Antonio Fernández Bobey

Isolamento e caracterização de ciclotídeos da espécie *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Ging.

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

Orientadora: Profa. Dra.Vanderlan da Silva Bolzani
Coorientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Araraquara
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

F363i

Fernández Bobey, Antonio
Isolamento e caracterização de ciclotídeos da espécie *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Ging. / Antonio Fernández Bobey. – Araraquara : [s.n], 2016
104 f. : il.

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

1. Ciclotídeos. 2. Espectrometria de massa. 2. Peptídeos cíclicos. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. 5. Violaceae. I. Título

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

ANTONIO FERNANDEZ BOBEY

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

Araraquara, 24 de fevereiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Vanderlan Bolzani

Profª. Drª. Vanderlan da Silva Bolzani (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP

Humberto Milagre

Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP

Alessandra R P Ambrozin

Profª Drª Alessandra Regina Pepe Ambrozin
Instituto de Ciência e Tecnologia / UNIFAL / Poços de Caldas- MG

Aos meus pais, irmão e esposa pelo amor incondicional

RESUMO

Os ciclotídeos são produtos naturais de estrutura polipeptídica, contendo de 28 a 37 resíduos de aminoácidos, sendo seis deles resíduos de cisteína, altamente conservados e formados por ligações dissulfeto as quais exibem ciclização tipo "cabeça-cauda". Esse arranjo estrutural característico confere aos ciclotídeos uma estabilidade excepcional e resistência à proteólise. Devido a estas peculiaridades moleculares os ciclotídeos são substâncias com importantes funções biológicas, entre elas, destacam-se as de defesa e adaptação dos organismos que as acumulam. São de grande interesse para agricultura, agindo como inseticidas e, no uso medicinal por apresentarem atividades anti-HIV, anti-helmíntica, antimicrobiana e efeitos uterotônicos. A presente dissertação trata do estudo de ciclotídeos isolados da planta *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Gingins, pertencente à família Violaceae, um táxon de ocorrência frequente na Mata Atlântica. Já existem dados na literatura sobre o estudo de ciclotídeos das raízes e o presente estudo é importante na medida que registra a ocorrência desta classe de substâncias e a sua caracterização nas folhas e galhos desta espécie, levando a informações mais completas sobre a ocorrência de ciclotídeos em Violaceae. A extração de ciclotídeos do material vegetal (galhos e folhas secos e moídos) foi feita mediante maceração hidrometanólica até esgotamento do material vegetal, seguida de partição líquido-líquido com diclorometano. A fase polar foi concentrada e submetida à cromatografia em coluna, empregando octadecilsilano (C_{18}) como fase estacionária, obtendo-se frações ricas em peptídeos. O processo de purificação foi realizado por HPLC preparativo e/ou analítico com eluição gradiente, empregando-se acetonitrila e água como fase móvel, o que permitiu a obtenção das substâncias. A sequência de aminoácidos (estrutura primária) dos ciclotídeos isolados foi estabelecida por Espectrometria de Massas MALDI-TOF/TOF com o auxílio das reações de redução, alquilação e digestão enzimática empregando as enzimas: endoproteinase de ácido glutâmico (endoGlu-C), tripsina e quimiotripsina. Também, foi realizada a análise de aminoácidos das substâncias, permitindo a quantificação de cada aminoácido presente. A presente pesquisa resultou no isolamento de seis compostos de galhos e três oriundos de folhas, totalizando sete diferentes possíveis ciclotídeos, visto que dois deles foram comuns para ambos os tecidos. Até o momento foi possível determinar a estrutura primária de quatro deles: Os ciclotídeos **Nor B** (substância $F_{20\text{-}2}$), massa molecular 3180,416 Da, **Nor C** (substância $F_{20\text{-}3}$), massa molecular 3282,472 Da, **Nor D** (substância $F_{17\text{-}1}$), massa molecular 3249,474 Da e **Nor E** (substância $F_{21\text{-}1}$), massa molecular 3170,472 Da. Todos eles reportados pela primeira vez no presente estudo. As demais substâncias isoladas se encontram em processo caracterização estrutural.

Palavras-chave: Ciclotídeos. Peptídeos cíclicos. Espectrometria de massa. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Violaceae.

ABSTRACT

Cyclotides are polypeptide structures, comprise 28-37 amino acid residues, six of them, are cysteine residues, highly conserved and formed by disulfide bonds, which exhibit "head-tail" cyclization type. This structural feature gives to cyclotides remarkable stability and resistance to proteolysis. Due to these singularities, such compounds have disclosed important biological functions. Among them; the literature has highlighted important ecological properties as defense and adaptation of the organisms, which accumulate these natural products. Accordingly, they are of great interest to agriculture, acting as insecticide, and to medicine, since some compounds have displayed anti-HIV activity, anthelmintic, antimicrobial and uterotonic properties. This research deals with the study of cyclotides isolated *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Gingins, belonging to the taxon Violaceae, which frequently occurs in the Atlantic Forest. There are several studies in the literature on the occurrence of this class of compounds and their characterization in the leaves and branches of Violaceae plant species, leading to more complete information on the occurrence of cyclotides, and their biological significance for these plants. The cyclotides extraction of plant material (dried and ground branches and leaves) was carried out by maceration with methanol/water, followed by a liquid-liquid partition with dichloromethane. The polar phase was concentrated and subjected to chromatographic column using octadecylsilane (C_{18}) as stationary phase, achieving several fractions rich in peptides. The purification process was performed by analytical and/or preparative HPLC, in gradient of acetonitrile and water as mobile phase, which led to the isolation of the cyclotides. The amino acid sequence (primary structure) of the isolated compounds was established by MALDI-TOF/TOF by reduction and alkylation reactions as well as enzymatic digestion using the enzymes: endoproteinase glutamic acid (endoGlu-C), trypsin and chymotrypsin. Also, the quantification of each amino acid present in the cyclotide structures was performed, and this amino acid analysis was fundamental for the characterization of these substances. Therefore, this research resulted in the isolation of the six compounds accumulated in the branches, and 3 of them were also found in the leaves. A complete analysis of all peptides suggested that seven are cyclotides, while two of them were common for both twigs and leaves tissues. Until now it was possible to determine the primary structure of four cyclotides, which is being described in plants for the first time: The cyclotides **Nor B** (F_{20-2} substance), molecular weight 3180.416 Da, **Nor C** (F_{20-3} substance), molecular weight 3282.472 Da, **Nor D** (substance F_{17-1}), molecular mass 3249.474 Da **Nor E** (F_{21-1} substance), molecular weight 3170.472 Da. All these cyclotides are being reported for the first time in this study, however, 3 of these are currently under further analytical studies aimed at the complete structural characterization.

Keywords: Cyclotides. Cyclic peptides. Mass spectrometry. High performance liquid chromatography. Violaceae.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ciclotídeos isolados e identificados por grupos de pesquisa brasileiros..23
Tabela 2 - Soluções empregadas para as reações de redução e alquilação de ciclotídeos**.** 37
Tabela 3 - Instruções de preparo das enzimas empregadas na digestão enzimática dos ciclotídeos.....37
Tabela 4 - Soluções empregadas no procedimento ZipTip® 38
Tabela 5 - Massas obtidas no HPLC preparativo para as frações advindas de galhos de *N. orchidiflora*.....43
Tabela 6 - Lista de sinais (*m*/*z*) de algumas das frações oriundas da preparativa do extrato de galhos (Fração 80% C_{18} galhos).....48
Tabela 7 - Resumo dos tempos de retenção (Tr) obtidos no estudo de otimização da fração F_{20}+$F_{31.}$.....52
Tabela 8 - Sequências de aminoácidos identificados nos fragmentos da digestão enzimática da substância F_{20-3}. 66
Tabela 9 - Aminoácidos identificados por meio de análise de aminoácidos do ciclotídeo $F_{20-3.}$.....67
Tabela 10 - Comparação das sequências dos ciclotídeos F_{20-3} e circulina B.....68
Tabela 11 - Sequências de aminoácidos identificados nos fragmentos da digestão enzimática da substância F_{20-2}.....77
Tabela 12 - Comparação das sequências dos ciclotídeos F_{20-2} e Viba-9. 78
Tabela 13 - Sequências de aminoácidos identificados nos fragmentos da digestão enzimática da substância F_{17-1}.....84
Tabela 14 - Comparação das sequências dos ciclotídeos F_{17-1} (Nor D) e Cycloviolin A.....84
Tabela 15 - Sequências de aminoácidos identificados nos fragmentos da digestão enzimática da substância $F_{21-1.}$.....89
Tabela 16 - Comparação das sequências dos ciclotídeos F_{21-1} (Nor E), viphi A e viphi G. 89
Tabela 17 - Massas obtidas no HPLC semipreparativo para as frações advindas de folhas de *N. orchidiflora*.....90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do orbitídeo segetalina D isolada de *Vaccaria segetalis* (Caryophyllaceae). (Arnison et al., 2013) 17
Figura 2 - Estrutura tridimensional do ciclotídeo **Varv F** isolado de *Viola arvensis* (Violaceae). Burman et al. 2014. 18
Figura 3 - Vista superior e lateral do arranjo CCK (nó de cistina cíclico). Em amarelo, em destaque, as três ligações dissulfeto características. (Wang et al. 2008) 18
Figura 4 - Classificação dos ciclotídeos 19
Figura 5 - Estrutura 3D do ciclotídeo Nor A (Najas, 2014). 19
Figura 6 - Distribuição geográfica mundial da família Violaceae 24
Figura 7 - *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Gingins 25
Figura 8 - Distribuição geográfica da espécie *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Gingins no Brasil 25
Figura 9 - Comparação dos cromatogramas dos extratos de folhas (preto) e galhos (azul) da espécie *Noisettia orchidiflora.*. 42
Figura 10 - Cromatograma da fração F_{17} 44
Figura 11 - Cromatograma da fração $F_{18.}$ 44
Figura 12 - Cromatograma da fração $F_{20.}$ 45
Figura 13 - Cromatograma da fração $F_{21.}$ 45
Figura 14 - Espectro de massas obtido por MALDI-(+)-TOF-MS da fração F_{17} 46
Figura 15 - Espectro de massas obtido por MALDI-(+)-TOF-MS da fração F_{18} 47
Figura 16 - Espectro de massas obtido por MALDI-(+)-TOF-MS da fração F_{20} 47
Figura 17 - Espectro de massas obtido por MALDI-(+)-TOF-MS da fração F_{21} 48
Figura 18 - Cromatograma da fração F_{20}+F_{31} 49
Figura 19 - Cromatograma da fração F_{20}+F_{31} 49
Figura 20 - Comparação dos cromatogramas da fração F_{20}+F_{31}. Temperatura: 25.5°C (preto) e 30°C (azul). 50
Figura 21 - Cromatograma da fração F_{20}+F_{31} 50
Figura 22 - Cromatograma da fração F_{20}+F_{31} 50
Figura 23 - Cromatograma da fração F_{20}+F_{31} 51
Figura 24 - Comparação dos cromatogramas da fração F_{20}+F_{31}. Temperatura: 25.5 °C (preto), 30 °C (azul), 35 °C (vermelho), 45°C (verde) e 55 °C (laranja). 51
Figura 25 - Cromatograma da substância $F_{17\text{-}2.}$ 53
Figura 26 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{17\text{-}2}$ 53
Figura 27 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{17\text{-}2}$ reduzida e alquilada. 54
Figura 28 - Cromatograma da substância $F_{21\text{-}2.}$ 55
Figura 29 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{21\text{-}2}$ 55
Figura 30 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{21\text{-}2}$ reduzida e alquilada. 56
Figura 31 - Cromatograma da substância $F_{20\text{-}3.}$ 57
Figura 32 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{20\text{-}3}$ 57
Figura 33 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{20\text{-}3}$ reduzida e alquilada. 58
Figura 34 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{20\text{-}3}$ digerida com endoGlu-C. 58

Figura 35 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 3648,604 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância $F_{20\text{-}3.}$ 59
Figura 36 - Ampliação (2000-3800 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 3648,604 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância $F_{20\text{-}3.}$ 59
Figura 37 - Ampliação (700-2000 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 3648,604 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância $F_{20\text{-}3.}$ 60
Figura 38 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{20\text{-}3}$ digerida com tripsina 61
Figura 39 - Ampliação (1400-3500 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 3407,532 oriundo da digestão com tripsina da substância $F_{20\text{-}3.}$ 61
Figura 40 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 2828,260 oriundo da digestão com tripsina da substância $F_{20\text{-}3.}$ 62
Figura 41 - Ampliação (300-1500 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 2828,260 oriundo da digestão com tripsina da substância $F_{20\text{-}3.}$ 62
Figura 42 - Ampliação (1500-2900 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 2828,300 oriundo da digestão com tripsina da substância $F_{20\text{-}3.}$ 63
Figura 43 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{20\text{-}3}$ digerida com quimiotripsina. 64
Figura 44 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 2261,098 oriundo da digestão com quimiotripsina da substância $F_{20\text{-}3.}$ 64
Figura 45 - Ampliação (1000-2400 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 2261,098 oriundo da digestão com quimiotripsina da substância $F_{20\text{-}3.}$ 65
Figura 46 - Ampliação (100-1100 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 2261,098 oriundo da digestão com quimiotripsina da substância $F_{20\text{-}3.}$ 65
Figura 47 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 1388,606 oriundo da digestão com quimiotripsina da substância $F_{20\text{-}3.}$ Íons *–b* (azul) e *–y* (vermelho). 66
Figura 48 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo $F_{20\text{-}3}$ (**Nor C**). 68
Figura 49 - Cromatograma da substância $F_{20\text{-}2.}$ 69
Figura 50 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{20\text{-}2}$ 69
Figura 51 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{20\text{-}2}$ reduzida e alquilada. 70
Figura 52 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{20\text{-}2}$ digerida com endoGlu-C. 71
Figura 53 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 3546,615 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância $F_{20\text{-}2.}$ 71
Figura 54 - Ampliação (2100-3600 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 3546,615 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância $F_{20\text{-}2.}$ 72
Figura 55 - Ampliação (600-2150 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 3546,615 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância $F_{20\text{-}2.}$ 72
Figura 56 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{20\text{-}2}$ digerida com tripsina. 73
Figura 57 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 3262,341 oriundo da digestão com tripsina da substância $F_{20\text{-}2.}$ 74
Figura 58 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 2726,246 oriundo da digestão com tripsina da substância $F_{20\text{-}2.}$ Íons *–b* (azul) e *–y* (vermelho). 74
Figura 59 - Ampliação (250-1500 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 2726,2 oriundo da digestão com tripsina da substância $F_{20\text{-}2.}$ Íons *–b* (azul) e *–y* (vermelho). 75
Figura 60 - Ampliação (1350- 2800 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 2726,246 oriundo da digestão com tripsina da substância $F_{20\text{-}2.}$ 75

Figura 61 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{20-2} digerida com quimiotripsina. 76
Figura 62 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 1417,608 oriundo da digestão com quimiotripsina da substância F_{20-2}. Íons –*b* (azul) e –*y* (vermelho). 77
Figura 63 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo F_{20-2}. 78
Figura 64 - Cromatograma da substância F_{17-1}. 79
Figura 65 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{17-1} 79
Figura 66 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{17-1} reduzida e alquilada. 80
Figura 67 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{17-1} digerida com endoGlu-C. 81
Figura 68 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 3615,647 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância F_{17-1}. 81
Figura 69 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{17-1} digerida com tripsina. 82
Figura 70 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 2796,175 oriundo da digestão com tripsina da substância F_{17-1}. 82
Figura 71 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{17-1} digerida com quimiotripsina. 83
Figura 72 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 2574 oriundo da digestão com quimiotripsina da substância F_{17-1}. 83
Figura 73 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo F_{17-1} (Nor D) 85
Figura 74 - Cromatograma da substância F_{21-1}. 86
Figura 75 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{21-1} 86
Figura 76 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{21-1} reduzida e alquilada. 87
Figura 77 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 3537,557 oriundo da digestão com EndoGlu-C da 87
Figura 78 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 3295,574 oriundo da digestão com EndoGlu-C da 87
Figura 79 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 2768,431 oriundo da digestão com quimiotripsina da substância F_{21-1}. 88
Figura 80 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo Nor E. 90
Figura 81 - Cromatogramas da fração F_1 (azul) e do extrato de folhas (preto) 91
Figura 82 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da fração F_1. 91
Figura 83 - Cromatogramas da fração F_2 (vermelho) e do extrato de folhas (preto) 92
Figura 84 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da fração F_2. 92
Figura 85 - Cromatogramas da fração F_3 (verde) e do extrato de folhas (preto) 93
Figura 86 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da fração F_3. 93
Figura 87 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{1-1}. 94
Figura 88 - Cromatogramas do extrato de Folhas (preto) e F_{1-1} (vermelho). 95
Figura 89 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{1-1} reduzida e alquilada. 95
Figura 90 - Cromatogramas do extrato de Folhas (preto) e F_{3-1} (azul). 96
Figura 91 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{3-1}. 96
Figura 92 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{3-1} reduzida e alquilada. 97
Figura 93 - Cromatogramas do extrato de Folhas (preto) e F_{3-2} (laranja). 97
Figura 94 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{3-2}. 98

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
ACN	Acetonitrila
AF	Ácido fórmico
C_{18}	Octadecilsilano
CCK	*Cyclic Cystine Knot* /Nó de cistina cíclico
CH_2Cl_2	Diclorometano
CID	*Collision induced dissociation*
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCM	Diclorometano
DTT	Ditiotreitol
EndoGlu-C	Endoproteinase de ácido glutâmico
HCl	Ácido clorídrico
HIV	*Human Immunodeficiency Virus*/
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*/ Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
H_2O	Água
IOA	Iodoacetamida
JBRJ	Jardim Botânico do Rio de Janeiro
LIFT	*Laser Induced Fragmentation Technique*
MA	Massachusetts
MALDI	*Matrix-assisted laser desorption/ionization*
MeOH	Metanol
MS	*Mass Spectrometry* / Espectrometria de Massas
N_2	Nitrogênio
NH_4HCO_3	Bicarbonato de amônio
OPA	orto-ftalaldeído
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
pág.	Página
SPE	*Solid Phase Extraction*/Extração em fase solida
TFA	Ácido trifluoracético
TOF	*Time of flight*/ Tempo de vôo
Tr	Tempo de retenção
u.a.	Unidades arbitrárias
U.V	Ultravioleta

LISTA DE SIMBOLOS

Å	Ångström
°C	grau Celsius
µL	microlitro
µm	micrómetro
Da	Dalton
h	horas
kV	kilovolts
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
m/z	Relação massa-carga
nm	nanômetro
rpm	Rotação por minuto

LISTA DE ABREVIATURAS DOS RESIDUOS DE AMINOÁCIDOS

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

1.1 Peptídeos cíclicos vegetais 16
1.2 Ciclotídeos 17
1.2.1 Extração e purificação 20
1.2.2 Caracterização estrutural: Sequenciamento 20
1.2.3 Atividades biológicas e farmacológicas 21
1.2.4 Pesquisas sobre Ciclotídeos no Brasil 22
1.3 A família Violaceae 23
1.4 O gênero *Noisettia* 24
1.5 Espécie *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Gingins 24

2 OBJETIVOS 26

3 PARTE EXPERIMENTAL 27

3.1 Material vegetal 27
3.1.1 Extração 27
3.1.2 Pré-purificação 27
3.2 Análises do perfil das frações 80% C_{18} dos galhos e folhas obtidas na pré-purificação 28
3.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica 28
3.3 Fracionamento dos extratos de folhas e galhos 30
3.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência preparativa 30
3.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa 30
3.4 Análises das frações obtidas no HPLC preparativo (Fração 80% C_{18} galhos) e semipreparativo (Fração 80% C_{18} folhas) 31
3.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência analítica 31
3.4.2 Espectrometria de massas MALDI-TOF 31
3.5 Otimização dos perfis cromatográficos das frações obtidas na preparativa 32
3.6 Isolamento das substâncias 33
3.6.1 Substâncias $F_{17\text{-}1}$ e $F_{17\text{-}2}$ 33
3.6.2 Substâncias $F_{20\text{-}2}$ e $F_{20\text{-}3}$ 34
3.6.3 Substâncias $F_{21\text{-}1}$ e $F_{21\text{-}2}$ 34
3.6.4 Substância $F_{1\text{-}1}$ 35
3.6.5 Substâncias $F_{3\text{-}1}$ e $F_{3\text{-}2}$ 36
3.7 Determinação estrutural 36
3.7.1 Sequenciamento 36
3.7.1.1 Redução e alquilação 36
3.7.1.2 Digestão enzimática 37
3.7.1.3 Remoção de sais (ZipTip®) 38
3.7.1.4 Sequenciamento por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF 39
3.7.2 Análise de aminoácidos 39
3.7.2.1. Hidrólise 39
3.7.2.2. Análise cromatográfica dos aminoácidos oriundos da hidrólise 39

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 41

4.1 Obtenção dos extratos **41**
4.2 Pré-purificação **41**
4.3 Análises dos extratos obtidos na pré-purificação **42**
4.4 Fracionamento do extrato de galhos (fração 80% C_{18} galhos) **42**
4.5 Análises das frações de galhos de *N. orchidiflora*, pós-preparativa **44**
4.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência analítica 44
4.5.2 Espectrometria de massas MALDI-TOF 45
4.6 Otimização dos perfis cromatográficos das frações obtidas na preparativa **48**
4.7 Análises das substâncias isoladas a partir das frações obtidas no HPLC preparativa do extrato de galhos de *N. orchidiflora* **52**
4.7.1 Substância $F_{17\text{-}2}$ 52
4.7.2 Substância $F_{21\text{-}2}$ 54
4.7.3 Substância $F_{20\text{-}3}$ (Nor C) 56
4.7.4 Substância $F_{20\text{-}2}$ (Nor B) 68
4.7.5 Substância $F_{17\text{-}1}$ (Nor D) 78
4.7.6 Substância $F_{21\text{-}1}$ (Nor E) 85
4.8 Fracionamento do extrato de folhas (Fração 80% C_{18} folhas) **90**
4.9 Análises das substâncias isoladas no HPLC semipreparativo do extrato de folhas de *N. orchidiflora* **94**
4.9.1 Substância $F_{1\text{-}1}$ 94
4.9.2 Substância $F_{3\text{-}1}$ 96
4.9.3 Substância $F_{3\text{-}2}$ 97

5 CONCLUSÕES **99**

REFERÊNCIAS **101**

1 INTRODUÇÃO

Os peptídeos cíclicos estão distribuídos nos mais variados grupos de organismos vivos. Eles estão presentes em micro-organismos, animais invertebrados marinhos, fungos, aracnídeos e plantas (CRAIK, 2001; MATSUMOTO, NISHIMURA, TAKEYA, 2002; TRABI e CRAIK, 2002). Uma característica comum desta classe de substâncias naturais é a participação nas reações dos mecanismos de defesa do hospedeiro, principalmente nas plantas (TRABI e CRAIK, 2002). Dada a importância biológica, os peptídeos são hoje bastante estudados devido a uma série de propriedades farmacológicas descritas na literatura, o que tem fascinado os cientistas ao longo dos últimos anos, a pesquisarem esta classe de produtos naturais, muito pouco explorada no Brasil. Substâncias como Gramicidina S, Octreotida, Ciclosporina A, Nisina, Polimixina e Colistina são de grande impacto na medicina atual (SEWALD, JAKUBE, 2009; WHITE, YUDIN, 2011).

1.1 Peptídeos cíclicos vegetais

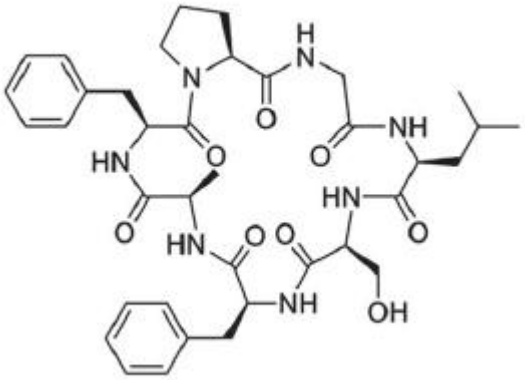
Os peptídeos cíclicos ou ciclopeptídeos são poliamidas cíclicas constituídas, de 2-37 resíduos de aminoácidos proteinogênicos (20 aa pertencentes ao código genético) ou não proteinogênicos (TAN, ZHOU, 2006; TANG et al., 2010). A ciclização destes peptídeos pode ser gerada a partir de quatro tipos de ligações (WHITE, YUDIN, 2011):

- ✓ *cabeça-cauda*, onde o grupo carboxila terminal reage via reação de condensação com o grupo amino terminal do próprio peptídeo formando uma ligação amida;
- ✓ *ligação por meio das cadeias laterais*, neste caso geralmente grupos sulfidrilas oriundos de resíduos de cisteína reagem para formar ligações dissulfeto;
- ✓ *ligação cadeia lateral-cabeça; cadeia lateral-cauda*;

Em 2013, foi proposto um novo sistema de classificação dos ciclopeptídeos vegetais (ARNISON et al., 2013), eles foram divididos em dois grandes grupos: os

peptídeos de ciclos pequenos, constituídos somente por resíduos de aminoácidos (proteinogênicos ou não-proteinogênicos), cuja estrutura cíclica é mantida pela formação de apenas uma ligação peptídica entre o grupo α-amino terminal com o grupo α-carboxila terminal, nomeados como ***orbitídeos*** (Figura 1); e os ciclopeptídeos de maior tamanho, chamados ***ciclotídeos***, contendo de 28 a 37 resíduos de aminoácidos na estrutura cíclica (Figura 2).

Figura 1 - Estrutura do orbitídeo segetalina D isolada de *Vaccaria segetalis* (Caryophyllaceae). (ARNISON et al., 2013)



1.2 Ciclotídeos

Ciclotídeos compreendem uma família de peptídeos com 28 - 37 resíduos de aminoácidos ligados em uma estrutura cíclica cabeça-cauda, contendo três ligações dissulfeto que conferem um arranjo estrutural característico denominado de nó de cistina cíclico (*Cyclic Cystine Knot* – CCK) (CRAIK et al., 2001) (Figura 3). Este arranjo da estrutura molecular dos ciclotídeos lhes conferem uma excepcional estabilidade térmica, enzimática e química (COLGRAVE; CRAIK, 2004). Além disso, o arranjo molecular é formado de modo que o anel macrocíclico contenha duas ligações dissulfeto (Cys I-Cys IV e Cys II-Cys V), enquanto que a terceira ligação dissulfeto (Cys II-Cys VI) constitui o núcleo fundamental *"core"* desse anel (Figura 3).

Os ciclotídeos se alinham em função dos seis resíduos de cisteína conservados (nomeados de I a VI), os chamados *loops* do esqueleto do ciclotídeo correspondem às regiões entre os resíduos de cisteína (estão numerados de 1 a 6) (Figura 2). São classificados em três subfamílias: Möbius (Figura 4A), Bracelete (Figura 4B) e Inibidores de tripsina, diferenciados pela disposição de seus aminoácidos no arranjo molecular (CRAIK et al., 1999; GÖRANSSON et al., 2004).

Figura 2 - Estrutura tridimensional do ciclotídeo **Varv F** isolado de *Viola arvensis* (Violaceae). (BURMAN et al., 2014)

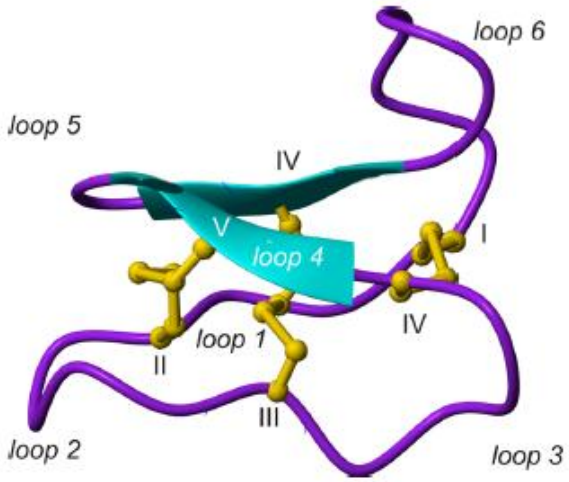


Figura 3 - Vista superior e lateral do arranjo CCK (nó de cistina cíclico). Em amarelo, em destaque, as três ligações dissulfeto características. (WANG et al., 2008)

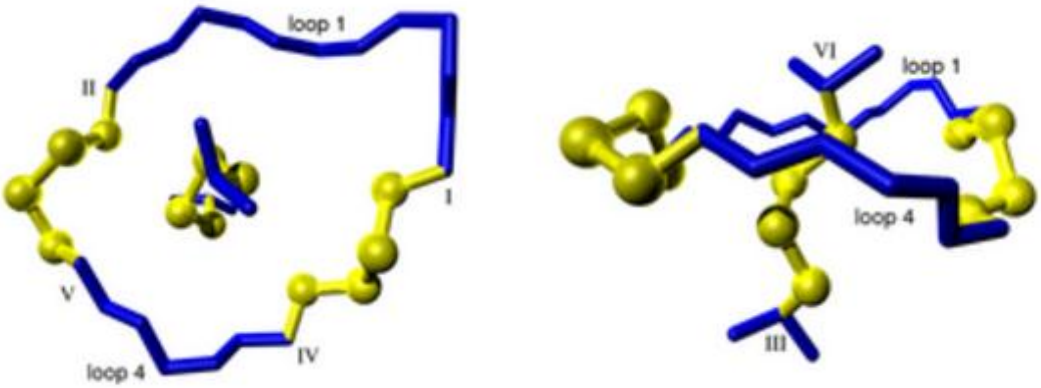
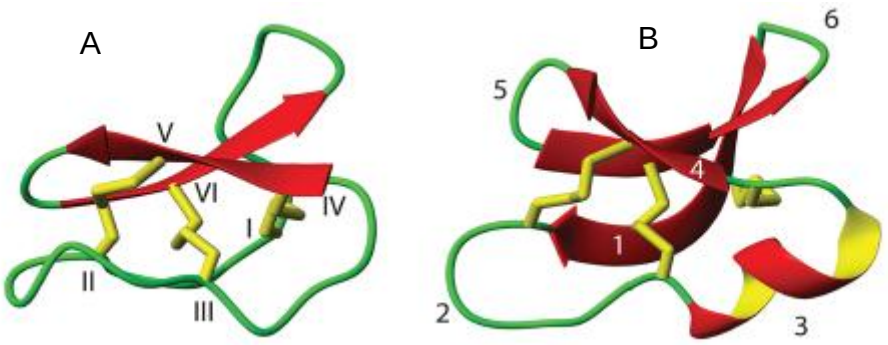


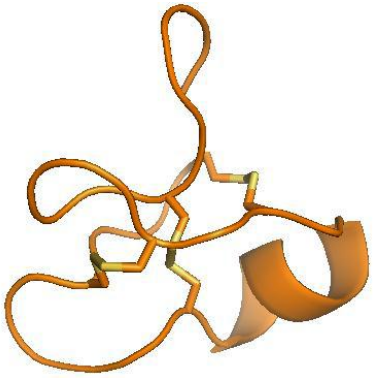
Figura 4 - Classificação dos ciclotídeos. (BURMAN et al., 2015)



A Ciclotídeo pertencente à subfamília Möbius
B Ciclotídeo pertencente à subfamília bracelete

Até o momento, a ocorrência destes compostos foi registrada em apenas seis famílias de Angiospermas: Curcubitaceae, Rubiaceae, Fabaceae, Poaceae, Solanaceae e Violaceae (POTH et al., 2011; BURMAN et al., 2014). Para a espécie *Noisettia orchidiflora* da família Violaceae foi confirmada a presença de ciclotídeos em galhos, folhas e raízes. Apesar da comprovação da existência destes ciclotídeos, apenas uma substância já foi descrita na literatura para esta espécie, o peptídeo **Nor A**, isolado das raízes desta espécie (Figura 5) (NAJAS, 2014).

Figura 5 - Estrutura 3D do ciclotídeo Nor A (NAJAS, 2014).



Uma listagem completa dos ciclotídeos isolados até o momento pode ser encontrada no site http://www.cybase.org.au (WANG et al., 2008), uma base de dados de peptídeos já descritos e disponibilizados para a pesquisa.

1.2.1 Extração e purificação

Os primeiros métodos de extração e isolamento de ciclotídeos eram experimentos complexos que dispendiam de um gasto significativo de tempo e de recursos, tornando a pesquisa química sobre esta classe importante de produtos naturais, limitada (CLAESON et al., 1998) e portanto, ainda pouco incorporada à química de produtos naturais realizada no Brasil. No entanto com o tempo, novas metodologias foram desenvolvidas para esses peptídeos trazendo melhoras nos rendimentos e simplificando os procedimentos experimentais empregados (GÖRANSSON et al., 2004; CRAIK et al., 2012; YESHAK et al., 2012).

No geral, o isolamento destes compostos se dá mediante Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em escala preparativa e/ou semipreparativa com eluição em gradiente. Geralmente esses processos são desafiadores em relação ao processo de separação, devido à complexa mistura de ciclotídeos que as plantas apresentam bem como ao alto grau de homologia entre os mesmos (BURMAN et al., 2014).

Contudo, a procura por novos ciclotídeos em plantas tem estimulado o desenvolvimento de novos métodos de "*screening*" para estas moléculas. Envolvidos com essa necessidade, em 2008 foi publicado um protocolo completo de isolamento, identificação e elucidação estrutural de ciclotídeos de plantas (GRUBER et al., 2008). Neste protocolo, extratos obtidos com diclorometano (DCM) / metanol (MeOH) ou 50% de acetonitrila (ACN)/H_2O são diretamente aplicados em um cartucho de extração em fase sólida contendo como fase estacionária sílica funcionalizada com C_{18}. Para a eluição, concentrações crescentes de ACN em solução aquosa são aplicadas no cartucho, obtendo dessa forma frações enriquecidas com ciclotídeos.

1.2.2 Caracterização estrutural: Sequenciamento *de novo*

A elucidação estrutural dessas moléculas não pode ser realizada por Espectrometria de Massas convencional, pois as características estruturais que elas

possuem as tornam extremamente estáveis, impedindo sua fragmentação. Para resolver esse problema, várias abordagens têm sido adotadas empregando-se reações de redução, alquilação e digestão enzimática com diferentes enzimas: endoproteinase-GluC, tripsina e quimiotripsina (PINTO, 2013).

Após as reações de redução e alquilação, os ciclotídeos ficam com suas seis cisteínas, acetoamidadas, o que confere um acréscimo de 348 Da, na massa molecular dos compostos em discussão. No geral, os ciclotídeos têm um único resíduo de ácido glutâmico na sua estrutura, conservado no *loop 1*. Assim espera-se que com o uso da enzima endoGlu-C haja uma clivagem na ligação C-terminal do resíduo de ácido glutâmico (Glu, E), produzindo a abertura do anel e a observação do incremento de 18 Da à massa do peptídeo. A tripsina cliva os resíduos de lisina (Lys, K) e arginina (Arg, R) que não antecedam prolina (Pro, P) produzindo, cerca de duas ou três clivagens.

Já a quimiotripsina é empregada principalmente para diferenciar leucina de isoleucina, as quais têm a mesma massa molecular e não podem ser diferenciadas facilmente por Espectrometria de Massas. A diferenciação é possível devido à especificidade que esta enzima tem em clivar os resíduos de fenilalanina, tirosina, triptofano, metionina e leucina que não estejam antes de prolina. Assim, no caso de dúvida entre isoleucina e leucina, se esta não anteceder prolina e for clivada após a digestão com quimiotripsina, significa que trata-se de leucina.

Também podem ser utilizadas outras técnicas como a Ressonância Magnética Nuclear (1D e 2D), Análise de Aminoácidos e Degradação de Edman.

1.2.3 Atividades biológicas e farmacológicas

Em alguns táxons de Angiospermas, os ciclotídeos são reconhecidamente, uma classe de grande importância biológica, o que dirige o interesse farmacológico, devido a uma série de propriedades terapêuticas entre elas: nematicida (COLGRAVE et al., 2008), moluscicida (PLAN et al., 2008) antibacteriana (TAM et al., 1999; PRANTING et al., 2010; FENSTERSEIFER et al., 2015), antiviral (GUSTAFSON et al., 1994; TRABI et al., 2004; DALY et al., 2006; WANG et al., 2008), antitumoral (HERRMANN et al., 2008; PARK et al., 2014), hemolítica (IRELAND et al., 2006), antifúngica (TAM et al., 1999; LINDHOLM et al. 2002),

antagonista da neurotensina (WITHERUP et al., 1994) e inibitória da tripsina (HERNÁNDEZ et al., 2000).

Propriedades inseticidas têm sido descritas, constituindo um dado relevante para as pesquisas realizadas no Brasil, um país que tem sua economia fortemente impactada pela agricultura (JENNINGS et al., 2001; JENNINGS et al., 2005; PINTO, 2010).

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

1.2.4 Pesquisas sobre Ciclotídeos no Brasil

Esta linha de pesquisa é muito recente no Brasil, o primeiro relato de um composto desta classe foi realizado pelo Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas da Universidade Católica de Brasília. Neste trabalho foi possível isolar da espécie *Palicourea rígida* (Rubiaceae) um novo ciclotídeo, pertencente à família dos braceletes e nomeado Parigidina-br1 (PINTO, 2010; PINTO et al., 2012).

Outro grupo de pesquisa que vem trabalhando nesta classe de compostos é o grupo NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) (PINTO, 2013; NAJAS, 2014). Eles têm feito estudos com várias plantas da família Violaceae, entre elas *Hybanthus. calceolaria* (L.) Schulze-Menz, neste estudo confirmou-se a presença de ciclotídeos nas folhas, caules e sementes; sendo este último órgão o que apresenta uma maior concentração deste tipo de compostos. Além disso, foi reportada a caracterização completa do ciclotídeo: **Hyco A** isolado das sementes, e uma sequência parcial de outro ciclotídeo denominado **Hyco B** (PINTO, 2013) (Tabela 1).

Mais recentemente, no ano 2014, o mesmo grupo realizou um estudo com quatro espécies nativas da Mata Atlântica do estado de Rio de Janeiro (NAJAS, 2014), nele foi possível isolar e identificar o primeiro ciclotídeo do gênero *Noisettia*, chamado **Nor A**. (Tabela 1).

Tabela 1 - Ciclotídeos isolados e identificados por grupos de pesquisa brasileiros

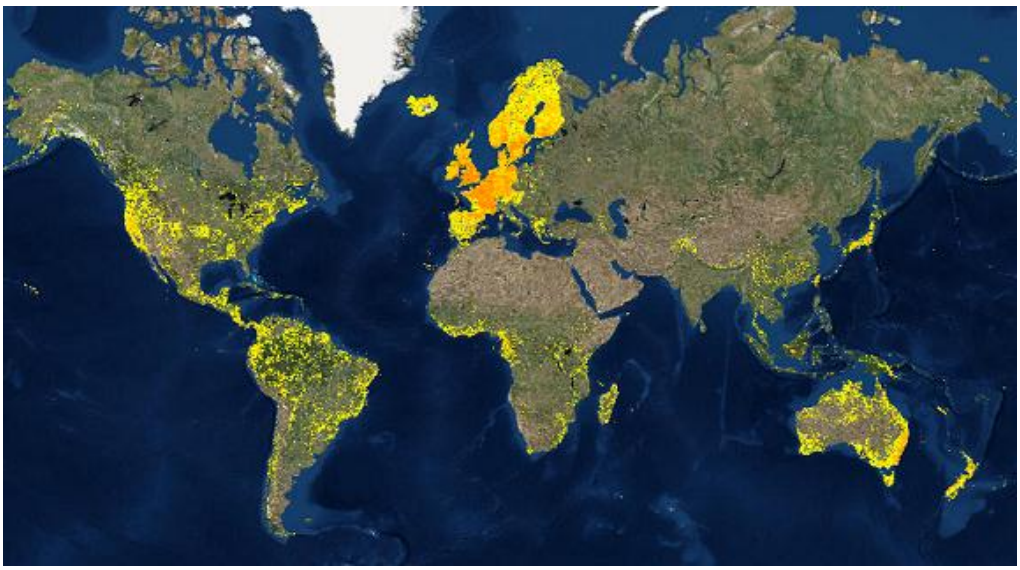
Ciclotídeo	Espécie	Sequência de aminoácidos
Parigidina-br1	*Palicourea rígida*	CGESCVFIPCITSLAGCSCKNKVCYYDGGSVP
Hyco A	*Hybanthus calceolaria*	CGESCVFIPCITAVIGCSCKDKVCYDSIP
Hyco B	*Hybanthus calceolaria*	CWSCVFIPCITTVIGCSCR----------ADP
Hyco C	*Hybanthus calceolaria*	CAESCVFIPCTITAILGCSCKDRVCYDGLP
Nor A	*Noisettia orchidiflora*	CAESCVYLPCTITAIIGCSCRSKVCYDGLP

Fonte: elaborada pelo autor

1.3 A família Violaceae

A família Violaceae, foi taxonomicamente descrita em 1802 e é constituída por 23 gêneros e aproximadamente 900 espécies (MUNZINGER et al., 2003). O táxon apresenta ampla distribuição geográfica (Figura 6), tipos diferenciados de vegetação e variação de hábitos (ervas anuais, subarbusto, arbustos, árvores e lianas). No Brasil, são encontradas 73 espécies em 13 gêneros amplamente distribuídos nos mais variados ecossistemas como a Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal e Cerrado. Os gêneros presentes no país são: *Amphirrhox*, *Anchietea*, *Corynostylis*, *Gloesperum*, *Hybanthopsis*, *Hybanthus*, *Leonia*, *Noisettia*, *Paypayrola*, *Rinorea*, *Rinoreocarpus*, *Schweiggeria* e *Viola* (PAULA-SOUZA, 2015).

Figura 6 - Distribuição geográfica mundial da família Violaceae



Fonte: The Global Biodiversity Information Facility: GBIF.
Disponível em:< http://www.gbif.org/species/6631>. Acesso em: 20 jan. 2016.
Pontos amarelos representam lugares de coletas

1.4 O gênero *Noisettia*

Noisettia é um dos menores gêneros da família Violaceae com oito espécies. Sua distribuição é majoritária na região tropical da América do Sul, com menor numero de relatos na Europa (Suécia, Bélgica e Inglaterra) (GBIF, 2013).

No Brasil só há reportada uma espécie (PAULA-SOUZA, 2015). Na literatura há descrição de um estudo fitoquímico empregando este gênero (NAJAS, 2014).

1.5 Espécie *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Gingins

Noisettia orchidiflora (Figura 7) é uma espécie nativa do Brasil, mas não endêmica. Também é conhecida pelo sinônimo *Noisettia longifolia* Kunth. Há descrições desta espécie em países da Europa e da América do Sul. No Brasil, a espécie tem como domínio fitogeográfico a Amazônia e a Mata Atlântica, sendo distribuída geograficamente no norte (Acre, Amazonas e Pará), nordeste (Alagoas, Bahia, Maranhão e Pernambuco), sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e no sul (Paraná e Santa Catarina) do país (Figura 8) (PAULA-SOUZA, 2015).

Morfologicamente, *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Gingins é um arbusto de pequeno porte, medindo cerca de 30 cm de comprimento, suas flores são em geral, zigomorfas com pétalas rebaixadas de cor laranja.

Figura 7 - *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Gingins



Fotos: SOUZA, 2013

No Acre, a espécie é conhecida popularmente como "*tetum rau*", é usada tradicionalmente na região para o tratamento do bócio. Em geral se faz uma infusão das folhas em agua morna. Após este processo de extração a solução resultante é colocada diretamente nas partes afetadas da pessoa (DALY; SILVEIRA; FERREIRA, 1996). Também, existem descrições do uso das raízes para tratamento como vomitivo nas comunidades que habitam a Guiana Francesa. Nesta região a população utiliza esta planta como uma alternativa da *Ipeca branca* (*Hybanthus calceolaria,* Violaceae) conhecida pelas propriedades anti-helmíntica (SILVA et al., 2011 apud PINTO 2013).

Figura 8 - Distribuição geográfica da espécie *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Gingins no Brasil



Fonte: Disponível em:<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 15 Jan. 2016.

2 OBJETIVOS

I) Isolar os ciclotídeos presentes nas folhas e galhos da espécie *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Gingins por meio de HPLC-DAD,

II) Sequenciar os ciclotídeos por meio espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF e Análise de Aminoácidos.

III) Encaminhar as frações e os ciclotídeos isolados para testes biológicos.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Material vegetal

A espécie *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Gingins foi coletada no Parque Nacional da Tijuca, Corcovado no Rio de Janeiro em abril de 2014 pelo botânico Dr. Marcelo Trovó, UFRJ. O material vegetal foi seco em estufa com ar circulante à temperatura de 40°C durante quatro dias. Após a secagem, cada um dos órgãos das plantas foi separado manualmente (folhas, galhos, e raiz) e, subsequentemente, submetidos a um processo de pulverização em moinho mecânico. Neste estudo, não utilizamos as raízes.

3.1.1 Extração

Tanto para o pó das folhas (15,1 g) quanto para o pó dos galhos (55,6 g), seguiu-se o mesmo procedimento de extração, de forma que o material pulverizado foi homogeneizado com uma solução extrativa hidrometanolica, MeOH:H_2O (60:40) v/v, durante 24h, seguida de filtração por gravidade, utilizando-se papel de filtro. Este procedimento foi repetido por quatro vezes até que se observasse o esgotamento do material moído.

Ao final dessa etapa, as soluções filtradas, referentes a cada órgão, foram colocadas em funil de separação e adicionou-se a elas 800 mL de diclorometano (4x 200 mL). A adição de diclorometano promoveu imiscibilidade entre os solventes, formando-se duas fases (MeOH:H_2O e CH_2Cl_2). Após a agitação branda, seguida de repouso (24 horas) com completa separação das fases, a fase CH_2Cl_2 foi armazenada e a fase hidrometanólica levada ao evaporador rotativo para remoção do metanol, restando desta forma uma fase majoritariamente aquosa (Esquema 1, pág. 27).

3.1.2 Pré-purificação

A fase aquosa de cada um dos extratos (galhos e folhas) foi pré-purificada por meio de cromatografia em coluna utilizando como adsorvente octadecilsilano (C_{18}, Polygoprep®, 40-63 µm, 60 Å).

O empacotamento foi feito a seco, uma vez colocada a fase estacionária (32 g) na coluna (diâmetro interno 4,5 cm) foram adicionados 150 mL (3 x 50 mL) de metanol com o intuito de ativá-la, seguido de 150 mL (3 x 50 mL) de uma solução de ACN 90% em H_2O/0,08% TFA (ácido trifluoroacético) (solvente B) e equilibrada com 200 mL H_2O/0,1% TFA (solvente A). Após o acondicionamento cromatográfico, as frações aquosas obtidas no processo de extração foram aplicadas na coluna e eluídas com 200 mL de uma solução de 20% de solvente B, para remoção dos compostos polares, seguido da adição de 200 mL de solução de 80% de solvente B, que removeu os peptídeos de interesse. Esta última fração foi coletada e liofilizada, sendo considerada a fração "rica em ciclotídeos" (**Fração 80% C_{18}**). Para limpeza da coluna foram utilizados 100% ACN (200 mL) e metanol (200 mL).

Considerando-se os dois órgãos em estudo, foram obtidas as frações de interesse:

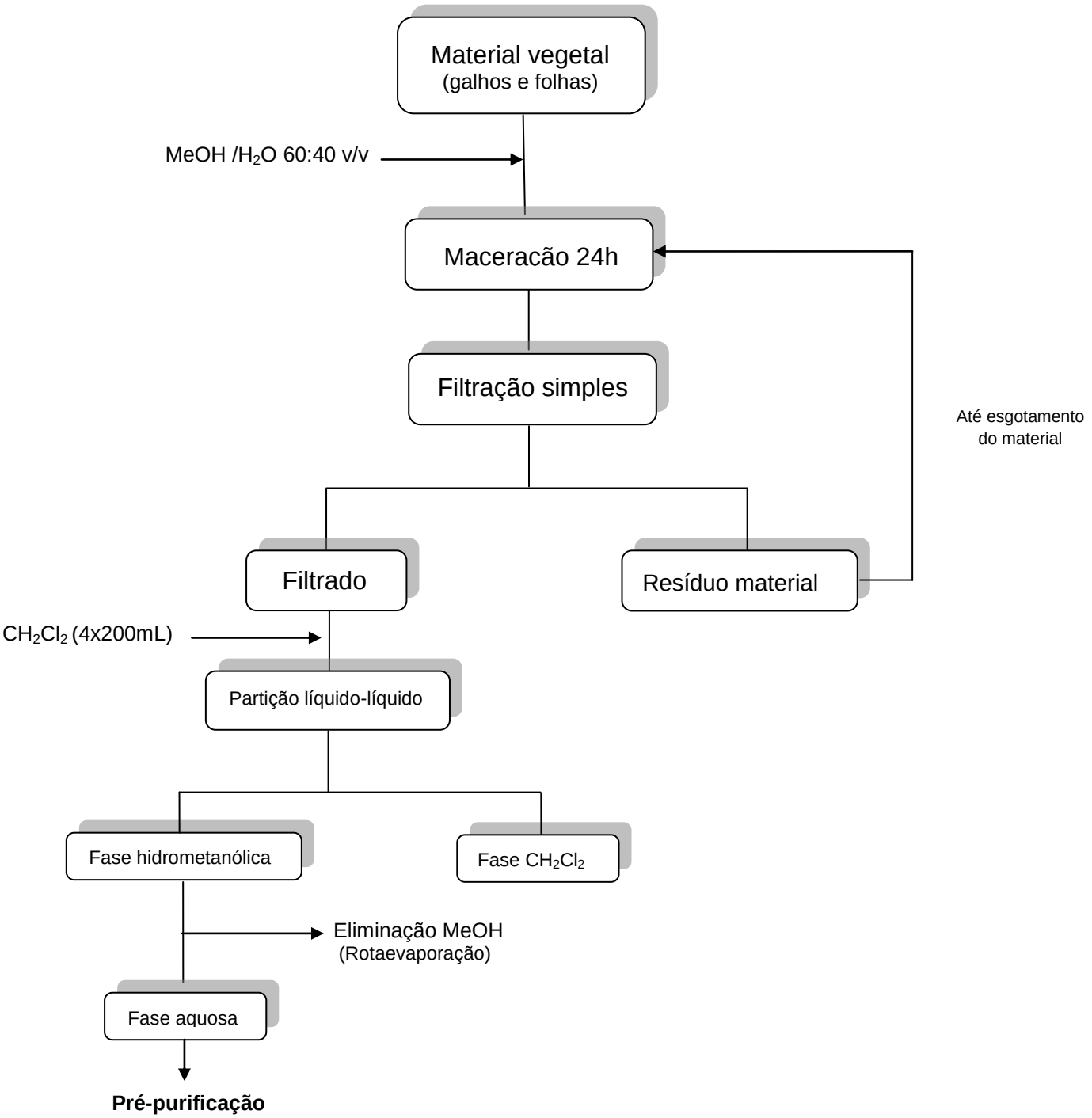
- **Fração 80% C_{18} (folhas)**
- **Fração 80% C_{18} (galhos)**

3.2 Análises do perfil das frações 80% C_{18} dos galhos e folhas obtidas na pré-purificação

3.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência analítica

Para essa análise foi empregado um cromatógrafo da marca SHIMADZU LC-20A Prominence, modo analítico, equipado com bombas LC-6AD, detector DAD SPD-M20A, injetor automático SIL-10AF, controlador CBM-20A e desgaseificador DGU-20 A_{5R}. Utilizou-se uma coluna Phenomenex Luna C_{18}, com tamanho de partícula de 5 µm, poro de 100 Å e dimensões de 250 x 4,6 mm, com programa de gradiente 34-65 % B em A em 62 minutos e vazão 1 $mL.min^{-1}$, sendo as fases móveis: Solvente A: H_2O/0,1% TFA e Solvente B: Acetonitrila (ACN) 90%/0,08%TFA.

Esquema 1. Extração do material vegetal da espécie *Noisettia orchidiflora*.



Fonte: todos os esquemas foram elaborados pelo autor

3.3 Fracionamento dos extratos de folhas e galhos

3.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência preparativa

O preparo da amostra para injeção em HPLC preparativo foi realizado dissolvendo-se 100 mg da fração 80% C_{18} (galhos), em 10 mL de uma mistura ACN/H_2O (2:8, v/v) e filtrada em membrana (PTFE Simplepure, 0,22 µm). Utilizou-se o mesmo cromatógrafo líquido descrito no item 3.2.1 porém com coluna preparativa Phenomenex Luna C_{18}, tamanho de partícula de 5 µm, poro de 100 Å e dimensões de 250 x 21,2 mm. A eluição foi feita em modo gradiente 34-65% de solvente B em solvente A por 62 min, vazão de 10 $mL.min^{-1}$, sendo as fases móveis as mesmas descritas na seção 3.2.1. Para detecção, foram monitorados os comprimentos de onda 220 nm (ligações peptídicas) e 280 nm (aminoácidos aromáticos). A coleta das amostras referentes aos picos se deu de forma manual.

Foram realizadas duas análises preparativas, sendo que as frações coletadas foram numeradas da 12-23 para análise 1 e da 24-34 para análise 2, como elencado na tabela 4 e no esquema 5 (pág. 41).

3.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência semipreparativa

O preparo da amostra para injeção em HPLC semipreparativo foi realizado dissolvendo-se 180 mg da fração 80% C_{18} (folhas), em 21 mL de uma mistura ACN/H_2O (4:6 v/v) e filtrada em membrana (PTFE Simplepure, 0,22 µm). Utilizou-se um cromatógrafo líquido da marca VARIAN® *ProStar* com os seguintes módulos: Bomba (modelo 210) e detector UV-Vis (modelo 320), além foi empregado um forno Timberline 101. A injeção foi manual por meio de válvula Rheodyne. Foi utilizada uma coluna semipreparativa Kromasil®, C_{18}, tamanho de partícula de 5 µm, poro de 300 Å e dimensões de 250 x 10 mm. A eluição foi feita em modo gradiente 5-40% em 10min, 40-48% de solvente B em solvente A por 16 min, vazão de 3,5 $mL.min^{-1}$, sendo as fases móveis as mesmas descritas na seção 3.2.1. Para detecção, foi monitorado o comprimento de onda 220 nm (ligações peptídicas). A coleta das amostras referentes aos picos se deu de forma manual.

Foram realizadas seis injeções de 300 µL cada uma, o restante da amostra foi liofilizado e o material guardado em geladeira.

3.4 Análises das frações obtidas no HPLC preparativo (Fração 80% C_{18} galhos) e semipreparativa (Fração 80% C_{18} folhas)

3.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência analítica

Cada uma das frações foi reanalisada por HPLC em escala analítica com o objetivo de comprovar a pureza das mesmas. A análise do perfil cromatográfico foi realizada em cromatógrafo líquido da marca SHIMADZU LC-20A Prominence equipado com bombas LC-20AT, detector UV-DAD SPD-M20A, injetor automático SIL-20A, controlador CBM-20A, desgaseificador DGU-20 A_3 e forno CTO-20A. Utilizou-se uma coluna: Kromasil®, C_{18}, 5 µm, 300 Å; 250 x 4,60 mm e detector DAD, monitorando os comprimentos 220 e 280 nm.

No caso das frações pertencentes aos galhos os cromatogramas foram registrados a uma temperatura de 23°C. A análise foi realizada em modo gradiente, com vazão de 1 $mL.min^{-1}$, volume de injeção de 50 µL e programa de eluição de 5-34% em 10 min, 34-49,5% de solvente B em solvente A em 31 min.

Os cromatogramas das frações advindas das folhas foram registrados a 55°C e o programa de eluição foi em modo gradiente de 5-40% em 10 min, 40-48 % de solvente B em A em 16 min, a vazão e o volume de injeção foram os mesmos empregados nas frações de galhos.

Em ambos os casos, os cromatogramas foram processados utilizando software LC-Solution e os solventes foram: Solvente A: H_2O/ TFA 0,1%; solvente B: Acetonitrila (ACN) 90%/ TFA 0,08%.

3.4.2 Espectrometria de Massas MALDI-TOF

Para a identificação, prévia da presença de ciclotídeos foi empregado um espectrômetro de massas MALDI TOF/TOF *Bruker Daltonics Ultraflex*, operando em modo refletor positivo, adquirindo de 1000-2000 pulsos por espectro. O uso desta técnica é de extrema importância, pois detecta concentrações de amostras na ordem dos femtomols (PAVIA et al., 2012).

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

No preparo das amostras (*spots*) nas placas, foi utilizada uma solução saturada de ácido α-ciano-hidroxil-cinâmico como matriz, preparada na concentração de 5 $mg.mL^{-1}$ em acetonitrila 50%. 3 µL desta matriz foram misturados com 1 µL de amostra e uma alíquota de 2 µL da mistura foi então aplicada na placa. Os espectros de massas foram adquiridos sem uso de CID (*collision-inducided dissociation*), energia do laser de 1 kV e processados no programa *Bruker Daltonics flexAnalysis*.

3.5 Otimização dos perfis cromatográficos das frações obtidas em escala preparativa

Em busca de melhorar a resolução da eluição dos compostos, a análise cromatográfica foi testada em diferentes condições de coluna, gradiente e temperatura. Para testar essas variáveis, a fração F_{20}+F_{31} foi escolhida como padrão, devido à boa quantidade de massa para os testes.

Utilizaram-se as colunas:

- Phenomenex® Luna, C_{18}, 5 µm, 100Å; 250 x 4,60 mm.
- Phenomenex® Luna, Phenyl-hexyl, 5 µm, 100Å; 250 x 4,60 mm.
- Kromasil®, C_{18}, 5 µm, 300Å; 250 x 4,60 mm

As análises foram realizadas em modo gradiente, com vazão de 1 $mL.min^{-1}$, volume de injeção de 50 µL e com os seguintes programas de eluição:

- Gradiente 5-100% de solvente B em A em 60 minutos
- Gradiente 34-65% de solvente B em A em 62 minutos
- Gradiente 34-49,5% de solvente B em A em 31 minutos
- Gradiente 20-45 % de solvente B em A em 60 minutos
- Gradiente 40-48 % de solvente B em A em 16 minutos.

As temperaturas utilizadas foram 23; 25,5; 30; 35; 45 e 55°C.

Utilizou-se o mesmo cromatógrafo líquido descrito na seção 3.4.1 e os cromatogramas foram registrados e processados utilizando software LC-Solution.

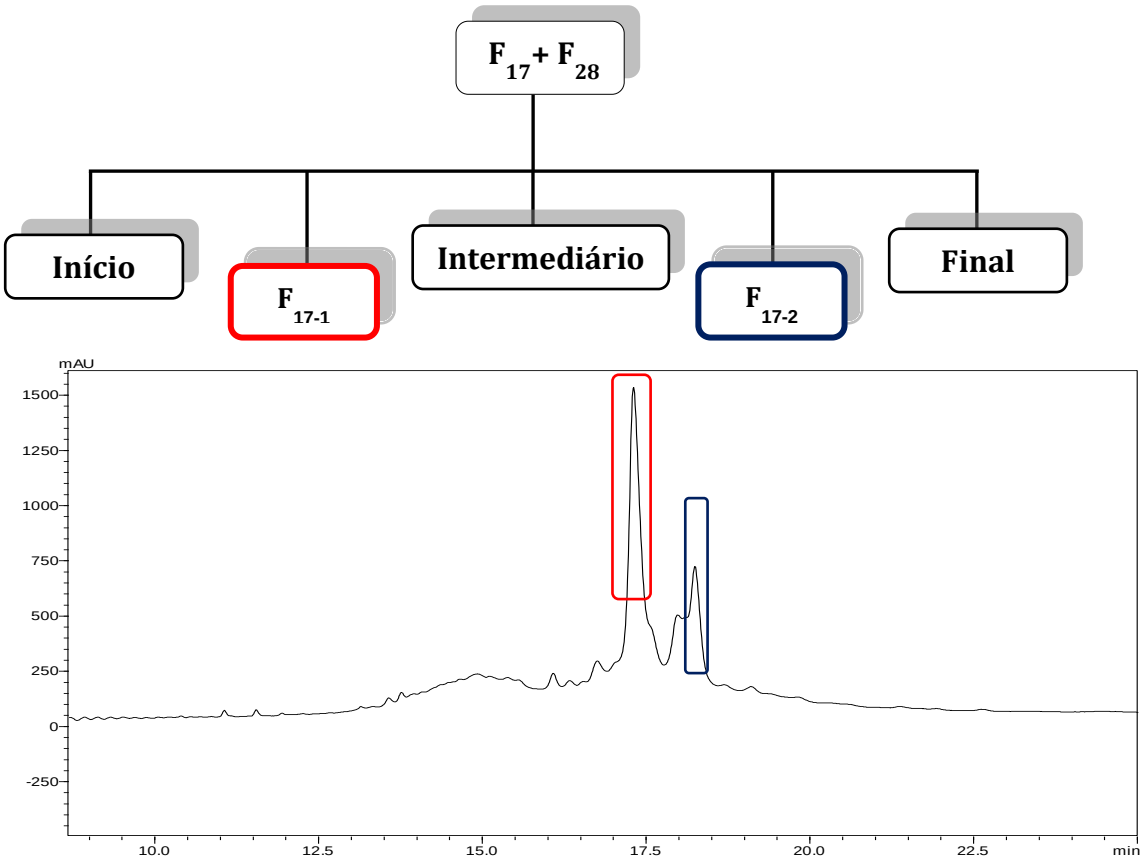
Para todos os experimentos os solventes empregados foram: solvente A: H_2O/ TFA 0,1%, solvente B: Acetonitrila (ACN) 90%/ TFA 0,08% e detector U.V monitorando à 220 nm e 280 nm.

3.6 Isolamento das substâncias

3.6.1 Substâncias F_{17-1} e F_{17-2}

O isolamento destas substâncias foi realizado via HPLC em escala analítica. O preparo da amostra para injeção foi realizado dissolvendo-se 7,1 mg da fração F_{17} + F_{28}, em 2 mL de uma mistura ACN/H_2O (2:8, v/v) e filtrada em membrana (PTFE Simplepure, 0,22 µm). Utilizou-se o mesmo cromatógrafo líquido descrito na seção 3.4.1 e coluna Kromasil®, C_{18}, com tamanho de partícula de 5 µm, poro de 300 Å e dimensões de 250 x 4,60 mm. O programa de eluição utilizado foi em modo gradiente 5-40% em 10 min, 40-48% de solvente B em A por 16 min, vazão de 1 $mL.min^{-1}$, volume de injeção de 50 µL e temperatura do forno de 55°C. A coleta das amostras correspondentes aos picos foi realizada de forma manual observando-se a detecção por U.V em 220 nm (Esquema 2).

Esquema 2. Coleta manual dos peptídeos F_{17-1} e F_{17-2} com regiões correspondentes no cromatograma HPLC.



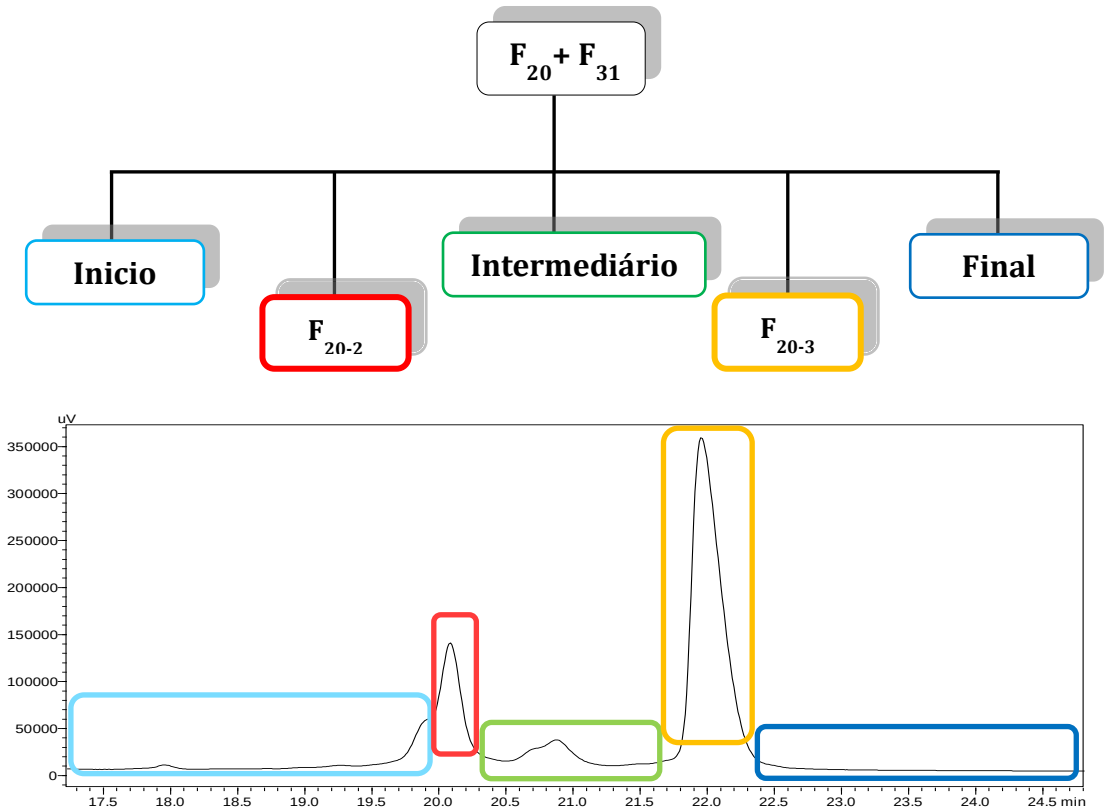
3.6.2 Substâncias F_{20-2} e F_{20-3}

O isolamento destas substâncias foi realizado também por HPLC em escala analítica, com mesmo equipamento e protocolo do item 3.6.1. O preparo da amostra para injeção foi realizado dissolvendo-se 12 mg da fração F_{20}+F_{31}, em 1 mL de uma mistura ACN/H_2O (2:8, v/v), seguida por filtração em membrana (PTFE Simplepure, 0,22 µm). A coleta dos picos se deu de forma manual conforme o esquema 3.

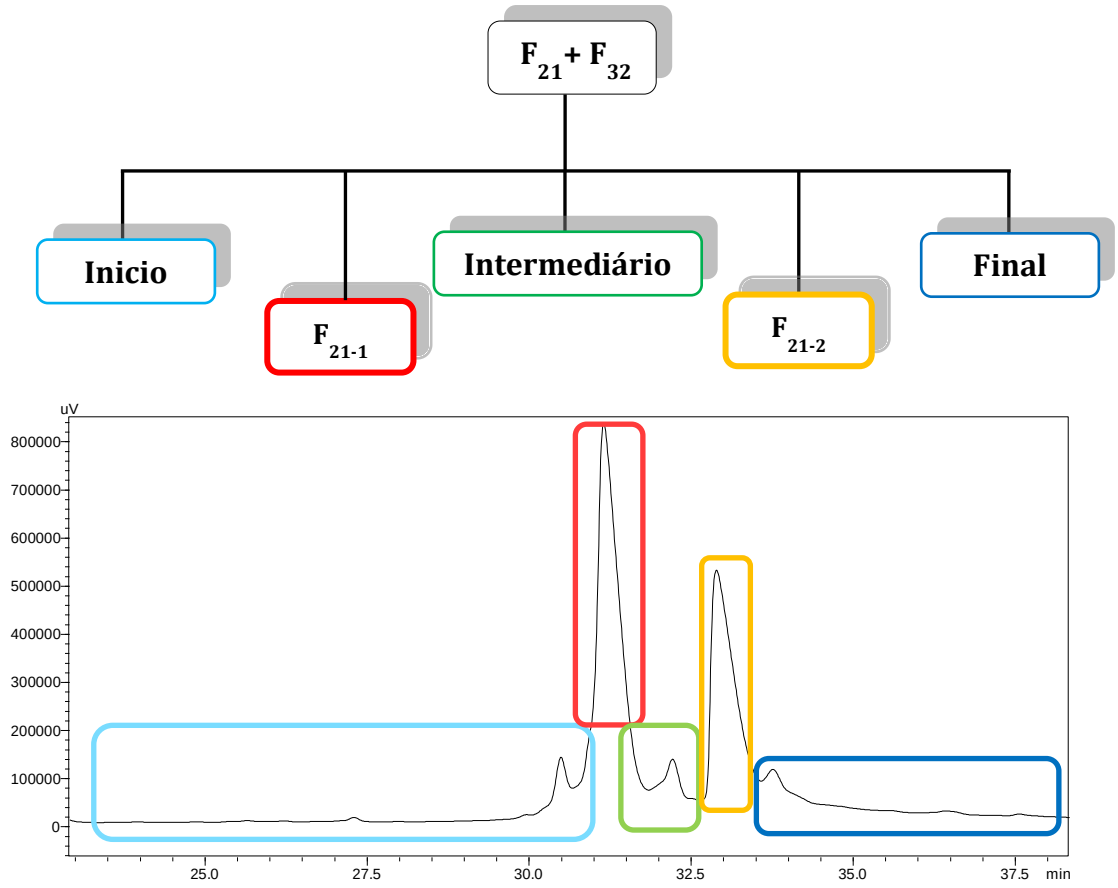
3.6.3 Substâncias F_{21-1} e F_{21-2}

O isolamento destas substâncias foi realizado também por HPLC em escala analítica, com mesmo equipamento e protocolo experimental descrito no item 3.6.1. O preparo da amostra para injeção foi realizado dissolvendo-se 8,1 mg da fração $F_{21+}F_{32}$ em 1 mL de uma mistura ACN/H_2O (2:8, v/v) seguida por filtração em membrana (PTFE Simplepure, 0,22 µm). A coleta dos picos se deu de forma manual conforme o esquema 4.

Esquema 3. Coleta manual dos peptídeos F_{20-2} e F_{20-3} com regiões correspondentes no cromatograma HPLC.



Esquema 4. Coleta manual dos peptídeos F_{21-1} e F_{21-2} com regiões correspondentes no cromatograma HPLC.



3.6.4 Substância F_{1-1}

O processo de isolamento desta substância foi realizado por HPLC em escala analítica, o equipamento, a coluna e fases móveis empregadas foram as mesmas descritas na seção 3.4.1. O preparo da amostra para injeção foi realizado dissolvendo-se 7 mg da fração F_1, em 2 mL de uma mistura ACN/H_2O (2:8, v/v), seguida por filtração em membrana (PTFE Simplepure, 0,22 µm). A coleta dos picos se deu de forma manual. Foi utilizado um programa isocrático 40% de solvente B em A durante 22 minutos, vazão de 1 $mL.min^{-1}$, volume de injeção de 50 µL e temperatura do forno de 55°C. A detecção foi feita a 220 e 280 nm.

3.6.5 Substâncias F_{3-1} e F_{3-2}

Estas substâncias foram isoladas por HPLC em escala analítica utilizando um programa em modo gradiente 25-43% de solvente B em A, com volume de injeção de 50 µL, vazão de 1 $mL.min^{-1}$ e temperatura de forno de 55℃. O equipamento utilizado foi o mesmo descrito na seção 3.4.1. O preparo de amostra foi realizado dissolvendo 3,5 mg da fração F_3, em 1 mL de uma mistura ACN/H_2O (2:8, v/v), seguida por filtração em membrana (PTFE Simplepure, 0,22 µm). Os solventes empregados foram: Solvente A: H_2O/ AF 0,1%; solvente B: Acetonitrila (ACN) 90%/ AF 0,1%.

3.7 Determinação estrutural

3.7.1 Sequenciamento *de novo*

3.7.1.1 Redução e alquilação

As reações de redução e alquilação são imprescindíveis para o sequenciamento dos ciclotídeos, pois elas clivam as ligações dissulfeto, permitindo a posterior digestão enzimática que permite identificar as partes que compõem o peptídeo.

Assim, para a redução, empregou-se uma solução 0,2 $mol.L^{-1}$ de ditiotreitol (DTT) **(B)**, em tampão de bicarbonato de amônio **(A).** Para a reação de acetamidação (alquilação), foi empregada uma solução 0,5 $mol.L^{-1}$ de iodoacetamida **(C)** diluída também em tampão amônio **(A)** (ver Tabela 2).

Enfim, para as reações, aproximadamente 1 mg das substâncias foram solubilizados em 200 µL de solução **(A)**. Uma alíquota de 20 µL desta solução foi transferida para um *eppendorf*, e adicionados a ela, 2 µL da solução **(B)**, com posterior incubação a 37°C por 30 minutos, com agitação e ausência de luz. Ao término da reação, foram adicionados 4 µL de solução **(C)**, seguido de uma nova incubação a temperatura ambiente e com agitação durante 10 minutos. Ao término, utilizou-se 1 µL de TFA 1% para parar a reação.

Tabela 2 - Soluções empregadas para as reações de redução e alquilação de ciclotídeos**.**

Solução A	Solução tampão NH_4HCO_3 0,1 mol.L^{-1}, pH 8,2-8,5
Solução B	Ditiotreitol (DTT, $C_4H_{10}O_2S_2$) 0,2 mol.L^{-1}: 3,2 mg/100 µL solução A
Solução C	Iodoacetamida (IOA, C_2H_4INO) 0,5 mol.L^{-1}: 9,25 mg/100 µL solução A

3.7.1.2 Digestão enzimática

Para digestão enzimática, cada substância foi reduzida/alquilada em triplicata conforme a seção 3.7.1.1. Porém, ao término, a reação não foi interrompida com ácido trifluoracético (TFA), mas sim, feita a adição de 1µL da solução de DTT com incubação de 10 minutos à temperatura ambiente.

Neste trabalho foram empregadas três enzimas: endoproteinase-GluC (endoGlu-C) (Promega, *sequencing grade*, V165A); tripsina (Promega, *sequencing grade*, V528A) e quimiotripsina (Promega, *sequencing grade*, V106A) preparadas a partir do material comercial liofilizado, seguindo o procedimento indicado na tabela 3.

A cada amostra reduzida e alquilada foram adicionadas uma alíquota de 2 µL de solução enzimática. As amostras foram incubadas no agitador de microplacas (Agimaxx®, modelo AG-100) com aquecimento e velocidade de agitação de 600 rpm durante 6 horas a 37°C, em ausência de luz.

Tabela 3 - Instruções de preparo das enzimas empregadas na digestão enzimática dos ciclotídeos.

Solução endoGlu-C	50 µg da enzima foram ressuspendidas em 100 µL de solução de ácido acético 0,01% (H_2O deionizada).
Solução tripsina	100 µg da enzima foram ressuspendidas em 100 µL de solução de ácido acético 50 mmol/L (H_2O deionizada).
Solução quimiotripsina	50 µg da enzima foram ressuspendidas em 50 µL de solução de ácido acético 0,01% (H_2O deionizada).

3.7.1.3 Remoção de sais (ZipTip®)

O ZipTip® (Millipore-Merck, Billerica, MA, USA) é uma ponteira de pipeta de 10 µL, contendo em sua extremidade fase estacionária C_{18}, muito utilizada na purificação e concentração de peptídeos e proteínas.

Esta etapa de limpeza da amostra, após a digestão enzimática, é fundamental, pois possibilita a obtenção de espectros de massas de qualidade, caso contrário, a presença de sais na amostra impediria a correta ionização das substâncias. O procedimento consta de três etapas, que foram repetidas 5 vezes para cada substância.

1. Acondicionamento do ZipTip®
2. Ligação e lavagem do peptídeo
3. Eluição do peptídeo

As soluções empregadas estão elencadas na tabela 4.

Para o acondicionamento do ZipTip®, etapa 1, foram utilizados 7 µL da solução **(I)**, seguido de 7 µL da solução **(II),** por três vezes.

Na segunda etapa foram feitas sete ciclos aspiração/dispensação da solução peptídica, tendo como intuito a ligação dos peptídeos no ZipTip®, depois foram empregados 14 µL (2x7µL) da solução **(II)**, para remoção das sais.

Uma vez concluída a etapa anteriormente descrita, foi realizada a eluição do peptídeo, para tanto, foram utilizados 7 µL da solução **(III).**

Tabela 4 - Soluções empregadas no procedimento ZipTip®

Solução (I)	100% ACN
Solução (II)	0,1% TFA em H_2O deionizada
Solução (III)	80% ACN em H_2O deionizada/ 0,1% TFA

Protocolo comercial disponível junto ao produto.

3.7.1.4 Sequenciamento por Espectrometria de Massas MALDI-TOF MS/MS

Utilizou-se o mesmo espectrômetro descrito na seção 3.4.2, porém neste experimento foram aplicados o modo MS/MS e LIFT (*Laser Induced Fragmentation Technique*)

3.7.2 Análise de aminoácidos

Com a finalidade de ampliar a informação sobre os aminoácidos que constituem os ciclotídeos isolados, foi realizada a hidrólise dos peptídeos e posterior identificação e quantificação dos aminoácidos pelo método cromatográfico de troca iônica usando HPLC com derivatização pós-coluna por orto-ftalaldeído (OPA), com detecção por fluorescência. O procedimento foi realizado no Laboratório de Sínteses de Peptídeos do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química de Araraquara, Unesp.

3.7.2.1. Hidrólise

Antes da injeção no cromatógrafo, 0,2 -0,5 mg de cada ciclotídeo isolado, foram hidrolisados adicionando-lhes 500 µL de HCl 6 $mol.L^{-1}$ e 80 µL de uma solução 5% de fenol em água. As misturas foram agitadas durante 72 h, a 110 °C, sob atmosfera de N_2. Ao término do tempo estipulado, o material foi concentrado à vácuo até a secagem completa, redissolvido em 500 µL de solução tampão de citrato de sódio pH 2,2 e, subsequente, filtração com unidade filtrante GV Millex-Millipore. Os aminoácidos oriundos da hidrólise foram então injetados no cromatógrafo.

3.7.2.2. Análise cromatográfica dos aminoácidos oriundos da hidrólise

Esta análise foi conduzida empregando o equipamento Shimadzu LC-10A/C-47A, com analisador automático, coluna Shim-pack ISC-07/S1504 Na, sendo as fases móveis:

- Solvente A Citrato de sódio 0,2 mol.L^{-1}, pH 3,2 (contendo 3% etanol)
- Solvente B Citrato de sódio 0,6 mol.L^{-1} e ácido bórico 0,6 mol/L, pH 10,0
- Solvente C Hidróxido de sódio 0,2 mol.L^{-1}

Para a reação de derivatização pós-coluna foram utilizadas as soluções:

- 0,4 mL de solução de hipoclorito de sódio comercial/ 1L de tampão alcalino
- 0,8 g de orto-ftalaldeído/ 14 mL de etanol; 0,4 g de polioxietileno lauril éter (Brij-35), 1g de N-acetilcisteína e adicionar tampão alcalino (solução de carbonato de sódio 0,384 mol.L^{-1}, ácido bórico 0,216 mol.L^{-1} e sulfato de potássio 0,108 mol.L^{-1}) até completar volume de 1 L.

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção dos extratos

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

Assim, após adição da solução extratora (MeOH/H_2O, 60:40, v/v) foram realizadas sucessivas macerações de 24 h cada, até esgotamento do material.

Com a finalidade da remoção de compostos de baixa polaridade da solução extraída, foi realizada uma partição líquido-líquido com DCM (diclorometano), o que resultou em uma fração hidrometanólica pobre em compostos apolares. Nesta etapa, compostos hidrofóbicos como lipídios, clorofilas e substâncias de baixa massa molecular como fenilpropanóides, terpenóides entre outros, migram para a fase diclorometano, sendo então separados. Os ciclotídeos e polipeptídios em geral não são solúveis em DCM (PINTO, 2012).

4.2 Pré-purificação

A fase polar - hidrometanólica - gerada na partição liquido-liquido- pode conter, junto com os ciclotídeos, substâncias como polifenóis, taninos, flavonóides, catequinas, açúcares, entre outros (CLAESON et al., 1998); estes são interferentes e podem gerar falsos positivos nas análises.

Diante desse problema, se fez necessário a pré-purificação dessa fase por cromatografia em coluna de fase reversa, de acordo o item 3.1.2. Para isso, se fez necessário a remoção do metanol através do uso de evaporador rotativo, o que permitiu a obtenção da fase aquosa. Alguns peptídeos, em especial os ciclotídeos, possuem um caráter anfifílico o que os fazem interagir com as cadeias da fase estacionária C_{18} por interações hidrofóbicas, precisando de uma polaridade mais baixa da fase móvel para serem eluídos, em comparação com os compostos interferentes ditos acima. Assim, nesta fase do trabalho foram obtidas as frações ricas em peptídeos, as mesmas serão consideradas os extratos iniciais:

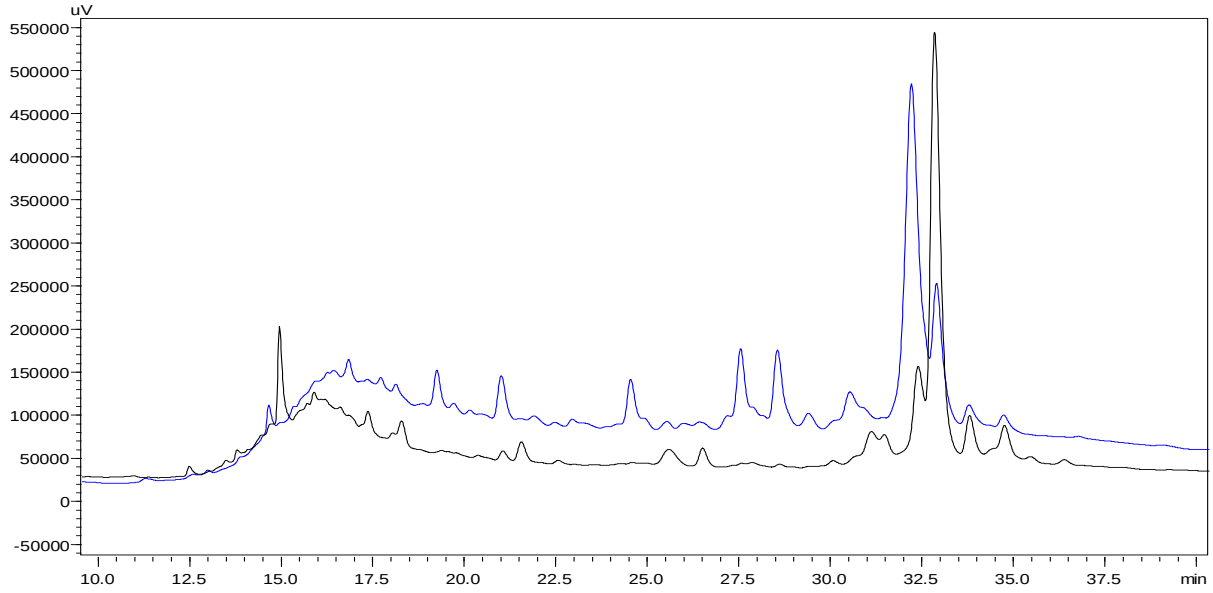
- **Extrato de Folhas (Fração 80% C_{18}).....**(208 mg)
- **Extrato de Galhos (Fração 80% C_{18}).....**(213 mg)

4.3 Análises dos extratos obtidos na pré-purificação

Os perfis analíticos das duas frações ricas em peptídeos (folhas e galhos) apresentaram diversos picos eluindo na faixa característica de ciclotídeos (50-70% de solvente B em A) e absorvendo em 220 nm, característica de ligações peptídicas.

Com isso, é possível prever a complexidade e a quantidade de peptídeos em cada fração, o que direcionou o início dos estudos à fração de galhos, devido à aparente maior diversidade apresentada por HPLC analítico (Figura 9).

Figura 9 - Comparação dos cromatogramas dos extratos de folhas (preto) e galhos (azul) da espécie *Noisettia orchidiflora.*
Programa: Gradiente 34-65% B em A em 62 min, 1 mL.min^{-1}, 50 µL, temperatura ambiente, 220 nm.
Coluna: Phenomenex® Luna, C_{18}, 250 x 4,60 mm,100 Å.



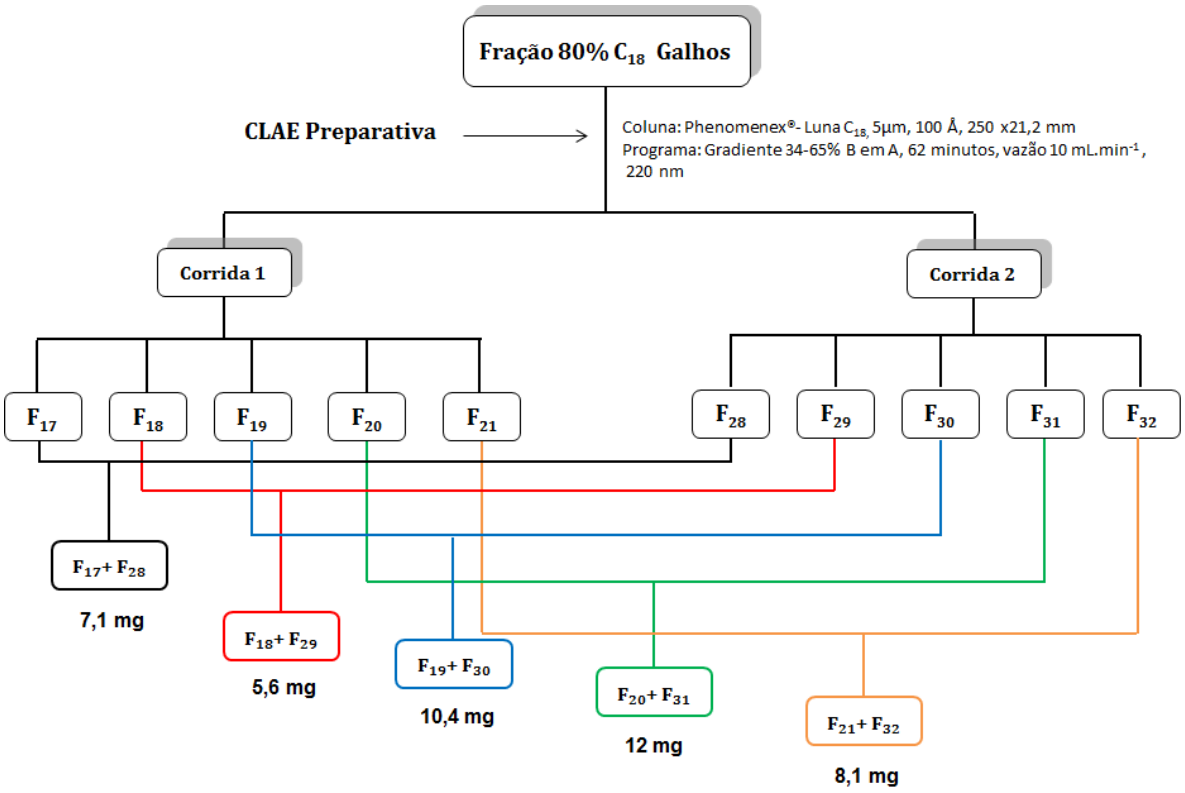
4.4 Fracionamento do extrato de galhos (fração 80% C_{18} galhos)

Após análise preparativa, foram coletadas manualmente 12 frações da análise 1 e 11 da análise 2 (Tabela 5). Essas frações foram reanalisadas por HPLC em escala analítica e espectrometria de massas MALDI-TOF, de acordo o item 3.4, sendo as mais promissoras em termos de pureza e quantidade, escolhidas para dar prosseguimento ao estudo. Comparando-se as duas análises, frações com mesmo perfil cromatográfico de eluição e *m*/*z*, foram reunidas (Esquema 5).

Tabela 5 - Massas obtidas no HPLC preparativo para as frações advindas de galhos de *N. orchidiflora*.

Análise #1		Análise #2	
Fração	**Massa (mg)**	**Fração**	**Massa (mg)**
F_{12}	5,2	F_{24}	2,7
F_{13}	2,7	F_{25}	3,7
F_{14}	4,2	F_{26}	2,2
F_{15}	3,0	F_{27}	3,0
F_{16}	2,3	F_{28}	4,6
F_{17}	2,5	F_{29}	2,6
F_{18}	3,0	F_{30}	3,9
F_{19}	6,5	F_{31}	5,0
F_{20}	7,6	F_{32}	3,1
F_{21}	5,0	F_{33}	2,5
F_{22}	4,0	F_{34}	2,2
F_{23}	3,0		

Esquema 5 - Fracionamento do extrato de galhos por HPLC preparativo.



4.5 Análises das frações de galhos de *N. orchidiflora*, pós-preparativa

4.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência analítica

Cada uma das frações foi reanalisada por HPLC analítico com o objetivo de comprovar a pureza das mesmas sob as condições descritas no item 3.4.1.

A análise do perfil cromatográfico permitiu observar que as mesmas encontravam-se impuras, mas com certa facilidade de purificação, pois em todas elas destacava-se a presença de um composto majoritário.

Aqui são apresentados os cromatogramas das frações F_{17}, F_{18}, F_{20} e F_{21} (Figuras 10-13), considerando que estas apresentaram maior massa e pureza e, portanto foram escolhidas para prosseguimento do estudo.

Figura 10 - Cromatograma da fração F_{17}.
Programa: Gradiente 5-34% em 10 min, 34-49,5 % B em A em 31 min, 1 mL.min^{-1}, 23 °C.
Coluna: Kromasil®, C_{18}, 5 µm, 300 Å; 250 x 4,60 mm, 220 nm.

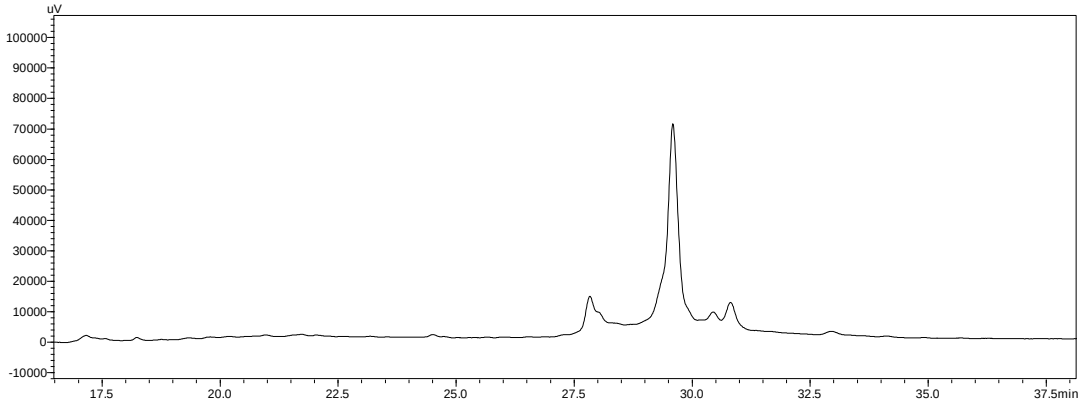


Figura 11 - Cromatograma da fração F_{18}.
Programa: Gradiente 5-34% em 10 min, 34-49,5 % B em A em 31 min, 1 mL.min^{-1}, 23 °C.
Coluna: Kromasil®, C_{18}, 5 µm, 300 Å; 250 x 4,60 mm, 220 nm.

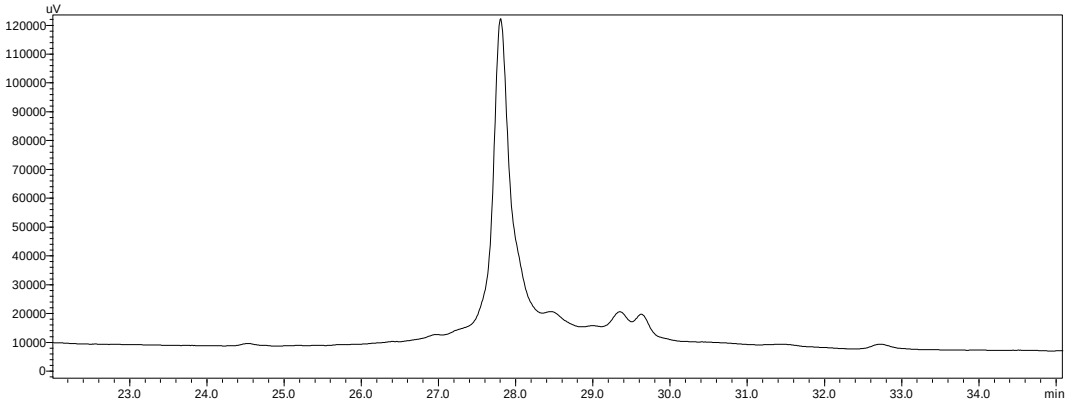


Figura 12 - Cromatograma da fração F_{20}.
Programa: Gradiente 5-34% em 10 min, 34-49,5 % B em A em 31 min, 1 mL.min^{-1}, 23 °C.
Coluna: Kromasil®, C_{18}, 5 µm, 300 Å; 250 x 4,60 mm, 220 nm.

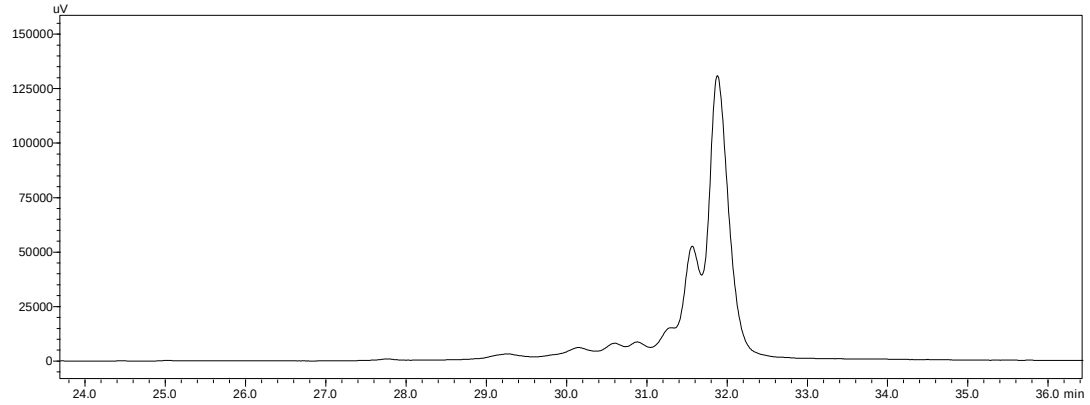
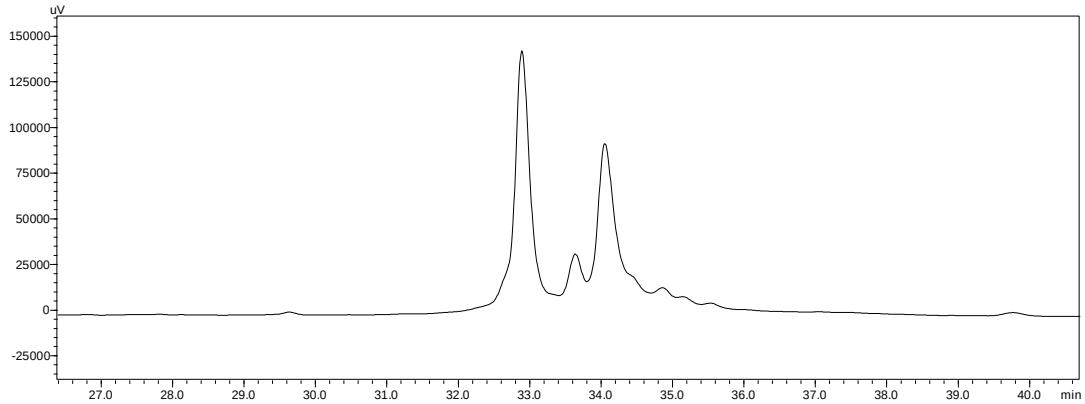


Figura 13 - Cromatograma da fração F_{21}.
Programa: Gradiente 5-34% em 10 min, 34-49,5 % B em A em 31 min, 1 mL.min^{-1}, 23 °C.
Coluna: Kromasil®, C_{18}, 5 µm, 300 Å; 250 x 4,60 mm, 220 nm.



4.5.2 Espectrometria de Massas MALDI-TOF

O intuito neste experimento era comprovar a complexidade das frações analisadas na seção anterior, pois nos ciclotídeos é muito frequente o fenômeno da coeluição, ou seja, que mesmo apresentando perfis cromatográficos relativamente simples (Figuras 10-13) é bem provável que a quantidade de compostos presentes seja bem maior. Para a análise foi empregado o espectrômetro descrito na seção 3.4.2.

Ciclotídeos possuem massas na faixa de 2500 a 4000 Da, logo, por esta técnica, foi possível comprovar a existência desses compostos analisando essa faixa de massas no espectro. A análise por MALDI foi realizada para todas as frações oriundas da preparativa e todas demonstraram sinais na faixa de interesse,

indicando a presença de ciclotídeos. Aquelas com maior grau de pureza foram consideradas para prosseguimento dos estudos de sequenciamento (Figura 14-17).

No espectro de massas da fração F_{17} (Figura 14) observou-se o sinal da substância com *m/z* 3249,402 Da, além de outras elencadas na tabela 6. No caso da fração F_{18} (Figura 15) o espectro de massa mostrou maior diversidade/complexidade quando comparado ao da fração F_{17}, pois foi observado o pico base *m*/*z* 3184,314 Da e também o íon *m*/*z* 3249,359 além de outros, como mostrado na tabela 6 da página 46.

O espectro de massas da fração F_{20} apresentou um íon *m/z* 3282,339 (correspondente ao majoritário) e na fração F_{21} sinais *m/z* 3193,240 e 3282,780. Apesar de F_{20} e F_{21} apresentarem dois íons similares de *m/z* 3282, acredita-se que são dois ciclotídeos diferentes, o que pode ser afirmado com base nos diferentes tempos de retenção e também na massa de alta resolução.

Assim, apesar de apresentarem bom grau de pureza, as frações F_{17}, F_{18}, F_{20} e F_{21} também apresentaram sinais com menores intensidades, referentes a outros ciclotídeos, o que demonstra a necessidade de uma repurificação das frações (Tabela 6, pág. 46).

Figura 14 - Espectro de massas obtido por MALDI - (+) - TOF - MS da fração F_{17}.

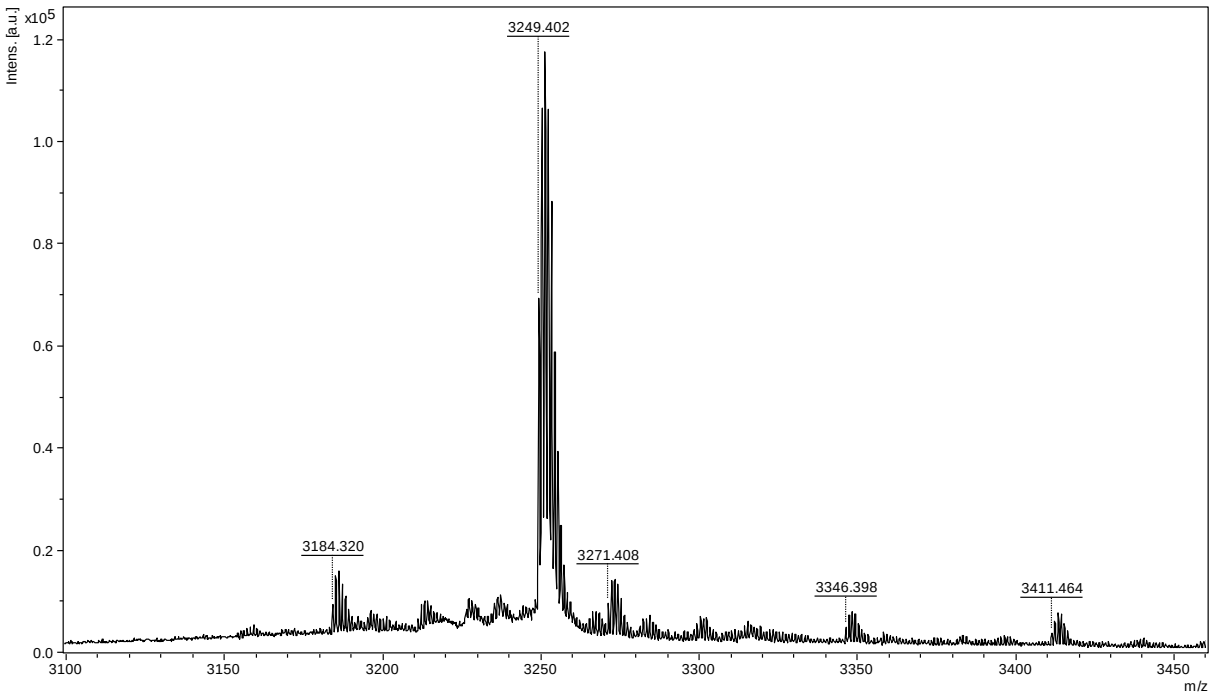


Figura 15 - Espectro de massas obtido por MALDI- (+) - TOF- MS da fração F_{18}.

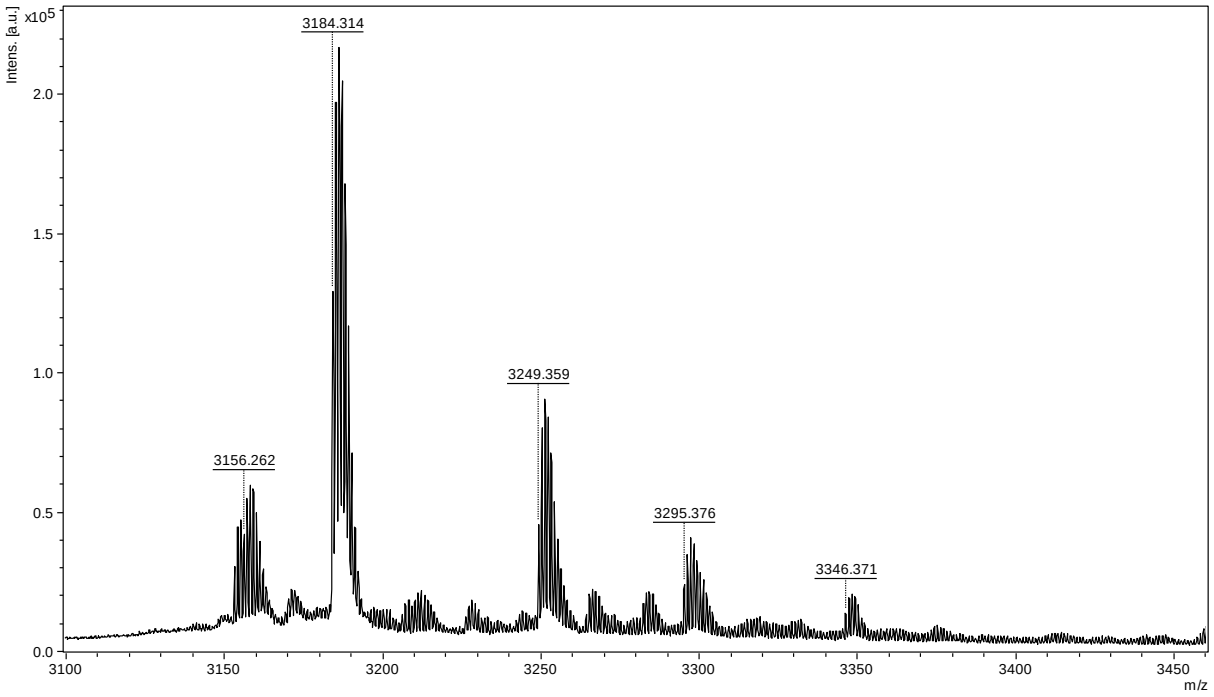


Figura 16 - Espectro de massas obtido por MALDI - (+) - TOF - MS da fração F_{20}.

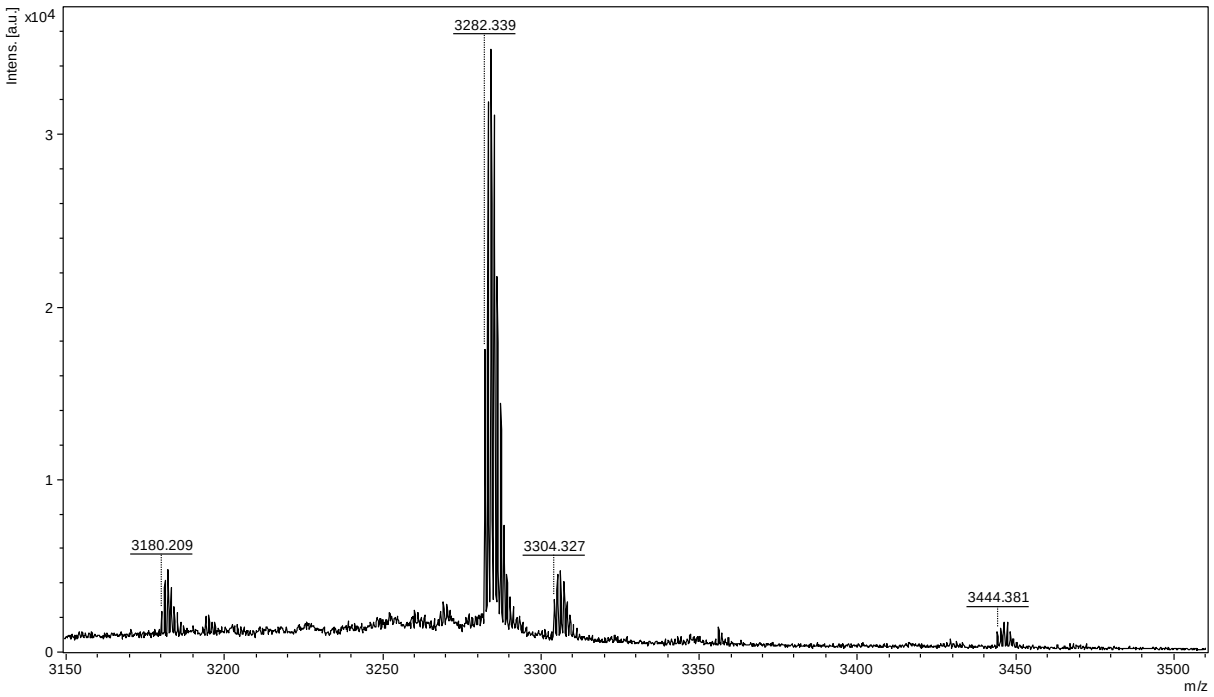


Figura 17 - Espectro de massas obtido por MALDI - (+) - TOF - MS da fração F_{21}.

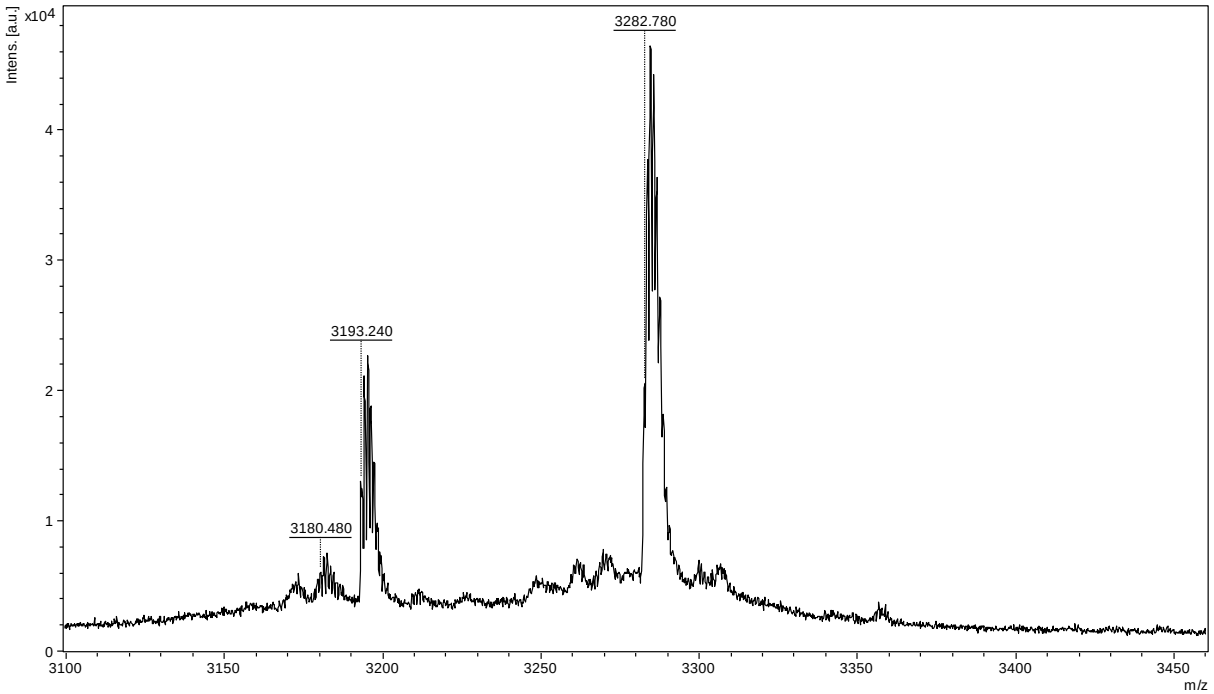


Tabela 6 - Lista de sinais (*m/z*) de algumas das frações oriundas da preparativa do extrato de galhos (Fração 80% C_{18} galhos)

Frações	*m/z*	*m/z*	*m/z*	*m/z*	*m/z*
F_{17}	3249,402	3184,320	3271,408	3346,398	3411,464
F_{18}	3184,314	3249,359	3156,262	3295,376	3346,371
F_{20}	3282,339	3180,209	3304,327	3444,381	-
F_{21}	3282,780	3193,240	3180,480	-	-

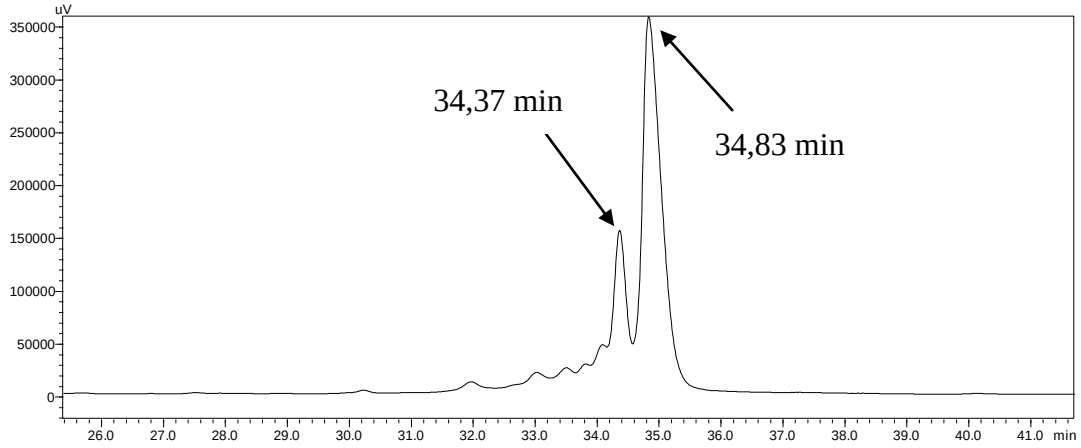
Fonte: Elaborada pelo autor

4.6 Otimização dos perfis cromatográficos das frações obtidas na preparativa

Com intuito de melhorar a resolução dos cromatogramas das frações obtidas, foram testadas diferentes variáveis (coluna, diferindo a fase estacionária e o tamanho de poro, porcentagem do solvente B e temperatura) (ver item 3.5). De todos os pontos investigados, foi observada uma expressiva melhora na resolução dos picos e, portanto da separação dos compostos, com a mudança de temperatura, especificamente, com o aumento da temperatura do leito cromatográfico, que pode ser exemplificado pela fração F_{20}+F_{31} (Figuras 18-23). As outras condições testadas não mostraram melhoras na resolução e, portanto não serão mostradas neste trabalho.

Se compararmos os cromatogramas obtidos a 25,5 e 35°C (Figura 20), pode-se observar uma mudança significativa no perfil cromatográfico, pois, além da melhoria obtida na resolução dos picos, também se observa uma mudança significativa dos tempos de retenção.

Figura 18 - Cromatograma da fração F_{20}+F_{31}.
Programa: Gradiente 5-40% em 10 min, 34-49,5 % B em A em 31 min, 1 mL.min^{-1}, 25,5 °C, 220 nm.
Coluna: Kromasil®, C_{18}, 5 µm, 300 Å; 250 x 4,60 mm.



O resultado obtido anteriormente nos permitiu fazer um estudo da variação do perfil cromatográfico com a mudança da temperatura (figuras 19-24).

Figura 19 - Cromatograma da fração F_{20}+F_{31}.
Programa: Gradiente 5-34% em 10 min, 34-49,5 % B em A em 31 min, 1 mL.min^{-1}, 30 °C, 220 nm.
Coluna: Kromasil®, C_{18}, 5 µm, 300 Å; 250 x 4,60 mm.

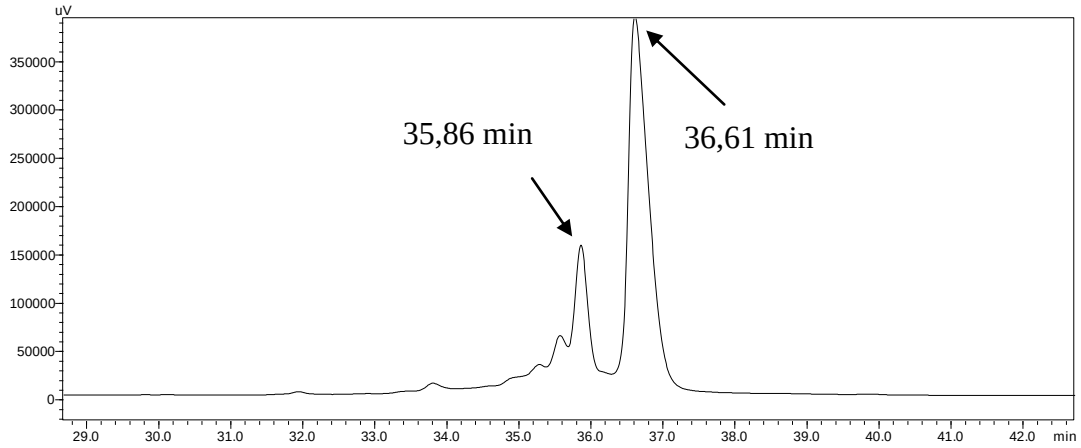


Figura 20 - Comparação dos cromatogramas da fração F_{20}+F_{31}. Temperatura: 25.5°C (preto) e 30°C (azul).

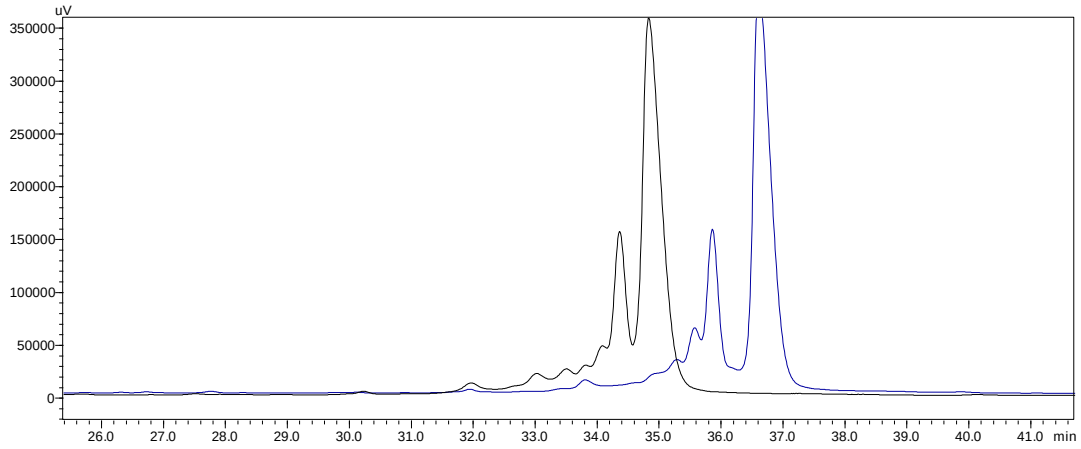


Figura 21 - Cromatograma da fração F_{20}+F_{31}.
Programa: Gradiente 5-34% em 10 min, 34-49,5 % B em A em 31 min, 1 mL.min^{-1}, 35 °C, 220 nm.
Coluna: Kromasil®, C_{18}, 5 µm, 300 Å; 250 x 4,60 mm.

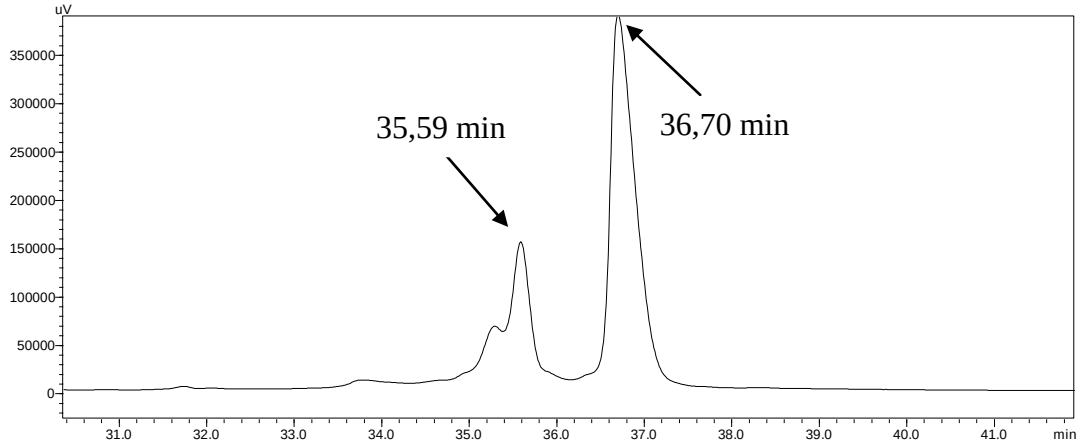


Figura 22 - Cromatograma da fração F_{20}+F_{31}.
Programa: Gradiente 5-34% em 10 min, 34-49,5 % B em A em 31 min, 1 mL.min^{-1}, 45 °C, 220 nm.
Coluna: Kromasil®, C_{18}, 5 µm, 300 Å; 250 x 4,60 mm.

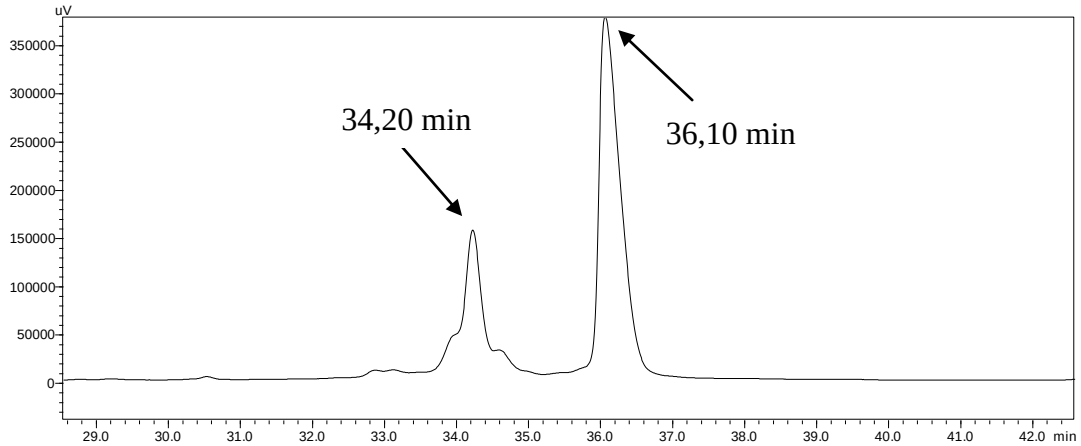


Figura 23 - Cromatograma da fração F_{20}+F_{31}.
Programa: Gradiente 5-34% em 10 min, 34-49,5 % B em A em 31 min, 1 mL.min^{-1}, 55 °C, 220 nm.
Coluna: Kromasil®, C_{18}, 5 µm, 300 Å; 250 x 4,60 mm.

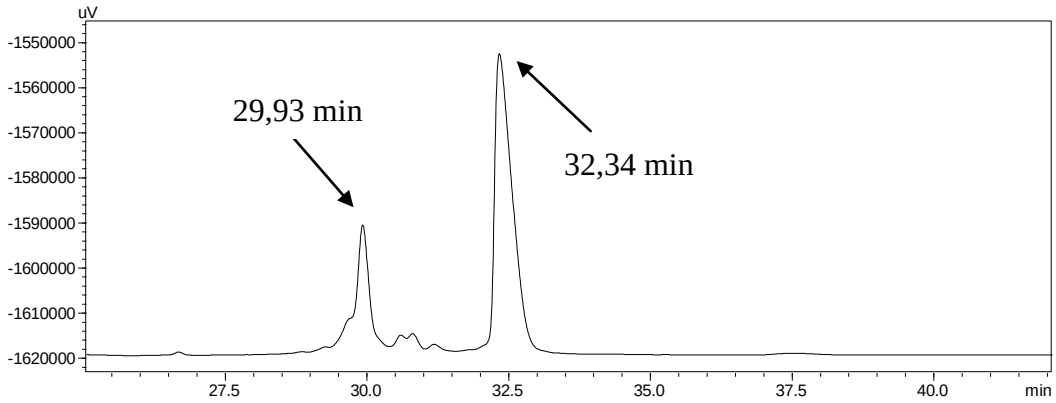
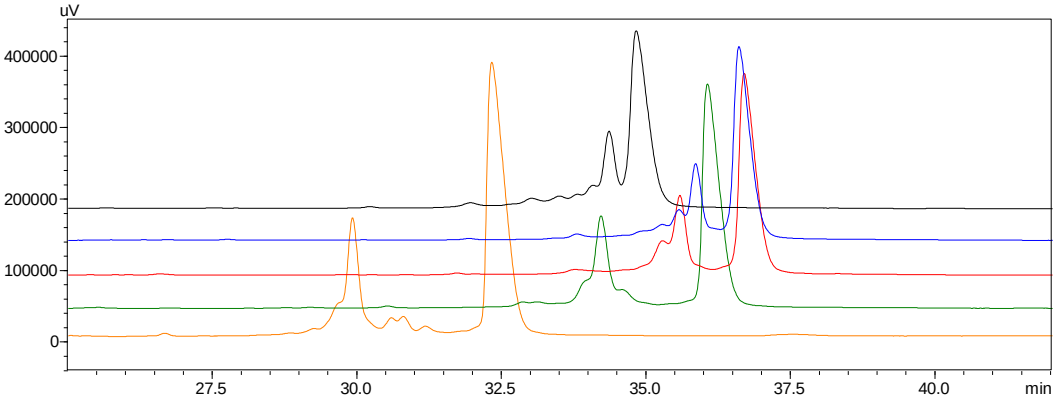


Figura 24 - Comparação dos cromatogramas da fração F_{20}+F_{31}. Temperatura: 25.5 °C (preto), 30 °C (azul), 35 °C (vermelho), 45 °C (verde) e 55 °C (laranja).



Este estudo demonstrou que fazendo mudanças na temperatura é possível melhorar o perfil cromatográfico da fração F_{20}+F_{31}, chegando a ter melhorias significativas na resolução dos picos (Tabela 7), tendo em consideração que para este tipo de compostos está reportado um comportamento complexo no que se refere à separação desses compostos (BURMAN et al., 2014), saber que é necessário otimização dos parâmetros temperatura é algo de relevância para os estudos de separação dessas promissoras moléculas.

Tabela 7 - Resumo dos tempos de retenção (Tr) obtidos no estudo de otimização da fração F_{20}+$F_{31.}$

Experimento	Temperatura (°C)	Tr/min. Pico # 1	Tr/min. Pico # 2	ΔTr/min.
1	23,00	31,58	31,85	0,27
2	25,50	34,37	34,83	0,46
3	30,00	35,86	36,61	0,75
4	35,00	35,59	36,70	1,11
5	45,00	34,20	36,10	1,90
6	55,00	29,93	32,34	2,41

Baseados neste estudo chegou-se à conclusão que a melhor temperatura para realizar os experimentos era 55℃, pois, com ela obteve-se a melhor separação cromatográfica e resolução das substâncias. Essa metodologia foi extrapolada para as demais frações e para o extrato de folhas.

4.7 Análises das substâncias isoladas a partir das frações obtidas no HPLC preparativo do extrato de galhos de *N. orchidiflora*.

Uma vez otimizadas, as frações foram submetidas a purificação seguindo as condições descritas na seção 3.6. O procedimento permitiu a obtenção de seis substâncias puras: $F_{17\text{-}1,}$ $F_{17\text{-}2,}$ $F_{20\text{-}2,}$ $F_{20\text{-}3,}$ $F_{21\text{-}1}$ e $F_{21\text{-}2.}$ Estas foram encaminhadas para reações de redução/alquilação e digestão enzimática com posterior análise por Espectrometria de Massas MALDI-TOF/TOF, para seu sequenciamento. De todas as seis substâncias, $F_{17\text{-}2}$ e $F_{21\text{-}2,}$ não foram totalmente sequenciadas, fazendo-se necessários mais estudos para o seu completo sequenciamento. Logo, são mostrados aqui os perfis cromatográficos e de massas desses compostos, como segue descrito nos itens 4.7.1 e 4.7.2.

4.7.1 Substância $F_{17\text{-}2}$

A substância $F_{17\text{-}2}$ foi obtida como um sólido branco, seu cromatograma HPLC mostrou um pico em 44,69 minutos (Figura 25). Seu espectro de massas apresentou um íon *m*/z 3184,358 (Figura 26). O espectro de massas da substância reduzida e alquilada permitiu conferir um acréscimo de 348 Da, confirmando a presença de seis resíduos de cisteína (Figura 27).

Figura 25 - Cromatograma da substância $F_{17\text{-}2.}$
Programa: Gradiente 20-45% B em A em 60 min, 1 $mL.min^{-1}$, 55°C, 50 µL, 220 nm.

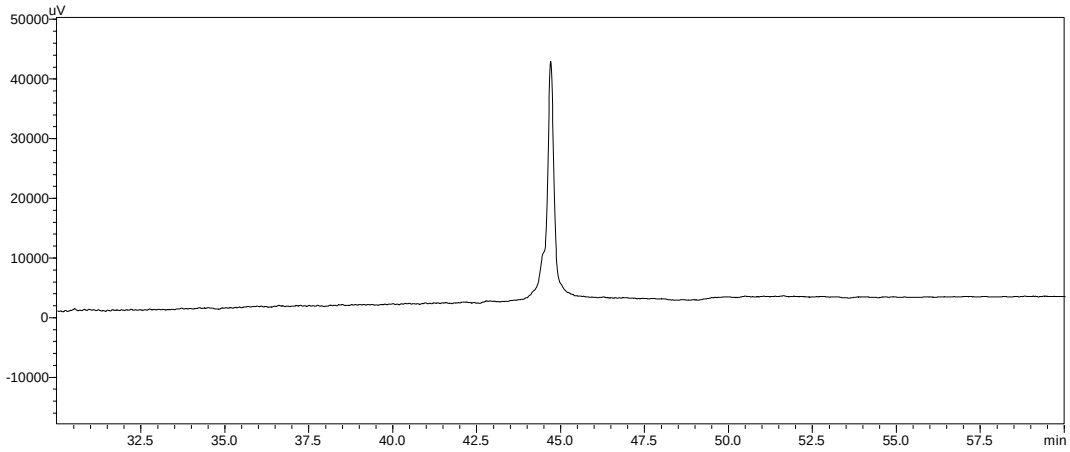


Figura 26 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{17\text{-}2.}$

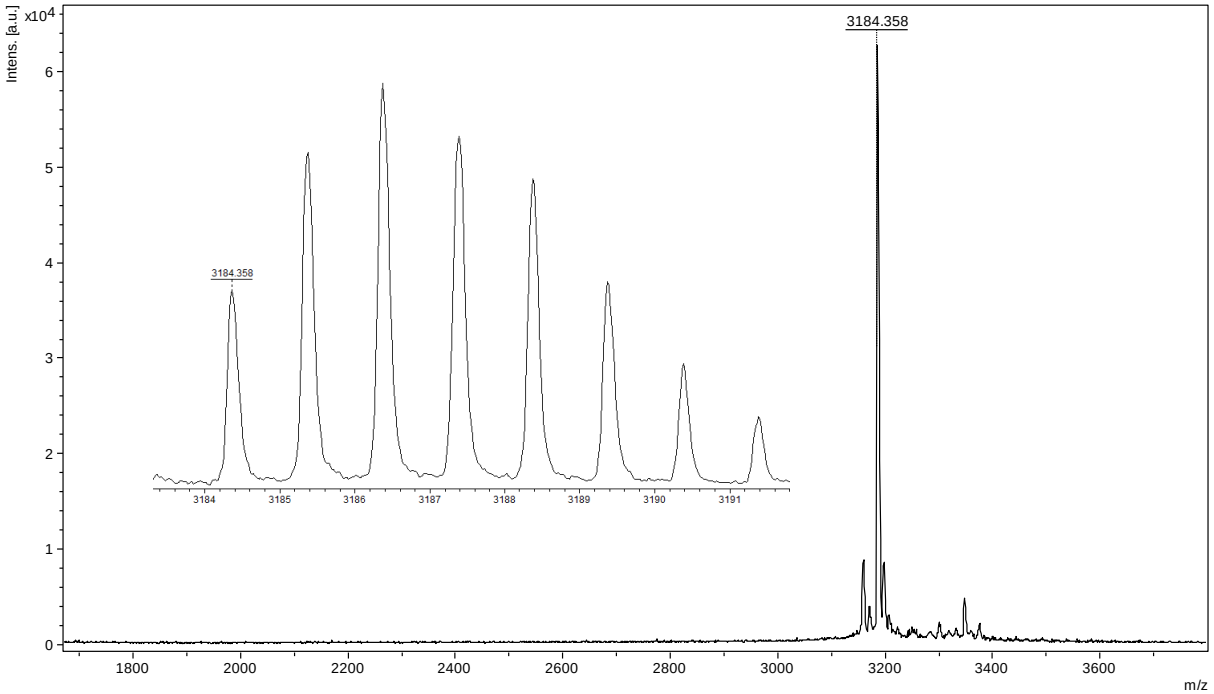
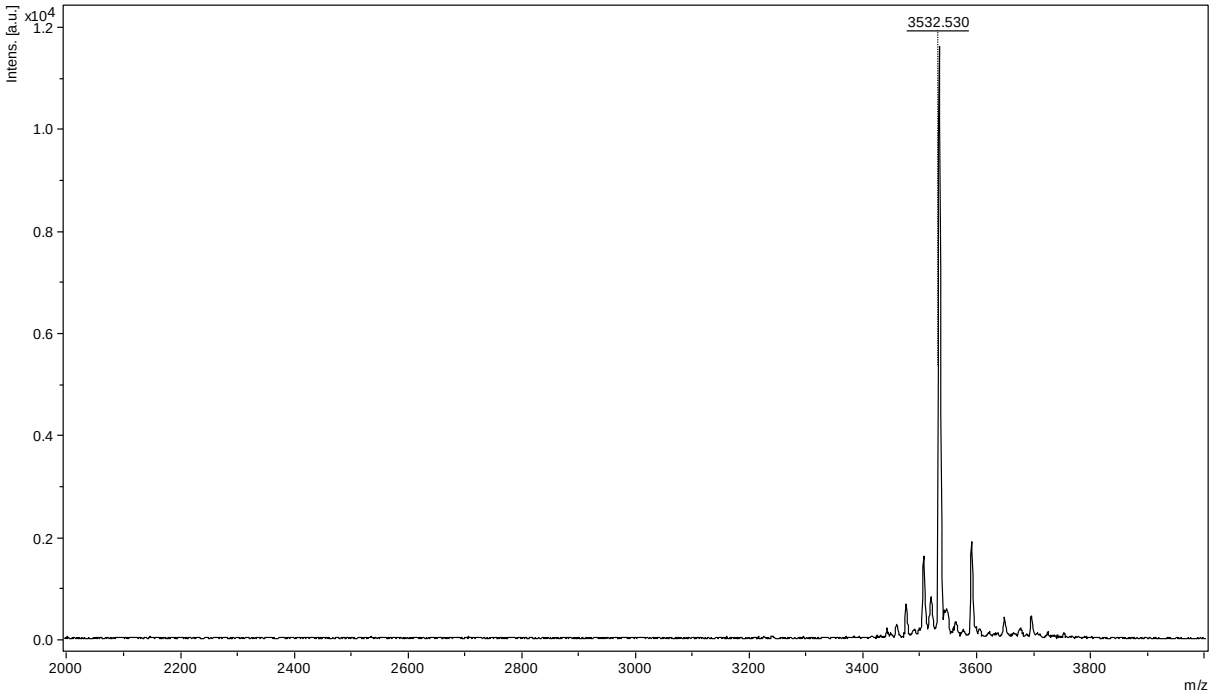


Figura 27 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{17-2} reduzida e alquilada.



4.7.2 Substância F_{21-2}

A substância F_{21-2} foi obtida como um sólido branco, seu cromatograma mostrou um único pico em 52,79 minutos (Figura 28). Seu espectro de massas apresentou um íon *m*/z 3282,509 (Figura 29). A confirmação da presença dos seis resíduos de cisteína, característicos dos ciclotídeos, foi obtida por meio da análise por espectrometria de massas MALDI-TOF-MS da amostra reduzida e alquilada (Figura 30).

Figura 28 - Cromatograma da substância $F_{21\text{-}2}$.
Programa: Gradiente 20-45% B em A em 60 min, 1 mL.min^{-1}, 55°C, 50 µL, 220 nm.

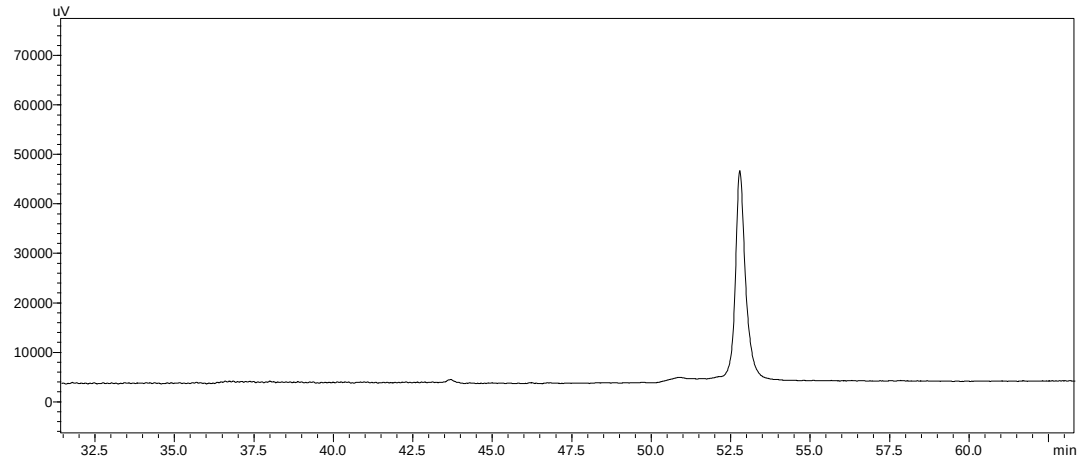


Figura 29 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{21\text{-}2}$.

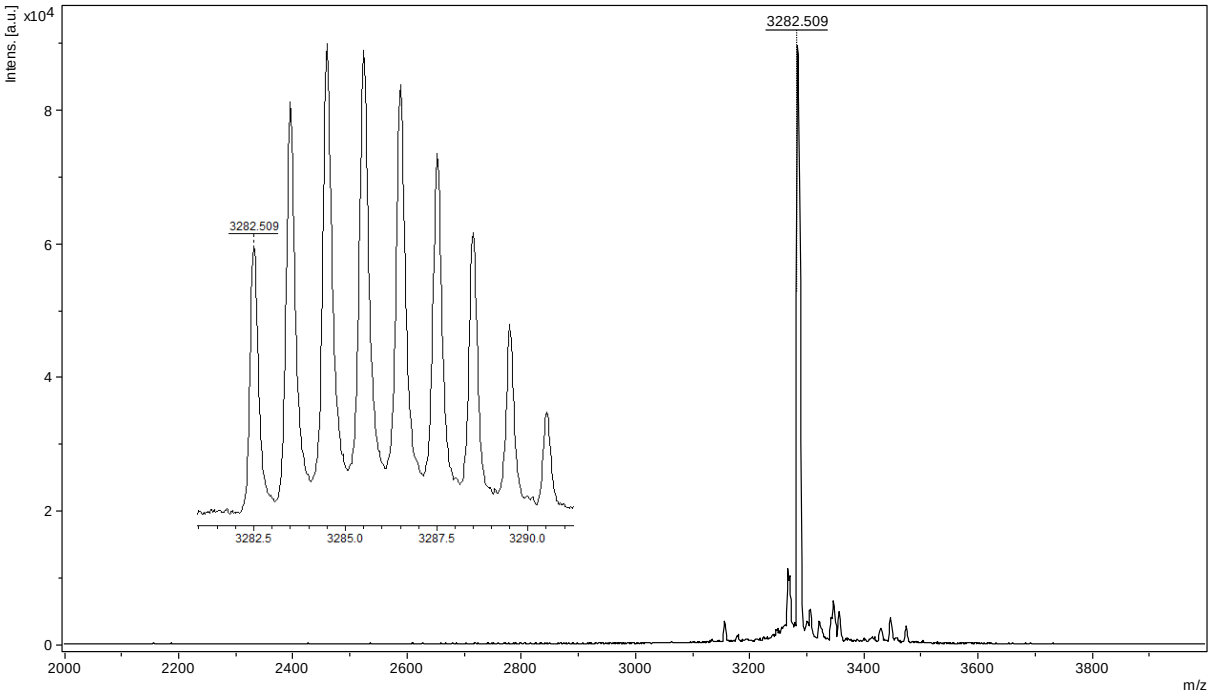
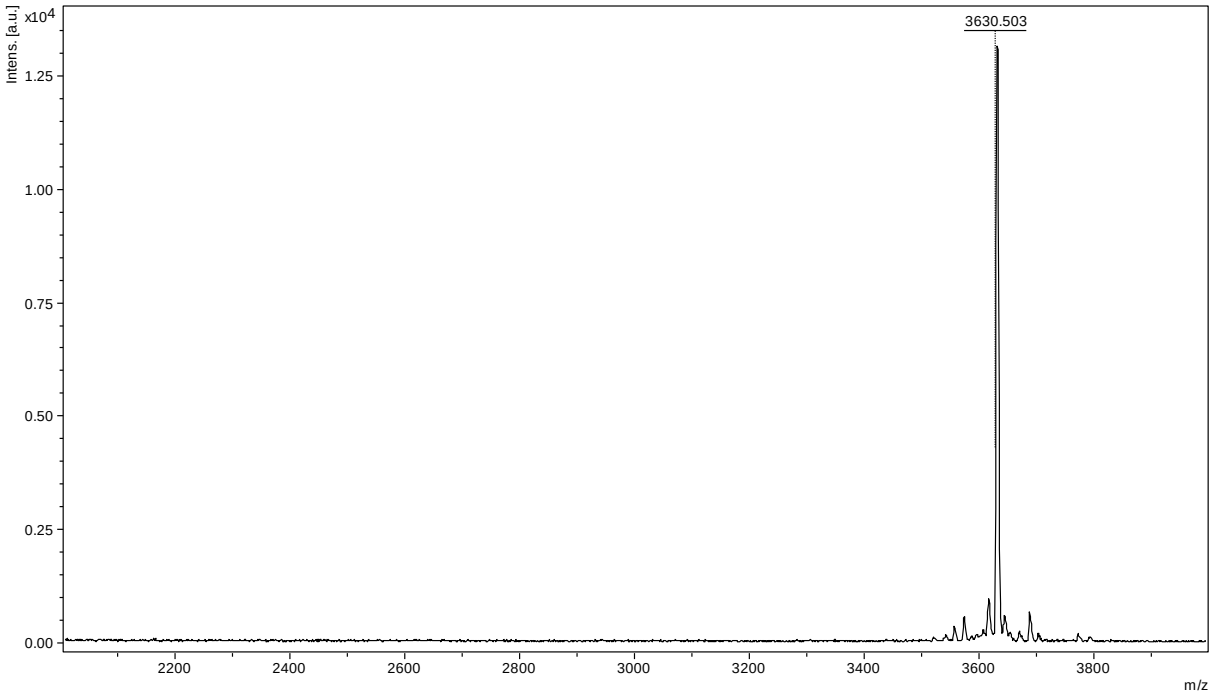


Figura 30 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{21-2} reduzida e alquilada.



4.7.3 Substância F_{20-3} (Nor C)

A substância F_{20-3} foi obtida como um sólido branco, seu cromatograma HPLC mostrou um único pico em 52,65 minutos (Figura 31). Seu espectro de massas apresentou um íon *m*/z 3282,472 (Figura 32). A redução e acetamidação (alquilação) foram confirmadas por meio do acréscimo de 348 Da (íon *m*/z 3630,4), referente às seis cisteínas (Figura 33). Para o sequenciamento utilizaram-se três enzimas com finalidades distintas, conforme discutido no item 3.7.1.2. O produto da digestão de cada enzima foi analisado por espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS) o qual permitiu identificar os fragmentos oriundos de cada uma delas. A reanálise desses fragmentos por espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF) permitiu estabelecer a sequência da estrutura primária verificando a existência de íons oriundos de C-terminal (íons -*y*) e N-terminal (íons -*b*). A união das informações proporcionadas por cada enzima possibilitou o sequenciamento do ciclotídeo.

Figura 31 - Cromatograma da substância $F_{20\text{-}3}$.
Programa: Gradiente 20-45% B em A em 60 min, 1 $mL.min^{-1}$, 55°C, 50 µL, 220 nm.

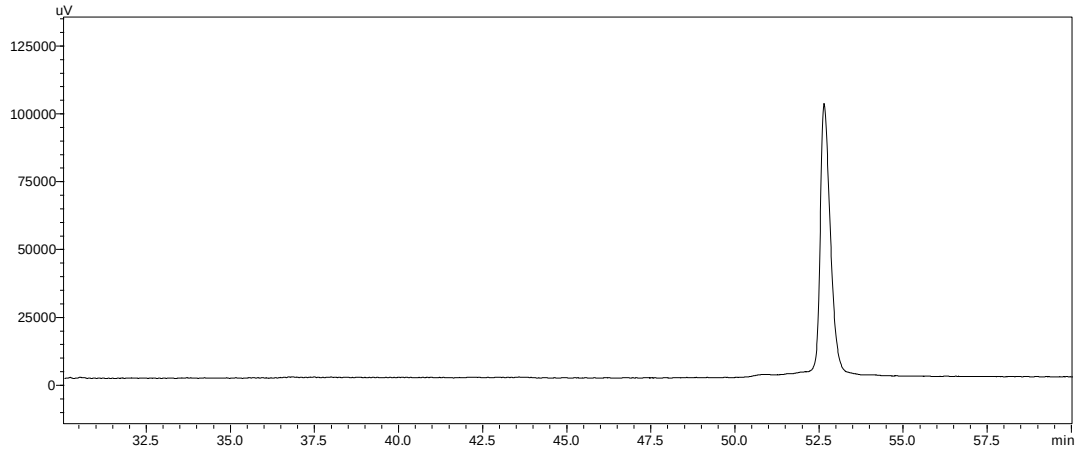


Figura 32 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{20\text{-}3}$.

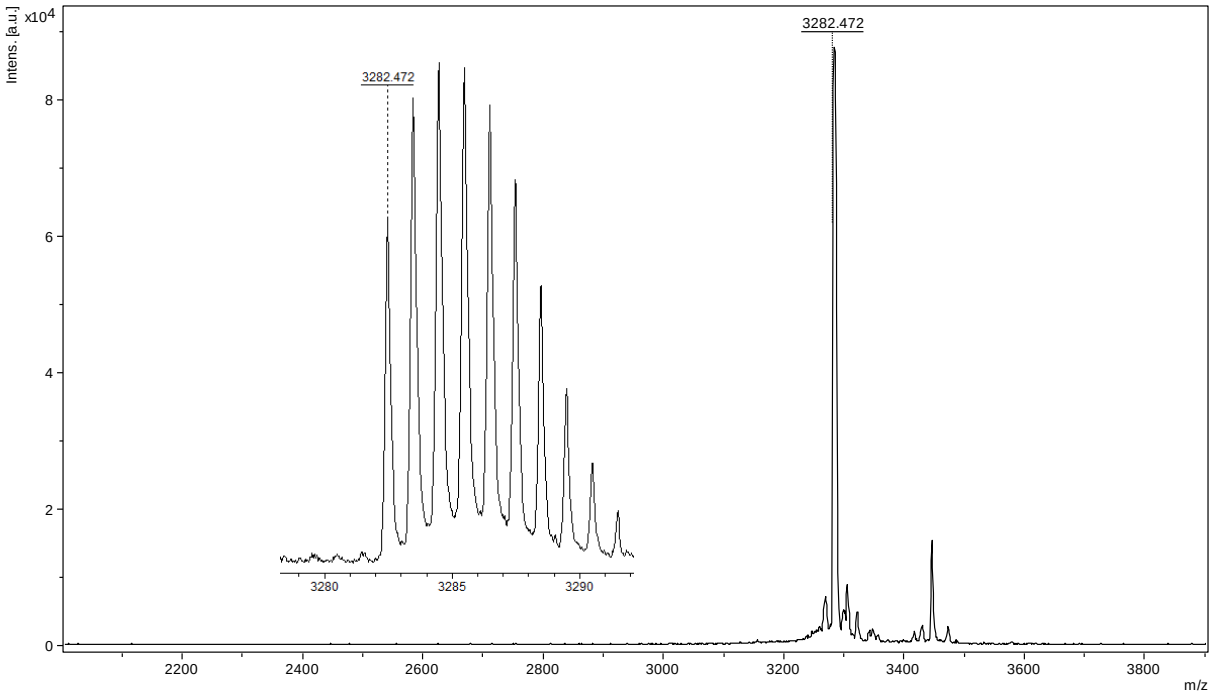
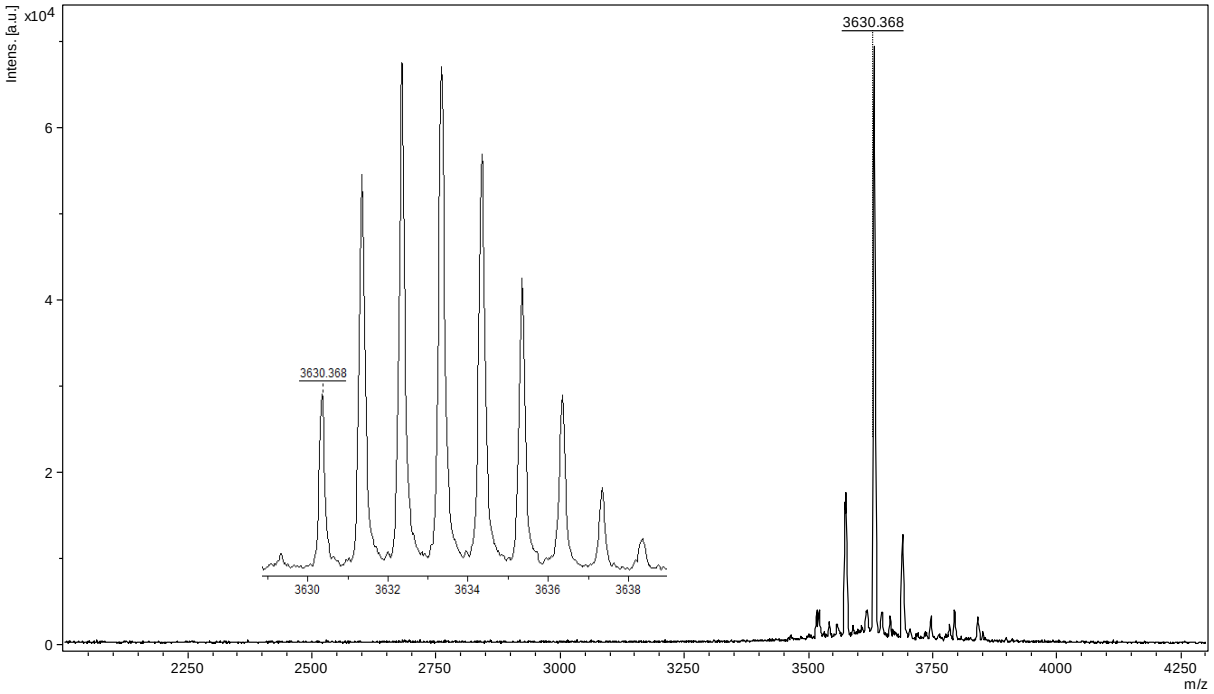
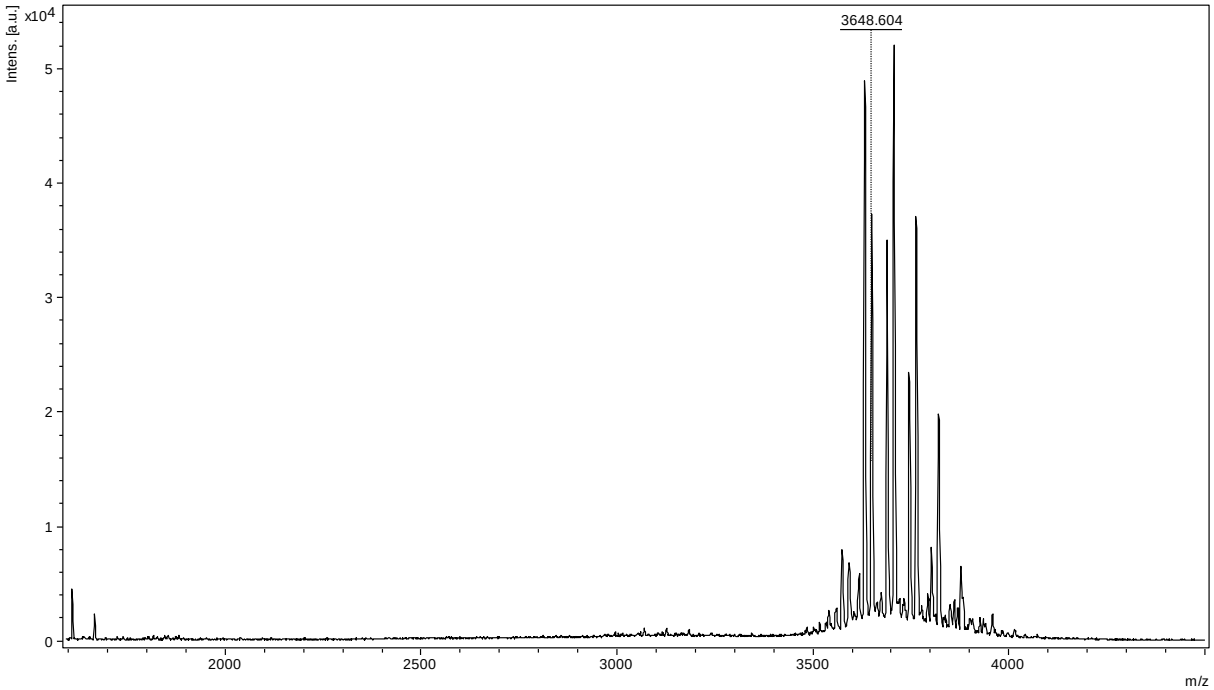


Figura 33 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{20-3} reduzida e alquilada.



A fração digerida com **endoGlu-C** apresentou um íon *m*/z 3648,604 referente à abertura do anel pelo extremo C-terminal do resíduo de ácido glutâmico (Glu, E) (Figura 34). O espectro de massas MS/MS deste íon permitiu propor a sequência mostrada nas figuras 35, 36, 37 e na tabela 8 (pág. 64).

Figura 34 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{20-3} digerida com endoGlu-C.



As siglas empregadas nos espectros (ressaltadas em vermelho) representam os resíduos de aminoácidos e estão elencadas na pág. 11.

Figura 35 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 3648,604 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância $F_{20\text{-}3}$.

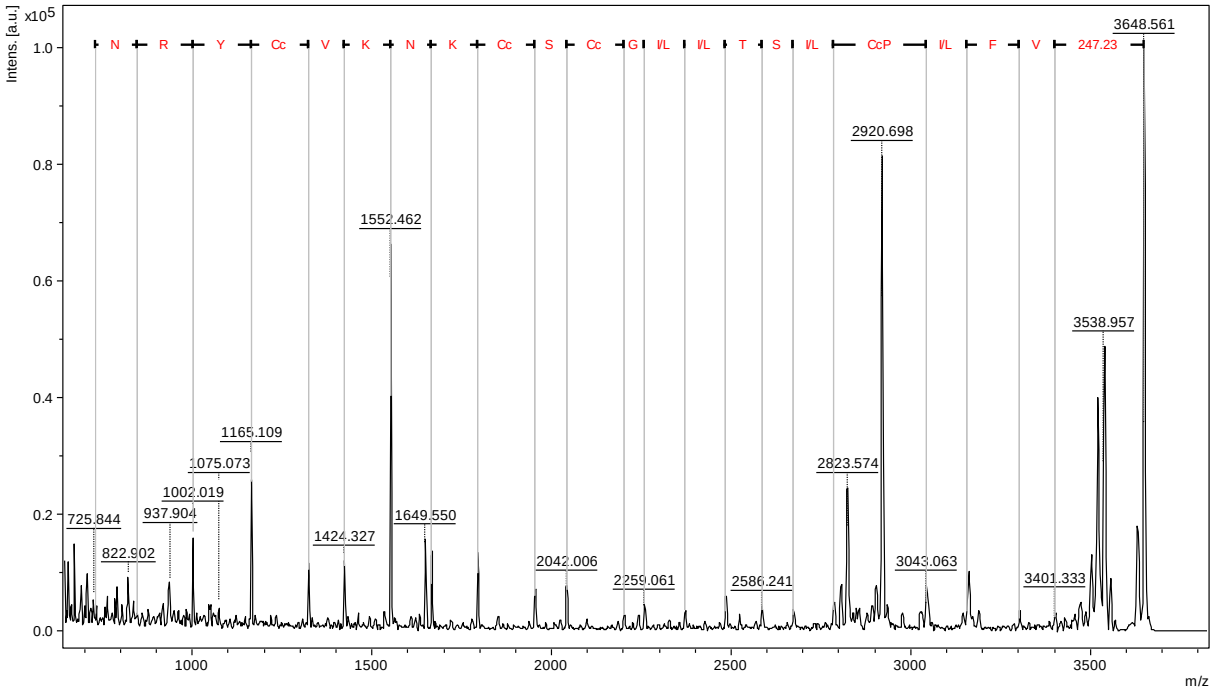


Figura 36 - Ampliação (2000-3800 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 3648,604 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância $F_{20\text{-}3}$.

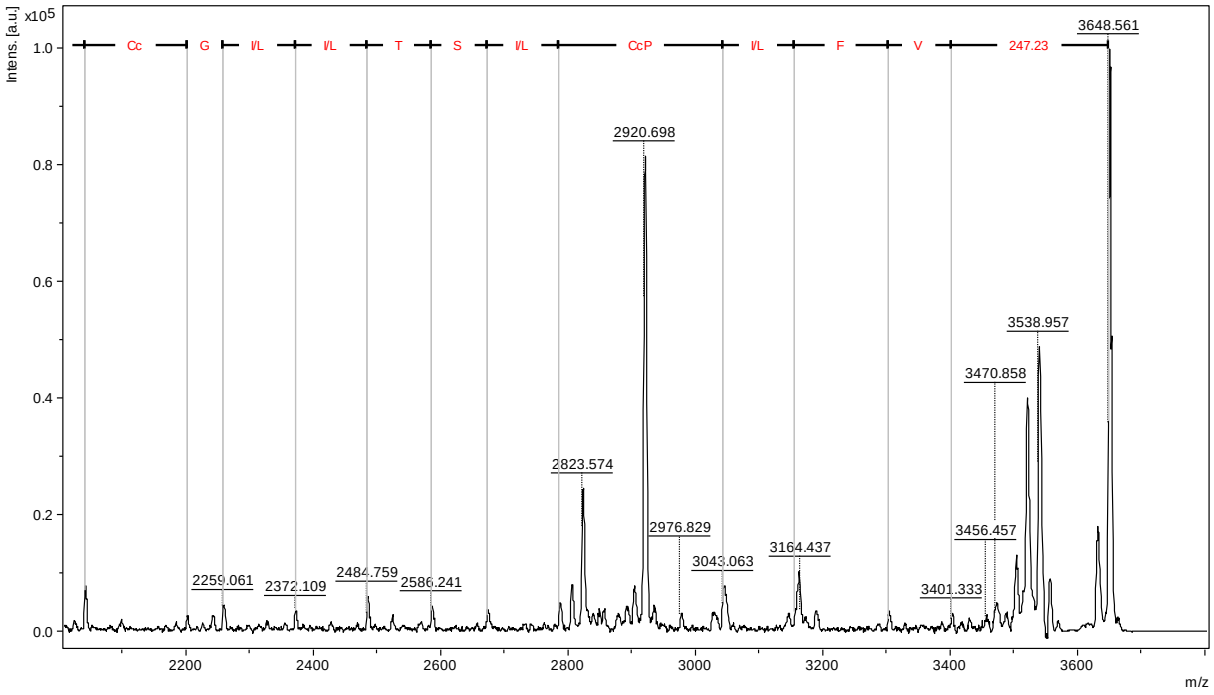
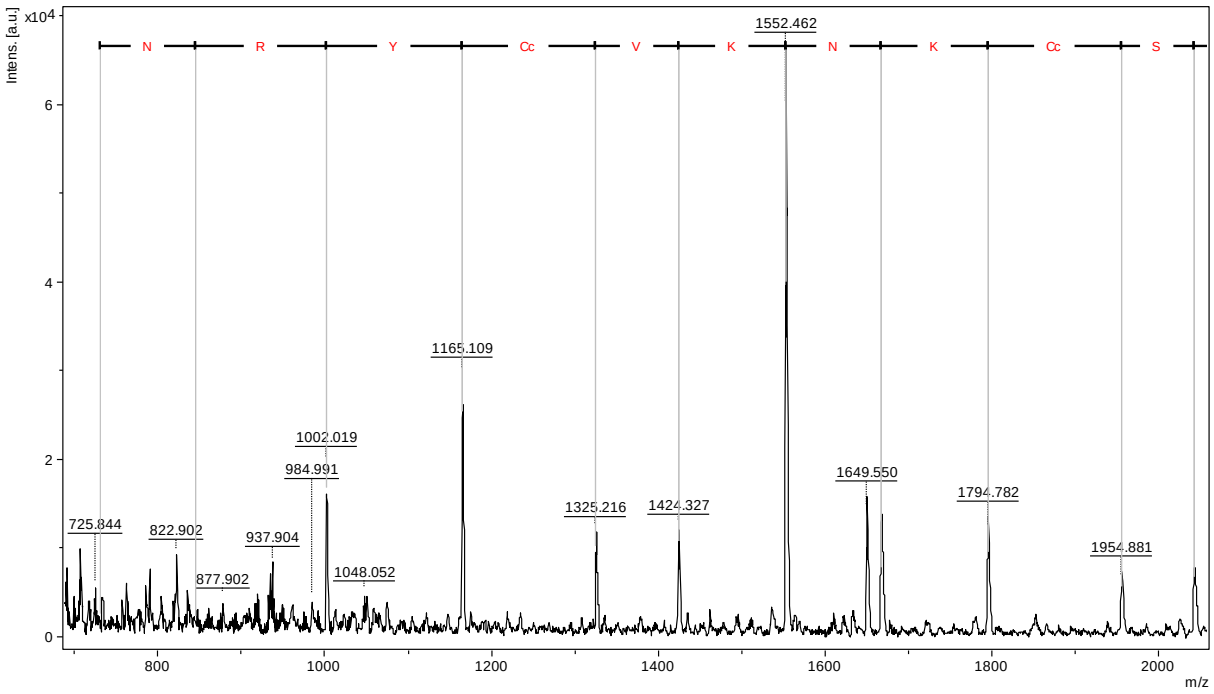


Figura 37 - Ampliação (700-2000 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 3648,604 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância $F_{20\text{-}3}$.



A fração digerida com **tripsina** apresentou vários íons *m*/z 3407,532; 2828,260 e 2521,475 (Figura 38). O íon *m*/z 3407,532 (Figura 39) refere-se à abertura do anel com perda de 241 Da o qual pode ser atribuído à perda do fragmento $N^{22}K^{23}$ (*Loop 5*), esse fragmento é oriundo da clivagem com tripsina, portanto é possível prever que ele esteja ligado à lisina (Lys, K) ou arginina (Arg, R). O que foi corroborado com os dados das outras enzimas.

Figura 38 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{20\text{-}3}$ digerida com tripsina

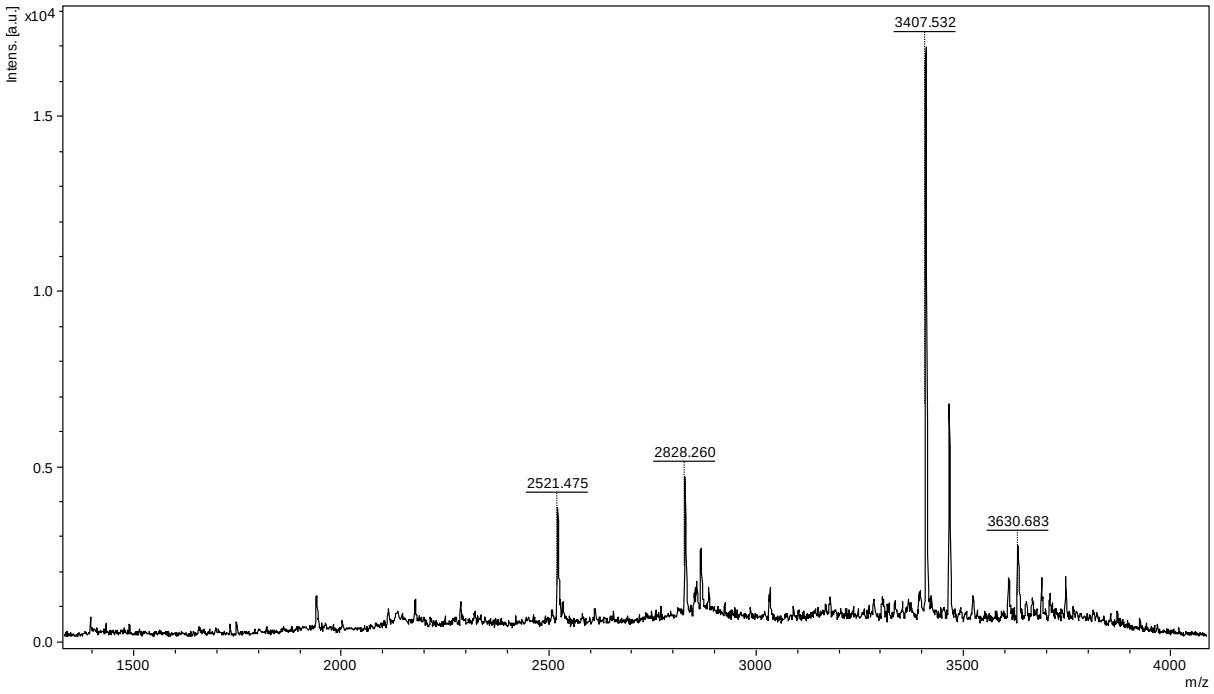
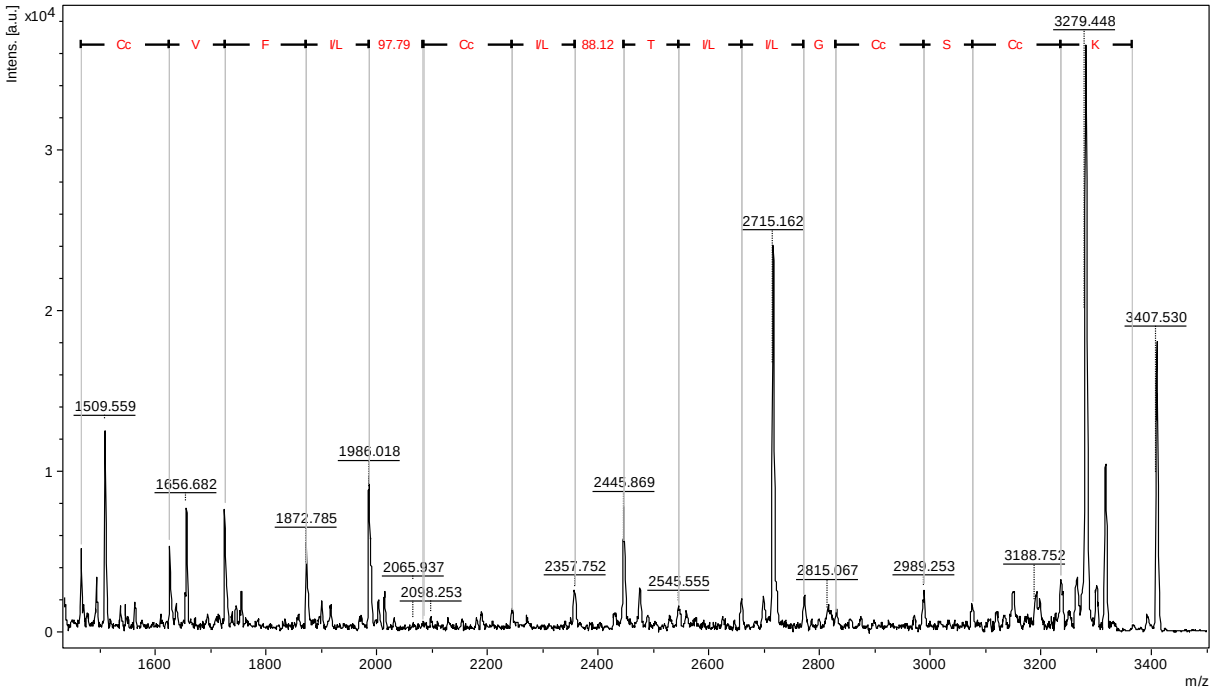


Figura 39 - Ampliação (1400-3500 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 3407,532 oriundo da digestão com tripsina da substância $F_{20\text{-}3}$.



O espectro de massas MS/MS do íon *m*/z 2828,300 (Figuras 40, 41 e 42) mostrou-se indispensável no sequenciamento, pois, por meio dele, se obteve informações sobre a sequência de aminoácidos do *Loop 6* (Tabela 8, pág. 64).

No caso do íon *m*/z 2521,475 não foi possível obter o espectro MS/MS devido a sua baixa intensidade.

Figura 40 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 2828,260 oriundo da digestão com tripsina da substância $F_{20\text{-}3}$.

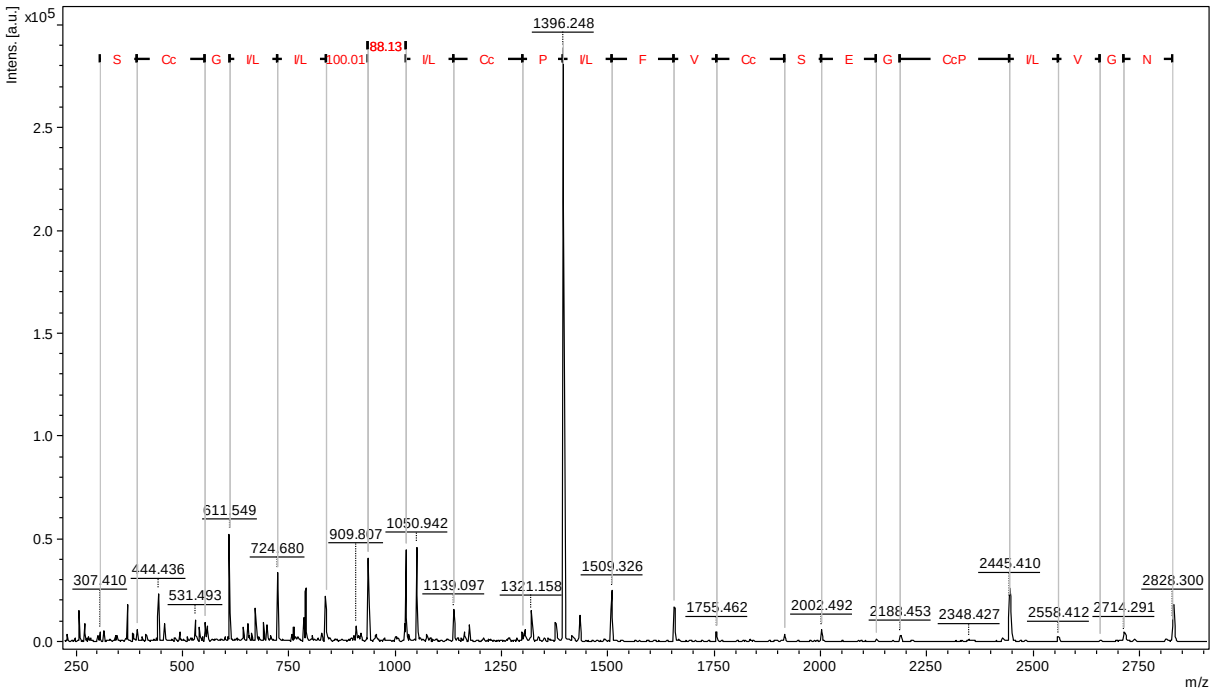


Figura 41 - Ampliação (300-1500 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 2828,260 oriundo da digestão com tripsina da substância $F_{20\text{-}3}$.

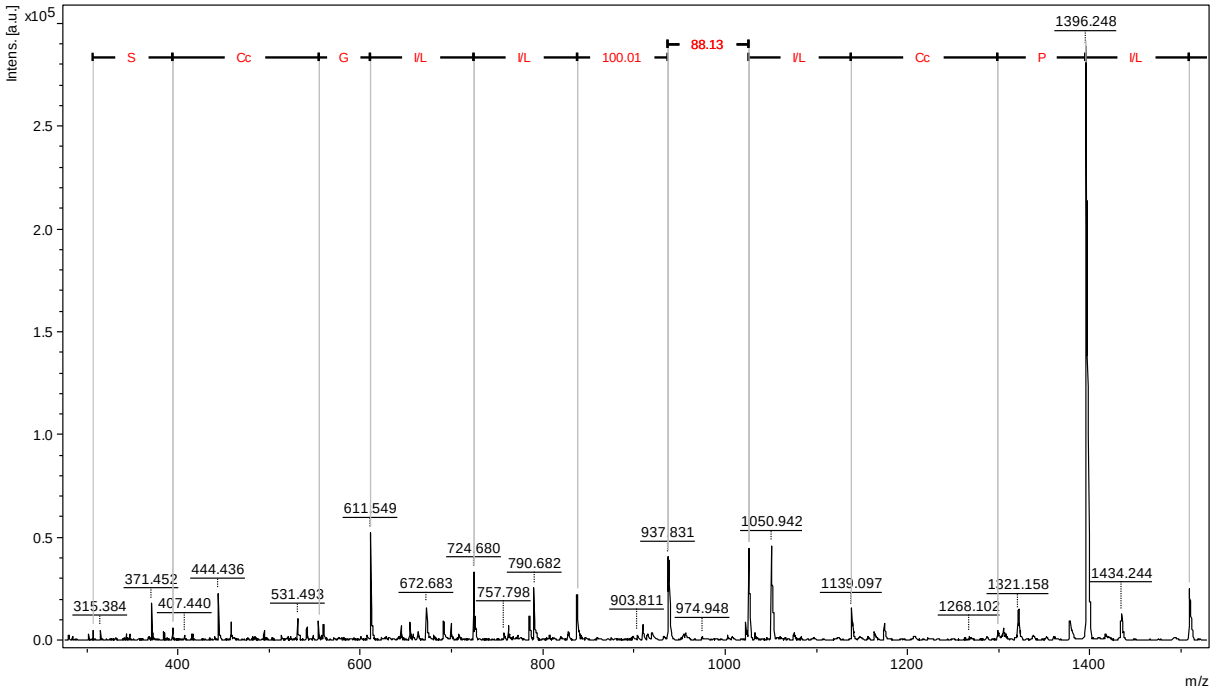
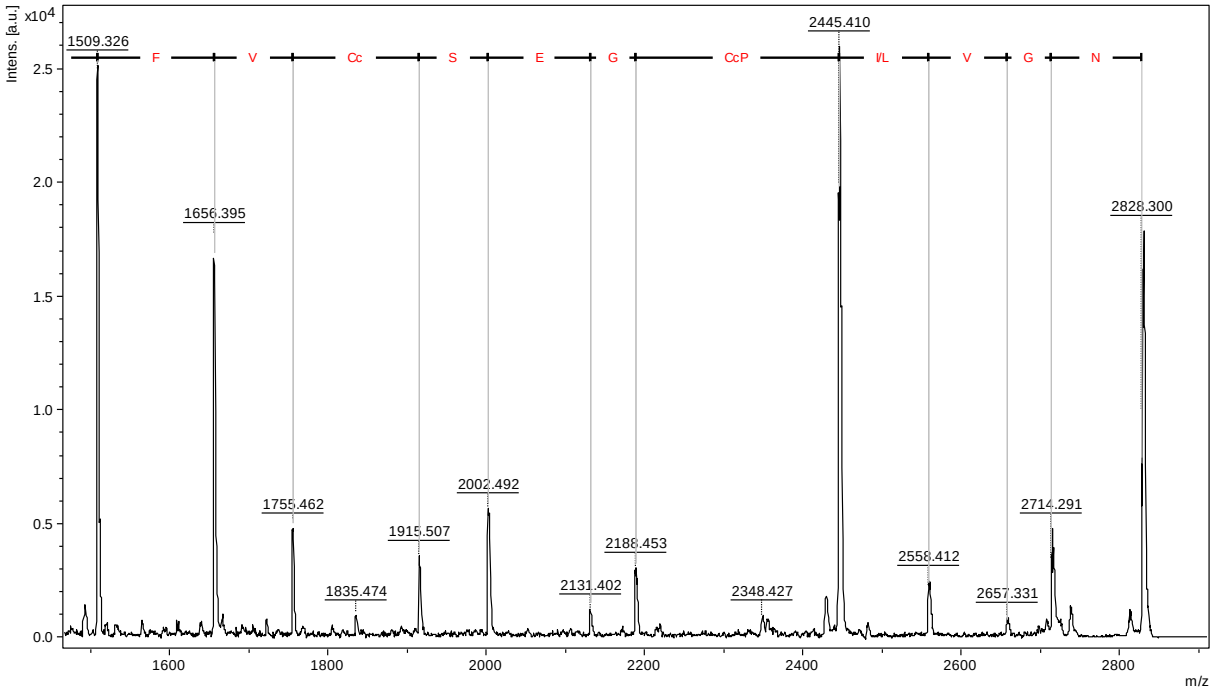


Figura 42 - Ampliação (1500-2900 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 2828,300 oriundo da digestão com tripsina da substância $F_{20\text{-}3}$.



A enzima **quimiotripsina** cliva os aminoácidos aromáticos assim como os aminoácidos apolares metionina (Met, M) e leucina (Leu, L) sempre que eles não estejam ligados a prolina (Pro, P). Neste trabalho tal enzima foi usada principalmente para diferenciar leucina (Leu, L) de isoleucina (Ile, I). No espectro de massas MALDI-TOF-MS da substância $F_{20\text{-}3}$ digerida foram observados os íons *m*/z 2261,054; 1494,700 e 1388,606 (Figura 43).

O íon *m*/z 2261,056 foi reanalisado por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF (Figuras 44, 45 e 46). Este íon possibilitou a identificação da isoleucina (I^{11}) e da leucina (L^{15}) ambas do *Loop 3* mas não permitiu determinar se a posição 8 do *Loop 2* esta ocupada por um resíduo de leucina ou de isoleucina devido à presença da prolina (P^{9}). Nesse caso, será colocada a letra X na posição correspondente até que a realização de outros experimentos permita a sua identificação. A sequência obtida é mostrada na tabela 8 da página 64.

Figura 43 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{20\text{-}3}$ digerida com quimiotripsina.

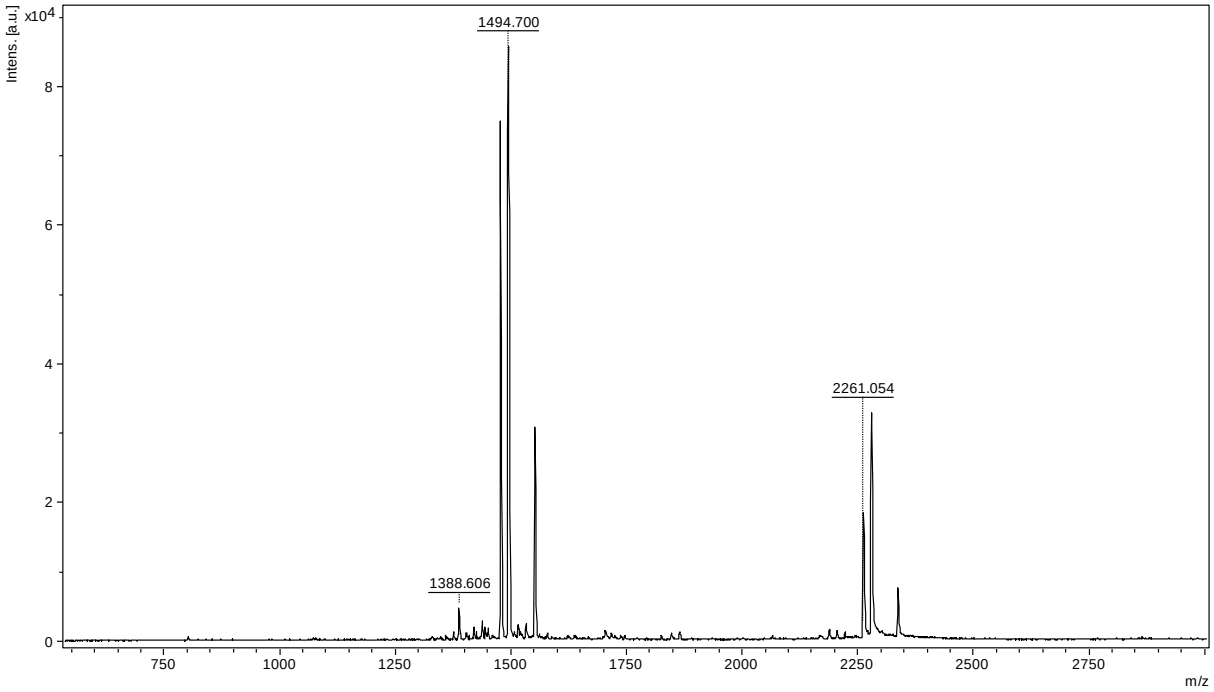


Figura 44 - Espectro MS/MS do íon *m/z* 2261,098 oriundo da digestão com quimiotripsina da substância $F_{20\text{-}3}$.

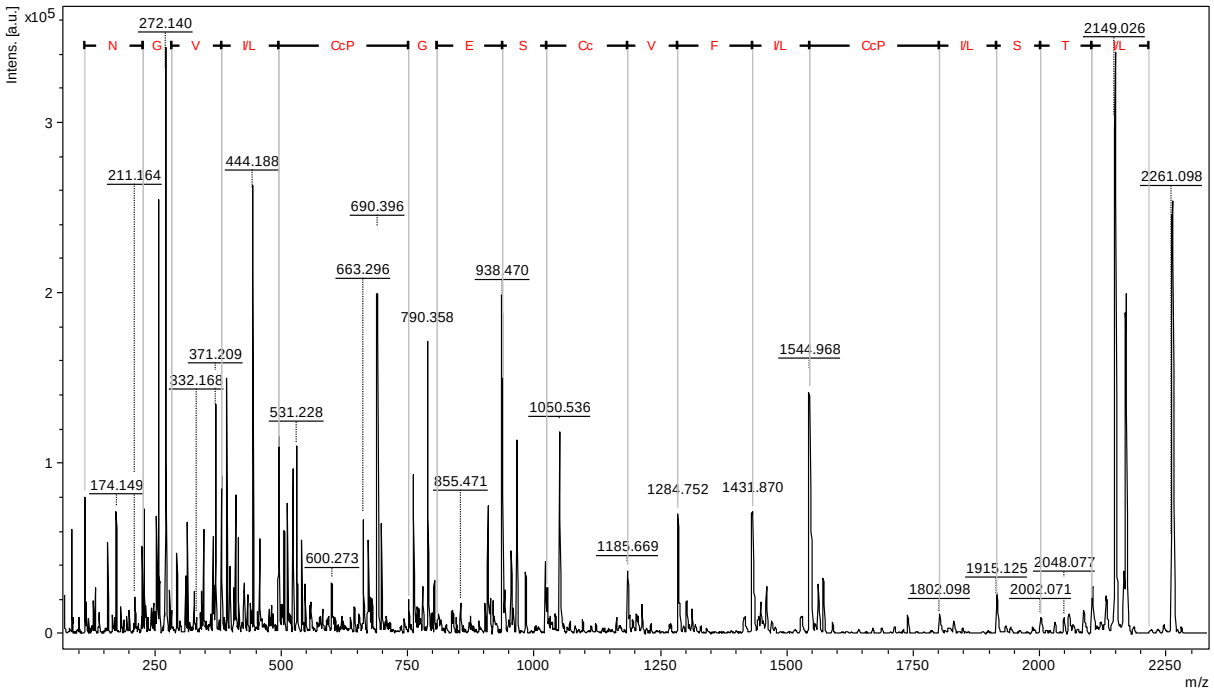


Figura 45 - Ampliação (1000-2400 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 2261,098 oriundo da digestão com quimiotripsina da substância $F_{20\text{-}3}$.

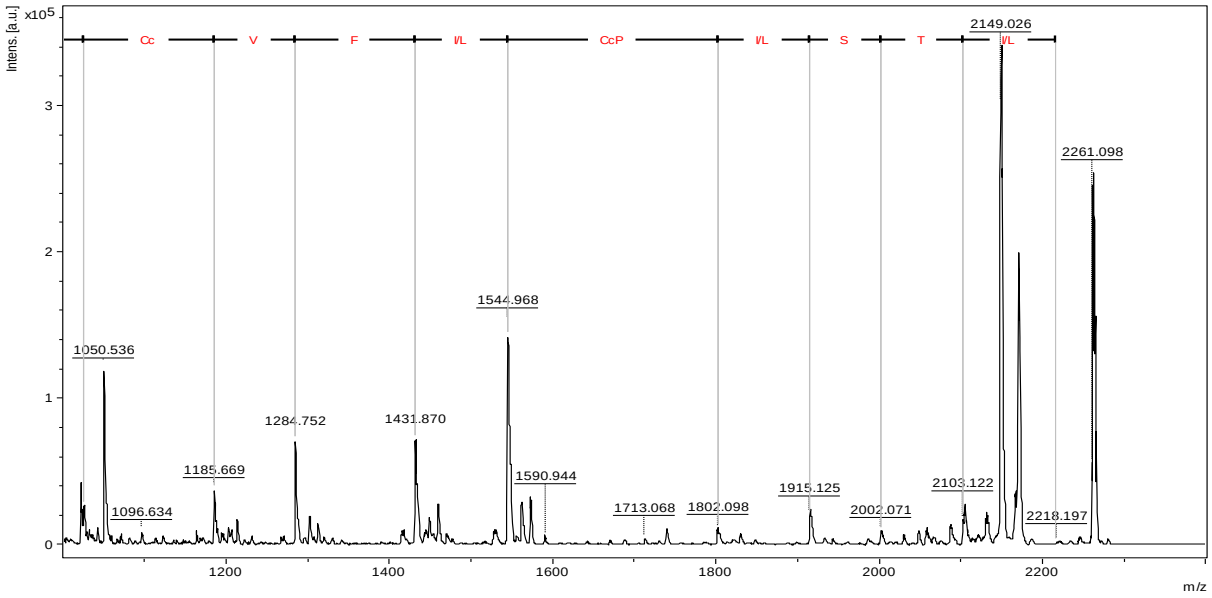
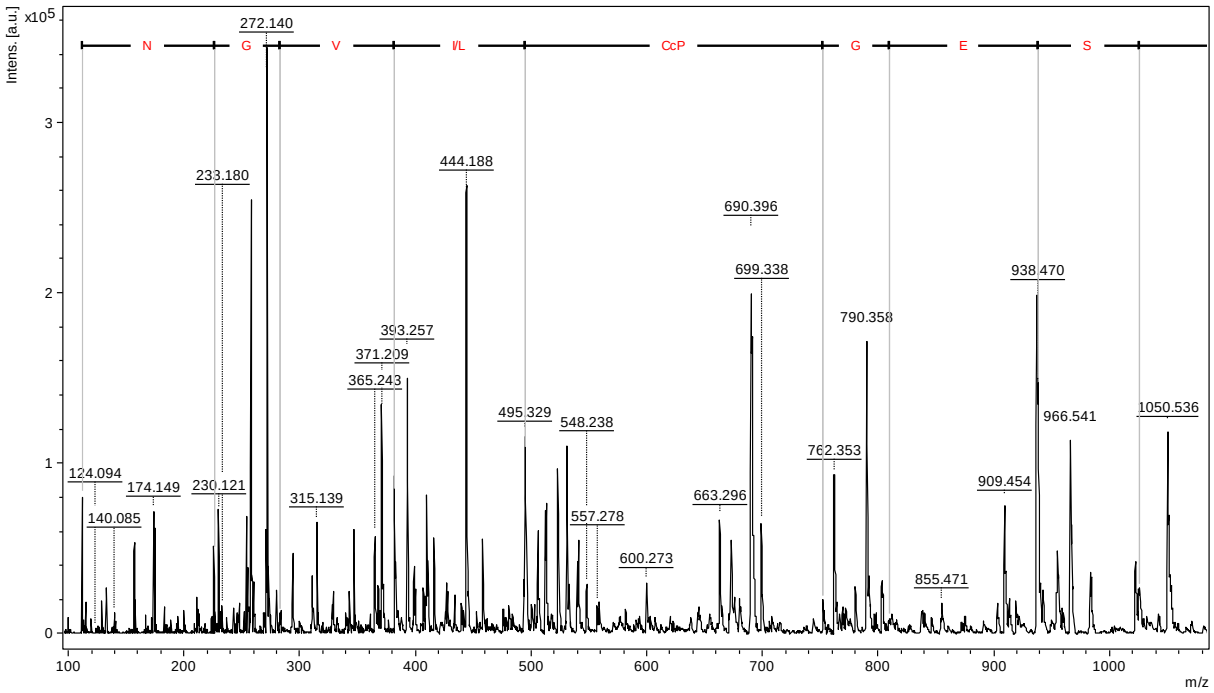


Figura 46 - Ampliação (100-1100 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 2261,098 oriundo da digestão com quimiotripsina da substância $F_{20\text{-}3}$.



O espectro MS/MS do íon *m*/z 1388,606 possibilitou identificar os íons *–b* e *–y* do fragmento (Figura 47), o que permitiu identificar o resíduo de leucina (L^{16}) na posição 16 do *Loop 3* (tabela 8).

Figura 47 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 1388,606 oriundo da digestão com quimiotripsina da substância $F_{20\text{-}3.}$ Íons –*b* (azul) e –*y* (vermelho).

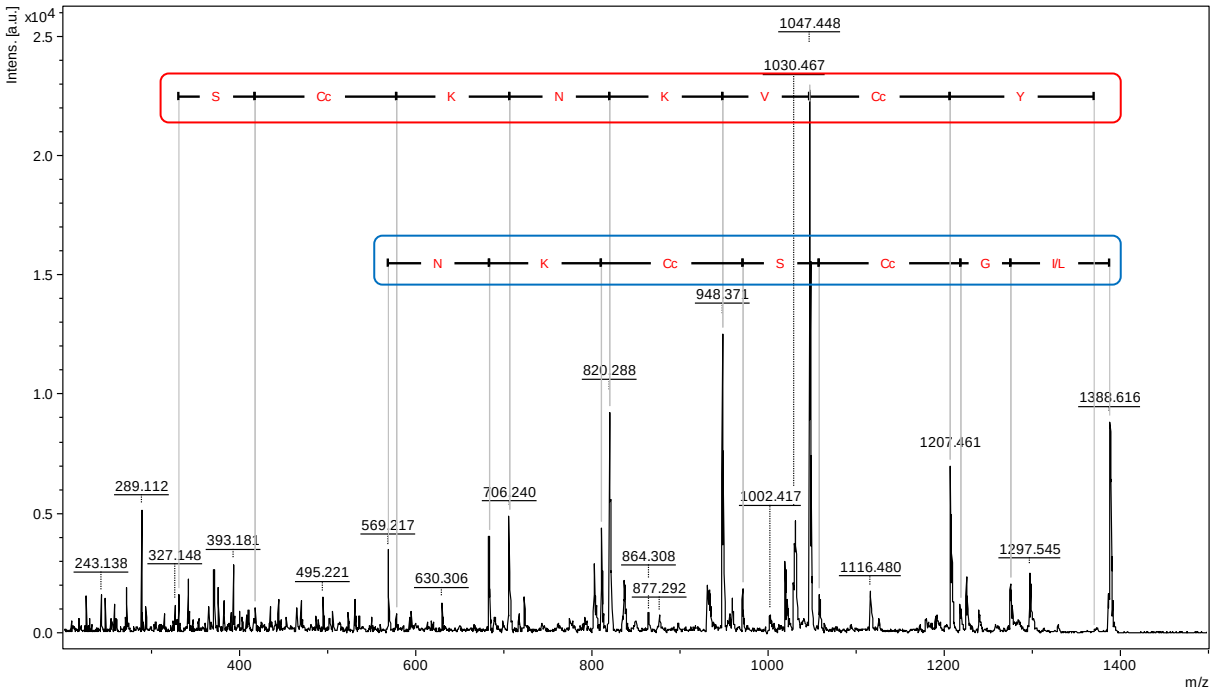


Tabela 8 - Sequências de aminoácidos identificados nos fragmentos da digestão enzimática da substância $F_{20\text{-}3}$.

Enzima	Íon *m*/*z*	Sequência
EndoGlu-C	3648,604	-S-C-V-F-X-P-C-X-S-T-X-X-G-C-S-C-K-N-K-V-C-Y-R-N-
Tripsina	3407,475	-C-V-F-X-P-C-X-S-T-X-X-G-C-S-C-K-
Tripsina	2828,300	C-G-E-S-C-V-F-X-P-C-X-S-T-X-X-G-C-S-C- -N-G-V-X-P
Quimiotripsina	2261,098	C-G-E-S-C-V-F-X-P-C- I-S-T-L- -N-G-V-X-P
Quimiotripsina	1494,700	C-G-E-S-C-V-F- -X-P
Quimiotripsina	1388,606	-I-G-C-S-C-K-N-K-V-C-Y-

Sequência final	**C-G-E-S-C-V-F-X-P-C-I-S-T-L-I-G-C-S-C-K-N-K-V-C-Y-R-N-G-V-X-P**

Na análise da sequência primária por meio do sequenciamento, foi visto que $F_{20\text{-}3}$ apresenta 31 resíduos de aminoácidos, entre eles os seis resíduos de cisteína, responsáveis pela formação das três ligações dissulfeto (C^1-C^{17}, C^5-C^{19} e C^{10}-C^{24}), responsáveis pela estabilização e formação da ligação cíclica de cistina na estrutura dos ciclotídeos (CRAIK et al., 1999). Observando os resíduos presentes em seu *Loop 5*, nota-se ausência de um resíduo de prolina precedida por triptofano, que é altamente conservada no ciclotídeos tipo Möbius (DALY et al., 2006), fato que permite classificar o composto em questão como pertencente a subfamília dos braceletes. No entanto, uma vez concluída esta etapa ainda não era possível

conhecer a natureza dos resíduos das posições 8 e 30 (Tabela 8, grifados em verde).

Diante disto, foi necessário realizar a técnica de análise de aminoácidos. O ciclotídeo foi tratado seguindo as especificações descritas na seção 3.7.2 e o aminograma gerado permitiu confirmar qualitativamente a maior parte dos aminoácidos identificados pela análise de espectrometria de massas. Além disso, foi possível quantificá-los, conforme a tabela 9. É importante ressaltar que o método de hidrólise empregado, utilizando-se ácido clorídrico 6 $mol.L^{-1}$ e 110℃, promove a destruição parcial ou total de alguns dos aminoácidos, especialmente de cisteína, metionina e triptofano (BERNARDI et al., 2003). Isto permite explicar a ausência do sinal correspondente às cisteínas. No entanto, o intuito principal para utilizar essa técnica foi atingido, uma vez que proporcionou a diferenciação dos resíduos de leucina e isoleucina. Essas informações em conjunto com o sequenciamento permitiram propor a sequência de aminoácidos.

Na figura 48 apresenta-se a estrutura "*collier de perles*" gerada com a ferramenta da base de dados Cybase.org que facilita observar o arranjo CCK na estrutura primária.

Tabela 9 - Aminoácidos identificados por meio da técnica de Análise de Aminoácidos do ciclotídeo $F_{20\text{-}3}$.

Aminoácido	Símbolo	Quantidade	Aminoácido	Símbolo	Quantidade
Aspartato	Asp	2	Leucina	Leu	1
Fenilalanina	Phe	1	Serina	Ser	3
Glicina	Gly	3	Tirosina	Tyr	1
Glutamato	Glu	1	Treonina	Thr	1
Isoleucina	Ile	4	Valina	Val	3

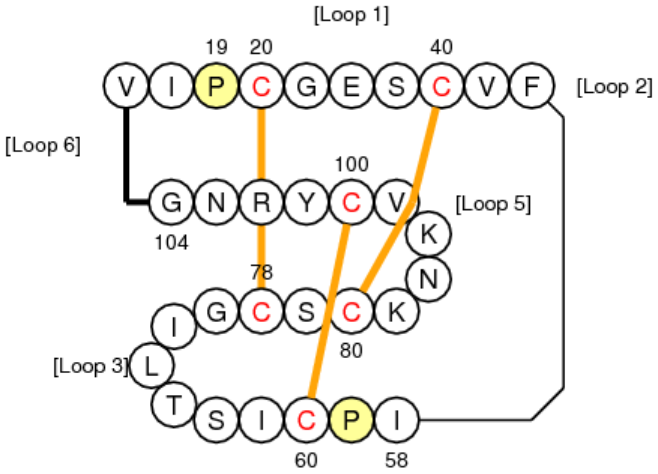
A comparação com a literatura mostrou que o mesmo tem 97 % de homologia com a circulina B (massa molecular 3282,51 Da), ciclotídeo anteriormente isolado de *Chassalia parvifolia* (Rubiaceae) o qual apresentou uma promissora atividade anti-HIV (GUSTAFSON et al., 1994), a única diferença entre eles está na posição 15 do *loop 3* (Tabela 10, grifado em amarelo).

Tabela 10 - Comparação das sequências dos ciclotídeos F_{20-3} e circulina B.

Ciclotídeo	M.M	Sequência
F_{20-3} (Nor C)	3282,472 Da	CGESCVFIPCISTLIGCSCKNKVCYRNGVIP
Circulina B	3282,51 Da	CGESCVFIPCISTLLGCSCKNKVCYRNGVIP

Tendo em consideração os resultados, antes expostos, evidenciou-se que o ciclotídeo F_{20-3} é inédito e foi chamado **Nor C**.

Figura 48 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo F_{20-3} (**Nor C**).



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

4.7.4 Substância F_{20-2} (Nor B)

A substância F_{20-2} foi obtida como um sólido branco, seu cromatograma analítico mostrou um único pico em 49,01 minutos (Figura 49) e seu espectro de massas apresentou um íon *m*/z 3180,416 (Figura 50). Uma vez concluída esta etapa, a amostra foi submetida ao processo de redução e alquilação, sendo que o espectro de massas do produto permitiu observar o acréscimo característico de 348 Da (Figura 51).

Figura 49 - Cromatograma da substância $F_{20\text{-}2}$.
Programa: Gradiente 20-45% B em A em 60 min, 1 mL.min^{-1}, 55°C, 50 µL, 220 nm.

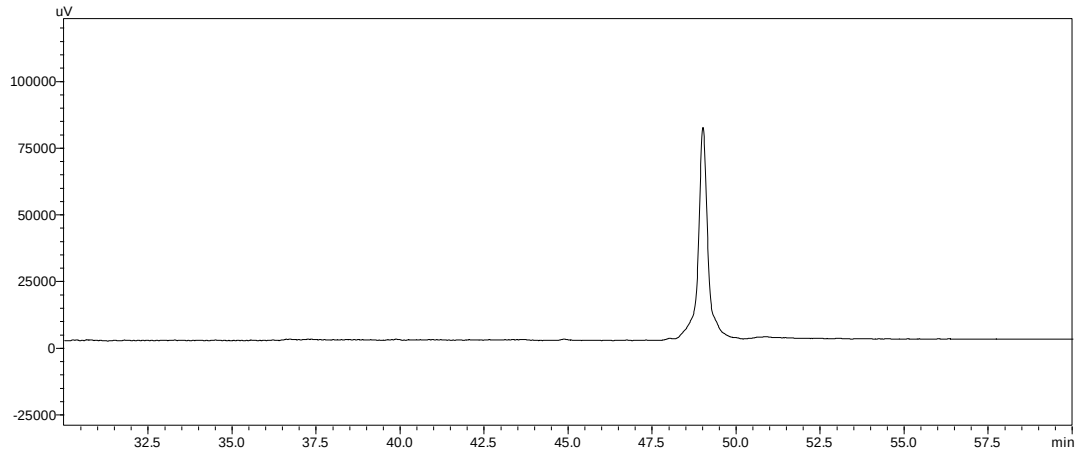


Figura 50 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{20\text{-}2}$.

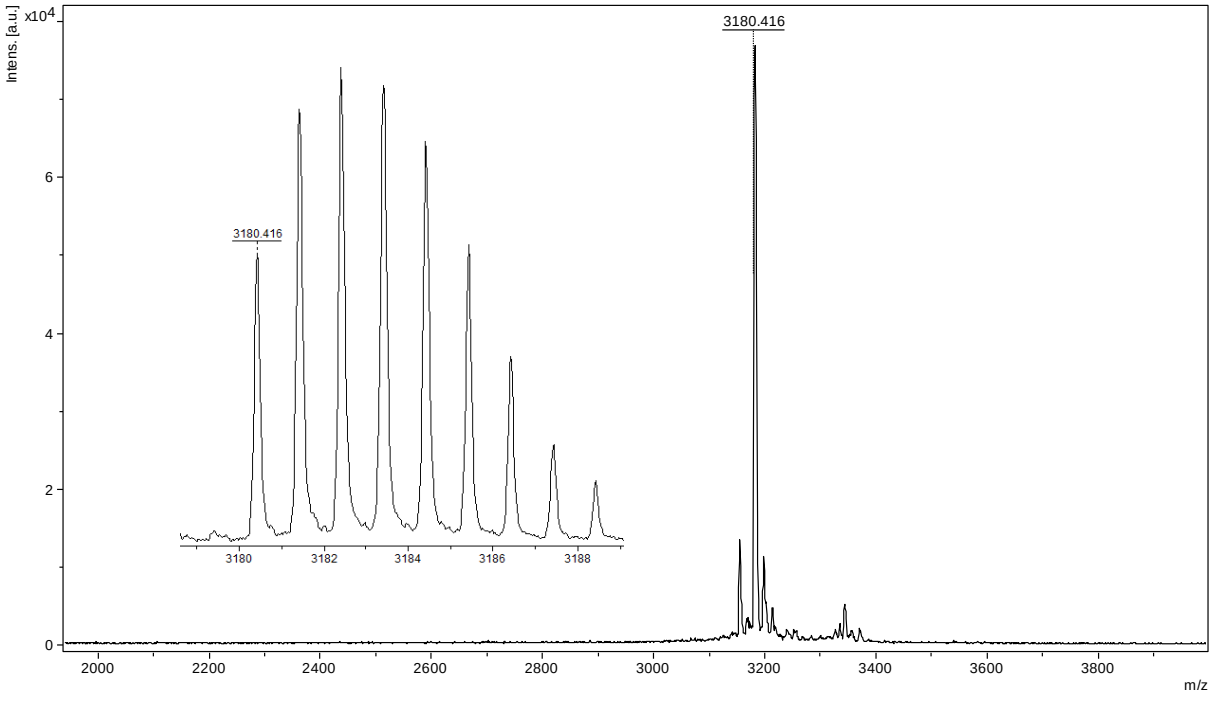
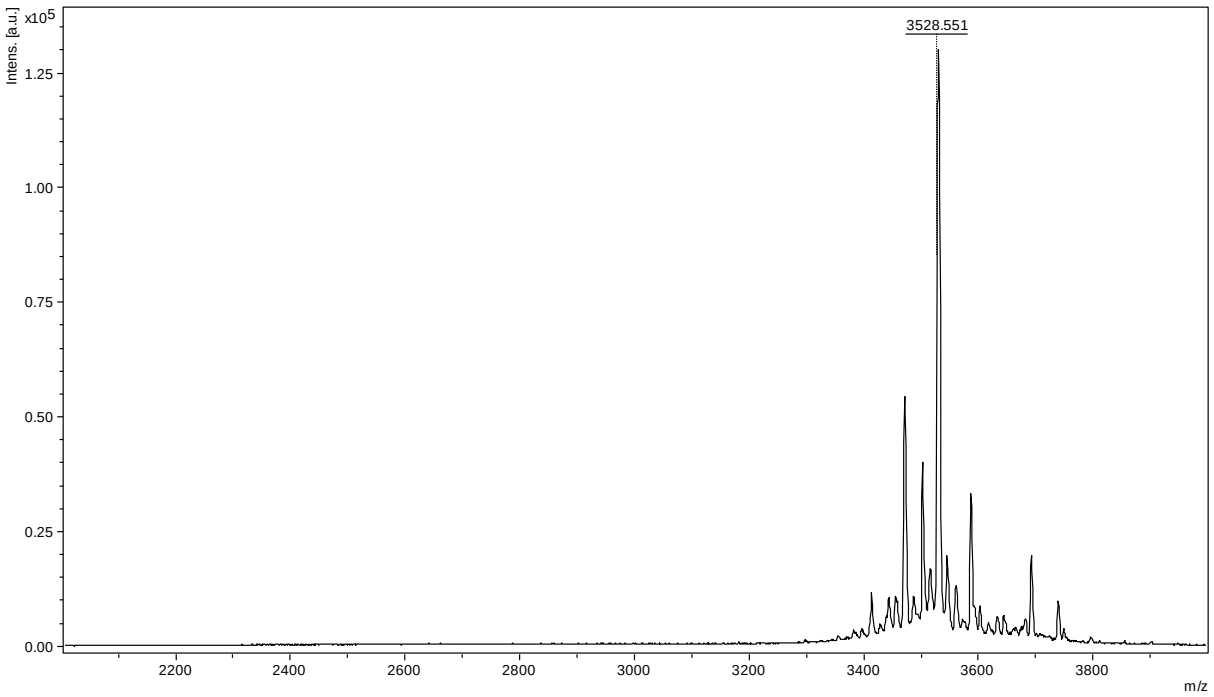


Figura 51 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{20\text{-}2}$ reduzida e alquilada.



Para o sequenciamento, as digestões com as três enzimas foram analisadas, conforme discutido na seção 3.7.1.2. O produto da digestão de cada enzima foi analisado por Espectrometria de Massas (MALDI-(+)-TOF-MS) o qual permitiu identificar os fragmentos oriundos de cada uma delas. A reanálise desses fragmentos por MS/MS permitiu estabelecer a sequência de aminoácidos. A união das informações proporcionadas por cada enzima possibilitou sequenciar a estrutura primária do ciclotídeo.

A fração digerida com **endoGlu-C** apresentou um íon *m*/z 3546,615 referente à abertura do anel pelo extremo C-terminal do resíduo de ácido glutâmico (Glu, E) (Figura 52). O espectro de massas MS/MS deste íon permitiu propor a sequência mostrada nas figuras 53, 54, 55 e na tabela 11 da página 75.

Figura 52 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{20\text{-}2}$ digerida com endoGlu-C.

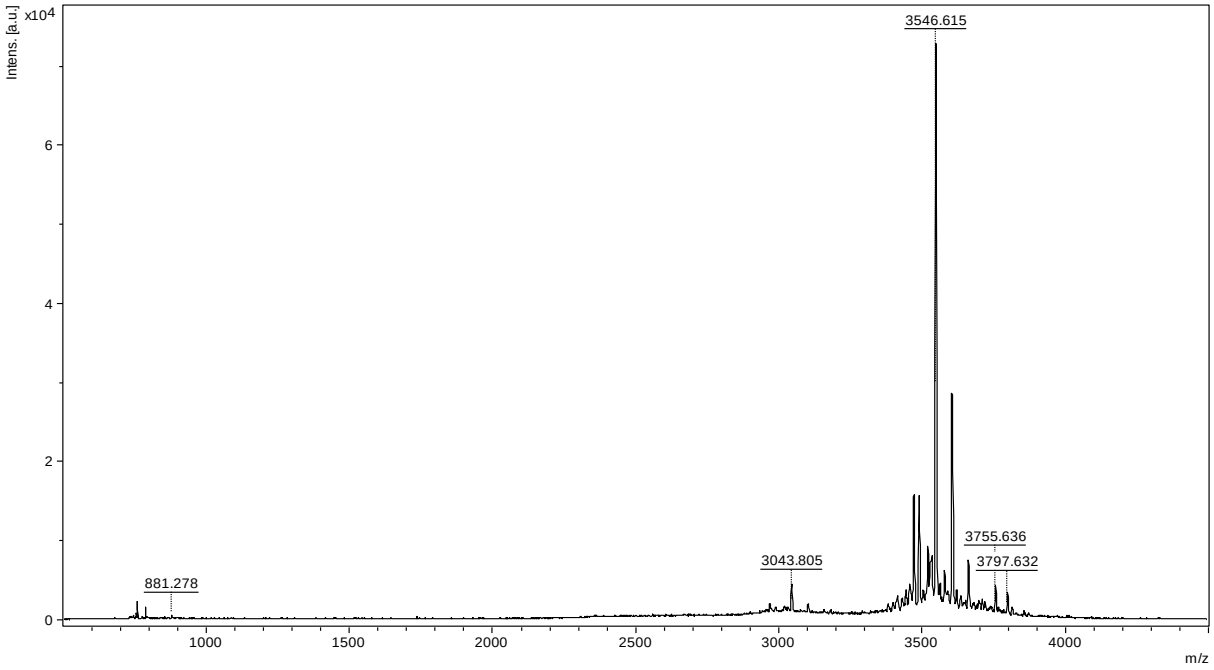


Figura 53 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 3546,615 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância $F_{20\text{-}2}$.

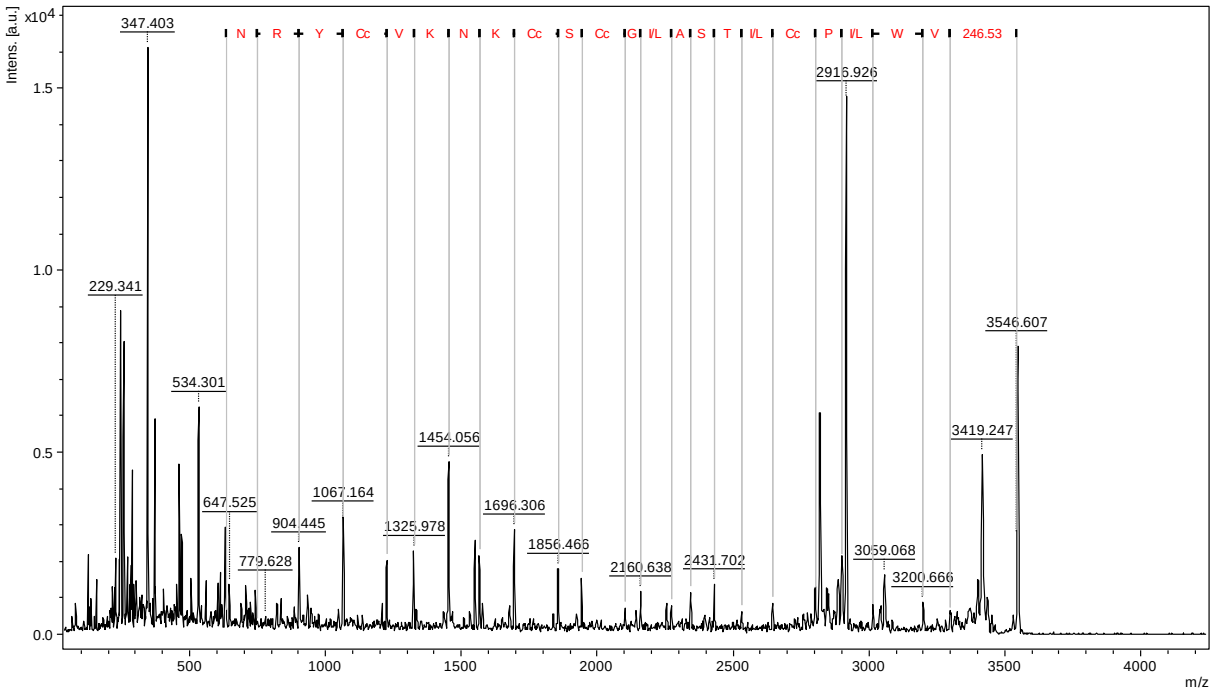


Figura 54 - Ampliação (2100-3600 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 3546,615 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância $F_{20\text{-}2}$.

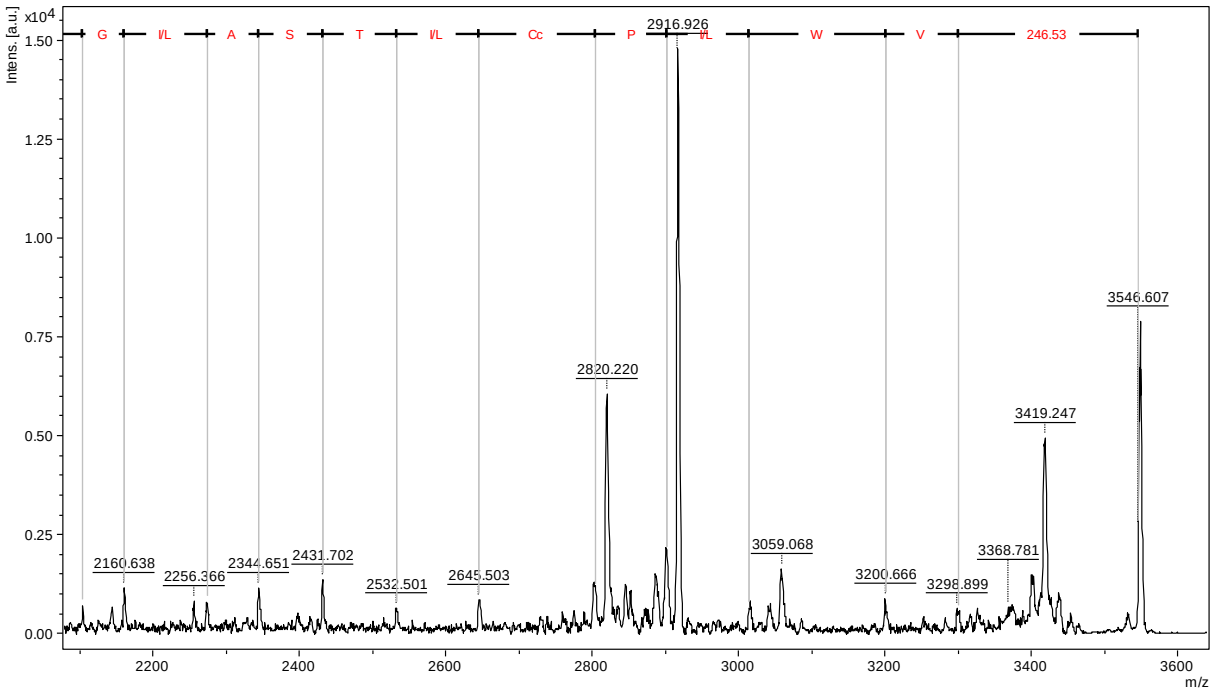
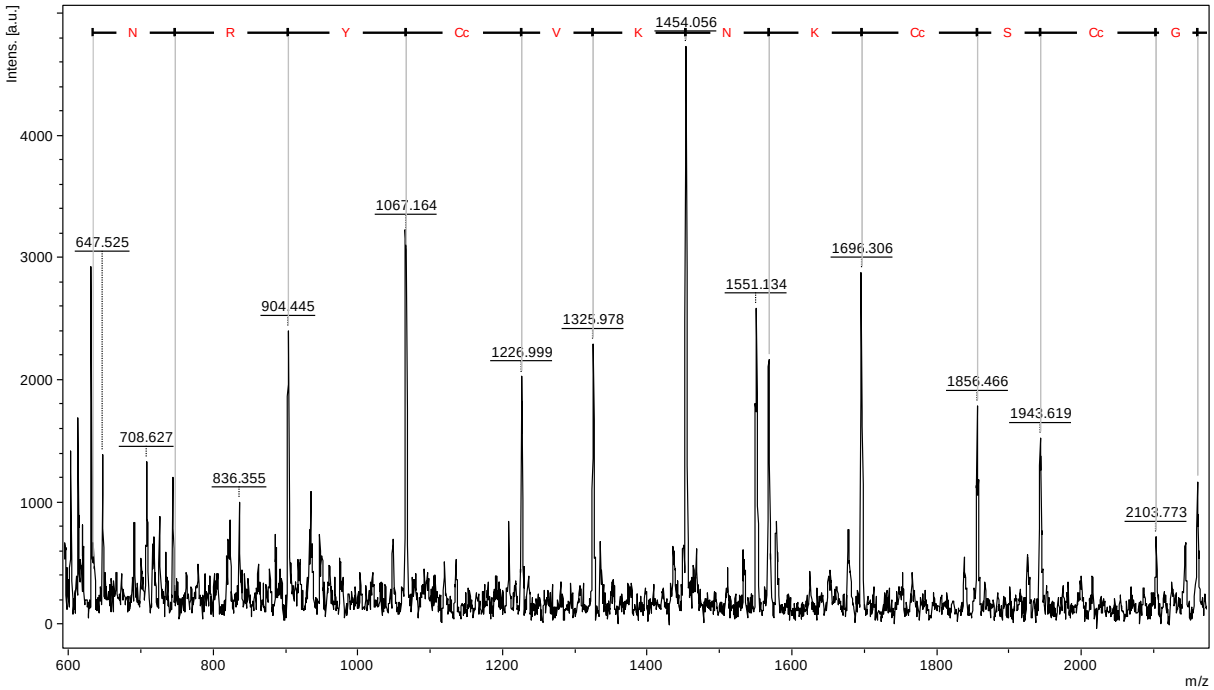


Figura 55 - Ampliação (600-2150 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 3546,615 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância $F_{20\text{-}2}$.



A fração digerida com **tripsina** apresentou os íons *m*/z 3262,341 e 2726,171 (Figura 56). O íon *m*/z 3262,341 refere-se à abertura do anel com perda de 266 Da.

O espectro de massas MS/MS deste íon permitiu propor a sequência mostrada na figura 57.

O íon *m*/z 2726,171 foi fragmentado (Figuras 58, 59 e 60), fornecendo informações sobre os resíduos de aminoácidos pertencentes ao *Loop 6* (Tabela 11, pág. 75).

Figura 56 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{20\text{-}2}$ digerida com tripsina.

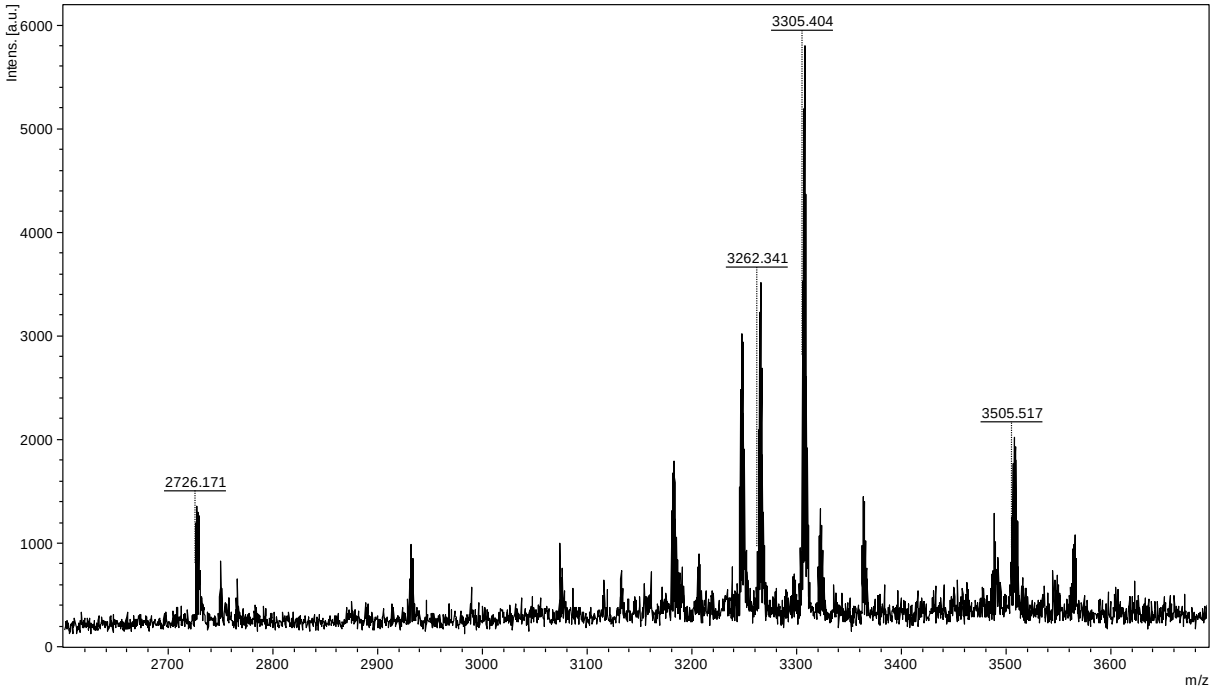


Figura 57 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 3262,341 oriundo da digestão com tripsina da substância $F_{20\text{-}2}$.

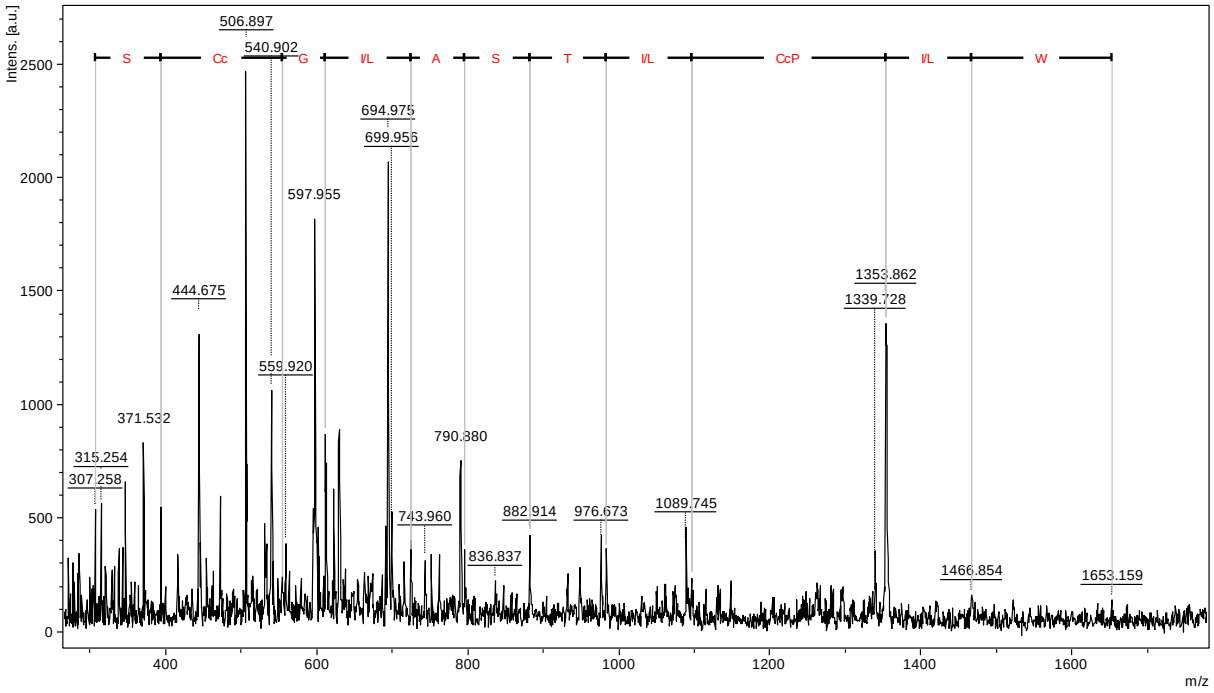


Figura 58 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 2726,246 oriundo da digestão com tripsina da substância $F_{20\text{-}2}$. Íons *–b* (azul) e *–y* (vermelho).

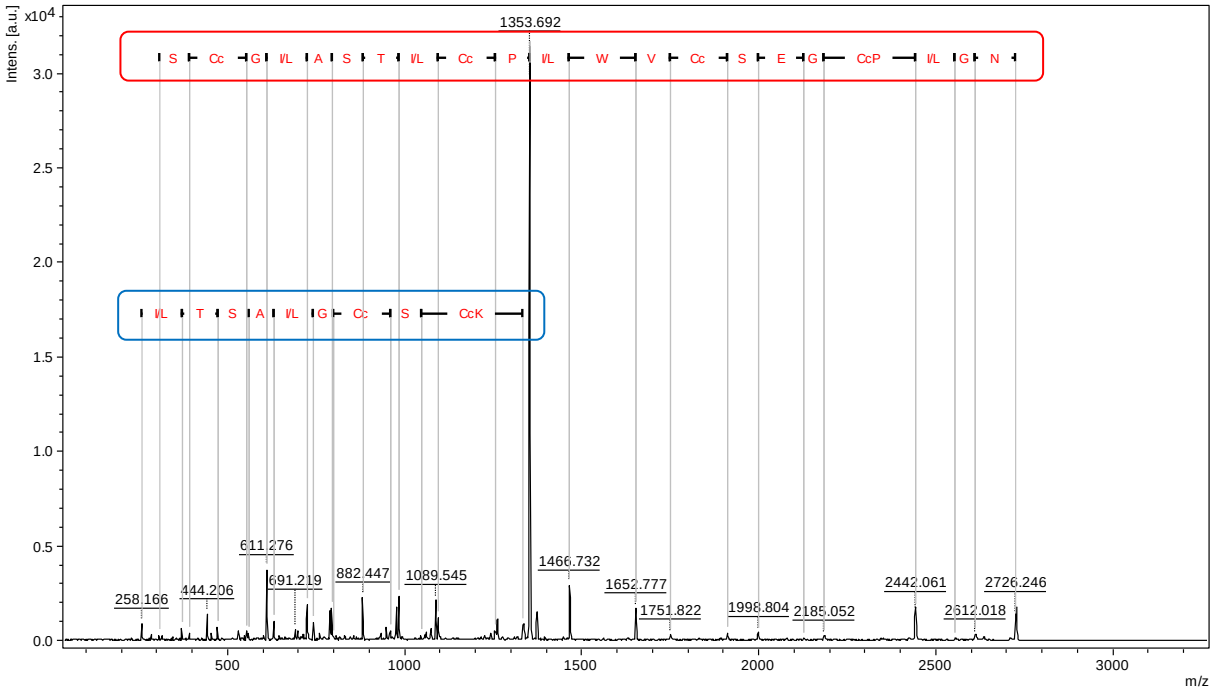


Figura 59 - Ampliação (250-1500 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 2726,246 oriundo da digestão com tripsina da substância $F_{20\text{-}2.}$ Íons *–b* (azul) e *–y* (vermelho).

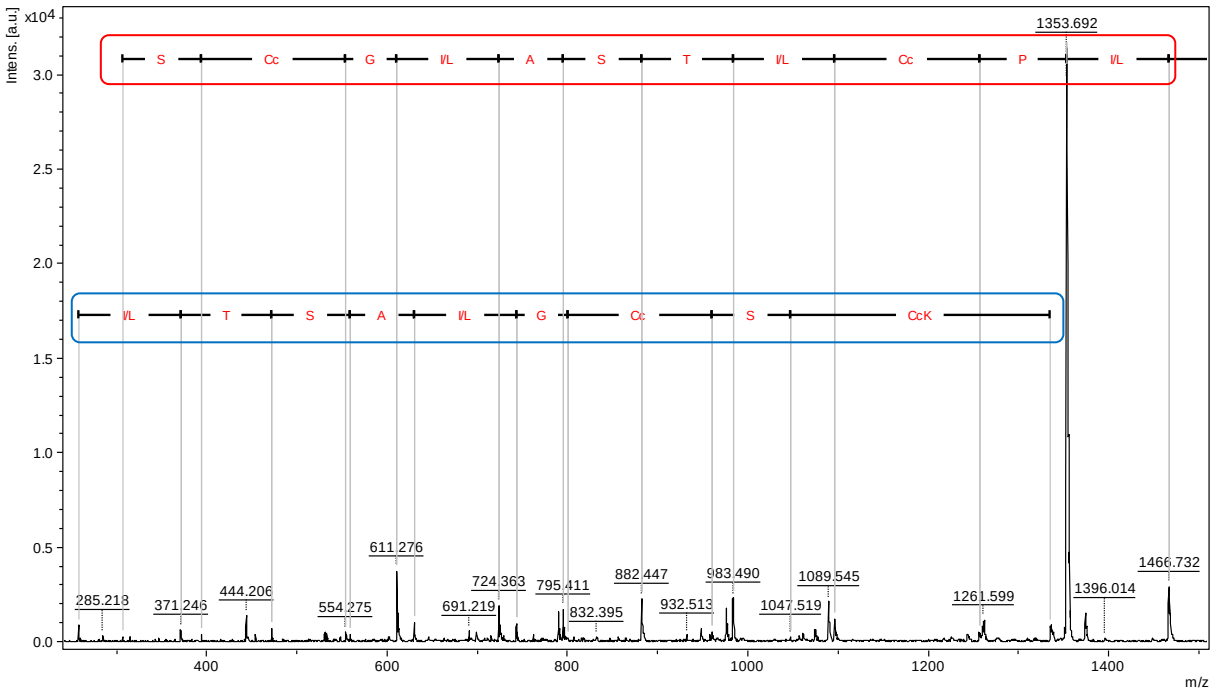
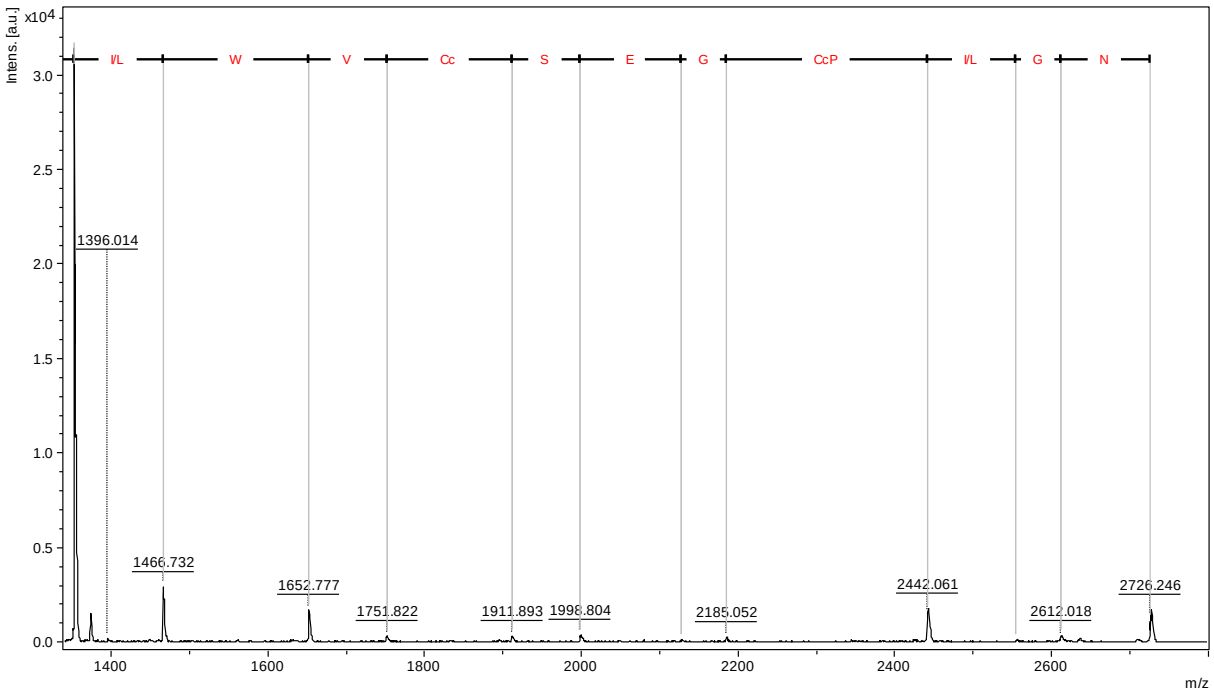


Figura 60 - Ampliação (1350- 2800 Da) do espectro MS/MS do íon *m*/z 2726,246 oriundo da digestão com tripsina da substância $F_{20\text{-}2.}$



Como já foi mencionado, anteriormente, a enzima **quimiotripsina** permite diferenciar os resíduos de leucina e isoleucina, os quais são isóbaros e, portanto, não podem ser diferenciados por espectrometria de massas. No espectro de massas MALDI-TOF-MS da substância $F_{20\text{-}2}$, digerida com essa enzima, foi observado o íon *m*/z 1417,608 (Figura 61). No entanto, os espectros MS/MS deste íon (Figura 62) não tiverem uma qualidade e intensidade satisfatórias para diferenciar os resíduos de leucina e isoleucina. Diante desta limitação de dados os mesmos encontram-se identificados com a letra X na tabela 11.

Figura 61 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{20\text{-}2}$ digerida com quimiotripsina.

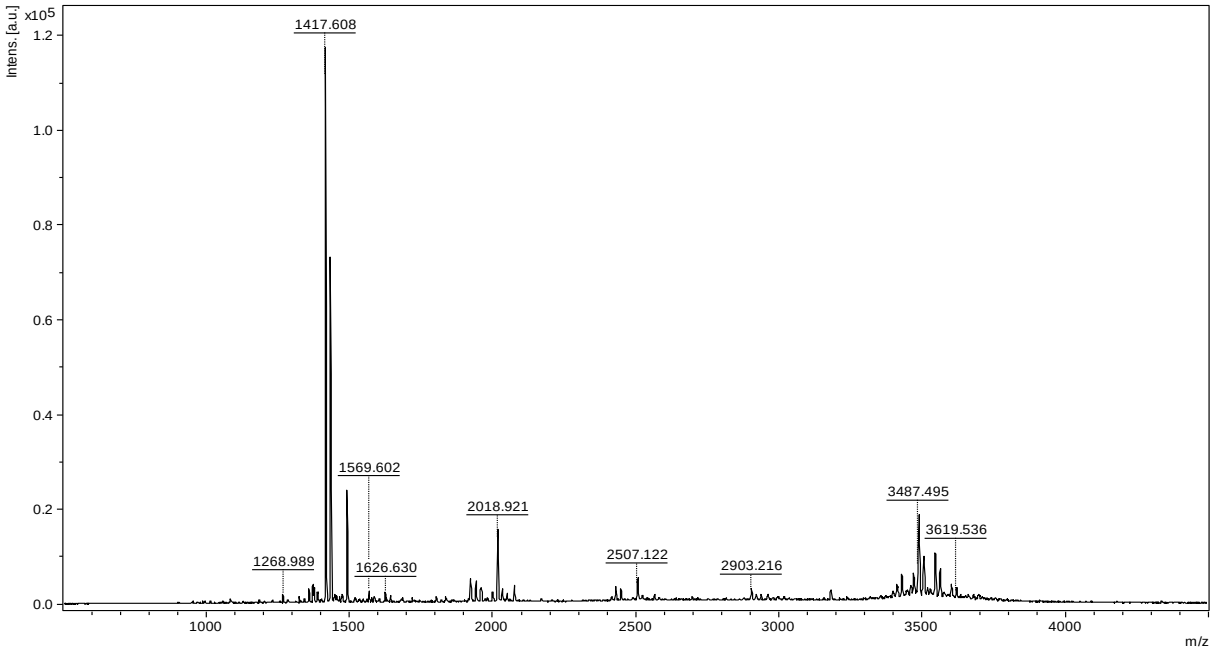


Figura 62 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 1417,608 oriundo da digestão com quimiotripsina da substância $F_{20\text{-}2}$. Íons *–b* (azul) e *–y* (vermelho).

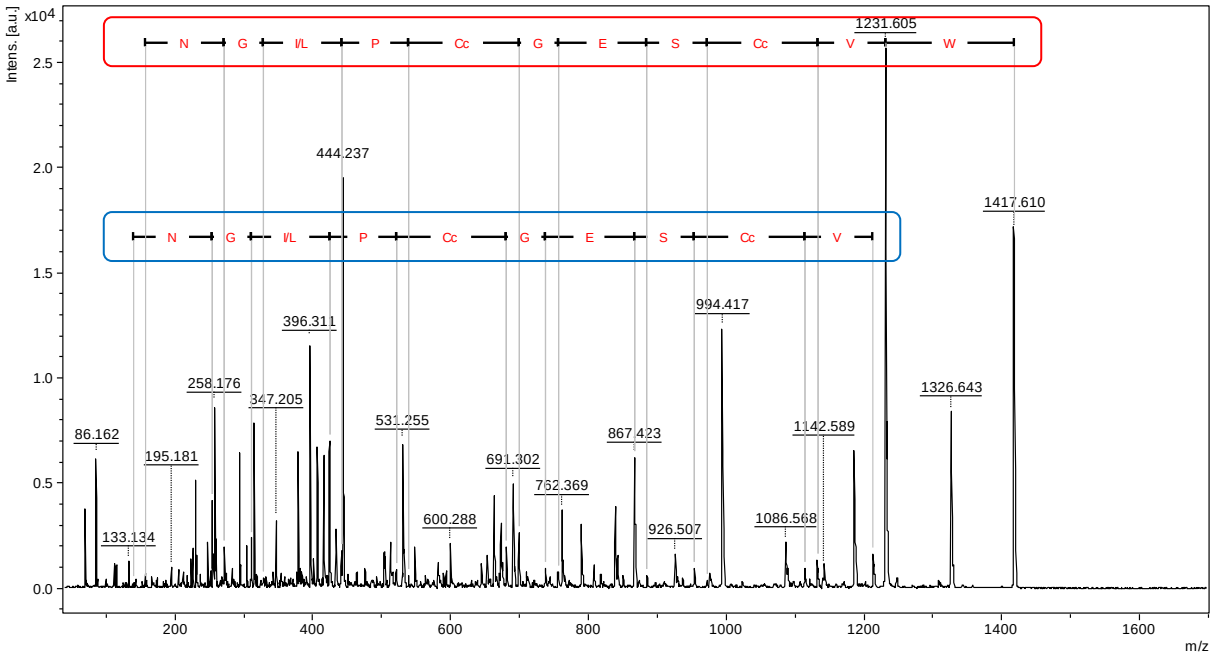


Tabela 11 - Sequências de aminoácidos identificados nos fragmentos da digestão enzimática da substância $F_{20\text{-}2}$.

Enzima	Íon *m*/z	Sequência
EndoGlu-C	3546,615	-V-W-X-P-C-X-T-S-A-X-G-C-S-C-K-N-K-V-C-Y-R-N-G-X-P
Tripsina	3262,341	-C-V-W-X-P-C-X-T-S-A-X-G-C-S-C-
Tripsina	2726,246	C-G-E-S-C-V-W-X-P-C-X-T-S-A-X-G-C-S-C-
Quimiotripsina	1417,608	C-G-E-S-C-V-W -N-G-X-P

Sequência final	**C-G-E-S-C-V-W-X-P-C-X-T-S-A-X-G-C-S-C-K-N-K-V-C-Y-R-N-G-X-P**

Na análise da sequência primária, foi constatado que $F_{20\text{-}2}$ apresenta ausência de um resíduo prolina (Pro, P) precedida por triptofano (Trp, W) no *Loop 5*, fato que permite classificar o composto em questão como pertencente a subfamília dos braceletes.

As análises anteriores corroboraram que a substância $F_{20\text{-}2}$ trata-se de um ciclotídeo com 30 resíduos de aminoácidos (Figura 63) e massa molecular 3180,416 Da. A busca na base de dados Cybase (www.cybase.org.au) (WANG et al., 2008) mostrou um ciclotídeo com a mesma massa molecular, Viba-9, predito da *Viola baoshanensis* (Violaceae) (ZHANG et al., 2008), mas a comparação das duas sequências de aminoácidos (Tabela 12) mostrou diferenças nos *Loops 3 e 6*, em destaque na tabela 12 (ressaltadas em amarelo). Portanto, apesar de não poder

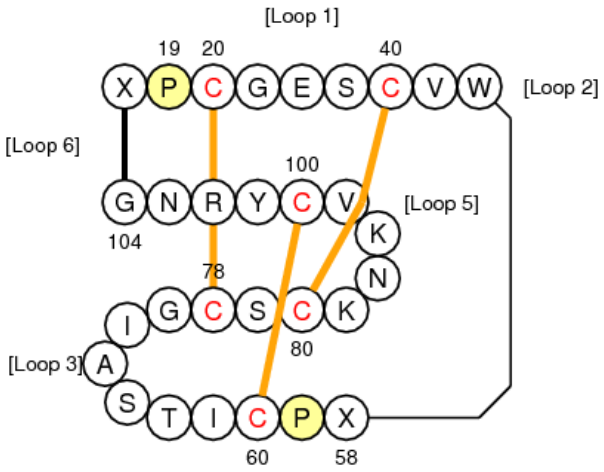
diferenciar os resíduos de leucina e isoleucina, grifados em verde na tabela 12, é possível afirmar que o ciclotídeo F_{20-2} é inédito e foi chamado **Nor B**.

A análise de aminoácidos comprovou que a molécula tem três isoleucinas e uma leucina. No entanto, não foi possível conhecer as posições que cada uma ocupa na sequência primária. Outras análises precisam ser feitas para esclarecer está incógnita.

Tabela 12 - Comparação das sequências dos ciclotídeos F_{20-2} e Viba-9.

Ciclotídeo	M.M	Sequência
F_{20-2}	3180,416 Da	CGESCVWXPCXTSAXGCSCKNKVCYRNGXP
Viba-9	3180,43 Da	CGESCVWIPCISSAIGCSCKNKVCYRKGIP

Figura 63 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo F_{20-2}.



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

4.7.5 Substância F_{17-1} (Nor D)

A substância F_{17-1} foi obtida como um sólido branco. Seu cromatograma HPLC mostrou somente um único pico em 42,74 minutos (Figura 64) indicando o alto grau de pureza da amostra em estudo. O espectro de massas de alta resolução apresentou um íon *m*/z 3249,474 (Figura 65). A análise por espectrometria de massas da substância reduzida e alquilada comprovou a presença dos seis resíduos de cisteína, devido ao acréscimo de 348 Da, quando comparado à massa da substância natural (Figura 66). A busca de informações sobre a presente estrutura

na base de dados Cybase não identificou nenhum ciclotídeo com essa massa molecular, sugerindo que esta substância tenha uma estrutura ainda não descrita na literatura, ou inédita, sendo necessário um acurado estudo de confirmação estrutural por meio do sequenciamento, o qual foi realizado e é descrito a seguir.

Figura 64 - Cromatograma da substância $F_{17\text{-}1.}$
Programa: Gradiente 20-45% B em A em 60 min, 1 mL.min^{-1}, 55 $^{\circ}$C, 220 nm.

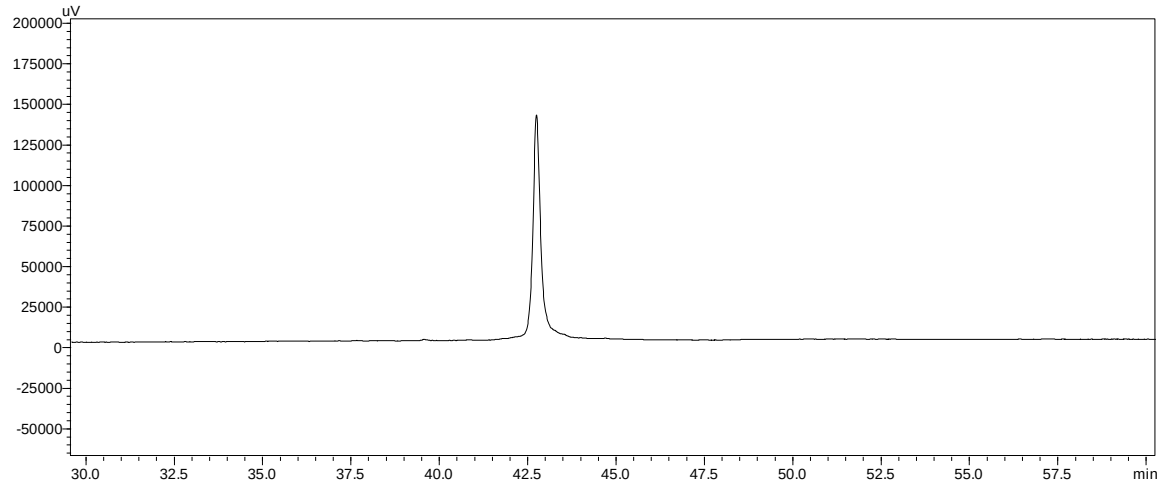


Figura 65 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{17\text{-}1.}$

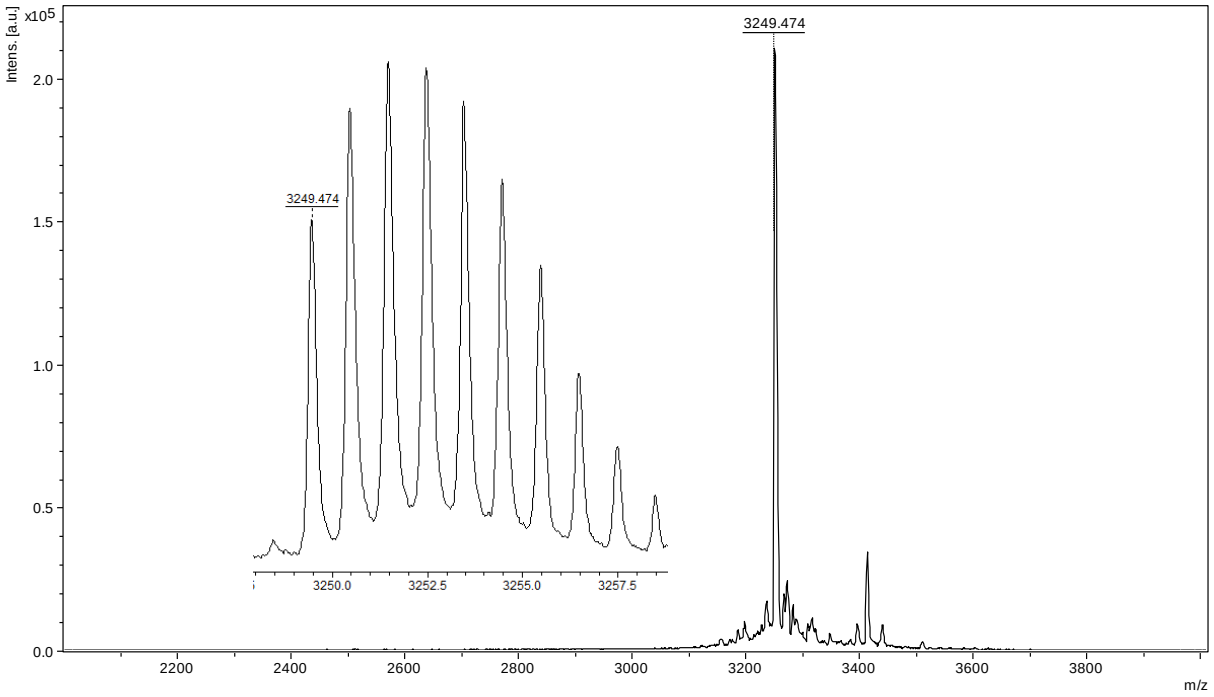
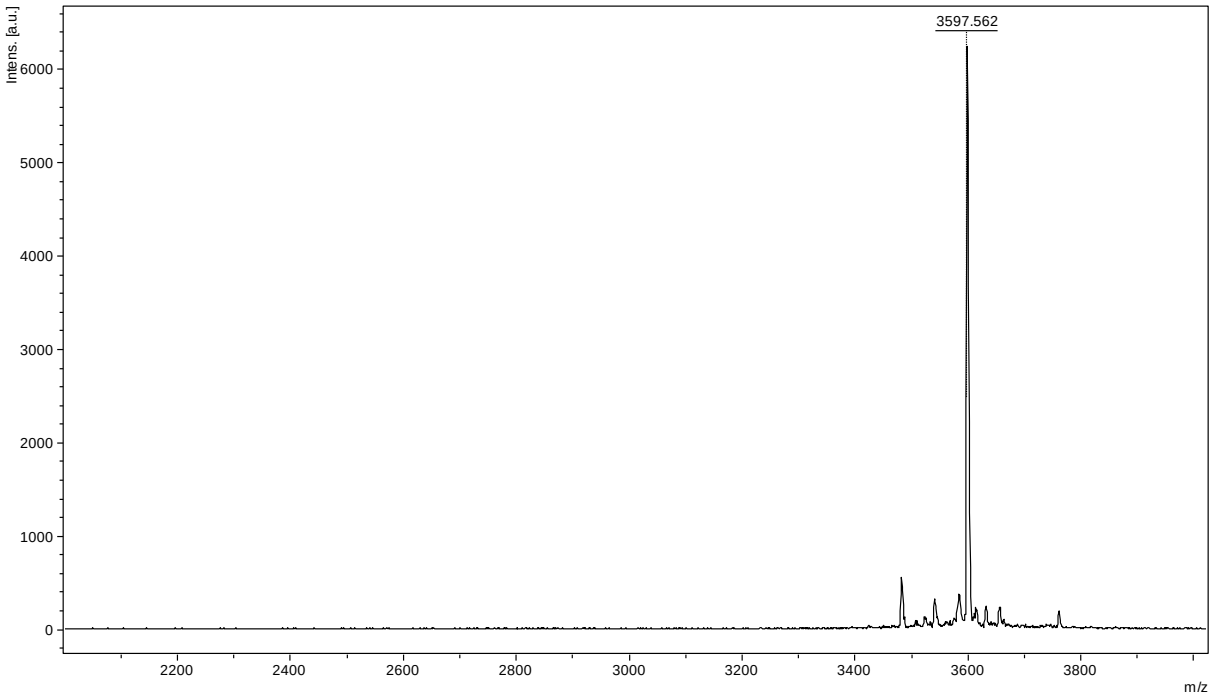


Figura 66 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{17\text{-}1}$ reduzida e alquilada.



A fração digerida com **endoGlu-C** apresentou um íon *m*/z 3615,665, referente à abertura do anel pelo extremo C-terminal do resíduo de ácido glutâmico (Glu, E) (Figura 67). O espectro de massas MS/MS (Figura 68) deste íon permitiu obter informações das sequências de aminoácidos dos *Loops 2*, *3*, *4* e *5* (Tabela 13, pág. 82).

Figura 67 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{17-1} digerida com endoGlu-C.

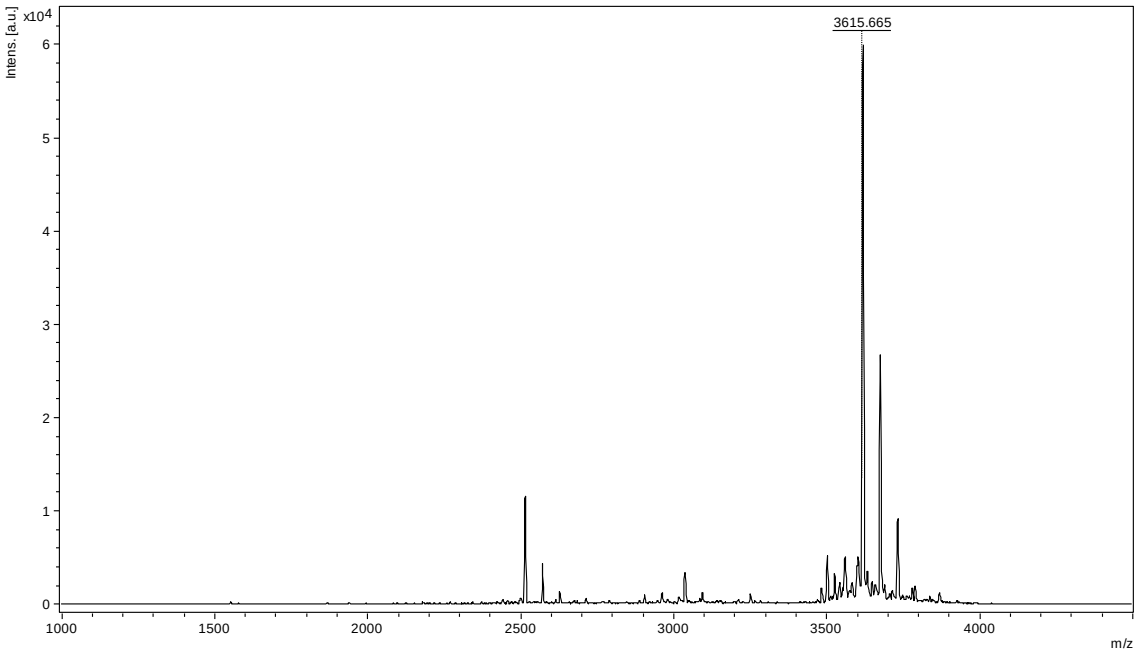
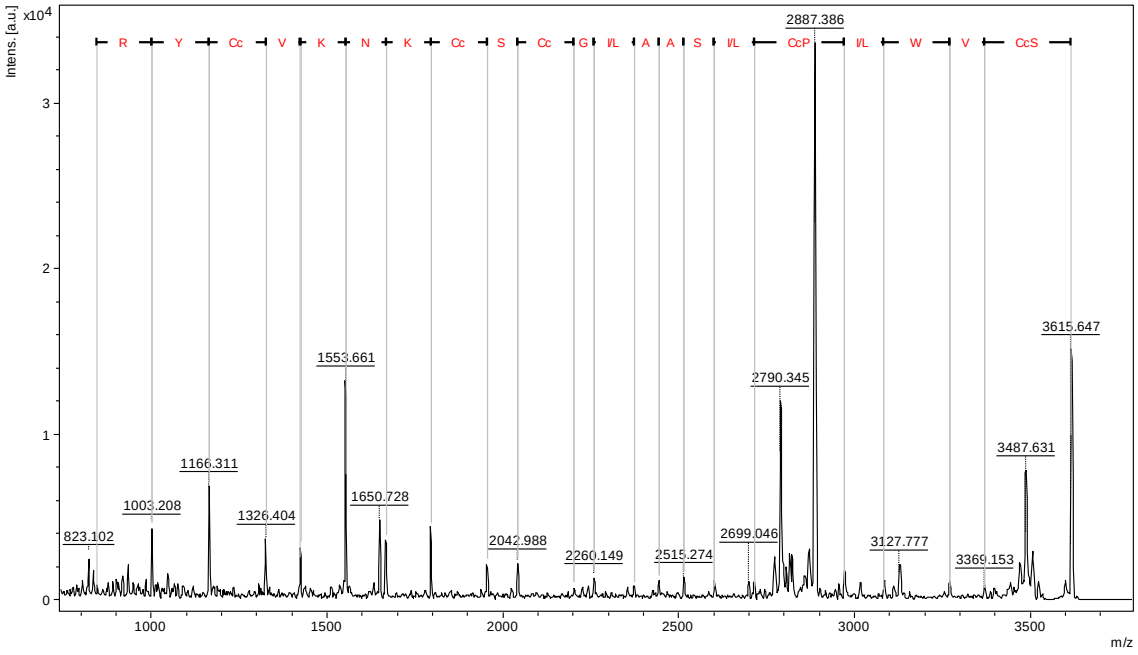
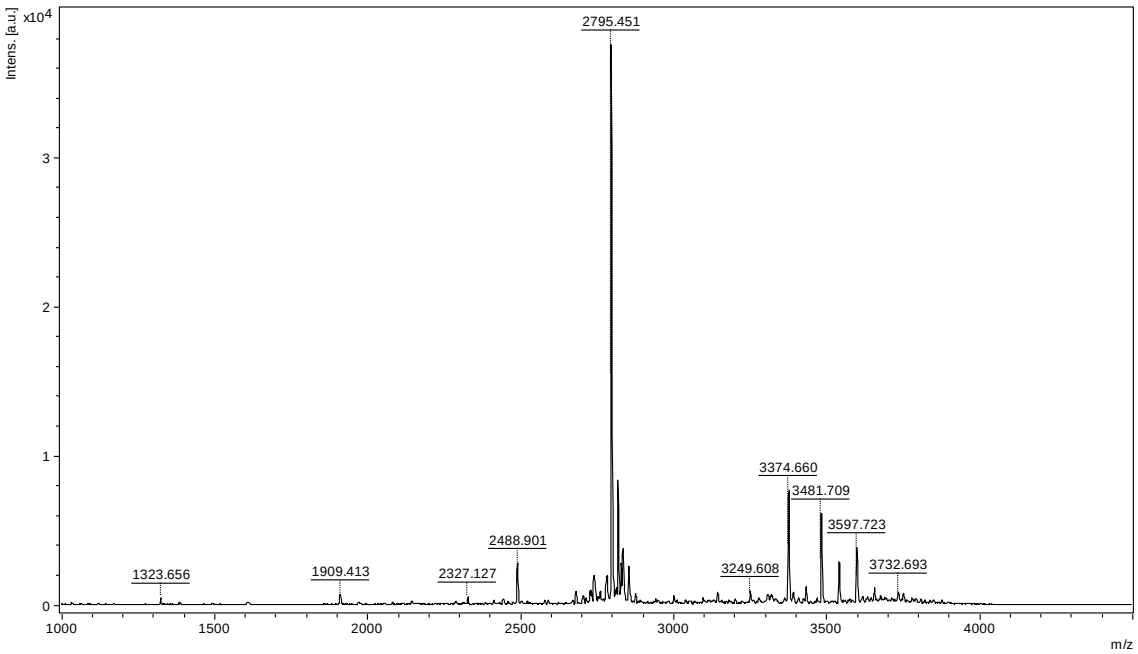


Figura 68 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 3615,647 oriundo da digestão com endoGlu-C da substância F_{17-1}.



A fração digerida com **tripsina** apresentou vários íons *m*/z 3374,660; 2795,451 e 2488,901 (Figura 69). O íon *m*/z 3374,660 refere-se à abertura do anel com perda de 241 Da, o qual pode ser atribuído à perda do fragmento $N^{22}K^{23}$ (*Loop 5*). Esse fragmento é oriundo da clivagem com tripsina de ciclotídeos pertencentes à subfamília dos braceletes.

Figura 69 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{17\text{-}1}$ digerida com tripsina.



O íon *m*/z 2796,175 permitiu obter informações sobre os resíduos de aminoácidos dos *Loops 1*, *2*, *3*, *4* e parte do *6* (Figura 70 e tabela 13, pág. 82).

Figura 70 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 2796,175 oriundo da digestão com tripsina da substância $F_{17\text{-}1}$.

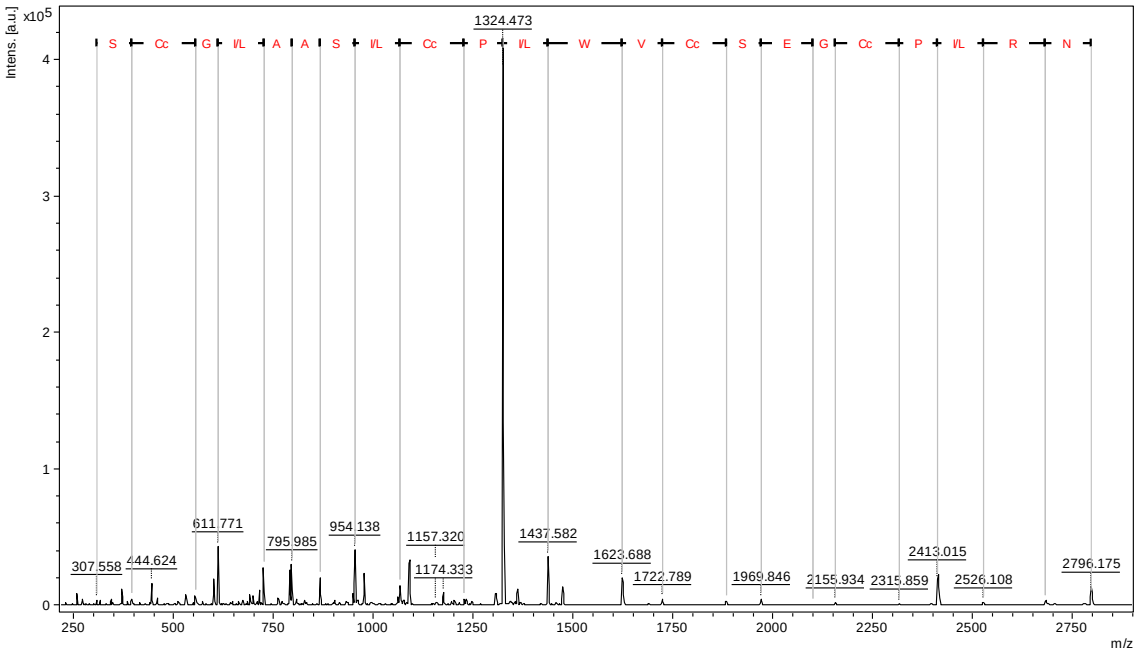
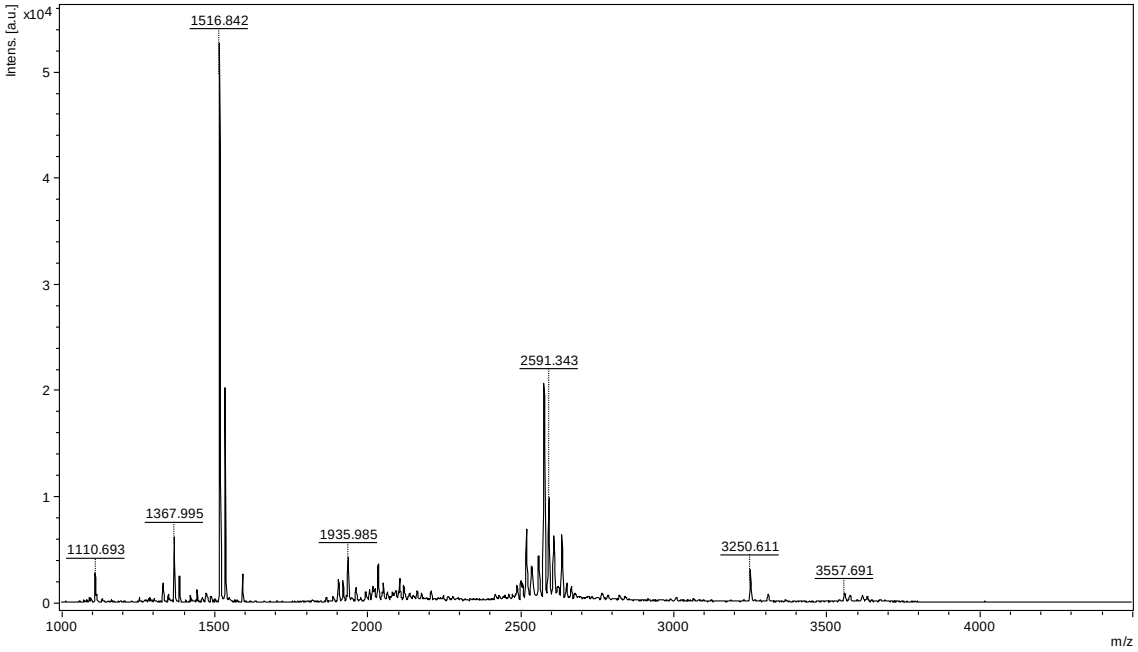


Figura 71 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{17\text{-}1}$ digerida com quimiotripsina.



O fragmento oriundo da digestão com quimiotripsina, íon *m*/z 2574 forneceu informações essenciais sobre a natureza dos resíduos do *Loop 3*, permitindo identificar ambos como isoleucinas (I^{11} e I^{15}) (Figura 72). Outros íons permitiram confirmar as sequências obtidas com as outras enzimas (Tabela 13).

Figura 72 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 2574 oriundo da digestão com quimiotripsina da substância $F_{17\text{-}1}$.

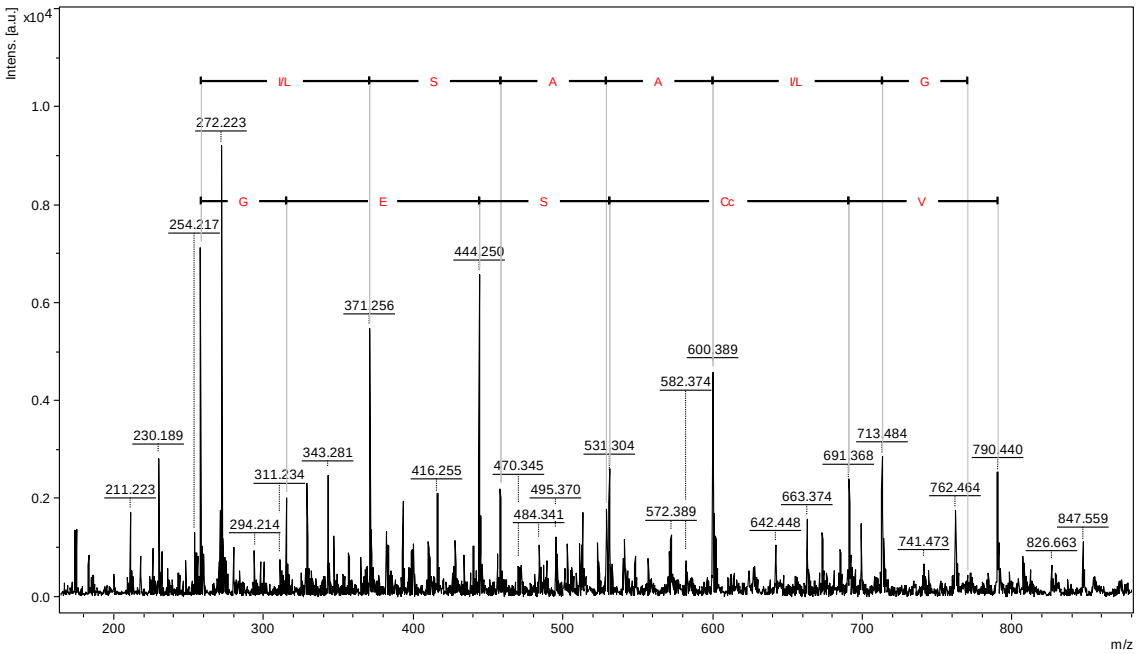


Tabela 13 - Sequências de aminoácidos identificados nos fragmentos da digestão enzimática da substância $F_{17\text{-}1}$.

Enzima	Íon *m/z*	Sequência
EndoGlu-C	3615,6	-S-C-V-W-X-P-C-X-S-A-A-X-G-C-S-C-K-N-K-V-C-Y-R-
Tripsina	2796,2	C-G-E-S-C-V-W-X-P-C-X-S-A-A-X-G-C-S-C- -N-R-X-P
Quimiotripsina	1516,8	C-G-E-S-C-V-W- -D-G-V-X-P
Quimiotripsina	2574	C-I-S-A-A-I-G-C

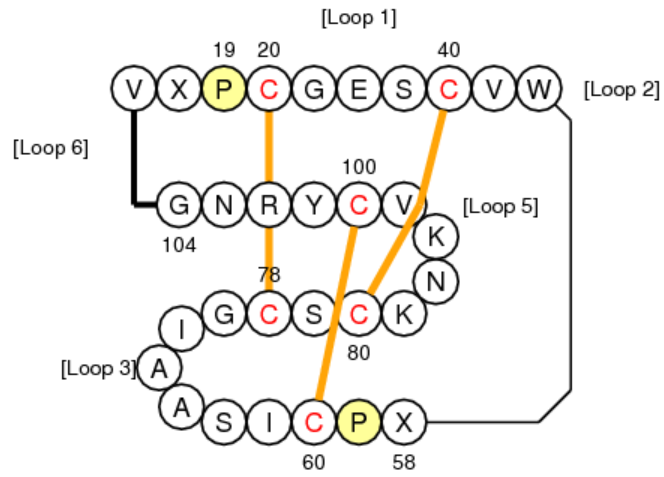
Sequência final	**C-G-E-S-C-V-W-X-P-C-I-S-A-A-I-G-C-S-C-K-N-K-V-C-Y-R-N-G-V-X-P**

Tabela 14 - Comparação das sequências dos ciclotídeos $F_{17\text{-}1}$ (Nor D) e Cycloviolin A.

Ciclotídeo	M.M	Sequência
$F_{17\text{-}1}$	3249,47 Da	CGESCVWXPCISSAIGCSCKNKVCYRNGVXP
Cycloviolin A	3209,44 Da	CGESCVFIPCISAAIGCSCKNKVCYRNGVIP

As análises anteriores corroboraram que a substância $F_{17\text{-}1}$ trata-se de um ciclotídeo com 31 resíduos de aminoácidos (Figura 73) e massa molecular 3249,474 Da. Comparando este ciclotídeo na base de dados Cybase (www.cybase.org.au) (WANG et al., 2008) com os demais isolados, observou-se que há um ciclotídeo com estrutura primária semelhante, a cycloviolin A, isolado da *Leonia cymosa* (Violaceae) (HALLOCK et al., 2000). No entanto mostrou, *a priori*, uma única diferença no resíduo de fenilalanina (Phe, F) na segunda posição do *Loop* 2 (ressaltado em amarelo na Tabela 14). Portanto, apesar de não poder diferenciar os resíduos de leucina e isoleucina (ressaltados em verde na Tabela 14) é possível afirmar que o ciclotídeo $F_{17\text{-}1}$ é inédito e foi nomeado **Nor D**. Outras análises precisarão ser feitas para esclarecer a natureza desses aminoácidos.

Figura 73 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo F_{17-1} (Nor D)



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

4.7.6 Substância F_{21-1} (Nor E)

A substância F_{21-1} apresentou um perfil cromatográfico obtido por HPLC com a presença de um único pico em 50,17 minutos (Figura 74). Seu espectro de massas de alta resolução apresentou um íon *m*/z 3171,436 (Figura 75). Uma vez concluídas as reações de redução e acetamidação foi possível conferir o acréscimo de 348 Da (íon *m*/*z* 3519,507), que permitiu confirmar a presença das seis cisteínas características desta classe de substâncias (Figura 76).

Para o sequenciamento foram empregadas as mesmas enzimas e metodologias citadas anteriormente.

A análise por espectrometria de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância, uma vez concluída a digestão com endoproteinase de ácido glutâmico, mostrou um íon *m*/*z* 3537,557 característico da abertura do anel pelo extremo C-terminal do resíduo de ácido glutâmico conservado no *Loop 1*. Esse íon foi submetido a análise por MS/MS com o qual foi possível obter informações sobre os resíduos correspondentes aos *Loops 1*, *5* e *6* (Figura 77).

No caso da tripsina se observou o íon *m*/*z* 3295,574 o qual foi analisado e sendo proposta a sequência mostrada na figura 78.

A amostra digerida com quimiotripsina forneceu o íon m/z 2768,431 (Figura 79). O espectro MS/MS deste permitiu identificar o resíduo da posição 26 do *Loop 6* como isoleucina (I^{26}) já que não foi observada clivagem nesta posição. Entretanto,

não foi possível diferenciar os resíduos das posições 11 e 14 do *Loop 3* (ressaltados em verde na tabela 15, pág. 87) e das posições 8 e 29 dos *Loops 2* e *6*, respectivamente. Isto porque tais resíduos encontram-se ao lado de prolina (ressaltados em amarelo na tabela 15, pág. 87). Para esclarecer a natureza desses aminoácidos será necessária a realização de outros experimentos tais como: análise de aminoácidos, sequenciamento químico e/ou ressonância magnética nuclear.

Figura 74 - Cromatograma da substância $F_{21\text{-}1}$.
Programa: Gradiente 20-45% B em A em 60 min, 1 mL.min^{-1}, 55°C, 50 µL, 220 nm.

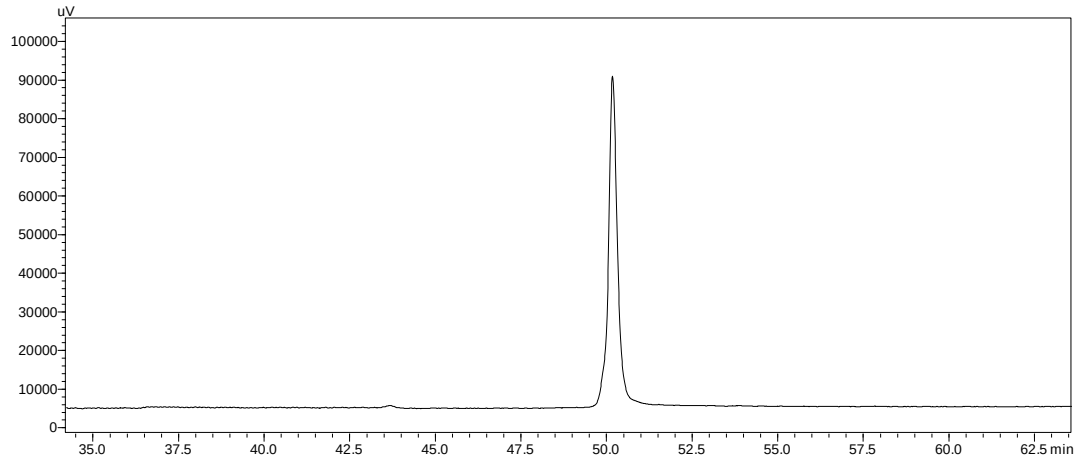


Figura 75 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{21\text{-}1}$.

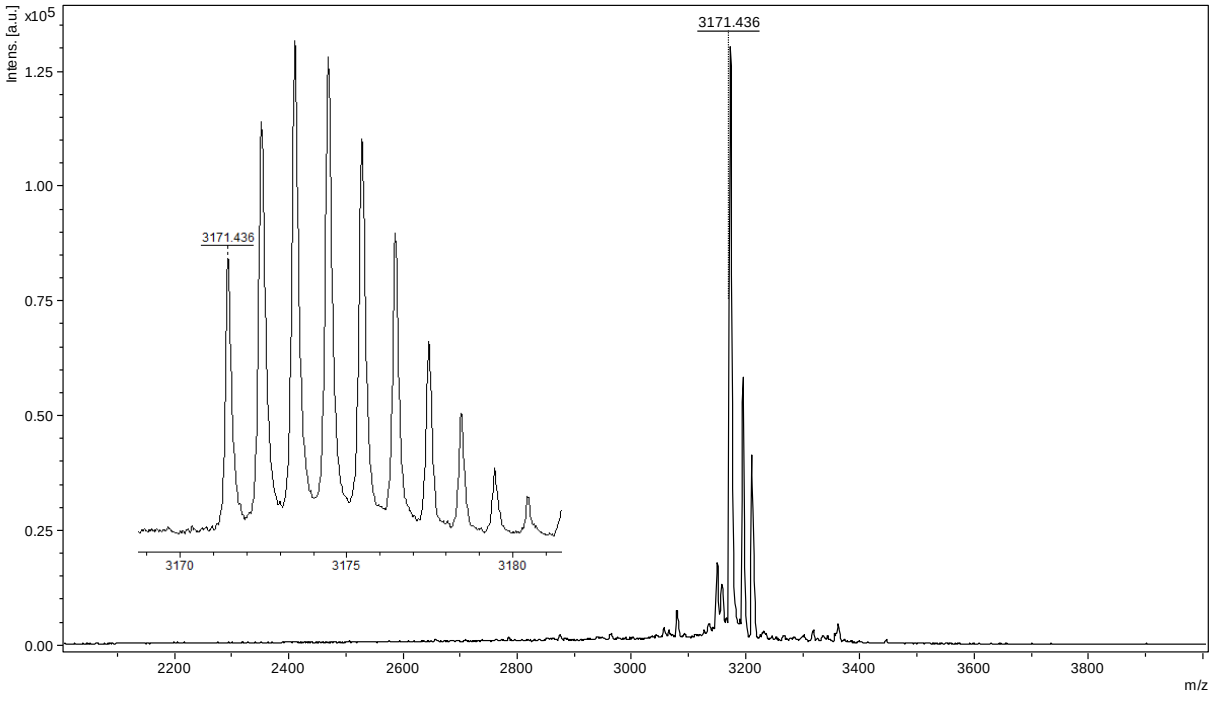


Figura 76 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{21\text{-}1}$ reduzida e alquilada.

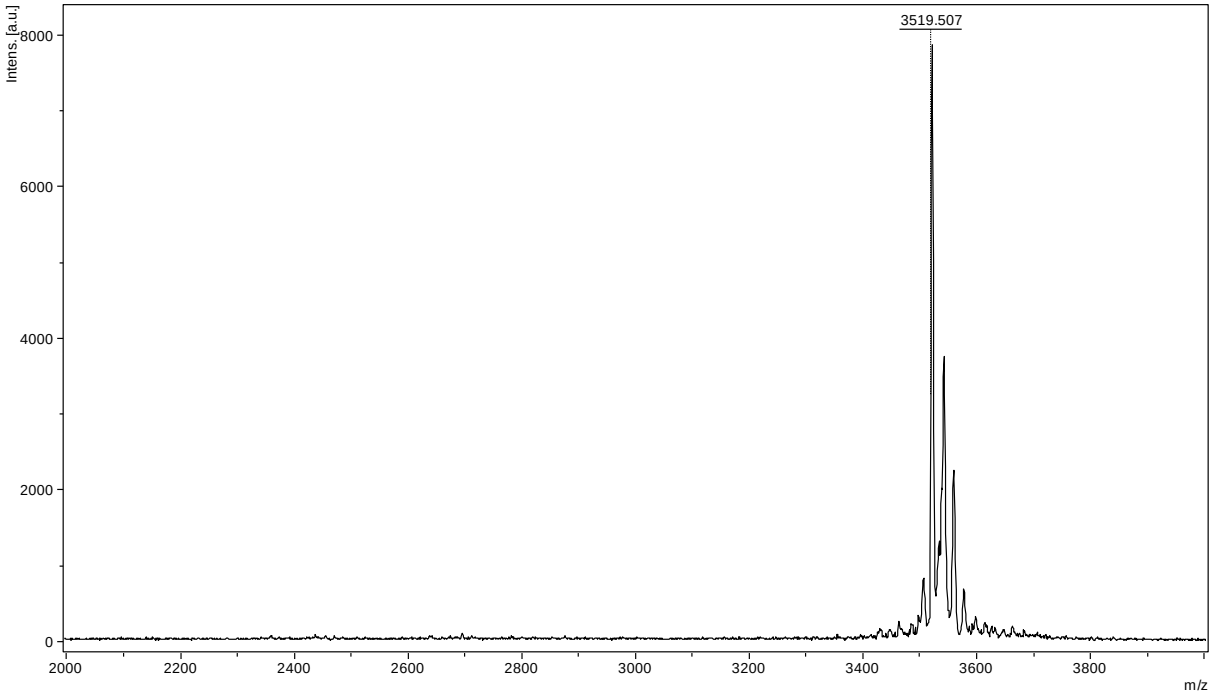


Figura 77 - Espectro MS/MS do íon *m/z* 3537,557 oriundo da digestão com EndoGlu-C da substância $F_{21\text{-}1}$.

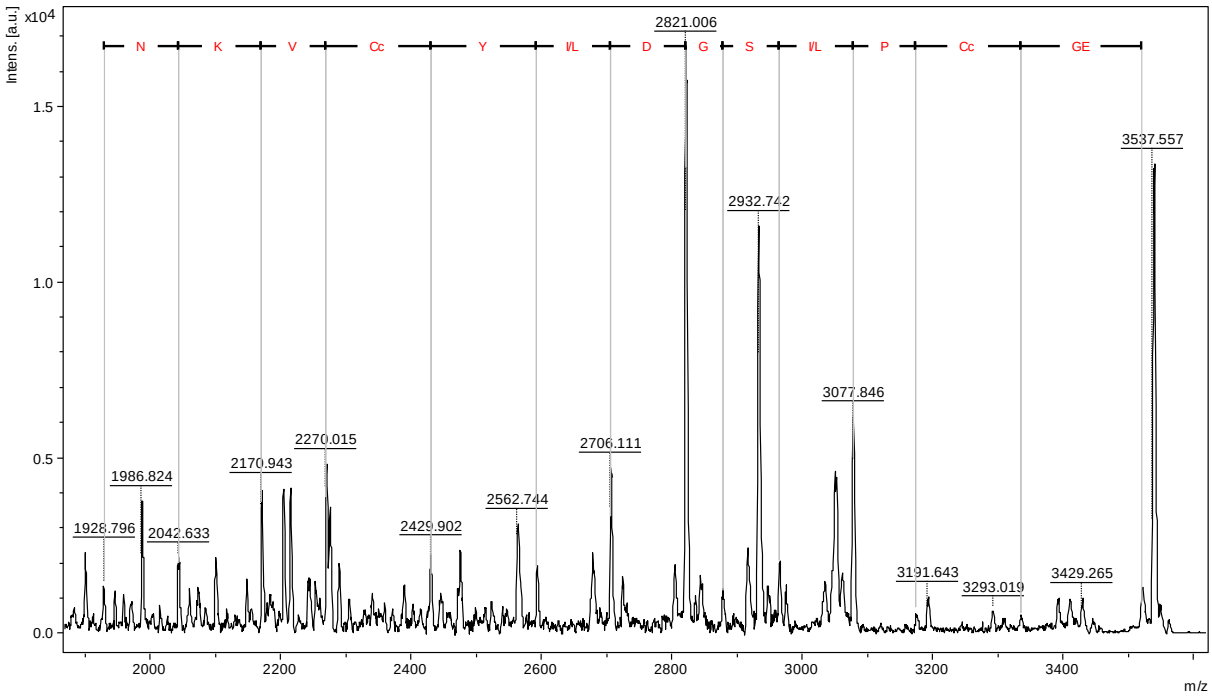


Figura 78 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 3295,574 oriundo da digestão com tripsina da substância $F_{21\text{-}1}$.

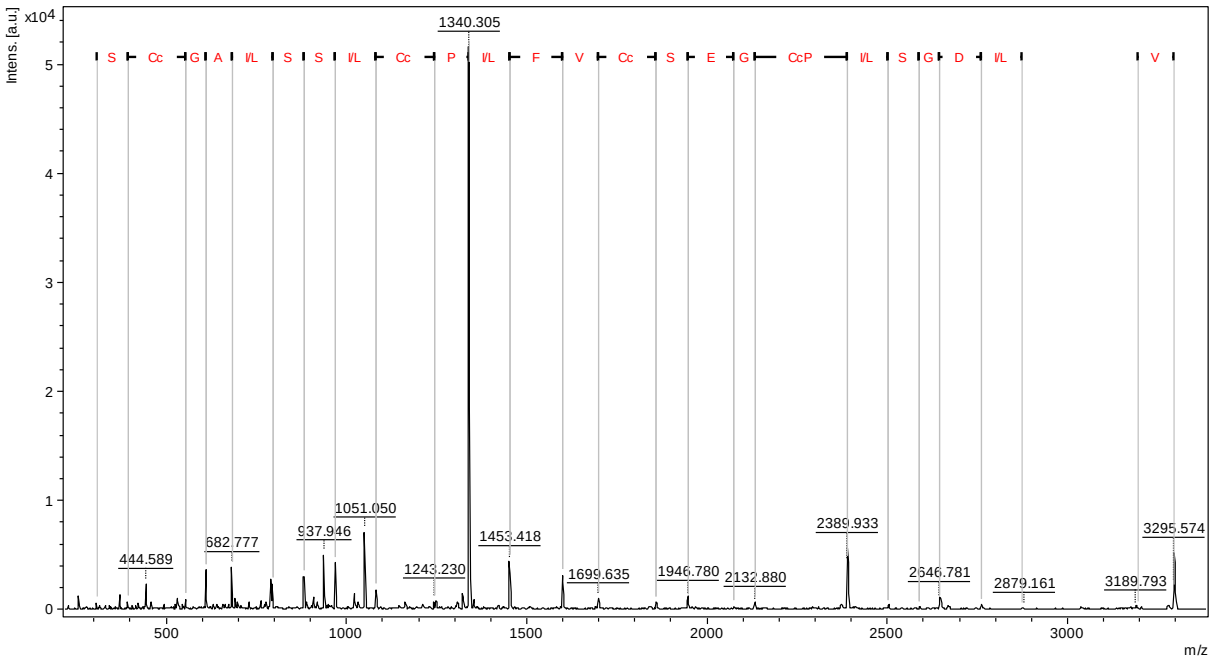


Figura 79 - Espectro MS/MS do íon *m*/z 2768,431 oriundo da digestão com quimiotripsina da substância $F_{21\text{-}1}$.

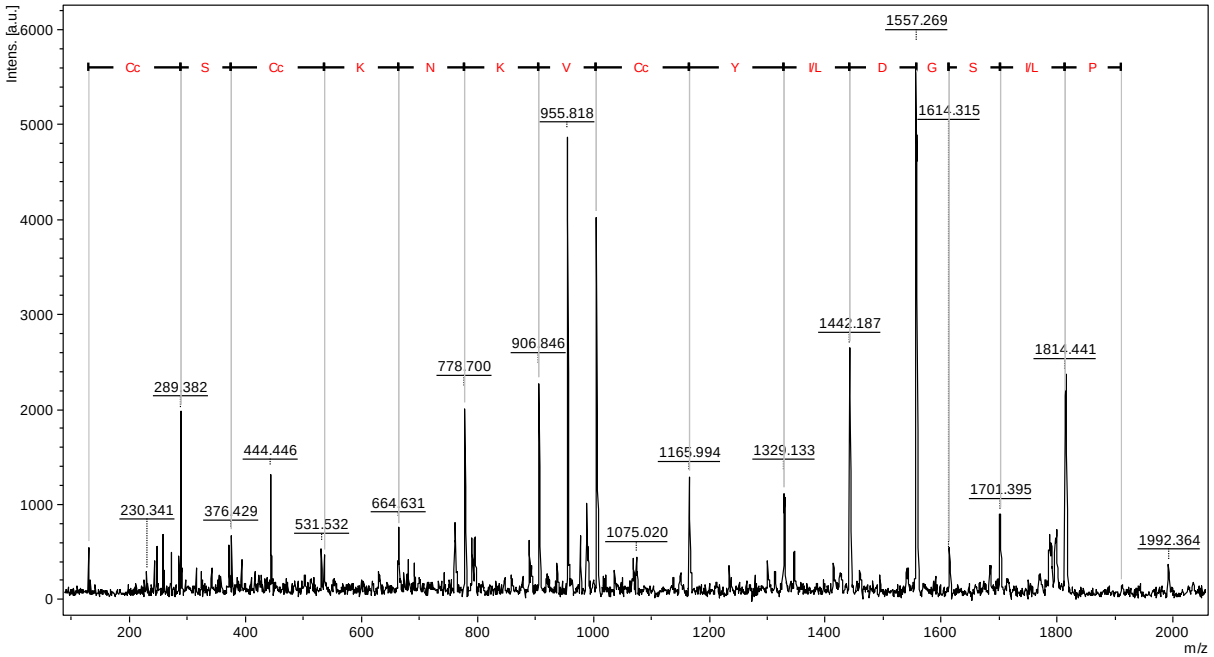


Tabela 15 - Sequências de aminoácidos identificados nos fragmentos da digestão enzimática da substância $F_{21\text{-}1}$.

Enzima	Íon *m/z*	Sequência
EndoGlu-C	3537,557	C-G-E- -N-K-V-C-Y-X-D-G-S-X-P
Tripsina	3295,574	C-G-E-S-C-V-F-X-P-C-X-S-S-X-A-G-C-S-C- -X-D-G-S-X-P
Quimiotripsina	2768,431	C-G-E-S-C-V-W- -C-S-C-K-N-K-V-C-Y-I-D-G-S-X-P

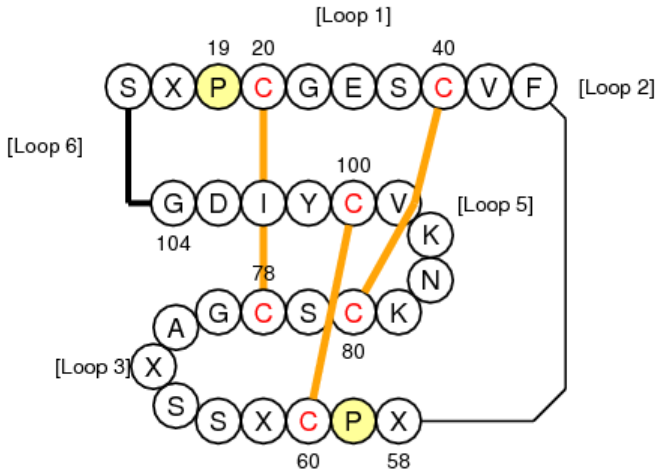
Sequência final	**C-G-E-S-C-V-F-X-P-C-X-S-S-X-A-G-C-S-C-K-N-K-V-C-Y-I-D-G-S-X-P**

As análises anteriores corroboraram que a substância $F_{21\text{-}1}$ trata-se de um ciclotídeo com 31 resíduos de aminoácidos (Figura 80) e massa molecular 3171,436 Da. A ausência do resíduo de prolina no *Loop 5* indica que este pertence a família dos braceletes. A procura na literatura (bases de dados: SciFinder®, Web of science e Cybase) mostrou dois ciclotídeos com a mesma massa molecular, viphi A e viphi G isolados da espécie *Viola philippica* (HE et al., 2011) (Tabela 16). Mesmo não sendo possível diferenciar os resíduos de leucina e isoleucina (representados com letra X) é possível afirmar que o ciclotídeo $F_{21\text{-}1}$ é inédito já que apresenta diferenças nos resíduos das posições 15, 26 e 27 (ressaltados em azul na tabela 16). Ele foi nomeado **Nor E**.

Tabela 16 - Comparação das sequências dos ciclotídeos $F_{21\text{-}1}$ (Nor E), viphi A e viphi G.

Ciclotídeo	M.M	Sequência
$F_{21\text{-}1}$	3170,436 Da	**C**GES**C**VFXP**C**XSSXAG**C**S**C**KNKV**C**YIDGSXP
Viphi A	3170,42 Da	**C**GES**C**VFIP**C**ISSVIG**C**S**C**KSKV**C**YKNGSIP
Viphi G	3170,38 Da	**C**GES**C**VFIP**C**ISAIIG**C**S**C**SNKV**C**YKNGSIP

Figura 80 - Estrutura de *Collier de perles* do ciclotídeo Nor E.



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

4.8 Fracionamento do extrato de folhas (Fração 80% C_{18} folhas)

Após análise semipreparativa, seguindo as condições descritas na seção 3.3.2, as frações foram reanalisadas por HPLC em escala analítica, empregando o mesmo programa de eluição do fracionamento e por Espectrometria de Massas MALDI-(+)-TOF-MS, de acordo ao item 3.4. Aquelas que apresentaram semelhanças foram reunidas.

As frações F_1, F_2 e F_3 (Figuras 81, 83 e 85 respectivamente) foram selecionadas, pois as mesmas continham os compostos majoritários do extrato, além de serem aquelas que apresentavam maior quantidade de massa (Tabela 17).

Tabela 17 - Massas obtidas no HPLC semipreparativo para as frações advindas de folhas de *N. orchidiflora*.

Fração	Massa (mg)	Íons *m/z* *
F_1	7,0	3171,272; 3193,152; 3209,167
F_2	4,0	3149,377; 3171,272; 3193,297; 3209,258
F_3	3,5	3154,254; 3176,201; 3282,601

* Aqueles com intensidade maior que 0,5 x 10^5 a.u

Figura 81 - Cromatogramas da fração F_1 (azul) e do extrato de folhas (preto) Programa: Gradiente 5-40% em 10 min, 40-48% B em A em 16 min, 1 $mL.min^{-1}$, 50 µL, 55 °C, 220 nm. Coluna: Kromasil®, C_{18}, 250 x 4,6 mm, 5 µm, 300 Å.

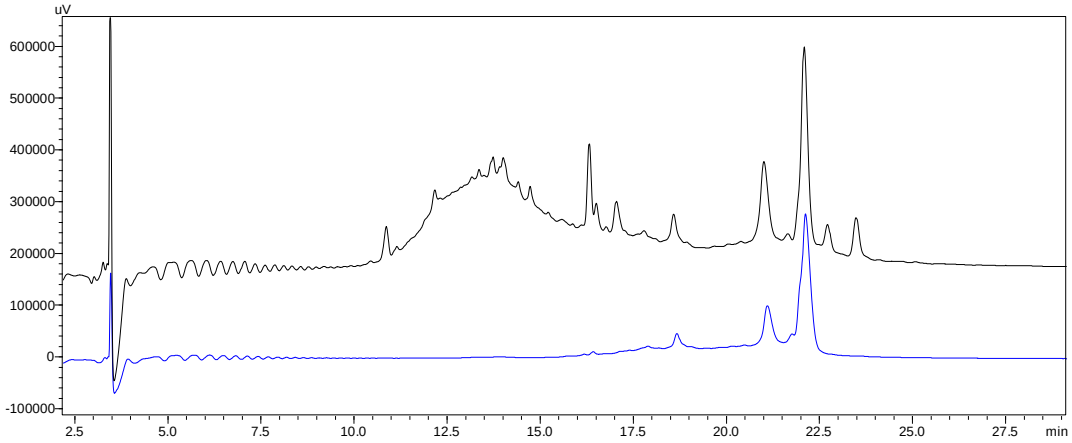


Figura 82 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da fração F_1.

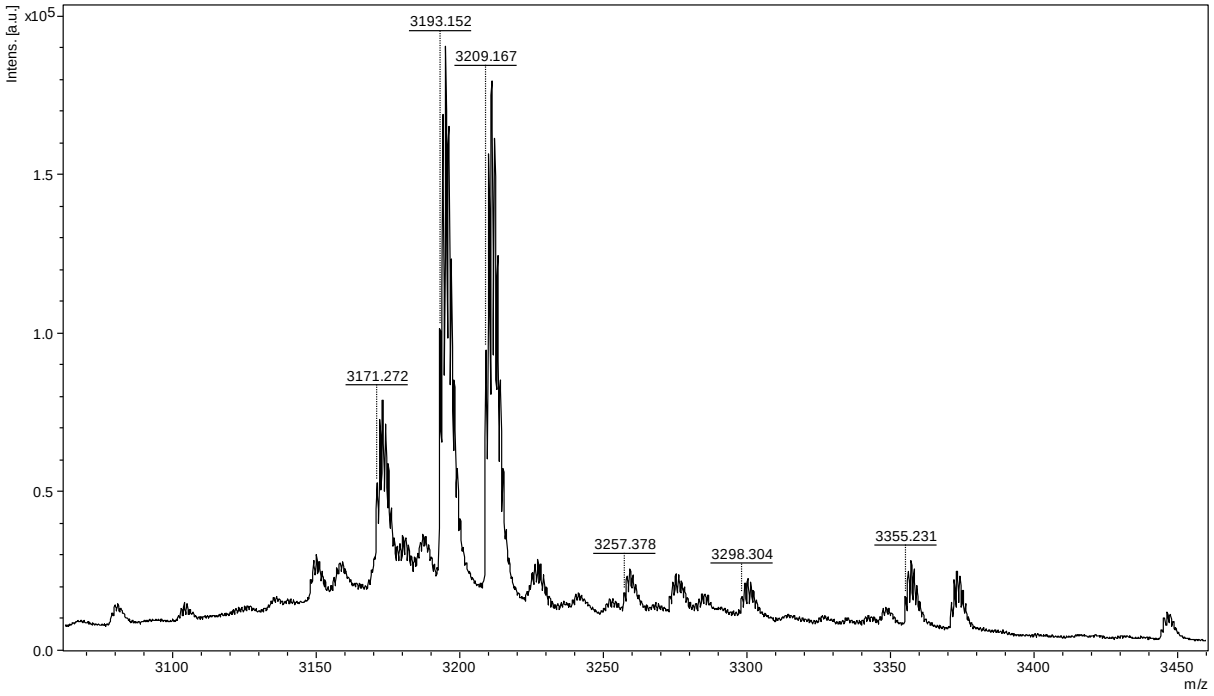


Figura 83 - Cromatogramas da fração F_2 (vermelho) e do extrato de folhas (preto) Programa: Gradiente 5-40% em 10 min, 40-48% B em A em 16 min, 1 mL.min^{-1}, 50 µL, 55 °C, 220 nm. Coluna: Kromasil®, C_{18}, 250 x 4,6 mm, 5 µm, 300 Å.

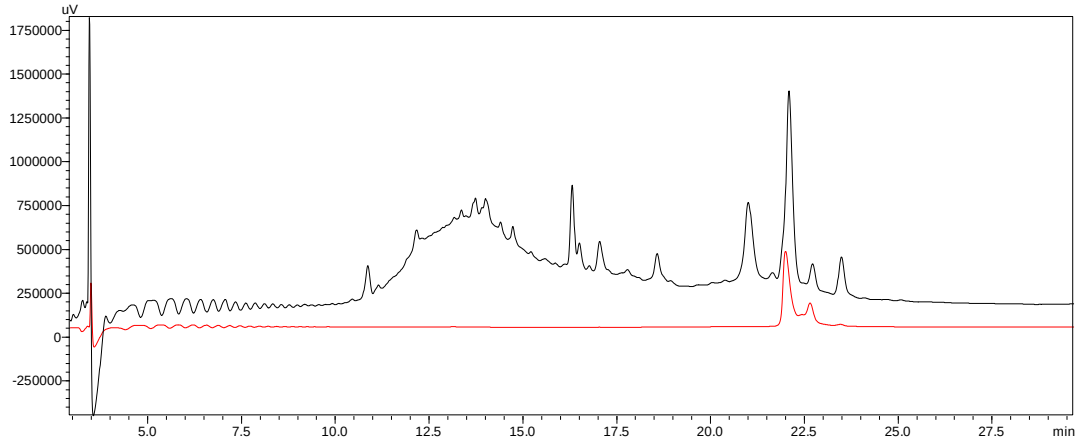


Figura 84 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da fração F_2.

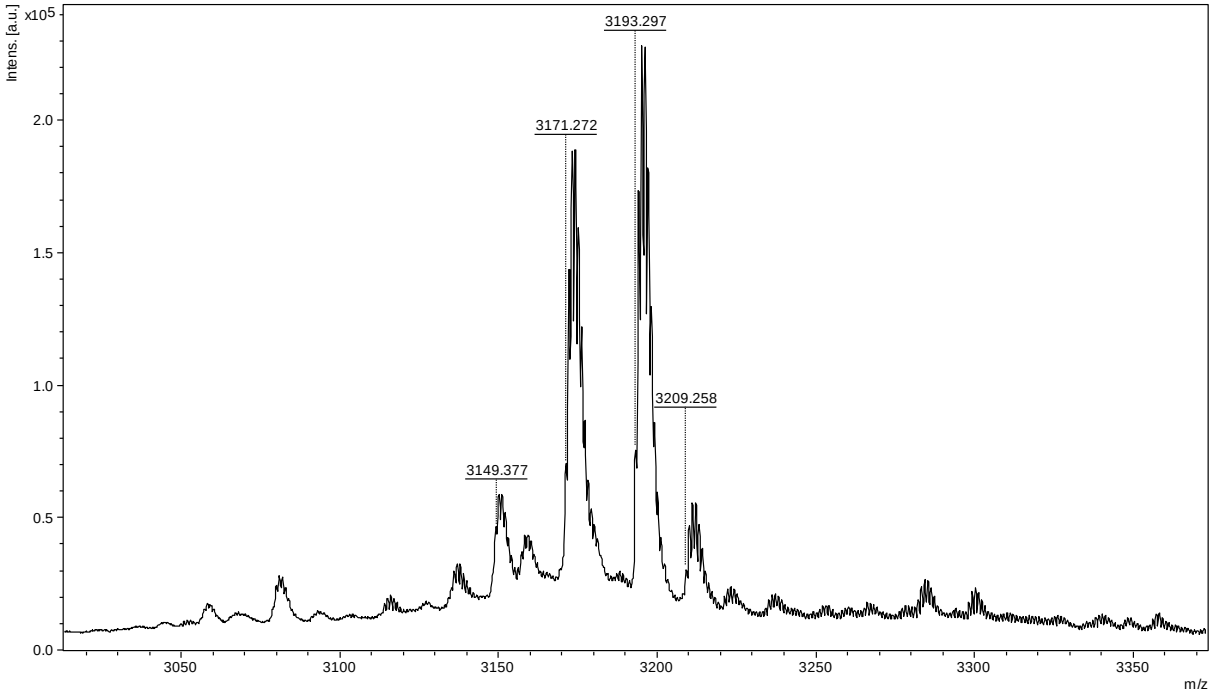


Figura 85 - Cromatogramas da fração F_3 (verde) e do extrato de folhas (preto)
Programa: Gradiente 5-40% em 10 min, 40-48% B em A em 16 min, 1 $mL.min^{-1}$, 50 µL, 55 °C, 220 nm. Coluna: Kromasil®, C_{18}, 250 x 4,6 mm, 5 µm, 300 Å.

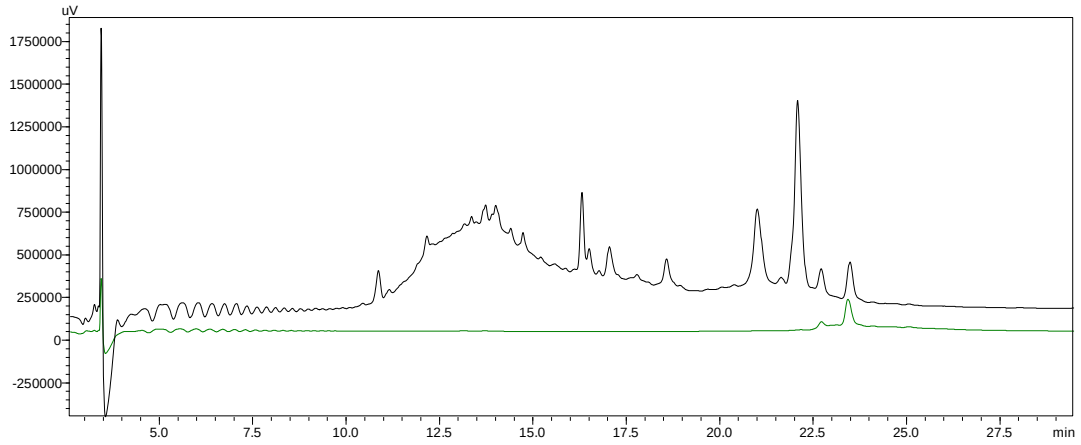
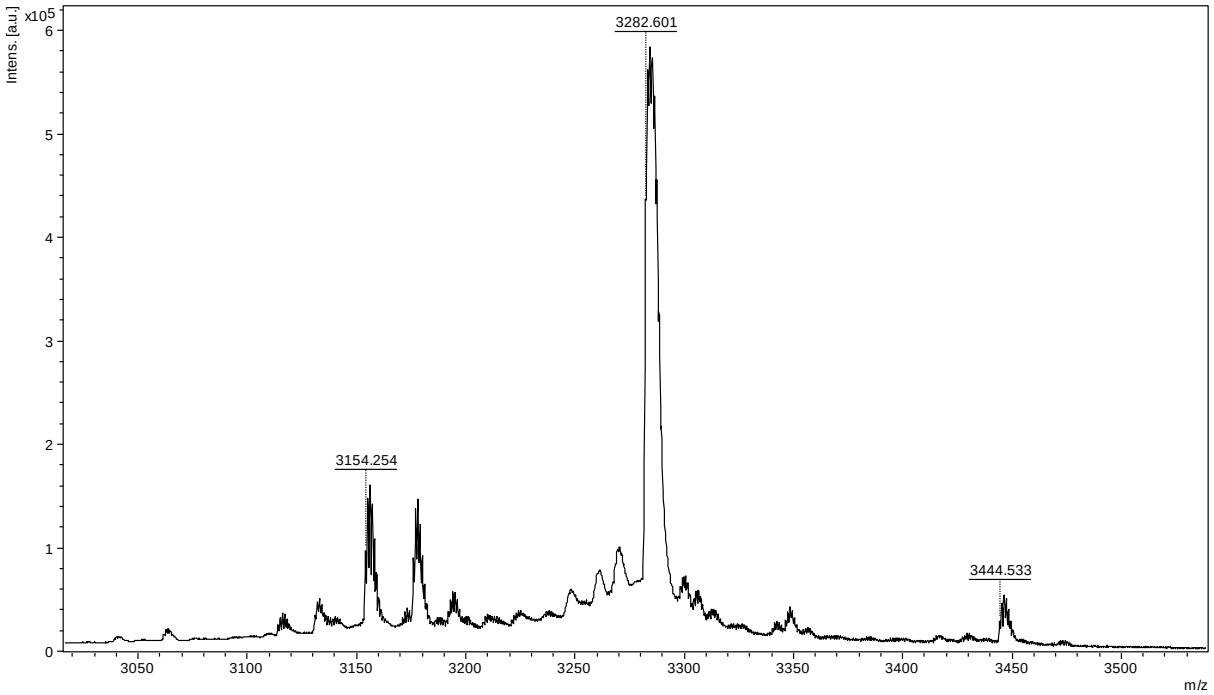


Figura 86 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da fração F_3.



4.9 Análises das substâncias isoladas no HPLC semipreparativo do extrato de folhas de *N. orchidiflora*.

As frações F_1 e F_3 foram submetidas à purificação seguindo as condições descritas na seção 3.6. O procedimento permitiu a obtenção de três substâncias puras: $F_{1\text{-}1}$, $F_{3\text{-}1}$, e $F_{3\text{-}2.}$ Estas foram encaminhadas para reações de redução/alquilação e digestão enzimática com posterior análise por Espectrometria de Massas MALDI-(+)-TOF-MS e MS/MS, para seu sequenciamento.

4.9.1 Substância $F_{1\text{-}1}$

A purificação da fração F_1 permitiu obter uma substância de cor branca, seu espectro de massas mostrou um íon *m*/*z* 3171,470 Da (Figura 87), e seu cromatograma mostrou um único pico eluindo aos 27,9 minutos (Figura 88). Além disso o espectro de massas da substância reduzida e alquilada confirmou a presença das seis cisteínas (Figura 89). O sequenciamento permitiu comprovar que sua estrutura era a mesma da substância $F_{21\text{-}1}$ (Nor E). Esta substância corresponde ao composto majoritário do extrato de folhas (Figura 88).

Figura 87 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{1\text{-}1}$.

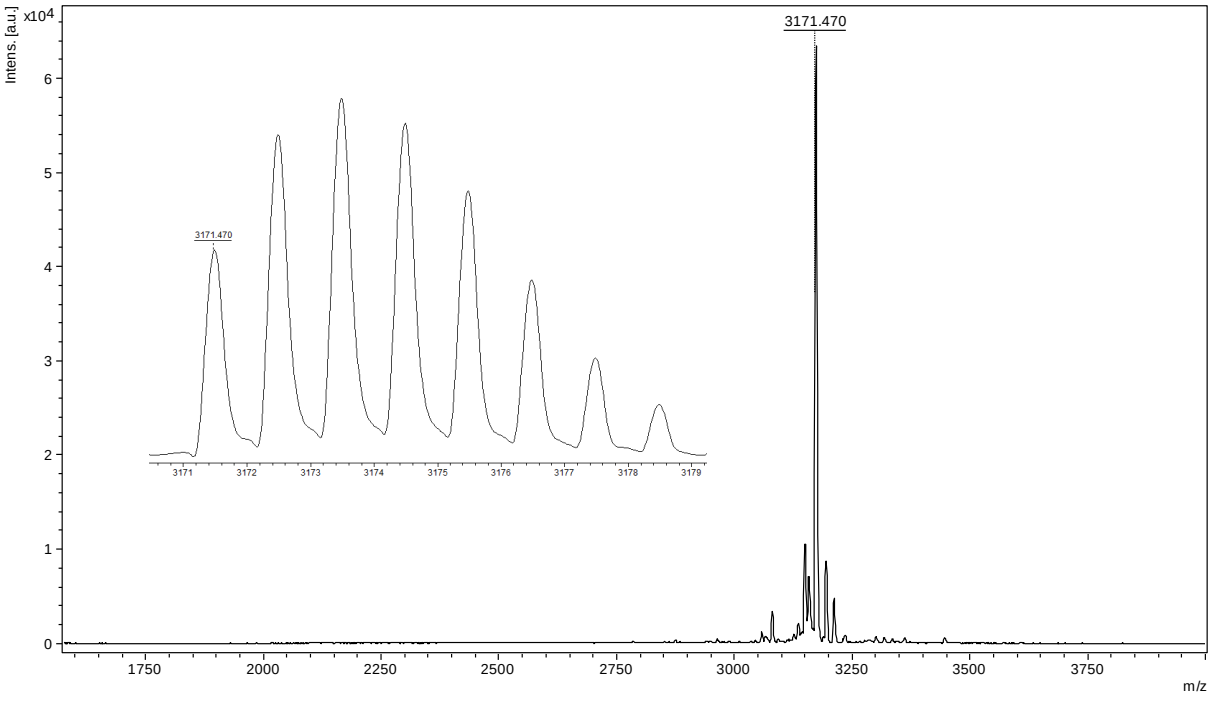


Figura 88 - Cromatogramas do extrato de Folhas (preto) e F_{1-1} (vermelho).
Programa: Gradiente 5-34% em 10 min, 34-41% B em A em 28 min, 1 $mL.min^{-1}$, 55 °C, 50 µL, fase móvel com ácido fórmico. Coluna: Kromasil®, C_{18}, 250 x 4,60 mm, 5 µm, 300 Å

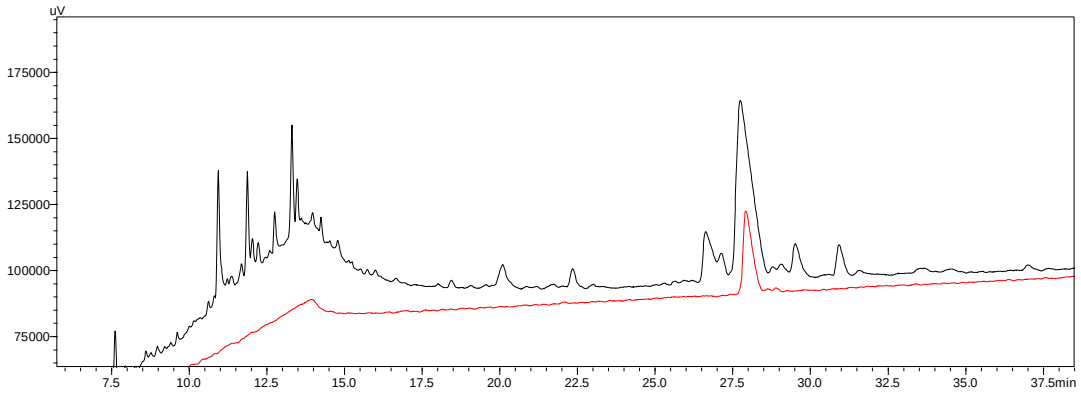
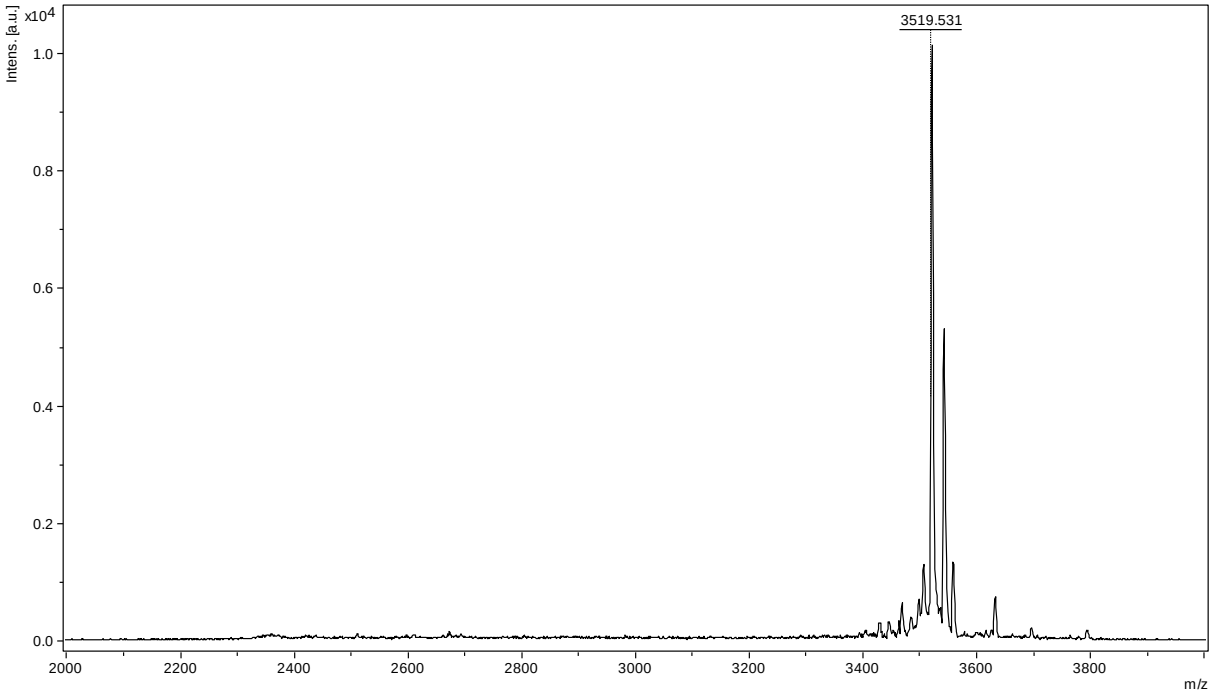


Figura 89 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{1-1} reduzida e alquilada.



4.9.2 Substância F_{3-1}

A substância F_{3-1} foi obtida como um sólido branco, seu cromatograma HPLC mostrou um único pico em 26,7 minutos (Figura 90). Seu espectro de massas apresentou um íon *m*/z 3282,529 Da (Figura 91). A redução e alquilação da substância com posterior análise por MALDI-(+)-TOF-MS permitiram comprovar o acréscimo de 348 Da, confirmando assim a presença das seis cisteínas (Figura 92). Para este composto o sequenciamento não foi finalizado.

Figura 90 - Cromatogramas do extrato de Folhas (preto) e F_{3-1} (azul).
Programa: Gradiente 5-34% em 10 min, 34-41% B em A em 28 min, 1 mL.min^{-1}, 55 °C, 50 µL, fase móvel com ácido fórmico. Coluna: Kromasil®, C_{18}, 250 x 4,60 mm, 5 µm, 300 Å.

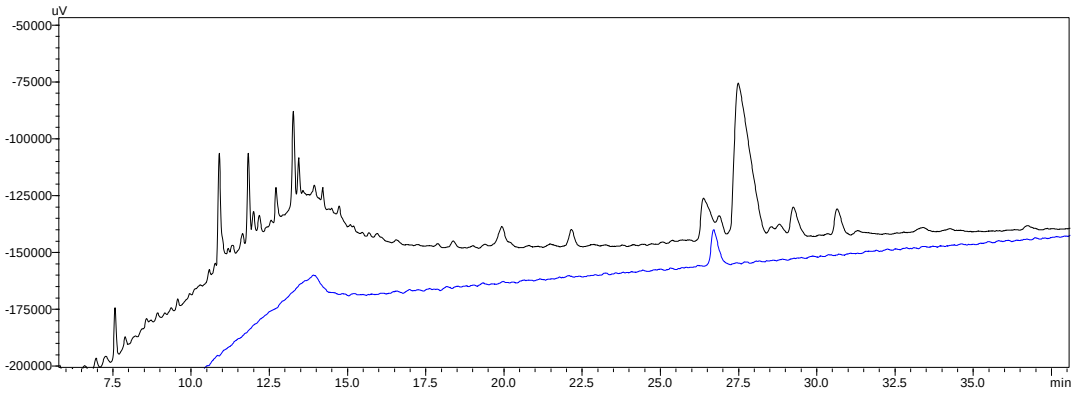


Figura 91 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{3-1}.

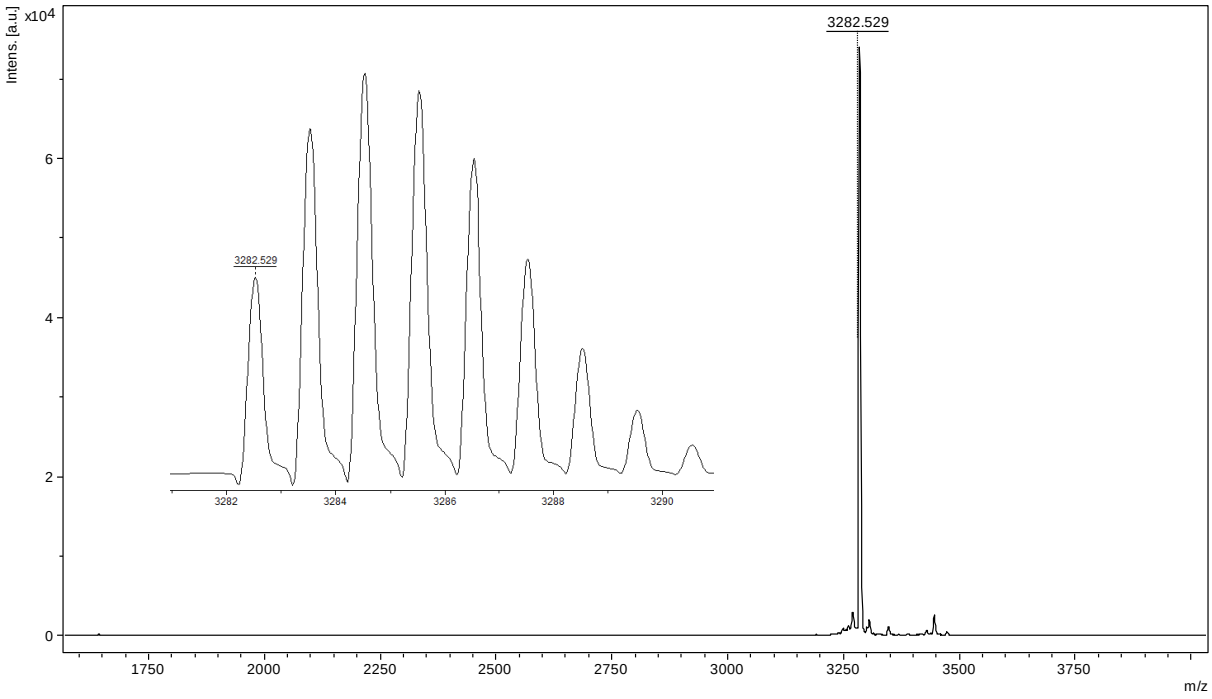
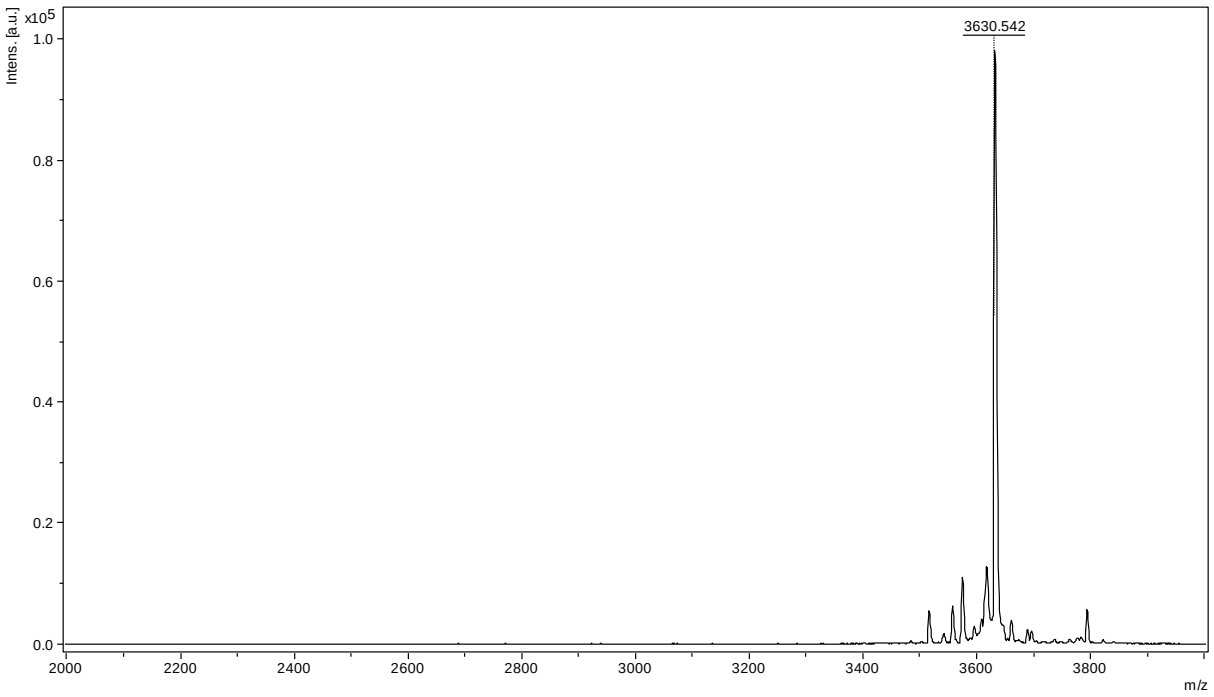


Figura 92 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância F_{3-1} reduzida e alquilada.



4.9.3 Substância F_{3-2}

A substância F_{3-2} foi obtida como um sólido branco, seu cromatograma HPLC mostrou um único pico em 30,7 minutos (Figura 93). Seu espectro de massas apresentou um íon *m*/z 3154,333 Da (Figura 94). Não foi possível realizar o espectro de massas da substância reduzida e alquilada. O sequenciamento não foi finalizado.

Figura 93 - Cromatogramas do extrato de Folhas (preto) e F_{3-2} (laranja).
Programa: Gradiente 5-34% em 10 min, 34-41% B em A em 28 min, 1 mL.min^{-1}, 55 °C, 50 µL, fase móvel com ácido fórmico. Coluna: Kromasil®, C_{18}, 250 x 4,60 mm, 5 µm, 300 Å.

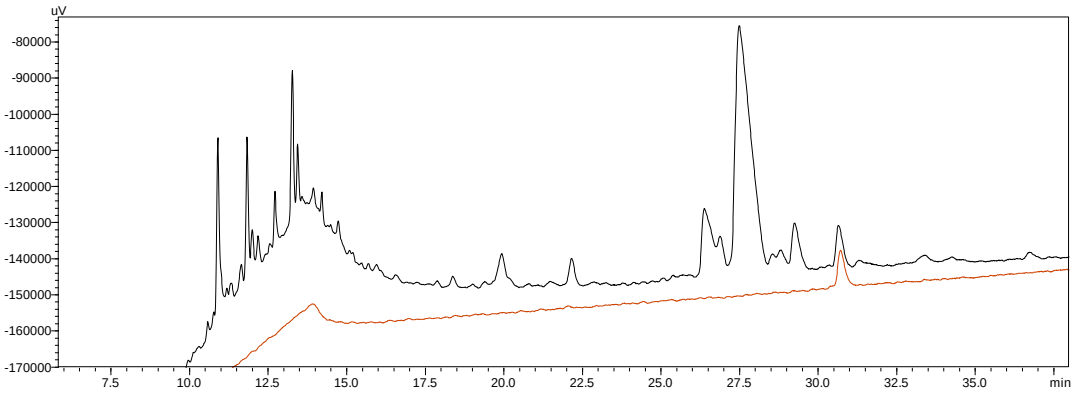
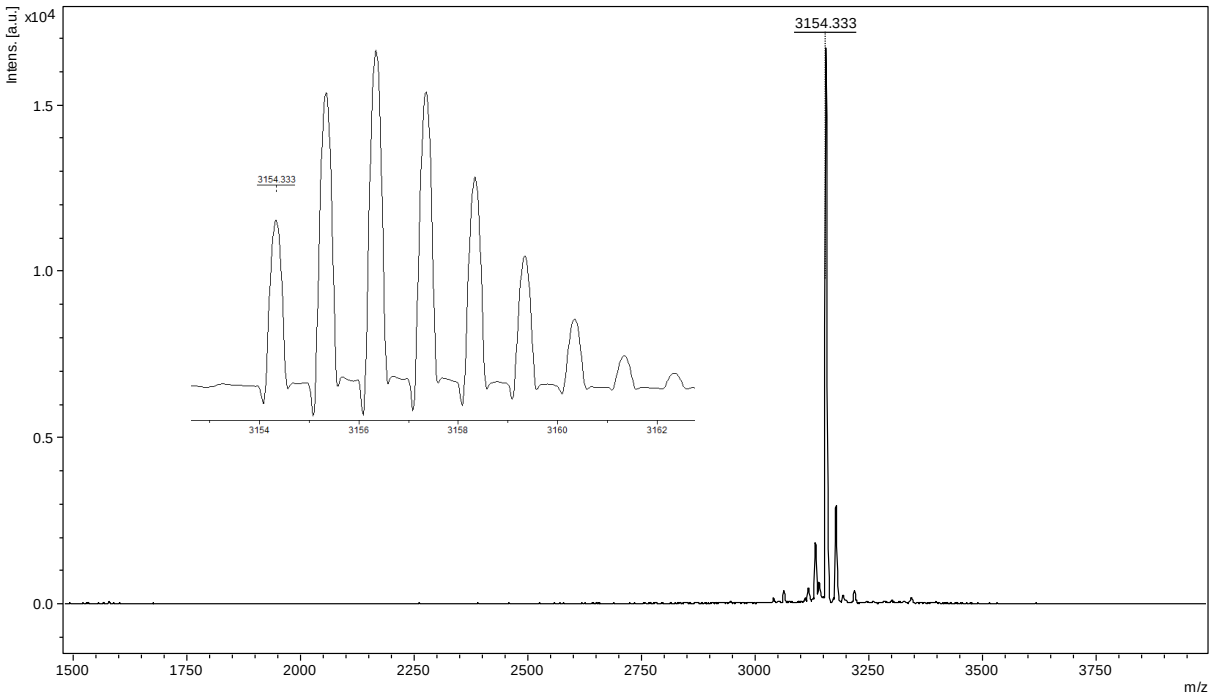


Figura 94 - Espectro de massas MALDI-(+)-TOF-MS da substância $F_{3\text{-}2}$.



5 CONCLUSÕES

O presente estudo contribui com o grupo NuBBE com mais dados sobre as pesquisas recentes com peptídeos de espécies de plantas brasileiras, recentemente em andamento sob a coordenação da professora Vanderlan Bolzani. O estudo destas mini-proteínas cíclicas vegetais é pouco explorado ainda. Os dados deste trabalho e de outros em andamento serão importantes para entender o papel destes produtos naturais em alguns táxons, especialmente de ambientes tropicais, onde os relatos são escassos. Adicionalmente, são atribuídas a esta classe de substâncias várias propriedades farmacológicas interessantes, sendo importante incluí-las na prospecção por substâncias de interesse farmacológico estudadas pelo nosso grupo.

Os galhos e folhas de *N. orchidiflora* foram analisados evidenciando o acúmulo de uma gama de ciclotídeos do tipo bracelete. Frações ricas em ciclotídeos de galhos e folhas de *N. orchidiflora* foram obtidas e dessas, foram realizados os isolamentos e purificações de nove compostos.

Dos galhos de *N. orchidiflora* foram identificados os ciclotídeos com massas: 3180,416 (Nor B), 3282,472 (Nor C), 3249,474 (Nor D), 3171,436 (Nor E), 3184,358, e 3282,509. Quatro deles foram caracterizadas com o auxilio das reações de redução/alquilação, digestão enzimática, Espectrometria de Massas MALDI-(+)-TOF-MS e MS/MS e Análise de Aminoácidos, a saber:

- **Nor B**, com 30 aminoácidos e massa molecular 3180,416 Da, inédito, e primeiro ciclotídeo presente nos galhos da espécie *Noisettia orchidiflora* (Violaceae).
- **Nor C**, com 31 aminoácidos e massa molecular 3282,472 Da, inédito.
- **Nor D**, com 31 aminoácidos e massa molecular 3249,474 Da, inédito.
- **Nor E**, com 31 aminoácidos e massa molecular 3171,436 Da, inédito.

Das folhas da espécie *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Gingins foi reisolado o ciclotídeo 3171,470 (Nor E), também presente nos galhos, assim como outros dois ciclotídeos ainda não sequenciados até o momento: 3282,529; 3154,333. Nor E mostrou ser o ciclotídeo em maior concentração nas folhas.

Além do isolamento e caracterização dessas moléculas, este trabalho contribuiu com o desenvolvimento de uma nova metodologia de separação por

HPLC com estabelecimento da temperatura em 55°C, ainda não descrita na literatura, evidenciando a importância do estudo também do ponto de vista de separação desta classe de substâncias. Esta variável evidencia também a relevância de se estabelecer estudos experimentais sobre métodos ainda não publicados na literatura que resultem numa melhor maneira de separar peptídeos em misturas complexas, tendo em conta as mudanças nos parâmetros de HPLC usados nas separações. O fato de um aumento de temperatura influenciar na resolução dos perfis cromatográficos das misturas de ciclotídeos certamente favorecerá futuros estudos de isolamento e purificação de ciclotídeos isolados de espécies da biodiversidade brasileira.

REFERÊNCIAS

ANJANEYA, S. R. et al. Lysine-rich cyclotides: a new subclass of circular knotted proteins from Violaceae. **ACS Chemical Biology**, v. 10, p. 2491-2500, Aug. 2015.

ARNISON, P. G. et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. **Natural Products Report**, v. 30, n. 1, p. 108-160, 2013.

BERNARDI, C. R. et al. Preparo de hidrolisados protéicos para a análise de aminoácidos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 317-322, 2003.

BURMAN, R. et al. Chemistry and biology of cyclotides: circular plant peptides outside the box. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 724-736, Feb. 2014.

BURMAN, R. et al. Distribution of circular proteins in plants: large-scale mapping of cyclotides in the Violaceae. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, Oct. 2015. doi:10.3389/fpls.2015.00855.

CLAESON, P. et al. Fractionation protocol for the isolation of polypeptides from plant biomass. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 1, p. 77-81, Jan. 1998.

COLGRAVE, M. L. et al. The anthelmintic activity of the cyclotides: natural variants with enhanced activity. **Chembiochem**, v. 9, n. 12, p. 1939-1945, July 2008.

CRAIK, D. J.; DALY, N. L.; WAINE, C. The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. **Toxicon**, v. 39, n. 1, p. 43-60, Jan. 2001.

CRAIK, D. J. et al. Plant cyclotides: a unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, n. 5, p. 1327-1336, Dec. 1999.

CRAIK, D. J. et al. Cyclotide isolation and characterization. **Methods in Enzymology**, v. 516, p. 37-62, 2012.

DALY, D. C.; SILVEIRA, M.; FERREIRA, E. J. L. **Florística e botânica econômica do Acre, Brasil**. Disponível em: <http://www.nybg.org/bsci/acre/title.html>. Acesso em: 25 jul. 2015.

DALY, N. L. Kalata B8, a novel antiviral circular protein, exhibits conformational flexibility in the cystine knot motif. **Biochemistry Journal**, v. 393, n. 3, p. 619-626, Feb. 2006.

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

ENPING, H. et al. Novel cyclotides from *Hedyotis diffusa* induce apoptosis and inhibit proliferation and migration of prostate cancer cells. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 3, p. 4059-4065, Mar. 2015.

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

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

GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY. ***Noisettia* Kunth**. Copenhagen, 2013. Disponível em: <http://www.gbif.org/species/7296317>. Acesso em: 28 jul. 2015.

GÖRANSSON, U. et al. Novel strategies for isolation and characterization of cyclotides: the discovery of bioactive macrocyclic plant polypeptides in the Violaceae. **Current Protein and Peptides Science**, v. 5, n. 5, p. 317-329, May 2004.

GRUBER, C. W. et al. Distribution and evolution of circular miniproteins in flowering plants. **The Plant Cell**, v. 20, n. 9, p. 2471-2483, Sept. 2008.

GUSTAFSON, K. R. et al. Circulins A and B: novel HIV-inhibitory macrocyclic peptides from the tropical tree *Chassalia parvifolia*. **Journal of American Chemical Society**, v. 116, p. 9337-9338, May 1994.

GUZMAN-RODRIGUEZ, J. J. et al. Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/73508715>. Acesso em: 12 jan. 2016.

HALLOCK, Y. F. et al. Cycloviolins A-D, anti-HIV macrocyclic peptides from *Leonia cymosa*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, p. 124-128, Jan. 2000.

HE, W. et al. Isolation and characterization of cytotoxic cyclotides from *Viola philippica*. **Peptides**, v. 32, p. 1719-1723, June 2011.

HENRIQUES, S. et al. The prototypic cyclotide kalata b1has a unique mechanism of entering cells. **Chemistry & Biology**, v. 22, p. 1087-1097, Aug. 2015.

HERNANDEZ, J-F. et al. Squash trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* exhibit an atypical macrocyclic structure. **Biochemistry**, v. 39, p. 5722-5730, Mar. 2000.

HERRMANN, A. et al. The alpine violet, *Viola biflora*, is a rich source of cyclotides with potent cytotoxicity. **Phytochemistry**, v. 69, n. 4, p. 939-952, Jan. 2008.

IRELAND, D. C.; COLGRAVE, M. L.; CRAIK, D. J. A novel suite of cyclotides from *Viola odorata*: sequence variation and the implications for structure, function and stability. **Journal of Biochemistry**, v. 400, n. 1, p. 1-12, July 2006.

JENNINGS, C. et al. Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 10614-10619, 2001.

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

LINDHOLM, P. et al. Cyclotides: a novel type of cytotoxic agents. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, n. 6, p. 365-369, Apr. 2002.

MATSUMOTO, T.; NISHIMURA, K.; TAKEYA, K. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 6, p. 857-860, June 2002.

MOLLICA, A. et al. Cyclotides: a natural combinatorial peptide library or a bioactive sequence player? **Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 575-580, Sept. 2014.

MUNZINGER, J. K. et al. *Hekkingia* (Violaceae), a new arborescent violet genus from French Guiana, with a key to genera in the family. **Systematic Botany**, v. 28, n. 2, p. 345-351, Apr. 2003.

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

PARK, S. et al. Cyclotide structure-activity relationships: qualitative and quantitative approaches linking cytotoxic and anthelmintic activity to the clustering of physicochemical forces. **PLoS One**, v. 9, n. 3, Mar. 2014. doi:10.1371/journal.pone.0091430.

PAULA-SOUZA, J. *Violaceae*. In: LISTA de espécies da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB247>. Acesso em: 20 jul. 2014

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012. 700 p.

PICCHI, D. G. et al. Peptídeos cíclicos de biomassa vegetal: características, diversidade, biossíntese e atividades biológicas. **Quimica Nova**, v. 32, n. 5, p. 1262-1277, set. 2009.

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

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

PINTO, M. F. S. et al. Cyclotides: from gene structure to promiscuous multifunctionality. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 40-53, Jan. 2012.

PLAN, M. R. R. et al. The cyclotide fingerprint in *Oldenlandia affinis*: elucidation of chemically modified, linear and novel macrocyclic peptides. **Chembiochem**, v. 8, n. 9, p. 1001-1111, Feb. 2007.

PLAN, M. R. R. et al. Backbone cyclised peptides from plants show molluscicidal activity against the rice pest *Pomacea canaliculata* (golden apple snail). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 13, p. 5237-5241, June 2008.

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

PRANTING, M. et al. The cyclotide cycloviolacin O2 from *Viola odorata* has potent bactericidal activity against Gram-negative bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 1964-1971, June 2010.

SAETHER, O. et al. Elucidation of the primary and three dimensional structure of the uterotonic polypeptide Kalata B1. **Biochemistry**, v. 34, p. 4147-4158, Dec. 1995.

SANGPHUKIEO, A. et al. Computational design of hypothetical new peptides based on a cyclotide scaffold as hiv gp120 inhibitor. **PLoS One**, v. 10, n. 10, Oct. 2015. doi:10.1371/journal.pone.0091430.

SEWALD, N.; JAKUBE, H. **Peptides**: Chemistry and Biology. 2nd ed. Weinlein: Wiley-VCH, c 2009. 594 p.

SILVA, R. C. P. et al. Propagação vegetativa de ipeca-branca (*Hybanthus calceolaria* (L.) Schulze- Menz- Violaceae) utilizando diferentes substratos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 6, n. 3, p. 186-191, jul. 2011.

SLAZAK, B. et al. Exogenous plant hormones and cyclotide expression in *Viola uliginosa* (Violaceae). **Phytochemistry**, v. 117, p. 527-536, July 2015.

TAM, J. P. et al. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 16, p. 8913-8918, Aug. 1999.

TAN, N. H.; ZHOU, J. Plant cyclopeptides. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 3, p. 840-895, Fev. 2006.

TANG, J. et al. Isolation and characterization of bioactive cyclotides from *viola labridorica*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, n. 11, p. 2287-2295, Mar. 2010.

TRABI, M.; CRAIK, D. J. Circular proteins - no end in sight. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 3, p. 132-138, Mar. 2002.

TRABI, M.; CRAIK, D. J. Tissue-specific expression of head-to-tail cyclized xminiproteins in Violaceae and structure determination of the root cyclotide *Viola hederacea* root cyclotide1. **Plant Cell**, v. 16, n. 8, p. 2204-2216, Aug. 2004.

WANG, C. K. et al. Anti-HIV cyclotides from the chinese medicinal herb *Viola yedoensis*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 1, p. 47-52, 2008.

WANG, C. K. et al. **Cybase**: a database of cyclic protein sequences and structures, with applications in protein discovery and engineering. Brisbane. Disponivel em: <http://www.cybase.org.au/>. Acesso em: 10 dez. 2015.

WHITE, C. J.; YUDIN, A. J. Contemporary strategies for peptide macrocyclization. **Nature Chemistry**, v. 3, n. 7, p, 509-524, July 2011.

WHITERHUP, K. M. et al. Cyclopsychotride A, a biologically active, 31-residue cyclic peptide isolated from *Psychotria longipes*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 12, p. 1619-1625, Dec. 1994.

YESHAK, M. Y. et al. Optimization of cyclotide extraction parameters. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 4, p. 776-781, Sept. 2012.

ZHANG, J. et al. Identification of two suites of cyclotide precursor genes from metallophyte *Viola baoshanensis*: cDNA sequence variation, alternative RNA splicing and potential cyclotide diversity. **Gene**, v. 431, p. 23-32, Nov. 2008.

ZHANG, J. et al. Transcriptomic screening for cyclotides and other cysteine-rich proteins in the metallophyte *Viola baoshanensis*. **Journal of Plant Physiology**, v. 178, p. 17-26, Feb. 2015.