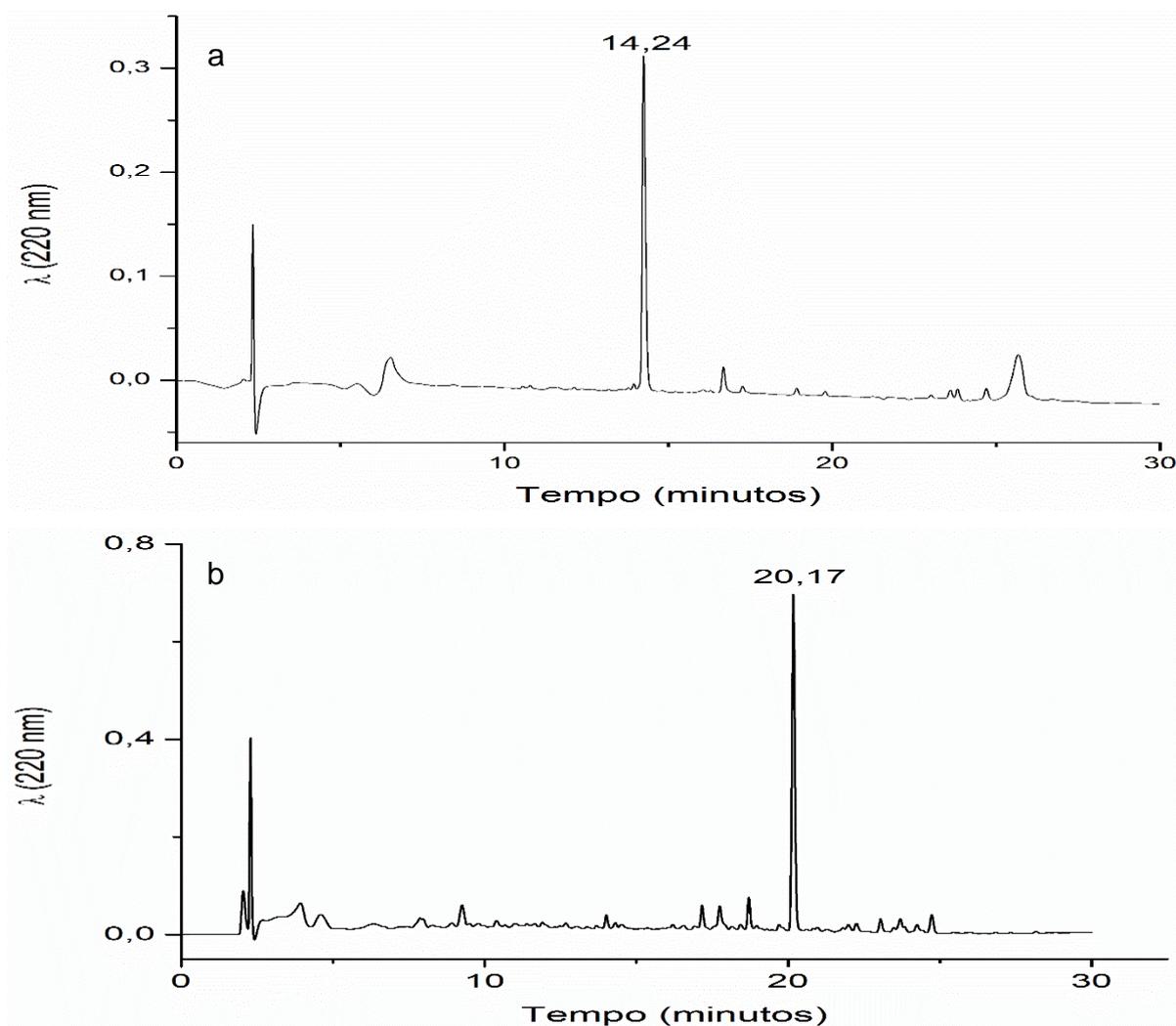
#### 4.4.3 Obtenção do peptídeo TIILGILG

O espectro de massas do peptídeo TIILGILG linear apresentou massa molecular 799 Da do íon protonado (Figura 20a), o que confirmou a obtenção do material desejado. A partir disso, foi realizado o processo de ciclização, e o material desejado foi confirmado por espectrometria de massas obtendo-se massa molecular 803 Da do aduto de sódio do peptídeo TIILGILG cíclico (Figura 20b).



**Figura 20:** Espectro de massas referente aos peptídeos TIILGILG linear (a) e TIILGILG cíclico (b).

O perfil cromatográfico dos peptídeos brutos de TIILGILG foi obtido em cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizando um programa gradiente de 5 a 95% de B e tempo de retenção de 14,24 min para o linear (Figura 21a) e para o peptídeo TIILGILG cíclico bruto o tempo de retenção foi 20,17 min (Figura 21b).



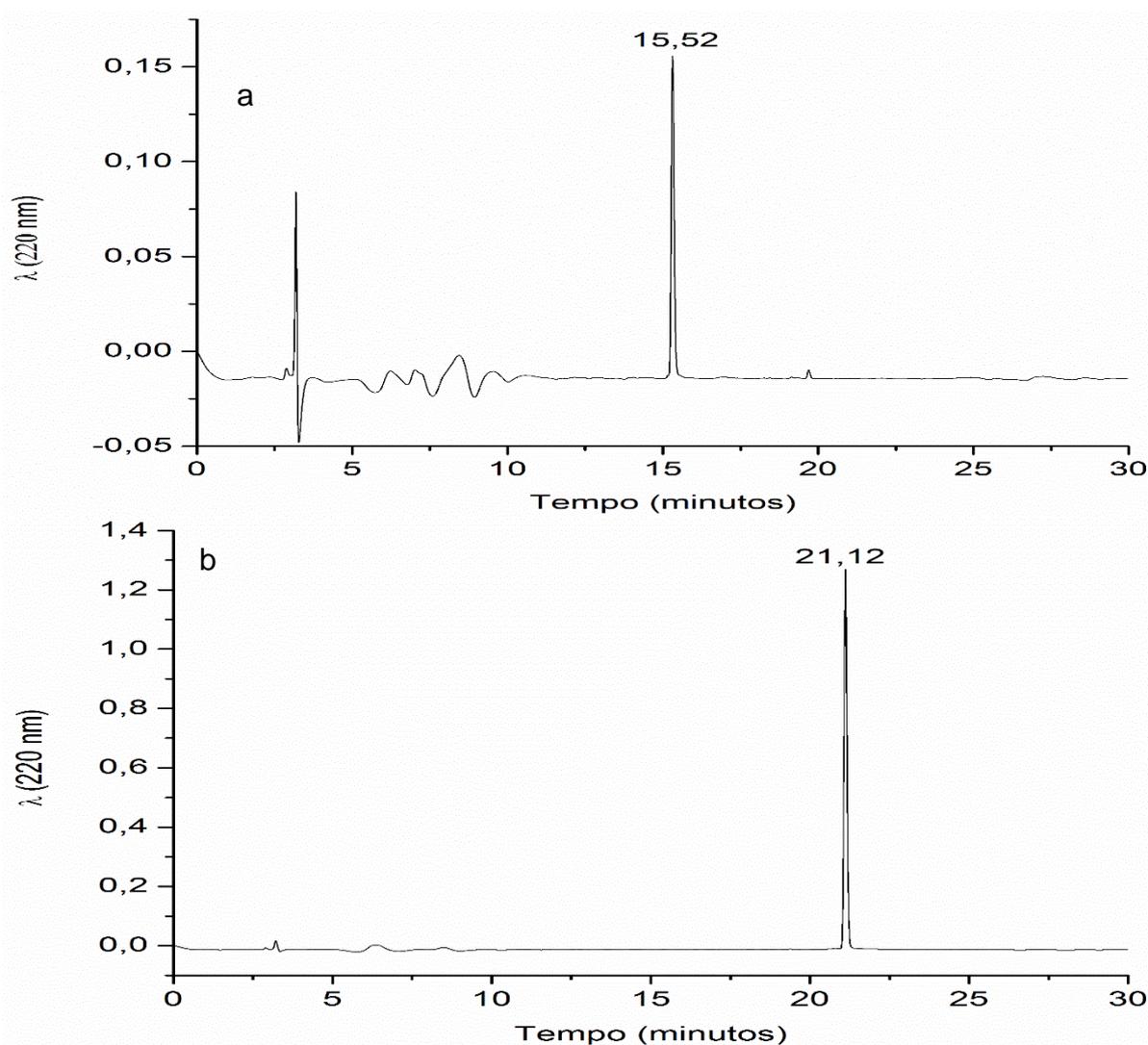
**Figura 21:** Perfil cromatográfico do peptídeo bruto TIILGILG linear (a) com tempo de retenção de 14,24 min e do peptídeo bruto TIILGILG cíclico (b) com tempo de retenção 20,17 min.

Os peptídeos sintetizados foram purificados em um sistema HPLC semipreparativo. E as frações obtidas da purificação foram avaliadas em um sistema HPLC analítico. As frações contendo os peptídeos purificados foram juntadas. As condições de purificação estão descritas na Tabela 10. Os perfis cromatográficos dos peptídeos puros podem ser vistos na Figura 22.

**Tabela 10:** Condições de purificação dos peptídeos e quantidade de material puro.

Peptidil-resina	HPLC semipreparativo	HPLC analítico	Frações puras (mg)	Pureza (%)
TIILGILG linear	25-55% de solvente B em 90 min	20-50% de solvente B em 30 min	1,4	100

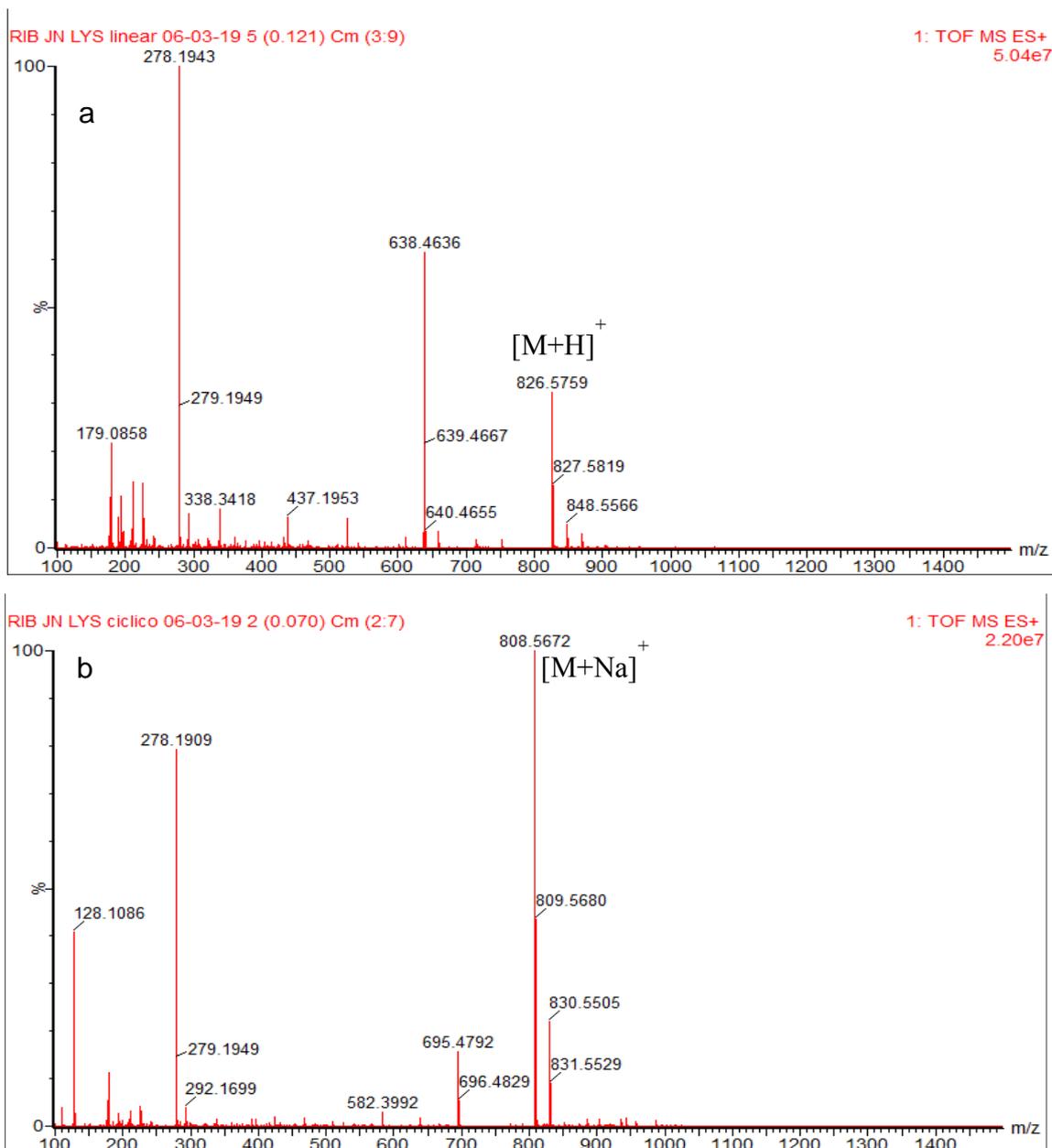
TIILGILG cíclico	40-70% de solvente B em 90 min	5-95% de solvente B em 30 min	16,0	100
---------------------	--------------------------------------	-------------------------------------	------	-----



**Figura 22:** Perfil cromatográfico dos peptídeos TIILGILG linear (a) e cíclico (b) puros.

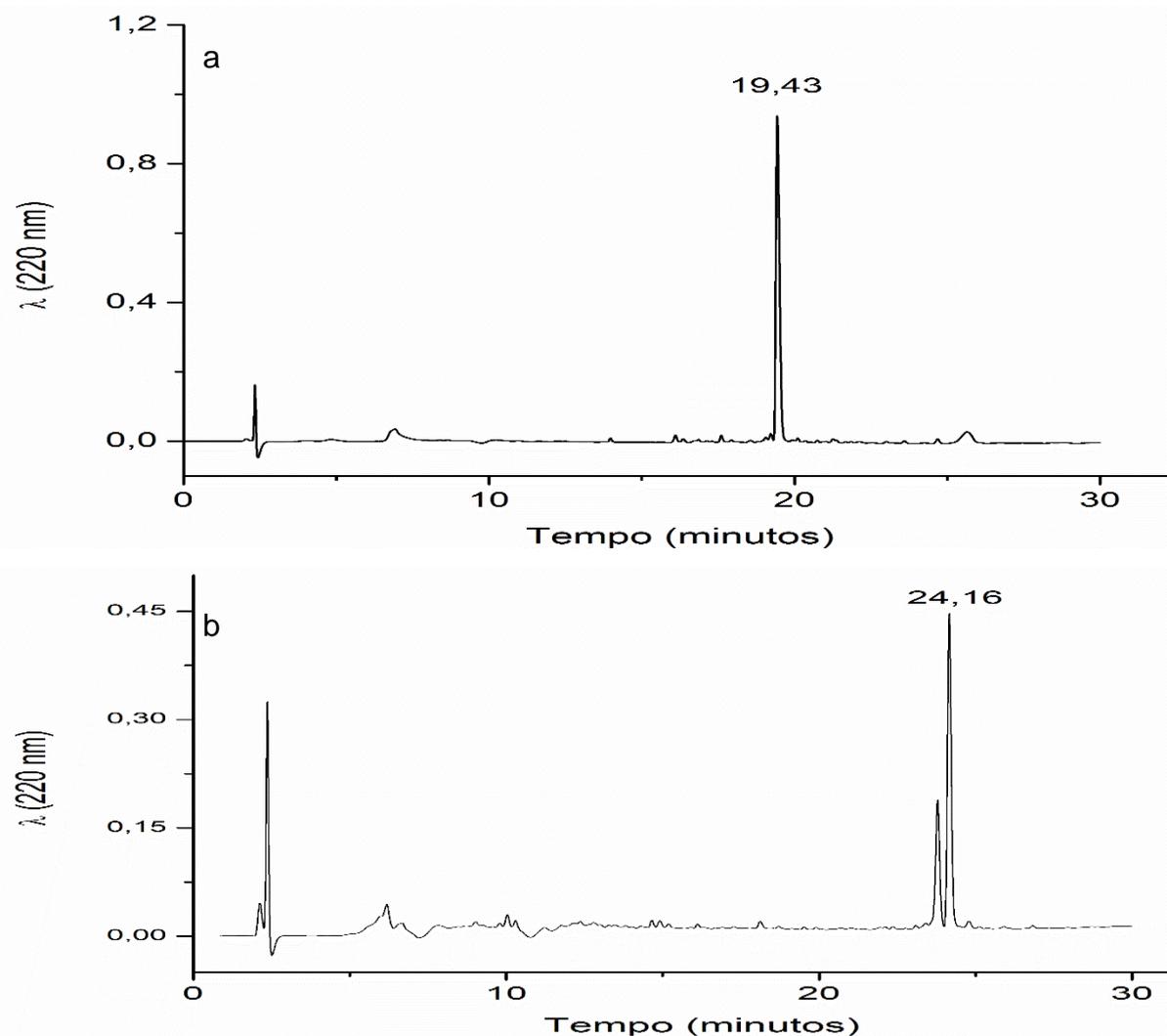
#### 4.4.4 Obtenção do peptídeo KIILGILG

O espectro de massas do peptídeo KIILGILG linear apresentou massa molecular 826 Da do íon protonado (Figura 23a), o que confirmou a obtenção do material desejado. A partir disso, foi realizado o processo de ciclização, e o material desejado foi confirmado por espectrometria de massas obtendo-se massa molecular 808 Da do aduto de sódio do peptídeo KIILGILG cíclico (Figura 23b).



**Figura 23:** Espectro de massas referente aos peptídeos KIILGILG linear (a) e KIILGILG cíclico (b).

O perfil cromatográfico dos peptídeos brutos de KIILGILG foi obtido em cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizando um programa gradiente de 5 a 95% de B e tempo de retenção de 19,43 min para o linear (Figura 24a) e para o peptídeo KIILGILG cíclico bruto o tempo de retenção foi 24,16 min (Figura 24b).



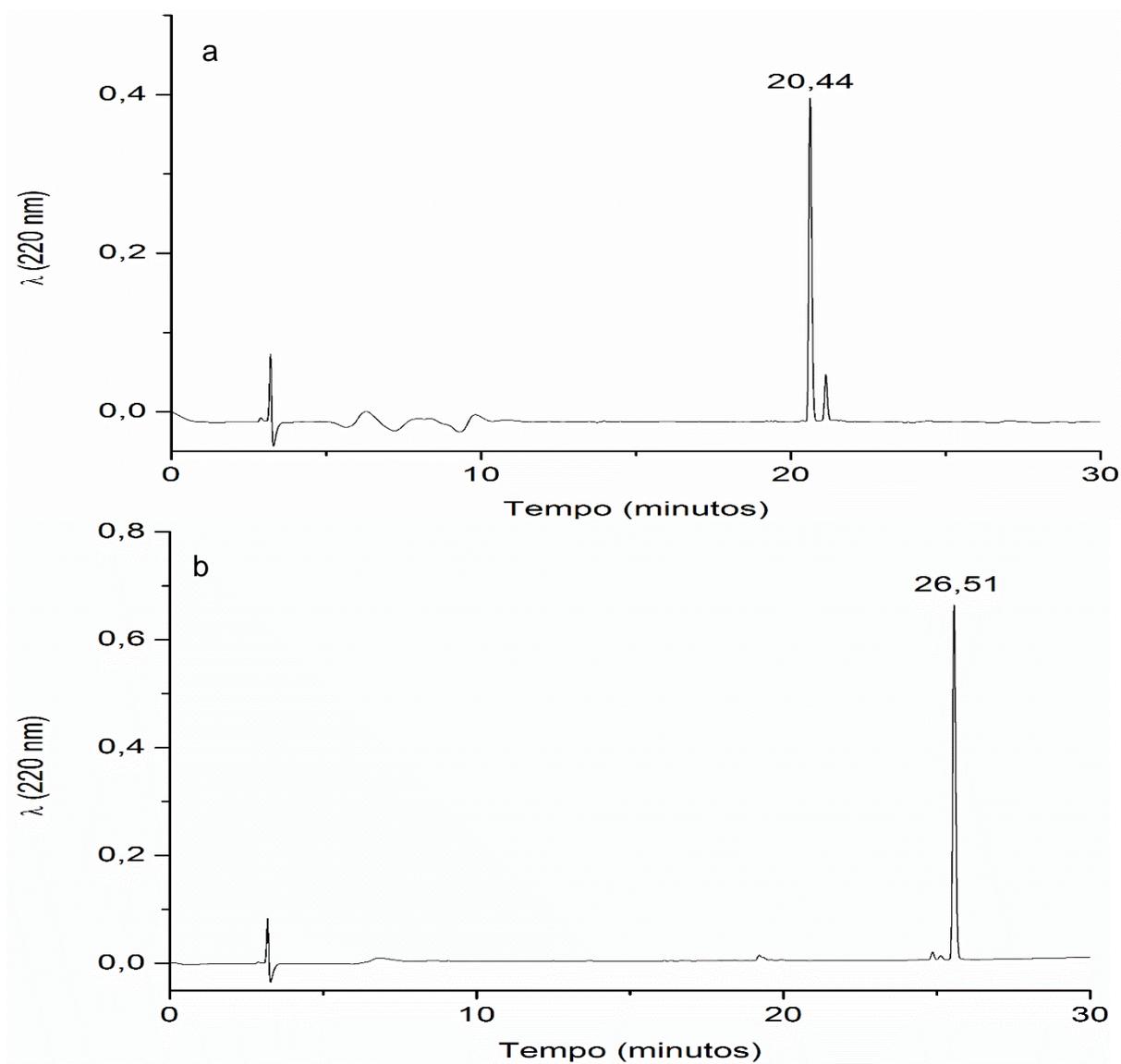
**Figura 24:** Perfil cromatográfico do peptídeo bruto KIILGILG linear (a) com tempo de retenção de 19 min e do peptídeo bruto KIILGILG cíclico (b) com tempo de retenção 24 min.

Os peptídeos sintetizados foram purificados em um sistema HPLC semipreparativo. E as frações obtidas da purificação foram avaliadas em um sistema HPLC analítico. As frações contendo os peptídeos purificados foram juntadas. As condições de purificação estão descritas na Tabela 11. Os perfis cromatográficos dos peptídeos puros podem ser vistos na Figura 25.

**Tabela 11:** Condições de purificação dos peptídeos e quantidade de material puro.

Peptidil-resina	HPLC semipreparativo	HPLC analítico	Frações puras (mg)	Pureza (%)
KIILGILG linear	25-55% de solvente B em 90 min	20-50% de solvente B em 30 min	4,5	100

KIILGILG cíclico	50-80% de solvente B em 90 min	5-95% de solvente B em 30 min	3,9	95,36
---------------------	--------------------------------------	-------------------------------------	-----	-------



**Figura 25:** Perfil cromatográfico dos peptídeos KIILGILG linear (a) e cíclico (b) puros.

#### 4.5 Avaliação antitumoral de ribifolina e seus análogos sintéticos

Câncer é uma doença multifatorial que acomete milhões de pessoas do mundo inteiro. Assim, a indústria farmacêutica e a comunidade científica unem esforços para buscar novos protótipos de fármacos que possuam maior eficácia e menor toxicidade ao organismo. Após a síntese e purificação das substâncias foi realizada a avaliação antitumoral em colaboração com a professora Dra Letícia Lotufo da Universidade de

São Paulo (USP). A Tabela 12 mostra a inibição de crescimento para a linhagem celular HCT-116.

**Tabela 12:** Avaliação da inibição de crescimento para a linhagem celular HCT-116.

Amostras	GI* (%) 5 ug/mL			GI (%) 50 ug/mL		
	Média	EPM	n	Média	EPM	n
RibJNAla linear	-0,07	2,87	2	-8,32	1,17	2
RibJNAla cíclico	0,05	3,43	2	3,75	4,99	2
ribifolina linear	19,74	3,05	2	16,54	5,29	2
ribifolina cíclica	5,13	6,66	2	6,87	4,26	2
RibJNThr linear	9,19	2,52	2	22,64	3,17	2
RibJNThr cíclico	6,28	2,15	2	12,46	2,13	2
RibJNLys linear	1,14	0,95	2	9,45	3,20	2
RibJNLys cíclico	44,85	2,12	2	73,50	3,12	2

\*GI: Inibição de crescimento.

A ribifolina e os seus análogos com aminoácidos mais apolares (Ala e Thr), bem como o análogo linear de RibJNLys apresentaram baixa inibição de crescimento para a linhagem celular HCT-116. Em contraste, o análogo cíclico da lisina (RibJNLys) gerou a melhor inibição de crescimento (73,5 % à 50 ug/mL). Com esses resultados é possível notar que a mudança pontual por aminoácidos mais apolares (sejam na forma linear ou cíclica) que a Ser não apresentou o aumento da atividade tumoral, entretanto, o uso de carga positiva do aminoácido Lys no peptídeo cíclico gerou o aumento de sua atividade, demonstrando que não só a carga positiva, mas também a forma cíclica aumentou a atividade antitumoral. A Tabela 13 mostra a inibição de crescimento para a linhagem celular MCF-7. O mesmo padrão de inibição para a ribifolina e seus análogos foi observada para a linhagem celular MCF-7. Dessa forma, pode-se denotar que a substituição pontual da Ser por aminoácidos que possuem carga positiva na sua cadeia lateral é mais indicado para a atividade antitumoral do que a substituição da Ser por aminoácidos mais apolares.

**Tabela 13:** Avaliação da inibição de crescimento para a linhagem celular MCF-7.

Amostras	GI (%) 5 ug/mL			GI (%) 50 ug/mL		
	Média	EPM	n	Média	EPM	n
RibJNAla linear	-6,76	9,95	2	1,20	6,45	2
RibJNAla cíclico	-2,19	11,23	2	-1,83	9,21	2
ribifolina linear	14,66	12,12	2	13,46	12,37	2
ribifolina cíclica	2,07	12,80	2	-3,00	14,49	2
RibJNThr linear	-0,68	9,65	2	7,79	7,07	2
RibJNThr cíclico	-28,29	1,83	2	-27,81	3,19	2
RibJNLys linear	9,05	7,66	2	23,04	3,84	2
RibJNLys cíclico	62,19	4,64	2	86,91	4,24	2

\*GI: Inibição de crescimento.

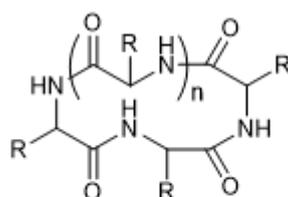
#### 4.6 Cromatografia líquida de alta eficiência para *C. sphaerogynus*

Segundo dados recentes da literatura, o gênero *Croton* L. também apresenta peptídeos cíclicos tipo orbitídeos (PEREIRA et al., 2012; QUINTYNE-WALCOTT et al., 2007), sendo assim, com o intuito de averiguar uma espécie de *Croton* L., selecionou-se *Croton sphaerogynus* para a análise de LCMS visando a desreplicação da matrix, visto que o ensaio de clorox é um ensaio visual e pode apresentar falso negativo.

Para a prospecção de peptídeos na espécie *C. sphaerogynus*, 50 mg do extrato etanólico das folhas e do caule foram fracionados por extração em fase sólida, conforme o item 3.3. As frações consideradas ricas em peptídeos (FR80F e FR80C) foram analisadas por HPLC analítico, o que permitiu estabelecer o melhor método para análise por LC/MS. Com base nos perfis obtidos, o gradiente de eluição selecionado foi de 15-40% de solvente B em A, em 45 min (B: 0,1% ác. fórmico / 90% ACN e A: 0,1% ác. fórmico /H<sub>2</sub>O), o que pode separar com boa resolução os compostos identificados (Figura 26). A Figura 27 apresenta os cromatogramas de íons

das FR80F e FR80C e os picos correspondentes aos compostos HPLC-ESI-MS/MS e descritos na Tabela 14. A análise foi realizada em modo positivo, a identificação das substâncias foi desenvolvida com base em padrões de fragmentação e comparação de dados da literatura para substâncias já identificadas anteriormente e para similares.

A comparação entre os perfis obtidos dos extratos analisados para as folhas e dos caules de *C. sphaerogynus* permitiu inferir a presença de orbitédeos (compostos de interesse), e também a detecção da classe de flavonoides



R= isoleucil ou sec-butil

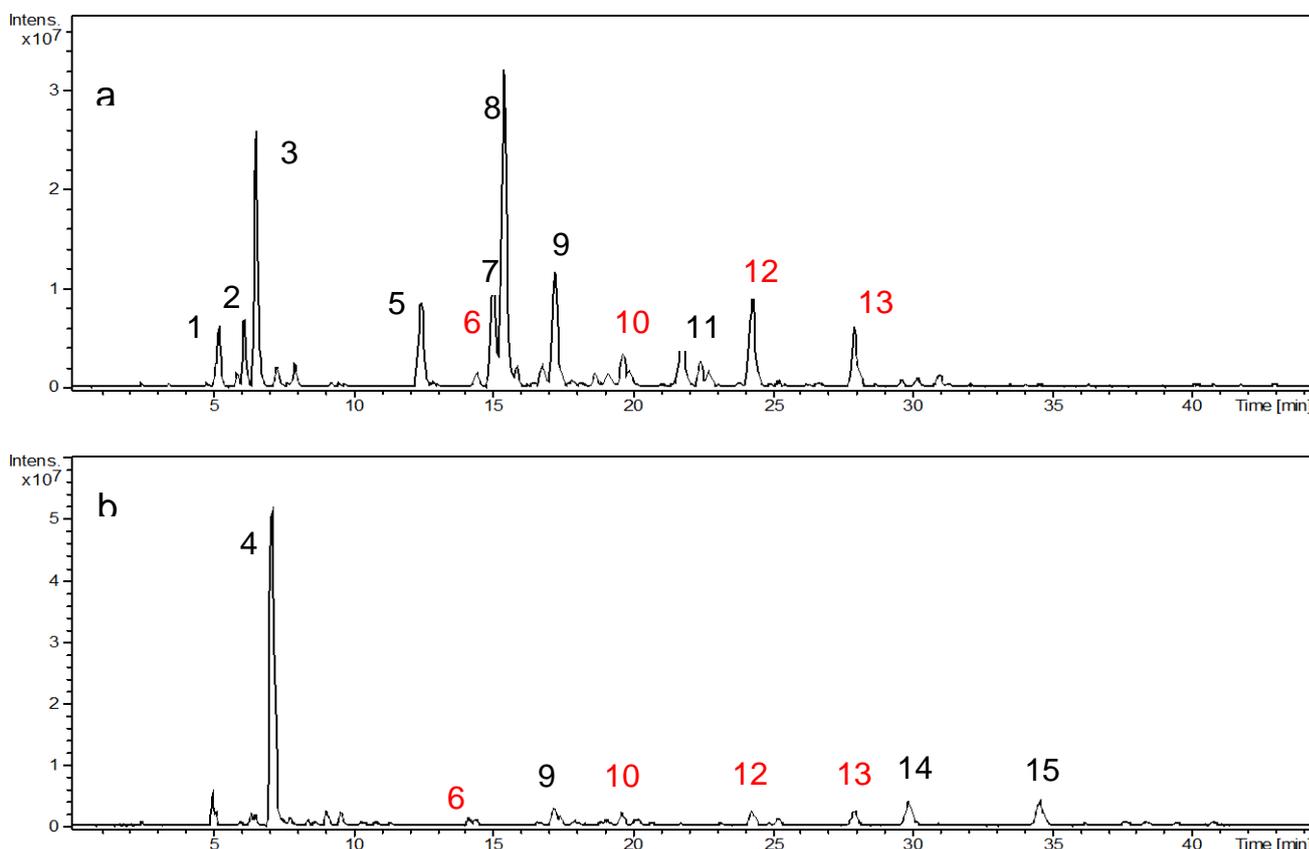
6 ciclotetraleucil (ou isoleucil) n=1

10 ciclopentaleucil (ou isoleucil) n=2

12 ciclohexaleucil (ou isoleucil) n=3

13 ciclo heptaleucil (ou isoleucil) n=4

**Figura 26:** Perfil cromatográfico dos peptídeos KIILGILG linear (a) e cíclico (b) puros.



**Figura 27:** Cromatograma de íons das frações FR80F (a) e FR80C (b) de *C. sphaerogynus*. Os números dos picos estão identificados na Tabela 2. Legenda: orbitídeos (vermelho) e flavonoides (preto). As condições experimentais foram descritas na metodologia. Programa: 15-40% de solvente B em A, em 45 min (B: 0,1% ác. fórmico / 90% ACN e A: 0,1% ác. fórmico /H<sub>2</sub>O).

**Tabela 14:** Caracterização dos constituintes de FR80F e FR80C *C. sphaerogynus* por HPLC-DAD-ESI-MS/MS. Orbitídeos (vermelho) e flavonoides (preto).

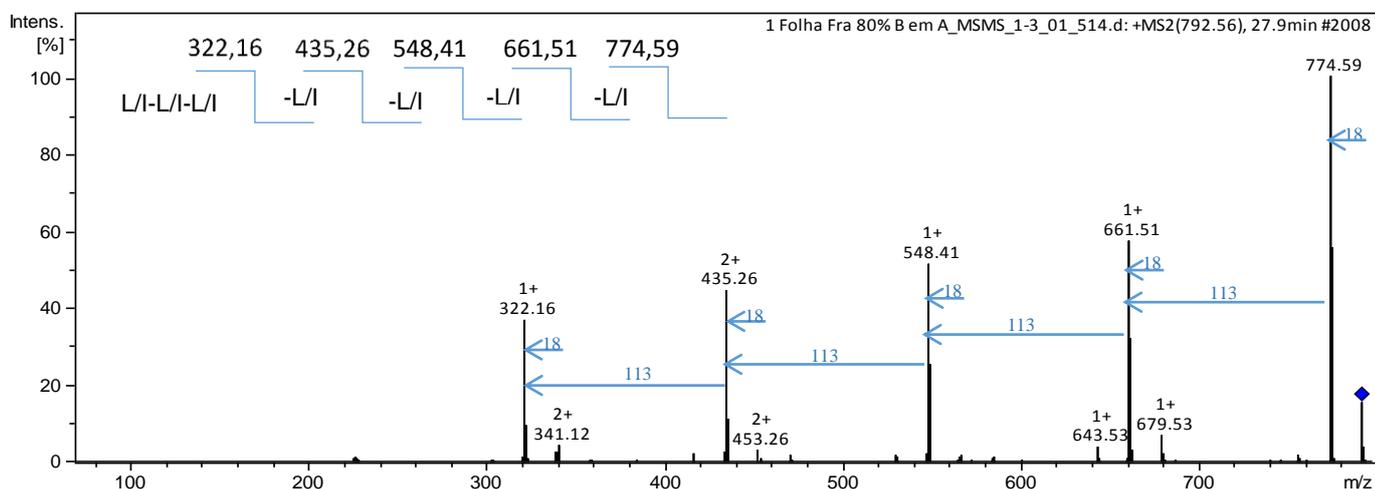
No	Tr (min)	[M-H] <sup>+</sup>	Fragmentos MS <sup>2</sup>	composto
1	5,3	344	344,299,174	n.i.
2	6,3	300	300, 267, 178	n.i.
3	6,6	330	330, 299, 192	n.i.
4	7,1	342	342, 297, 265	n.i.
5	12,4	757	757, 611, 449, 303	quercetina
6	14,4	453	453, 435, 322, 209	ciclotetraleucil (ou isoleucil)
7	15,0	763	763, 617, 477, 331	metoxiquercetina
8	15,4	741	741, 595, 449, 433, 286	campferol triglicosídeo (2 ramnose, 1 hexose)
9	17,2	611	611, 465, 449, 303	quercitina diglicosilada (1 ramnose, 1 glucose)
10	19,6	566	566, 548, 435, 322, 209	ciclopentaleucil (ou isoleucil)
11	21,7	595	595, 449, 286	campferol diglicosilado
12	24,3	679	679, 661, 566, 548, 435, 322, 209	ciclohexaleucil (ou isoleucil)
13	27,8	792	792, 774, 679, 661, 566, 548, 435, 322, 209	cicloheptaleucil (ou isoleucil)
14	30,0	314	314, 176	n.i.
15	34,5	314	314, 176	n.i.

n.i.: não identificado.

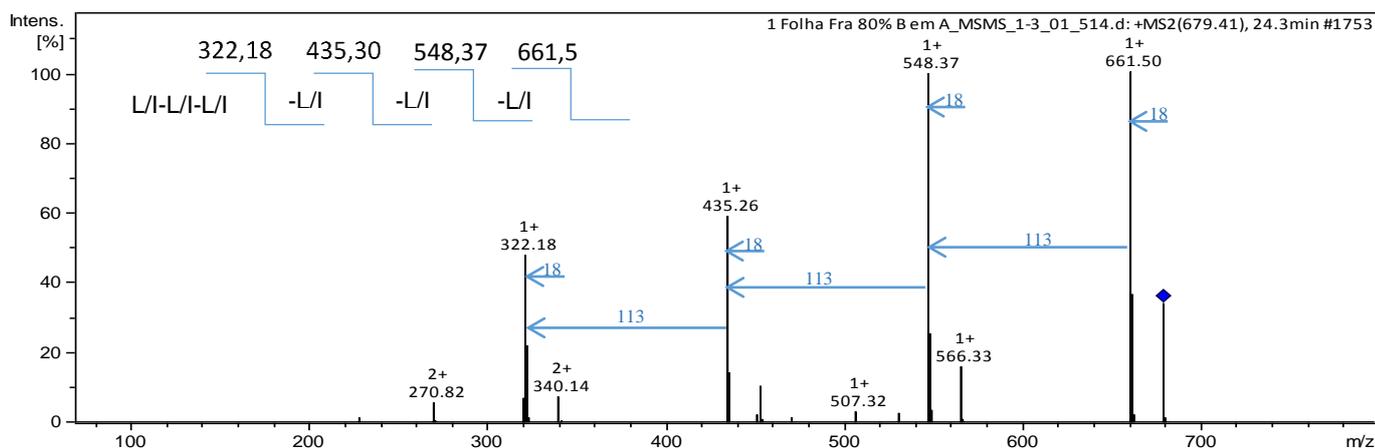
Peptídeos cíclicos são amplamente distribuídos em bactérias, organismos marinhos e plantas. Sendo de grande relevância por exibirem relativa estabilidade química e atividades biológicas variadas.

Até o momento, foram assinalados 9 compostos para *C. sphaerogynus*. Sendo destes, 4 orbitídeos (6, 10, 12 e 13), 2 flavonoides e 3 flavonoides glicosilados. Os orbitídeos possuem íons [M-H]<sup>+</sup> 453, 566, 679 e 792, respectivamente e estão presentes tanto nas folhas como nos caules. A análise dos espectros MS/MS evidenciou fragmentações ocorrendo de maneira similar, apresentando perdas neutras de 113 Da (resíduos de aminoácidos leucil ou isoleucil) e 18 Da (H<sub>2</sub>O) (Figuras 28-31). Estes orbitídeos foram reportados pela primeira vez por Wang (2014) que identificou estes peptídeos cíclicos pela técnica de LCMS em uma formulação fitoterápica da medicina tradicional chinesa, composta pelas espécies *Citri reticulatae pericarpium*, *Aurantii fructus immaturus* e *Zingiberis rhizome Recens*. Mais

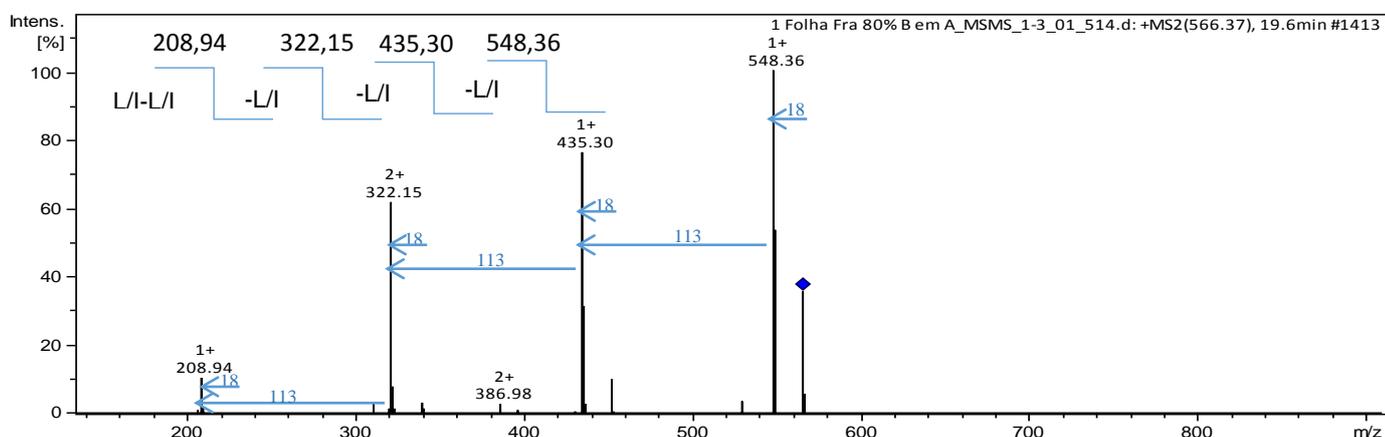
recentemente, estes orbitóides foram identificados na espécie *Anemarrhena asphodeloides*, contudo não foram isolados, apenas identificados por LCMS (Ji et al., 2017).



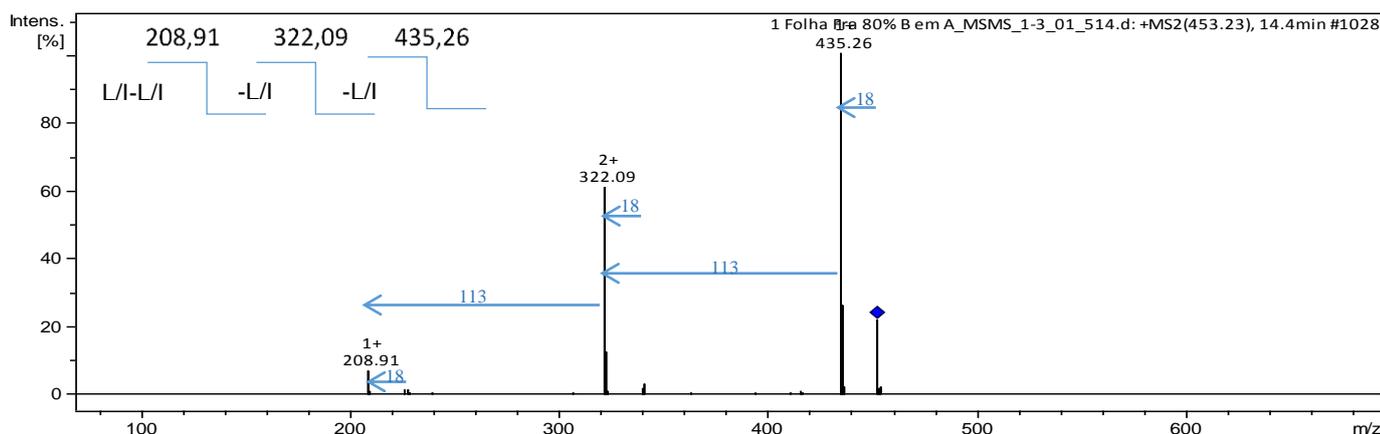
**Figura 28:** Espectro MS<sup>2</sup> e proposta de fragmentação para cicloheptaleucil (pico 13).



**Figura 29:** Espectro MS<sup>2</sup> e proposta de fragmentação para cyclohexaleucil (pico 12).



**Figura 30:** Espectro MS<sup>2</sup> e proposta de fragmentação para cyclopentaleucil (pico 10).

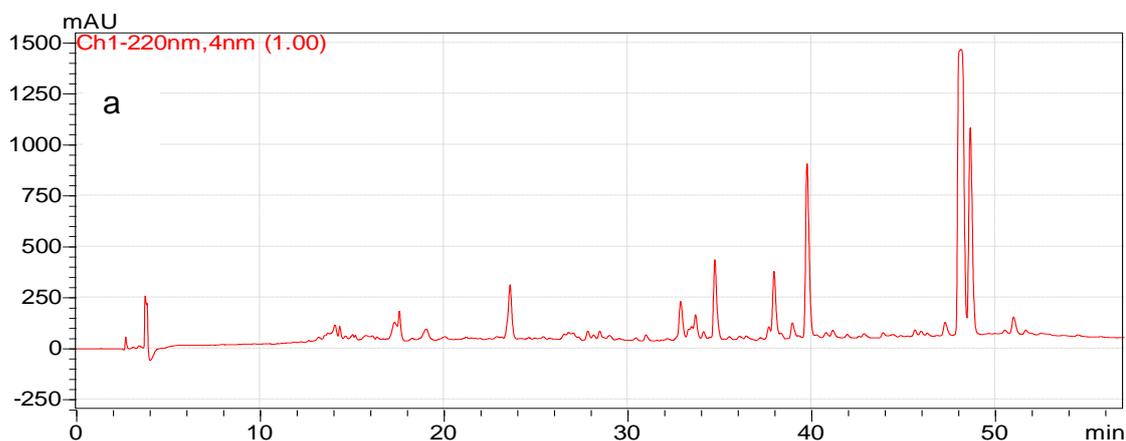


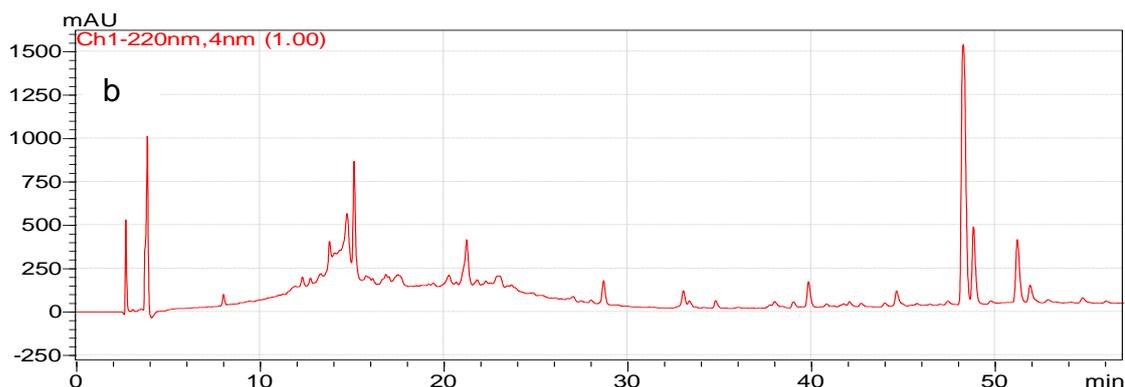
**Figura 31:** Espectro MS<sup>2</sup> e proposta de fragmentação para ciclotetraleucil (pico 6).

Com relação ao último resíduo de aminoácido não foi possível observar a sua completa fragmentação, entretanto quando comparado com dados da literatura notou-se que a perda de 113 Da a partir do íon 208,91 geraria o possível último aminoácido com a perda de uma molécula de água (96 Da) (JI et al., 2017).

#### 4.7 Partição do extrato bruto etanólico

Após analisar o perfil cromatográfico das amostras de folha e de caule (Figura 32) observou-se uma grande quantidade de picos de baixa polaridade. Sabendo que peptídeos cíclicos possuem uma faixa de eluição por volta de 60 % de ACN em H<sub>2</sub>O e que, portanto, esses compostos mais apolares não seriam de interesse, optou-se pela remoção deles. Para tanto, uma partição do extrato etanólico com metanol e hexano foi realizada. O perfil cromatográfico da fração metanólica foi selecionada para continuidade do estudo. A Tabela 15 apresenta as massas obtidas para cada fração.



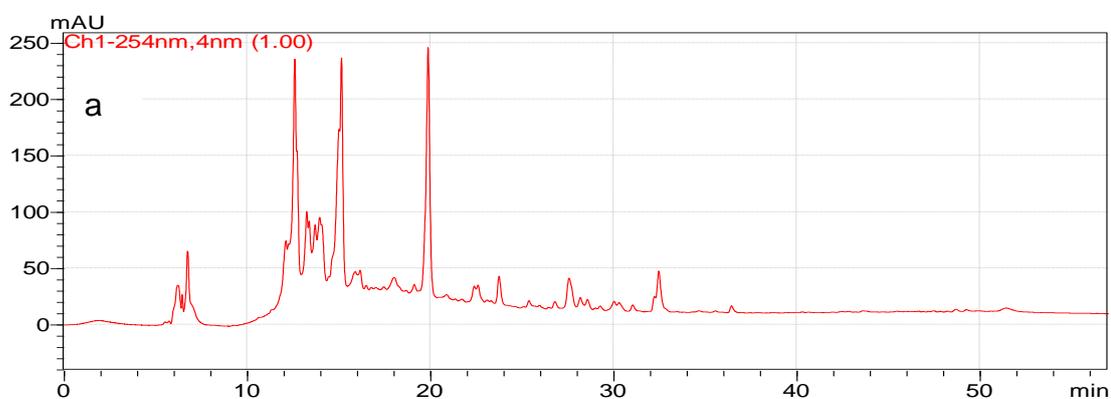


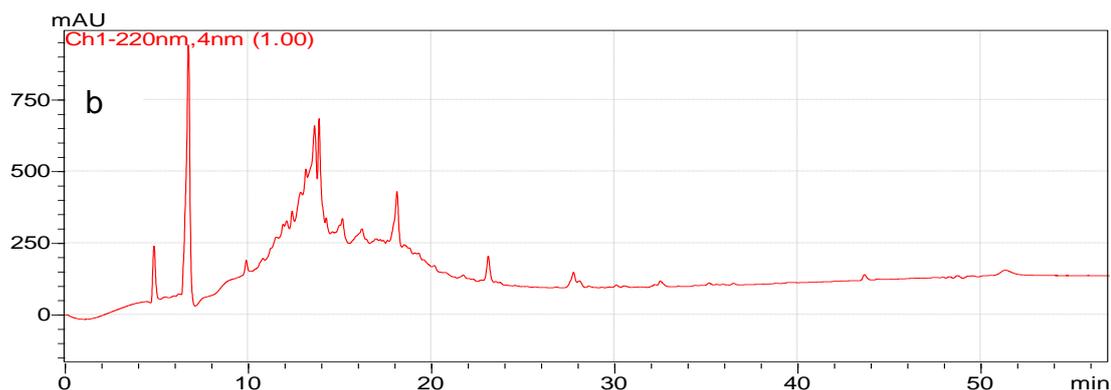
**Figura 32:** Cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas (a) e dos caules (b) de *C. sphaerogynus*, utilizando método exploratório gradiente de 5-95% de B, em 55 min e 220 nm.

**Tabela 15:** Massas obtidas da partição do extrato etanólico das folhas e dos caules de *C. sphaerogynus*.

	Extrato etanólico (g)	Fração metanólica (g)	Fração hexânica (g)
Folha	41,1	24,65	13,67
Caule	17,2	13,11	2,45

A partir da análise comparativa dos perfis cromatográficos da fração metanólica provenientes das folhas e dos caules da espécie *C. sphaerogynus* (Figura 33), notou-se uma maior diversidade de picos na faixa de eluição de orbitóides (cerca de 60 % de ACN em H<sub>2</sub>O) na fração de folhas. A detecção é feita por UV monitorada em comprimento de onda de 220 nm, característico de ligações peptídicas e 280 nm, de resíduos aromáticos.





**Figura 33:** Cromatogramas das frações metanólicas das folhas (a) e dos caules (b) de *C. sphaerogynus*, utilizando método exploratório gradiente de 5-95% de B, em 45 min e 220 nm.

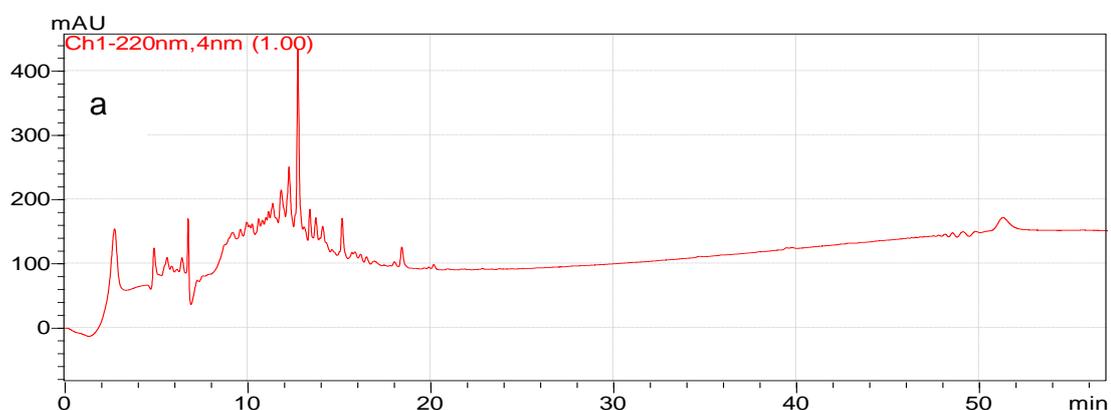
#### 4.8 Extração em fase sólida das frações metanólicas

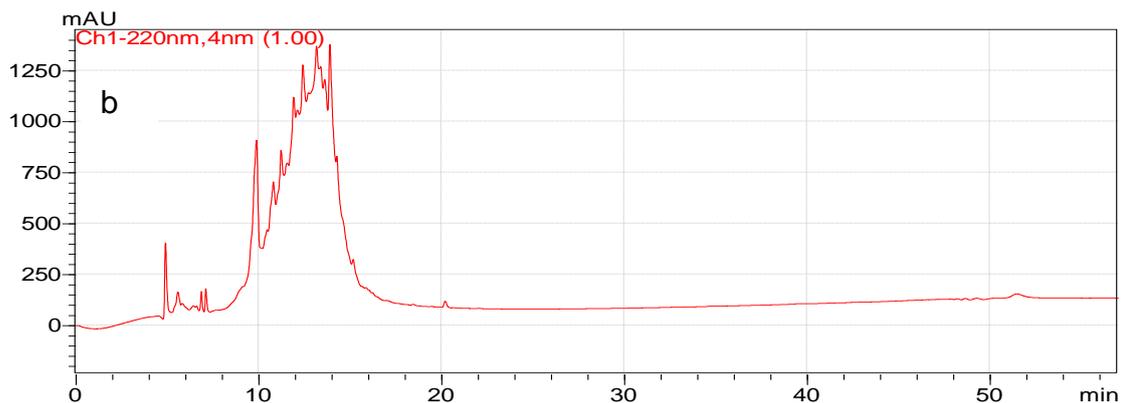
##### 4.8.1 Da folha e do caule

A fim de se obter frações enriquecidas de peptídeos (FR80), um fracionamento em cromatografia de coluna de C18 foi realizado. As massas obtidas de cada fração são apresentadas na Tabela 16. Os cromatogramas da FR20 e FR80 são mostrados na Figura 34 e Figura 35, respectivamente.

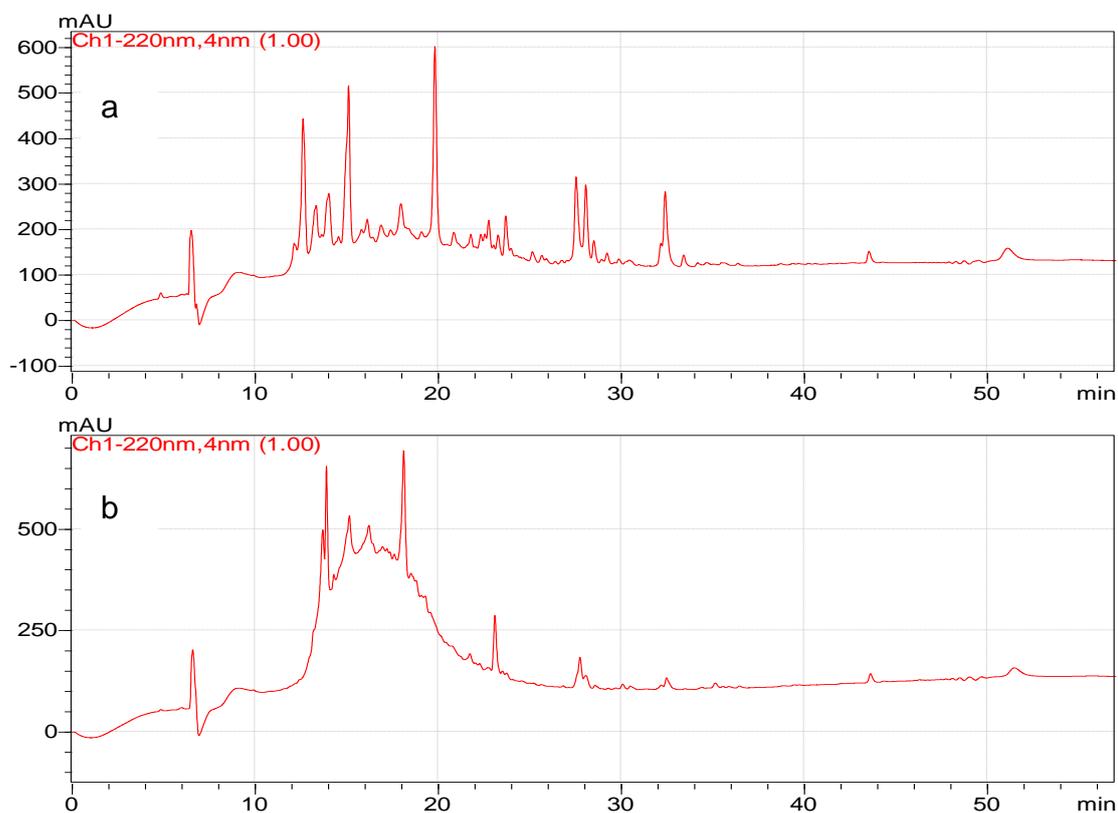
**Tabela 16:** Massas obtidas do fracionamento das frações metanólicas das folhas e caules de *C. sphaerogynus*.

Extrato etanólico (g)	FR20 (g)	FR80 (g)
Folha	0,87	1,83
Caule	2,48	0,98





**Figura 34:** Cromatogramas das frações FR20 de folhas (a) e caules (b) de *C. sphaerogynus*, utilizando método exploratório gradiente de 5-95% de B, em 45 min e 220 nm.



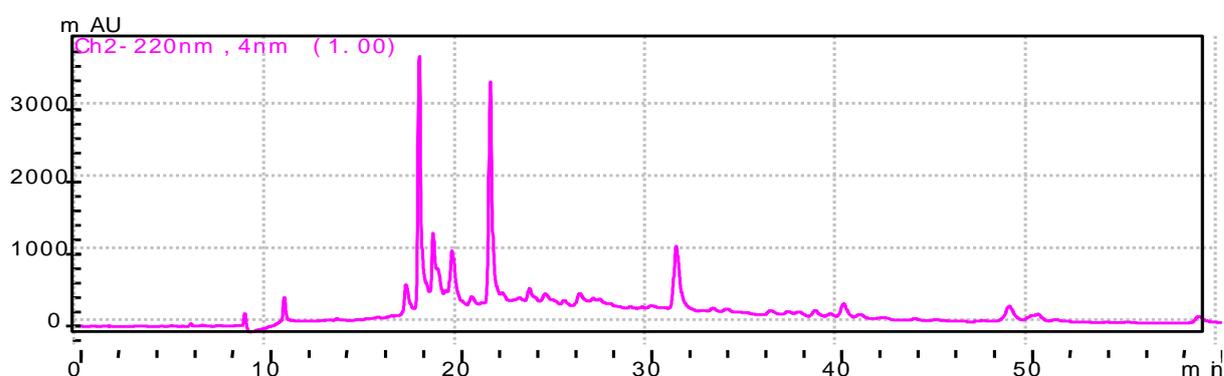
**Figura 35:** Cromatogramas das frações FR80 de folhas (a) e caules (b) de *C. sphaerogynus*, utilizando método exploratório gradiente de 5-95% de B, em 45 min e 220 nm.

Após avaliar o perfil cromatográfico da fração FR80 da folha e do caule selecionou-se a FR80 das folhas para iniciar os estudos de isolamento, pois apontava para uma maior concentração de orbitóides. No cromatograma da FR80 dos caules

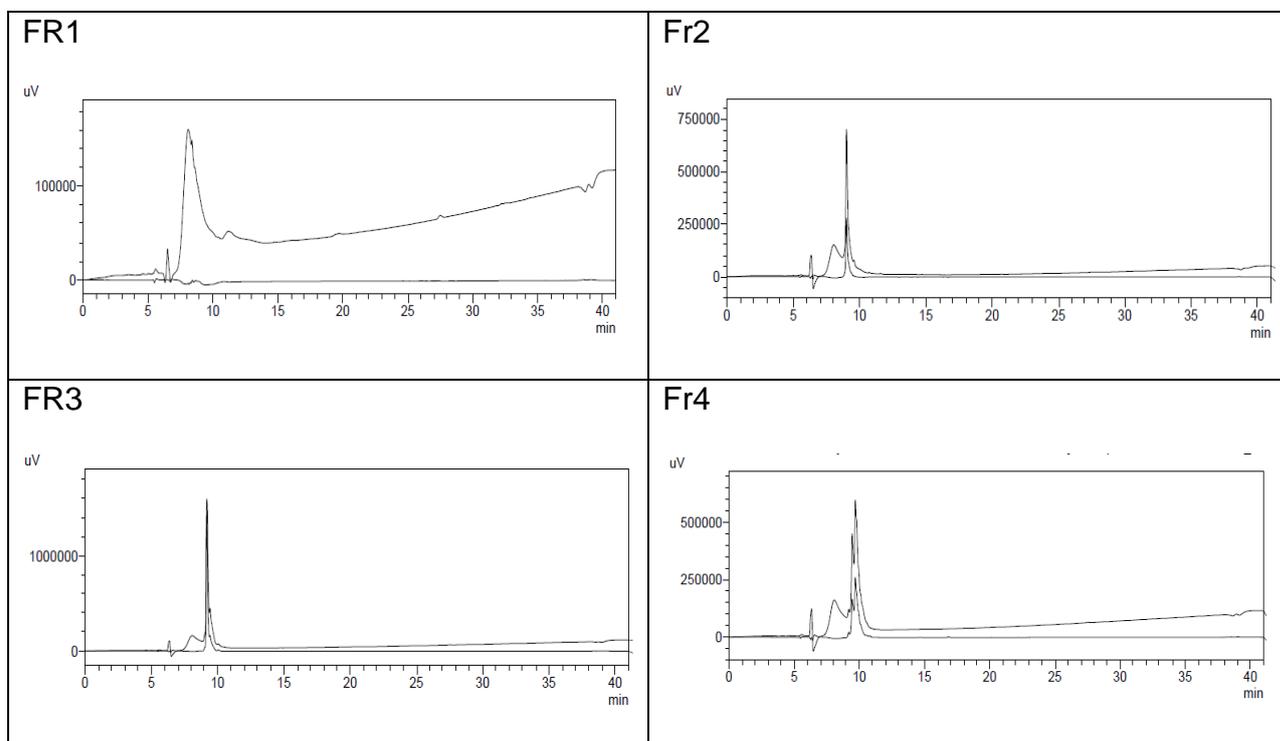
observou-se uma banda alargada na faixa de eluição de 12 à 22 min, indicativos de polifenóis poliméricos (taninos).

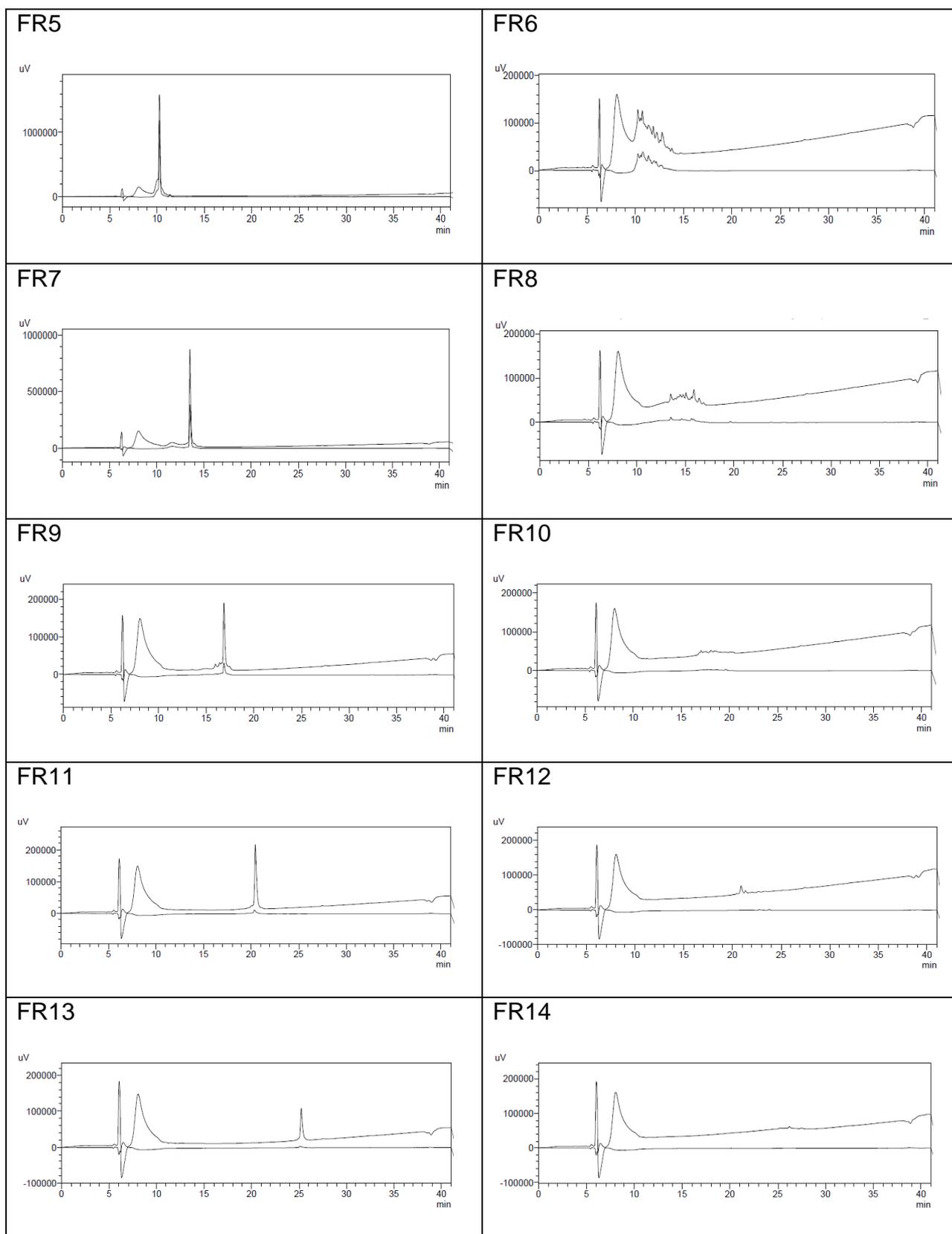
#### 4.8.2 Purificação da fração FR80 do extrato de folhas

O processo de purificação se deu via HPLC preparativo. Para tanto, o perfil cromatográfico foi ajustado para um gradiente de 30-90% de B em A em 60 min, o que permitiu melhorar a resolução cromatográfica (Figura 36). A coleta dos picos foi feita de forma manual o que permitiu obter 14 frações (Figura 37).



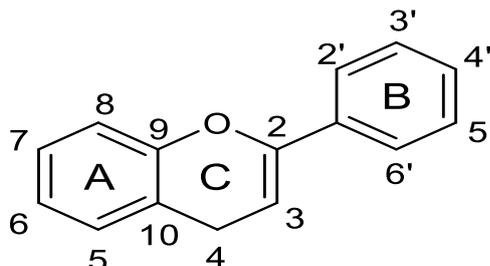
**Figura 36:** Cromatograma da fração FR80 das folhas de *C. sphaerogynus*, utilizando método gradiente de 30-90% de B, em 60 min e 220 nm.





**Figura 37:** Cromatograma das frações FR1 a FR14 de *C. sphaerogynus*, utilizando método exploratório gradiente de 5-95% de B, em 40 min. Superior 220 nm e inferior 280 nm.

As frações Fr2, FR3, FR5, FR7, FR9, FR11, FR13 se mostraram com relativa simplicidade cromatográfica, o que é indicativo de pureza, entretanto a análise por espectrometria de massas evidenciou que as frações estão em mistura. A priori, a fração FR3 foi selecionada para fracionamento em coluna semipreparativa, sendo isolados 2 flavonoides glicosilados. Para efeitos de biossíntese, a enumeração básica do núcleo aglicona de um flavonoide é representado na Figura 38.

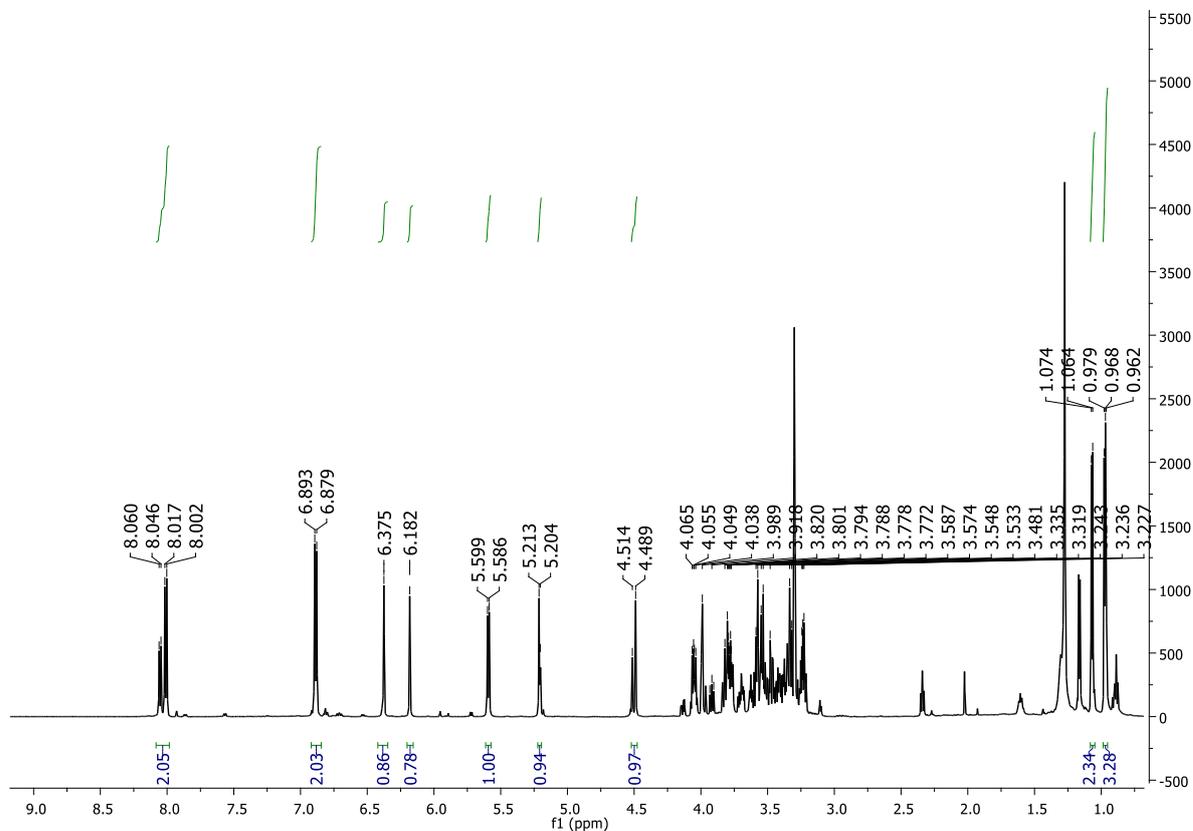


**Figura 38:** Numeração da estrutura básica dos flavonoides.

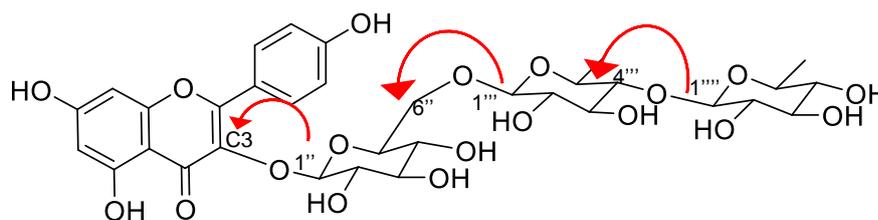
#### 4.8.3 Caracterização do composto B1

O composto B1 foi caracterizado como campferol triglicosilado (1 glucose e 2 raminose), obtido como um pó levemente amarelado (2,7 mg). Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 39) foi possível observar três dupletos em  $\delta\text{H}$  8,05 (H-2'),  $\delta\text{H}$  8,01 (H-6') e em  $\delta\text{H}$  6,88 (H-3' e H-5') com constantes de acoplamento de 8,6, evidenciando um anel aromático *para* substituído. Observou-se, também, os dupletos em  $\delta\text{H}$  6,18 (H-6) e  $\delta\text{H}$  6,37 (H-8) com integração para um hidrogênio cada. Além disso, o composto B1 apresenta 3 dupletos em  $\delta\text{H}$  5,59 ( $J = 7,6$  Hz),  $\delta\text{H}$  5,21 ( $J = 6,9$  Hz) e  $\delta\text{H}$  4,49 ( $J = 7,6$  Hz), referentes aos hidrogênios anoméricos com configuração  $\beta$ . Os sinais entre  $\delta$  4,02 – 3,23 e os dupletos em  $\delta$  0,97 e  $\delta$  1,07 estão relacionados aos demais hidrogênios das unidades glicosídicas. A identificação das unidades de hexoses e os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos foram atribuídos com o auxílio dos experimentos HSQC (APÊNDICE A), TOCSY (APÊNDICE B) e HMBC (APÊNDICE C). A ligação entre a aglicona e as unidades de glicosídeos, bem como as suas posições foram determinadas por meio das correlações H1'' ( $\delta\text{H}$  5,59) e C-3 ( $\delta\text{C}$  134,3), H1''' ( $\delta\text{H}$  4,51) e C-6'' ( $\delta\text{C}$  68,3), H1'''' ( $\delta\text{H}$  5,59) e C-4''' ( $\delta\text{C}$  73,8), referente a glucose e as duas raminoses, respectivamente (Figura 40). O espectro de

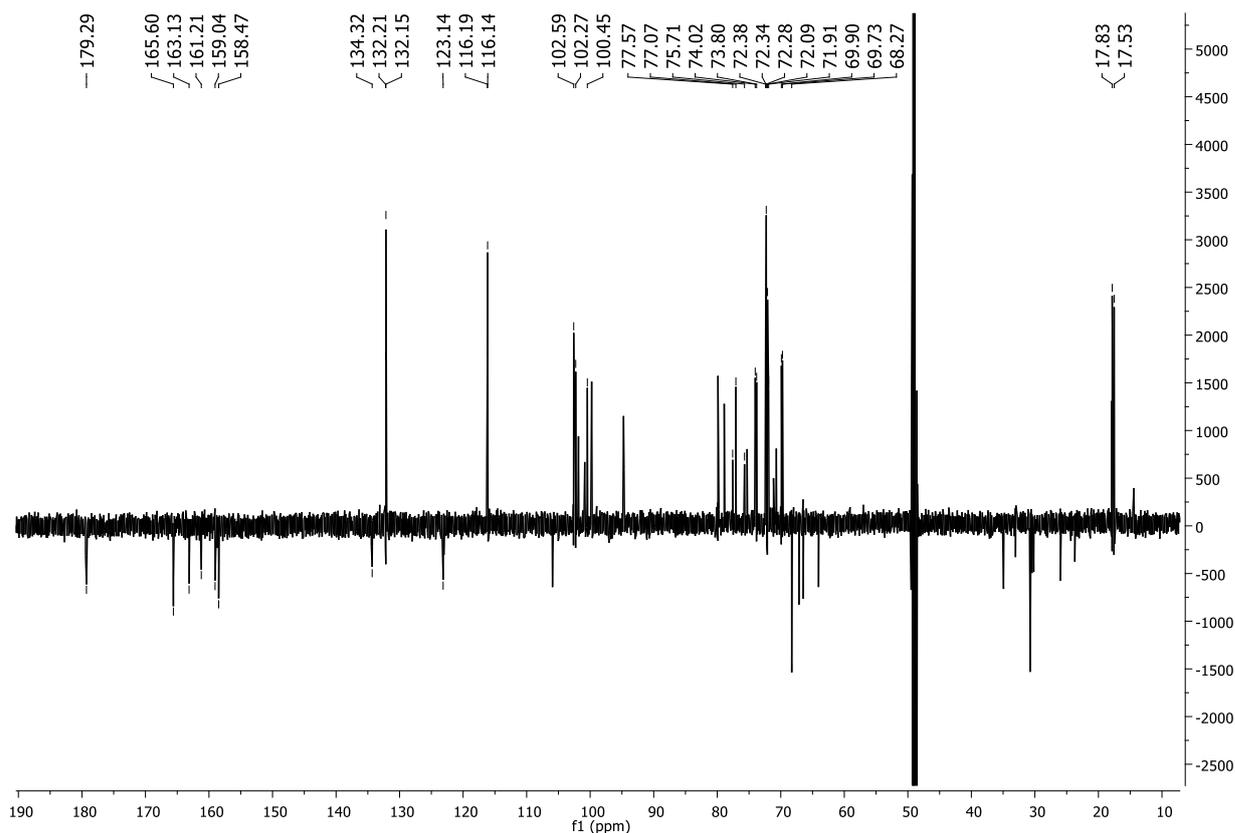
carbono é apresentado na Figura 41. A Tabela 17 mostra dados dos experimentos e compara com os dados com a literatura (HAN et al., 2004).



**Figura 39:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto B1.



**Figura 40:** Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a substância B1.



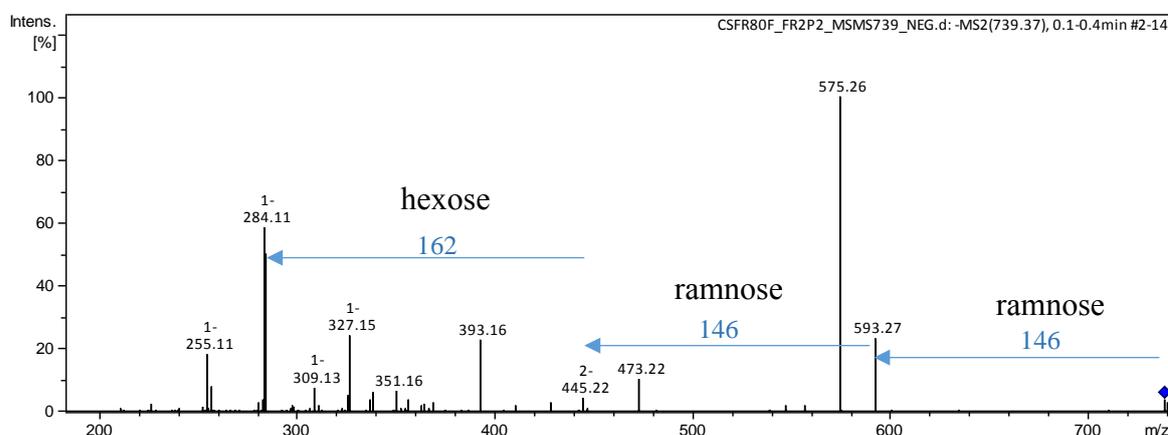
**Figura 41:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do composto B1.

**Tabela 17:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) em  $\text{CD}_3\text{OD}$  do composto B1 em comparação com dados da literatura.

Posição				Referência	
	$\delta\text{H}$ ; multiplicidade; J (Hz)	$\delta\text{C}$	HMBC	$\delta\text{H}$ ; multiplicidade; J (Hz)	$\delta\text{C}$
2		159,4			158,2
3		134,2			134,2
4		179,3			179,0
5		163,3			162,9
6	6,18; <i>sl</i>	99,8	C5, C8, C10	6,17; <i>d</i> ; 2,0	99,7
7		165,6			165,4
8	6,38; <i>sl</i>	94,7	C5, C6, C9, C10	6,37; <i>d</i> ; 2,0	94,7
9		158,45			158,8
10		105,9			105,8
1'		123,1			123,4
2'	8,01; <i>d</i> ; 8,6	132,2	C4', C6'	8,01; <i>d</i> ; 8,8	132,0
3'	6,88; <i>d</i> ; 8,6	116,2	C1', C4', C5'	6,89; <i>d</i> ; 8,8	116,0
4'		161,2			161,1
5'	6,88; <i>d</i> ; 8,6	116,1	C1', C3', C4'	6,89; <i>d</i> ; 8,8	116,0
6'	8,01; <i>d</i> ; 8,6	132,1	C2', C4'	8,01; <i>d</i> ; 8,8	132,0
glc-1''	5,59; <i>d</i> ; 7,6	100,5	C3	5,59; <i>d</i> ; 8,4	102,4
glc-2''	3,95; <i>m</i>	77,5	C3''	3,21~4,08; <i>m</i>	73,9
glc-3''	3,72; <i>m</i>	75,7	C2''	3,21~4,08; <i>m</i>	78,8
glc-4''	3,37; <i>m</i>	77,1		3,21~4,08; <i>m</i>	79,7

glc-5''	3,27; <i>m</i>	72,3		3,21~4,08; <i>m</i>	76,9
glc-6''	3,62; <i>m</i>	68,3	C1''	3,21~4,08; <i>m</i>	68,2
	3,57; <i>m</i>			3,21~4,08; <i>m</i>	
ram-1'''	5,21; <i>d</i> ; 6,9	102,6	C2''', C6''	4,51; <i>d</i> ; 1,2	100,3
ram-2'''	3,81; <i>m</i>	72,1	C4'''	3,21~4,08; <i>m</i>	72,2
ram-3'''	3,99; <i>m</i>	72,4	C2'''	3,21~4,08; <i>m</i>	72,3
ram-4'''	3,36; <i>m</i>	74,0	C3'''	3,21~4,08; <i>m</i>	73,7
ram-5'''	4,02; <i>m</i>	69,7	C4'''	3,21~4,08; <i>m</i>	69,7
ram-6'''	1,07; <i>d</i> ; 6,2	17,8	C4''', C5'''	0,98; <i>d</i> ; 1,2	17,9
ram-1''''	4,50; <i>d</i> ; 5,5	102,2	C2''', C5''''	5,11; <i>d</i> ; 1,2	102,2
ram-2''''	3,47; <i>m</i>	72,3	C3''''	3,21~4,08; <i>m</i>	72,0
ram-3''''	3,57; <i>m</i>	71,9	C2''''	3,21~4,08; <i>m</i>	72,2
ram-4''''	3,23; <i>m</i>	73,8	C3''''	3,21~4,08; <i>m</i>	73,7
ram-5''''	3,41; <i>m</i>	69,9	C4''''	3,21~4,08; <i>m</i>	69,8
ram-6''''	0,97; <i>d</i> ; 6,2	17,5	C4''', C5''''	1,07; <i>d</i> ; 6,0	17,6

O espectro de massas de baixa resolução (Figura 42), no modo negativo apresentou o sinal relativo ao íon  $[M-H]^-$  com valor de 739,37; consistente com o valor teórico de  $m/z$  739 correspondente ao íon desprotonado da substância campferol triglicosilado (2-ramnose e 1-hexose), também foram observados os sinais característicos 593, 284 e 255 (Figura 42) (MARCH et al., 2004).

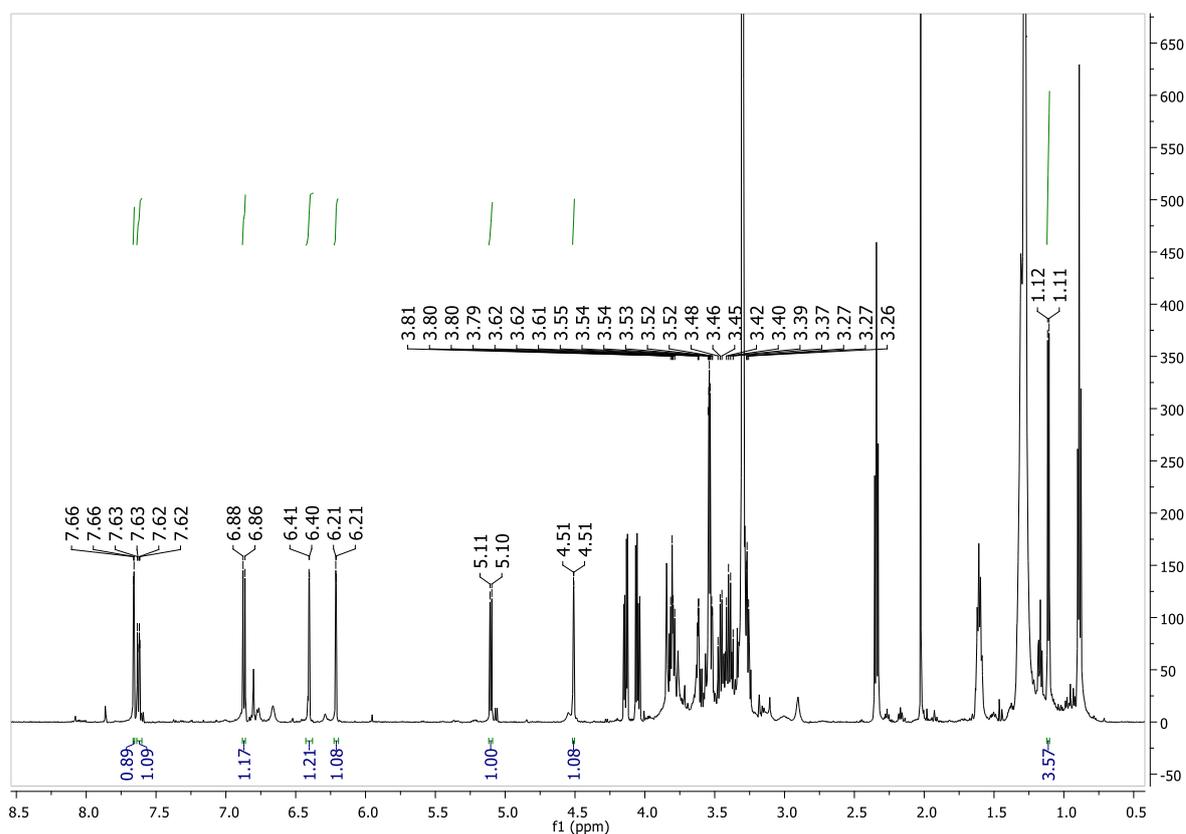


**Figura 42:** Espectro MS<sup>2</sup> de  $m/z$  739,  $[M-H]^-$ , da substância B1.

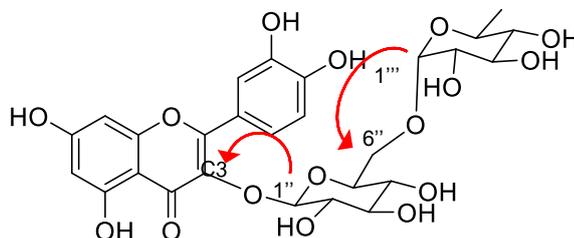
#### 4.3.4 Caracterização da substância B2

O composto B2 foi identificado como rutina (flavonoide quercetina-3-O-rutinosídeo), que foi obtida como um pó levemente amarelado (0,8 mg). Pela análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 43) foi possível observar um duplete em  $\delta$ H 7,66 (H-2'), e um duplo duplete em  $\delta$ H 7,62 (H-6') com constantes de acoplamento de 2,1

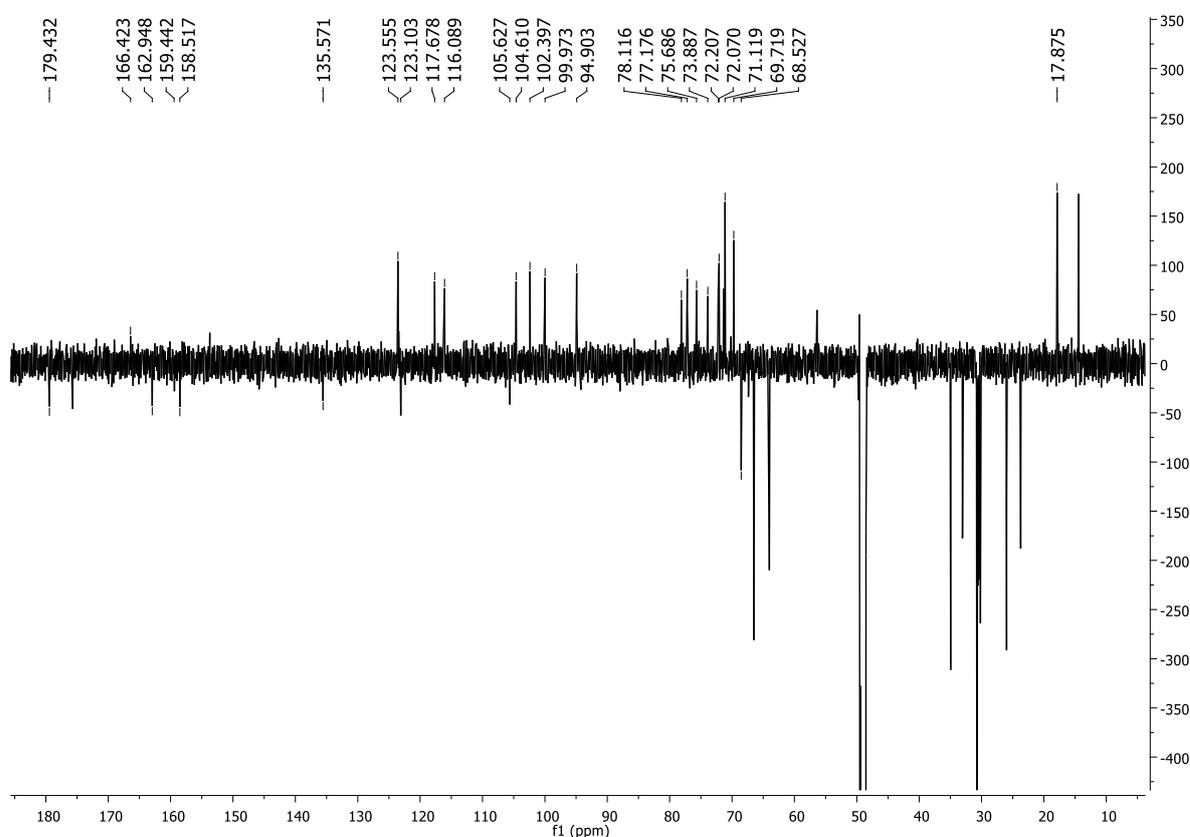
e 8,5/2,1, respectivamente, com integração para um hidrogênio cada. O duplete em  $\delta$ H 6,87 foi atribuído ao H-5', com constante de acoplamento de 8,5 e integração de 1 hidrogênio. Os dupletos  $\delta$ H 6,40 ( $J = 2,1$ ) e  $\delta$ H 6,21 ( $J = 2,1$ ), ambos com integração de 1 hidrogênio, foram atribuídos aos hidrogênios em *meta* H-8 e H-6 do anel A, respectivamente. Além dos sinais de hidrogênios aromáticos, o composto B2 apresenta um duplete em  $\delta$ H 5,10 ( $J = 7,7$ ) e um singlete largo  $\delta$ H 4,51 referentes a hidrogênios anoméricos com configuração  $\beta$  e  $\alpha$ , respectivamente. Os sinais entre  $\delta$  3,26 – 3,78 e o duplete em  $\delta$  1,14 estão relacionados aos demais hidrogênios das unidades glicosídicas. A identificação das unidades de hexoses e os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos foram atribuídos com o auxílio dos experimentos HSQC (APÊNDICE D), TOCSY (APÊNDICE E) e HMBC (APÊNDICE F), que confirmaram a existência de uma unidade de glicose e outra de ramnose, sendo que a glicose está ligada na posição 3 da aglicona, observada pela correlação entre H-1'' ( $\delta$  5,10) com C-3 ( $\delta$  104,66) no mapa de contornos HMBC, e a unidade de ramnose encontra-se ligada a posição 6'' da glicose por meio da correlação H-1''' ( $\delta$  4,51) com C-6'' ( $\delta$  68,6) (Figura 44). O espectro de carbono é apresentado na Figura 45. A Tabela 18 compara os dados com a literatura (CHANG et al., 2017).



**Figura 43:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância B2.



**Figura 44:** Principais correlações observadas no mapa e contornos HMBC para a substância B2.



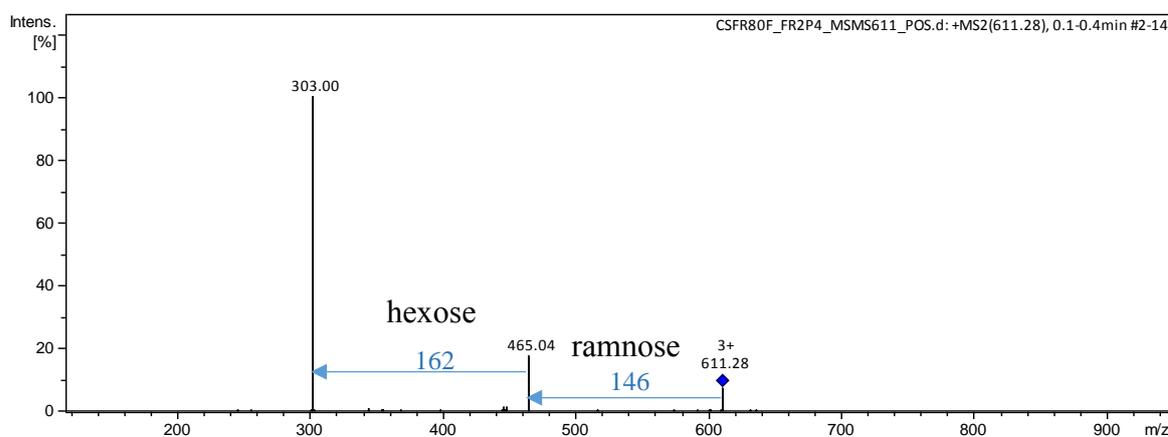
**Figura 45:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância B2.

**Tabela 18:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) em  $\text{CD}_3\text{OD}$  do composto B2 em comparação com dados da literatura.

Posição	$\delta\text{H}$ ; multiplicidade; J (Hz)	$\delta\text{C}$	HMBC	Referência $\delta\text{H}$ ; multiplicidade; J (Hz)	$\delta\text{C}$
2		158,5			158,5
3		135,6			135,6
4		179,4			179,3
5		162,9			162,9

6	6,21; <i>d</i> ; 2,1	100,0	C8, C9, C10	6,20; <i>s</i>	100,0
7		166,4			166,2
8	6,40; <i>d</i> ; 2,1	94,9	C2, C6, C10	6,38; <i>s</i>	94,9
9		159,4			159,3
10		105,6			105,5
1'		123,6			123,1
2'	7,66; <i>d</i> ; 2,1	116,1	C2, C6'	7,64; <i>s</i>	116,0
3'		144,4			145,8
4'		148,5			149,8
5'	6,87; <i>d</i> ; 8,5	117,7	C3', C4', C6'	6,87; <i>d</i> ; 8,5	117,6
6'	7,62; <i>dd</i> ; 8,5/2,1	123,6	C2', C4'	7,62; <i>d</i> ; 8,5	123,5
glc-1''	5,11; <i>d</i> ; 7,7	104,66	C3	5,10; <i>d</i> ; 7,5	104,7
glc-2''	3,45; <i>m</i>	75,7	C1'', C3''	3,47; <i>m</i>	75,7
glc-3''	3,39; <i>m</i>	78,1		3,45; <i>m</i>	78,2
glc-4''	3,26; <i>m</i>	71,8	C5''	3,26; <i>m</i>	71,4
glc-5''	3,31; <i>m</i>	77,8	C6''	3,30; <i>m</i>	77,2
glc-6''	3,78; <i>m</i>	68,6		3,81; <i>m</i>	68,2
ram-1'''	4,52; <i>sl</i>	102,4	C6'''	4,52; <i>sl</i>	102,4
ram-2'''	3,55; <i>m</i>	72,1	C3'''	3,64; <i>m</i>	72,1
ram-3'''	3,46; <i>m</i>	72,2	C2'''	3,54; <i>m</i>	72,2
ram-4'''	3,29; <i>m</i>	73,9	C5'''	3,28; <i>m</i>	73,9
ram-5'''	3,42; <i>m</i>	69,7	C4'''	3,45; <i>m</i>	69,7
ram-6'''	1,14; <i>d</i> ; 6,2	17,9	C4''', C5'''	1,12; <i>d</i> ; 6,0	17,9

O espectro de massas de baixa resolução (Figura 46), no modo positivo apresentou o sinal relativo ao íon  $[M-H]^+$  com valor de 611,28, consistente com o valor teórico de  $m/z$  611,15 correspondente ao íon protonado da substância B2, também foram observados os sinais característicos 465 e 303 (Wang et al., 2018).



**Figura 46:** Espectro  $MS^2$  de  $m/z$  611,  $[M-H]^+$ , da substância B2.

## 5. CONCLUSÃO

Assim, este trabalho proporcionou o estudo de duas espécies vegetais *J. ribifolia* e *C. sphaerogynus*. A partir do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *J. ribifolia* foi possível re-isolar o octapeptídeo do tipo orbitídeo, chamado de ribifolina. Foi realizada a síntese da ribifolina, idêntico ao natural, bem como sete análogos, planejados com o intuito de serem avaliados para a atividade anticâncer. A mudança pontual dos aminoácidos, variando hidrofobicidade e carga, resultou nas sequências cíclicas e lineares: SIILGILG, AIILGILG, TIILGILG e KIILGILG. A atividade antitumoral demonstrou que apenas a sequência KIILGILG cíclica gerou uma boa inibição de crescimento para as linhagens celulares a linhagem celular HCT-116 e MCF-7. Este resultado mostra a importância da presença de carga positiva nos orbitídeos para a sua atividade anticâncer.

A espécie *C. sphaerogynus* apresentou uma série de possíveis peptídeos cíclicos nos seus órgãos (folhas e caules), os quais foram assinalados através da técnica de LC-MS. Os espectros de MS<sup>2</sup> permitiram observar perdas neutras de 113 Da, identificando-se os peptídeos tetraleucil (ou isoleucil), pentaleucil (ou isoleucil), hexaleucil (ou isoleucil) e heptaleucil (ou isoleucil), descritos pela primeira vez em espécies de *Croton*. Adicionalmente, foram isolados dois flavonoides glicosilados os quais tiveram suas estruturas propostas através de massas, RMN e dados da literatura identificados como campferol triglicosilado e rutina. Os estudos apresentados mostraram que a espécie *C. sphaerogynus* apresenta uma baixa diversidade de peptídeos. Somado a isso, os nossos resultados mostraram, que ao contrário da literatura, a presença de uma carga positiva em orbitídeos é importante para sua atividade anticâncer, como observado para a ribifolina.

### Referências

ABDULLA, R.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Biodiesel production from *Jatropha curcas*: a critical review. **Critical Reviews in Biotechnology**. 31(1), 53–64, 2011.

ADEAPO, A. A.; SHABO, O. O.; ADEDOKUN, O. A. Anthelmintic efficacy of the aqueous crude extract of *Euphorbia hirta* Linn. in Nigerian dogs. **Veterinarski arhiv**. 75, 39-47, 2005.

AHMED, B.; ALAM, T.; NAJAM, L. KHAN, S. A. Oblongiside: A new steroidal glycoside from aerial parts of *Croton oblongifolius* Roxb. **Asian journal of chemistry**. 28 (3), 517-519, 2016.

ALTEI, W. F.; PICCHI, D. G.; ABISSI, B. M.; GIESEL, G. M.; FLAUSINO JR, O.; REBOUD-RAVAUX, M.; VERLI, H.; CRUSCA JR, E.; SILVEIRA, E. R.; CILLI, E. M.; BOLZANI, V. S. Jatrophidin I, a cyclic peptide from Brazilian *Jatropha curcas* L.: isolation, characterization, conformational studies and biological activity. **Phytochemistry**. 107, 91-96, 2014.

ALVES, C.; RIBEIRO, D.; NUNES, C.; REIS, S. Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studie. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1858, 2231–2244, 2016.

ARNISON, P. G., BIBB, M. J., BIERBAUM, G., BOWERS, A. A., BUGNI, T. S., BULAJ, G., CAMARERO, J. A., CAMPOPIANO, D. J., CHALLIS, G. L., CLARDY, J., COTTER, P. D., CRAIK, D. J. et al., Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. **Natural Product Reports**, 30, 108-160, 2013.

AUVIN-GUETTE, C.; BARAGUEY, C.; BLOND, A.; XAVIER, H. S.; POUSSET, J. L.; BODO, B. Pohfianins A, B and C, Cyclic Peptides from the Latex of *Jatropha pohliana* ssp. *molissima*. **Tetrahedron**. 55, 11495-11510, 1999.

AUVIN-GUETTE, C.; BARAGUEY, C.; BLOND, A.; POUSSET, J. L.; BODO, B. Cyclogossine B, a Cyclic Octapeptide from *Jatropha gossypifolia*. **Journal of Natural Products**. 60, 1155-1157, 1997.

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

BARAGUEY, C.; BLOND, A.; CAVELIER, F.; POUSSET, J. L.; BODO, B.; AUVIN-GUETTE, C. Isolation, structure and synthesis of mahafacyclin B, a cyclic heptapeptide from the latex of *Jatropha mahafalensis*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**. 1, 2098-2103, 1998.

BARAGUEY, C.; BLOND, A.; CORREIA, I.; POUSSET, J. L.; BODO, B.; AUVIN-GUETTE, C. Mahafacyclin A, a cyclic heptapeptide from *Jatropha mahafalensis* exhibiting  $\beta$ -bulge conformation. **Tetrahedron Letters**. 41, 325–329, 2001.

BARRETO, M. B.; GOMES, C. L.; DE FREITAS, J. V. B.; PINTO, F. C. L.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; TORRES, A. S. C. Flavonoids and terpenoids from *Croton muscicapa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**. 36 (5), 675-679, 2013.

BATISTA, P. H. J.; ANDRADE, J. R. M.; MATOS, T. S.; SOUSA; T. S.; PINTO; F. C. L.; SILVEIRA; E. R.; LOIOLA; M. I. B.; OTILIA D. LOIOLA PESSOA, O. D. L. Terpenoids and coumarins from *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. **Química Nova**. 37 (6), 1010-1014, 2014.

- BERRY, P. E.; HIPPI, A. L.; WURDACK, K. J.; VAN, B. E. E. ; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe crotonae (euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and *TRNL-TRNF* DNA sequence data. **American Journal of Botany**. 92(9), 1520–1534, 2005.
- BURGOS, A.; BARUA, J.; FLORES-GIUBI, M. E.; BAZAN, D.; FERRO, E.; ALVARENGA, N.L. Antibacterial activity of the alkaloid extract and isolated compounds from *Croton bonplandianum* Baill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 17 (4), 922-927, 2015.
- CÂNDIDO-BACANI, P. M.; FIGUEIREDO, P. O.; MATOS, M. F. C.; FERNANDA R. GARCEZ, F. R.; WALMIR S. GARCEZ, W. S. Cytotoxic Orbitide from the Latex of *Croton urucurana*. **Journal of Natural Products**. 78, 2754-2760, 2015.
- CARUZO, M. B. R.; VAN EE, B. W.; CORDEIRO, I.; BERRY, P. E.; RIINA, R. Molecular phylogenetics and character evolution of the “sacaca” clade: Novel relationships of *Croton* section *Cleodora* (Euphorbiaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 60, 193–206, 2011.
- CHANG, Y.; ZHANG, P.; ZHANG, X.; CHEN, J.; RAUSCH, W. D.; GULA, A.; BAO, B. Cytotoxic activities of flavonoids from a traditional Mongolian medicinal herb *Clematis aethusifolia* Turcz. **Natural Product Research**. 31(10), 1223-1227, 2017.
- CONDIE, J. A.; NOWAK, G.; REED, D.W.; BALSEVICH, J.J.; REANEY, M. J. T.; ARNISON, P.G.; COVELLO, P.S. The biosynthesis of Caryophyllaceae-like cyclic peptides in *Saponaria vaccaria* L. from DNA-encoded precursors. **Plant Journal**. 67,682-690, 2011.
- CRAIK, D. J. Host-defense activities of cyclotides. **Toxins**.4, 139-156, 2012.
- CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1830, 3670-3695, 2013.
- DAS, B.; SALVANNA, N.; REDDY, P. R; PARAMESH, J.; DAS, R. Our phytochemical research on *Jatropha* species. **Arkivoc**. 114-133, 2018.
- DATTA, S.; SOOD, A.; TOROK, M. steps toward green peptide synthesis. **Current Organic Synthesis**. 8, 262-280, 2011.
- DERMACCESSITYGOLD. Disponível em: <https://www.dermacessitygold.com/wp-content/uploads/2016/05/A-New-Peptide-Generation.pdf>  
acessado em 22/03/2019
- FERRIE, J. J.; GRUSKOS, J. J.; GOLDWASER, A. L.; DECKER, M. E.; DANIELLE A. GUARRACINO, D. A. A comparative protease stability study of synthetic macrocyclic peptides that mimic two endocrine hormones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 23, 989–995, 2013.
- Global Burden of Disease Cancer Collaboration. The global burden of cancer 2013. **JAMA Oncology**. 1, 505–527, 2015.

HAN, J.; BANG, M.; CHUN, O.; KIM, D.; LEE, C.; BAEK, N. Flavonol glycosides from the aerial parts of *Aceriphyllum rossii* and their antioxidant activities. **Archives of Pharmacal Research**. 27 (4), 390-395, 2004.

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

HORSTEN, S. F. A. J.; van den Berg, A. J. J.; Kettenes-van den Bosch, J. J.; Leeftang, B. B.; Labadie, B. P. Cyclogossine A: A Novel Cyclic Heptapeptide Isolated from the Latex of *Jatropha gossypifolia* **Planta Medica**. 62, 46-50, 1996.

INSANU, M., ANGGADIREDDA, J., OLIVER, K. Curcacycline A and B – new pharmacological insights to an old drug. **International Journal of Applied Research in Natural Products**. 5, 26–34, 2012.

ISLAM A.K.M.A., YAAKOB Z., GHANI J.A., ANUAR N. *Jatropha curcas* L.: A Future Energy Crop with Enormous Potential. **Biomass and Bioenergy**. 2, 31-61, 2014.

KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**. 34, 595, 1970.

KAMUSOKO, R.; JINGURA, R. M. Utility of *Jatropha* for Phytoremediation of Heavy Metals and Emerging Contaminants of Water Resources: A Review. **Clean Soil Air Water**. 45 (11), 1-9, 2017.

KAPOOR, L. D. Handbook of Ayurvedic medicinal plants, In L. D. Kapoor, (ed.). Medicinal plants. CRC Press. 1989.

KHALIL, H. P. S. A.; APRILIA, N. A. S.; BHAT, A. H.; JAWAID, M.; PARIDAH, M.T.; RUDI, D. A *Jatropha* biomass as renewable materials for biocomposites and its applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 22, 667–685, 2013.

JI, D.; HUANGA, Z.; FEIA, C.; XUEC, W.; LUA, T. Comprehensive profiling and characterization of chemical constituents of rhizome of *Anemarrhena asphodeloides* Bge. **Journal of Chromatography B**. 1060, 355-366, 2017.

JUCA, T. L.; RAMOS, M. V.; FREITAS, C. D. T.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. D. O. Peptides from the Genus *Jatropha*: Beyond Isolation. **Tetrahedron Letters**. 41, 325–329, 2017.

MARQUES, J. P.; LOPES, G. C. Alkaloids as antitumor agents: chemical and biological considerations. **Revista Uningá Review**. 24(1), 56-61, 2015.

MERRIFIELD, B. Concept and early development of solid phase peptide synthesis. **Methods in Enzymology**. 289, 3-13, 1997.

MONGKOLVISUT, W.; SUTTHIVAIYAKIT, S.; LEUTBECHER, H.; MIKA, S.; KLAIBER, I.; MOLLER, W.; ROSNER, H.; BEIFUSS, U.; CONRAD, J. Integerrimides A and B, cyclic heptapeptides from the latex of *Jatropha integerrima*. **Journal of Natural Products**. 7069, 1435-1441, 2006.

MORITA, H., TAKEYA, K. Bioactive cyclic peptides from higher plants. **Heterocycles**. 80 (2), 739-764, 2010.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**. 65, 55-63, 1983.

MOTTA, L. B.; FURLAN, C. M.; SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G.; CARVALHO, J. E.; MONTEIRO, P. A.; RUIZ, A. L. T. G.; CARUZO, M. B.; SALATINO, A. Antiproliferative activity and constituents of leaf extracts of *Croton sphaerogynus* Baill. (Euphorbiaceae). **Industrial Crops and Products**. 50, 661– 665, 2013.

MWINE, J. T.; DAMME, P. V. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of Medicinal Plants Research**. 5 (5), 652-662, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**. 7079, 629–661, 2016.

PEREIRA, S.; TALEB-CONTINI, S.; COPPEDE, J.; PEREIRA, P.; BERTONI, B.; FRANÇA, S.; PEREIRA, A. M. An ent-Kaurane-Type Diterpene in *Croton antisyphiliticus* Mart. **Molecules**. 17, 8851-8858, 2012.

PICCHI, D. G.; ALTEI, W. F.; SAITO, S. M.; BOLZANI, V. F.; CILLI, E. M. Peptídeos cíclicos de biomassa vegetal: características, diversidade, biossíntese e atividades biológicas. **Química Nova**. 32, 1262-1277, 2009.

PINTO, M. E.; BATISTA, J. M. J.; KOEHBACH, J.; GAUR, P.; SHARMA, A.; NAKABASHI, M.; CILLI, E. M.; GIESEL, G. M.; VERLI, H.; GRUBER, C. W.; BLANCH, E. W.; TAVARES, J. F.; DA SILVA, M. S.; GARCIA, C. R.; BOLZANI, V. S. Ribifolin, an orbitide from *Jatropha ribifolia*, and its potential antimalarial activity. **Journal of Natural Products**. 7078, 374–380, 2015.

OKINYO-OWITI, D. P.; DONGB, Q.; LING, B.; JADHAVA, P. D.; BAUERA, R.; MALEYC, J. M.; REANEYA, M. J. T.; YANGB, J.; SAMMYNAIKENC, R. Evaluating the cytotoxicity of flaxseed orbitides for potential cancer treatment. **Toxicology Reports**. 2, 1014-1018, 2015.

QUINTYNE-WALCOTT, S.; MAXWELL, A. R.; REYNOLDS, W. F. Crotogossamide, a Cyclic Nonapeptide from the Latex of *Croton gossypifolius*. **Journal of Natural Products**. 70, 1374-1376, 2007.

- RAMALHO, S. D.; PINTO, M. E. F.; FERREIRA, D.; BOLZANI, V. S. Biologically Active Orbitides from the Euphorbiaceae Family. **Planta Medica**. 84(9-10), 558-567, 2018.
- RIGHI, A.A.; MOTTA, L. B.; KLAFKE, G. M.; POHL, P. C.; FURLAN, C. M.; SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F.; GIUSEPPINA NEGRI, G.; LABRUNA, M. B.; SALATINO, A. Chemical composition and efficacy of dichloromethane extract of *Croton sphaerogynus* Baill. (Euphorbiaceae) against the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**. 192, 292– 295, 2013.
- SANCHES, T.; SALCEDO, E.; CEBALLOS, H.; DUFOUR, D.; MAFLA, G.; MORANTE, N.; CALLE, F.; PEREZ, J. C.; DEBOUCK, D.; JARAMILLO, G.; MORENO, I. X. Screening of Starch Quality Traits in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Starch-Starke**. 61, 12-19, 2009.
- SANTOS, K. P.; MOTTA, L. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A.; FERREIRA, M. J. P.; LAGO, J. H. G.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; CLÁUDIA M. FURLAN, C. M. Antiproliferative Activity of Flavonoids from *Croton sphaerogynus* Baill. (Euphorbiaceae). **BioMed Research International**. 2015, 1-7, 2015.
- SHLAMOVITZ, G. Z.; GUPTA, M.; DIAZ, J. A. A case of acute keratoconjunctivitis from exposure to latex of *Euphorbia tirucalli* (pencil cactus). **Journal of Emergency Medicine**. 36, 239-241, 2009.
- SILVA, C.E. L.; MINGUZZI, S.; SILVA, R. C. L.; MATOS, M. F. C.; TOFOLI, D.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; COSTA, W. F.; SIMIONATTO, E. Chemical Composition and Cytotoxic Activity of the Root Essential Oil from *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 26 (2), 233-238, 2015.
- SPANO, D.; HECK, C.; ANTONELLIS, P.; CHRISTOFORI, G.; MASSIMO ZOLLO, M. Molecular networks that regulate cancer metastasis. **Seminars in Cancer Biology**. 22, 234– 249, 2012.
- TAN, N. H.; ZHOU, J. Plant Cyclopeptides **Chemical Reviews**. 106, 840-895, 2006.
- THELL, K.; HELLINGER, R.; SCHABBAUER, G.; GRUBER, C. W. Immunosuppressive peptides and their therapeutic applications. **Drug Discovery Today**. 19, 645-653, 2013.
- VAN DAMME, P. L. J. *Euphorbia tirucalli* for high biomass production, in: A. Schlissel and D. Pasternak (Eds.), *Combating desertification with plants*. **Kluwer Academic Pub.**: Norwell, MA, 169-187, 2001.
- VAN DEN BERG, A. J. J.; HORSTEN, S. F. A. J.; KETTENES-VAN DEN BOSCH, J. J.; KROES, B. H.; BEUKELMAN, C. J.; LEEFLANG, B. R.; LABADIE, R. P. Curcacycline A- a novel cyclic octapeptide isolated from the latex of *Jatropha curcas* L. **FEBS Letters**. 358, 215-218, 1995.

WANG, S.; CHEN, P.; JIANG, W.; WU, L.; CHEN, L.; FAN, X.; YI WANG, Y.; YIYU CHENG, Y. Identification of the effective constituents for anti-inflammatory activity of Ju-Zhi-Jiang-Tang, an ancient traditional Chinese medicine formula. **Journal of Chromatography A**. 1348, 105–124, 2014.

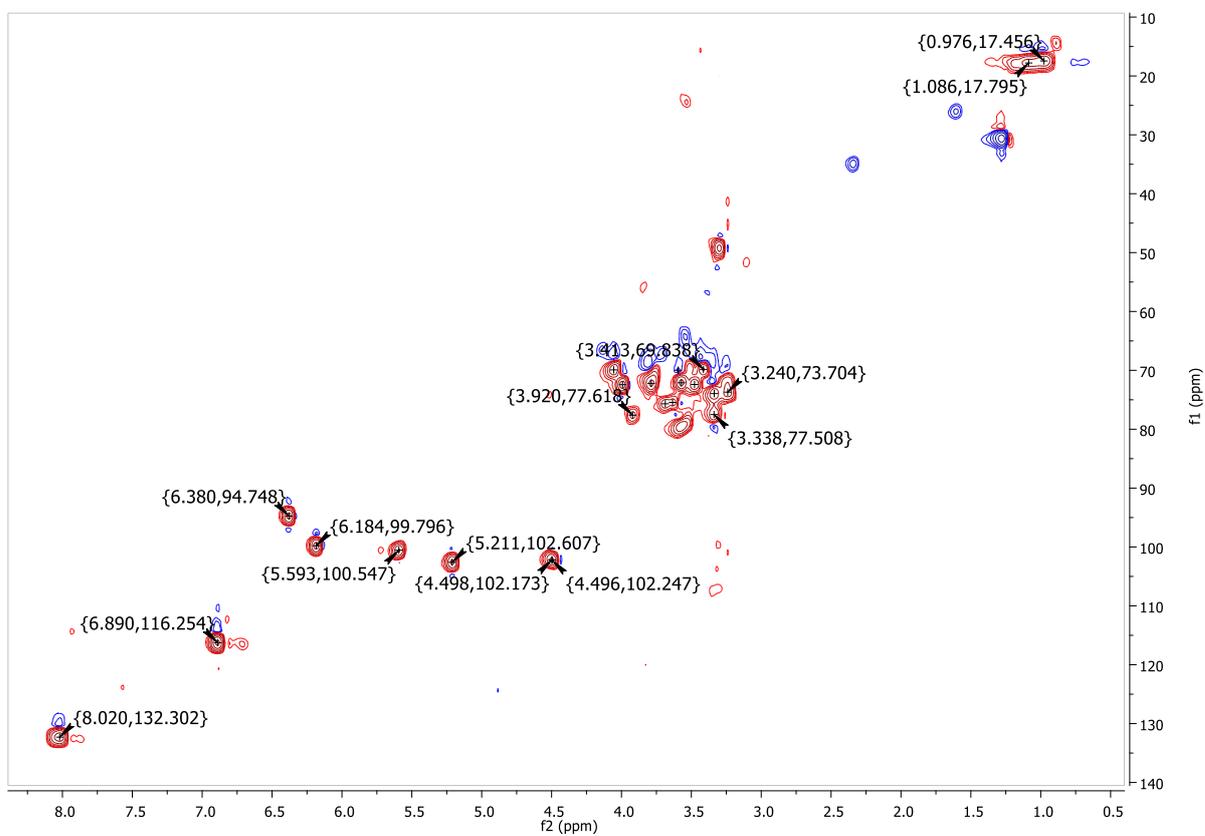
WANG, Y.; XING, S.; LIN, M.; GU, Y.; XIANG-LAN PIAO, X. Determination of flavonoids from *Gynostemma pentaphyllum* using ultra-performance liquid chromatography with triple quadrupole tandem mass spectrometry and an evaluation of their antioxidant activity *in vitro*. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. 41 (8), 437-444, 2018.

WU, S.; HANNUNB, Y. The importance of extrinsic factors in the development of cancers. **Molecular & Cellular Oncology**. 3 (3), 1-2, 2016.

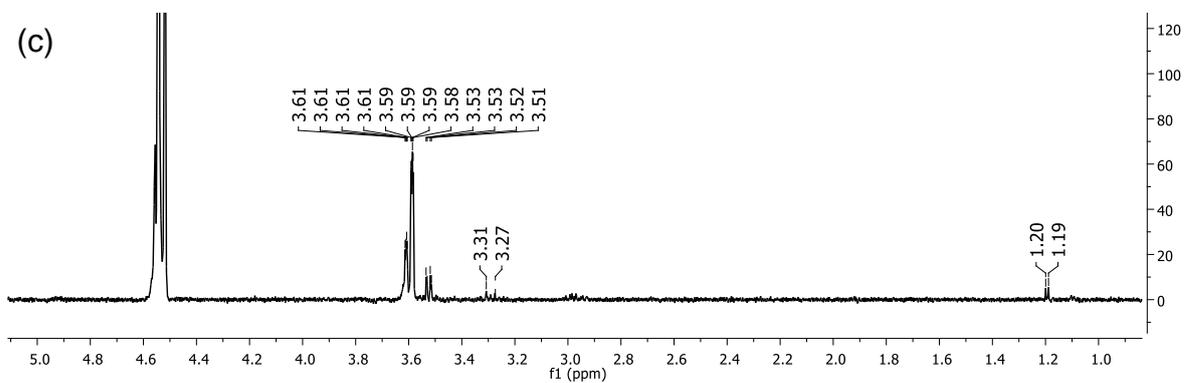
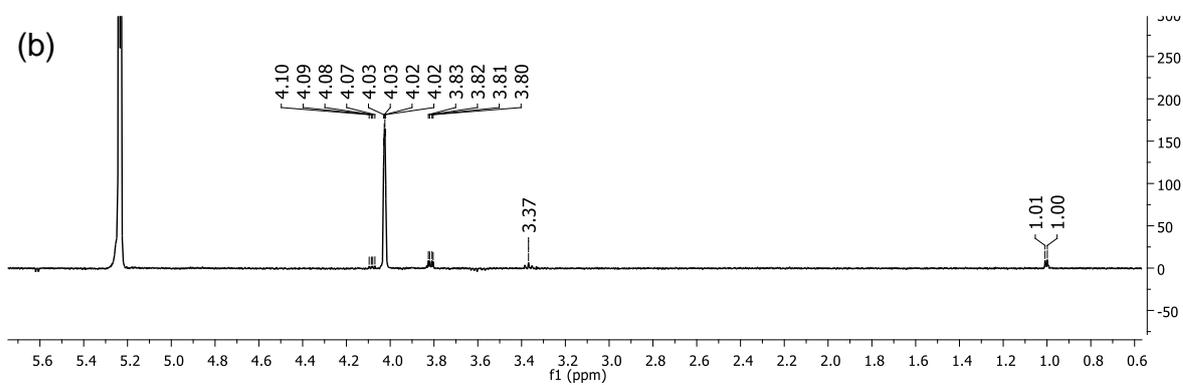
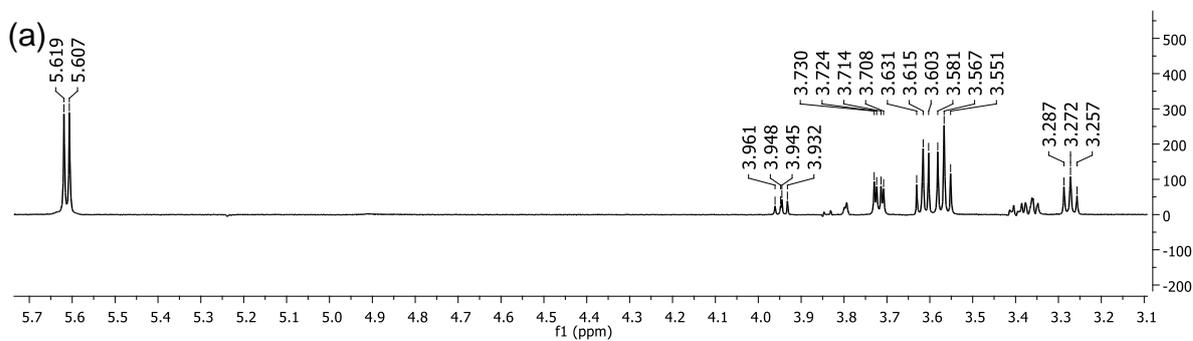
ZHOU, J.; TAN, N. H. Application of a new TLC chemical method for detection of cyclopeptides in plants. **Chinese Science Bulletin**. 45 (20), 1825-1831, 2000. **Pub.** 169-187, 2000.

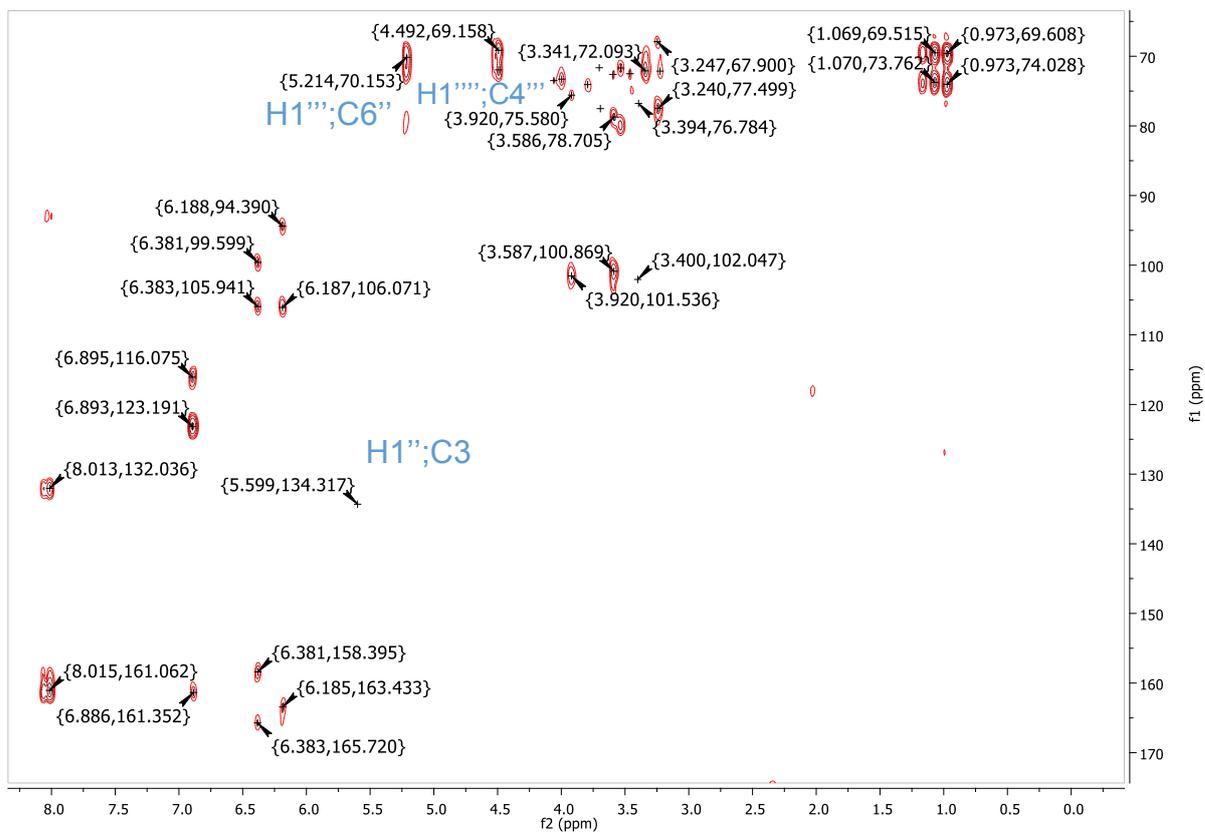
## Apêndices

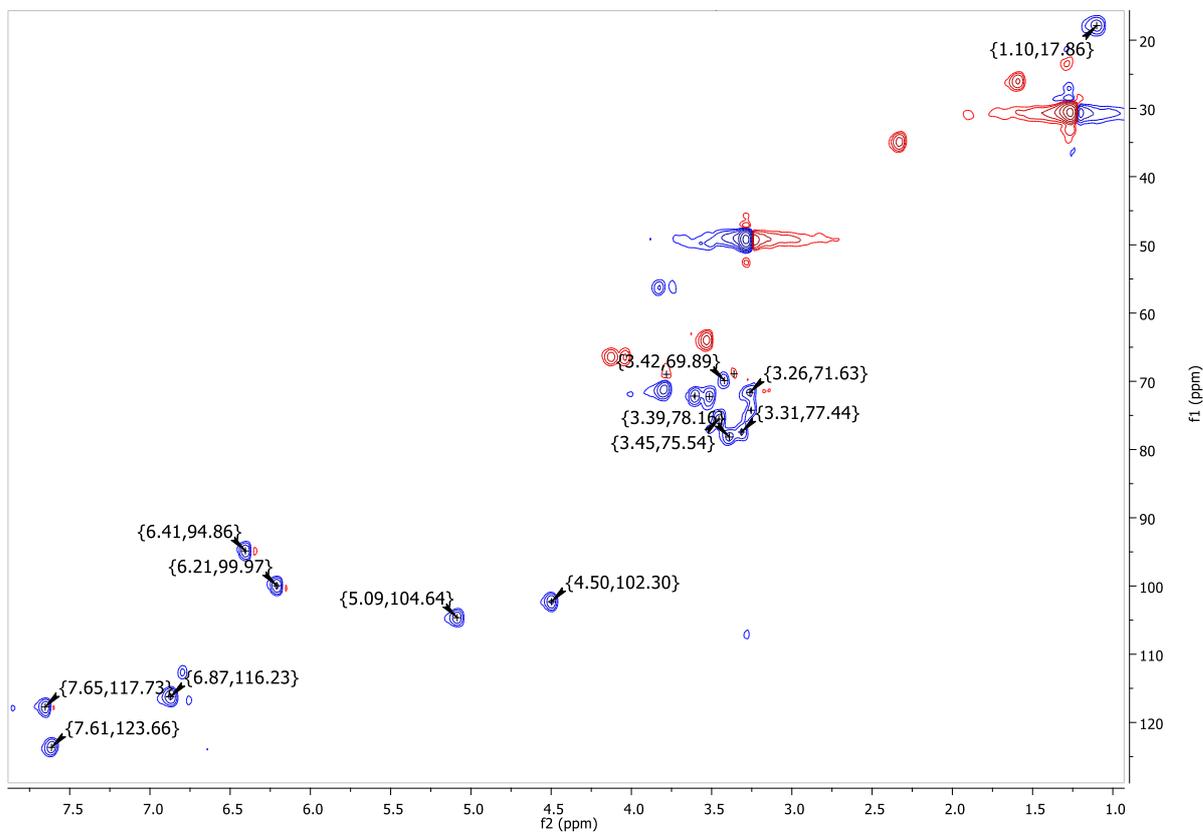
### Apêndice A - Mapa de contornos HSQC da substância B1 (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T).



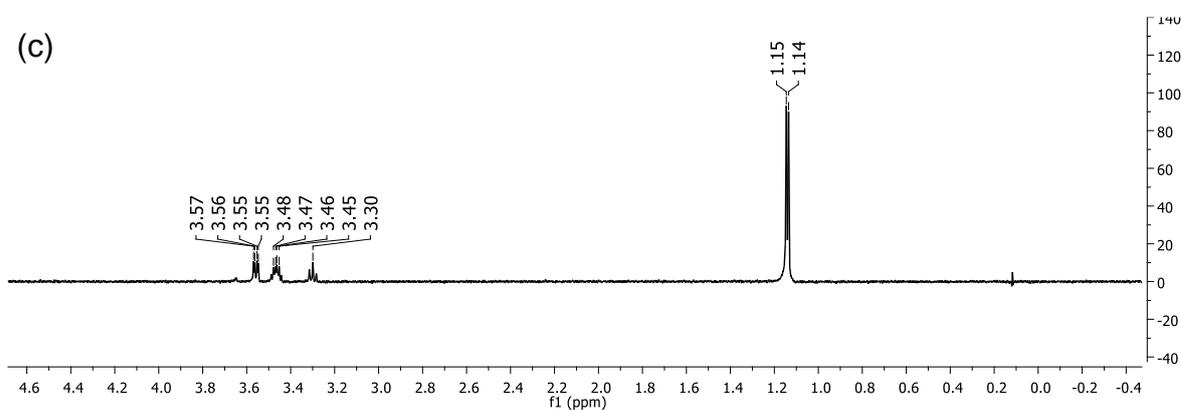
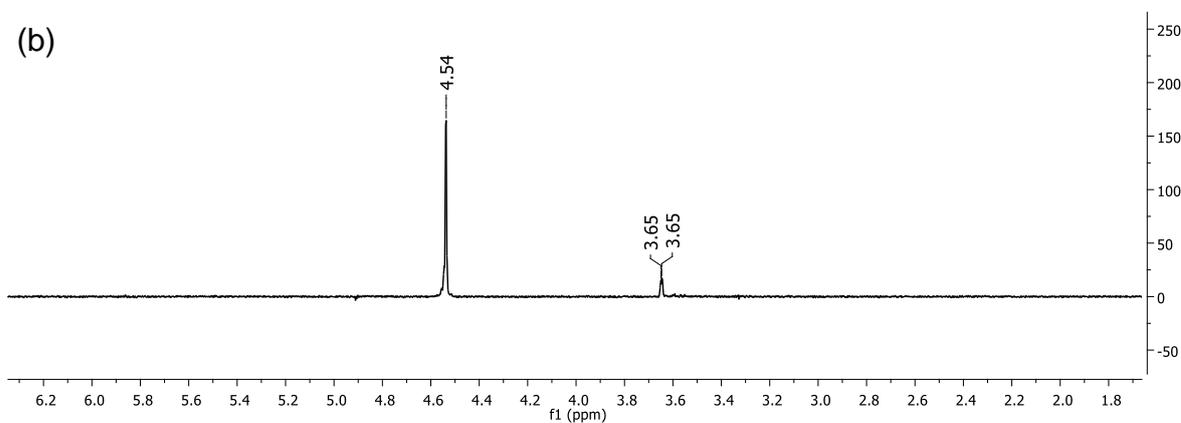
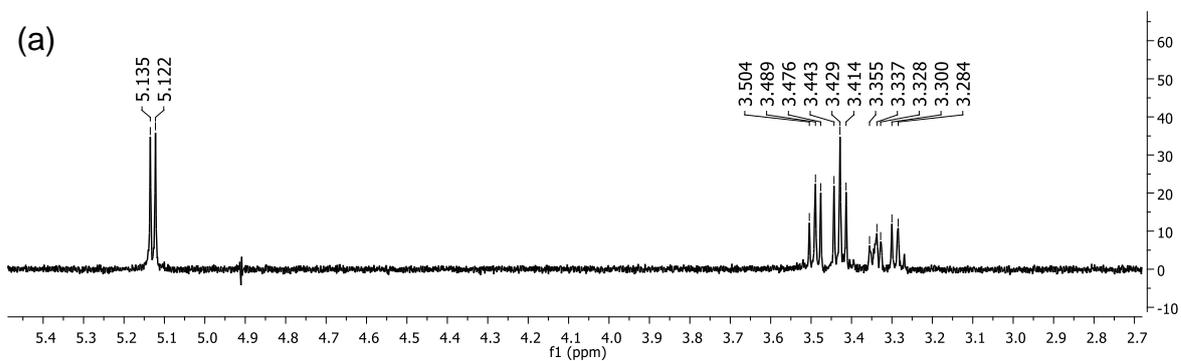
**Apêndice B - Espectro de TOCSY 1D do composto B1 com irradiação em:  $\delta$  5,60**  
(a) e  $\delta$ 45,24 (b)  $\delta$ 4,54 (c) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T).



Apêndice C - Mapa de contornos HMBC do composto B1 (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T).

**Apêndice D - Mapa de contornos HSQC da substância B2 (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T).**

**Apêndice E** - Espectro de TOCSY 1D do composto B2 com irradiação em:  $\delta$  5,11 (a) e  $\delta$ 4,52 (b)  $\delta$ 1,14 (c) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T).



Apêndice F - Mapa de contornos HMBC do composto B2 (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T).